

## Hücre Duvarını Parçalayıcı Enzimlerin Yonca Silajlarının Fermantasyon Özellikleri, Hücre Duvarı Kapsamı ve Aerobik Stabiliteleri Üzerine Etkileri

İsmail FİLYA<sup>1</sup>

Gilad AŞBELL<sup>2</sup>

Zwi G. WEINBERG<sup>2</sup>

Yaira HEN<sup>2</sup>

Geliş Tarihi : 01.03.2001

**Özet:** Bu çalışma, silaj katkı maddesi olarak kullanılan hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin yonca (*Medicago sativa*) silajının fermantasyon özellikleri, hücre duvarı kapsamı ve aerobik stabiliteleri üzerindeki etkilerinin saptanması amacıyla düzenlenmiştir. Araştırmada kullanılan yonca yaklaşık % 10-20 çiçeklenme döneminde hasat edilmiştir. Hücre duvarını parçalayıcı enzim olarak ise sellüloz (Cellulast®, Novo Nordisk, Denmark) ile hemisellüloz ve pektinaz (Viscozyme®, Novo Nordisk, Denmark) kullanılmıştır. Üretici firma (Novo Nordisk, Denmark) tarafından enzimlerin aktiviteleri sellüloz için 1500 NCU ml<sup>-1</sup> (Novo cellulase units), hemisellüloz ve pektinaz için ise 120 FBG ml<sup>-1</sup> (fungal  $\beta$ -glucanase units) olarak bildirilmiştir. Enzimler yoncaya % 0.025 (0.0375 NCU Cellulast® ve 0.03 FBG Viscozyme®), % 0.05 (0.075 NCU Cellulast® ve 0.06 FBG Viscozyme®) ve % 0.1 (0.15 NCU Cellulast® ve 0.12 FBG Viscozyme®) düzeyinde katılmışlardır. Yonca yalnızca gaz çıkışına olanak tanıyan, 1.5 litrelik özel cam kavanozlarda silolanmıştır. Kavanozlar laboratuvar koşullarında 25±2 °C' de depolanmışlardır. Silolamadan sonraki 2, 8, 15 ve 50. günlerde her gruptan 3' er kavanoz açılarak kimyasal ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Silolama döneminin sonunda (50. gün) açılan tüm silajlar 5 gün süre ile aerobik stabilite testine tabi tutulmuşlardır. Sonuç olarak; sellüloz (Cellulast®), hemisellüloz ve pektinaz (Viscozyme®) gibi hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin yonca silajlarının fermantasyon özelliklerini geliştirdiği, hücre duvarı kapsamını azalttığı, aerobik stabilitelerini ise etkilemediği saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Hücre duvarını parçalayıcı enzimler, yonca, silaj, fermantasyon özellikleri, hücre duvarı kapsamı, aerobik stabilite

### The Effects of Cell Wall Degrading Enzymes on the Fermentation Characteristics, Cell Wall Contents and Aerobic Stabilities of Alfalfa Silages

**Abstract:** This research was carried out to determine the effects of cell wall degrading enzymes using as silage additives on the fermentation characteristics, cell wall contents and aerobic stabilities of alfalfa (*Medicago sativa*) silages. Alfalfa was harvested at about 10-20 % bloom stage. Cellulase (Cellulast®, Novo Nordisk, Denmark) and hemicellulase and pectinase (Viscozyme®, Novo Nordisk, Denmark) were used as cell wall degrading enzymes. The enzyme activities stated by manufacturer's 1500 NCU ml<sup>-1</sup> (Novo cellulase units) for cellulase and 120 FBG ml<sup>-1</sup> (fungal  $\beta$ -glucanase units) for hemicellulase and pectinase. The enzymes were applied to alfalfa at 0.025 % (0.0375 NCU Cellulast® and 0.03 FBG Viscozyme®), 0.05 % (0.075 NCU Cellulast® and 0.06 FBG Viscozyme®) and 0.1 % (0.15 NCU Cellulast® and 0.12 FBG Viscozyme®). Alfalfa was ensiled in 1.5 liter special glass jars equipped with a lid that enables gas release only. The jars were stored at 25±2 °C at laboratory conditions. Three jars from each group were sampled for chemical and microbiological analyses on the days 2, 8, 15 and 50 after ensiling. All silages were opened at the end of the ensiling period (50 days) and subjected to an aerobic stability test for 5 days. As a result, cell wall degrading enzymes like cellulase (Cellulast®) and hemicellulase and pectinase (Viscozyme®) improved fermentation characteristics, decreased cell wall contents and did not effect aerobic stability of alfalfa silages.

**Key Words:** Cell wall degrading enzymes, alfalfa, silage, fermentation characteristics, cell wall contents, aerobic stability

#### Giriş

Bir ürünün iyi bir şekilde silolanabilmesi için başta heksozlar olmak üzere kuru madde (KM) de en az % 3-5 düzeyinde fermente olabilir karbonhidrat içermesi gerekir. Bitkilerde bulunan karbonhidratların büyük bir bölümünü laktik asit bakterileri (LAB) tarafından fermente edilemeyen lifsel yapıdaki polimerler oluştururlar. Bu nedenle özellikle baklagil yem bitkileri gibi suda eriyebilir karbonhidrat (SEK) içerikleri yetersiz olan ürünlerin silolanması sırasında yeterli düzeyde fermente olabilir karbonhidrat sağlanabilmesi için hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin kullanılması önerilmektedir. Bu enzimler sellüloz, hemisellüloz ve pektinazdır (Stokes 1992, Muck 1993).

Hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin silaj katkı maddesi olarak kullanılması iki önemli avantaj sağlar. Bunlardan birincisi; bu enzimler bitkilerde bulunan yapısal karbonhidratları hidrolize ederek, özellikle fermente olabilir karbonhidrat içeriği düşük olan bitkiler için ilave bir substrat açığa çıkartırlar. İkincisi ise; fermente olabilir karbonhidrat içerikleri yetersiz olan bitkilerin yapısal karbonhidratlarını hidrolize ettikleri için bu tür bitkilerin KM ve organik maddelerinin (OM) hayvanlar tarafından sindirilme derecelerini artırır (Henderson ve ark. 1991, McDonald ve ark. 1991, Filya 2000).

