

## Sellülaz Enziminin Buğday Samanının Besleme Değeri, *in vitro* Sindirimi ve Mikrobiyal Protein Üretimi Üzerine Etkileri <sup>[1]</sup><sup>[2]</sup>

Hatice KALKAN \*  İsmail FİLYA \*

[1] Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2004/50 proje numarasıyla desteklenmiştir

[2] İlk isim yazarın doktora tezinden hazırlanmıştır

\* Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, 16059 Görükle, Bursa - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-4246

### Özet

Bu araştırmada, buğday (*Triticum aestivum* L.) samanını %40 kuru madde (KM) içerecek şekilde, *Trichoderma viride* kaynaklı sellülazla %0, 0.2, 0.4, 0.6 ve 0.8 dozlarında (KM'de), kontrol ve uygulama başına 3 paralelli olarak işlendikten sonra cam kavanozlara silolanarak oda sıcaklığı (22°C) ve 40°C'de 30 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Buğday samanının farklı dozlarda sellülaz enzimiyle işlenmesi sonucunda nötr deterjanda çözünmeyen lif (NDF), hemisellüloz ve sellüloz içeriklerinde düşüşler belirlenmiş, suda çözünebilir karbonhidrat (ŞÇK), laktik asit ve metabolik enerji (ME) içerikleri ise artmıştır (P<0.05). *In vitro* gaz üretimi sonucunda elde edilen parametrelerden, en yüksek gaz üretimi (GÜ), kuru madde sindirilebilirliği (KMS) ve gerçek organik madde sindirilebilirliği (GOMS) değerleri sırasıyla; 23.00 ml, %24.30 ve 33.40 (KM'de) olarak 40°C'de %0.8 dozunda işleme sonucunda, mikrobiyal protein üretimi (MPÜ) ise 99.40 mg (KM'de) değeriyle 40°C'de %0.2 dozunda yapılan işleme sonucunda saptanmıştır (P=0.000). Araştırma sonucunda besin maddeleri, hücre duvarı bileşenleri ve *in vitro* sindirilebilirlik parametrelerinde saptanan gelişmeler dikkate alındığında, fibrolitik enzim kullanımının buğday samanının besleme değerini artırdığı ve en iyi sonuçların 40°C sıcaklık uygulanarak sellülazla yapılan işlemlerin en yüksek dozlarında (%0.8) alındığı belirlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Fibrolitik enzim, Sellülaz, Buğday samanı, *in vitro* sindirilebilirlik, Mikrobiyal protein üretimi

## Effects of Cellulase Enzyme on Nutritive Value, *in vitro* Digestion Characteristics and Microbial Biomass Production of Wheat Straw

### Summary

Wheat straw (*Triticum aestivum* L.) was treated by using cellulase from *Trichoderma viride* at 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8% doses (dry matter (DM) basis) to have straw containing 40% DM. After this process was performed in triplicate for each control and experimental groups, samples ensiled in glass jars were incubated at room temperature (22°C) and 40°C for 30 days. As a result of enzyme treatment, neutral detergent fiber (NDF), hemicellulose and cellulose contents of wheat straws were decreased but water soluble carbohydrate (WSC), lactic acid and metabolizable energy contents (ME) were increased (P<0.05). While significant increases were determined on *in vitro* gas production (GP), dry matter digestibility (DMD) and true organic matter digestibility (TOMD) parameters of wheat straws as 23.00 ml, 24.30 and 33.40% (in DM), respectively at 40°C of 0.8% cellulase treatments, microbial biomass production (MBP) was determined as 99.40 mg (in DM) at 40°C of 0.2% cellulase treatment (P=0.000). In conclusion, when the improvements in the nutrient, cell wall component, and *in vitro* digestibility were considered, it was determined that the use of fibrolytic enzyme increased the nutritive value of wheat straw. The best results were obtained from higher doses of cellulase (0.8%) treatments at 40°C.

**Keywords:** Fibrolytic enzyme, Cellulase, Wheat straw, *in vitro* digestion, Microbial biomass production

### GİRİŞ

Buğday, çok eski çağlardan beri bilinen ve büyük ölçüde insan gıdası olarak kullanılmak üzere, tüm dünyada çok geniş alanlarda ekilerek tarımı yapılan monokotiledon

bir bitkidir. Üretilen her 1 kg buğday danesi, yaklaşık 1 kg saman üretimini de beraberinde getirmektedir. Ülkemizde yıllık yaklaşık 34.68 milyon ton olan saman üretiminin yak-



İletişim (Correspondence)



+90 224 2941560



hkalkan@uludag.edu.tr

laşık %59.40'ını buğday samanı (20.60 milyon ton) oluşturmaktadır (dane:saman oranı 1:1) <sup>1</sup>. Buğday samanı, az miktarda protein ve mineral madde ile birlikte başlıca sellüloz, hemisellüloz ve lignin içermektedir. Bu nedenle besleme değeri düşük bir kaba yemdir.

Sellülozca zengin kaba yemlerin yem değerinin artırılmasında fiziksel, kimyasal ve biyolojik işleme yöntemleri kullanılmaktadır. Özellikle fiziksel (bitkilerin çeşitli kısımlarının ayrılması, buharla işleme, öğütme, peletleme vb.) ve kimyasal (üre, sodyum hidroksit, potasyum hidroksit gibi alkaliler ve sulu veya susuz amonyak ile işleme) işleme yöntemleri kaba yemlerin besleme değerinin artırılmasında geçmişten günümüze kadar kullanılmış olup halen de kullanılmaktadır. Ancak söz konusu işleme yöntemleri ile besleme değerinde sağlanan gelişme hiçbir zaman belirli bir düzeyin üzerine çıkamamıştır. Bu nedenle günümüzde bu alanda biyolojik yöntemlerin (bazı böcek, bakteri ve funguslarla mikrobiyal işleme, sellülaz, hemisellülaz, pektinaz ve ksilanaz ile enzimatik işleme vb.) uygulanması daha çok yaygınlaşmıştır <sup>2</sup>.

Enzimler, birçok yem hammaddesinde bulunan anti besinsel faktörleri olduğu kadar, lif bakımından zengin hücre duvarını da parçalayarak, içinde kalan nişasta, protein ve mineral maddelerden yararlanmayı da artırır. Yem hammaddesi içinde yer alan ve hayvanın endojen enzimleri tarafından genellikle parçalanmayan spesifik kimyasal bağları, yeme katılan enzimler parçalamakta, böylece daha fazla besin maddesi serbest hale geçmektedir.

Fibrolitik (hücre duvarını parçalayıcı) enzim kullanımının, besi sığırlarının canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanma etkinliği üzerine etkileri ilk olarak yaklaşık 50 yıl önce yürütülen ve 10 besi denemesini kapsayan bir çalışma sonucunda belirlenirken <sup>3</sup>, süt ineklerinde süt üretimine etkisi ilk olarak 1990'ların ortasında araştırma konusu olmuş <sup>4-6</sup> ve her iki hayvan grubunda da fibrolitik enzimlere karşı değişken sonuçlar alınmıştır.

Geçmişte yürütülen araştırmalar et sığırlarında enzim kullanımının potansiyel yararları hakkında değerli bilgiler sağlamasına rağmen, rasyonun bileşimi, enzim çeşidi, enzim aktivitesi ve enzim uygulama yöntemleri gibi faktörler, hayvanların enzimlere karşı göstereceği tepkiler konusunda aydınlatıcı olamamıştır. Daha sonraki çalışmalar özellikle bu faktörlerin etkilerini araştırmak üzere düzenlenmiştir. Enzim çeşitleri <sup>7-10</sup> uygulama dozları <sup>11,12</sup> rasyon bileşimi <sup>13</sup> enzim ürünleri <sup>10,14</sup> ve enzim uygulama yöntemleri <sup>11,15</sup> kontrollü koşullar altında birbirleriyle karşılaştırılmış ve bu çalışmalar günümüze kadar devam etmiştir.

Bu çalışmada, lignosellülozik (lignin ve selülozca zengin bitkisel üretim artıkları) materyalin besleme değerini geliştirebilmek için biyolojik bir yöntem üzerinde durulmuştur. Bu amaçla, ülkemizde ruminant beslemede çok yaygın olarak kullanılan bir kaba yem olan buğday samanı, fibrolitik bir enzim olan sellülaz ile farklı kombinasyon-

larda işlenerek, bu uygulamaların buğday samanının besleme değeri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Yem ve Hayvan Materyali

Araştırmanın yem materyalini oluşturan buğday (*Triticum aestivum* L.) samanı ve hayvan materyalini oluşturan 2 baş Holstein süt ineği, Uludağ Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi Ziraat Fakültesi Birimi'nden temin edilmiştir.

