

**FARKLI SAMAN ÇEŞİTLERİNİN
MİKROBİYAL İNOKÜLASYON YOLUYLA
YEM DEĞERLERİNİN ARTIRILMASI**

Elif Burcu TŪZEMEN BAYYURT

**Yūksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR
2014
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARKLI SAMAN ÇEŞİTLERİNİN MİKROBİYAL İNOKÜLASYON
YOLUYLA YEM DEĞERLERİNİN ARTIRILMASI**

Elif Burcu TÜZEMEN BAYYURT

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2014**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**FARKLI SAMAN ÇEŞİTLERİNİN MİKROBİYAL İNOKÜLASYON YOLUYLA
YEM DEĞERLERİNİN ARTIRILMASI**

Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR danışmanlığında, Elif Burcu TÜZEMEN BAYYURT tarafından hazırlanan bu çalışma 07/05/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet Nuri AYDOĞAN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Adem KAYA

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 15.05.2014 . tarih ve 20/634 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI SAMAN ÇEŞİTLERİNİN MİKROBİYAL İNOKÜLASYON YOLUYLA YEM DEĞERLERİNİN ARTIRILMASI

Elif Burcu TÜZEMEN BAYYURT

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

Bu araştırmada katı hal fermentasyonu yoluyla arpa ve buğday samanlarının yem değerlerinin artırılması amaçlanmıştır. Bu maksatla önce lignoselülitik aktivitesi yüksek olan 3 adet mikrofungus (X, Mu ve Yk) ve 1 adet bakteri (E7) çürümüş odun, saman ve talaş örneklerinden izole edilmiştir. Bu isolatlar klasik (sitolojik ve biyokimyasal) ve moleküler (MIS ve 16S rRNA) yöntemlerle *Aspergillus* sp (X), *Penicillium* sp. (Mu), *Trichoderma harzianum* (Yk) ve *Pseudomonas putida* (E7) olarak teşhis edilmiştir. Ayrıca standart suş olarak ARS Kültür Koleksiyonundan temin edilen *Streptomyces setonii* B-2555 kullanılmıştır. Azot bakımından zenginleştirilmesi için, samanlara mısır maserasyon sıvısı (CSL) ilave edilmiştir. Arpa, buğday ve arpa-buğday samanları bu mikroorganizmalar ile inoküle edilmiş ve 30 günlük inkübasyon periyodundan sonra kontrol ve deney gruplarında kuru madde (KM), ham kül (HK), ham protein (HP), asit deterjanda çözünmeyen lif (ADF), nötral deterjanda çözünmeyen lif (NDF) ve asit deterjan lignin ((ADL) analizleri yapılmış ve selüloz (ADF-ADL), hemiselüloz (NDF-ADF), kuru madde sindirilebilirliği (KMS), kuru madde tüketilebilirliği (KMT), nisbi yem değeri (NYD) ve yem kalitesi (YK) değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *S. setonii* B-2555 ve *T. harzianum* (Yk) ile inokülasyon, samanın yem kalitesini 5. dereceden 3. dereceye yükseltmiştir. Ayrıca selüloz ve hemiselüloz değerlerinde %50-53 oranında azalmalar kaydedilmiş ve bu azalmaların istatistiki olarak önemli ($P<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Maksimum ADF ve NDF düşüşü (%52), mısır maserasyon sıvısı katılmış buğday samanında *S. setonii* B-2555 inokülasyonu sonucu elde edilmiştir. Ayrıca saman örneklerinin protein içeriğinde %90'a varan artışlar gözlenmiştir.

Sonuç olarak saman gibi lignoselülozik zirai ürünlerin mikrobiyal inokülasyon yoluyla yem değerlerinin artırılabilceği belirlenmiştir.

2014, 79 sayfa

Anahtar Kelimeler: Lignoselüloz, katı hal fermentasyonu, arpa samanı, buğday samanı, mısır maserasyon sıvısı

ABSTRACT

MS Thesis

ENHANCEMENT OF NUTRITIVE VALUE OF DIFFERENT KINDS OF STRAW BY MICROBIAL INOCULATION

Elif Burcu TÜZEMEN BAYYURT

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

In this research work the particular aim is to increase the nutritive values of wheat and barley straws by solid state fermentation. For this purpose, three microfungi (X, Mu and YK) and one bacterium (E7) those have high lignocellulolytic activity were isolated from the samples of decay wood, fodder and sawdust. This isolates were identified as *Aspergillus* sp (X), *Penicillium* sp. (Mu), *Trichoderma harzianum* (Yk) and *Pseudomonas putida* (E7) by using the classical (cytological and biochemical) and molecular (MIS and 16S rRNA) methods. In addition, *Streptomyces setonii* B-2555 which was obtained from the ARS Culture Collection (USA) was used as standard. To increase the nitrogen content of straws, corn steep liquor (CSL) was added to them. Wheat, barley and wheat-barley straws were inoculated by these microorganisms. After the incubation period of 30 days, contents of dry material (DM), crude ash (CA), crude protein (CP), acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent lignin (ADL) of samples taken from control and experimental groups were analysed and the levels of cellulose (ADF-ADL), hemicellulose (NDF-ADF), digestibility of dry matter (DDM), expendability of dry matter (EDM), relative food value (RFV) and forage quality (FQ) were calculated. As a result, nutritive value of straws were risen from the 5th quality to 3rd quality. The levels of cellulose and hemicellulose decreased (50-53%) as well and these reductions were statistically significant ($P<0.05$). Moreover maximum ADF and NDF reductions (22%) occurred at CSL containing wheat straw inoculated by *S. setonii* B-2555. In addition, increasing protein levels of straw samples were observed up to 90%.

Finally, it was detected that the nutritive value of lignocellulosic agricultural products such as straw could be increased by microbial inoculation.

2014, 79 pages

Keywords: Lignocellulose, solid state fermentation, barley straw, wheat straw, corn steep liquor

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarım boyunca bana her türlü desteği veren ve beni sürekli teşvik eden, değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım süresince desteğini aldığım Biyoloji Bölümü öğretim elemanları ve çalışanlarına, ayrıca çalışmamın analiz aşamasında yardımlarını esirgemeyen Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü öğretim elemanlarından Sayın Prof. Dr. Mevlüt KARAOĞLU'na ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Adem KAYA'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca ilgisini ve desteğini esirgemeyen, görüş ve bilgi birikiminden yararlandığım, değerli hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ, Sayın Uzman Dr. Murat ÖZDAL ve Sayın Arş. Gör. Özden CANLI TAŞAR'a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Laboratuardaki çalışma arkadaşlarım; Mustafa ÖZDEMİR, Özlem GÜR, Alev SEZEN, Neslihan YÜCE, Nur Betül KARTAL ve Nisa METİN'e ve daha ismini burada sayamadığım birçok arkadaşıma teşekkürlerimi sunarım.

Sadece bu süreçte değil, hayatım boyunca her zaman her koşulda yanımda olan ve benim için her şeyden kıymetli olan aileme ve eşime çok teşekkür ederim.

Elif Burcu TÜZEMEN BAYYURT

Nisan 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Yemin Önemi, Dünya ve Ülkemizde Yem İhtiyacı	1
1.2. Yem Olarak Kullanılan Maddeler ve Samanın Yem Değeri.....	3
1.2.1. Lignoselülozik materyaller.....	6
1.2.1.a. Selüloz	8
1.2.1.b. Hemiselüloz.....	8
1.2.1.c. Lignin.....	9
1.3. Samanın Biyoteknolojik Süreçlerde Substrat Olarak Kullanımı.....	10
1.3.1. Ön muamele yöntemleri	11
1.3.1.a. Fiziksel ön muamele	11
1.3.1.b. Termal ön muamele.....	11
1.3.1.c. Asit ön muamelesi	12
1.3.1.d. Biyolojik ön muamele	12
1.4. Samanın Yem Değerini Artırmak İçin Kullanılan Yöntemler	13
1.5. Samanın Yem Değerini Artırmada Mikroorganizmaların Kullanılması.....	15
1.5.1. Lignoselüloz yıkımında rol alan bakteriler	15
1.5.1.a. Aerobik yıkım.....	15
1.5.1.b. Anaerobik yıkım.....	16
1.5.2. Lignoselüloz yıkımında rol alan funguslar.....	17
1.5.3. Lignoselüloz yıkımında rol alan aktinomisetler.....	18
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	28
3.1. Materyal.....	28

3.1.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	28
3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	29
3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışı	29
3.1.4. Çalışmada kullanılan izolasyon kaynakları ve saman örnekleri	32
3.1.5. Çalışmada inokulant olarak kullanılan mikroorganizmalar	33
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu ve saflaştırılması	33
3.2.2. İzolatların selüloolitik aktivitelerinin belirlenmesi	34
3.2.3. İzolatların ligninolitik aktivitelerinin belirlenmesi.....	34
3.2.4. Etkili izolatların morfolojik, sitolojik ve fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi.....	34
3.2.4.a. Kültürel testler	34
3.2.4.b. Moleküler metotlar	35
3.2.5. İnokulum materyalinin hazırlanması.....	38
3.2.5.a. Spor süspansiyonunun hazırlanması.....	38
3.2.6. Katı hal fermentasyonu	39
3.2.7. İnkubasyon sonunda elde edilen üründe yapılan analizler	41
3.2.7.a. Kuru Madde (KM) analizi	41
3.2.7.b. Ham Kül (HK) analizi	41
3.2.7.c. Ham Protein (HP) Analizi	42
3.2.7.d. Asit Deterjanda Çözünmeyen Lif (ADF) Analizi	42
3.2.7.e. Nötral Deterjanda Çözünmeyen Lif (NDF) Analizi	43
3.2.7.f. Asit Deterjan Lignin (ADL) Analizi	43
3.2.7.g. Kuru madde sindirilebilirliği (KMS), kuru madde tüketilebilirliği (KMT) ve nispi yem değerlerinin (NYD) belirlenmesi	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
4.1. Potansiyel Etkili İzolatların Seçimi	45
4.2. İzolatların Lignoselüloolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi	45
4.2.1. İzolatların Selüloolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi	45
4.2.2. İzolatların Ligninolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi	46
4.3. Etkili İzolatların Bazı Morfolojik, Sitolojik ve Fizyolojik Özellikleri.....	48

