

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

**FARKLI SÜKROZ SEVİYELERİ VE İNKUBASYON
SÜRELERİNDE HAZIRLANAN FERMENTE EDİLMİŞ
DOĞAL LAKTİK ASİT SIVISININ, LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİ İLE YONCA SİLAJİ KALİTESİNE
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sadık Serkan AYDIN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihat DENEK

ŞANLIURFA
2014

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

**FARKLI SÜKROZ SEVİYELERİ VE İNKUBASYON
SÜRELERİNDE HAZIRLANAN FERMENTE EDİLMİŞ
DOĞAL LAKTİK ASİT SIVISININ, LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİ İLE YONCA SİLAJI KALİTESİNE
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sadık Serkan AYDIN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihat DENEK

ŞANLIURFA
2014

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Sadık Serkan AYDIN'ın hazırladığı "Farklı Sukroz Seviyeleri ve İnkubasyon Sürelerinde hazırlanan Fermente Edilmiş Doğal Laktik Asit Sıvısının, Laktik Asit Bakterileri ile Yonca Silajı Kalitesine Etkisi" konulu çalışma, 01.12.2014 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Mehmet AVCI
Harran Üniversitesi
BAŞKAN



Prof. Dr. Nihat DENEK (Danışman)
Harran Üniversitesi
ÜYE



Prof. Dr. Abdullah CAN
Harran Üniversitesi
ÜYE



Q N A Y
01.12.2014
Prof. Dr. Nurten AKSOY
Enstitü Müdürü

TEŐEKKÖR

Bu alıŐma sűresince tűm bilgilerini benimle paylaŐmaktan kaçınmayan, her tűrlű konuda desteęini benden esirgemeyen ve tezimde bűyűk emeęi olan, aynı zamanda kiŐilik olarak da bana çok Őey katan Harran Ŭniversitesi űęretim űyelerinden danıŐman hocam, sayın Prof. Dr. Nihat DENEK'e sonsuz minnet ve teŐekkűrlerimi sunarım.

ÇalıŐmam sırasında katkılarını ve yardımlarını gűrdűęűm Harran Ŭniversitesi űęretim űyelerinden deęerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet AVCI ve Yrd. Doç. Dr. Oktay KAPLAN'a, denemelerin yűrűtűlmesinde desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Nurten AKSOY, Kadir RASTGELDİ, Ahmet ŬZDEMİR, Veteriner Hekim Mehmet SAVRUNLU ve Biyolog Gűrkem ÇOLAK'a, tűm bu çalıŐmalar boyunca daima yanımda hissettięim, desteklerini esirgemeyen eŐim A. Aydan AYDIN ve oęullarım Ahmet Sırrı ve Osman Nuri'ye gűsterdikleri sabır ve anlayıŐ için teŐekkűr ederim.

Sadık Serkan AYDIN

2014

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u> <u>No</u>
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii-iii
TABLolar DİZİNİ.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. GİRİŞ.....	1-2
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Silaj Katkı Maddeleri	3
2.1.1. Silajı Besin Maddeleri Yönünden Zenginleştirmek için Kullanılan Katkı Maddeleri.....	4
2.1.1.1. Tane Yemler ve Diğer Yem Maddeleri.....	4
2.1.1.2. Melas.....	4
2.1.1.3. Yemlik Şeker.....	5
2.1.1.4. Üre.....	5
2.1.1.5. Kireç Taşı.....	6
2.1.1.6. Peynir Suyu.....	6
2.1.2. Fermantasyonu Güçlendirmek için Kullanılan Katkı Maddeleri.....	6
2.1.2.1. Bakteriyel İnokulantlar.....	7-9
2.1.2.2. Fermente Edilmiş Doğal Laktik Asit Sıvısı (Previously Fermented Juice, PFJ).....	9-10
2.1.2.3. Enzimler.....	10
2.1.3. Asit Ortamı Güçlendirmek için Kullanılan Katkı Maddeleri.....	11
2.1.4. Koruyucu Olarak Kullanılan Katkı Maddeleri.....	11
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	12
3.1. Materyal	12
3.1.1. Fermente Edilmiş Doğal Laktik Asit Sıvısının (Previously Fermented Juice, PFJ) Hazırlanması.....	12
3.1.2. Silajlık Bitki Materyali ve Silajların Hazırlanması.....	12-13
3.1.3. Rumen Sıvısı Materyali	13
3.2. Yöntem.....	13
3.2.1. Silaj Materyali ve Elde Edilen Silajların Ham Besin Madde Analizleri.....	13
3.2.2. Fermente Edilmiş Doğal Laktik Asit Sıvısının (PFJ), Toplam Laktik Asit Bakteri Sayısı ve Tür Tespitinin Belirlenmesi	14
3.2.2.1. Laktik Asit Bakteri Sayımı.....	14
3.2.2.2. Laktik Asit Bakteri Tür Tayini.....	14-15
3.2.3. Silajların pH, Amonyak Azotu, Laktik Asit ve Uçucu Yağ Asit Analizi.....	15
3.2.4. İn Vitro Denemenin Yürütülmesi.....	16
3.2.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması ve Gaz Üretim Tekniğinin Uygulanması.....	16
3.2.4.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	16-17
3.2.4.1.2. Yöntemin Uygulanması.....	17-18

3.2.4.1.3. İVOMS ve ME İçeriklerinin Hesaplanması.....	18
3.2.5. İstatistiksel Analiz.....	18
4. BULGULAR.....	19-24
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	25-29
6. KAYNAKLAR.....	30-35



TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Homofermantatif ve Heterofermantatif laktik asit bakterileri.....	7
Tablo 2. Farklı seviyelerde sukroz ilavesi ve değişik sürelerde inkubasyona bırakılarak elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının taze ve değişik sürelerde bekletilmesinin laktik asit bakteri türleri üzerine etkisi	19
Tablo 3. Farklı seviyelerde sukroz ilavesi ve değişik sürelerde inkubasyona bırakılarak elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının taze ve değişik sürelerde bekletilmesinin toplam laktik asit bakteri sayısı üzerine etkisi.....	20
Tablo 4. Farklı seviyelerde sukroz ilavesi ve değişik sürelerde inkubasyona bırakılarak elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının taze ve değişik sürelerde bekletilmesinin pH değeri üzerine etkisi	21
Tablo 5. Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının yonca silajlarının besin madde, in vitro organik madde sindirilebilirliği ve metabolik enerji içeriğine etkisi.....	22
Tablo 6. Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının yonca silajının fermantasyon özellikleri üzerine etkisi.....	23

ÖZET

Farklı Sukroz Seviyeleri ve İnkubasyon Sürelerinde Hazırlanan Fermente Edilmiş Doğal Laktik Asit Sıvısının, Laktik Asit Bakterileri ile Yonca Silajı Kalitesine Etkisi

Sadık Serkan AYDIN

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışmada, değişik seviyelerde sukroz ilavesi (%1, %3, %5, %10) ve farklı inkubasyon süreleri (48, 72 ve 96 saat) sonrasında farklı sürelerde (taze, 15, 30, 45 ve 60 gün) oda ısısında (25 °C) bekletilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının; toplam laktik asit bakteri sayısı, bakteri türü ile elde edilen yonca silajının fermantasyon kalitesi üzerine etkileri amaçlanmıştır. Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarında oluşan laktik asit bakteri kolonilerinden tesadüfi olarak seçilenlerde, oda ısısında bekletilme süresinin uzamasına bağlı olarak *Lb. Plantarum* hakim bakteri türü olarak görülmüştür. Genel olarak her bir inkubasyon süresi (48, 72 ve 96 saat) için (taze olarak hazırlanan sıvılar hariç) tüm bekletilme sürelerinde (15, 30, 45 ve 60 gün) sukroz seviyesinin artışına bağlı olarak elde edilen toplam laktik asit bakteri sayısında ve pH değerinde azalmalar görülmüştür ($P<0.001$). Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarına %1 sukroz ilave edilerek 48 saat inkubasyon sonrası elde edilen taze, 15 gün ve 30 gün bekletilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının %0.1 oranında yonca bitkisine ilave edilmesiyle elde edilen silajlarda pH, amonyak azotu, asetik asit değerleri azalırken, silaj laktik asit değerleri ise artmıştır ($P<0.001$). Sonuç olarak değişik seviyelerde sukroz ilavesi ile farklı sürelerde inkubasyon sonrasında taze ve değişik sürelerde oda ısısında bekletilerek elde edilen laktik asit sıvılarının; gerek laktik asit bakteri türü, toplam laktik asit bakteri sayısı ve gerekse elde edilen silajların kalitelerinin yükseldiği görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısından %0.1 oranında kullanımında, silaj fermantasyon kriterlerinde olumlu etki görülmesi bu ürünün kullanılabilirliğinin pratiğe aktarılabilceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, bu konuda yapılacak çalışmalara rehber olabilecek potansiyeldir.

Anahtar kelimeler: Laktik asit sıvısı, yonca, silaj

ABSTRACT

The Effect of Pre-Fermented Lactic Acid Juice Prepared with Different Levels of Sucrose and Incubation times on the Lactic Acid Bacteria Level and Alfalfa Silage Quality.

Sadık Serkan AYDIN

Animal Nutrition and Nutritional Diseases Department

Master Thesis

This study was aimed to investigate the effects of fermented lactic acid liquid prepared with different levels of sucrose (1.0%, 3.0%, 5.0% and 10.0%), different incubation times (48, 72 and 96 hour) and different storage times (fresh, 15, 30, 45 and 60 days) at the 25 °C on the total lactic acid bacteria count, bacteria species and alfalfa silage fermentation quality. *Lb. Plantarum* was found as the dominant species from the randomly selected in colony of lactic acid bacteria collected from fermented lactic acid liquid depending on the leave time for the storage period. In general, total number of lactic acid bacteria and pH value decreased with increasing sucrose levels (except fresh prepared) during each of the incubation times (48, 72 and 96 hours) including all storage periods (15, 30, 45 and 60 days) ($P < 0.001$). Silage pH, ammonia nitrogen, acetic acid values decreased and lactic acid value increased with addition of fermented lactic acid liquid prepared with addition of 1% sucrose, afterwards 48 hours incubation and following 15 or 30 days of storage at the 25 °C ($P < 0.001$). As a result, fresh and stored fermented lactic acid liquid prepared with the addition of different levels of sucrose afterwards different incubation periods increased not only lactic acid bacterial species and bacteria counts but also improved silage quality. This study indicated that usage of 0.1% fermented lactic acid bacteria liquid to alfalfa silage material had a positive effect on silage fermentation criteria therefore this product has a potential to be transferred to practical field. In addition, the results obtained from this study have a potential to be a guide for future studies in at this subject.

Key words: Fermented lactic acid, alfalfa, silage

1. GİRİŞ

Ülkemizde çiftlik hayvanlarının beslenmesindeki en önemli problem, yeterli miktarlarda üretilmeyen ve temin edilemeyen kaliteli kaba yem sorunudur. Son yıllarda ülkemizde aile tipi işletmelerden, modern tip süt ve besi işletmelerine geçiş ile birlikte, kaliteli kaba yem ihtiyacı artmıştır. Uygun vejetasyon dönemlerinde otlatılarak veya biçilerek hayvanlara verilen yemlerin fazlası, yüksek nem içerikleri nedeniyle uzun süre bozulmadan muhafaza edilmeleri zordur. Kızışarak bozulmayı önlemek için, nem içeriği yüksek kaba yemlerin değişik yöntemler ile kullanılacakları döneme kadar saklanması gerekmektedir. Ülkemizde ve dünyada kaba yemlerin saklanmasında kurutma ve silolama yaygın olarak kullanılan konservasyon yöntemleri olarak görülmektedir.

Hayvansal üretimde vazgeçilmez yem kaynaklarından baklagil kaba yemlerinin kurutulmaları esnasında yaprak kırılmalarına bağlı olarak besinsel kayıplar oldukça fazla olmakta, bu tip yemlerin silolanmasıyla yaprak kayıplarının en aza indirilebileceği bildirilmektedir (1). Ayrıca baklagil kaba yemlerinin kurutularak muhafaza edilmelerinin oldukça zor ve sınırlı olduğu bol yağışlı bölgelerde, silolama en etkin konservasyon yöntemidir.

İdeal silaj fermantasyonu için, suda çözünebilir karbonhidrat içeriğinin, yaş silaj materyalinde en az %3 olması gerektiği bildirilmiş, ancak yonca bitkisinde bu değer %1,3 civarında olduğu bilinmektedir (2). Baklagil yem kaynaklarının yapılarında bulunan, düşük düzeydeki suda çözünebilir karbonhidrat içeriği ve tamponlama kapasitesinin yüksek olması, silaj fermantasyonunda laktik asit bakterilerinin gelişimini, dolayısıyla laktik asit üretimini sınırlamaktadır. Bu gerekçelerden dolayı, baklagiller kullanılarak yapılacak silajlara katkı maddesi ilavesi zorunluluk arz etmektedir (3). Ruminant beslemede yaygın olarak kullanılan baklagil kaba yem kaynaklarının uzun süre silolanarak bozulmadan muhafaza edilebilmeleri için, silaj fermantasyonu sırasında laktik asit düzeyini artırarak, pH değerini bir an önce düşürmek amacıyla silaj materyaline ticari laktik asit bakteri (LAB) inokulantlarının kullanılması, son yıllarda yaygınlaşmıştır (4-8). Pahalı ve bazen silaj fermantasyonunu iyileştirmesi bakımından etkisiz görülen ticari laktik asit bakteri inokulantlarına alternatif olarak, pratik ve ekonomik bir şekilde kolay

hazırlanabilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının (Previously Fermented Juice, PFJ) kullanımı son yıllarda dikkat çekmektedir (9-13).