### Enzim Materyali

Buğday samanını enzimle işlemek için toz formda; *Trichoderma viride* kaynaklı sellülaz (C-9422; Sigma-Aldrich, USA. E.C. No: 232-734-4; 1,4-(1,3;1,4)-β-D-Glucan 4-glukanohidrolaz; 7000 U/g; 1 U 37°C sıcaklık ve pH:5.0 olan 2 saatlik inkübasyon sonunda sellülozdan 1.0 μmol glukozu serbest bırakmaktadır) kullanılmıştır. Enzim dozları üretici firmanın bildirdiği enzim aktiviteleri göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır.

### Enzimle İşleme

Araştırmada kullanılacak enzim dozlarının belirlenmesi amacıyla geniş bir literatür taraması yapılmıştır. Kullanılacak enzimin aktivite ve miktarları da göz önünde bulundurularak belirlenen enzim dozlarıyla bir ön deneme kurulmuştur. Ön denemeden elde edilen bulgular dikkate alınarak, araştırmada kullanılacak olan enzim dozları % 0, 0.2, 0.4, 0.6 ve 0.8 (KM'de) olarak belirlenmiştir.

Enzimle işlemede Nakashima ve ark.<sup>16</sup> tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır. Buna göre %92.87 KM içeriğine sahip buğday samanı 2.5 mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülmüştür. Buğday samanını enzimle işlemek için ilave edilecek su miktarı, samana yaklaşık %40 KM sağlanacak şekilde hesaplanmış, enzimlerin yem materyaline etkili bir şekilde dağılımını sağlamak için, saman ile su karıştırılmadan hemen önce, enzimler suda çözündürülmüş ve sonra samana püskürtülerek emdirilmiştir. Karıştırma işleminden sonra buğday samanları 110 ml'lik cam kavanozlara (Şişecam, Türkiye) 3 paralelli olarak silolanmış ve hava almamaları için kapakların etrafı silikonla kaplanarak sabitlenmiş, bir kısmı inkübatörde (Nüve EN 500, Türkiye) 40°C'de diğer kısmı ise karanlık bir ortamda oda sıcaklığında (21.8±0.22-22.3±0.18°C) tutularak, açılmadan 30 gün muhafaza edilmiştir. Bu süre sonunda kavanozlar açılarak, dijital pH-metre (Sartorius AG, Germany) ile pH'ları ölçülmüş ve enzimle işlenmiş saman örneklerinin bir kısmı; 1/10 oranında saf su ilave edilerek çalkalanıp süzülükten sonra, laboratuvar santrifüjü (Sigma 6K15 Laborzentrifugen, 12165 H Rotor, Germany) kullanılarak 14.000 devir/dak'da, 30 dak. süre ile santrifüj edilmiş ve üstte kalan berrak sıvı eppendorf tüplerine aktarılarak daha sonra yapılacak suda çözünebilir karbonhidrat (SÇK)

ve uçucu yağ asitleri (UYA) analizleri için derin dondurucuda (UĞUR BK 600, Türkiye) -30°C'de saklanmıştır. Diğer bir kısmı ise enzim aktivitesinin durdurulması amacıyla hemen etüve (Nüve FN 500, Türkiye) alınmış ve 100°C'de kurutularak kimyasal analizler için ayrılmıştır. Kurutulan örnekler laboratuvar tipi değirmende (3303 Mill, Hundunge, Sweden) 1 mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülerek kimyasal analizlere hazır hale getirilmiştir.

### ***in vitro* Gaz Üretimini Belirlenmesi ve Metabolik Enerjinin Hesaplanması**

Buğday samanının *in vitro* koşullarda rumen sıvısında sindirilebilirlik özelliklerinin değerlendirilmesinde Menke ve Steingass<sup>17</sup> tarafından bildirilen "Gaz Üretim Tekniği" kullanılmıştır. Yönteme göre rumen sıvısı ve yapay tükrük çözeltisi karışımında oluşan gaz hacimleri 3, 6, 12 ve 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda kaydedilip elde edilen veriler Ørskov ve McDonald<sup>18</sup> tarafından geliştirilen modele göre hesaplanarak gaz üretim değerleri belirlenmiştir.

Buğday samanlarının ME içerikleri, Menke ve ark.<sup>19</sup> tarafından kaba yemler için bildirilen aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Formülde megajoule (MJ) cinsinden hesaplanan ME, kcal/kg' a dönüştürülmüştür (1 MJ = 239.005736138 kcal).

$$ME \text{ (MJ/kg KM)} = 2.20 + 0.136 \times GÜ + 0.057 \times HP \text{ (R}^2 = 0.94)$$

(ME: metabolik enerji, GÜ: 200 mg kuru kaba yem örneğinin 24 saat inkübasyon süresi sonundaki net gaz üretimi, HP: % KM'de ham protein).

### ***in vitro* Kuru Madde Sindirilebilirliği (KMS), Gerçek Organik Madde Sindirilebilirliği (GOMS) ve Mikrobiyal Protein Üretimini (MPÜ) Saptanması**

Buğday samanlarının rumen bakterileri kaynaklı protein biyokütlesinin gelişmesi üzerine etkileri Blümmel ve ark.<sup>20</sup> tarafından bildirilen formül kullanılarak, Makkar ve ark.<sup>21,22</sup> tarafından bildirilen yöntemlere göre saptanmıştır. Bu amaçla, gaz üretim tekniğinde belirtilen ve kontrol, işlenmiş buğday samanları ve kör deneme başına en az 6 paralel olacak şekilde hazırlanan cam şırıngaların içerisine yem örneklerinden yaklaşık 500 mg (KM'de) tartılmış (**a**) ve üzerine 40 ml rumen sıvısı: yapay tükrük çözeltisi karışımı aktarıldıktan sonra şırıngalar 24 saat süreli bir inkübasyona bırakılmıştır.

Inkübasyon süresinin sonunda 3 adet şırınganın içeriği, darası alınmış 70 ml'lik santrifüj tüplerine (**b**) ayrı ayrı aktarılıp +4°C sıcaklıkta 14.000 devir/dak.'da 30 dak. süre ile santrifüj edilerek, tüpün içerisindeki berrak sıvıdan otomatik pipetle bir miktar alınıp üzerine koruyucu eklenmiş ve daha sonra yapılacak UYA analizleri için derin dondurucuda -30°C'de saklanmıştır. Örnek aldıktan sonra santrifüj tüpü içerisinde kalan sıvı kısım tamamen atılmıştır. Daha sonra cam şırıngalar bir dispenser (Brand Dispensette, Germany) yardımıyla 60 ml NaCl çözeltisi (4 g NaCl/L) ile

yıkayıp içeriği santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj tüplerinin diplerinde kalan kalıntının sıvı kısım ile karışabilmesi için tüpler elde iyice çalkalandıktan sonra tekrar +4°C'de 30 dak.'lık santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve üstte kalan sıvı kısım pipetle alınarak dışarı atılmıştır. Santrifüj tüpleri içerisindeki kalıntı, etüvde 105°C'de sıcaklıkta kurumaya bırakılmış ve daha sonra içerisinde kurumuş kalıntı bulunan tüplerin ağırlıkları saptanmıştır (**c**).

Sonraki aşamada geri kalan 3 şırınganın içeriği 600 ml'lik cam beherlere ayrı ayrı aktarılıp, şırıngalar dispenser kullanılarak kalıntı kalmayacak şekilde 70 ml NDF çözeltisi ile yıkanmış ve içerik behere aktarıldıktan sonra 1 saat süreyle kaynatılmıştır. Bu sürenin sonunda darası alınmış filtreli cam krozelerde (Gooch kroze, porozite: 1) (**d**) süzdürülmüştür. Krozeler 1 gece boyunca etüvde 105°C'de kurutulduktan sonra ağırlıkları saptanmıştır (**e**). Son olarak içinde NDF kalıntısı bulunan ağırlığı saptanmış krozeler 550°C'ye ayarlı kül fırınında (Nüve MF 120, Türkiye) 3.5 saat süre tutularak yakılmış ve oda sıcaklığına soğutulduktan sonra ağırlıkları saptanmıştır (**f**).

Bu işlemlerin sonunda aşağıdaki eşitlikler yardımıyla (kör inkübasyonlar sonucu elde edilen kalıntı ağırlığına göre düzeltilerek) yem örneklerinin KMS, GOMS ve MPÜ saptanmıştır. Gerçek organik madde sindirilebilirlikleri hesaplanırken cam şırınganın içine tartılmış olan örnek miktarı OM'ye göre düzeltilmiştir.

$$KMS \text{ (\%)} = (a - (c - b)) / a \times 100$$

$$GOMS \text{ (\%)} = (a - (e - f)) / a \times 100$$

$$MPÜ \text{ (mg)} = (c - b) - (e - f)$$

**a:** Örnek miktarı (mg KM), **b:** Boş santrifüj tüpü ağırlığı (g), **c:** Kurutulmuş kalıntı içeren santrifüj tüpü ağırlığı (g), **d:** Boş cam kroze ağırlığı (g), **e:** NDF kalıntısı içeren kurutulmuş cam kroze ağırlığı (g), **f:** NDF külü içeren cam kroze ağırlığı (g).