4.4. Mikroorganizmalarla Enfekte Edilmiş Samanlarda İnkübasyon Sonrası	
Oluşan Morfolojik Değişiklikler	50
4.5. İnkübasyon Sonunda Elde Edilen Üründe Yapılan Analiz Sonuçları	51
4.5.1. Kuru madde, ham kül ve ham protein analiz sonuçları	51
4.5.2. ADF ve NDF analiz sonuçları	54
4.5.3. selüloz, hemiselüloz değerleri ve adl analiz sonuçları	56
4.5.4. Kuru madde sindirilebilirliği, kuru madde tüketilebilirliği, nispi yem değeri ve yem kalitesi değerleri	59
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	63
5.1. Potansiyel Etkili İzolatlar	63
5.2. Potansiyel İzolatların Morfolojik, Sitolojik ve Fizyolojik Özellikleri	63
5.3. Kuru Madde, Ham Kül ve Ham Protein Analiz Sonuçları	64
5.4. ADF ve NDF Analiz Sonuçları	66
5.5. Selüloz, Hemiselüloz Değerleri ve ADL Analiz Sonuçları	68
5.6. Kuru Madde Sindirilebilirliği, Kuru Madde Tüketilebilirliği ve Nispi Yem Değerleri	69
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	80

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

atm	Atmosfer
°C	Santigrat Derece
dak	Dakika
g	Gram
g/l	Gram/litre
kg	Kilogram
ml	Mililitre
sn	Saniye
%	Yüzde
ADF	Acid Detergent Fiber (Asit Deterjanda Çözünmeyen Lif)
ADL	Acid Detergent Lignin (Asit Deterjan Lignin)
CCRA	Cellulose Congo Red Agar (Selüloz Kongo Kırmızısı Agar)
CDA	Czapek Dox Agar
CMC	Carboxymethylcellulose (Karboksimetilselüloz)
CMCA	Carboxymethylcellulose Agar (Karboksimetilselüloz Agar)
CSL	Corn Steep Liquor (Mısır Maserasyon Sıvısı)
HK	Ham Kül
HP	Ham Protein
KM	Kuru Madde
KMS	Kuru Madde Sindirilebilirliği
KMT	Kuru Madde Tüketilebilirliği
MSML	Minimal Salt Medium Lignin (Minimal Tuzlar Ortamı-Lignin)
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NDF	Neutral Detergent Fiber (Nötral Deterjanda Çözünmeyen Lif)
NYD	Nispi Yem Değeri
PDA	Potato Dextrose Agar (Patates Dekstroz Agar)
PDB	Potato Dextrose Broth (Patates Dekstroz Broth)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Selülozun moleküler yapısı	8
Şekil 1.2 Hemiselülozun moleküler yapısı	9
Şekil 1.3. Ligninin moleküler yapısı.....	10
Şekil 3.1. Fermentasyona bırakılan saman örnekleri	39
Şekil 4.1. Ekim yapılmamış selüloz kongo kırmızısı agar (kontrol)	47
Şekil 4.2. Ss'nin selüloz kongo kırmızısı agarda meydana getirdiği renk açılımı.....	47
Şekil 4.3. Ekim yapılmamış minimal tuzlar ortamı-lignin (kontrol)	47
Şekil 4.4. Ss'nin minimal tuzlar ortamı-ligninde meydana getirdiği renk açılımı.....	47
Şekil 4.5. Çalışmada kullanılan bakterilerin mikroskopik görüntüleri (Solda <i>Streptomyces setonii</i> , sağda <i>Pseudomonas putida</i>).....	48
Şekil 4.6. Katı hal fermentasyonunda kullanılan mikrofungusların mikroskopik görüntüleri (<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Penicillium</i> sp. ve <i>Aspergillus</i> sp.)....	49
Şekil 4.7. Katı hal fermentasyonu aşamasında kontrol ve deney gruplarına ait örnekler	51
Şekil 4.8. Arpa samanının kontrol ve deney gruplarında KM, HK ve HP analiz sonuçları	52
Şekil 4.9. Buğday samanının kontrol ve deney gruplarında KM, HK ve HP analiz sonuçları	52
Şekil 4.10. Arpa-buğday samanının kontrol ve deney gruplarında KM, HK ve HP analiz sonuçları.....	53
Şekil 4.14. Arpa samanının kontrol ve deney gruplarında ADF ve NDF analiz sonuçları	54
Şekil 4.12. Buğday samanının kontrol ve deney gruplarında ADF ve NDF analiz sonuçları	55
Şekil 4.13. Arpa-buğday samanının kontrol ve deney gruplarında ADF ve NDF analiz sonuçları.....	56
Şekil 5.1. Arpa, buğday ve arpa-buğday samanlarının kontrol ve bazı deney gruplarına ilişkin protein değerleri (%)	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından hazırlanan yem maddeleri kataloğu.....	5
Çizelge 1.2. Tarımsal atıklar ve katı atıkların hemiselüloz, selüloz ve lignin muhtevası	7
Çizelge 1.3. Mısır maserasyon sıvısının genel analizi	14
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	28
Çizelge 3.2. Karboksimetilselüloz agarın içeriği (Mandels and Weber 1969).....	30
Çizelge 3.3. Minimal tuzlar ortamı-lignin besiyerinin içeriği	31
Çizelge 3.4. Selüloz Kongo Kırmızısı Agarın İçeriği.....	31
Çizelge 3.5. Kontrol ve deney grubu arpa samanı örnekleri.....	40
Çizelge 3.6. Kontrol ve deney grubu buğday samanı örnekleri.....	40
Çizelge 3.7. Kontrol ve deney grubu arpa-buğday samanı örnekleri	41
Çizelge 4.1. Etkili bakterilerin bazı morfolojik, sitolojik ve fizyolojik özellikleri.....	48
Çizelge 4.2. Potansiyel etkili E7 kodlu bakterinin MIS sistemine göre içerdiği yağ asiti çeşitleri ve bulunma oranları	50
Çizelge 4.3. Arpa samanının kontrol ve deney gruplarında selüloz, hemiselüloz değerleri ve ADL analiz sonuçları	57
Çizelge 4.4. Buğday samanının kontrol ve deney gruplarında selüloz, hemiselüloz değerleri ve ADL analiz sonuçları	58
Çizelge 4.5. Arpa-buğday samanının kontrol ve deney gruplarında selüloz, hemiselüloz değerleri ve ADL analiz sonuçları.....	59
Çizelge 4.6. Arpa samanının kontrol ve deney gruplarında KMS, KMT, NYD ve YK değerleri	60
Çizelge 4.7. Buğday samanının kontrol ve deney gruplarında KMS, KMT, NYD ve YK değerleri	61
Çizelge 4.8. Arpa-buğday samanının kontrol ve deney gruplarında KMS, KMT, NYD ve YK değerleri	62
Çizelge 5.1. Mikroorganizmalarla enfekte edilen saman örneklerinin ADF ve NDF analiz sonuçlarının değerlendirilmesi	67

1. GİRİŞ

1.1. Yemin Önemi, Dünya ve Ülkemizde Yem İhtiyacı

Hayvanların yaşamlarını sürdürebilmeleri ve çeşitli ürünleri verebilmeleri için su, karbonhidrat, protein, yağ, vitamin, mineral madde gibi besin maddelerine ihtiyaçları vardır. Yemlerin besin maddeleri sağlama dışında, dolgu maddesi oluşturma, hayvansal ürünlere istenen renk, koku ve tat veren unsurları sağlama ve gerektiğinde hastalıktan koruyucu veya tedavi edici amaçlı ilaçların ağız yoluyla hayvanlara verilmesinde aracı olma gibi görevleri de vardır (Kutlu 2008).

Yemin günümüzde en beğenilen tanımı; pratikteki deneyimlerin gösterdiği sınırlar içinde kalan miktarlarda ve koşullarda hayvanlara yedirildiğinde, hayvanın sağlığına zararlı etkisi olmayan, hayvanların yaşamlarını sürdürmelerini ve verimli olmalarını sağlayan, hayvanların yararlanabileceği formlarda organik ve inorganik besin maddeleri içeren ve ağız yoluyla alınan tüm maddelere yem denir (Kutlu 2008).

Saman besleyici desteği olan ve tahıl tarımından elde edilen temel bir yan üründür (Mosier *et al.* 2005). Orskov and McDonald (1979), samanı ruminantlar için kullanılan temel bir besin olarak tanımlamışlardır.

Her yıl dünya genelinde tahıllar ve diğer lifli bitkisel materyallerden yaklaşık üç milyar ton saman üretildiği tahmin edilmektedir ve hasat edilen tahılın her bir tonu için yaklaşık 1,5 ton saman üretilmektedir. Yani yıllık tahıl üretiminin bir milyar ton artması, her yıl hemen hemen 1,5 milyar ton saman oluşması anlamına gelir (Howard *et al.* 2003). Biyoteknolojik süreçler de bugün dünya üzerinde çok miktarda saman ve lifli materyalleri kullanma imkanını artırır (Gomez *et al.* 2012).

Uygun iklimatik şartlardan dolayı çeşitli hububatların tarımı Türkiye’de çok önemli bir yer teşkil etmektedir Aynı zamanda ekonomik ve çevresel faktörler sebebiyle saman tüketimi günlük hayvan besini içerisinde gözardı edilemez ölçüdedir (Nguyen 2000).

Dünya üzerinde tarımsal ürünlerin üretimi ve bunların işlenmesi sırasında kullanılabilir ürün miktarından daha fazla miktarda artık ortaya çıkmakta ve bu tarımsal artıkların üretimi süreklilik göstermektedir. Hasat edilen tarımsal ürünlerin çok az bir kısmı değerlendirilebilmekte, çoğu ise çevreye atılarak önemli bir kirlilik unsuru oluşturmaktadır (Erikson 1984).

Gerek ülkemizde, gerekse diğer birçok ülkede kaliteli yem açığı bulunduğu ve bu sebeple de saman fiyatlarının değişen oranlarda arttığı bilinmektedir. Bu açığı kapatmak için samanın yem değerinin artırılması yoluna gidilmiş ve bunun için çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmıştır. Saman içeriğinin hayvanlar için en uygun değerlerde olması amacıyla biyolojik yöntemler başlığı altında birçok işlem gerçekleştirilmiştir. Samanın fazla miktarda yapısal karbonhidrat içeriği (lignin, selüloz ve hemiselüloz) beslenme ve sindirilme açısından dezavantaj olmakta ve bununla beraber düşük protein içeriği de olumsuz bir özellik olarak kabul edilmektedir (Salephor *et al.* 2012).