<sup>1</sup>Uludağ Üniv. Ziraat Fak. Zootekni Bölümü-Bursa

<sup>2</sup>The Volcani Center, Agricultural Research Organization, Forage Preservation and By-Products Research Unit, -Israel

Bu enzimler KM içeriği düşük olan ürünlerden yapılan silajlarda, KM içeriği yüksek olan veya soldurulmuş ürünlerden yapılan silajlara göre daha etkilidirler (Spoelstra 1991). Diğer yandan bu enzimlerin sellüloz, hemisellüloz ve pektinaz karışımı halinde bulunması ve silolanacak ürüne bu şekilde üçlü bir karışım halinde katılması, tek başlarına katılmalarına göre daha iyi sonuç vermektedir. Nitekim Weinberg ve ark. (1990) yaptıkları çalışma sonucunda yoncanın hücre duvarını hidrolize edebilmek için yalnız başına sellüloz enziminin etkili olmadığını ve sellülazın yanı sıra mutlaka hemisellüloz ve pektinaz enzimlerinin de bulunması gerektiğini saptamışlardır.

Selmer-Olsen ve ark. (1993a,b) *Trichoderma reesei*' den elde edilen sellüloz ve hemisellüloz karışımı içeren ticari enzim preparatını, İngiliz (*Lolium perenne*) ve İtalyan (*Lolium multiflorum*) çimlerinin silolanması sırasında kullandıkları çalışmaları sonucunda, silajların pH, amonyak azotu (NH<sub>3</sub>-N) ve asit deterjanda çözünmeyen lif (ADF) içeriklerini düşürdüğünü, fermantasyon sonucundaki kalıntı SEK miktarını ise artırdığını belirlemişlerdir. Aynı sonuçlar, *Aspergillus spp.*' den elde edilen sellüloz ve hemisellüloz karışımı içeren ticari enzim preparatının kullanıldığı çayır kelp kuyruğu (*Phleum pratense*), çayır yumağı (*Festuca pratensis*) ve çayır üçgülü (*Trifolium pratense*) gibi buğdaygil-baklagil yem bitkileri karışımlarının silajlarında da elde edilmiştir (Selmer-Olsen 1994).

Filya ve ark. (2001) yonca silajlarında, iki farklı sıcaklıkta (25-41 °C) *Aspergillus niger*' den elde edilen sellüloz, hemisellüloz ve pektinaz karışımı ticari enzim preparatını kullandıkları çalışma sonucunda; enzimlerin her iki sıcaklıkta da genel olarak silajların pH, NDF ve ADF içeriklerini düşürdüğünü, gaz kayıplarını azalttığını, SEK içeriklerini artırdığını saptamışlardır. Ayrıca enzimlerin 25 °C sıcaklıkta silajların aerobik stabilitelerini etkilemediğini, 41 °C sıcaklıkta ise düşürdüğünü belirlemişlerdir.

Hücre duvarını parçalayıcı enzimler, genel olarak SEK içeriklerinin yetersiz olmasından dolayı zor silolanan baklagil ve buğdaygil-baklagil karışımı yem bitkileri ile KM içerikleri düşük olan buğdaygil ve baklagil yem bitkilerinden yapılan silajların; pH, asetik asit (AA) ve diğer uçucu yağ asitleri konsantrasyonlarını düşürmektedirler (Rauramaa ve ark. 1987, Jaakkola 1990, Jaakkola ve ark. 1991, Stokes ve Dhar 1991, Stokes 1992). Bunun yanı sıra bu enzimler katıldıkları silajların nötr deterjanda çözünmeyen lif (NDF), ADF ve asit deterjanda çözünmeyen lignin (ADL) olarak saptanan hücre duvarı bileşenlerini düşürürlerken (Chamberlain ve Robertson, 1989, Weinberg ve ark. 1990, Tengerdı ve ark. 1991, Chen ve ark. 1994) laktik asit ve SEK içeriklerini artırmaktadırlar (Van Vuuren ve ark. 1989, Weinberg ve ark. 1990, Jaakkola 1990). Diğer yandan hücre duvarını parçalayıcı enzimler yonca silajlarında proteinin geri kazanımını da artırmaktadırlar (Weinberg ve ark. 1990).

Weinberg ve ark. (1993) farklı olgunlaşma dönemlerinde hasat edilen ve farklı KM içeriğine sahip (soldurulmamış ve soldurulmuş) yem bezelyesi (*Pisum sativum*), İtalyan çimi (*Lolium multiflorum*) ve buğday (*Triticum vulgare*) silajlarında, *Trichoderma reesei*' den elde edilen sellüloz ile *Aspergillus spp.*' den elde edilen

hemisellüloz ve pektinaz karışımı ticari enzim preparatlarını kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, bu enzimlerin özellikle geç olgunlaşma dönemlerinde hasat edilen ve KM içerikleri yüksek olan soldurulmuş yem bezelyesi, İtalyan çimi ve buğday silajları üzerinde bir etkilerinin olmadığı, ancak KM içerikleri düşük olan soldurulmamış taze materyalin NDF, ADF ve ADL içeriklerinde bir düşmeye neden olduklarını saptamışlardır. Bunun yanı sıra söz konusu enzimler soldurulmamış taze materyalden yapılan silajların pH' larını düşürürken, SEK ve laktik asit (LA) içeriklerini artırmışlardır. Aynı sonuçlar, yem bezelyesi ve buğday silajlarında sellüloz, hemisellüloz ve pektinaz karışımından oluşan ticari enzim preparatlarının kullanıldığı başka bir çalışma sonucunda da elde edilmiştir (Weinberg ve ark. 1995). Bunun yanı sıra bu çalışma sonucunda, söz konusu enzimlerin silajların aerobik stabilitelerini (silo ömrü) de düşürdüğü saptanmıştır. Yine hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin silajların aerobik stabiliteleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı başka çalışmalarda da söz konusu enzimlerin silajların aerobik stabilitelerini düşürdüğü (Jaakkola ve ark. 1991) veya etkilemediği (Bolsen ve ark. 1980, Stokes 1992, Selmer-Olsen ve ark. 1993b) saptanmıştır.

Bu çalışma ile, silaj fermantasyonu açısından SEK içeriği yetersiz olan yoncanın silolanması sırasında kullanılan sellüloz, hemisellüloz ve pektinaz gibi hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin, yonca silajlarının fermantasyon, hücre duvarı kapsamı ve aerobik stabiliteleri üzerindeki etkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Yöntem

### Silaj materyali

İsrail' de yürütülen (The Volcani Center, Agricultural Research Organization, Forage Preservation and By-Products Research Unit, Bet-Dagan) bu çalışmada silaj materyali olarak yaklaşık % 10-20 çiçeklenme döneminde hasat edilen ve % 21.4±0.35 KM içeriğine sahip yonca (*Medicago sativa*) kullanılmıştır.