### ***Kimyasal Analizler***

Araştırmada kullanılan işlenmemiş ve sellülaz enzimiyle farklı kombinasyonlarda işlenmiş buğday samanlarının besin maddeleri içerikleri Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında AOAC<sup>23</sup> tarafından bildirilen analiz yöntemlerine göre, hücre duvarı bileşimi Van Soest ve ark.<sup>24</sup> tarafından bildirilen deterjan lif analiz yöntemlerine göre ve SÇK analizi ise Dubois ve ark.<sup>25</sup> tarafından bildirilen fenol sülfürik asit yöntemiyle saptanmıştır.

### ***Uçucu Yağ Asitleri Analizleri***

Kavanozlara silolanarak ve *in vitro* gaz üretim tekniği ile rumen sıvısı + yapay tükrük çözeltisi ile inkübasyona bırakılan işlenmemiş ve sellülaz enzimiyle farklı kombinasyonlarda işlenmiş buğday samanı örneklerinin UYA değerleri, gaz kromatografisinde (Agilent Technologies 6890N Network GC System, 7683 B Series Injector, China), kapillar kolon (Stabilwax®-DA; Crossbond "Carbowax"-PEG, asidik bileşikler için, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm df, maksimum

program sıcaklığı: 260°C) kullanılarak saptanmıştır. Kromatografin fırını 100°C'de 5 dak., ardından 10°C/dak. artışla 160°C'de 2 dak. ve son olarak 80°C/dak. artışla 5 dak. bekleme şeklinde programlanmıştır.

### İstatistik Analizler

Tesadüf parselleri deneme desenine göre yürütülen araştırmada her bir muamele için 3 tekerrür yapılmıştır. Araştırmadan elde edilen bulguların istatistiki analizinde MINITAB paket programı (MINITAB<sup>26</sup>) kullanılmış, ortalamalar arasında görülen farklılıkların önem seviyelerinin kontrolünde ise Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi'nden yararlanılmıştır (Snedecor ve Cochran<sup>27</sup>).

## BULGULAR

Araştırmanın yem materyalini oluşturan işlenmemiş buğday samanının kimyasal bileşimi, laktik asit, UYA ve etanol konsantrasyonları, hücre duvarı bileşenleri ve rumen sıvısında elde edilen GÜ, KMS, MPÜ, ME değerleri ile UYA konsantrasyonları *Tablo 1*'de verilmiştir.

Buğday samanının, oda sıcaklığı (22°C) ve 40°C'de *Trichoderma viride* kaynaklı sellülazla % 0, 0.2, 0.4, 0.6 ve 0.8 dozlarında, kontrol ve işleme başına 3 paraleli olarak (n=3) işlendikten sonra 30 gün süre ile inkübe edilmesi sonucundaki kimyasal bileşimi ile laktik asit, UYA ve etanol konsantrasyonları *Tablo 2*'de, hücre duvarı bileşenleri ise *Tablo 3*'te verilmiştir.

Araştırmanın yem materyalini oluşturan, farklı dozlarda sellülaz enzimiyle işlendikten sonra farklı sıcaklıklarda silolan buğday samanlarının, rumen sıvısında *in vitro* GÜ tekniği ile 24 saatlik 2 farklı inkübasyonu sonucunda (200 mg/KM ve 500 mg/KM örnek miktarı kullanılarak) elde edilen pH, GÜ, KMS, GOMS, MPÜ ve ME parametreleri *Tablo 4*'te; UYA konsantrasyonları ise *Tablo 5*'te verilmiştir.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

*Tablo 1*'de işlenmemiş buğday samanının kimyasal bileşimi ve rumen sıvısında elde edilen biyolojik parametreleri ile UYA kompozisyonu verilmiştir.

### Enzimle İşlenmiş Buğday Samanlarının Kimyasal Özellikleri

Araştırmada üzerinde çalışılan enzim dozu ve sıcaklık gibi işleme koşullarının, araştırılan kimyasal parametreler üzerine olan etkileri farklı düzeylerde olmuştur. *Tablo 2*'de sellülaz enzimiyle farklı doz ve sıcaklıklarda işlenen buğday samanlarının kimyasal bileşimi ile laktik asit, UYA ve etanol konsantrasyonları verilmiştir. *Tablo 2* incelendiğinde işleme koşullarından enzim dozu (P=0.000) ve inkübasyon sıcaklığının (P=0.002) buğday samanlarının pH değerleri üzerinde istatistiksel olarak etkili olduğu görülmektedir. Enzim dozu x inkübasyon sıcaklığı bakımından pH sonuçları dikkate alındığında, 40°C'de elde edilen bütün değerler, oda sıcaklığında (22°C) elde edilenlerden rakamsal olarak daha düşük bulunduğu halde, grup ortalamaları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür (P=0.145). pH değerlerinde gözlenen rakamsal düşüşler, enzimlerin hücre duvarını oluşturan sellüloz, hemisellüloz gibi yapısal polisakkaritleri parçalamasıyla açığa çıkan basit şekerlerin, homofermantatif ve heterofermantatif bakterilerin kullanımı için kaynak teşkil ettiğini ve özellikle artan enzim dozlarında pH'nın daha fazla düşmesi sonucu, fermentasyonun ilerleyen aşamalarında laktik asit bakterilerinin kullanımı için daha fazla basit şeker sağlanıp daha fazla laktik asit üretildiği için ortam asitliğinin artmasının bir sonucudur. pH değerlerindeki düşüş, Nakashima ve ark.<sup>16</sup>, Gupta ve Pradhan<sup>28</sup> ile Filya ve ark.<sup>29,30</sup> tarafından da bildirilmiştir.

Suda çözünebilir karbonhidrat içerikleri dikkate alındı-

**Tablo 1.** İşlenmemiş buğday samanının kimyasal bileşimi ile rumen sıvısında elde edilen *in vitro* fermentasyon özellikleri (KM'de)

**Table 1.** Chemical and *in vitro* fermentation characteristics (DM basis) of untreated wheat straw

Kimyasal Analizler	Buğday Samanı	Kimyasal Analizler	Buğday Samanı
pH	6.62	pH*	6.70
Kuru madde (%)	92.87	Gaz üretimi* (ml)	14.92
Suda çözünebilir karbonhidrat (%)	3.90	Kuru madde sindirilebilirliği** (%)	16.66
Ham protein (%)	2.10	Gerçek organik madde sindirilebilirliği** (%)	21.15
Laktik asit (mg/kg)	-	Mikrobiyal protein üretimi** (mg)	44.90
Asetik asit (mg/kg)	53.28	Metabolik enerji* (kcal/kg)	1039.50
Bütirik asit (mg/kg)	0.65	Asetik asit** (%)	53.93
Etanol (mg/kg)	-	Propiyonik asit** (%)	27.77
Nötr deterjanda çözünmeyen lif (%)	81.73	İzobütirik asit** (%)	0.80
Asit deterjanda çözünmeyen lif (%)	53.27	Bütirik asit** (%)	14.17
Asit deterjanda çözünmeyen lignin (%)	12.16	İzovalerik asit** (%)	1.31
Hemisellüloz (%)	28.46	Valerik asit** (%)	2.02
Sellüloz (%)	41.11	Toplam uçucu yağ asitleri** (mmol/L)	68.37

\* 200 mg/KM örneğin rumen sıvısında 24 saatlik inkübasyonu sonucunda saptanmıştır; \*\* 500 mg/KM örneğin rumen sıvısında 24 saatlik inkübasyonu sonucunda saptanmıştır



**Tablo 2.** Sellülaaz enzimiyle işlenen buğday samanlarının kimyasal bileşimi ve fermantasyon özellikleri (KM'de)**Table 2.** Chemical composition and fermentation characteristics (DM basis) of cellulase treated wheat straw