Bu çalışma; değişik seviyelerde sukroz ilavesi ve farklı sürelerde inkubasyon sonrasında elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının yonca silajı kalitesi (KM, HP, ADF, NDF, pH, UYA, NH₃-N, in vitro besin madde sindirimi ve metabolik enerji) üzerine etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Böylece farklı şekillerde elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının oda ısısında, değişik sürelerde muhafaza edilmesinin toplam laktik asit bakteri populasyonu ve türleri üzerine etkisinin araştırılması ile elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının oda ısısında saklanabilme kapasiteleri araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

Baklagil kaba yemleri ruminantların beslenmesinde yaygın olarak kullanılan, besin değeri yüksek önemli kaba yem kaynaklarıdır. Baklagil kaba yemlerinin yapısındaki kuru madde ve suda çözünebilir karbonhidrat içeriğinin düşük olması, buna karşın tamponlama kapasitesinin yüksekliği nedeniyle silolanmaları oldukça zordur (3). Silaj fermentasyonu sırasında bitki bünyesinde bulunan proteaz enzimleri, bitkinin yapısındaki proteinleri, başta aminoasitler ve amonyak olmak üzere peptid ve amidlere kadar parçalarlar. Oluşan proteolizis sonucunda yemdeki gerçek proteinlerin %80'inin amonyağa kadar parçalandığı bildirilmektedir (14). Baklagil kaba yemlerinin yapısında bulunan proteinler, hem silaj oluşumu döneminde, hem de rumende aşırı proteolizise maruz kaldıklarından, bu yem kaynaklarının yapısında bulunan proteinlerin besleyici değerinden ruminantlar yeterince faydalanamazlar (3). Bitkilerdeki proteaz enzimlerinin optimum aktiviteleri için gerekli pH düzeyi 6 civarındadır. Silo içerisinde pH değerindeki düşüşü hızlandırılarak, silodaki silaj pH değerinin 4'ün altına indiği durumda, proteolizisin tamamen engellendiği kabul edilmektedir (15). Silaj fermentasyon sürecinde ortaya çıkan pH değerindeki azalma, laktik asit üretimiyle yakından ilişkili olup, silajda laktik asit üretim hızı ne kadar yüksek olursa proteolizisin şekillenmeside o oranda azalmaktadır (16). Bu nedenle protein ve mineral madde bakımından zengin, kolay eriyebilir karbonhidrat kaynağı bakımından fakir olan yem bitkilerinin silolanması sırasında, fermentasyonun güvence altına alınabilmesi için katkı maddelerin kullanımı zorunlu hale gelmektedir (4, 17).

2.1. Silaj Katkı Maddeleri

Yeşil yem bitkilerinin ve bazı kuru madde içeriği düşük gıda sanayi artığı kaba yem kaynaklarının havasız koşullarda fermente edilerek saklanmalarıyla elde edilen, besin madde bakımından tercih edilebilir kaba yem kaynaklarına silaj, yapılan işleme silolama ve yapıldığı yere silo adı verilir (18). Silaj yapımındaki amaç; taze kaba yem materyalinin mümkün olan en az besin maddesi kaybı ile saklanmasıdır. Kaba yemlerin silolanarak saklanmaları sırasında silaj katkı maddesi kullanımının amacı; silajlık yeşil yem ve gıda

sanayi yan ürünü materyallerin silaj yapılarak saklanması sırasında besin madde kaybını azaltmak, elde edilen silajın yem değerini iyileştirmek, fermantasyon akışını düzenlemek, probiyotik etki göstererek silajların hayvanlar tarafından değerlendirme düzeylerini artırmak ve silo açıldıktan sonra silaj kalitesinin uzun süre korunabilmesi amaçlanmaktadır (19, 20).

2.1.1. Silajı Besin Maddeleri Yönünden Zenginleştirmek İçin Kullanılan Katkı Maddeleri

Bu amaçla bir çok farklı katkı maddelerinden yararlanmakla birlikte daha çok ortamda yetersiz düzeyde bulunan kolay eriyebilir karbonhidrat, protein, mineral madde açığını kapatmaya yönelik katkı maddelerinden yararlanılmaktadır. Karbonhidrat kaynağı olarak en fazla tahıl taneleri, melas, üzüm posası, şeker vb. katkıları kullanılmaktadır (21-23). Öte yandan son zamanlarda alternatif olarak şeker içeriği yüksek ve ucuz olan gladiçya gibi bazı ağaç meyvelerinin kullanımında ön plana çıkmaktadır (23-25).

2.1.1.1. Tane Yemler ve Diğer Yem Maddeleri

Silo içerisinde kolay eriyebilir karbonhidrat miktarını arttırmak maksadıyla tane yemler ve diğer yem maddeleri katkı olarak kullanılmaktadır. Bu kapsamda öğütülmüş mısır, arpa ve yulaf gibi tane yem kaynakları silajlık bitkinin nem oranına bağlı olarak %5-10 oranında silaja katılabilir. Bu şekilde hem fermantasyon hızı, hem de yemin lezzeti artmaktadır (26). Kaliteli bir silaj elde edebilmek için silolanacak yem materyallerinin kuru madde içeriğinin %30-35 düzeyinde olması gerekir. Yemlerin nem oranları fazla iken silolanmaları zorunlu ise silajın nem oranını düşürmek maksadıyla kuru şeker pancarı posası, buğday kepeği, saman, yulaf kapçıları, pamuk kapçıları kullanılabilir. Ancak bu katkıları silaj kalitesini düşürdüklerinden zorunlu olmadıkça kullanılmaları önerilmemektedir (26).

2.1.1.2. Melas

Şeker fabrikalarında, şeker üretimi sırasında uygulanan işlemlerin sonunda ortaya çıkan, kristalleşmeyen şekerler ile diğer bazı maddelerden oluşan şurup şeklindeki, pekmez

görünümlü yan ürüne melas adı verilir. Suda çözünebilir karbonhidrat içeriğince fakir ve soldurulmamış silajlarda fermantasyonu sağlamak için kolay eriyebilir karbonhidrat kaynağı olarak kullanılmaktadır (27). Ucuz olması ve kolayca bulunmasının yanında, sakkaroz içeriği kuru maddede %50'den fazla olan melasın, genel olarak silajın pH, bütirik asit ve amonyak azotu değerini azalttığı; laktik asit düzeyini ise arttırdığı bildirilmiştir (28). Silajlık materyalin özelliğine göre silaja katılacak melas miktarının, kullanılan yeşil yem kuru madde miktarına, ham protein ve şeker içeriğine bağlı olarak %4 oranında uygulanması tavsiye edilir. Silaja katılacak melas, uygulamanın kolaylaşması için 3-4 kat su ile seyreltilerek kullanılır (27).

2.1.1.3. Yemlik Şeker

Hayvancılığın gelişmiş olduğu ülkelerde özel olarak üretilmiş, silaj yapımında kullanılan silo şekerlerini ucuz fiyata piyasadan sağlamak mümkündür. Şekerin etkisi diğer karbonhidratlarda olduğu gibi laktik asit fermantasyonunu ve silajın karbonhidrat miktarını artırıcı yöndedir. Bu amaçla glukoz ve sakkaroz şekerleri üretilmektedir.

2.1.1.4. Üre

Üre silaj katkı maddelerinin sınıflandırılmasında besin maddeleri grubuna giren bir bileşiktir (3). Saf üre %46.67 azot içeriğine ve %291.7 ham protein değerine, yem kaynağı olarak kullanılan üre ise; %42 azot ve %262.5 ham protein değerine sahiptir. Üre özellikle başta mısır olmak üzere sorgum ve azot içeriği düşük diğer bitkilerin silolanmaları sırasında bu bitkilerden elde edilen silajın azot, dolayısıyla protein içeriğini arttırmak amacı ile kullanılmaktadır. Silaj fermantasyonunda ürenin silaj katkı maddesi olarak kullanımı ile silajlardaki protein parçalanmasını azaltmakta ve silajların aerobik stabilitelelerini geliştirmekte (29), amonyak kullanımında ise mısır silajlarının kimyasal özelliklerinin etkilenmediğini ve mikrobiyal büyümenin çok azaldığı (30), mısır silajlarının aerobik stabilitesinin ise geliştiği saptanmıştır (31). Silaja katılan üre, silajların nötr deterjanda çözünmeyen lif (NDF) ve asit deterjanda çözünmeyen lif (ADF) gibi hücre duvarı bileşenlerini de azaltarak rumendeki kuru madde (KM), organik madde (OM), NDF ve ADF'nin parçalanabilirliklerini arttırmaktadır. Ancak silajların KM, OM, NDF ve ADF parçalanabilirliklerinde meydana gelen bu artışlar,

ruminantların süt verimi, canlı ağırlık kazancı ve yemden yararlanma düzeyi gibi önemli performans kriterlerini de her zaman arttırmamaktadır (32, 33). Kullanılan üre, protein içeriği düşük olan silajın ham protein (HP) oranını %8-12'lere yükseltirken, diğer yandan silajlarda oluşabilecek olumsuz fermantasyonu kısmen önleyebilmektedir (26). Silajlara üre ilavesinin, silajın kuru madde düzeyini arttırdığı, proteolizisin oluşumunda ve küf üremelerinde azalma sağladığı bildirilmiştir (34). Mısır silajlarına üre katılarak yapılan bir çalışmada (31) ürenin; mısır silajlarının pH ve ham protein içeriklerini arttırdığı, NDF ve ADF gibi hücre bileşenlerini azalttığı, laktik asit, asetik asit ve bütirik asit düzeylerini etkilemediği belirlenmiştir. Silajın azot içeriğini artırmak amacıyla silaj materyaline en fazla %0,5 oranında üre katılmalıdır.

2.1.1.5. Kireç Taşı

Silajlara %5-10 arasında kireç taşı katılması, silajı kalsiyum (Ca) yönünden zenginleştirmekte ve silo içerisinde asit üretimini teşvik etmektedir. Ruminantların beslenmesinde kaba yem kaynağı olarak, sadece mısır silajı gibi Ca bakımından yetersiz yemler kullanıldığında, silaja katılacak kireç taşı hayvanın ihtiyacını yeterince karşılamaktadır (26).

2.1.1.6. Peynir Suyu

Yaklaşık %7 kuru madde ve %4,4 laktoz içeren ve içerdiği laktoz disakkariti, bazı laktik asit bakterileri tarafından laktik aside fermente edilmektedir. Kolay eriyebilir karbonhidrat kaynağının yanında, protein ve mineral madde bakımından da silajı zenginleştirmektedir. Bu amaçla kurutulmuş ya da koyulaştırılmış peynir suyu, belli bir yoğunluğa kadar sulandırıldıktan sonra silaja katılmalıdır. Proteince zengin yemlere %1-3 oranında katılabilir (26).

2.1.2. Fermantasyonu Güçlendirmek için Kullanılan Katkı Maddeleri

Bu amaçla silajlara laktik asit üreten bakteri kültürleri, maya kültürü ve çeşitli enzimler ilave edilmesi gerektiği görüşü yaygındır (26).

2.1.2.1. Bakteriyel İnokulantlar

Laktik asit bakterileri; silajlık bitkilerden veya silajlardan izole edilirler ve çok geniş sıcaklık ve nem koşullarında hızlı bir şekilde çoğalabilirler (35, 3). Optimum üreme ve gelişme göstermeleri için; asidik (pH 3-4) ve anaerobik ortam, kolay eriyebilir karbonhidrat, amino asit, vitamin gibi besin maddelerine ve uygun ısı (3) şartlarına ihtiyaç duyarlar.

Oluşturdukları fermantasyon ürünlerine göre homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Tablo 1). Homofermentatif laktik asit bakterileri gerçek laktik asit bakterileridir. Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise gerçek olmayan laktik asit bakterileri olarak da isimlendirilmektedir. Diğer bir deyişle şekerleri tam olarak laktik asite dönüştürenlere homofermentatif, dönüştürmeyenlere ise heterofermentatif laktik asit bakterileri denmektedir (36, 37).

Tablo 1: Homofermantatif ve Heterofermantatif laktik asit bakterileri (36, 37).

Homofermentatif Laktik Asit Bakterileri	Heterofermentatif Laktik Asit Bakterileri
<i>Lactobacilluslar:</i> <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. comyiformis</i> , <i>Lb. curvatus</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> <i>Pediococcuslar:</i> <i>P. acidilactis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. inopinatus</i> <i>Streptococcuslar:</i> <i>St. faecalis</i> , <i>St. durans</i> , <i>St. faecium</i> , <i>St. lactis</i> , <i>St. bovis</i> <i>Enterococcuslar:</i> <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> <i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacilluslar:</i> <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. viridescens</i> , <i>Lb. confusus</i> , <i>Lb. collinoides</i> , <i>Lb. hilgardii</i> <i>Leuconostoclar:</i> <i>Lue. mesenteroides</i> , <i>Leu. lactis</i>

Laktik asit bakterileri silajın fermantasyon sürecinde hemen hemen hiçbir besin madde kaybına yol açmadıklarından, silo içerisinde arzu edilen fermantasyonu sağlayan mikroorganizma grubudur. Silolanma esnasında laktik asit bakterilerinin gelişimi için en önemli faktör, silajlık ürünün kolay eriyebilir karbonhidrat ve kuru madde içeriğidir (38). Laktik asit bakterileri tarafından salgılanan laktasidaz enzimi, yemlerin yapısında bulunan karbonhidratları parçalayarak laktik asit üretir. Silaj pH değerindeki azalma laktik asit üretimi ile yakından ilişkili olup, silajda laktik asit üretim hızı ne kadar hızlı olursa proteolizisin şekillenmesi o oranda azalmaktadır (16). Laktik asit bakterileri, antibiyotik etkiye sahip

maddeler oluşturarak, silo içerisinde çoğalmaları arzu edilmeyen asetik asit ve bütirik asit bakterilerinin de faaliyetlerini önlerler (39). Laktik asit bakterileri, silo içerisinde anaerobik şartlar oluşmaz etkin duruma geçerler.