### Silajların hazırlanması

Silajı yapılacak olan yonca hasat edildikten hemen sonra parçalama makinesinde yaklaşık 1.5 cm uzunluğunda parçalanmıştır. Parçalanmış materyaller 1.5 litre kapasiteli ve yalnızca gaz çıkışına olanak tanıyan özel cam kavanozlara 3' er paralelli olarak silolanmıştır. Araştırmada 12' si kontrol, 12' si % 0.025, 12' si % 0.05 ve 12' si de % 0.1 düzeyinde sellüloz, hemisellüloz ve pektinaz katılan yoncadan oluşan toplam 60 kavanoz silaj yapılmıştır. Kavanozlar laboratuvar ortamında 25±2 °C sıcaklıkta tutulmuşlardır. Her muamele grubundan 3' er kavanoz, silolandıktan sonraki 2, 8, 15 ve 50. günlerde açılarak kimyasal ve mikrobiyolojik analizlere tabi tutulmuştur. Araştırmanın 50. gününde tüm silajlara 5 gün süre ile aerobik stabilite testi uygulanmıştır.

### Kullanılan enzimler

Araştırmada hücre duvarını parçalayıcı ticari enzim preparatı olarak *Trichoderma reesei*' den elde edilen

sellülaz (Cellulast®, Novo Nordisk, Denmark) ile *Aspergillus* spp.' dan elde edilen hemisellülaz ve pektinaz (Viscozyme®, Novo Nordisk, Denmark) kullanılmıştır. Üretici firma (Novo Nordisk, Denmark) enzimlerin aktivitelerini sellülaz için 1500 NCU ml<sup>-1</sup> (Novo cellulase units), hemisellülaz ve pektinaz için ise 120 FBG ml<sup>-1</sup> (fungal β-glucanase units) olarak bildirmiştir.

Söz konusu enzimler yonca silajlarında şu şekilde kullanılmışlardır;

1. grup: kontrol grubu olup hiç enzim içermemektedir.

2. grup: 2.5 g Cellulast® ve 2.5 g Viscozyme® 20' şer ml çeşme suyu ile karıştırılarak, 1x4 m' lik temiz bir alana yayılan 10 kg taze yonca üzerine püskürtülmüşlerdir. Böylece silolan taze yoncaya 0.0375 NCU Cellulast® ve 0.03 FBG Viscozyme® katılmış olup, taze materyal % 0.025 düzeyinde sellülaz, hemisellülaz ve pektinaz enzimlerini içermiştir.

3. grup: 5.0 g Cellulast® ve 5.0 g Viscozyme® 20' şer ml çeşme suyu ile karıştırılarak, 1x4 m' lik temiz bir alana yayılan 10 kg taze yonca üzerine püskürtülmüşlerdir. Böylece silolan taze yoncaya 0.075 NCU Cellulast® ve 0.06 FBG Viscozyme® katılmış olup, taze materyal % 0.05 düzeyinde sellülaz, hemisellülaz ve pektinaz enzimlerini içermiştir.

4. grup; 10.0 g Cellulast® ve 10.0 g Viscozyme® 20' şer ml çeşme suyu ile karıştırılarak, 1x4 m' lik temiz bir alana yayılan 10 kg taze yonca üzerine püskürtülmüşlerdir. Böylece silolan taze yoncaya 0.15 NCU Cellulast® ve 0.12 FBG Viscozyme® katılmış olup, taze materyal % 0.1 düzeyinde sellülaz, hemisellülaz ve pektinaz enzimlerini içermiştir.

### Kimyasal ve mikrobiyolojik analizler

Taze ve silolanmış yoncanın KM ve ham kül (HK) analizleri ile Kjeldahl yöntemi ile yapılan ham protein (HP) ve NH<sub>3</sub>-N analizleri AOAC (1980)' e göre yapılırken, SEK içeriklerinin saptanmasında Dubois ve ark. (1956) tarafından bildirilen fenol sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır. LA, AA ve bütirik asit (BA) içerikleri FFAP (HP) kolon kullanılarak, 60-230 °C sıcaklık aralığında çalışan gaz kromatografisinde (Hawlett Packard) belirlenmiştir. Gaz kayıpları ağırlık esasına göre hesap yolu ile saptanmıştır. NDF, ADF ve ADL içeriklerinin saptanmasında ise Van Soest (1982) tarafından geliştirilen analiz yöntemleri kullanılmıştır. Silajların aerobik stabilite testlerinde Ashbell ve ark. (1991) tarafından geliştirilen yöntem kullanılırken, silajlardaki görsel küflenmenin saptanmasında Filya ve ark. (2000) tarafından geliştirilen değerlendirme yöntemi kullanılmıştır.

Araştırmada taze örnek ve silajların içerdiği lactobacilli, maya ve küf gibi mikrobiyal populasyonlar Filya ve ark. (2000) tarafından tanımlanan mikrobiyolojik analiz yöntemlerine göre belirlenmiştir.

### İstatistik analizler

Araştırmadan elde edilen verilerin istatistikî olarak değerlendirilmesinde varyans analizi ve Duncan çoklu karşılaştırma testinden yararlanılmıştır (SAS, 1988).

### Bulgular ve Tartışma

Taze ve farklı düzeylerde enzim katılarak silolan yoncaya ait kimyasal analiz sonuçları Çizelge 1' de verilmiştir.