Tarımsal üretimin önemli ekonomik girdi sağladığı ülkemizde, tarımsal ürün atıkları bol miktarda oluşmaktadır. Türkiye’de oluşacak toplam tarımsal atık miktarı yaklaşık 55-70 milyon tondur (Demirbaş 2006). Bu miktarın yaklaşık 40 milyon tonu teorik, 25 milyon tonu ise üretilebilir niteliktedir (Özgür 2008). Mevcut veriler ışığında, biyokütle enerjisinin ve tarımsal kökenli biyokütleden enerji üretiminin önemi ülkemiz için günden güne artmaktadır. Ancak biyokütlenin potansiyel statüden kaynak statüsüne geçebilmesi ve kullanılabilir hale gelebilmesi için modern teknoloji geliştirilmesi şarttır (Günerhan 2011).

1.2. Yem Olarak Kullanılan Maddeler ve Samanın Yem Değeri

Hayvanların yararlanacağı besin maddelerini içermeyen kum ve toprak gibi maddeler yem değildir. Ayrıca tırnak, boynuz, deri unları, kömür tozu, hayvanların ihtiyacı olan bazı organik maddeleri içerdikleri halde sindirilemedikleri için hayvanlar tarafından kullanılamazlar ve bu nedenle yem sayılmazlar. Ayrıca ıslatılmadan hayvana verildiğinde su çekerek şişen ve yemek borusunu tıkayabilen ya da rumeni zorlayabilen kuru pancar posası, fazla yedirildiklerinde hayvana zararlı etkileri olan acı bakla, yeşil yonca ve arpa gibi yemler de bu nitelikleri ile yem sayılmazlar. Bu yiyecekler belirli bazı işlemlerden geçirilerek ya da sınırlı miktarlarda hayvanlara yedirilerek zararlı etkileri ortadan kaldırıldığında, yem niteliği kazanırlar. Bunun yanı sıra, hayvanların rasyonlarına katılan renk maddeleri, stres azaltıcı ve oksidasyonu önleyici bileşikler de besin değeri taşımadıkları için yem olarak kabul edilmezler. Yemler; ot, saman, mısır, arpa, süt vb. çeşitli bitkisel veya hayvansal kaynaklı tamamen doğal ürünler olabilecekleri gibi, bunların işlenme artıkları veya yan ürünleri ve bütünüyle teknoloji ürünü maddeler de olabilirler. Mısır glütenu, buğday kepeği, kan unu, süt tozu, yağlı tohum küspeleri gibi ürünler işlenme artıklarını oluşturmaktadır. İleri teknoloji ürünü olan ve tamamen yapay olarak elde edilen aminoasitler, çeşitli vitaminler ve mineraller gibi bazı sentetik maddeler de besin değerine sahip oldukları için yem olarak tanımlanabilir (Kutlu 2008).

Yemler içeriklerinde bulundurdıkları besin maddelerinin konsantrasyonu derecesinde değer kazanırlar. Birim ağırlıkta yüksek oranda sindirilebilir besin maddesi içeren yemlere “yoğun (kesif) yemler” adı verilir. Birim ağırlıkta düşük oranda sindirilebilir besin maddeleri içeren yemlere ise “kaba yemler” adı verilir. Besin maddesi açısından zengin olan yemler kuru madde içeriği bakımından da zengindir. Ancak kuru madde içeriğinin zengin olması o yemin yoğun yem olduğunu göstermez. Örneğin samanlar kuru maddece zengindirler; ancak sindirilebilirlikleri düşük olduğu için kaba yem olarak değerlendirilirler. Kuru madde içeriğince zengin kaba yemlere “kuru kaba yemler” denir. Yeşil ve sulu yemler, kuru madde ve birim ağırlıklarındaki besin madde

içeriğince fakir olduklarından yeşil kaba yemler veya sulu kaba yemler olarak tanımlanırlar (Kutlu 2008).

Dünyada, özellikle tropikal bölgelerde ruminantlar yıl boyunca devam eden bir şekilde meralardaki kesilmiş çim ve tarımsal ürün artıklarıyla beslenirler. Bu bölgelerin çoğu, çayır ve otlakların azaldığı, aynı zamanda ürünlerdeki sindirilebilir enerji ve azot içeriğinin düştüğü mevsimsel kuru dönemlerle karşı karşıya kalırlar. Bu ülkelerde yetiştirilen buğday, arpa vs.'den arta kalan samanın bol miktarda olmasından dolayı çiftçiler bu samanları hayvanları için temel kaba yem kaynağı olarak kullanmaktadırlar (NARC newsletter 2004).

Sadece samanla beslenme, önemli derecede odunlaşmış materyalin düşük gıda içeriğinden dolayı ruminantlara yaşamlarını sürdürebilmeleri için yeterli gıdaları sağlamaz. Yavaş ve sınırlanmış ruminal karbonhidrat degradasyonu, düşük azot içeriği geniş getiren hayvanlar için arpa ve buğday samanının besin değerini etkileyen temel eksiklikleridir (Van Soest 2006). Ayrıca günümüzde lignoselülozik kaynak olarak buğday ve arpa samanı kullanılmasının sebebi, ülkemizde oldukça önemli miktarda oluşmaları ve lignoselüloz içeriklerinin tespit edilebilir olmasıdır. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından hazırlanan yem maddeleri Çizelge 1.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından hazırlanan yem maddeleri kataloğu

İsmi	Tanımı
Pancar yaprakları	<i>Beta</i> spp. yaprakları
Tahıl bitkileri	Hububat türüne ait tüm bitkiler ve bunların parçaları (kurutulmuş, taze veya silajlanmış olabilir)
Tahıl samanı	Tahıllardan elde edilen saman
Üçgül unu	<i>Trifolium</i> spp.'nin kurutulup öğütülmesi ile elde edilen ürün. Bu ürün kurutulmuş ve öğütülmüş körpe yonca veya diğer otları %20'ye kadar içerebilir.
Kaba yem bitkileri unu (Yeşil ot unu)	Kaba yem bitkilerinin kurutulup öğütülmesi ve bazı durumlarda sıkıştırılması ile elde edilen ürün
Açıktaki kurutulmuş çayır otu (Kuru ot)	Açıktaki kurutulmuş herhangi bir ot türü
Yüksek sıcaklıkta kurutulmuş çayır otu	Her çeşit çayır otunun yapay olarak kurutulması ile elde edilen ürün
Yeşil ot, aromatik bitkiler, baklagil bitkileri (yeşil kaba yem)	Ot, baklagil bitkileri veya aromatik bitkilerden oluşan taze, silajlanmış veya kurutulmuş bitkiler
Hint keneviri unu	Kurutulmuş <i>Cannabis sativa</i> yapraklarının öğütülmesinden elde edilen un
Hint keneviri lifi	<i>Cannabis sativa</i> 'nın işlenmesi sırasında elde edilen yeşil, kurutulmuş lifli ürün
Bakla samanı	Bakla sapı
Keten tohumu samanı	<i>Linum usitatissimum</i> samanı
Yonca	<i>Medicago sativa</i> bitkisi veya parçaları
Açıktaki kurutulmuş yonca	Açıktaki kurutulmuş <i>Alfalfa</i> sp.
Yüksek sıcaklıkta kurutulmuş yonca	Yapay olarak kurutulmuş herhangi bir yapıdaki yonca
Yonca	Özel işleminden geçirilmiş yonca peletleri
Yonca unu	Yoncanın kurutulup öğütülmesi ile elde edilen ürün. Yonca ile birlikte kurutulmuş ve öğütülmüş %20'ye kadar üçgül veya kaba yem bitkilerini içerebilir.
Yonca ezmesi	Yoncadan suyun preslenerek uzaklaştırılmasıyla elde edilen kurutulmuş ürün
Yonca proteini konsantresi	Yonca ezmesi suyunun santrifüj edilip ısıtılma tabi tutularak çöktürülen proteinlerin yapay olarak kurutulmasıyla elde edilen ürün
Yonca çözünürleri	Yonca suyundan proteinlerin ekstrakte edilmesinden sonra elde edilen ürün,
Mısır silajı	Silajlanmış <i>Zea mays</i> bitkisi veya parçaları
Bezelye samanı	<i>Pisum</i> spp. samanı

1.2.1. Lignoselülozik materyaller

Lignoselülozlu maddeler yeryüzünde bol miktarda üretilen, her yıl yenilenebilme özelliği gösteren ve yeryüzünde yetişen biyokütlenin %95'ini oluşturan bileşikler olup yapısal birimleri selüloz, hemiselüloz ve lignindir (Bisaria *et al.* 1984; Crawfort and Crawfort 1984).

Evsel katı atık, ürün atıkları, hayvan atıkları, talaş atıkları, orman atıkları ya da sadece enerji eldesi için yetiştirilen ürünlerin büyük bölümü lignoselülozik madde içermektedir (Sims 2003). Ntaikou *et al.* (2010a), lignoselülozik kalıntıları; şeker kamışı tatlı sorghum küspesi, mısır ve buğday sapı vb. tarımsal kalıntılar ve ağaç kırpıntıları gibi orman kalıntıları içeren biyokütle olarak tanımlamışlardır. Bol ve hemen hemen sıfır maliyetli olmasına karşın, tarımsal kalıntılar kolaylıkla fermente olabilen serbest şeker içermezler. Kuvvetli bir şekilde lignine bağlı karmaşık karbonhidrat polimerleri (selüloz ve hemiselüloz) içerirler (Ntaikou *et al.* 2010).

Günümüzde kullanım alanı oldukça yaygın olan biyoteknolojik süreçler, organizma ve bileşenlerinin tarım, besin ve diğer endüstriyel alanlarda kullanımı esasına göre çalışmaktadır. Endüstriyel mikrobiyoloji ve biyoteknolojinin en önemli uygulama alanlarından biri olan yenilenebilen kaynak teknolojisi, özellikle tarım ve ormancılıktan gelen atık lignoselülozik maddelerin kimyasal ham madde ve enerji üretimi için kullanımını amaçlar (Şık ve Ünyayar 1998).

Lignoselülozik biyokütlerde selüloz, hemiselüloz ve lignin bileşenlerinin oranı biyokütle türlerine göre değişiklik gösterebilmektedir (Jorgensen *et al.* 2007). Sert yapılı ağaçlarda fazla miktarda selüloz bulunurken, buğday, saman ve yapraklarda daha fazla hemiselüloza rastlanılmaktadır (Sun and Cheng 2002). Bazı lignoselülozik maddelerin selüloz, hemiselüloz ve lignin içerikleri Çizelge 1.2'de verilmiştir. Çizelge 1.2'den görüleceği üzere, lignin içeriği sert ağaçlarda %18-25, kozalaklı ağaçlarda %25-35 ve çimde %10-30 iken, atıkların yaprakları lignin içermemektedir. Selüloz ise sert ağaçlarda %40-45 iken, atık yapraklarda %15-20 aralığında değişmektedir.