Etkiler	pH	Havadaki Kuru, (%)	SÇK, (%)	HP, (%)	Laktik Asit, (mg/kg)	Asetik Asit, (mg/kg)	Bütirik Asit, (mg/kg)	Etanol, (mg/kg)	
<b>Doz</b>									
0	5.12 <sup>a</sup>	38.48 <sup>c</sup>	0.64 <sup>e</sup>	1.95 <sup>c</sup>	-	153.00 <sup>b</sup>	101.33 <sup>a</sup>	0.07 <sup>c</sup>	
0.2	4.48 <sup>b</sup>	40.74 <sup>bc</sup>	5.19 <sup>d</sup>	2.41 <sup>b</sup>	2.14 <sup>d</sup>	109.30 <sup>e</sup>	44.59 <sup>b</sup>	0.11 <sup>a</sup>	
0.4	4.35 <sup>c</sup>	42.94 <sup>a</sup>	6.46 <sup>c</sup>	2.55 <sup>a</sup>	2.68 <sup>c</sup>	118.30 <sup>d</sup>	8.22 <sup>c</sup>	0.09 <sup>b</sup>	
0.6	4.23 <sup>d</sup>	41.77 <sup>ab</sup>	8.72 <sup>b</sup>	2.37 <sup>b</sup>	4.95 <sup>b</sup>	150.10 <sup>c</sup>	3.61 <sup>d</sup>	0.09 <sup>b</sup>	
0.8	4.14 <sup>e</sup>	42.42 <sup>ab</sup>	9.56 <sup>a</sup>	2.55 <sup>a</sup>	6.01 <sup>a</sup>	245.70 <sup>a</sup>	1.42 <sup>e</sup>	0.10 <sup>ab</sup>	
<i>SH</i>	<b>0.018</b>	<b>0.481</b>	<b>0.123</b>	<b>0.019</b>	<b>0.020</b>	<b>0.423</b>	<b>0.247</b>	<b>0.005</b>	
<i>P</i>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	
<b>Sıcaklık</b>									
22°C	4.51 <sup>a</sup>	39.83 <sup>b</sup>	5.52 <sup>b</sup>	2.21 <sup>b</sup>	1.74 <sup>b</sup>	136.90 <sup>b</sup>	53.38 <sup>a</sup>	0.10 <sup>a</sup>	
40°C	4.42 <sup>b</sup>	43.12 <sup>a</sup>	6.70 <sup>a</sup>	2.51 <sup>a</sup>	4.57 <sup>a</sup>	173.60 <sup>a</sup>	10.29 <sup>b</sup>	0.08 <sup>b</sup>	
<i>SH</i>	<b>0.011</b>	<b>0.304</b>	<b>0.078</b>	<b>0.012</b>	<b>0.012</b>	<b>0.268</b>	<b>0.156</b>	<b>0.003</b>	
<i>P</i>	<b>0.002</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	
<b>Doz x Sıcaklık</b>									
0	22°C	5.14	38.45	0.61 <sup>h</sup>	1.84 <sup>g</sup>	-	129.00 <sup>e</sup>	151.21 <sup>a</sup>	0.05 <sup>gh</sup>
	40°C	5.10	40.51	0.68 <sup>h</sup>	2.05 <sup>f</sup>	-	177.10 <sup>b</sup>	51.45 <sup>c</sup>	0.09 <sup>cd</sup>
0.2	22°C	4.56	39.36	4.06 <sup>g</sup>	2.23 <sup>e</sup>	1.05 <sup>g</sup>	106.60 <sup>i</sup>	89.18 <sup>b</sup>	0.08 <sup>de</sup>
	40°C	4.40	42.12	6.31 <sup>e</sup>	2.58 <sup>c</sup>	3.23 <sup>d</sup>	111.90 <sup>h</sup>	*	0.13 <sup>ab</sup>
0.4	22°C	4.38	40.74	5.71 <sup>f</sup>	2.26 <sup>e</sup>	1.78 <sup>f</sup>	121.10 <sup>f</sup>	16.43 <sup>d</sup>	0.10 <sup>c</sup>
	40°C	4.31	45.15	7.20 <sup>d</sup>	2.85 <sup>a</sup>	3.56 <sup>c</sup>	115.40 <sup>g</sup>	*	0.07 <sup>ef</sup>
0.6	22°C	4.27	39.88	8.30 <sup>c</sup>	2.31 <sup>e</sup>	2.32 <sup>e</sup>	152.20 <sup>c</sup>	7.22 <sup>e</sup>	0.12 <sup>b</sup>
	40°C	4.20	43.65	9.15 <sup>b</sup>	2.43 <sup>d</sup>	7.58 <sup>b</sup>	147.90 <sup>d</sup>	*	0.06 <sup>fg</sup>
0.8	22°C	4.18	40.69	8.96 <sup>b</sup>	2.43 <sup>d</sup>	3.55 <sup>c</sup>	175.60 <sup>b</sup>	2.84 <sup>f</sup>	0.15 <sup>a</sup>
	40°C	4.09	44.15	10.17 <sup>a</sup>	2.66 <sup>b</sup>	8.46 <sup>a</sup>	315.80 <sup>a</sup>	*	0.05 <sup>h</sup>
<i>SH</i>	<b>0.025</b>	<b>0.680</b>	<b>0.174</b>	<b>0.027</b>	<b>0.028</b>	<b>0.598</b>	<b>0.349</b>	<b>0.006</b>	
<i>P</i>	<b>0.145</b>	<b>0.484</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	

<sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup> Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ( $P < 0.05$ ); *SH*: standart hata; *P*: *P* değeri; *SÇK*: suda çözünebilir karbonhidrat; *HP*: ham protein

ğında, artan enzim dozlarıyla birlikte SÇK içeriklerinde de önemli artışlar gözlenmiş ( $P=0.000$ ) olup, 40°C'de elde edilen grup ortalamaları 22°C'de elde edilenlerden daha yüksek bulunmuştur ( $P=0.000$ ). Enzim dozu x inkübasyon sıcaklığı bakımından ise en yüksek SÇK sonuçları her iki inkübasyon sıcaklığında sellülaaz enziminin en yüksek dozlarında (22°C'de %8.96; 40°C'de %10.17) elde edilmiştir ( $P=0.000$ ). Suda çözünebilir karbonhidratların başlangıç ve kontrol gruplarına göre önemli bir artış göstermesi sellülaaz tarafından hücre duvarı kapsamının hidrolize edilerek basit şekere dönüştürülmesinin bir sonucudur. Suda çözünebilir karbonhidrat içeriğinde görülen artış Nakashima ve ark.<sup>16</sup> ile Rodrigues ve ark.'nın<sup>31</sup> bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

Laktik asit konsantrasyonları bakımından *Tablo 2* incelendiğinde de işleme koşullarının buğday samanlarının laktik asit konsantrasyonları üzerindeki etkilerinin önemli olduğu görülmektedir. En yüksek laktik asit konsantrasyonu, her iki inkübasyon sıcaklığında sellülaaz enziminin en yüksek dozlarında (22°C'de 3.55 mg/kg; 40°C'de 8.46 mg/kg) elde edilirken ( $P=0.000$ ), uçucu yağ asitlerinden asetik

asit üretiminin baskın olduğu fermantasyonda, en yüksek asetik asit düzeyleri de her iki inkübasyon sıcaklığında yine %0.8 sellülaazla işlenmiş gruplarda saptanmıştır (22°C'de 175.58 mg/kg; 40°C'de 315.82 mg/kg;  $P=0.000$ ). Laktik asit konsantrasyonundaki artışlar Nakashima ve ark.<sup>16</sup> ile Rodrigues ve ark.'nın<sup>31</sup> bulgularıyla uyumlu bulunmuştur.

### **Enzimle İşlenmiş Buğday Samanlarının Hücre Duvarı Kompozisyonu**

Sellülaaz enzimiyle işlemenin buğday samanının kimyasal kompozisyonu üzerine olan etkileri *Tablo 3*'te gösterilmiştir. *Tablo 3*'te de görüldüğü gibi, sellülaaz enziminin artan dozları ( $P=0.000$ ) ve inkübasyon sıcaklığının ( $P=0.000$ ) etkisiyle birlikte buğday samanının NDF içeriği kademeli olarak azalmıştır. Enzim dozu x inkübasyon sıcaklığının ikili etkisi dikkate alındığında, en düşük NDF içeriği 22°C ve 40°C sıcaklıkta %0.8 dozunda sellülaaz ile işlenmiş gruplarda görülmüştür ( $P=0.023$ ). Hücre duvarını oluşturan sellüloz bileşeni bakımından enzim dozu ( $P=0.000$ ) ve inkübasyon sıcaklığının ( $P=0.000$ ) tekil etkilerinin istatistiksel olarak önemli olduğunun gözlenmesine rağmen, enzim dozu x

**Tablo 3.** Sellülaaz enzimiyle işlenen buğday samanlarının hücre duvarı bileşenleri (KM'de, %)   
**Table 3.** Cell wall composition (% of DM) of cellulase treated wheat straw