Çizelge 1. Yonca silajlarına ait kimyasal analiz sonuçları ( $\bar{x} \pm S \bar{x}$ ; KM' de, %)

Günler	Uygulama	pH	SEK	NH <sub>3</sub> -N	HP	HK	LA	AA	BA	Gaz kaybı
0	Taze	6.5±0.01	3.2±0.02	11.7±0.16	22.2±0.21	9.9±0.08	0.6±0.02	0.2±0.01	0	0
2	Kontrol	5.6±0.02 <sup>a</sup>	3.2±0.06 <sup>a</sup>	11.6±0.15 <sup>a</sup>	13.9±0.17 <sup>d</sup>	9.8±0.10 <sup>a</sup>	0.8±0.02 <sup>c</sup>	0.6±0.02 <sup>a</sup>	0	0.8±0.05 <sup>a</sup>
	%0.025	5.4±0.01 <sup>ab</sup>	3.2±0.08 <sup>a</sup>	10.9±0.15 <sup>b</sup>	19.3±0.19 <sup>c</sup>	9.9±0.11 <sup>a</sup>	1.2±0.04 <sup>b</sup>	0.4±0.01 <sup>bc</sup>	0	0.7±0.05 <sup>a</sup>
	%0.05	5.4±0.02 <sup>ab</sup>	3.3±0.07 <sup>a</sup>	10.5±0.13 <sup>c</sup>	20.0±0.16 <sup>b</sup>	9.9±0.08 <sup>a</sup>	1.4±0.02 <sup>ab</sup>	0.3±0.03 <sup>c</sup>	0	0.7±0.04 <sup>a</sup>
	%0.1	5.2±0.01 <sup>b</sup>	3.3±0.03 <sup>a</sup>	10.2±0.13 <sup>c</sup>	20.8±0.17 <sup>a</sup>	9.9±0.09 <sup>a</sup>	1.6±0.05 <sup>a</sup>	0.3±0.02 <sup>c</sup>	0	0.7±0.05 <sup>a</sup>
8	Kontrol	5.4±0.03 <sup>a</sup>	3.2±0.05 <sup>d</sup>	11.5±0.15 <sup>a</sup>	9.7±0.18 <sup>d</sup>	9.9±0.10 <sup>a</sup>	1.2±0.03 <sup>d</sup>	3.5±0.05 <sup>a</sup>	0	1.5±0.04 <sup>a</sup>
	%0.025	5.1±0.02 <sup>b</sup>	4.0±0.06 <sup>c</sup>	8.8±0.13 <sup>b</sup>	14.4±0.20 <sup>c</sup>	10.1±0.10 <sup>a</sup>	4.4±0.05 <sup>c</sup>	2.0±0.07 <sup>b</sup>	0	1.3±0.06 <sup>ab</sup>
	%0.05	5.1±0.02 <sup>b</sup>	4.5±0.08 <sup>b</sup>	8.6±0.16 <sup>b</sup>	15.9±0.22 <sup>b</sup>	9.9±0.08 <sup>a</sup>	4.9±0.09 <sup>b</sup>	1.5±0.05 <sup>a</sup>	0	1.1±0.05 <sup>bc</sup>
	%0.1	5.0±0.01 <sup>b</sup>	5.7±0.05 <sup>a</sup>	8.0±0.12 <sup>c</sup>	18.0±0.17 <sup>a</sup>	10.0±0.09 <sup>a</sup>	5.8±0.09 <sup>a</sup>	1.4±0.05 <sup>c</sup>	0	1.0±0.07 <sup>c</sup>
15	Kontrol	5.3±0.06 <sup>a</sup>	3.2±0.03 <sup>d</sup>	11.5±0.17 <sup>a</sup>	8.0±0.19 <sup>d</sup>	10.0±0.12 <sup>a</sup>	1.6±0.04 <sup>d</sup>	5.3±0.13 <sup>a</sup>	0	2.1±0.08 <sup>a</sup>
	%0.025	4.9±0.01 <sup>b</sup>	7.4±0.08 <sup>c</sup>	6.9±0.13 <sup>b</sup>	13.3±0.21 <sup>c</sup>	10.1±0.11 <sup>a</sup>	7.7±0.06 <sup>c</sup>	2.2±0.09 <sup>b</sup>	0	1.6±0.06 <sup>b</sup>
	%0.05	4.9±0.02 <sup>b</sup>	7.8±0.06 <sup>b</sup>	6.6±0.14 <sup>b</sup>	14.8±0.20 <sup>b</sup>	10.1±0.10 <sup>a</sup>	8.4±0.11 <sup>b</sup>	1.6±0.10 <sup>c</sup>	0	1.3±0.07 <sup>c</sup>
	%0.1	4.7±0.01 <sup>b</sup>	8.3±0.07 <sup>a</sup>	6.1±0.19 <sup>c</sup>	16.4±0.17 <sup>a</sup>	10.0±0.12 <sup>a</sup>	9.3±0.13 <sup>a</sup>	1.5±0.06 <sup>c</sup>	0	1.2±0.05 <sup>c</sup>
50	Kontrol	5.1±0.01 <sup>a</sup>	3.2±0.03 <sup>d</sup>	11.4±0.18 <sup>a</sup>	5.5±0.16 <sup>d</sup>	9.9±0.09 <sup>a</sup>	1.8±0.05 <sup>d</sup>	7.7±0.16 <sup>a</sup>	0	2.7±0.15 <sup>a</sup>
	%0.025	4.5±0.01 <sup>b</sup>	10.1±0.07 <sup>c</sup>	2.4±0.11 <sup>b</sup>	11.6±0.19 <sup>c</sup>	10.0±0.12 <sup>a</sup>	10.2±0.09 <sup>c</sup>	3.3±0.10 <sup>b</sup>	0	2.0±0.13 <sup>b</sup>
	%0.05	4.3±0.01 <sup>b</sup>	12.5±0.08 <sup>b</sup>	2.2±0.16 <sup>b</sup>	13.1±0.22 <sup>b</sup>	10.0±0.10 <sup>a</sup>	11.0±0.13 <sup>b</sup>	2.8±0.08 <sup>c</sup>	0	1.8±0.11 <sup>b</sup>
	%0.1	4.0±0.01 <sup>c</sup>	15.8±0.08 <sup>a</sup>	1.7±0.15 <sup>c</sup>	15.6±0.20 <sup>a</sup>	9.9±0.08 <sup>a</sup>	12.6±0.10 <sup>a</sup>	2.4±0.07 <sup>d</sup>	0	1.4±0.10 <sup>c</sup>

Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0.05).