Lignoselülozik maddelerin hemiselüloz içerikleri de lignin ve selüloz gibi biyokütle kaynakları arasında farklılık göstermektedir (Günerhan 2011).

Çizelge 1.2. Tarımsal atıklar ve katı atıkların hemiselüloz, selüloz ve lignin muhtevası (Sun and Cheng 2002)

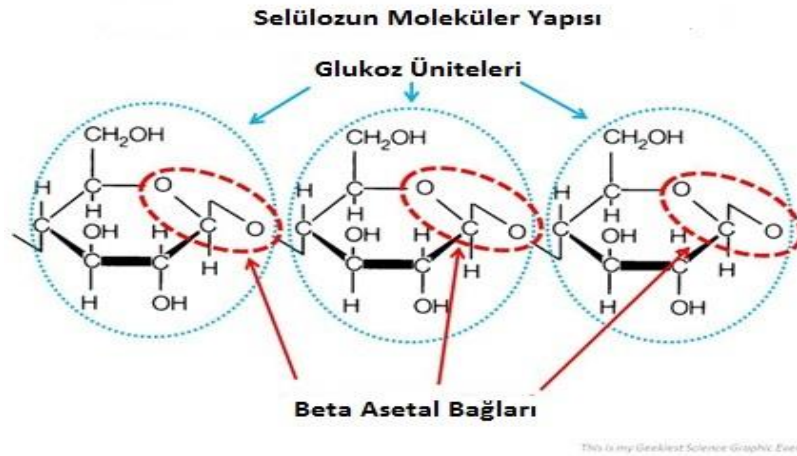
Lignoselülozik madde	Selüloz (%)	Hemiselüloz (%)	Lignin (%)
Sert ağaç	40-45	24-40	18-25
Kozalaklı ağaç	45-50	25-35	25-35
Fındık kabuğu	25-30	25-30	30-40
Mısır koçanı	45	35	15
Çim-Çimen	25-40	35-50	10-30
Buğday samanı	30	50	15
Kâğıt	85-99	0	0-15
Ayrıştırılmış atık	60	20	20
Yaprak	15-20	80-85	0
Pamuk tohumu saçakları	80-95	5-20	0
Gazete	40-55	25-40	18-30
Katı sığır gübresi	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7
Bermuda çimi	25	35,7	6,4
Çim	45	31,4	12
Kereste atığı	6	28	-

Fang *et al.* (2010), bitkisel materyallerin %30-50 oranında selüloz, %19-45 oranında hemiselüloz ve %15-35 oranında lignin içerdiğini belirtmiştir. Ren *et al.* (2009), lignoselülozik kalıntıların %32-47 oranında selüloz, %19-27 oranında hemiselüloz ve %5-24 oranında ligninden oluştuğunu vurgulamıştır.

Balat ve Kırtay (2010)'a göre lignoselülozik maddelerin kimyasal yapısı dört ana bileşene ayrılabilir. Bunlar selüloz, hemiselüloz, lignin ve özüksenebilir diğer maddelerdir. Genel olarak ilk üç bileşen yüksek molekül ağırlığına sahiptir, en son bileşen ise küçük moleküler boyuttadır.

1.2.1.a. Selüloz

Selüloz, D-glukoz birimlerinin $\beta(1\rightarrow4)$ glukozit bağıyla birbirlerine bağlanarak oluşturduğu doğrusal zincir yapıyı içeren polisakkarit bir bileşik olup $(C_6H_{10}O_5)_n$ formülüyle ifade edilmektedir (Updegraff 1969; Crawford 1981). Selüloz zincirleri hidrojenle birleştiğinde “mikrofibril” yapılarını oluşturmaktadır (Ha *et al.* 1998). Bu fibriller birbirlerine hemiselülozlar ve farklı şekerlerin amorf polimerleriyle bağlanmakta ve ligninle çevrelenmektedirler. Mikrofibriller sık bir şekilde birleşerek yığınlar ya da makrofibril formlarında bulunabilmektedirler (Delmer and Amor 1995). Şekil 1.1’den görüleceği üzere selülozun kristalin ve kompakt yapısı onu hem biyolojik hem de kimyasal ön arıtmaya karşı dirençli hale getirmektedir (Talebnia *et al.* 2008).

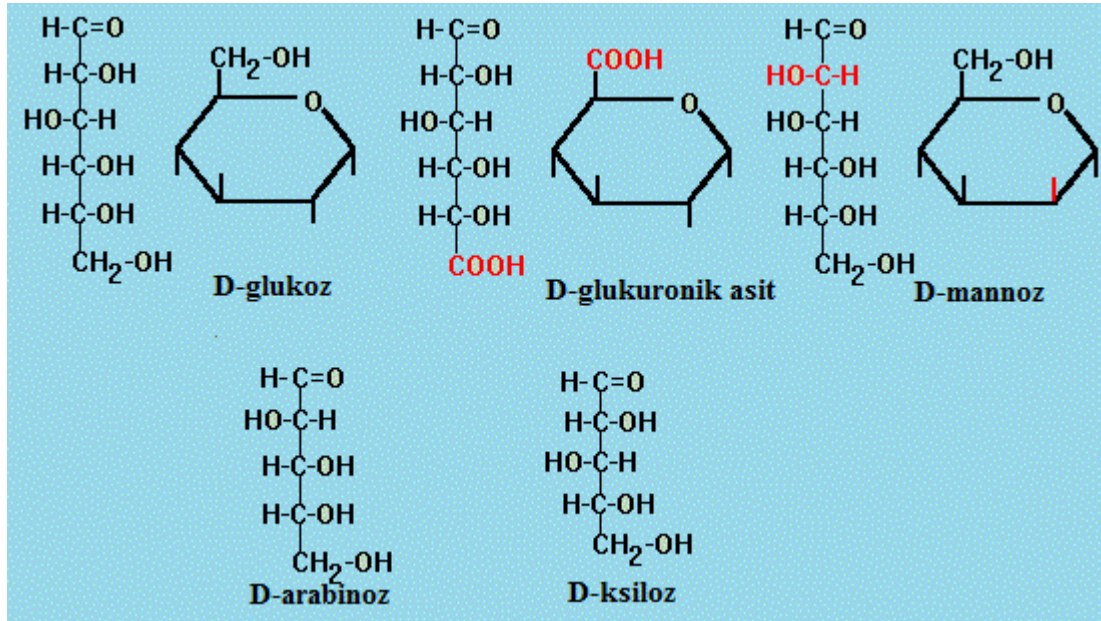


Şekil 1.1. Selülozun moleküler yapısı

1.2.1.b. Hemiselüloz

Hemiselüloz, heterojen bir polimerdir ve genel olarak pentoz, heksoz ve/veya üronik asitleri içermektedir (Girio *et al.* 2010). Selülozun kristal ve dayanıklı yapısına karşın, hemiselülozlar düzensiz, amorf ve dallı yapılarıyla hidrolize karşı daha az dirençlidirler ve asit ön muamelesine maruz kaldıklarında veya enzimatik hidroliz esnasında monomerlerine daha kolay ayrışmaktadırlar (Taherzadeh and Karimi 2008). Balat ve Kırtay (2010) ise hemiselülozun glukoz, mannoz, galaktoz, ksiloz, arabinoz, glukuronik

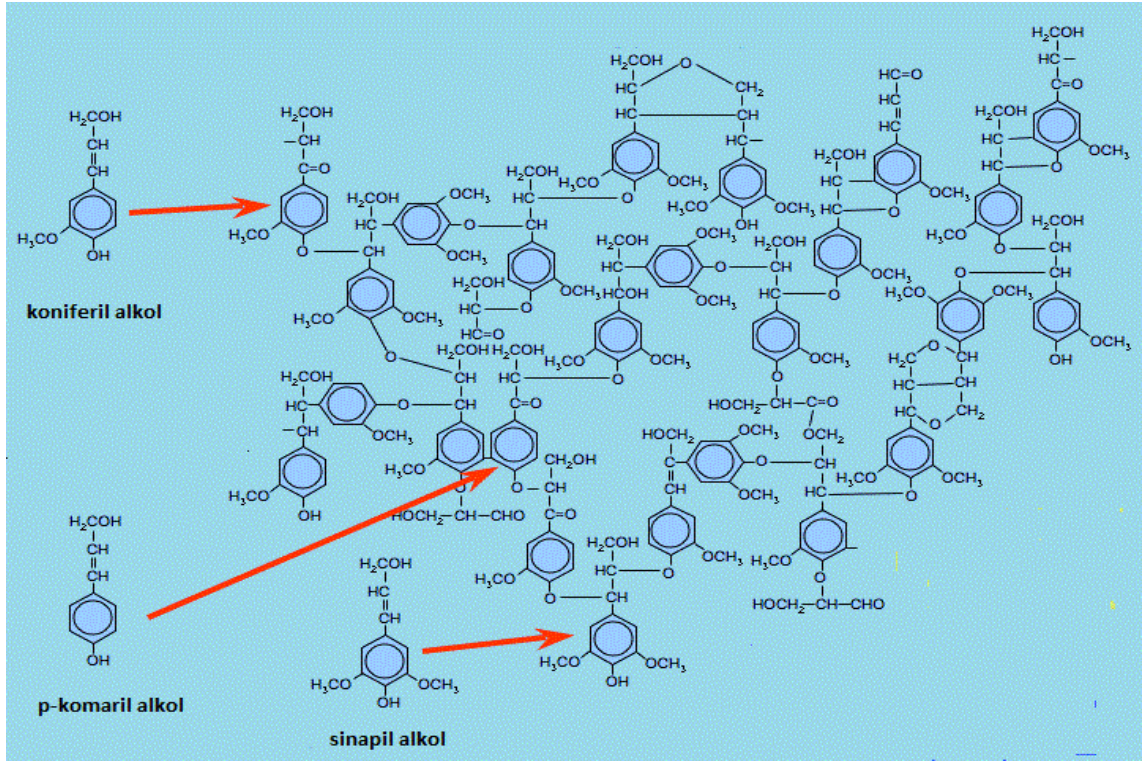
asit ve bu asitin kalıntıları gibi çeşitli polimerize olmuş monosakkaritlerin karışımı olduğunu ve selülozdan daha düşük molekül ağırlığına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Hemiselülozun moleküler yapısı Şekil 1.2’de sunulmuştur.