Silaj katkı maddesi olarak kullanılacak laktik asit bakteri inokulanlarının etkinliği; inokulantların özelliği, silolama tekniği, mikroflora, iklim şartları, silaj yapılacak bitkinin özelliği ve türü gibi birçok faktöre bağlıdır (40). Bakteriyel inokulantlar, genel olarak *Lactobacillus plantarum*, diğer *Lactobacillus* türleri, *Streptococcus faecium* ve çeşitli *Pediococcus* türlerini tek başlarına veya çeşitli karışımlarını bir arada bulunduran ticari ürünlerdir (41). Silolanan materyal laktik asit tarafından korunduğu için, laktik asit bakterileri silaj fermantasyonundaki en önemli mikroorganizma popülasyonudur.

Silaj fermantasyonu sırasında silajın laktik asit düzeyini arttırarak, pH değerini bir an önce düşürmek amacıyla silaj materyaline ticari laktik asit bakterileri inokulantlarının kullanımı son yıllarda yaygınlaşmıştır (4-8). Ticari laktik asit bakteri inokulantları tek tip veya birden fazla laktik asit bakteri türü içerebilmektedir (42). Genel olarak homofermentatif silaj inokulantları yaygın olarak kullanılırlar. 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 (3, 43). Ayrıca *Lactobacillus buncheri* gibi heterofermentatif inokulantlarında, silajda asetik asit konsantrasyonunu arttırmak suretiyle küf oluşumunu engellediği ve silajın aerobik stabiliteğini arttırmak amacıyla da kullanıldığı bildirilmiştir (44). Yapılan çalışmalarda ticari laktik asit bakteri inokulantlarının yaş silaj materyaline 10^5 - 10^6 Cfu/ml oranında homojen olarak katılmasının silaj içerisinde hâkim bakteri türünün laktik asit bakterileri olması için yeterli olduğu bildirilmiştir (45).

Silaj fermantasyonunda katkı maddesi olarak laktik asit bakteri inokulantlarının kullanıldığı çoğu araştırmada, elde edilen silajların pH, asetik asit, bütirik asit, amonyak azotu ve etanol düzeylerini düşürüp, laktik asit ve laktik:asetik asit oranını arttırarak silaj fermantasyonunu geliştirdiği saptanmıştır (24, 46). Bunun yanı sıra bazı araştırmalarda bakteriyel inokulantların, silajların aerobik stabiliteğini arttırdığı (47), bazılarında ise etkilemediği (24) veya düşürdüğü bildirilmiştir (21, 46). Ayrıca silajda inokulant kullanımı; silaj azot içeriğinin mikrobiyal proteine dönüşüm oranındaki artışın, rumende mikrobiyal gelişmeyi teşvik ettiği bildirilmiştir (45). Muck (33) tarafından yapılan bir çalışmada; silaj yapımında kullanılan bakteriyel inokulantların silo ortamının pH değerini düşürdüğü, hemisellülozların hidrolizi için siloda ilave bir miktar asit oluşturduğu ve bu asit ortamdan

etkilenen bitki hücre duvarı fraksiyonlarının rumen mikroorganizmaları tarafından daha hızlı ve yoğun bir şekilde parçalandığı bildirilmiştir. Silaj kuru madde sindirilebilirliğindeki artışın, hayvanların canlı ağırlık artışı, süt verimi ve yemden yararlanma performanslarında arttıracığı bildirilmiştir (20). Fakat bazı çalışmalarda ticari laktik asit bakteri inokulant katkılarının silaj fermantasyonu üzerine etkisi konusunda farklı sonuçlar bulunmuştur. Bazı çalışmalarda ticari laktik asit bakteri inokulantlarının silaj kalitesini arttırdığı (48-53); bazı çalışmalarda ise yeteri düzeyde etki göstermedikleri yönünde bildirimler bulunmaktadır (54-56).

2.1.2.2. Fermente Edilmiş Doğal Laktik Asit Sıvısı (Previously Fermented Juice, PFJ)

Ticari laktik asit bakteri inokulantlarına alternatif olarak son zamanlarda geliştirilmiş ve fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı (Previously Fermented Juice, PFJ) olarak adlandırılan, yeni bir silaj katkı maddesi önem kazanmaya başlamıştır. Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı biyolojik kökenli olması, hazırlanmasının ve kullanımının oldukça kolay olması, güvenli olması, toksik etkisinin olmaması, silaj yapımında kullanılan makinelerde korozyona sebep olmaması, çevre kirliliği yaratmaması ve doğal ürün olmaları gibi önemli avantajlara sahip olduklarından, kimyasal kökenli katkı maddelerine göre daha fazla tercih edilmektedirler (57).

Farklı bitkiler üzerindeki laktik asit bakteri sayısı ve türünün, farklı olabileceği varsayımından hareketle, silaj materyali ile aynı bitkiden hazırlanan fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının, silaj kalitesini arttırmada daha etkili olabileceği bildirilmiştir (9, 10, 58). Yonca bitkisinden hazırlanan fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarında yapılan tür tespitinde, *Laktobacillus plantarum*'un baskın tür olduğu ve izole edilen laktik asit bakterilerinin %90'dan daha fazlasının homofermentatif yapıda olduğu bildirilmiştir (59). Denek ve ark. (60) tarafından yapılmış bir çalışmada; arpa, buğday ve çayır otundan elde edilen taze yada dondurulmuş fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının pH değerlerinin; 3,75-3,86; laktik asit bakteri içeriklerinin ise $1,4 \times 10^7$ - 6×10^8 arasında olduğu bildirilmiştir. Yonca bitkisine fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı ilavesinin elde edilen yonca silajlarında besin madde içeriği, fermantasyon kalitesi, in vitro sindirilebilirlik, metabolik enerji ve gaz üretim değerlerini arttırdığı bildirilmiştir (61). Silaj yapımı sırasında silajlık materyale fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı ilavesinin, özellikle %70'in üzerinde nem

içeriğine sahip silajlarda daha etkili olduğu, ayrıca suda çözünebilir karbonhidrat kaynakları gibi katkı maddeleriyle beraber kullanmanın, fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının etkinliğini daha da arttırdığı bildirilmiştir (12). Bazı çalışmalarda ticari bakteriyel inokulantlarının etkisiz olduğu durumlarda bile fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısının silaj pH değerini düşürmek suretiyle, silaj laktik asit ve in vitro organik sindirilebilirlik düzeyini arttırıp, amonyak azotu ve bütirik asit düzeyini düşürdüğü yönünde bildirimler bulunmaktadır (13, 61). Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısının ticari laktik asit bakteri inokulantlarına göre silajı daha iyi korumasının muhtemel sebebinin, fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısının içeriğinde çok sayıda farklı laktik asit bakteri türünün bulunmasından kaynaklanabileceği bildirilmektedir (10). Silaj katkı maddesi olarak fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı kullanımı, silajın yapısında bulunan proteinleri aşırı yıkımlanmadan koruduğu (62) ve laktik asit bakteri yoğunluğunun bir sonucu olarak pH düzeyini azaltarak klostridial aktiviteyi engellediği bildirilmiştir (49).

2.1.2.3. Enzimler

Enzimler, silaj katkı maddesi olarak bakteriyel inokulantlar ve protein niteliğinde olmayan azotlu bileşiklere (NPN) kıyasla nispeten daha yeni silaj katkı grubundadır. Bu amaç için kullanılan enzimler, ya inokulantlar ile karışım halinde ya da bir veya birden fazla enzim içeren karışım halindedirler. Silaj katkı maddesi olarak enzim kullanımı bitki hücre duvarını oluşturan polisakkaritlerin parçalanmasını sağlayarak, silajın NDF içeriğini azaltmak, böylece silajın organik maddelerinin sindirilme derecesini arttırmaktır. Ayrıca bitki hücre duvarını parçalayarak fermantasyon sırasında kullanılmak üzere laktik asit bakterileri için ilave şeker açığa çıkarmaktır (3, 63). Laktik asit bakterileri ile birlikte kullanılan sellülaz, hemisellülaz ve pektinaz gibi hücre duvarını parçalayan enzimler ile amilaz gibi nişastayı parçalayan enzimler, silajlarda katkı maddesi olarak kullanıldığında, laktik asit bakterilerinin faaliyetleri için ilave substrat açığa çıkararak silaj fermantasyonunu iyileştirdikleri, NDF, ADF, asit çözücülerde çözünmeyen lignin (ADL), hemisellüloz ve sellüloz içeriklerini azalttığı; KM, OM, NDF ve ADF'nin parçalanabilirliğini veya sindirilme derecesini arttırdığı bildirilmektedir (41).

2.1.3. Asit Ortamını Güçlendirmek İçin Kullanılan Katkı Maddeleri

Silo içerisinde asit ortamı güçlendirmek için çeşitli inorganik ve organik asitler kullanılmaktadır. İnorganik asitler pH değeri üzerinde hızlı etki göstererek, asiditenin yükselmesine sebep olurken, organik asitlerde bu etki zayıftır. Her iki asit grubu da mikrobiyal faaliyetleri durdurarak, silajın aerobik stabilitesine yardımcı olur. Sülfirik asit, hidroklorik asit ve fosforik asit gibi mineral asitler içerisinde en çok tavsiye edilen fosforik asit, silajın asitliğini arttırmasının yanı sıra, hayvanların fosfor (P) ihtiyacının karşılanmasına da yardım eder. Asetik, propiyonik ve bütirik asit gibi kısa zincirli uçucu yağ asitlerinin silajlarda özellikle maya ve küf gelişimini baskı altına alarak silajlardaki aerobik bozulmayı önlediği bildirilmektedir (3). Son yıllarda silajlarda maya ve küf gelişimini önlemek ve aerobik stabiliteyi arttırmak için, organik asit temeline dayalı koruyucu özellikteki katkı maddeleri geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Özellikle formik asit ve formik asit temeline dayalı koruyucular, katıldıkları silajların pH değerini çok kısa bir sürede düşürerek fermantasyonu sınırlandırmakta ve silajlarda aerobik bozulmaya neden olan maya, küf, enterobakteriya ve klostridiya gelişimini önleyerek, silajların aerobik stabiliteğini geliştirmektedirler (56, 64, 65). Bu koruyucular ayrıca fermantasyon sırasında ve sonrasında silajların kızılaşmasını engelleyerek, silajlardaki proteolizisi de önlemektedir. Dolayısıyla bu tür silajlarda daha az amonyak azotuna rastlanmaktadır (65-68). Asitlerin silajda oluşturdukları olumlu etkilere rağmen bu tip kimyasalların kullanımlarını kısıtlayan en önemli faktör kanserojenik etkiye sahip olmalarıdır. Genel düşünce bu asitlerin yararlarından çok zararlarının olduğu yönündedir (26).

2.1.4. Koruyucu Olarak Kullanılan Katkı Maddeleri

Silajlara koruyucu olarak katılan antibiyotikler, Na Diasetat, Na Meta Bisülfid (4-6 kg/ton), Na Benzoat, Na Nitrat ve Ca Format gibi maddeler seçici olarak istenmeyen mikrobiyal aktiviteyi azaltırlar. Böylece karoten gibi bazı etkin maddelerin yıkılması engellenir. Silaj kokusunun düzelmesine yol açarlar (26). Tuz silolama esnasında meydana gelen bazı toksinleri yok etmekte, bakteriyel aktivite üzerinde olumlu etki yapmakta, silo içerisindeki drenajı arttırmakta ve laktik asit fermantasyonunu hızlandırmaktadır. Silo yemlerine %1-1,5 oranında tuz katılması yeterli görülmektedir (26).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Fermente Edilmiş Doğal Laktik Asit Sıvısının (Previously Fermented Juice, PFJ) Hazırlanması

Bu çalışmada fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısının hazırlanmasında ve silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisi (*Medicago Sativa*) Şanlıurfa ili Akçakale ilçesindeki özel bir işletmeden temin edilmiştir. Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı (Previously Fermented Juice, PFJ) temelde Masuko ve ark. (69)'nin bildirdiği yöntemle hazırlanmıştır. Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısının hazırlanmasında, elde edilecek ürünün daha konsantre olması için su miktarı azaltılmıştır. Bu amaçla, 1000 gr taze yonca bitkisine 300 ml saf su ilave edilerek blender yardımıyla 2 dakika boyunca parçalanmıştır. Elde edilen bitki sıvı karışımı iki kat tülbent bezi kullanılarak süzülmüştür. Süzüntü, cam şişelere aktarılarak; taze, %1, %3, %5 ve %10 düzeyinde sukroz ilave edilerek şişelerin ağzı kapatılmıştır. Şişeler 48, 72 ve 96 saat boyunca 30°C'de inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyonlardan çıkarılan şişeler oda ısısında 25°C'de karanlık bir ortamda 15, 30, 45 ve 60 gün muhafaza edilmiştir. Her bir grubun taze, 15, 30, 45 ve 60 gün sonunda toplam laktik asit bakteri sayımı, türü ve pH değerleri belirlenmiştir.