Yonca silajlarında kullanılan hücre duvarını parçalayıcı enzimler genel olarak yonca silajlarının fermantasyon özelliklerini olumlu yönde etkilemişlerdir. Çizelge 1' de de görüldüğü gibi daha fermantasyonun ilk günlerinden itibaren kontrol grubu ile enzim kullanılan diğer gruplar arasında önemli farklılıklar oluşmaya başlamıştır. Enzim kullanılan tüm silajların pH, NH<sub>3</sub>-N ve ham protein içerikleri önemli düzeyde düşerken (p<0.05), SEK içerikleri ise önemli düzeyde artmıştır (p<0.05). Enzim kullanılan gruplar kendi içerisinde incelendiğinde ise söz konusu fermantasyon özellikleri bakımından, enzim dozundaki artışa paralel olarak silajların pH ve NH<sub>3</sub>-N düzeyleri düşmüş, SEK ve HP içerikleri ise artmıştır. Çizelge 3 ve Şekil 1' in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi yonca silajlarında kullanılan bu enzimler, yoncanın hücre duvarını parçalamışlardır. Bunun sonucunda açığa çıkan karbohidratlar, silaj fermantasyonu sırasında LAB' nin besin maddesi olarak kullanılabileceği SEK miktarını fermantasyonun 8. gününden itibaren önemli düzeyde artırmışlardır (p<0.05). SEK' ların LAB tarafından fermente edilmesiyle enzim katılan yonca silajlarının pH ve NH<sub>3</sub>-N düzeyleri fermantasyonun başından itibaren kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşmüştür (p<0.05). Diğer yandan hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin silajların ham kül içerikleri üzerinde herhangi bir etkileri görülmezken, söz konusu enzimler fermantasyonun bütün dönemlerinde kontrol grubuna göre silajlardaki protein parçalanmasını azaltarak, protein geri kazanımını artırmışlardır. Protein parçalanmasının azalması ve protein geri kazanımının artması aynı zamanda silajların NH<sub>3</sub>-N düzeylerinin çok düşük düzeyde kalması üzerinde de etkili olmuştur.

Hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin kullanıldığı tüm silajlarda başlıca fermantasyon ürünü laktik asit olmuştur. Hücre duvarının parçalanmasıyla birlikte ortaya çıkan

SEK' ların LAB tarafından fermente edilmesi sonucu yonca silajlarının LA içerikleri önemli düzeyde artmıştır (p<0.05). Kullanılan enzimler kullanım dozlarına bağlı olarak silajların LA içeriklerini önemli düzeyde artırırlarken (p<0.05), AA içeriklerini ise önemli düzeyde düşürmüşlerdir (p<0.05). Kontrol grubu da dahil olmak üzere fermantasyonun hiçbir döneminde BA görülmemiştir.

Diğer yandan enzim kullanılan gruplarda fermantasyon dönemi boyunca görülen gaz kayıpları kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur (p<0.05). Bu gruplarda özellikle enzim düzeyinin artışına bağlı olarak fermantasyon dönemi sonunda görülen gaz kayıpları önemli düzeyde düşmüştür (p<0.05). Dolayısıyla fermantasyon sırasında görülen gaz kayıplarının düşük oluşunun, hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin yoncanın hücre duvarını parçalaması sonucu ortaya çıkan SEK' ların iyi bir silaj fermantasyonuna yol açtığı söylenebilir.

Taze ve farklı düzeylerde enzim katılarak silolanan yoncaya ait mikrobiyolojik analiz sonuçları Çizelge 2' de verilmiştir.

Çizelge 2' de de görüldüğü gibi fermantasyonun başlaması ile birlikte silajların lactobacilli, maya ve küf içerikleri de artmaya başlamıştır. Ancak değişik düzeylerde katılan enzimlerin yonca silajlarının lactobacilli, maya ve küf içerikleri üzerinde önemli bir etkileri olmamıştır. Silajlarda görülen mikrobiyal büyüme oldukça normal olup, silajların içerdiği maya ve küf popülasyonları da oldukça düşük düzeylerde bulunmuştur. Mikrobiyolojik analiz sonuçlarından elde edilen verilere göre, yonca silajlarında oldukça iyi bir fermantasyonun gerçekleştiğini ve silaj ortamının mikrobiyal büyümeye izin vermeyerek mikrobiyolojik yönden temiz silajlar elde edilmesini sağladığını söyleyebiliriz.

Çizelge 2. Yonca silajlarına ait mikrobiyolojik analiz sonuçları ( $\bar{x} \pm S. x$ ; log cfu/g KM)

Günler	Uygulama	Lactobasil	Maya	Küf
0	Taze	2.1±0.29	2.4±0.23	2.2±0.21
2	Kontrol	9.3±0.35*	3.0±0.30*	2.8±0.19*
	%0.025	9.4±0.43*	2.9±0.29*	2.6±0.20*
	%0.05	9.4±0.32*	2.8±0.28*	2.7±0.19*
	%0.1	9.4±0.34*	3.0±0.21*	2.6±0.17*
8	Kontrol	9.1±0.41*	3.4±0.30*	3.0±0.18*
	%0.025	9.3±0.32*	3.5±0.27*	3.1±0.29*
	%0.05	9.0±0.31*	3.4±0.26*	3.9±0.20*
	%0.1	9.2±0.36*	3.3±0.28*	3.0±0.17*
15	Kontrol	9.3±0.44*	3.8±0.19*	3.4±0.29*
	%0.025	9.4±0.34*	3.7±0.17*	3.3±0.20*
	%0.05	9.3±0.45*	3.7±0.20*	3.3±0.27*
	%0.1	9.3±0.32*	3.6±0.19*	3.2±0.18*
50	Kontrol	7.1±0.40*	4.3±0.20*	4.1±0.21*
	%0.025	7.3±0.39*	4.5±0.17*	4.1±0.19*
	%0.05	7.2±0.31*	4.4±0.26*	4.0±0.17*
	%0.1	7.4±0.37*	4.2±0.17*	3.9±0.18*

Log cfu, logaritma koloniform ünite.

Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0.05).

FİLYA, İ., G. ASHBELL, Z. G. WEINBERG ve Y. HEN, "Hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin yonca silajlarının

Yonca silajlarının fermantasyon özelliklerini temsil eden kimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları ile ilgili olarak araştırmadan elde edilen veriler, benzer konularda yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen veriler ile uyum içerisindedir (Ruramaa ve ark. 1987, Van Vuuren ve ark. 1989, Jaakkola 1990, Weinberg ve ark. 1990, Jaakkola ve ark. 1991, Stokes ve Dhar 1991, Stokes 1992, Selmer-Olsen ve ark. 1993a,b, Weinberg ve ark. 1993, Selmer-Olsen 1994, Weinberg ve ark. 1995, Filya ve ark. 2001).

Taze ve farklı düzeylerde enzim katılarak silolan yoncanın hücre duvarı kapsamı ile ilgili olarak araştırmadan elde edilen bulgular Çizelge 3 ve Şekil 1' de verilmiştir.