Şekil 1.2. Hemiselülozun moleküler yapısı

1.2.1.c. Lignin

Lignin üç boyutlu fenil propan birimlerinin bir araya gelmesiyle oluşan ve zor ayrışabilen çok kompleks bir yapıdır (Taherzadeh and Karimi 2008) (Şekil 1.3). Lignoselülozik hücre duvarının önemli bir bileşeni olan lignin, su ve besin ara transferine ve mikroorganizma saldırılarına karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Lignin, selüloz ve hemiselülozdan sonra doğada en bol bulunan üçüncü doğal polimerdir. Yeryüzünde lignin miktarının 300 milyar metrik ton olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle ligninin biyo-ürün ve biyo-yakıt üretiminde dünyanın biyo-temelli ekonomisi için önemli bir hammadde rolü oynaması beklenmektedir (Buranov and Mazza 2008). Ligninin moleküler yapısı Şekil 1.3’de gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Ligninin moleküler yapısı

1.3. Samanın Biyoteknolojik Süreçlerde Substrat Olarak Kullanımı

Samının fiziksel ve kimyasal özellikleri ve kullanımı üzerine birçok çalışma rapor edilmiştir (Shen *et al.* 1998; Abou-El-Emin *et al.* 1999; Vadiveloo 2000, 2003). Buna ek olarak samanın kullanımını ve yem değerini artırmak için diğer gıda maddelerinin takviyesi ile birlikte çok sayıda fiziksel, kimyasal ve biyolojik muamele metotları araştırılmıştır (Reddy 1996; Karunanandaa and Varga 1996a, b; Shen *et al.* 1999; Vu *et al.* 1999; Liu and Orskov 2000; Selim *et al.* 2004). Fakat bazı fiziksel muameleler makine ihtiyacı gerektirdiğinden ve çiftçiler açısından ekonomik olmadığından elverişli değildir. Sodyum hidroksit, amonyak ve üre gibi kimyasal muameleler çiftlik kullanımı için daha kullanışlıdır. Substrat olarak samanın kullanıldığı ve lignoselülitik mikroorganizmaların görev aldığı biyoteknolojik süreçler ürün bakımından çok çeşitlilik arzeder. Örneğin; Zhong *et al.* (2011), mikrobiyal ajanlarla gerçekleştirilen biyolojik ön muamelenin biyogaz üretimini; Talebnia *et al.* (2009) ise biyoetanol

üretiminde şeker verimini artırdığını belirtmiştir. Samanın biyoteknolojik süreçlerde kullanımını artırmak için geliştirilen muhtemel stratejiler 1.3.1’de özetlenmiştir.

1.3.1. Ön muamele yöntemleri

Biyokütle dönüşüm proseslerinde hasat atıklarının lignin bariyeri, selüloz kristalin yapısı ve hemiselüloz asetillemesi gibi lignoselülozik yapı karakteristiklerden dolayı parçalanılabilirliklerinin artması için ön işlem prosesi gereklidir (Chang *et al.* 1998). Ön işlem prosesinin amacı; lignin ve hemiselülozu gidermek ve selüloz kristalinitesini azaltarak gözenekli yapının arttırılmasını sağlamaktır. Ayrıca ön işlem prosesinin bazı gereksinimleri de karşılaması gerekmektedir. Bunlar;

- Şeker dönüşümünü veya ön muamele sonrasında gerçekleşecek olan hidroliz aşamasında şeker geri kazanımını sağlamak,
- Karbonhidrat bozunmasını veya kaybını önlemek,
- Hidroliz ve fermentasyon süreçleri sonrasında inhibitör oluşumunu önlemek,
- Uygun maliyetli olmak.

1.3.1.a. Fiziksel ön muamele

Fiziksel ön muamele, lignoselülozik biyokütlenin küçük parçalar haline getirilmesi işlemidir. Fiziksel ön muamelede amaç, parçacık boyutunu azaltarak ulaşılabilir yüzey alan artışı sağlamak ve kristalin yapıyı azaltarak polimerizasyon derecesinin azaltılmasına yardımcı olmaktır (Hendriks and Zeeman 2009; Palmowski and Muller 1999).

1.3.1.b. Termal ön muamele

Termal ön muamele prosesi, biyokütlenin ısıtılması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde kullanılan sıcaklık değerleri 150°C ve 180°C aralığına çıkartıldığında

lignoselülozik biyokütlerde öncelikle hemiselüloz ve kısa bir süre sonrada lignin çözünmeye başlamaktadır (Bobleter 1994; Garrote *et al.* 1999).

1.3.1.c. Asit ön muamelesi

Asitle ön muamele prosesinde en çok kullanılan kimyasal sülfürik asit (H_2SO_4) olmasına karşın, hidroklorik (HCl) ve nitrik asit (HNO_3) de kullanılmaktadır (Taherzadeh and Karimi 2007). Bu ön muamele prosesinde; yüksek sıcaklık düşük asit konsantrasyonu (seyreltik asit) veya düşük sıcaklık yüksek asit konsantrasyonu (derişik asit) kullanılmaktadır (Taherzadeh and Karimi 2008). Asit ön işlem hemiselülozu çözüdür hale getirmekte ve enzimlerin selüloza ulaşılabilirliğini arttırmaktır. Ayrıca, asit ön muamele sırasında çözünen lignin, hızlı bir şekilde yoğunlaşmakta ve asidik ortamda çökelmektedir. Hemiselülozun çözümesi ve çözülmüş ligninin çökmesi, seyreltik asit ön arıtıma oranla derişik asit ön arıtımında daha çok gözlenmektedir (Hendriks and Zeeman 2009).

1.3.1.d. Biyolojik ön muamele

Birçok ön muamele teknolojisinde prosese bağılı olarak yüksek enerji gerektiren pahalı ekipmana ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle fiziksel ve termokimyasal prosesler biyokütle dönüşümü için yüksek enerji gerektirmektedir. Biyolojik ön muamelenin, lignoselülozik maddeden lignini gidermek için yüksek enerji gerektirmediğı ve ön arıtımda çeşitli küf ve mantarların kullanımından dolayı güvenli ve çevre dostu bir metot olduğı savunulmaktadır. Bu ön arıtım yönteminde kahverengi, beyaz ve yumuşak küf mantarları kullanılmaktadır Kahverengi küf mantarları ağırlıklı olarak selülozu, beyaz ve yumuşak küf mantarları ise selüloz ve lignini parçalamaktadır (Kumar *et al.* 2009).

1.4. Samanın Yem Değerini Artırmak İçin Kullanılan Yöntemler

Sarnklong *et al.* (2010), ruminantlar için bir besin unsuru olan pirinç samanının kullanımını artırmak için muhtemel stratejiler geliştirmiş ve besin kalitesi üzerine bir derleme yaparak bazı fiziksel muamelelerin ya yüksek donanım gerektirmesi ya da çiftçiler açısından ekonomik olmaması gerekçesiyle pratik bir uygulama olmadığını ileri sürmüştür. Sodyum hidroksit, amonyak ya da üre gibi kimyasal muamelelerin tarımsal kullanım için daha uygulanabilir olduğunu belirtmişlerdir. Pirinç samanının besin değerini artırmak için bir diğer alternatif yolun ligninolitik funguslarla onların ekstraselular ligninolitik enzim sistemlerinin ya da selüloz ve/veya hemiselüloz parçalayıcı spesifik enzimlerinin kullanımı olduğunu açıklamışlardır. Sonuç olarak pirinç samanının gıda değerini artırmada fungus ya da enzim muamelesinin çok daha pratik ve çevre dostu bir uygulama olduğunu, aynı zamanda fungus ve enzim kullanımının klasik kimyasal ve fiziksel muamelelerle beraber uygulanabileceğini vurgulamışlardır. Bayram (1997), samanın ruminantlar için hazmolunabilir nitelikte yem özelliği kazanabilmesi için asit hidrolizi, enzimatik hidrolizasyon ve mikrobiyal fermentasyon olmak üzere 3 tip değerlendirme yapılabildiğini belirtmiştir.

Samanın yem değerinin artırılması çalışmalarında özellikle lignoselüloolitik bakteriler ve mikrofunguslar kullanılmaktadır. Samanın yapısını kuran selüloz, hemiselüloz ve lignin bileşenlerinin degradasyonu bu mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir.

Samanda besinsel değerin artmasında ön koşul olan lignin giderimi ise ligninolitik mikroorganizmalar ve spesifik enzim sistemleri ile gerçekleştirilmektedir. Bu sebeple araştırmacılar karbon kaynağı olarak sadece lignin bulunan besiyerlerini tercih etmişlerdir. Yem olarak kullanılacak olan samanda lignin giderimi için farklı parametreler kullanılmış ve optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca bakteriler ve fungusların ligninolitik potansiyellerinin karşılaştırılması da araştırma konusu olmuştur.

Ayrıca samanda mikroorganizma gelişimini teşvik etmek için samana protein içeriği yüksek olan mısır maserasyon sıvısı (CSL) ilavesi mikroorganizma gelişimi, saman

protein değeri ve mısır fabrikası atığının değerlendirilmesi bakımından önem taşımaktadır. Nitekim CSL hızlı çoğalan patojenler dışında tüm mikroorganizmalar için azot ve karbon kaynağı olan bir mısır endüstrisi yan ürünüdür. Mikrobiyolojide mısır maserasyon sıvısının temel dezavantajı içeriğinin çeşitliliğidir. CSL maya ekstraktı ve pepton gibi çok daha pahalı materyallere göre ucuz bir alternatif azot kaynağıdır (Liggett and Koffler 1948).

CSL'nin pH'sı 3,7 ve 4,1 arasında değişkenlik gösterebilir. Tüm CSL örneklerinin %95'i %3,85 ile %4,1 oranında azot içeriğine sahipken, %5'i bu alt ve üst sınırların dışındaki değerlere sahiptir. CSL çok yüksek oranda aminoasit ve polipeptit içeriğinin yanı sıra indirgen şeker, laktik asit ve uçucu asitlere de sahip olduğu Çizelge 1.3'de belirtilmiştir (Liggett and Koffler 1948).

Cardinal and Hedrick (1947)'e göre CSL'deki toplam nitrojenin %95'inden daha fazlası amonyağın ve aminositlerin hidrolizinden temin edilir. Ayrıca mevcut nitrojenin yarısına yakın miktarı alanin aminoasitinde bulunur. CSL yüksek oranda B vitamini kompleksi içerir (Liggett and Koffler 1948).