3.1.2. Silajlık Bitki Materyali ve Silajların Hazırlanması

Çalışmada silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisi (*Medicago Sativa*), fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı materyali için alınan yonca tarlasından çiçeklenmenin başlangıç döneminde biçilmiştir. Üniversitemiz bünyesinde bulunan mini silotrak yardımı ile silajlık bitki materyali 2-4 cm ebatlarında parçalanmıştır. Silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisinin (*Medicago Sativa*) kuru madde, ham kül, ham protein, ADF ve NDF değerleri kuru madde esasına göre sırasıyla %24.91, %10.54, %21.79, %29.54, %41.60 olarak tespit edilmiştir. Parçalanmış taze silaj materyaline bakteri sayımı göz önünde bulundurularak en

yüksek laktik asit bakteri içeriğine sahip olan %1 sukroz ve 48 saatlik inkubasyon grubundan ilave edilmiştir. Parçalanmış taze silaj materyaline kontrol (katkısız), 48 saat taze fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı, 15 ve 30 gün oda ısısında muhafaza edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarından 10^3 cfu/ml düzeyinde ilave edilerek toplam 4 farklı grup oluşturulmuştur. Bu amaçla elde edilmiş fermente edilmiş doğal laktik asit sıvıları 100 kat saf su ile sulandırılarak kullanılmıştır. Böylece konsantre olarak elde edilmiş sıvılar seyreltilerek (sahada kullanılabilirliğinin arttırılabilmesi için) %0,1 oranında taze silaj materyaline ilave edilmiştir. Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı silajlık materyale ilave edilme işleminde çapraz kontaminasyonu önlemek maksadıyla her bir grup için farklı plastik eldiven ve el spreyleri kullanılmıştır. Silajlar her bir muamele grubu için 4 tekerrür olacak şekilde 1,5 litrelik cam kavanozlara sıkıştırılarak ağzları hava almayacak şekilde silolanmıştır. Cam kavanozlar 60 gün süre ile oda ısısında karanlık bir ortamda muhafaza edilmiştir.

3.1.3. Rumen Sıvısı Materyali

Şanlıurfa'da faaliyet gösteren özel bir mezbahanedan alınan rumen sıvısı, sıcaklığını korumak amacıyla, daha önce içinde 38-40°C sıcak su ve karbondioksit (CO₂) bulunan termos kap içerisine konularak hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Silaj Materyali ve Elde Edilen Silajların Ham Besin Madde Analizleri

Çalışmada silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisi (*Medicago Sativa*) ile elde edilen silajların ham besin madde içeriklerinden kuru madde, ham kül ve ham protein analizleri AOAC (70)'e göre, ADF ve NDF analizleri ise Van Soest ve ark. (71)'e göre yapılmıştır.

3.2.2. Fermente Edilmiş Doğal Laktik Asit Sıvılarının (PFJ), Toplam Laktik Asit Bakteri Sayısı ve Tür Tespitinin Belirlenmesi

Araştırmada kullanılan fermente edilmiş doğal laktik asit sıvı materyallerinin laktik asit bakteri sayısı tempo cihazı test prosedürüne göre yapılmıştır. Laktik asit bakteri tür tespiti API (Analytical Profile Index) 50 CHL test kit prosedürüne göre yapılmıştır (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France).

3.2.2.1. Laktik Asit Bakterisi Sayımı

Çalışmadan elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının laktik asit bakteri sayımı tempo cihazı test prosedürüne göre yapılmıştır. Yöntem kaynağı olarak, TEMPO LAB (Lactic Acid Bacteria) 80071 (is an automated test for use with TEMPO, for the enumeration of Lactic Acid Bacteria in 40-48 hours in food products) kullanılmıştır. Bu amaçla yonca bitkisinden hazırlanan 10 ml fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarına 90 ml MRD (Maximum Recovery Diluent) zenginleştirme solüsyonu eklenerek stomacher yardımıyla homojenize edilmiştir. En geç 20 dakika önce hazırlanan 3.9 ml steril saf su eklenip vortekslenen Tempo LAB besiyeri şişelerine, homojenize edilerek zenginleştirilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarından, 0.1 ml ilave edilmiştir. Tempo LAB besiyeri şişeleri hızlı devirde tekrar vortekslenmiştir. Besiyeri şişeleri ve besiyerine ait inkubasyon kartları, raklara yerleştirilmiştir. Raklar inkubasyon kartlarının dolumu için Tempo Filler cihazına verilmiştir. Tempo Filler cihazından çıkarılan kart 30°C'de 40-48 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon süresi sonunda, inkübatörden çıkarılan kartlar, Tempo Reader cihazına verilmiş ve sonuç cfu/ml cinsinden cihaz tarafından sayımı yapılmıştır.

3.2.2.2. Laktik Asit Bakteri Tür Tayini

Çalışmada elde edilen ve değerlendirilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarındaki, laktik asit bakteri türlerinin belirlenmesinde, standardize edilmiş tanımlama sistemi API (Analytical Profile Index) 50 CHL test kitlerinden (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) yararlanılmıştır. Farklı seviyelerde sukroz ilave edilerek değişik sürelerde inkubasyona bırakılarak elde edilen fermente edilmiş laktik asit sıvılarındaki laktik asit

bakteri tür tayini tesadüfî seçilen laktik asit bakteri kolonilerinden belirlenmiştir. API kiti; 49 farklı karbonhidrat kaynağını, dehidre substart olarak içeren 50 adet kuyucuktan oluşmaktadır. Tür tayini yapılacak olan izolatlar anaerobik ortamda MRS Agar üzerinde 37°C’de 72 saat süreyle tek koloni düşecek şekilde aktifleştirilmiştir. Bu süre sonunda her bir petri kutusunda gelişen 2-3 mm çapındaki beyaz-krem renkli, yuvarlak-eliptik koloniler seçilerek, 2 kez MRS agarda (Merck 1.10660) saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bu izolatlardan gram pozitif, katalaz negatif ve çubuk şeklindeki bakteriler tanımlama testleri için seçilmiştir. Seçilen izolatlardan her örnek için 10 koloni seçilip tekrar MRS Agara çizilerek ekilmiştir. Anaerobik ortamda gelişen 24 saatlik koloniler steril eküvyon çubuğuyla toplanmıştır. 2 ml’lik süspansiyon medyum (ref. 70700) içerisinde 2 Mc Farland (ref. 70900) yoğunluk elde edilinceye kadar inokule edilmiştir. Bu işlemler her bir izolat için ayrı ayrı yapılmıştır. Bu yöntemde karbonhidratların fermente edilmesiyle asidik ortam oluşmakta ve buna bağlı olarak pH düşmekte, pH düşmesine bağlı olarak indikatörlerin etkinliği sonucu renk değişiklikleri oluşmaktadır. 24 saatlik inkubasyon sonunda tüplerdeki mavi-morumsu renk negatif, sarı, sarı-yeşil renk oluşumu ise pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda suşun biyokimyasal profili elde edilmiştir. Sonuçlar pozitif ve negatif şeklinde sonuç kağıdına işaretlenmiştir. Tanımlama, bilgisayar programı (API Lab Plus Program, Biomerieux) yardımıyla elde edilmiştir (72, 73).

3.2.3. Silajların pH, Amonyak Azotu, Laktik Asit ve Uçucu Yağ Asit Analizleri

Silajlar 60 günlük fermantasyon süresi sonunda açılarak kavanozların üst kısmında bulunan 3-5 cm’lik kısmı atıldıktan sonra, homojen olarak alınan 25 gr silaj örneği üzerine 100 ml saf su ilave edilerek blender yardımı ile 2 dakika süre ile parçalanmış, parçalanan silaj sıvısının pH değeri hızlı bir şekilde pH metre (WTW 7310) ölçüm cihazı ile ölçülerek kaydedilmiştir (67). Blender içerisinde bulunan sıvı süzülerek 10 ml’lik tüplere alınmıştır. Amonyak azotu analizi yapılacak örneklerin üzerine 0,1 ml 1M HCl; laktik asit ve uçucu yağ asidi analizi yapılacak örneklerin üzerine ise %25’lik 0,25 ml metafosforik asit ilave edilerek analizlerin yapılacağı zamana kadar derin dondurucuda (-18°C) saklanmıştır.

Silaj örneklerinin amonyak azotu analizleri kjeldahl metodu ile Broderick ve Kang (74) tarafından bildirilen yöntemle göre yapılmıştır. Silaj örneklerinin laktik asit ve uçucu yağ asidi (asetik, propiyonik ve bütirik asit) analizleri ise Suziki ve Lund (75)’e göre yapılmıştır.

Bu amaçla yüksek performans likit kromatografi (HPCL) cihazından (Shimadzu L.C-20 AD HPCL pump, shimadzu SIL-20 ADHT Autosampler, Shimadzu SPD M20A Detector (DAD), Shimadzu cto-20ac Columun oven, Icsep Coregel (87H3 colon) yararlanılmıştır.

3.2.4. İn Vitro Denemenin Yürütülmesi

3.2.4.1 Çözeltilerin Hazırlanması ve Gaz Üretim Tekniğinin Uygulanması

Çözeltilerin hazırlanması ve gaz üretim tekniğinin uygulanması Menke ve ark. (76) tarafından bildirilen yöntemle göre uygulanmıştır. Bu yöntemin temeli, yemlerin rumen sıvısı ile 24 saatlik inkubasyonu sonucu oluşan gaz miktarının ölçülmesine dayanmaktadır. Elde edilen sonuçlar denemede kullanılan yemlerin in vitro organik madde sindirilebilirliği (İVOMS) ve yemin metabolik enerji (ME) içeriğinin hesaplanmasında kullanılmaktadır.

3.2.4.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması

a) Makromineral Çözeltisi:

5.7 g Na_2HPO_4

6.2 g KH_2PO_4

0.6 g $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$

Yukarıda verilen kimyasal maddeler saf su ile çözdürülerek, yine saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH değeri 6.8 olarak ölçülmüştür.

b) Mikromineral Çözeltisi:

13.2 g $\text{CaCl}_2 (2\text{H}_2\text{O})$

10 g $\text{MnCl}_2 (4\text{H}_2\text{O})$

1.0 g $\text{CoCl}_2 (6\text{H}_2\text{O})$

8.0 g $\text{FeCl}_3 6 \text{H}_2\text{O}$

Yukarıda verilen kimyasal maddeler saf su ile çözdürülerek, 100 ml'ye tamamlanmıştır.

c) Tampon (Buffer) Çözeltisi:

39 g Na HCO₃

4 g (NH₄) HCO₃

Yukarıda verilen kimyasal maddeler saf su ile çözdürülerek, 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

d) Resazurin Çözeltisi:

100 mg resazurin saf suda çözdürülerek, 100 ml'ye tamamlanmıştır.

e) İndirgeme (Redüksiyon) Çözeltisi:

Her çalışmada taze olarak hazırlanmıştır. 47.50 ml saf suya 2 ml 1 N NaOH ilave edilerek, üzerine 285 mg Na₂S (7H₂O) eklenerek karışım çözdürülmüştür.

3.2.4.1.2. Yöntemin Uygulanması

Analizin uygulanmasında yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan çözeltiler, Woulf şişesine aşağıda verilen miktar ve sıra ile ilave edilmiştir.

474.50 ml saf su

0.12 ml mikro mineral çözeltisi

237.23 ml Tampon (buffer) çözeltisi

237.23 ml makro mineral çözeltisi

1.22 ml resazurin çözeltisi

49.44 ml İndirgeme (redüksiyon) çözeltisi

Bu karışım, rumen sıvısı laboratuara gelmeden hemen önce hazırlanmış, CO₂ gazı altında 39°C deki su banyosunda manyetik bir karıştırıcı ile karıştırılarak, rumen sıvısı ilave edilene kadar bekletilmiştir.

Şanlıurfa'da faaliyet gösteren özel bir mezbahanedan alınan rumen sıvısı, sıcaklığını korumak amacıyla, daha önce içinde 38-40°C sıcak su ve CO₂ bulunan termos kap içerisine konularak hızlı bir şekilde laboratuara getirilmiştir. Laboratuara getirilen rumen sıvısı, kaba

partiküllerinden ayrılması için hızlı bir şekilde CO₂ gazı altında 4 kat tülbent bezinden süzülmüştür. Laboratuarda hazırlanan 1000 ml karışıma (suni tükürük karışımı) 500 ml süzölmüş rumen sıvısı ilave edilmiştir. Bu karışım içerisinde ince bir hortum vasıtasıyla sürekli CO₂ gazı verilmiş ve bu sırada renk değişimi kontrol edilmiştir (yaklaşık 15 dakika). Bu aşamaya kadar tüm işlemler 38°C'de yapılmıştır. Daha önceden içerisinde 1 mm elekten geçecek şekilde öğütölmüş silaj örneklerinden yaklaşık 200-220 mg özel cam şırıngalara konularak inkubatorde 39°C'de bekletilmiştir. Bekletilen bu cam şırıngalara dispenser yardımıyla 30 ml rumen sıvısı karışımından konulduktan sonra, içindeki hava kabarcıkları ortamdandan uzaklaştırılmış ve uç kısmındaki kısıkaç sıkıştırılmıştır. İlk hacim değeri okunup kaydedilmiş ve şırıngalar 39°C'de sabitlenmiş olan özel yapım su banyosuna yerleştirilmiştir. Gaz üretim tekniğı Menke ve ark. (76) tarafından bildirilen yöntemeye göre uygulanmıştır. İnkubasyon 39°C'de 24 saat sürdürölmüş ve 24. saat gaz oluşum değeri kaydedilmiştir. Gaz üretim tekniğinde her bir örneğı için 4 tekrör olacak şekilde çalışılmıştır.