Çizelge 3 ve Şekil 1' de de görüldüğü gibi enzim katılarak silolan yonca üzerinde enzimler oldukça etkili olmuştur. Enzimler fermantasyonun ilk günlerinden itibaren etkilerini göstermeye başlamışlardır. Fermantasyonun ilerlemesiyle birlikte enzim kullanılan gruplar ile kontrol grubu arasında önemli düzeyde farklılıklar oluşmuş ve kullanım dozlarına bağlı olarak yonca silajlarının NDF, ADF ve ADL içeriklerini önemli düzeyde düşürmüştür (p<0.05). Dolayısıyla yoncanın silolanması sırasında kullanılan sellüloz, hemiselüloz ve pektinaz enzim kompleksi, yoncanın içerdiği sellüloz, hemiselüloz ve pektinler gibi hücre duvarının önemli bir kısmını oluşturan bileşikleri parçalamışlardır. Bu parçalanma sonucunda Çizelge 1' de de görüldüğü gibi yonca silajlarının SEK içerikleri fermantasyonun 8. gününden itibaren önemli düzeyde artmıştır (p<0.05). Yoncanın yapısal karbonhidatlarını içeren hücre duvarının parçalanması sonucu serbest hale geçen SEK' lar da LAB tarafından besin maddesi olarak kullanılmışlardır. Böylece silaj fermantasyonu açısından yetersiz düzeyde SEK

içeren ve bu nedenle silolanması oldukça zor olan yonca başarılı bir şekilde silolanmıştır. Yonca silajlarının NDF, ADF ve ADL içerikleri ile ilgili olarak araştırmadan elde edilen bulgular benzer konularda yapılan araştırma sonuçları ile uyum göstermektedir (Chamberlain ve Robertson 1989, Weinberg ve ark. 1990, Tengerdı ve ark. 1991, Selmer-Olsen ve ark. 1993a,b, Weinberg ve ark. 1993, Chen ve ark. 1994, Selmer-Olsen, 1994, Weinberg ve ark. 1995, Filya ve ark. 2001).

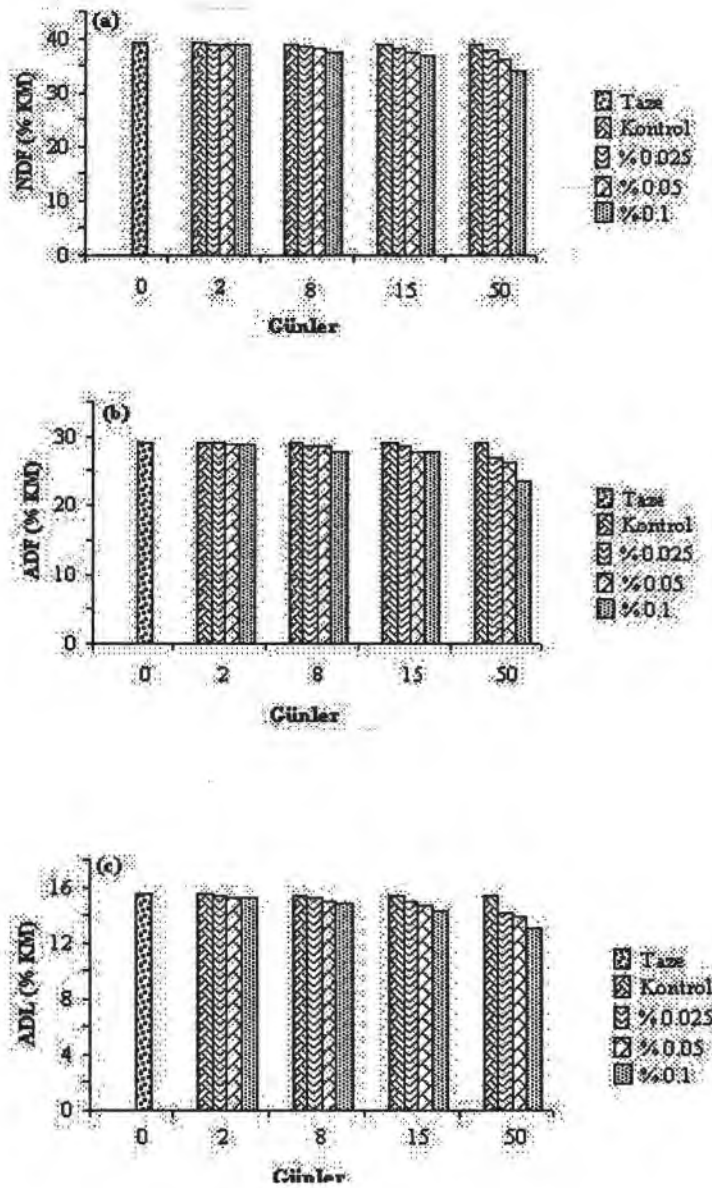
Araştırmada yonca silajlarına 5 gün süre ile uygulanan aerobik stabilite testi sonuçları ise Çizelge 4' de verilmiştir.

Çizelge 4' de de görüldüğü gibi enzimler yonca silajlarının aerobik stabiliteyi etkilememişlerdir. Özellikle silajların hava ile temas ettikleri bu 5 günlük dönem süresince silajların ürettikleri CO<sub>2</sub> miktarı açısından gruplar arasında önemli düzeyde bir farklılık görülmemiştir (p>0.05). Aynı şekilde grupların maya ve küf içerikleri açısından da gruplar arasında önemli düzeyde bir farklılığa rastlanmamıştır (p>0.05). Nitekim gerek maya ve küf analizleri sonucunda elde edilen bulgular gerekse görsel küflenme ile saptanan bulgular, silajlarda bozulmaya neden olan mikroorganizmaların silajlardaki düzeylerinin çok az olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla silajlardaki maya ve küf düzeylerinin az olması sonucu, özellikle mayaların hücre duvarının parçalanması sonucu ortaya çıkan karbonhidratları tüketerek gelişmesi ve silajların aerobik stabiliteyi etkilememesi riski engellenmiştir. Silajların aerobik stabiliteyi ile ilgili olarak araştırmadan elde edilen bulgular, benzer konularda yapılan araştırma bulguları ile uyum göstermektedir (Bolsen ve ark. 1980, Stokes 1992, Selmer-Olsen ve ark. 1993b, Filya ve ark. 2001).