Etkiler		NDF	ADF	ADL	Hemisellüloz	Sellüloz
<b>Doz</b>						
	0	85.54 <sup>a</sup>	55.63 <sup>a</sup>	12.61 <sup>a</sup>	29.91 <sup>a</sup>	43.02 <sup>a</sup>
	0.2	79.02 <sup>b</sup>	51.36 <sup>b</sup>	11.67 <sup>b</sup>	27.66 <sup>b</sup>	39.69 <sup>b</sup>
	0.4	77.34 <sup>c</sup>	49.93 <sup>c</sup>	11.29 <sup>bc</sup>	27.41 <sup>b</sup>	38.64 <sup>c</sup>
	0.6	75.19 <sup>d</sup>	48.02 <sup>d</sup>	11.20 <sup>bc</sup>	27.17 <sup>b</sup>	36.82 <sup>d</sup>
	0.8	73.33 <sup>e</sup>	47.31 <sup>d</sup>	10.73 <sup>c</sup>	26.02 <sup>c</sup>	36.58 <sup>d</sup>
	<i>SH</i>	<b>0.211</b>	<b>0.180</b>	<b>0.182</b>	<b>0.234</b>	<b>0.210</b>
	<i>P</i>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
<b>Sıcaklık</b>						
	22°C	78.93 <sup>a</sup>	50.41	11.06 <sup>b</sup>	28.52 <sup>a</sup>	39.35 <sup>a</sup>
	40°C	77.24 <sup>b</sup>	50.49	11.94 <sup>a</sup>	26.75 <sup>b</sup>	38.55 <sup>b</sup>
	<i>SH</i>	<b>0.133</b>	<b>0.114</b>	<b>0.115</b>	<b>0.148</b>	<b>0.133</b>
	<i>P</i>	<b>0.000</b>	<b>0.634</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
<b>Doz x Sıcaklık</b>						
0	22°C	85.99 <sup>a</sup>	55.98	12.69 <sup>a</sup>	30.01 <sup>a</sup>	43.29
	40°C	85.09 <sup>b</sup>	55.28	12.54 <sup>ab</sup>	29.81 <sup>a</sup>	42.74
0.2	22°C	80.53 <sup>c</sup>	51.45	11.25 <sup>de</sup>	29.08 <sup>ab</sup>	40.20
	40°C	77.51 <sup>d</sup>	51.27	12.09 <sup>abc</sup>	26.24 <sup>c</sup>	39.18
0.4	22°C	78.13 <sup>d</sup>	49.67	10.60 <sup>ef</sup>	28.46 <sup>b</sup>	39.07
	40°C	76.56 <sup>e</sup>	50.18	11.98 <sup>abcd</sup>	26.38 <sup>c</sup>	38.20
0.6	22°C	76.02 <sup>e</sup>	47.91	10.61 <sup>ef</sup>	28.11 <sup>b</sup>	37.30
	40°C	74.36 <sup>f</sup>	48.12	11.79 <sup>bcd</sup>	26.24 <sup>c</sup>	36.33
0.8	22°C	73.99 <sup>f</sup>	47.03	10.13 <sup>f</sup>	26.96 <sup>c</sup>	36.90
	40°C	72.67 <sup>g</sup>	47.58	11.34 <sup>cd</sup>	25.09 <sup>d</sup>	36.24
	<i>SH</i>	<b>0.298</b>	<b>0.255</b>	<b>0.258</b>	<b>0.331</b>	<b>0.297</b>
	<i>P</i>	<b>0.023</b>	<b>0.115</b>	<b>0.050</b>	<b>0.011</b>	<b>0.918</b>

<sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ( $P < 0.05$ ); *SH*: standart hata; *P*: *P* değeri; *NDF*: nötr deterjanda çözünmeyen lif; *ADF*: asit, deterjanda çözünmeyen lif; *ADL*: asit deterjanda çözünmeyen lignin

inkübasyon sıcaklığının ikili etkisi dikkate alındığında, ortalamalar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ( $P=0.918$ ). Hemisellüloz içerikleri incelendiğinde ise enzim dozu ( $P=0.000$ ) ve inkübasyon sıcaklığının ( $P=0.000$ ) etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Her iki inkübasyon sıcaklığındaki en düşük hemisellüloz değerleri, sellülazın en yüksek dozunda (%0.8) yapılan işlemlerden elde edilmiştir ( $P=0.011$ ). Rakamsal olarak en düşük hemisellüloz değerleri 22°C ve 40°C'de %0.8 oranında sellülaaz enzimiyle işlenmiş gruplardan elde edilirken, her iki inkübasyon sıcaklığında sırasıyla %0.4 ve 0.6 dozunda yapılan işlemler sonucunda elde edilen değerler birbirine çok yakın bulunmuştur ( $P=0.011$ ).

Araştırmada kullanılan sellülaaz enzimi, hücre duvarının parçalanabilirliğini artırarak sellüloz ve hemisellüloz gibi yapısal polisakaritlerin basit şekerlere dönüşümünü sağlamış ve böylece buğday samanının NDF, ADF, ADL, hemisellüloz ve sellüloz içeriklerinde azalmaya yol açmıştır. Bazı gruplarda başlangıç materyalinden yüksek sonuçların elde edilmesinin nedeni sellüloz ve hemisellülozun hidrolizi sonrasında serbest kalan basit şekerlerin yer değiştirerek

tekrar kümeleşmesi olmuştur. Nitekim, Gupta ve Pradhan<sup>28</sup> ile Rodrigues ve ark.<sup>31</sup> fibrolitik enzimlerle NDF, ADF ve ADL içeriklerinde düşüş bildirirken, Rodrigues ve ark.<sup>10</sup>, Yang ve ark.<sup>11</sup>, Pinos-Rodriguez ve ark.<sup>13</sup> ile Nakashima ve ark.<sup>16</sup> tarafından yürütülen çalışmalarda da NDF içeriklerinde düşüşler meydana geldiği bildirilmiştir. Bununla beraber farklı sonuçlar veren araştırmalar da yayınlanmıştır. Reddish ve Kung<sup>12</sup> tarafından NDF içeriklerinde önemli bir azalma saptanamamasına karşın ZoBell ve ark.<sup>32</sup> tarafından önemli artışlar tespit edilmiştir.

*Tablo 2*'deki UYA verileri, *Tablo 3*'te verilen hücre duvarı bileşiminde gerçekleşen değişimlerle uyumlu niteliktedir. Başka bir deyişle fermantasyonda asetik asitteki artış eğilimi, lif sindirilebilirliğindeki artışla uyumlu olup, bunda mikrobiyal popülasyon ya da substratın parçalanması sırasında uğradığı metabolik değişiklikler etkili olmuştur.

Kimyasal analiz parametrelerinden SÇK içeriklerindeki artışlar da (*Tablo 2*), hücre duvarı bileşenlerinden NDF içeriğindeki düşüşleri (*Tablo 3*) destekler niteliktedir. Elde edilen bulgular sonucunda bu iki parametre arasında doğ-

**Tablo 4.** Sellülaz enzimiyle işlenen buğday samanlarının rumen sıvısında 24 saatlik inkübasyonları sonucu elde edilen pH ile KM'deki GÜ, KMS, GOMS, MPÜ ve ME değerleri

**Table 4.** *in vitro* ruminal fermentation characteristics (DM basis) of cellulase treated wheat straw at 24 h

Etkiler	pH	GÜ, ml	KMS, %	GOMS, %	MPÜ, mg	ME, kcal/kg	
<b>Doz</b>							
0	6.74 <sup>a</sup>	12.46 <sup>d</sup>	10.82 <sup>e</sup>	15.08 <sup>e</sup>	42.56 <sup>d</sup>	957.50 <sup>d</sup>	
0.2	6.70 <sup>b</sup>	15.66 <sup>c</sup>	12.95 <sup>d</sup>	21.67 <sup>d</sup>	87.16 <sup>a</sup>	1067.70 <sup>c</sup>	
0.4	6.68 <sup>bc</sup>	17.43 <sup>b</sup>	16.26 <sup>c</sup>	24.68 <sup>c</sup>	84.21 <sup>ab</sup>	1127.10 <sup>b</sup>	
0.6	6.67 <sup>c</sup>	18.15 <sup>b</sup>	19.81 <sup>b</sup>	27.75 <sup>b</sup>	79.35 <sup>bc</sup>	1148.20 <sup>b</sup>	
0.8	6.66 <sup>c</sup>	20.19 <sup>a</sup>	21.67 <sup>a</sup>	29.40 <sup>a</sup>	77.25 <sup>c</sup>	1216.60 <sup>a</sup>	
<i>SH</i>	<b>0.006</b>	<b>0.296</b>	<b>0.195</b>	<b>0.164</b>	<b>1.486</b>	<b>9.532</b>	
<i>P</i>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	
<b>Sıcaklık</b>							
22°C	6.64 <sup>b</sup>	14.46 <sup>b</sup>	15.07 <sup>b</sup>	21.37 <sup>b</sup>	63.02 <sup>b</sup>	1026.10 <sup>b</sup>	
40°C	6.74 <sup>a</sup>	19.10 <sup>a</sup>	17.54 <sup>a</sup>	26.06 <sup>a</sup>	85.19 <sup>a</sup>	1180.80 <sup>a</sup>	
<i>SH</i>	<b>0.004</b>	<b>0.186</b>	<b>0.018</b>	<b>0.104</b>	<b>0.940</b>	<b>6.028</b>	
<i>P</i>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	
<b>Doz x Sıcaklık</b>							
0	22°C	6.75 <sup>ab</sup>	11.89 <sup>e</sup>	10.31 <sup>h</sup>	14.25 <sup>i</sup>	39.40 <sup>g</sup>	937.30 <sup>e</sup>
	40°C	6.73 <sup>bc</sup>	13.04 <sup>e</sup>	11.33 <sup>g</sup>	15.90 <sup>h</sup>	45.70 <sup>f</sup>	977.60 <sup>e</sup>
0.2	22°C	6.63 <sup>d</sup>	12.16 <sup>e</sup>	11.81 <sup>g</sup>	19.30 <sup>g</sup>	74.90 <sup>c</sup>	951.50 <sup>e</sup>
	40°C	6.77 <sup>a</sup>	19.16 <sup>b</sup>	14.10 <sup>f</sup>	24.04 <sup>e</sup>	99.40 <sup>a</sup>	1183.80 <sup>b</sup>
0.4	22°C	6.60 <sup>e</sup>	15.00 <sup>d</sup>	15.80 <sup>e</sup>	22.94 <sup>f</sup>	71.40 <sup>cd</sup>	1044.10 <sup>d</sup>
	40°C	6.75 <sup>ab</sup>	19.86 <sup>b</sup>	16.72 <sup>d</sup>	26.43 <sup>c</sup>	97.10 <sup>ab</sup>	1210.10 <sup>b</sup>
0.6	22°C	6.63 <sup>c</sup>	15.90 <sup>d</sup>	18.36 <sup>c</sup>	24.94 <sup>d</sup>	65.80 <sup>de</sup>	1074.10 <sup>d</sup>
	40°C	6.72 <sup>c</sup>	20.41 <sup>b</sup>	21.27 <sup>b</sup>	30.55 <sup>b</sup>	92.80 <sup>b</sup>	1222.30 <sup>b</sup>
0.8	22°C	6.60 <sup>e</sup>	17.37 <sup>c</sup>	19.05 <sup>c</sup>	25.40 <sup>d</sup>	63.50 <sup>e</sup>	1123.50 <sup>c</sup>
	40°C	6.72 <sup>c</sup>	23.00 <sup>a</sup>	24.30 <sup>a</sup>	33.40 <sup>a</sup>	91.00 <sup>b</sup>	1309.80 <sup>a</sup>
<i>SH</i>	<b>0.008</b>	<b>0.417</b>	<b>0.276</b>	<b>0.232</b>	<b>2.101</b>	<b>13.480</b>	
<i>P</i>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	

<sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup> Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ( $P<0.05$ ); *SH*: standart hata; *P*: *P* değeri; *GÜ*: gaz üretimi; *KMS*: kuru madde sindirilebilirliği; *GOMS*: gerçek organik madde sindirilebilirliği; *MPÜ*: mikrobiyal protein üretimi; *ME*: metabolik enerji. pH ve GÜ sonuçları, 200 mg/KM örneğin rumen sıvısında 24 saatlik inkübasyonu sonucunda; *KMS*, *GOMS* ve *MPÜ* sonuçları, 500 mg/KM örneğin rumen sıvısında 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilmiştir

rusal bir ilişki olup olmadığı araştırılmış, NDF ve SÇK içerikleri arasında yüksek negatif korelasyonlar saptanmıştır. Sellülaz enzimi için her iki inkübasyon sıcaklığında araştırılan korelasyon ilişkisi sonucunda elde edilen korelasyon katsayıları; 22°C'de,  $r=-0.992$ , 40°C'de ise  $r=-0.999$  olarak saptanmıştır. Nötr deterjanda çözünmeyen lif ve SÇK arasındaki tersine ilişki Smith ve ark.<sup>33</sup> tarafından da bildirilmiştir.

#### **Enzimle İşlenmiş Buğday Samanlarının 24 Saatlik *in vitro* Fermantasyon Parametreleri**

Araştırmada üzerinde çalışılan enzim dozu ve sıcaklık gibi işleme koşullarının yemlerin rumen sıvısında 24 saatlik *in vitro* fermantasyonu ile araştırılan biyolojik parametreler üzerine etkileri farklı olmuştur.

*Tablo 4*'te farklı dozlarda sellülaz enzimiyle işlemenin buğday samanının gaz üretim değerleri üzerine etkileri dikkate alındığında, enzim dozu ( $P=0.000$ ), inkübasyon

sıcaklığı ( $P=0.000$ ) ve enzim dozu x inkübasyon sıcaklığının ( $P=0.000$ ) etkileri önemli bulunmuştur. Gaz üretimi, tüm gruplarda kontrol buğday samanlarına göre artış göstermiş, en yüksek değerler her iki sıcaklık derecesinde %0.8 dozunda sellülazla işlenmiş gruplarda görülmüştür (17.37 ve 23.00 ml;  $P=0.000$ ). Gaz üretimindeki benzer artışlar, Eun ve ark.<sup>9</sup>, Rodrigues ve ark.<sup>10</sup>, Gupta ve Pradhan<sup>28</sup>, Canbolat ve ark.<sup>34</sup> ile Kalkan ve Karabulut'un<sup>35</sup> çalışmalarında da görülmekle beraber, Canbolat ve ark.'ın<sup>36</sup> diğer bir çalışmada gaz üretiminde düşüşler gözlenmiş, bunun yanı sıra Rodrigues ve ark.<sup>31</sup> tarafından çok yıllık İngiliz çimi ile yürütülen çalışmada sellülaz uygulamasıyla GÜ'nde herhangi bir gelişme sağlanamamıştır.

İşleme koşullarından, enzim dozu ( $P=0.000$ ) ile inkübasyon sıcaklığı ( $P=0.000$ ) ve enzim dozu x inkübasyon sıcaklığı interaksyonunun ( $P=0.000$ ) *KMS* üzerinde de etkili olduğu *Tablo 4*'te gözlenmiştir. En yüksek *KMS* değeri her iki inkübasyon sıcaklığında %0.8 dozunda sellülazla işlenmiş gruplarda görülürken (%19.05 ve 24.30), 22°C'de %0.6

**Tablo 5.** Sellülaz enzimiyle işlenen buğday samanlarının rumen sıvısında 24 saatlik inkübasyonları sonucu elde edilen UYA kompozisyonu (KM'de)  
**Table 5.** Volatile fatty acids (VFA) composition (DM basis) of cellulase treated wheat straw at 24h in vitro fermentation

Etkiler	Uçucu Yağ Asitleri Kompozisyonu (%)						TUYA, mmol/L	
	Asetik Asit *	Propiyonik Asit *	İzobütirik Asit *	Bütirik Asit *	İzovalerik Asit *	Valerik Asit *		
<b>Doz</b>								
0	54.64 <sup>ab</sup>	25.83 <sup>a</sup>	0.98 <sup>b</sup>	14.91 <sup>c</sup>	1.51 <sup>c</sup>	2.13 <sup>b</sup>	65.56 <sup>c</sup>	
0.2	51.25 <sup>d</sup>	25.01 <sup>ab</sup>	1.62 <sup>a</sup>	17.21 <sup>a</sup>	2.55 <sup>a</sup>	2.36 <sup>a</sup>	82.76 <sup>b</sup>	
0.4	52.93 <sup>c</sup>	24.33 <sup>b</sup>	1.50 <sup>a</sup>	17.30 <sup>a</sup>	1.82 <sup>b</sup>	2.12 <sup>b</sup>	86.29 <sup>b</sup>	
0.6	54.13 <sup>b</sup>	25.30 <sup>ab</sup>	0.84 <sup>b</sup>	16.19 <sup>b</sup>	1.50 <sup>c</sup>	2.04 <sup>c</sup>	83.48 <sup>b</sup>	
0.8	55.17 <sup>a</sup>	25.03 <sup>ab</sup>	1.04 <sup>b</sup>	15.24 <sup>bc</sup>	1.40 <sup>c</sup>	2.12 <sup>b</sup>	93.02 <sup>a</sup>	
SH	0.212	0.217	0.092	0.230	0.075	0.069	1.313	
P	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.038	0.000	
<b>Sıcaklık</b>								
22°C	52.35 <sup>b</sup>	27.48 <sup>a</sup>	0.84 <sup>b</sup>	15.53 <sup>b</sup>	1.52 <sup>b</sup>	2.28 <sup>a</sup>	69.74 <sup>b</sup>	
40°C	54.90 <sup>a</sup>	22.72 <sup>b</sup>	1.55 <sup>a</sup>	16.81 <sup>a</sup>	2.00 <sup>a</sup>	2.02 <sup>b</sup>	94.70 <sup>a</sup>	
SH	0.134	0.137	0.058	0.146	0.047	0.043	0.831	
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	
<b>Doz x Sıcaklık</b>								
0	22°C	54.60 <sup>c</sup>	26.91 <sup>a</sup>	0.96 <sup>bc</sup>	14.07 <sup>d</sup>	1.38 <sup>cd</sup>	2.08 <sup>bc</sup>	60.64 <sup>e</sup>
	40°C	54.68 <sup>c</sup>	24.75 <sup>b</sup>	1.01 <sup>bc</sup>	15.75 <sup>bc</sup>	1.63 <sup>c</sup>	2.18 <sup>ab</sup>	70.47 <sup>d</sup>
0.2	22°C	51.80 <sup>d</sup>	27.72 <sup>a</sup>	0.80 <sup>c</sup>	15.87 <sup>bc</sup>	1.58 <sup>cd</sup>	2.23 <sup>ab</sup>	70.86 <sup>d</sup>
	40°C	50.69 <sup>e</sup>	22.29 <sup>c</sup>	2.45 <sup>a</sup>	18.55 <sup>a</sup>	3.53 <sup>a</sup>	2.49 <sup>a</sup>	94.65 <sup>b</sup>
0.4	22°C	51.37 <sup>de</sup>	27.28 <sup>a</sup>	0.79 <sup>c</sup>	16.78 <sup>b</sup>	1.52 <sup>cd</sup>	2.26 <sup>ab</sup>	78.38 <sup>c</sup>
	40°C	54.49 <sup>c</sup>	21.37 <sup>d</sup>	2.20 <sup>a</sup>	17.82 <sup>a</sup>	2.14 <sup>b</sup>	1.98 <sup>bc</sup>	94.19 <sup>b</sup>
0.6	22°C	51.78 <sup>d</sup>	27.79 <sup>a</sup>	0.84 <sup>bc</sup>	15.65 <sup>c</sup>	1.53 <sup>cd</sup>	2.41 <sup>a</sup>	69.35 <sup>d</sup>
	40°C	56.49 <sup>b</sup>	22.82 <sup>c</sup>	0.84 <sup>bc</sup>	16.73 <sup>b</sup>	1.44 <sup>cd</sup>	1.68 <sup>d</sup>	97.61 <sup>b</sup>
0.8	22°C	52.22 <sup>d</sup>	27.71 <sup>a</sup>	0.81 <sup>bc</sup>	15.28 <sup>c</sup>	1.58 <sup>cd</sup>	2.40 <sup>a</sup>	69.48 <sup>d</sup>
	40°C	58.13 <sup>a</sup>	22.36 <sup>c</sup>	1.24 <sup>b</sup>	15.21 <sup>c</sup>	1.23 <sup>d</sup>	1.83 <sup>cd</sup>	116.56 <sup>a</sup>
SH		2.296	0.306	0.130	0.326	0.106	0.097	1.857
P		0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000