3.2.4.1.3. İVOMS ve ME İçeriklerinin Hesaplanması

Gaz üretim miktarları belirlendikten sonra aşağıdaki eşitlikler kullanılarak İVOMS ve ME değeri hesaplanmıştır (77).

$$\text{İVOMS (\%)} = 14.88 + 0.889G\ddot{U} + 0.45HP + 0.0651HK$$

$$\text{ME (MJ / kg KM)} = 2.20 + 0.136G\ddot{U} + 0.057HP$$

GÜ = 24 saatlik inkubasyon sonucu açığa çıkan net gaz miktarı (ml).

HP = Yemin ham protein içeriğı (% , KM).

HK = Yemin ham kül içeriğı (% , KM).

3.2.5. İstatistiksel Analiz

Araştırma sonunda elde edilen veriler SPSS paket programının GLM prosedüründe değerlendirilmiştir. Grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Duncan testi kullanılmıştır. Bu amaçla SPSS (78) paket programından yararlanılmıştır.

4. BULGULAR

Farklı seviyelerde (%1, %3, %5 ve %10) sukroz ilave edilerek değişik sürelerde inkubasyona (48, 72 ve 96 saat) bırakılarak elde edilen fermente edilmiş laktik asit sıvılarının taze ve değişik sürelerde (15, 30, 45 ve 60 gün) oda ısısında bekletilmesi sonucunda tespit edilen homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakteri türleri Tablo 2’de sunulmuştur.

Tablo 2. Farklı seviyelerde sukroz ilavesi ve değişik sürelerde inkubasyona bırakılarak elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının taze ve değişik sürelerde bekletilmesinin laktik asit bakteri türleri üzerine etkisi.

		Homofermentatif Laktik Asit Bakterileri			Heterofermentatif Laktik Asit Bakterileri		
İnkubasyon Süresi (Saat)	Bekletilme Süresi (Gün)	<i>Lb. Plantarum</i>	<i>Lb. delbrueckli ssp Lactis1</i>	<i>Lb. delbrueckli ssp Bulgaricus</i>	<i>Lb. Brevis1</i>	<i>Lb. Brevis2</i>	<i>Leu. Lactis</i>
		48	Taze		%3, +		%5, +
15			%1, +	%1, +	%3, +		
30	%10, +						
45	%5, +						
60	%3, +						
72	Taze			%10, +	%5, +		%3, +
	15		%1, +			%3, +	
	30	%10, +					
	45						
	60						
96	Taze		%3, +	%10, +	%3, +		%1, +
	15					%10, +	
	30	%10, +					
	45						
	60						

%1, %3, %5 ve %10: Sukroz seviyesi; 48, 72 ve 96 saat: inkubasyon süresi; Taze, 15, 30, 45 ve 60 gün: Oda ısısında bekletilme süresi; +: pozitif

Tablo 3. Farklı seviyelerde sukroz ilavesi ve değişik sürelerde inkubasyona bırakılarak elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının taze ve değişik sürelerde bekletilmesinin toplam laktik asit bakteri sayısı üzerine etkisi ($\times 10^8$ cfu/ml).

İnkübasyon süresi	Sukroz seviyesi	Taze	15.Gün	30.Gün	45.Gün	60.Gün	SEM	P
48 saat	% 1	6,953 ^{c,A}	5,958 ^{a,A}	0,597 ^{d,B}	1,617 ^{a,B}	0,480 ^{bc,B}	0,572	***
	% 3	2,327 ^{efg,A}	0,534 ^{cd,B}	0,044 ^{e,B}	0,004 ^{c,B}	0,009 ^{d,B}	0,205	***
	% 5	1,978 ^{g,A}	1,805 ^{bc,A}	0,227 ^{e,B}	0,001 ^{c,B}	0,001 ^{d,B}	0,173	***
	% 10	1,900 ^{g,A}	1,367 ^{bcd,A}	0,300 ^{de,B}	0,002 ^{c,B}	0,003 ^{d,B}	0,174	***
72 saat	% 1	3,817 ^{de,A}	2,600 ^{b,B}	1,807 ^{a,BC}	1,217 ^{ab,C}	0,393 ^{c,D}	0,244	***
	% 3	4,258 ^{d,A}	1,368 ^{bcd,B}	1,250 ^{b,BC}	0,888 ^{b,C}	0,004 ^{d,D}	0,272	**
	% 5	9,883 ^{b,A}	0,650 ^{cd,B}	0,284 ^{de,B}	0,004 ^{c,B}	0,000 ^{d,B}	0,725	***
	% 10	2,383 ^{efg,A}	1,718 ^{bcd,A}	0,020 ^{e,B}	0,007 ^{c,B}	0,000 ^{d,B}	0,215	***
96 saat	% 1	2,217 ^{fg,B}	5,233 ^{a,A}	1,467 ^{b,B}	1,383 ^{a,B}	0,900 ^{a,B}	0,337	***
	% 3	4,817 ^{d,A}	0,365 ^{d,CD}	1,285 ^{b,B}	0,122 ^{c,D}	0,748 ^{ab,C}	0,327	***
	% 5	3,667 ^{def,A}	0,785 ^{cd,B}	0,915 ^{c,B}	0,004 ^{c,C}	0,000 ^{d,C}	0,266	***
	% 10	11,500 ^{a,A}	1,497 ^{bcd,B}	0,030 ^{e,C}	0,011 ^{c,C}	0,000 ^{d,C}	0,847	***
SEM		0,388	0,233	0,078	0,082	0,048		
P		***	***	***	***	***		

a,b,c,d,e,f,g: aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler farklı bulunmuştur; A,B,C,D: aynı satırda farklı harf taşıyan değerler farklı bulunmuştur; **: P<0.01; ***: P<0.001; %1, %3, %5 ve %10: Sukroz seviyesi; 48, 72 ve 96 saat: inkübasyon süresi; Taze, 15, 30, 45 ve 60 gün: Oda ısısında bekletilme süresi

Farklı seviyelerde sukroz ilavesi (%1, %3, %5 ve %10) ve değişik sürelerde (48, 72 ve 96 saat) 30°C’de inkübe edilerek elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının değişik sürelerde (taze, 15, 30, 45 ve 60 gün) oda ısısında (25°C’de) muhafaza edilmesiyle, bu sıvılardaki toplam laktik asit bakteri sayıları Tablo 3’te sunulmuştur. Taze olarak değerlendirilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarında inkübasyon süreleri dikkate alındığında, en yüksek laktik asit bakteri içeriği, 48 saatlik inkübasyonda %1 sukroz ($6,953 \times 10^8$ cfu/ml), 72 saatlik inkübasyonda %5 sukroz ($9,883 \times 10^8$ cfu/ml), 96 saatlik inkübasyonda %10 sukroz ($11,500 \times 10^8$ cfu/ml) ilave edilen sıvılardan elde edilmiştir (P<0.001). Oda ısısında 15 ve 45 gün bekletilen sıvılarda ise %1 sukroz ilavesi ile 48 saat inkübe edilen sıvılardan en yüksek değerler ($5,958 \times 10^8$ ve $1,61 \times 10^8$ cfu/ml) elde edilirken, 30 günlük oda ısısında bekletilmeye %1 sukroz ilavesi ile 72 saat inkübasyon değeri ($1,807 \times 10^8$ cfu/ml), 60 günlük bekletilmesinde ise %1 sukroz ilavesi ile 96 saat inkübasyon değeri ($0,9 \times 10^8$ cfu/ml) en yüksek bulunmuştur (P<0.001). Genel olarak her bir inkübasyon süresi (48, 72 ve 96 saat) için (taze sıvılar hariç) tüm oda ısısında bekletilme sürelerinde (15, 30, 45 ve 60 gün) sukroz seviyesinin artışına bağlı olarak elde edilen sıvılardaki toplam laktik asit bakteri sayıları azalmıştır (P<0.001). Her bir inkübasyon süresinde (48, 72 ve 96 saat) ve her bir sukroz seviyesinde (%1, %3, %5, %10), bekletilme süresinin (taze, 15, 30, 45 ve 60 gün)

uzamasına bağılı olarak genel anlamda toplam laktik asit bakteri sayılarında azalmalar görülmüştür (P<0.001). Her bir inkubasyon süresi (48, 72 ve 96 saat) ve her bir sukroz seviyesinde (%1, %3, %5, %10) en yüksek laktik asit bakteri sayıları en fazla taze olarak elde edilen gruplarda belirlenmiştir (P<0.001).

Tablo 4. Farklı seviyelerde sukroz ilavesi ve değişik sürelerde inkubasyona bırakılarak elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının taze ve değişik sürelerde bekletilmesinin pH değeri üzerine etkisi.

İnkübasyon süresi	Sukroz seviyesi	Taze	15.Gün	30.Gün	45.Gün	60.Gün	SEM	P
48 saat	% 1	4,64 ^{a,B}	4,73 ^{c,B}	4,65 ^{c,B}	6,20 ^{a,A}	4,55 ^{c,B}	0,119	***
	% 3	4,52 ^{b,A}	3,82 ^{ef,D}	3,83 ^{e,D}	3,92 ^{cd,B}	3,87 ^{e,C}	0,050	***
	% 5	4,49 ^{c,A}	3,75 ^{gh,C}	3,75 ^{e,C}	3,79 ^{cd,B}	3,82 ^{ef,B}	0,053	***
	% 10	4,46 ^{d,A}	3,76 ^{gh,B}	3,69 ^{e,C}	3,74 ^{cd,B}	3,72 ^{fg,BC}	0,055	***
72 saat	% 1	4,64 ^{a,C}	4,85 ^{b,BC}	5,65 ^{b,A}	5,50 ^{b,AB}	4,74 ^{b,BC}	0,132	*
	% 3	4,22 ^{e,A}	3,84 ^{de,BC}	3,80 ^{e,C}	4,02 ^{cd,B}	3,71 ^{fg,C}	0,132	***
	% 5	4,23 ^{e,A}	3,73 ^{hi,C}	3,83 ^{e,B}	3,83 ^{cd,B}	3,76 ^{fg,BC}	0,132	***
	% 10	4,18 ^{f,A}	3,69 ^{i,B}	3,64 ^{e,C}	3,66 ^{d,C}	3,70 ^{g,B}	0,038	***
96 saat	% 1	4,62 ^{a,E}	6,16 ^{a,D}	6,32 ^{a,BC}	6,36 ^{a,B}	6,91 ^{a,A}	0,148	***
	% 3	3,98 ^{i,C}	3,87 ^{d,D}	4,14 ^{d,B}	4,26 ^{c,A}	4,30 ^{d,A}	0,033	***
	% 5	4,01 ^{h,A}	3,79 ^{fg,CD}	3,84 ^{e,C}	3,93 ^{cd,B}	3,75 ^{fg,D}	0,020	***
	% 10	4,08 ^{g,A}	3,70 ^{i,C}	3,67 ^{e,C}	3,76 ^{cd,B}	3,69 ^{g,C}	0,029	***
SEM		0,029	0,085	0,102	0,123	0,105		
P		***	***	***	***	***		

a,b,c,d,e,f,g,h,i: aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler farklı bulunmuştur; A,B,C,D: aynı satırda farklı harf taşıyan değerler farklı bulunmuştur; *: P<0.05; ***: P<0.001; %1, %3, %5 ve %10: Sukroz seviyesi; 48, 72 ve 96 saat: inkubasyon süresi; Taze, 15, 30, 45 ve 60 gün: Oda ısısında bekletilme süresi

Farklı seviyelerde sukroz ilavesi (%1, %3, %5 ve %10) ve değişik sürelerde (48, 72 ve 96 saat) 30°C’de inkube edilerek elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının değişik sürelerde (taze, 15, 30, 45 ve 60 gün) oda ısısında (25°C)’de muhafaza edilmesiyle elde edilen sıvıların pH değerleri Tablo 4’te verilmiştir. Taze fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının en yüksek pH değeri 48 ve 72 saatlik inkubasyon ve %1 sukroz ilavesinden (4.64) ile elde edilmiştir. Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının bekletilme süreleri dikkate alındığında; en yüksek pH değerine 15, 30, 45 ve 60 gün oda ısısında bekletilmesinde, 96 saatlik inkubasyon ve %1 sukroz ilavesi (6.16, 6.32, 6.36 ve 6.91) ile elde edilmiştir (P<0.001). Sukroz seviyesi, inkubasyon ve bekletilme süreleri birlikte değerlendirildiğinde 30 gün oda ısısında muhafaza edilen, 72 saatlik inkubasyon ve %10 sukroz ilavesi en düşük pH değerine (3,64) sahip olmuştur (P<0.001). Genel olarak değerlendirildiğinde her bir inkubasyon süresi (48, 72 ve 96 saat) ve tüm bekletilme sürelerinde (taze, 15, 30, 45 ve 60

gün) sukroz seviyesinin artışına bağlı olarak elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit bakteri sıvılarının pH değerinde istatistiksel azalmalar görülmüştür ($P<0.001$). Tüm inkubasyon sürelerinde (48, 72 ve 96 saat); %3, %5 ve %10 sukroz seviyelerinde bekletilme süresinin uzamasına (taze, 15, 30, 45 ve 60 gün) bağlı olarak genelde pH değerlerinin azaldığı, %1 sukroz seviyesinde ise tüm inkubasyon süreleri için (48, 72 ve 96 saat) pH değerinin arttığı görülmüştür ($P<0.001$).