Çizelge 3. Yonca silajlarının NDF, ADF ve ADL içerikleri ( $\bar{x} \pm Sx$ ; % KM)

Günler	Uygulama	NDF	ADF	ADL
0	Taze	39.1±0.23	29.2±0.0.25	15.5±0.27
2	Kontrol	39.0±0.24 <sup>a</sup>	29.2±0.26 <sup>a</sup>	15.5±0.24 <sup>a</sup>
	%0.025	38.8±0.25 <sup>a</sup>	29.0±0.29 <sup>a</sup>	15.4±0.31 <sup>a</sup>
	%0.05	38.8±0.30 <sup>a</sup>	28.9±0.33 <sup>a</sup>	15.3±0.29 <sup>a</sup>
	%0.1	38.7±0.22 <sup>a</sup>	28.8±0.30 <sup>a</sup>	15.3±0.26 <sup>a</sup>
8	Kontrol	38.9±0.26 <sup>a</sup>	29.2±0.32 <sup>a</sup>	15.4±0.25 <sup>a</sup>
	%0.025	38.4±0.31 <sup>ab</sup>	28.7±0.28 <sup>ab</sup>	15.2±0.31 <sup>ab</sup>
	%0.05	38.3±0.25 <sup>b</sup>	28.6±0.25 <sup>b</sup>	15.0±0.33 <sup>ab</sup>
	%0.1	37.5±0.34 <sup>c</sup>	27.9±0.29 <sup>c</sup>	14.8±0.28 <sup>b</sup>
15	Kontrol	38.9±0.38 <sup>a</sup>	29.1±0.31 <sup>a</sup>	15.4±0.27 <sup>a</sup>
	%0.025	38.3±0.26 <sup>b</sup>	28.5±0.36 <sup>b</sup>	15.0±0.22 <sup>ab</sup>
	%0.05	37.6±0.20 <sup>c</sup>	27.8±0.34 <sup>c</sup>	14.7±0.20 <sup>bc</sup>
	%0.1	36.9±0.33 <sup>d</sup>	27.0±0.30 <sup>d</sup>	14.3±0.29 <sup>c</sup>
50	Kontrol	38.9±0.29 <sup>a</sup>	29.1±0.34 <sup>a</sup>	15.4±0.31 <sup>a</sup>
	%0.025	37.7±0.22 <sup>b</sup>	27.0±0.26 <sup>b</sup>	14.2±0.27 <sup>b</sup>
	%0.05	36.2±0.26 <sup>c</sup>	26.3±0.29 <sup>c</sup>	13.9±0.29 <sup>c</sup>
	%0.1	34.1±0.30 <sup>d</sup>	23.5±0.31 <sup>d</sup>	13.1±0.33 <sup>d</sup>

Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0.05).



Şekil 1. Yonca silajlarının (a) NDF, (b) ADF ve (c) ADL içerikleri

Çizelge 4. Yonca silajlarının aerobik stabilite testi sonuçları ( $\bar{x} \pm Sx$ )

Uygulama	pH	CO <sub>2</sub> <sup>a</sup>	Maya <sup>b</sup>	Küf <sup>b</sup>	Görsel küflenme <sup>c</sup>
Kontrol	5.4±0.01 <sup>a</sup>	2.5±0.15 <sup>a</sup>	5.4±0.66 <sup>a</sup>	6.1±0.63 <sup>a</sup>	2
%0.025	4.7±0.02 <sup>b</sup>	2.4±0.13 <sup>a</sup>	5.6±0.52 <sup>a</sup>	5.9±0.56 <sup>a</sup>	2
%0.05	4.4±0.01 <sup>bc</sup>	2.4±0.17 <sup>a</sup>	5.3±0.47 <sup>a</sup>	5.9±0.49 <sup>a</sup>	1
%0.1	4.2±0.02 <sup>c</sup>	2.2±0.12 <sup>a</sup>	5.2±0.50 <sup>a</sup>	5.7±0.51 <sup>a</sup>	1

<sup>a</sup> CO<sub>2</sub>, karbondioksit (g kg<sup>-1</sup> KM).

<sup>b</sup> Maya ve küf log cfu/g KM olarak verilmiştir.

<sup>c</sup> Silajların küflenme durumlarının görsel olarak 1' den 5' e kadar olan sayılarla değerlendirilmesidir. 1: hiç küf içermeyen bir silaj, 2: noktalar halinde çok çok az düzeyde küf içeren bir silaj, 3: noktalar halinde yüzeye yayılmış şekilde küf içeren bir silaj, 4: yüzeyi kısmen küf ile kaplı, bölge bölge küflenmiş yüzeyleri olan bir silaj, 5: yüzeyi tamamen küf ile kaplı, ağır bir kokuya sahip ve partikülleri birbirine yapışmış bir silaj. Bu değerlendirmeler üç kişi tarafından yapılmakta ve daha sonra üçünün ortalaması alınmaktadır.

Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.05).

## Sonuç

Yonca silajlarına sellüloz (Cellulast®), hemisellüloz ve pektinaz (Viscozyme®) gibi hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin katılması, silaj fermantasyonunu geliştirirken, silajların hücre duvarı kapsamını azaltmış, aerobik stabiliteyi ise etkilememiştir. Enzimlerin yoncanın hücre duvarını parçalaması sonucunda yoncanın NDF, ADF ve ADL içerikleri önemli düzeyde düşmüştür ( $p < 0.05$ ). Bu parçalanma sonucunda açığa çıkan SEK' lar yoncanın fermantasyonu sırasında LAB tarafından besin maddesi olarak kullanılmışlardır. Böylece silaj fermantasyonu açısından yetersiz düzeyde SEK içeren ve bu nedenle silolanması oldukça zor olan yonca başarılı bir şekilde silolanabilmiştir. Enzimler fermantasyon sonunda yonca silajlarının pH,  $NH_3-N$  ve AA içeriklerini önemli düzeyde düşürürlerken ( $p < 0.05$ ), gaz kayıplarını da önemli düzeyde azaltmışlardır ( $p < 0.05$ ). Diğer yandan silajların SEK ve LA içeriklerini önemli düzeyde artırırken ( $p < 0.05$ ), silajlardaki protein parçalanmasını azaltarak protein geri kazanımını da önemli düzeyde artırmışlardır ( $p < 0.05$ ). Bununla birlikte enzimler silajların aerobik stabiliteyi etkilememişlerdir.