<sup>a,b,c,d,e</sup> Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ( $P < 0.05$ ); SH: standart hata; P: P değeri; TUYA: toplam uçucu yağ asitleri; \* 500 mg/KM örneğin rumen sıvısında 24 saatlik inkübasyonu sonucunda bireysel olarak elde edilen UYA konsantrasyonu TUYA konsantrasyonuna oranlanarak, % değer olarak verilmiştir

dozunda yapılan işleme sonucunda elde edilen değer ile %0.8 dozuyla yapılan işleme değeri birbirine çok yakın bulunmuştur ( $P=0.000$ ). Bazı araştırmacılar KMS'nde artış bildirirken (Eun ve ark.<sup>9</sup>, Pinos-Rodriguez ve ark.<sup>13</sup>), bazı araştırmacılar tarafından herhangi bir gelişme saptanmamış (Reddish ve Kung<sup>12</sup>), bazı araştırmacılar tarafından ise olumsuz sonuçlar elde edilmiştir (ZoBell ve ark.<sup>32</sup>).

Gerçek organik madde sindirilebilirliği değerleri de KMS değerlerinde olduğu gibi, işleme koşullarından önemli derecede etkilenmiş, en yüksek GOMS değeri her iki sıcaklık derecesinde %0.8 dozunda sellülazla işlenmiş gruplarda görüldükçe (%25.40 ve 33.40), 22°C'de %0.6 dozunda yapılan işleme sonucunda elde edilen değer ile %0.8 dozuyla yapılan işleme değeri birbirine çok yakın bulunmuştur ( $P=0.000$ ). Organik madde sindirilebilirliğinde benzer artışlar Yang ve ark.<sup>11</sup> tarafından da bildirilmiştir.

Gaz üretimi ile GOMS parametrelerinden elde edilen bulguların ışığında bu iki *in vitro* sindirilebilirlik paramet-

resi arasında doğrusal bir ilişki olup olmadığı araştırılmış ve GÜ ve GOMS arasında genel olarak yüksek pozitif korelasyonlar tespit edilmiştir. Sellülaz enzimi için her iki inkübasyon sıcaklığında araştırılan korelasyon ilişkisi sonucunda elde edilen korelasyon katsayıları; 22°C'de  $r=0.920$ , 40°C'de ise  $r=0.970$  olarak saptanmıştır. Gaz üretimi ile GOMS arasındaki pozitif korelasyon Blümmel ve ark.'nın<sup>37</sup> bildirilerini destekler niteliktedir.

Mikrobiyal protein üretimi değerleri, KMS ve GOMS değerlerinde olduğu gibi işleme koşullarından önemli düzeyde etkilenmiştir ( $P=0.000$ ). En yüksek MPÜ değeri, her iki sıcaklık derecesinde %0.2 dozunda sellülazla işlenmiş gruplarda görülmüştür (74.90 ve 99.40 mg;  $P=0.000$ ). Enzim uygulamaları MPÜ'ni kontrol grubuna göre arttırmakla birlikte, enzim dozları arttıkça MPÜ değerlerinde bir miktar azalma göze çarpmaktadır. Enzim dozları arttıkça MPÜ değerlerinde görülen düşüşün nedeni artan SÇK'nın UYA'ne dönüştürülmesi, bu durumun mikrobiyal protein üreten bakterilerin rumen ortamında kendi bakteri proteinlerini



üretebilmek için kullanabilecekleri substratın yetersiz kalmasına yol açarak MPÜ'nin yavaşlamasıdır. Rumen ortamında karbonhidrat metabolizmasının protein parçalanma hızını geçmesi durumunda MPÜ'nin azaldığı, bazı araştırmacılar tarafından da doğrulanmakla beraber (Nocek ve Russel<sup>38</sup>; Rymer ve Givens<sup>39</sup>); diğer bazı araştırmacılar enzim kullanımıyla MPÜ'nin arttığını bildirmişlerdir (Yang ve ark.<sup>11</sup>).

Buğday samanlarının rumen sıvısında *in vitro* GÜ tekniği ile 24 saat inkübasyonu sonucu elde edilen UYA konsantrasyonları *Tablo 5*'te verilmiştir. *Tablo 5* incelendiğinde en yüksek toplam uçucu yağ asitleri (TUYA) değerleri, oda sıcaklığında %0.4 dozunda sellülazla işlenen grupta (78.38 mmol/L) 40°C'de ise %0.8 sellülazla (116.56 mmol/L) işlenmiş gruplarda görülmüştür (P=0.000). Oda sıcaklığında elde edilen en yüksek TUYA değeri, başlangıç materyaline göre %14.64, kontrol grubuna göre %29.25; 40°C'de elde edilen en yüksek TUYA değeri ise başlangıç materyaline göre %70.54, kontrol grubuna göre ise %65.46'lık oransal artışlar ortaya koymuştur. İşleme koşullarının asetik asit üzerindeki etkileri incelendiğinde, TUYA konsantrasyonunun oransal olarak büyük bir kısmını asetik asitin oluşturduğu gözlenmiştir. Özellikle 40°C'de %0.8 sellülaz katkısıyla asetik asit miktarının önemli derecede arttığı görülmüştür (*Tablo 5*; P=0.000). Konu ile ilgili olarak Rodrigues ve ark.<sup>10</sup> tarafından yürütülen araştırmada, enzimle işlemenin rumende UYA konsantrasyonlarını etkilemediği yine Rodrigues ve ark.'nın<sup>31</sup> diğer bir çalışmasında asetik asit konsantrasyonlarının düştüğü belirlenmiştir.

Araştırmada sellülaz enzimiyle yapılan işlemlerin buğday samanlarının rumen ortamındaki *in vitro* sindirim parametrelerini geliştirdiği gözlenmiştir. Sellülaz enzimiyle işleme hücre duvarı (NDF) kapsamındaki azalma ile serbest kalan karbonhidratların rumendeki fermentasyonuna bağlı olarak GÜ, KMS, GOMS, UYA ve ME içeriklerini artırmıştır. En iyi sonuçlar 40°C'de %0.8 sellülazla işleme sonucunda elde edilmiştir. Rumende karbonhidrat metabolizması ile bunların fermentasyonuna bağlı olarak GÜ ve UYA üretiminde artışlar Blümmel ve Ørskov<sup>40</sup>; GÜ ve ME arasındaki pozitif ilişkiler Menke ve Steingass<sup>17</sup>, Getachew ve ark.<sup>41</sup>; GÜ ve OMS arasındaki pozitif ilişkiler Getachew ve ark.<sup>41</sup> tarafından da vurgulanmıştır.