Çizelge 1.3. Mısır maserasyon sıvısının genel analizi

Madde	%
Su	45-55
Toplam azot	3,7-6,3
Serbest indirgen şeker	0,1-11
Laktik asit	5-15
Kül	9-10
Uçucu asitler	0,1-0,3
SO ₂	0,009-0,015

1.5. Samanın Yem Değerini Artırmada Mikroorganizmaların Kullanılması

1.5.1. Lignoselüloz yıkımında rol alan bakteriler

Genellikle lignoselülozik materyallerin degradasyonunun funguslar tarafından yürütüldüğü kabul edilmektedir. Bunun sebebi, bu organizmalara lignoselüloz içerisine nüfuz edebilme yeteneği kazandıran fungal büyümenin hifli yapısıdır. Normalde bakterilerin, ligninleşmiş odun hücre duvarının yıkımında sınırlı bir kapasiteleri bulunmaktadır. Bununla birlikte bakteriler genellikle karışık mikrobiyal populasyonlarda ortaya çıkarlar ve birbirleriyle sinerjik etki gösterebilen bir dizi enzim üretirler. Bu ilişkiler en sonunda aerobik koşullar altında CO₂'e; anaerobik koşullar altında ise CO₂, metan ve H₂O'ya dönüştürülecek olan lignoselülozun tamamen yıkımına öncülük etmektedir (Kuru 2003).

1.5.1.a. Aerobik yıkım

Lignoselülozik artıkların biriktiği toprak yüzeyi, en önemli mikrobiyal habitatlardan birini oluşturmaktadır. Yüksek lignin içeriğine bağlı olarak odun, lignoselülozik yapıların en dirençlisini temsil eder. Ligninin tamamen degradasyonu, sadece *Phanerochaete chrysosporium* ve *Streptomyces* gibi birkaç mikroorganizma tarafından yürütülen oksidatif bir süreçtir. Bununla birlikte, daha geniş çeşitliliğe sahip bir grup mikroorganizma, özellikle de aktinomisetler, selülozik ve hemiselülozik substratlara ulaşabilme doğrultusunda lignoselülozun kısmi delignifikasyonunu gerçekleştirebilme yeteneğindedirler (McCarthy 1987). Alkali pH ve yüksek sıcaklıklarda, yüksek düzeylerde lignoselüloolitik aktivite gösteren organizmalar içerisinde *Bacillus* üyeleri de *Streptomyces* üyeleri ile birlikte dikkate değer mikroorganizmaları oluşturmaktadır (Subramaniyan and Prema 2002). Öte yandan bu mikroorganizmaların bazı üyelerinin selüloz aktivitesine sahip olmaları, bunların kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanılabilme potansiyellerini artırmaktadır. Aerobik lignoselülozik toprak bakterileri arasında *Cellulomonas*, *Pseudomonas* (*Cellvibrio*), *Thermomonospora* (Tuncer *et al.* 1999; Rob *et al.* 1996; Bachmann and McCarthy 1991) ve *Microbispora* genuslarına ait

bazı türler detaylı bir biçimde çalışılmıştır. Humprey *et al.* (1977) ise bakterilerde selülozun parçalanmasının hem aerobik hem de anaerobik bakteriler tarafından gerçekleştirildiğini ve bu selülitik aerobik bakterilerin *Bacillus*, *Cytophaga*, *Herpetosiphon*, *Pseudomonas*, *Cerratia*, *Streptomyces*, *Sporocytophaga*, *Thermoactinomyces* ve *Thermomonospora* genuslarına dahil olduğunu belirtmiştir.

1.5.1.b. Anaerobik yıkım

Lignoselülozun anaerobik degradasyonu gübre, kompost, atık su işleme tesislerinin çamurları ve deniz veya tatlı su sedimentleri gibi çeşitli anaerobik habitatlarda meydana gelmektedir. Bunlara ek olarak, lignoselülozun rumen ve gastro-intestinal boşlukta anaerobik mikroorganizmalar tarafından hidrolizi, ot-obur hayvanların beslenmesinde çok önemli rol oynamaktadır. Hayvan yeminin rumende degradasyonu, gerekli enzimleri üreten bakteriler, funguslar ve protozoonların kompleks bir kombinasyonu tarafından gerçekleştirilmektedir. Rumende lignoselüloz degradasyonunun kompleks bir mikro-flora tarafından gerçekleştirilmesinin nedeni, bitki hücre duvarındaki selülozun glukuronoarabinoksilanların dolaylı ortaklığı ile korunmasından kaynaklanmaktadır (Wilkie 1979). Buna ilaveten, ksilanlar yüksek derecede asetillenmişlerdir. Ksiloz yapılarının %70'i ksilopiranoz halkasındaki C₂ veya C₃ pozisyonundaki hidroksil grubundan esterlenmiştir (Puls and Schuseil 1993). Bunun da ötesinde, dallanmış ksilan polimerleri, esterlenmiş ferulik asit ve p-kumarik asitlerle birbirlerine, bitki hücre duvarının yapısal birlikteliğini de sağlayan çapraz bağlarla bağlanmışlardır (Mueller-Harvey *et al.* 1986). Bu kompleks substratla yüzleştikten sonra, rumen mikroorganizmalarının farklı özelliklere sahip çok çeşitli lignoselülitik enzimleri ürettiği olmaları ise sürpriz olmamaktadır.

Detaylı bir şekilde çalışılmış olan selülitik ve ksilanolitik bazı rumen bakterilerinden gram-negatif türler *Fibrobacter* (eski isimlendirmeye göre *Bacteriodes*) *succinogenes* ve *Butyrivibrio fibrisolvens*; gram-pozitif türler *Ruminococcus albus* ve *Ruminococcus flavefaciens*'tir (Malburg *et al.* 1992). Selülitik rumen fungusları, anaerobik *Chytridiomyces* üyelerini, özellikle de *Neocallimastix frontalis*, *N. patriciarum*, *N.*

joyoni, *Sphareronomonas communis*, *Piromyces communis*, *Orpinomyces bovis* ve *Anaeromyces mucronatus*'u içine almaktadır (Malburg *et al.* 1992). Rumende selülozik bitki parçalarını kullanan siliatların, özellikle *Diplodinium* ve *Eudiplodinium* genusuna ait oldukları belirlenmiştir (Malburg *et al.* 1992; Orpin 1988). Protozoanın selülozu fagositozla içeri almasından dolayı hidrolitik enzimlerin protozoanlar tarafından mı üretildiği yoksa selülitik bakteriler tarafından üretilip substratla birlikte mi içeri alındığı sorusu ortaya çıkmaktadır. En azından *Eudiplodinium maggii*'de selülitik enzimler siliat tarafından üretiliyormuş gibi görünmektedir (Coleman 1978).

1.5.2. Lignoselüloz yıkımında rol alan funguslar

Sanchez (2009), düşük maliyetli iyileştirme projelerinde lignoselülozu parçalayan enzim sistemlerinden dolayı fungusların kullanımının çok etkili olabileceğini savunmuştur. Funguslar lignoselülozik materyali degrade edebilme yetenekleri bakımından üç kategoride sınıflandırılmaktadırlar. Bunlar; beyaz-çürükçül funguslar, kahverengi-çürükçül funguslar ve yumuşak-çürükçül funguslardır (Buswell and Odier 1987). Beyaz-çürükçül funguslar, polisakkaritler ve ligninin her ikisine birden veya tercihen lignine saldırıp degrade ederek lignoselülozun etkin bir biçimde yıkımını gerçekleştirebilirler (Eriksson *et al.* 1990). Tipik olarak beyaz-çürümeye, etkilenmiş odundan her ne kadar sadece lignin uzaklaştırılsa da, sağlam odunda bulunan lignin ve polisakkaritlerin eşit oranda uzaklaştırıldığı süngerimsi, iplikli ya da yapraklı yapı olarak tanımlanan çürüklükler ortaya çıkmaktadır (Maijala 2000). Lignoselüloz degrade eden beyaz-çürükçüllerin çoğu bazidiyomisetlere (örneğin; Agaricaceae, Corticaceae, Hydnaceae, Polyporaceae ve Telesporaceae) veya askomisetlerin Sphaeriales ordosuna (örneğin; *Ustilago vulgaris*, *Xylaria polymorpha*) aittir (Buswell and Odier 1987).

Kahverengi-çürükçül funguslar, özellikle konifer odunlarından selüloz ve hemiselülozu seçici bir biçimde uzaklaştıran, hem patojenik hem de saprofitik türleri içermektedir. Enfekte odun çok hızlı bir şekilde doğal dayanıklılığını kaybeder. Ani ayrılımlar ve çürüyen odun fibrilleri boyunca kırılımlar meydana gelir. İlerleyen aşamalarda odun, temelde ligninin modifiye yapılarından oluşan kübik, koyu kahverengi, çabucak

dağılabilen parçalar halini almaktadır. Kahverengi-çürükçül funguslar bazidiyomisetler içerisinde azınlığı oluşturan gruptur (%10-26) (Maijala 2000). Kahverengi-çürükçül funguslar, lignin degradasyonu için gerekli olan oksidatif fenol oksidaz veya peroksidaz aktivitelerine sahip değildirler. Bununla birlikte selüloz hidrolizi için düşük moleküler ağırlıklı şelatörleri, oksalatları ve hidroksil radikallerini içeren etkin bir mekanizma geliştirmişlerdir (Goodell *et al.* 1997).

Yumuşak-çürümeye neden olan funguslar ise yüksek nem içeren oduna saldırırlar. Bu funguslar Ascomycetes (veya Deuteromycetes) üyeleri olan *Penicillium*, *Thielavia* ve *Dactylomyces*'i içerisine almaktadır (Maijala 2000). Bunlar odun hücre duvarından çok önemli miktarda selüloz ve hemiselüloz uzaklaştırabilirler. Bazı yumuşak-çürüme meydana getiren *Aspergillus* üyeleri, önemli ksilanaz üreticileridir ve lignini degrade edebilirler.

Lignoselülozu degrade etme yeteneği gösteren organizmalar içerisinde en detaylı çalışılmış olanı beyaz-çürükçül bir fungus olan *Phanerochaete chrysosporium*'dur (Eriksson *et al.* 1990; Kirk and Farrel 1987). Aktinomisetler ile lignoselüloz degradasyonunun çalışılmasında araştırmaya bir başlangıç noktası olarak *P. chrysosporium* için halihazırda geliştirilmiş olan metodoloji kullanılabilir. Bundan dolayı aktinomisetler tarafından lignoselüloz degradasyonunun tespit edilmesi durumunda *P. chrysosporium*'un lignoselüloz degradasyon sisteminin ve metodolojilerinin tüm ayrıntıları ile gözden geçirilmesi önemlidir.