%1 sukroz ilave edilerek 48 saat inkubasyon sonrası elde edilen taze ve farklı sürelerde (15-30 gün) oda ısısında bekletilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının, yonca silajının ham besin madde, in vitro organik madde sindirilebilirliği ve metabolik enerji değeri üzerine etkileri Tablo 5'te sunulmuştur.

Tablo 5. Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının yonca silajlarının besin madde (%KM), in vitro organik madde sindirilebilirliği (IVOMS,% KM) ve Metabolik enerji (ME, MJ/Kg KM) içeriğine etkisi.

	KM	HK	HP	ADF	NDF	IVOMD	ME
Kontrol	23.75 ^b	11.04 ^a	22.80 ^a	25.71 ^c	35.99 ^a	77.24	11.29
PFJ-T	24.86 ^a	10.64 ^b	21.99 ^b	26.99 ^b	34.55 ^b	76.62	11.16
PFJ-15	24.81 ^a	11.07 ^a	22.13 ^b	27.97 ^a	34.86 ^{ab}	76.04	11.02
PFJ-30	24.87 ^a	10.90 ^a	22.10 ^b	26.99 ^b	32.99 ^c	74.70	10.84
SEM	0.14	0.05	0.10	0.24	0.33	0.54	0.08
Önemlilik	***	**	**	***	**	Önemsiz	Önemsiz

a,b,c,d: Her sütunda farklı harf taşıyan değerler farklı bulunmuştur ($P<0.001$); **PFJ:** Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı (Previously Fermented Juice); **PFJ-T:** %1 sukroz ilavesi ile 48 saat inkubasyon sonucu taze olarak kullanılan sıvı; **PFJ-15:** %1 sukroz ilavesi ile 48 saat inkubasyon sonucu 15 gün oda ısısında bekletilerek kullanılan sıvı; **PFJ-30:** %1 sukroz ilavesi ile 48 saat inkubasyon sonucu 30 gün oda ısısında bekletilerek kullanılan sıvı, **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Elde edilen verilere göre kontrol silajı ile kıyaslandığında taze, 15 ve 30 gün oda ısısında bekletilen doğal laktik asit sıvıları katılarak elde edilen silajların kuru madde değerleri (%24,81-%24,87), kontrol silajından elde edilen değerden (%23,75) yüksek bulunmuştur ($P<0.001$). Çalışmadan elde edilen silajların ham protein içerikleri değerlendirildiğinde; taze, 15 gün ve 30 gün oda ısısında bekletilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvıları, kontrol grubu silajı ile kıyaslandığında silajların ham protein değerlerini azaltmıştır ($P<0.001$). Çalışmada en yüksek ham protein içeriği (%22,80 KM) kontrol silajından elde edilmiştir. Elde edilen silajların ADF ve NDF değerleri incelendiğinde; ADF içeriği; taze, 15 ile 30 gün oda ısısında bekletilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı ilavesine bağlı olarak, kontrol silajına kıyasla artış göstermiş, en düşük ADF içeriğinin

(%25,71) ile kontrol silajından, en yüksek ADF içeriğinin ise (%27,97) ile 15 gün oda ısısında bekletilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı katılan silajlardan elde edilmiştir (P<0.001). NDF içeriği ise; kontrol silajına kıyasla taze ve 15 ile 30 gün oda ısısında bekletilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı katılması, genel olarak NDF değerlerini azaltmıştır (P<0.001). En yüksek NDF değeri (%35,99 KM) ile kontrol silajında belirlenirken, en düşük NDF değeri (%32,99 KM) ise 30 gün oda ısısında bekletilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı katkılı silajlardan elde edilmiştir (P<0.001). Çalışmada değerlendirilen silajların İVOMS ve ME parametreleri bakımından istatistiksel olarak önem görülmemiştir. En yüksek İVOMS ve ME değerleri rakamsal olarak (%77,24 ve 11,29 MJ/kg KM) kontrol silajından elde edilmiştir.

Tablo 6. Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının, yonca silajının fermantasyon özellikleri üzerine etkisi.

	pH	NH ₃ -N (% TN)	LA (g/kg,KM)	AA (g/kg,KM)	PA (g/kg,KM)	BA (g/kg,KM)
Kontrol	4.62 ^a	12.99 ^a	53.57 ^d	25.55 ^a	ND	6.17
PFJ-T	4.47 ^b	10.91 ^c	64.25 ^b	15.90 ^c	ND	ND
PFJ-15	4.46 ^b	12.08 ^b	62.68 ^c	22.14 ^b	ND	ND
PFJ-30	4.41 ^b	12.36 ^b	67.78 ^a	22.64 ^b	ND	ND
SEM	0.02	0.22	1.37	0.94	-	-
Önemlilik	***	***	***	***	-	-

a,b,c,d: Her sütunda farklı harf taşıyan değerler farklı bulunmuştur (P<0.001).

PFJ: Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı (Previously Fermented Juice); **PFJ-T:** %1 sukroz ilavesi ile 48 saat inkubasyon sonucu taze olarak kullanılan sıvı; **PFJ-15:** %1 sukroz ilavesi ile 48 saat inkubasyon sonucu 15 gün oda ısısında bekletilerek kullanılan sıvı; **PFJ-30:** %1 sukroz ilavesi ile 48 saat inkubasyon sonucu 30 gün oda ısısında bekletilerek kullanılan sıvı; **TN:** Toplam azot, ***: P<0.001.

Taze ve farklı sürelerde (15-30 gün) oda ısısında bekletilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının yonca silajının fermantasyon özellikleri üzerine etkisi Tablo 6'da sunulmuştur. Silajların pH değerleri incelendiğinde taze ve oda ısısında farklı sürelerde (15-30 gün) bekletilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının, silajın pH değerlerini genel olarak azalttıkları (P<0.001) görülmüştür. Beklenen sonuç olarak en yüksek pH değeri (4,62) kontrol silajından elde edilmiştir (P<0.001).

Silajların amonyak azotu değerleri incelendiğinde, kontrol silajına kıyasla fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı ilave edilen gruplarda silaj amonyak azotu değerinin azaldığı (P<0.001) görülmüştür. En yüksek amonyak azotu değeri (%12,99 TN) kontrol silajında belirlenirken en düşük amonyak azotu değeri ise (%10,91 TN) olarak fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısının taze olarak katıldığı silajlardan elde edilmiştir (P<0.001).

Silajların önemli fermantasyon kriterlerinden olan laktik asit düzeyine bakıldığında, en yüksek laktik asit içeriği (67,78 g/kg KM) ile 30 gün süre ile ortam ısısında muhafaza edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvı katkılı silajdan elde edilirken, en düşük laktik asit değeri ise (53.57 g/kg KM) kontrol silajından elde edilmiştir ($P<0.001$). Silajlara taze ve 15 ile 30 gün oda ısısında bekletilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısının katılması kontrol silajına kıyasla silajların asetik asit düzeyinde istatistiksel olarak azalmalara neden olmuştur ($P<0.001$). En yüksek asetik asit içeriği (25,55 g/kg KM) ile kontrol silajında belirlenirken, en düşük asetik asit değeri ise taze olarak silaja katılan fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısından elde edilmiştir ($P<0.001$). Çalışmada değerlendirilen silajların hiçbirisinde propiyonik asit belirlenemezken, bütirik asit ise sadece kontrol silajında (6,17 g/kg KM) belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Farklı seviyelerde sukroz ilave edilerek değişik sürelerde inkubasyona bırakılarak elde edilen fermente edilmiş laktik asit sıvılarında tespit edilen homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakteri türleri Tablo 2’de sunulmuştur. Laktik asit bakteri tür tayini tesadüfi seçilen laktik asit bakteri kolonilerinden belirlenmiştir. Tüm inkubasyon sürelerinde (48, 72 ve 96 saat) taze olarak hazırlanan fermente edilmiş laktik asit sıvılarında *Leu. laktic*’in ürediği tespit edilmiştir. Benzer durum *Lb. brevis 1* ve *Lb. delburueckli lactis 1* içinde ortaya çıkmıştır. Oda ısısında bekletilme süresinin uzamasına bağlı olarak asit ortamda çoğalabilen ve asit ortama dayanıklı olan *Lb. plantarum* hakim bakteri türü olmuştur. Bitkisel ürünlerin fermantasyonu, heterofermentatif bir laktik asit bakterisi olan ve son ürün olarak özellikle laktik asit ve asetik asit üreten *Leuconostoc (Leu.) mesenteroides* tarafından başlatılır (79, 80). Asit miktarındaki artış ile beraber bu bakteriler ölür ve fermantasyon *Lactobacillus (Lb.) brevis*, *Pediococcus (P) pentosaceus* ve *Lb. plantarum* tarafından devam ettirilir. Ortam pH değerinin düşüşü *Lb. brevis* ve *P. pentosaceus* türlerinin etkisinin azalmasına neden olur ve fermantasyon genellikle aside dayanıklı *Lb. plantarum* bakterisi tarafından tamamlanır (79). Yonca bitkisi ile yapılan bazı çalışmalarda; *Lb. plantarum* baskın tür olarak görülmüş ve izole edilen laktik asit bakterilerinin %90’dan daha fazlası homofermentatif tür olarak belirlenmiştir (59).

Farklı seviyelerde (%1, %3, %5 ve %10) sukroz ilave edilerek değişik sürelerde (48, 72 ve 96 saat) inkubasyona bırakılarak elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarında taze olanlar hariç, farklı sürelerde oda ısısında bekletilmesi ile (15, 30, 45 ve 60 gün) sukroz seviyesinin artışına bağlı olarak toplam laktik asit bakteri sayılarında istatistiksel olarak azalmalar görülmüştür ($P < 0.001$). Laktik asit bakteri sayılarının azalması, laktik asit bakterilerinin oluşturdıkları asit nedeniyle ortam pH düzeyinin düşmesi, bu düşük pH seviyesinde bazı laktik asit bakterilerinin gelişiminin inhibe olması ile açıklanabilmektedir (81). Taze olarak hazırlanan fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarında ise 48 saatlik inkubasyon süresi sonunda sukroz seviyesinin artışına bağlı olarak toplam laktik asit bakteri içeriği azalırken; 72 ve 96 saatlerde ise bu durumun aksine, genel olarak bir artış eğilimi görülmüştür. Mikroorganizmaların gelişmelerinde önemli fiziksel koşullarından (sıcaklık, su

aktivitesi, çevrenin bağıl nemi, yüzey gerilimi, ısı, elektrik, koruyucu biyolojik yapılar) biri de mikroorganizmanın bulunduğu ortamın ozmotik basıncıdır. Farklı sukroz konsantrasyonuna bağlı olarak, farklı inkubasyon sürelerindeki (48, 72 ve 96 saat) mikroorganizma popülasyonundaki değişme, ortam konsantrasyonunun osmotik basıncına bağlı olarak değişmekte olup, ortama adaptasyondan sonra logaritmik çoğalmanın daha hızlı şekillendiği bilgisi ile açıklanabilmektedir (82).

Farklı oranlarda sukroz ilavesi ve değişik sürelerde inkubasyona bırakılarak elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının taze ve değişik sürelerde (15, 30, 45 ve 60 gün) oda ısısında bekletilmeleri ile pH değerlerinde genel olarak azalma şekillenmiştir ($P < 0.001$; $P < 0.05$). Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının inkubasyonu sırasında sukroz seviyesinin artışına bağlı olarak; ortamda bulunan homofermentatif laktik asit bakterileri, şekerlerden temel ürün olarak laktik asit oluştururken, heterofermentatif laktik asit bakterileri ise laktik asitin yanı sıra, etil alkol, asetik asit, diasetil ve karbondioksit gibi ikincil ürünleri de üretirler (83-85). Böylece ortamda artan laktik ve asetik asit miktarları pH değerini düşürmektedir (86). Bu çalışmada sukroz seviyesinin artışı ve inkubasyon süresinin uzamasına bağlı olarak fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının pH değerinin azalması, Bureenok ve ark. (87)'nin %1, %3, %5 ve %7 seviyelerinde sukroz ilave ederek hazırladıkları fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının pH değerleri ile uyumlu bulunmuştur. Mayalar genellikle yuvarlak, silindirik, oval ya da limon şeklinde hücre morfolojisine sahip olup geniş bir pH aralığında (2.0-9.0) üreyebilirler. Laktik asit fermantasyonunda laktik asit bakterileri ve mayalar önemli mikroorganizma gruplarıdır. Fermentatif mayalar; pH değerinin azalmasına bağlı olarak gelişmeleri yavaşlayan laktik asit bakterilerinin kullanmadıkları şekerleri kullanarak fermantasyona neden olurken (88), oksidatif mayalar ise karbonhidrat kaynağı olarak laktik asidi kullanırlar (89). Bu çalışmada %1 sukroz ilave edilerek değişik sürelerde inkubasyona (48, 72 ve 96 saat) bırakılarak elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının bekletilmeleri aşamalarında pH değerlerinde dalgalanma ve buna bağlı olarak laktik asit bakteri sayılarında değişiklikler ortaya çıkmıştır. Bu dönemde hızla gelişen mayalar tarafından bir miktar laktik asidin parçalanması ile ortamın pH düzeyinin arttığı, artan pH düzeyi ise laktik asit bakterilerinin yeniden etkinlik kazanmalarına neden olmuştur (81). Arslankoz (90)'un laktik asit bakterilerinin pH 5.0-6.5 aralığında iyi gelişme gösterdiği bildiri, bu çalışmadaki pH dalgalanmalarında ortaya çıkan laktik asit bakterilerinin artışını açıklayabilmektedir.