Sonuç olarak, sellülaz enziminin artan dozlarıyla birlikte hücre duvarı bileşiminde azalma ile SÇK, *in vitro* GÜ, GOMS ve ME içeriğindeki artışlar şeklinde görülen etkilerle, düşük besleme değerine sahip olan buğday samanının besleme değerinin geliştirilebileceği belirlenmiştir. Bu durum lignosellülozik materyalin ruminant beslemede daha etkin bir şekilde değerlendirilebileceği anlamına gelmektedir. En etkili sonuçlar sellülazın en yüksek dozlarıyla yapılan işlemlerden elde edilmiştir. Enzim etkisinin sıcaklıkla artması nedeniyle, enzim kullanımı sırasında inkübasyon sıcaklığı da dikkate alınmalıdır. Diğer yandan bu araştırmada, fibrolitik bir enzim olan sellülazın kaba yemlerin

besleme değerini artırmada dikkate değer bir potansiyele sahip olduğu ortaya konmuştur. Gelecekte enzimlerin hücre duvarı bileşenleri ve bunların rumendeki sindirilebilirlikleri üzerine olan etkileri, canlı hayvanlar üzerinde sindirim denemeleri yürütülerek incelenmeli, tüm bu çalışmalar enzim uygulamasının ekonomik yönünü de kapsayacak şekilde planlanmalıdır.

## KAYNAKLAR

- 1. TÜİK:** Türkiye İstatistik Kurumu. Bitkisel Üretim İstatistikleri. [http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb\\_id=45&ust\\_id=13](http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=45&ust_id=13). Erişim Tarihi: 10.01.2011.
- 2. Filya I:** Türkiye' de kaba yem sorunu ve çözüm yolları. *Türkiye Süt Sığırcılığı Kurultayı (Çağrılı Tebliği)*. İzmir, 25-26 Ekim 2007.
- 3. Burroughs W, Woods W, Ewing SA, Greig J, Theurer B:** Enzyme additions to fattening cattle rations. *J Anim Sci*, 19, 458-464, 1960.
- 4. Chen KH, Huber JT, Simas J, Theurer CB, Yu P, Chan SC, Santos F, Wu Z, Swingle RS:** Effect of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows. *J Dairy Sci*, 78, 1721-1727, 1995.
- 5. Lewis GE, Sanchez WK, Treacher R, Hunt CW, Pritchard GT:** Effect of direct fed fibrolytic enzymes on lactational performance of midlactation holstein cows. *Proceeding Western Section American Society of Animal Science*, 46, 310-313. Lethbridge, Alberta, 1995.
- 6. Stokes MR, Zheng S:** The use of carbohydrase enzymes as feed additives for early lactation cows. *Proceeding of the 23<sup>rd</sup> Conference on Rumen Function*. Chicago, Illinois, p. 34, 1995.
- 7. Beauchemin KA, Rode LM, Sewalt VJH:** Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can J Anim Sci*, 75, 641-644, 1995.
- 8. Beauchemin KA, Jones SDM, Rode LM, Sewalt, VJH:** Effect of fibrolytic enzyme in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. *Can J Anim Sci*, 77, 645-653, 1997.
- 9. Eun JS, Beauchemin KA, Hong SH, Bauer MW:** Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: Effects on *in vitro* fermentation characteristics and degradability. *Anim Feed Sci Technol*, 131, 86-101, 2006.
- 10. Rodrigues MAM, Pinto P, Bezerra RMF, Dias AA, Guedes CVM, Cardoso VMG, Cone JW, Ferreira LMM, Colaco J, Sequeira CA:** Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and *in vitro* digestibility of wheat straw. *Anim Feed Sci Technol*, 141 (3-4): 326-338, 2008.
- 11. Yang WZ, Beauchemin KA, Rode LM:** Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 82, 391-403, 1999.
- 12. Reddish MA, Kung Jr L:** The effect of feeding a dry enzyme mixture with fibrolytic activity on the performance of lactating cows and digestibility of a diet for sheep. *J Dairy Sci*, 90, 4724-4729, 2007.
- 13. Pinos-Rodriguez, JM, Moreno R, Gonzalez SS, Robinson PH, Mendoza G, Alvarez G:** Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestibility of total mixed rations fed to lambs. *Anim Feed Sci Technol*, 142, 210-219, 2008.
- 14. Morgavi DP, Beauchemin KA, Nsereko VL, Rode LM, Iwaasa AD, Yang WZ, McAllister TA, Wang Y:** Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *J Dairy Sci*, 83, 1310-1321, 2000.
- 15. Hristov AN, McAllister TA, Cheng KJ:** Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzyme supplementation on rumen fermentation and nutrient digestibility. *J Anim Sci*, 76, 3146-3156, 1998.
- 16. Nakashima Y, Ørskov ER, Adebawale EA, Ambo K:** Enzymatic manipulation of straw quality: Experience on straw upgrading. *Proc. of the International Conference on Increasing Livestock Production through Utilization of Local Resources*, October 18-22, 1993 Beijing-China, pp.139-

152, 1993.

**17. Menke KH, Steingass H:** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim Res Dev*, 28, 7-55, 1988.

**18. Ørskov ER, McDonald I:** The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to the rate of passage. *J Agri Sci*, 92, 499-503, 1979.

**19. Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W:** The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *J Agri Sci (Cambridge)*, 93, 217-222, 1979.

**20. Blümmel M, Makkar HPS, Becker K:** *In vitro* gas production: A technique revisited. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 77, 24-34, 1997.

**21. Makkar HPS, Blümmel M, Becker K:** Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implications in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *Br J Nutr*, 73, 897-933, 1995.

**22. Makkar HPS, Blümmel M, Becker K:** *In vitro* rumen apparent and true digestibilities of tannin-rich forages. *Anim Feed Sci Technol*, 67, 245-251, 1997.

**23. AOAC:** Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 15<sup>th</sup> ed., Vol. 1, pp. 69-79, AOAC, Washington, DC, 1990.

**24. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis A:** Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*, 74, 3583-3597, 1991.

**25. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebbers, PA Smith F:** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 28, 350-356, 1956.

**26. MINITAB Inc.:** MINITAB Release 11 for Windows. State College, Pennsylvania, USA, 1996.

**27. Snedecor GW, Cochran WG:** Statistical Methods. 6<sup>th</sup> ed., Ames, IA. Iowa State University Press, 1980.

**28. Gupta ML, Pradhan K:** Chemical and biological evaluation of ensiled wheat straw. *J Dairy Sci*, 60 (7): 1088-1094, 1977.

**29. Filya I, Ashbell G, Weinberg ZG, Hen Y:** Cell-wall degrading enzymes beneficial for silages. *FEEDSTUFFS*, 73, 13-14, 2001.

**30. Filya I, Ashbell G, Weinberg ZG, Hen Y:** Hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin yonca silajlarının fermantasyon özellikleri, hücre duvarı

kapsamı ve aerobik stabiliteyi üzerine etkileri. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 7 (3): 81-87, 2001.

**31. Rodrigues MAM, Cone JW, Sequeira CA, Mascarenhas-Ferreira A:** Effect of the addition of cell wall degrading enzymes on fermentation kinetics of perennial ryegrass silage. *J Agri Sci*, 136, 443-449, 2001.

**32. ZoBell DR, Wiedmeier RD, Olson KC, Treacher RJ:** The effect of an exogenous enzyme treatment on production and carcass characteristics of growing and finishing steers. *Anim Feed Sci Technol*, 87, 279-285, 2000.

**33. Smith KF, Culvenor RA, Humphreys MO, Simpson RJ:** Growth and carbon partitioning in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) cultivars selected for high water-soluble carbohydrate concentrations. *J Agri Sci*, 138 (4): 375-385, 2002.

**34. Canbolat O, Kalkan H, Karaman S, Filya I:** Üzüm posasının yonca silajlarında karbonhidrat kaynağı olarak kullanıma olanakları. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (2): 269-276, 2010.

**35. Kalkan H, Karabulut A:** Buhar ve asitle işlemenin mercimek samanının yem değeri üzerine etkisi. *Turk J Vet Anim Sci*, 27 (6): 1375-1381, 2003.

**36. Canbolat O, Karaman S, Filya I:** Farklı kekik yağı dozlarının mısır silajının sindirimi ve rumen fermantasyonu üzerine etkileri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (6): 933-939, 2010.

**37. Blümmel M, Steingass H, Becker K:** Relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial Biomass yield and <sup>15</sup>N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *Br J Nutr*, 77, 911-921, 1997.

**38. Nocek JE, Russell JB:** Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J Dairy Sci*, 71, 2070-2107, 1988.

**39. Rymer C, Givens DI:** The use of the *in vitro* gas production technique to investigate the effect of substrate on the partitioning between microbial biomass production and the yield of fermentation products. In, *Proceedings of the British Society of Animal Science*, p. 36, 1999.

**40. Blümmel M, Ørskov ER:** Comparison of gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim Feed Sci Technol*, 40, 109-119, 1993.

**41. Getachew G, Crovett GM, Fondevilla OM, Krishnamoorthy U, Singh B, Spanghero M, Steingass H, Robinson PH, Kailas MM:** Laboratory variation of 24 hour *in vitro* gas production and estimated metabolizable energy value of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol*, 102, 169-180, 2002.