1.5.3. Lignoselülozun yıkımında rol alan aktinomisetler

Aktinomisetlerin çevresel olarak en önemli yetenekleri arasında lignoselülozu degrade edebilmeleri gelir. Her ne kadar son yıllarda lignoselülitik aktinomisetler üzerine yapılan çalışmaların çoğu ağırlıklı olarak Crawford'un (Department of Bacteriology and Biochemistry, University of Idaho, U.S.A.) ve McCarthy'nin laboratuvarlarında (Department of Genetics and Microbiology, University of Liverpool, U.K.) yürütülmüş

olsa da uzun zamandır aktinomisetler gibi bakterilerin doğal habitatlarda lignoselüloz degradasyonuna karıştığından şüphelenilmiştir (Waksman and Cordon 1939).

1954'lere kadar gidildiğinde Hintli balıkçıların balık ağlarındaki bozulmadan *Streptomyces* ve *Nocardia* türlerinin sorumlu olduğu görülmektedir (Freitas and Bhat 1954). 1968'de Sorensen, ligninin in vivo koşullarda toprak bakterileri tarafından degradasyonunu rapor etmiştir. 1974'de *Thermomonospora fusca*'nın lignoselüloza saldırdığı gözlemlenmiştir (Crawford 1974). Bununla birlikte, 1977'de Trojanowski'nin bulgularından öncesine kadar aktinomisetler tarafından lignoselüloz degradasyonuna ilişkin kesin bir kanıt bulunamamıştır.

1978'de Crawford, [^{14}C]-lignin-işaretli-lignoselülozu [^{14}C]'a okside etme yeteneğine sahip bir grup *Streptomyces* suşu elde etmiştir. Crawford'un grubu tarafından topraktan izole edilen diğer iki aktinomiset suşu olan *Streptomyces viridosporus* T7A ve *Streptomyces setonii* 75Vİ2'nin ise ot lignoselülozunun lignin içeriğini sırası ile %44 ve %39 oranında uzaklaştırabildiği gösterilmiştir (Antai and Crawford 1981). *Micromonospora*, *Streptomyces* ve *Thermomonospora* genuslarına ait türlerde lignin- [^{14}C]-lignoselüloz için geliştirilmiş en yüksek lignoselüloz degradasyon aktivitesini sırasıyla %8 ve %7,5 [^{14}C] ile *Streptomyces* sp. MT813 ve *Thermomonospora mesophila* göstermiştir (McCarthy and Broda 1984).

Tüm anlatılanlara ek olarak endüstriyel mikrobiyoloji ve biyoteknolojinin en önemli uygulama alanlarından biri olan yenilenebilen kaynak teknolojisi, özellikle tarım ve ormancılıktan gelen atık lignoselülozik maddelerin kimyasal ham madde ve enerji üretimi için kullanımını amaçlar (Şık ve Ünyayar 1998).

Biz de bu çalışmada kaliteli yem açığı konusunda belirtilen olumsuzlukları azaltmak veya ortadan kaldırmak, yemleme çalışmalarına bağlı değerlendirmelerle yem sanayisine yönelik önemli katkılar sağlamak, hayvancılığımızda verim artışı ve kaynak israfının önlenmesi yönünden yararlı olacak nitelikte yem temin etmek ve biyolojik degradasyon uygulamalarının işlem görmemiş tarımsal artıkların yem olarak

kullanılmasına oranla pek çok özelliği bakımından olumlu katkıları olduğunu göstermek için arpa ve buğday samanlarının, teker teker ve ikili kombinasyonlarının farklı rezervuarlardan izole edilecek olan, özellikle de lignini ve selülozu sindirebilen bakteriler ve mikrofunguslarla muamele edilerek yem değerlerinin artırılmasını amaçlamaktayız.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lignoselülozik materyallerin mikrobiyolojik yöntemlerle değerlendirilmesi çalışmaları arasında yer alan samanın yem değerinin artırılması konulu araştırmalar son yıllarda üst düzeyde bir popularite yakalamıştır. Bu konu kapsamında ülkemiz ve dünyada yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Salehpor *et al.* (2012), bakteriyel, enzimatik ve kimyasal metotlarla pirinç samanının sindirilebilirliğini ve besin değerini artırma üzerine bir çalışma yapmışlardır. 3 kg'lık tanklarda anaerobik şartlarda 60 gün süreyle yürütülen çalışmada örnekler kurutulduktan sonra ham protein, NDF, ADF, kül ve organik madde analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak bakteriyel süreçler sonunda samandaki selüloz ve hemiselüloz miktarının düştüğünü ve artan inkübasyon süresine bağlı olarak gaz üretim oranının diğer metotlara göre daha çok olduğunu gözlemlemişlerdir.

Gupta *et al.* (2012), selüloz degradasyonu için substrat olarak filtre kağıdı ile zenginleştirilmiş bazal kültür ortamını kullanarak, dört farklı omurgasız hayvandan selüloz degradasyonu yapan sekiz tane bakteri izole etmişlerdir. Organizmaların selülaz aktivitelerini belirlemek için selüloz Kongo kırmızısı agarda koloni etrafındaki açık zonun çapını ölçmüşlerdir.

Gomez *et al.* (2012), *Trametes sp.* 44 kullanarak mısır samanının biyolojik delignifikasyonu üzerine partikül boyutunun ve havalandırmanın etkisini çalışmışlardır. Fermentasyon partikül boyutu 4 (4,76 mm) ve 8 (2,30 mm); hava akış hızı 100 ve 200 ml/dk olacak şekilde yürütülmüştür. Çalışma sonuçları, partikül boyutunun hidrolitik enzimlerin üretimini etkilediğini, partikül boyutu 8 olanın ise selülazların ve hemiselülazların sentezlenmesini desteklediğini göstermiştir. Buna ek olarak havalandırmanın ve partikül boyutunun ligninolitik enzimlerin sentezlenmesini etkilediğini gözlemlemişlerdir.

Zhong *et al.* (2011), mısır samanının oda sıcaklığında yeni kompleks mikrobiyal ajanlarla gerçekleştirilen biyolojik ön muamele ile biyoparçalanabilirliğinin ve anaerobik biyogaz üretiminin arttığını gözlemleyen araştırmacılar, %0,01'lik kompleks mikrobiyal ajanların ve 15 günlük ön muamelenin uygun olacağını belirtmişlerdir. Bu muamele şartlarının muamele edilmemiş saman örneğiyle karşılaştırıldığında deney grubu samanında %33,07'den fazla toplam biyogaz verimi, %75,57'den fazla metan verimi ve sindirim süresinin daha kısa olması ile sonuçlandığını gözlemlemişlerdir. Kimyasal kompozisyon analizlerinin lignin, selüloz ve hemiselüloz miktarında %5,81-25,10 oranında azalma olduğunu gösterdiğini vurgulamışlar ve bu değişikliklerin biyogaz üretimini artırmak için etkili bir metot olabileceği kanısına varmışlardır.

Swe (2011), lignoselülozik bileşiklerin parçalanmasında yüksek potansiyelli filamentli fungusları teşhis etmeyi amaçlamıştır. Yedi fungus ırkı seçilmiş ve huş ağacı odunu içeren agarda geliştirilerek bu ırkların degradasyon yetenekleri taranmıştır. Araştırmacı lignin parçalayan enzimlerin üretiminde indikatör olarak kullanılan sentetik boyanın dekolorizasyonunu gözlemlemiştir. Fungi ırkları arasından *Penicillium pinophilum* ve *Trametes hirsuta*'nın pepton ve huş odunu içeren sıvı besiyerinde yetiştirildiklerinde selülaz ve ksilenaz enzimlerini yüksek miktarda ürettiklerini, ayrıca buğday kepeğinde *T. hirsuta*'nın katı hal fermentasyonunun lignin degradasyonu enzimi olan lakkazın sentezini indüklediğini tespit etmiştir.

Genç (2011), enerji bitkileri, lignoselülozik kalıntılar ve atıklar sular gibi biyohidrojen üretiminde kaynak olabilecek potansiyel biyokütle tiplerini araştırmıştır. Araştırmacı, nişasta ve şeker esaslı biyokütle ve atıkların hidrojen üretimi için mikroorganizmalar tarafından kolaylıkla fermente olabildiği halde, lignoselülozik biyokütlenin ön muameleye tabi tutulması gerektiğini belirtmiştir. Ön muamelenin biyokütlenin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değiştirilmesi için uygulandığını da ifade etmiştir.

Bandounas *et al.* (2011), Kraft lignin ile zenginleştirilmiş besiyeri kullanarak toprak bakterilerini izole etmiş ve bu bakterilerin atık ligninin değerlendirilmesi için yeni enzim kaynağı olarak ligninolitik potansiyellerini araştırmıştır. 16S rRNA gen dizilimi

ve fenotipik karakterizasyonlarına göre organizmaların *Pandora* *norimbergensis*, *Pseudomonas* sp ve *Bacillus* sp. olduklarını ortaya koymuştur. Bu izolatlardan her birisinin ligninolitik kapasitesi, bakteriler yüksek moleköl ağırlıklı ve düşük moleköl ağırlıklı lignin elemanları üzerinde geliştirilerek değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, *Bacillus* sp.'nin yeni tip ligninolitik enzim kaynağı olarak seçildiğini belirtmiştir.

Sarnklong *et al.* (2010), ruminantlar için bir besin unsuru olan pirinç samanının kullanımını artırmak için muhtemel stratejiler ve besin kalitesi üzerine bir derleme yapmışlardır. Bazı fiziksel muamelelerin ya yüksek donanım gerektirmesi ya da çiftçiler açısından ekonomik olmaması gerekçesiyle pratik bir uygulama olmadığını ileri sürmüşlerdir. Sodyum hidroksit, amonyak ya da üre gibi kimyasal muamelelerin tarımsal kullanım için daha uygulanabilir olduğunu belirtmişlerdir. Pirinç samanının besin değerini artırmak için bir diğer alternatif yolun ligninolitik funguslarla, onların ekstraselular ligninolitik enzim sistemlerinin ya da selüloz ve/veya hemiselüloz parçalayıcı spesifik enzimlerinin kullanımı olduğunu açıklamışlardır. Sonuç olarak pirinç samanının gıda değerini artırmada fungus ya da enzim muamelesinin çok daha pratik ve çevre dostu bir uygulama olduğunu, aynı zamanda fungus ve enzim kullanımının daha klasik kimyasal ve fiziksel muamelelerle beraber uygulanabileceğini vurgulamışlardır.