Bu çalışmada, kontrol silajı ile kıyaslandığında %1 sukroz ilavesi ve 48 saatlik inkubasyon sonucu elde edilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı katkısına bağlı olarak taze ve tüm oda ısısında bekletilme (15 ve 30 gün) süresine bağlı olarak yonca silajlarının kuru madde değeri artmıştır ($P<0.001$). Bu sonuç bazı çalışmalar (61, 62, 91) ile uyumlu bulunmuştur. Henderson ve ark. (92)'ı silaj kuru madde düzeyindeki artışın sebebini; silo içerisinde pH düzeyindeki azalmaya bağlı olarak, bütirik asit bakterileri ve birçok mikroorganizmanın inhibe edilmesine bağlamaktadırlar. Benzer şekilde, silo içerisinde homofermentatif laktik asit bakterilerinin glukoz ve fruktoz gibi şekerleri laktik aside çevirerek, ortamdaki laktik asit miktarındaki artışa bağlı olarak kuru madde kaybının azaldığı bildirilmektedir (93). Silo içerisindeki silaj materyalinin silolanma sürecindeki kuru madde kayıp oranı %10-12'den daha düşük düzeyde olduğunda iyi fermantasyon, %20 oranından daha fazla kayıp şekillendiği durumda ise kötü fermantasyon olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada ise kontrol silajları ile kıyaslandığında fermente edilmiş doğal laktik asit sıvısı katkılı gruplarda kuru madde kaybının şekillenmediği görülmüştür. Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının katıldığı silajlar, kontrol silajı ile kıyaslandığında (13, 62)'nin yaptığı çalışmalarla uyumlu olarak İVOMS ve ME değerleri kontrol ve katkılı silajlar ile istatistiksel olarak benzer bulunmuştur.

Kontrol silajı ile kıyaslandığında, %1 sukroz ilavesi ve 48 saatlik inkubasyon sonucu elde edilen taze ve farklı sürelerde (15 ve 30 gün) bekletilerek hazırlanan fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının yonca silajına ilave edilmesi ile silajların pH değerlerinde azalmalar şekillenmiştir ($P<0.001$). Farklı oranlarda sukroz katılarak hazırlanan fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının, yonca bitkisine ilave edilerek yapılan bazı silaj çalışmalarında (13, 61, 62), kontrol grubunun pH değerleri, bu çalışmadaki pH (4.62) değerinden yüksek iken; yonca bitkisi ile yapılan diğer silaj çalışmalarının (10, 12) kontrol grubu pH değerleri (4.59-4.67) bu çalışmadan elde edilen değerle uyumlu görülmüştür. Silajlık bitkilerin içerdiği epifitik mikroorganizma popülasyonları; bitki türü, olgunlaşma dönemi, hava koşulları, soldurma ve parçalama gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (94). Bu çalışmada kontrol silajının pH değeri (4.62)'nin diğer çalışmalara ve beklenen sonuca göre düşük bulunması; silajlık yonca bitkisine uygulamış olduğumuz parçalama (partikül büyüklüğü 3-5 cm) ile serbest kalan bitki enzimlerinin, daha önce aktif olmayan bakterileri aktive etmesi (35) özellikle laktik asit bakteri popülasyonunu arttırması (95, 96) ve silajın hazırlandığı kavanozlarda iyi sıkıştırılması ile açıklanabilmektedir.

Çalışmada kontrol silajı ile kıyaslandığında fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının ilavesine bağlı olarak silaj amonyak azotu değerinde istatistiksel olarak azalma şekillenmiştir ($P<0.001$). Bu sonuç birçok çalışma (10, 12, 13, 61, 62, 97) ile uyumlu bulunmuştur. Silonun iyi sıkıştırılıp, sıkıştırılmaması, silo içerisindeki laktik asit üretim hızı ve silajlık bitkinin kuru madde içeriği silaj NH_3-N düzeyi ile yakından ilişkilidir (16). Proteinlerin yıkımına bağlı olarak proteolizisin artışı ve sonuç olarak amonyak azot düzeyi artar. Ortamda laktik asit artışına bağlı olarak proteolizis azalır dolayısıyla proteinlerin yıkımında azalır (98). Bu çalışmadaki silajlar; 1,5 litrelik cam kavanozlarda, bitki partikül büyüklüğü 2-4 cm boyutlarına getirilerek modifiye edilmiş meyve sıkacağı ile sıkıştırılarak elde edilmiştir. Silo içerisinde proteolizisin şekillenmemesi muhtemelen sıkıştırma işleminin ve partikül büyüklüğünün küçültülmesinden kaynaklanmaktadır. Carpintero ve ark. (99)'na göre silaj amonyak değerinin total nitrojen değerinin %11'den daha düşük seviyede ise iyi kaliteli silaj sınıfında değerlendirilmektedir. Her ne kadar bu çalışmada elde edilen silajların amonyak değerleri genel olarak %11 değerinden düşük olmasalar da bu değere yakın bulunmuşlardır.

Kontrol silajı ile kıyaslandığında taze ve farklı sürelerde (15 ve 30 gün) bekletilerek hazırlanan fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının ilave edildiği silajların laktik asit içeriğini arttırırken, asetik asit değerlerini azaltmıştır ($P<0.001$). Yapılan birçok çalışmada silaj laktik asit oranındaki artış, asetik asit oranındaki azalma bu çalışma ile uyumluluk göstermektedir (10, 12, 13, 91, 97). Fermente edilmiş doğal laktik asit sıvıları katılarak elde edilen silajların laktik asit düzeyinin artışı, silaj pH değerinin düşüşüne bağlı olarak laktik asit bakterilerinin fermantasyonunun yoğunlaşmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (49). Kaliteli bir silajdaki laktik asit düzeyi toplam silaj asitlerinin %65-70 düzeyinde olması gerekmektedir (98). Bu çalışmanın kontrol grubundaki laktik asit miktarı belirtilen oranın altında kalırken (% 62.5), taze ve farklı sürelerde (15 ve 30 gün) oda ısısında bekletilen fermente edilmiş doğal laktik asit sıvılarının ilave edildiği silajlarda ise belirtilen oranın üzerinde olduğu (%80.16, % 73.87, % 74.96) görülmüştür.

Bu çalışmada elde edilen silajlardan sadece kontrol silajında bütirik asit içeriği (6.17 g/kg KM) bazı çalışmalarla (60, 61) benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisinin, ham protein oranının (21.79 g/kg KM) yüksek, kuru madde (24.71g/kg) ve suda çözünebilir karbonhidrat içeriğinin düşük olması, klostrodiyal bakterilerin gelişimini inhibe etmek için gerekli olan laktik asit üretiminde yetersizliğe neden olduğu düşünülmektedir (49). Bu durumun sonucu olarak sakkarolitik klostridiyalar, bitki

bünyesindeki şekerleri ve organik asitleri, bütirik aside dönüştürmektedir (10). Bu durum çalışmanın kontrol grubundaki bütirik asit varlığını açıklamaktadır.

Sonuç olarak; farklı seviyelerde sukroz ilavesi ile değişik sürelerde inkubasyona bırakılarak elde edilen fermente edilmiş laktik asit sıvılarının, yonca silajlarına ilavesi ile silaj fermantasyon kalitesini arttırdığı; yonca bitkisinden hazırlanacak silajlara ekonomik, kolay hazırlanabilir ve etkili bir katkı maddesi olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Ancak uygulamanın pratikte kullanılabilmesi için bu katkı maddesi ile büyük silolarda yonca bitkisinin değişik parçalama boyutlarında silajlarının hazırlanmasının yanı sıra yedirme denemelerinin de yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.



6. KAYNAKLAR

1. Rotz CA and Abrams SM. Losses and quality changes during alfalfa hay harvest and storage. *Am. Soc. Agric. Eng.* 1998; 31: 350-355.
2. Chamberlain AT, Wilkinson JM. Feeding the dairy cow. Chalcombe Publications, Painshall, Church Lane, Welton, Lincoln, LN2 3 LT, UK. 1996; 19.
3. McDonald P, Henderson AR, Heron SJE. *The Biochemistry of Silage* (2nd ed.). Chalcombe Publ., Churchlane, Kingston, Canterbury, Kent, UK. 1991; 340.
4. Muck RE, Filya I, Contreras Govea FE. Inoculant effects on alfalfa silage: In vitro gas and volatile fatty acid production. *J Dairy Sci.* 2007; 90: 5115-5125.
5. Phillip LE, Underhill L, and Garino H. Effect of treating Lucerne with an inoculum of lactic acid bacteria or formic acid upon chemical changes during fermentation and upon the nutritive value of the silage for lambs. *Grass and Forage Science.* 1990; 45: 337-344.
6. Kung LJR, Tung RS, Macirowski KG, Buffum K, Knutsen K, Almusatus WR. Effect of plant cell wall degrading enzymes and lactic acid bacteria on silage fermentation and composition. *J Dairy Sci.* 1991;74: 4284-4296.
7. Stokes MR. Effects of an enzyme mixture, an inoculant and their interaction on silage fermentation and dairy production. *J.Dairy Sci.* 1992; 75: 764-773.
8. Pitt RE. The probability of inoculant effectiveness in alfalfa silages. *Am. Soc. Agric. Eng.* 1990; 33: 1771-1778.
9. 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.
10. 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.
11. Cao LM, Goto M, Karita S, Yamamoto Y, Mizutani M, Deguchi Y, Urakawa S, Maekawa Y, Yamamoto Y, Masuko T: Effect of fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria on the fermentation quality of alfalfa (*Medicago sativa*) silage and its energy and nitrogen utilization by dry cows. *Grassl Sci.* 2002a; 48, 227-235.
12. Cao LM, Goto M. And Ohshima M. Variations in the fermentation characteristics of alfalfa silage of different harvest times as treated with fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria. *Grasslan Science.* 2002b; 47 (6): 583-587.
13. 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. *Anim Feed Sci Technol.* 2009; 151, 280-290.
14. Winters AL, Cockburn JE, Dhanoa MS, Merry RJ. Effects of lactic acid bacteria in inoculants on changes in amino acid composition during ensilage of sterile and non-sterile ryegrass. *Journal of Applied Microbiology.* 2000; 89: 442-451.
15. Virtanen AJ. The A.I.V. method of preserving fresh fodder. *Empire Journal of Experimental Agriculture.* 1993;1: 143-155.
16. Davies DR, Merry RJ, Willams AP, Bakewell EL, Leemans DK, Tweed JKS. Proteolysis during ensilage of forages varying in soluble sugar content. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 444-453.

17. Kamalak A, Aydın R, Bal MA, Atalay Aİ. Glediçya meyvesinin katkı maddesi olarak yonca silajında kullanımı. TÜBİTAK. Proje No: 107 0 401. 2009; 1-67.
18. Avcı M, Ayaşan T. Yem Bitkileri ile Silaj Hazırlanması. Öztürk A (Ed): Pratik Sığırcılık. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yaygın Çiftçi Eğitim Projesi.207; 205-222, 2007.
19. Karakozak E, Ayaşan T. Değişik yem bitkileri ve karışımlarından hazırlanan silajlarda inokulant kullanımının flieg puanı ve ham besin maddeleri üzerine etkileri. Kafkas Univ. Vet Fak Derg. 2010; 16(6): 987-994.
20. Filya İ. Bazı silaj katkı maddelerinin ruminantların performansları üzerindeki etkileri. Hayvansal Üretim. 2000; 41: 76-83.
21. Weinberg ZG, Ashbell G, Hen Y, Azrieli A. The Effect of Applying Lactic Acid Bacteria at Ensiling on the Aerobic Stability of Silages. J. Appl. Bacteriol. 1993; 75: 512-518.
22. Stokes MR, Chen J. Effects of an Enzyme-Inoculant Mixture on the Course of Fermentation of Corn Silage1. J. Dairy Sci. 1994; 77: 3401-3409.
23. Flores GJ, Castro AG, Arraez AA, Brea T, and Warleta MG. Effect of a bacterial additive on silage fermentation, digestibility, ruminal degradability, intake and performance of lactating dairy cattle in Galicia (NW Spain). In: Proc. 12th International Silage Conference. Uppsala, Sweden. 1999; 181-182.
24. Filya I, Karabulut A, Kalkan H, Sucu E. Bakteriyal inokulantların sorgum silajlarının fermentasyon, aerobik stabilite ve rumen parçalanabilirlik özellikleri üzerine etkileri. Ankara Üniv. Zir. Fak. Tarım Bil. Derg. 2001; 7: 112-119.
25. Kleinmans J, Hooper P. The effect of a commercial silage Inoculant (Pioneer brand 1188) on animal performance In: Proc. 12th International Silage Conference. Uppsala, Sweden. 1999; pp. 319-320.
26. Coşkun B, Şeker E, İnal F. Yemler ve Teknolojisi: Baskı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya 1998.
27. Kaiser AG. The influence of silage fermentation on animal production. In Silage in the 80s (ed. T. J. Kempton, A. G. Kaiser and T. E. Trigg), Proceedings of the National Workshop, Armidale, New South Wales, Australia, August 8-9, 1984; 106-135.
28. Spoelstra SF. Over content in silage making in the Netherlands. Institute for Livestock feeding and nutrition. Research Annual Report. 1988; 38-46.
29. Kung LJR, A review on silage additives and enzymes. In: Proc. 59 th Minneapolis nutrition conference, Minneapolis, MN. 1998; 121:135.
30. Soper IG. and Owen FG. Improving silage preservation and stability with an ammonia-molasses-mineral solution. J. Dairy Sci.1977; 60: 1077-1082.
31. Filya İ, Sucu E ve Hanoğlu H. Mısır silajına katılan ürenin silaj fermentasyonu, aerobik stabilite, rumende parçalanabilirliği ve kuzularının besi performansı üzerine etkileri. Tarım Bilimleri Dergisi 2004;10(3) 258-262.
32. Filya I. Silaj Fermentasyonu. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 2001; 32:1, 87-93.
33. Muck RE. The role of silage additives in making high quality silage. In: Proc. Natural Silage Production Conference NRAES-67, Ithaca, New York. 1993; 106-116.
34. Lattema P, Ohisson C, Lingwall P. The combined effect of molasses and formic acid on quality of red-clover silage. Swedish J. Agric. Res. 1996; 26, 1, 31-41.
35. Woolford MK. The Silage Fermentation. Marcel Dekker, Inc., New York. NY. 1984.
36. Bolsen KK, Ashbell G, Weinberg ZG. Silage fermentation and additives. AJAS Reviews.1996; 9:5, 483-489.
37. Pitt RE. Mikrobial and enzymatic additives for ensiling. Department of Agricultural and Biological Engineering Cornell University, Ithaca, New York. 1986.