Araştırmada kullanılan enzim dozları ile ilgili olarak ise, silajların fermantasyon ve hücre duvarı kapsamı açısından en iyi sonuçlar %0.1' lik enzim dozunda alınmış, bunu sırasıyla %0.05 ve %0.025' lik enzim dozları izlemiştir.

## Kaynaklar

- AOAC., 1980. Official Methods of Analysis. 13<sup>th</sup> Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Ashbell, G., Z. G. Weinberg, A. Azrieli, Y. Hen and B. Horev, 1991. A simple system to study the aerobic deterioration of silages. *Can. Agric. Eng.*, 33:391-393.
- Bolsen, K. K., H. J. Ilg and D. E. Axe., 1980. Additives for alfalfa silage. *J. Anim. Sci.* 51 (Suppl. 1):230. (Abstr.)
- Chamberlain, D. G. and S. Robertson., 1989. The effects of various enzyme mixtures as silage additives on feed intake and milk production of dairy cows. *Br. Grassl. Soc. Occas. Symp.* 23:187.
- Chen, J., M. R. Stokes and C. R. Wallace., 1994. Effects of enzyme-inoculant systems on preservation and nutritive value of haycrop and corn silages. *J. Dairy Sci.* 77:501-512.
- Dubois, M., K. A. Giles, J. K. Hamilton, P. A. Reber and F. Smith., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28:350-356.
- Filya, I., 2000. Silaj fermantasyonunda katkı maddeleri kullanımı. *Ondokuz Mayıs Üniv. Zir. Fak. Derg.*, 15(3):118-125.
- Filya, I., G. Ashbell, Y. Hen and Z. G. Weinberg., 2000. The effect of bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability of whole crop wheat silage. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 88:39-46.
- Filya, I., G. Ashbell, Z. G. Weinberg and Y. Hen., 2001. Cell-wall degrading enzymes beneficial for silages. *FEEDSTUFFS. Nutrition and Health/Dairy.* 73:11. pp. 13-14.
- Henderson, A. R., R. McGinn, A. P. Stanway and C. A. Morgan., 1991. A technique designed to evaluate commercial polysaccharide degrading enzymes as additives for grass silage. *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Symp. Forage Preservation*, Nitra, Czechoslovakia, pp. 92-95.
- Jaakkola, S., 1990. The effect of cell wall degrading enzymes on the preservation of grass and on the silage intake and digestibility in sheep. *J. Agric. Sci. Finl.* 62:51.
- Jaakkola, S., P. Huhtanen and K. Hissa., 1991. The effect of cell wall degrading enzymes or formic acid on fermentation quality and on digestion of grass silage by cattle. *Grass Forage Sci.* 46:75.
- McDonald, P., A. R. Henderson and S. J. E. Heron., 1991. *The Biochemistry of Silage* (2<sup>nd</sup> ed.). Chalcombe publ., Church Lane, Kingston, Canterbury, Kent, UK.
- Muck, R. E., 1993. The role of silage additives in making high quality silage. In: *Proc. Nat. Silage Prod. Conf. NRAES-67*, Ithaca, New York. pp. 106-116.
- Rauramaa, A., J. Setälä, T. Moiso, T. Heikkilä and M. Lampila., 1987. The effect of inoculants and cellulase on the fermentation and microbiological composition of grass silage. 1. Biochemical changes in the silages. *J. Agric. Sci. Finl.* 59:361.
- SAS., 1988. *Statistical Analysis System ®. Users Guide: Statistics, Version 6 Edition.* SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Selmer-Olsen, I., A. R. Henderson, S. Robertson and R. McGinn., 1993a. Cell wall degrading enzymes for silage. I. The fermentation of enzyme-treated ryegrass in laboratory silos. *Grass Forage Sci.*, 48:45-54.
- Selmer-Olsen, I., A. R. Henderson, S. Robertson and R. McGinn., 1993b. Cell wall degrading enzymes for silage. II. Aerobic stability of enzyme-treated ryegrass in laboratory silos. *Grass Forage Sci.*, 48:55-63.
- Selmer-Olsen, I., 1994. Enzymes as silage additives for grass-clover mixtures. *Grass Forage Sci.*, 49:305-315.
- Spoelstra, S. F., 1991. Chemical and biological additives in forage conservation. In: G. Pahlow and H. Monig (Editors), *Proc. of a Conference on Forage Conservation towards 2000*. Braunschweig, Germany, pp. 48-70.
- Stokes, M. R. and M. K. Dhar., 1991. Effects of two commercial enzyme additives on the preservation and nutritive value of hay crop silage. *J. Dairy Sci.* 74 (Suppl.):314. (Abstr.)
- Stokes, M. R., 1992. Effects on an enzyme mixture, an inoculant, and their interaction on silage fermentation on silage fermentation and dairy production. *J. Dairy Sci.* 75:764.
- Tengerdy, R. P., Z. G. Weinberg, G. Szakacs, M. Wu, J. C. Linden, L. L. Henk and D. E. Johnson., 1991. Ensiling alfalfa with additives of lactic acid bacteria and enzymes. *J. Sci. Food Agric.*, 55:215-228.
- Van Soest, P. J., 1982. Analytical systems for evaluation of feeds. In: P. J. Van Soest (Editor), *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, NY, Chapter 6, pp. 75-94.
- Van Vuuren, A. M., K. Bergsma, F. Frol-Kramer and J. A. C. Van Beers., 1989. Effects of addition of cell wall degrading enzymes on the chemical composition and the in sacco degradation of silage. *Grass Forage Sci.* 44:223.
- Weinberg, Z. G., G. Szakacs, J. C. Linden and R. P. Tengerdy., 1990. Recovery of protein and chlorophyll from alfalfa by simultaneous lactic acid fermentation and enzyme hydrolysis (ENLAC). *Enzyme Microbial Technol.*, 12:921-925.
- Weinberg Z. G., G. Ashbell, A. Azrieli and I. Brukental., 1993. Ensiling peas, ryegrass and wheat with additives of lactic acid bacteria (LAB) and cell wall degrading enzymes. *Grass Forage Sci.*, 48:70-78.
- Weinberg Z. G., G. Ashbell, Y. Hen and A. Azrieli., 1995. The effect of cellulase and hemicellulase plus pectinase on the aerobic stability and fibre analysis of peas and wheat silages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 55:287-293.