38. Jones BA, Satter LD and Muck RE. Influence of bacterial inoculant and substrate addition to lucerne ensiled at different dry matter contents. *Grass and Forage Science*. 1992; 47: 19-27.
39. Özen N, Çakır A, Haşimoğlu Ş, Aksoy A. *Yemler Bilgisi ve Teknolojisi*. Atatürk Üniv. Zir. Fak. Ders Notları No:50, A.Ü.Zir. Fak. Ofset Tesisi, Erzurum, 1993.
40. Henderson AR, McDonald P. The effect of a range of commercial inoculants on the biochemical changes during the ensilage of grass in laboratory studies. *Res Dev Agric*. 1984; 3: 167-171.
41. Filya I. Laktik asit bakteri ve laktik asit bakteri enzim karışımı silaj inokulantlarının mısır silajı üzerine etkileri. *Turk J. Vet. Anim Sci*. 2002; 26: 679-687.
42. McAllister TA, Wang Y, Hristov AN, Olson ME, and Cheeke PR. Applications of *Yucca schidigera* in livestock production. *Northwest Anim. Nutr. Conf., Vancouver, British Columbia, Canada*. 1998; 109-119.
43. Henderson N. Silage additives. *Animal Feed Science and Technology*. 1993; 45: 35-56.
44. Sucu E and Filya I. Using lactic acid bacteria for improving aerobic stability of silages. *Book of Abstracts of 17th International Conference Krmiva*. In: Lulić, S (Ed.). Opatija, Croatia. 2010; 71.
45. Weinberg ZG, Muck RE. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev*. 1996; 19: 53-68.
46. Meeske R, Ashbell G, Weinberg ZG, Kipnis T. Ensiling forage sorghum at two stages of maturity with the addition of lactic acid bacterial inoculants. *Anim. Feed Sci. and Technol*. 1993; 43: 165-175.
47. Filya I, Ashbell G, Hen Y, Weinberg ZG. The effect of bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability of whole crop wheat silage. *Anim. Feed Sci. And Technol*. 2000; 88: 39-46.
48. Seale DR. Bacterial Inoculants as Silage Additives *J. Appl. Bacteriol*. 1986; 61: 9-26.
49. 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. *J Appl Bacteriol*. 1988; 64, 1-8.
50. Kumai S, Kimaru T, Fukumi R, Cai Y, Quintio LF. Effects of inoculation of *Lactobacilli* at ensiling on the fermentative quality of silage and changes in microflora during ensilage. *Japanese Society of Grassland Science*. 1990; 36; 231-237.
51. Tengerdy RP, Weinberg ZG, Szakacs G, Wu M, Linden JC, Henk LL, Johnson DE. Ensiling alfalfa with additives of lactic acid bacteria and enzymes. *J Sci Food Agric*. 1991; 55: 215-228.
52. Masuko T, Okada S, Uchimura T, Awaya K. Effects of inoculation with lactic acid bacteria culture at ensiling on the fermentative quality and flora of lactic acid bacteria of grass silage. *Anim Feed Sci Technol*. 1992; 63: 1182-1187.
53. Rooke JA. and Kafilzadeh F. The effect upon fermentation and nutritive value of silages produced after treatment by three different inoculants of lactic acid bacteria applied alone or in combination. *Grass Forage Sci*. 1994; 49: 324-333.
54. Ohyama Y, Masaki S, Morichi T. Effects of inoculation of *Lactobacillus plantarum* and addition of glucose at ensiling on the silage quality. *Japanese Journal of Zootechnical Science*. 1973; 44: 404.
55. Ely LO, Moon NJ, and Sudweeks EM. Chemical evaluation of *Lactobacillus* addition to alfalfa, corn, sorghum, and wheat forage at ensiling. *Journal of Dairy Science*. 1982; 65: 1041.

56. Lindgren S, Lingvall AP, Kartzow A and Rydberg E. Effects of inoculants, grain and formic acid on silage fermentation. *Swedish J. Agric. Res.* 1983; 13: 91-100.
57. Ling HJ, Ke WLK, Fa DS. Effect of previously fermented juice on nutritive value and fermentative quality of rice straw silage. *Journal of Northeast Agricultural University.* 2013; 20(2): 48-52.
58. 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. *Anim Sci Technol (Jpn).* 1997c; 68: 41-44.
59. Chunjian L, Bolsen KK, Brent BE, DYC Fung. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling periods of alfalfa and maize. *Journal of Applied Bacteriology.* 1992; 73: 375-387.
60. 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 Forage Sci.* 2011; 66: 243-250.
61. Denek N, Can A, Avci M, Aksu T, Durmaz H. The Effect of Fresh and Frozen Pre-Fermented Juice on the Fermentation Quality of Alfalfa Silage *Kafkas Üniversitesi Vet. Fak. Derg.* 2012; 18(5): 785-790.
62. Nishino N, Uchida S. Laboratory evaluation of previously fermented juice as a fermentation stimulant for lucerne silage. *J Sci. Food Agric.* 1999; 79: 1285-1288.
63. Henderson AR, McGinn R, Stanway AP, and Morgan CA. A technique designed to evaluate commercial polysaccharide degrading enzymes as additives for grass silage. *Proc. 5th Int. Symp. Forage Preservation, Nitra, Czechoslovakia.* September 1991; 92-95.
64. Filya I, 2003. Organik asitlerin buğday, mısır ve sorgum silajlarının mikrobiyal flora ile aerobik stabiliteyi üzerine etkileri. III. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, Ankara, 14-16 Ekim 2002; 299-308.
65. Rooke JA, Maya FM, Arnold JA and Armstrong DG. The chemical composition and nutritive value of grass silages prepared with no additive or with the application of additives containing either *Lactobacillus plantarum* or formic acid. *Grass Forage Sci.* 1988; 43: 87-95.
66. Filya I, Sucu E, 2003. Silajlarda fermantasyon kalitesi ve aerobik stabilitenin geliştirilmesi üzerinde araştırmalar. GAP III. Tarım Kongresi, Şanlıurfa, 2-3 Ekim 2003; 273-278.
67. Polan CE, Stieve DE, and Garrett JL. Protein preservation and ruminal degradation of ensiled forage treated with heat, formic acid, ammonia, or microbial inoculant. *J. Dairy Sci.* 1998; 81: 765-776.
68. Winters AL, Fychan R and Jones R. Effect of formic acid and a bacterial inoculant on the amino acid composition of grass silage and on animal performance. *Grass Forage Sci.* 2001;56: 181-192.
69. 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. *Grassl Sci.* 2002; 48: 120-125.
70. Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA, 2005,
71. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 1991; 74: 3583-3597.
72. Nigatu A, Ahrne S, and Molin G. Temperature-Dependent Variation in API 50 CH Fermentation Profiles of *Lactobacillus* Species. *Current Microbiology.* 2000; 41: 21-26.

73. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, and Collins JK. Quality control lactobacillus strains for use with the API 50CHL and API ZYM Systems at 37°C. *Journal of Basic Microbiology* 2001; 41(5): 241-251.
74. Broderick GA, Kang JH. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *J Dairy Sci.* 1980; 63: 64-75.
75. Suzuki M, Lund CW. Improved gas liquid chromatography for simultaneous determination of volatile fatty acids and lactic acid in silage. *J.Agric Food Chem.* 1980; 28: 1040-1041.
76. Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W: Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res Develop.* 1988; 28: 7-55.
77. Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W: The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J Agric Sci Camb.* 1979; 93:217-222.
78. SPSS, Inc. Statistical package for the social sciences (SPSS/PC+). Chicago, IL.1991.
79. Harris LJ. *The Microbiology of Vegetable Fermentations*, (Wood BJB, editor), *Microbiology of Fermented Foods*, Blackie Academic and Professional, London, 1998; 45-72.
80. Bergqvist SW, Sandberg AS, Carlsson NG, Andlid T. Improved iron solubility in carrot juice fermented by homo- and hetero-fermentative lactic acid bacteria. *Food Microbiology.* 2005; 22: 53-61.
81. İç E, Özçelik F. Hıyar turşusu fermentasyonunda görülen mikroorganizmalar. *Gıda.*1995; 20(3);173-178.
82. Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi. *Gıda Teknolojisi, Genel Mikrobiyoloji*, Ankara, 2006.
83. Holzapfel WH. and Wood BJB. *Lactic Acid Bacteria in Contemporary Perspective*, (Wood B.B. and Holzapfel WH, editors), *The General of Lactic Acid Bacteria, Vol: II*, Blackie Academic-Professional, London. 1995; 1-6.
84. Caplice E. and Fitzgerald GF. *Food Fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation.* *International Journal of Food Microbiology.* 1999; 50: 131-149.
85. Blandino A, Al-Aseer ME, Pandiella SS, Cantero D. and Webb C. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International.* 2003; 36: 527-543.
86. Frazier WC. and Westhoff DC. *Food Microbiology.* 4th Edition. Tata McGraw-Hill International Editions. 1988; 539.
87. Bureenok S, Namihira T, Kawamoto Y, Nakada T. Additive effects of fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria on the fermentative quality of guineagrass (*Panicum maximum* jacq.) silage. *Japanese Society of Grassland Science.* 2005; 51: 243-248.
88. Fleming HP. *Mixed Cultures in Vegetable Fermentations*, (J.G. Zeikus and Johnson EA, editors), *Mixed Cultures in Biotechnology*, McGraw- Hill, Inc., New York. 1991; 69-103.
89. Binsted R, Devey JD, Dakin JC. *Pinckle and sauce making*, Food Trade Press ltd. London. 1962; 274.
90. Arslankoz N. Ankara Çubuk yöresi turşularından izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.* 2011.

91. Yuhuan Z, Meina L, Xusheng G. Improve fermentation quality of alfalfa silage by addition of fermented juice prepared from *Kobresia littledalei*. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*. 2013; 29(5): 199-206.
92. Henderson AR, McDonald P, Anderson D. The effect of a cellulase preparation derived from *Trichoderma viride* on the chemical changes during the ensiling of grass, lucerne and clover. *J. Sci. Food Agric*. 1982; 33: 16-20.
93. Kung JRL. Silage fermentation end products and microbial populations: Their relationships to silage quality and animal productivity. Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners. 25-27, Charlotte, NC Sept. 2008.
94. Spoelstra, SF. and Hindle VA. Influence of Wilting on Chemical and Microbiological Parameters of Grass Relevant to Ensiling. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. 1989; 37: 355-364.
95. Muck RE. Effect of inoculation level on alfalfa silage quality. *Am. Soc. Agric. Eng*. 1989; 32:1153-1158.
96. Lin C, Bolsen KK, Brent BE, Fung DYC. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. *J. Appl Bacteriol*. 1992; 73: 375-387.
97. Bai CS, Zhang RZ, Jiang C, Yan R, Han JG, Zhu Y, Zhang YJ. Characterization of carbohydrate fractions and fermentation quality in ensiled alfalfa treated with different additives. *African Journal of Biotechnology*. 2011; 10(48); 9958-9968.
98. Kung JRL. Understanding the biology of silage preservation maximize quality and protect the environment. *Proceedings. California Alfalfa - Forage Symposium and Corn/Cereal Silage Conference, Visalia, CA*. 2010;1-2.
99. Carpintero CM, Henderson AR, McDonald P. The effect of some pre-treatments on proteolysis during the ensiling of herbage. *Grass Forage Science*. 1979; 34: 311-315.