Jahromi *et al.* (2010), hayvan besini olarak kullanılan pirinç samanının kalitesini artırmak için katı hal fermentasyonunun kullanımını geliştirmeyi amaçlayan bir çalışma yapmışlardır. Azot kaynağı içeren ve içermeyen pirinç samanları *Aspergillus niger* (K8) ile fermente edilmiştir. Pirinç samanının fermentasyondan önceki ve fermentasyondan 10 gün sonraki selüloz, hemiselüloz, organik madde, kuru madde, ADF, NDF ve ADL içeriklerini belirlemişlerdir. Fermentasyonun NDF içeriği üzerinde etkili fakat ADF ve ADL içerikleri üzerinde etkisiz olduğunu gözlemlemişlerdir. Azot kaynağı olarak üre ilavesinin fermente pirinç samanının NDF ve hemiselüloz içeriğini önemli ölçüde düşürdüğünü belirtmişlerdir. Fermentasyondan sonra pirinç samanının selüloz içeriğinin değişmediğini, ham protein miktarının ise önemli ölçüde arttığını vurgulamışlardır.

Talebnia *et al.* (2010), buğday samanından biyoetanol üretiminde ön muamele, hidroliz ve fermentasyon üzerine bir çalışma yapmışlardır. Buğday samanının enzimatik hidrolizinden sonra uygulanan ön muamele metodu ile şeker veriminin %74-99,6 olduğunu gözlemlemiştir.

Abd-Elsalam and El-Hanafy (2009), ligninolitik bakteriyal ırkların lignin biyodegradasyonu ve mısır toprağından izole edilen *Bacillus subtilis* ve *Bacillus* sp.'nin bu konuda karşılaştırılması üzerine bir çalışma yapmıştır. Lignin parçalayan bakterilerin funguslardan daha geniş aralıklı sıcaklık ve pH toleransı olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, mısır toprağından izole edilip moleküler ve fizyolojik analizlerle teşhis edilen bir bakteriyal ırkın sentetik lignini tek karbon kaynağı olarak kullanma ve etkili bir şekilde parçalayabilme kapasitesinin bulunduğunu açıklamışlardır. *Bacillus* sp. (EU978470) olarak teşhis edilen bu ırkın degradasyon deneylerinde 6 günlük inkübasyon süresi sonunda lignin parçalanmasının pH 6'da maksimum (%81,4), pH 13'de ise minimum (%34,2) düzeyde olduğunu gözlemlemiştir.

Abdulla (2007), *Micromonospora*, *Streptomyces* ve *Nocardiodetes* cinslerine ait üç selüloolitik aktinomiset izolatu birlikte pirinç samanının organik iyileştirilmesinde kullanmıştır. Kullanılan mikrop kombinasyonunun aerobik şartlar altında saman dekompozisyonu sürecini hızlandırıldığını ve *Micromonospora* inokulasyonunun nitrat içeriğini artırdığını gözlemleyerek bu kombinasyonun pirinç samanı kullanımında çevre dostu bir uygulama olduğu sonucuna varmıştır. Oluşan son ürünün biyogübre değerinin ise tartışılmakta olduğunu ifade etmektedir.

Özşahin (2006), Kahramanmaraş ili kağıt fabrikaları çevresinden alınan toprak, su ve atık örneklerinden izole edilen *Bacillus* sp. suşlarının selülaz aktivitelerini araştırmış ve bu suşların enzim aktivitelerini artırmaya yönelik teknikler uygulamıştır. En yüksek selülaz aktivitesi gösteren *Bacillus* sp. suşundan selülaz yoğunlaştırılması yapılarak enzim miktarları saptanmıştır. Araştırmacı, selülaz enziminin kısmi saflaştırma yapıldıktan sonra optimum 10 pH ve 40°C'de faaliyet gösterdiğini gözlemlemiştir.

Ayrıca enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının ve karboksimetil selüloz (CMC) konsantrasyonunun etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Kuru (2003), Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilmiş ve izole edildikleri habitatlar doğrultusunda lignoselüloz degradasyonu gerçekleştirebileceği düşünülen altı adet *Streptomyces* suşunun ekstraselüler lignoselülitik enzimlerini, farklı karbon kaynakları içeren bazal maya ekstraktı besiyeri üzerinde gelişmeleri sırasında çalışmıştır. En yüksek enzim aktivitesinin 72-96 saat inkübasyon sonrasında, 30-35°C'de ve pH 8-9'da, *Streptomyces* sp. F6616'nın buğday samanı üzerinde gelişmesi sırasında meydana geldiğini gözlemlemiştir.

Tuncer and Ball (2002), *Thermomonospora fusca* BD25 tarafından üretilen ekstraselüler lignoselülitik enzimlerle, substrat olarak kullanılan yulaf ksilanının %28,9'unun hidroliz edildiğini rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, substrat olarak buğday samanı ve solubilize karaft/kraft hamurunu kullandıklarında ise bu materyallerin hidroliz oranlarının yulaf ksilanına oranla 4 ve 6 defa daha az olduğunu fakat bu iki substratın içerdikleri hemiselüloz miktarları dikkate alındığında ise hemiselülozun hidroliz oranlarının %22,2 ve %25,9 olarak gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

Arora et al. (2002), *Trametes versicolor*, *Daedalea flava*, *Dichomitus squalens*, *Phlebia fascicularia*, *Phlebia floridensis* ve *Phlebia radiata*'nın lignoselülitik enzimleri üzerine yaptıkları çalışmada, bu organizmalardan hiçbirisinin *P. chrysosporium*'un toplam organik madde miktarında meydana getirdiği kayıp oranına (%52) erişemediklerini rapor etmiştir. Adı geçen mikroorganizmalar içerisinde en yüksek aktivite gösteren *Dichomitus squalens*, ancak %36,8 oranında organik madde kaybı meydana getirebilmiştir.

Wenzel et al. (2001), *Zootermopsis angusticollis* termitinin bağırsağındaki aerobik ve fakültatif anaerobik selülitik bakterilerin varlığını göstermeyi amaçlamıştır. Aerobik kültür şartlarında *Z. angusticollis* bağırsağından 119 selülitik ırk izole etmiş ve bu isolatların gram pozitiflerden *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*; gram negatiflerden

ise *Rhizobium*, *Brucella*, *Pseudomonas* ve *Zymomonas* cinsleri olduğunu gözlemlemiştir. Bazı izolatların ml başına 10^7 adet bulunması sebebiyle araştırmacılar, termitin bağırsağındaki bu izolatların selüloz sindiriminde rol oynayabileceğini savunmuştur.

Şık ve Ünyayar (1998), iki beyaz-çürükçül fungus *Phanerochaete chrysosporium* ME 446 ve *Funalia trogii* tarafından pamuk sapının yarı-katı fermentasyonu ile lignoselülozik yıkımı ve lignolitik enzim aktivitelerini çalışmışlardır. Yapılan çalışmalarda pamuk sapının %23 lignin ve %40 selüloz içerdiği tespit edilmiştir. Yarı-katı fermentasyon ile 20 günlük inkübasyon sonucu, *P. chrysosporium*'un %22 lignin ve %24 selüloz yıkımına, *F.trogii*'nin ise %23 lignin, %27 selüloz yıkımına yol yol açtığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca *P. chrysosporium* ve *F. trogii*'nin ligninolitik sisteminin fungal gelişimin sekonder metabolizması esnasında aktive edildiği sonucuna varmışlardır.

Bayram (1997), mikrobiyal degradasyona bırakılan 7 ayrı tarımsal artığın hayvan yemi olarak değerinin artırılması yönünde çalışmıştır. Bu amaçla test organizması olarak basidiomiset sınıfına ait *Pleurotus sajor caju* ve *Phanerochaete chrysosporium* ME446'yı kullanmıştır. Fermentasyonun 60. günü itibariyle, bütün tarımsal artıkların kuru madde, ham selüloz, NDF ve lignin içeriklerinde azalmalar; ham protein ve sindirilebilirlik değerlerinde artışlar meydana geldiğini saptamıştır. Araştırmacı, bu değerlerin kullanılan test organizması ve tarımsal atık türüne göre farklılık gösterdiğini belirtmiştir.

Mccarthy and Broda (1984), lignin parçalayan aktinomisetlerin seçilmesi ve buğday lignoselülozuna karşı aktivitelerinin belirlenmesi konusu üzerine araştırma yapmışlardır. Doğal substratlar üzerinde farklı aktinomiset gruplarının gelişimi karşılaştırılmış ve ırklar samanı parçalayabilme ve ligninle ilişkili fenolik bileşiklerde üreme yeteneklerine göre seçilmiştir. Sonuç olarak, samanı degrade eden izolatların çoğunun *Thermomonospora* ve *Micromonospora* genuslarına ait olduğu ve *Micromonospora* cinsine ait türlerin lignini kullanabildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca

araştırmacılar, samanı parçalamayan bazı ırkların da ligninden kaynaklanan fenolik substratları kullanabilme yeteneğinde olduğunu ve bu ırklardan *Thermomonospora mesophila* ve *Streptomyces sp.*'nin lignini karbondioksite ve suda çözülebilir karbon bileşiklerine kadar parçalayabildiklerini de vurgulamışlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmada Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü ve Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü'nde bulunan Çizelge 3.1'deki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Tüm yem örneklerinde kuru madde (KM), ham kül (HK), ham protein (HP), asit deterjanda çözünmeyen lif (ADF), nötral deterjanda çözünmeyen lif (NDF) ve asit deterjan lignin (ADL) analizleri Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Yem Analizleri Laboratuvarında yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Distile su üretme cihazı (Nüve NS 112)	Besiyeri ile çözeltilerin hazırlanmasında ve çözücü olarak kullanılacak distile suyun temininde kullanılmıştır.
Hassas terazi, Denver Instrument	Gerekli kimyasalların tartım işlemlerinde kullanılmıştır.
pH metre, Orion 3 Star pH Portable Thermo Scientific	Besiyerlerinin ve çözeltilerin pH'sının ayarlanmasında kullanılmıştır.
Isıticılı manyetik karıştırıcı (Chiltern HS31, UK)	Besiyeri ve çözelti hazırlanmasında homojenizasyonu sağlamak amacıyla kullanılmıştır.
Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-110, Japonya)	Besiyeri ve malzemelerin sterilizasyonunda kullanılmıştır.
Etüv (Philip-Harris, İngiltere)	İzolasyon, saflaştırma ve tarama işlemlerinde petrilerdeki kültürlerin inkübasyonunda kullanılmıştır.
Çalkalamalı inkübatör (Zhicheng ZHWY-200B, Çin)	Sıvı besiyerinde biyomas üretiminde kullanılmıştır.
Vorteks karıştırıcı (Fisons Whirlimixer, Leicestershire)	Spektrofotometrik ölçüm esnasında kullanılan biyomas-steril fizyolojik su karışımlarının ve yapılan çözeltilerin homojenizasyonunu sağlamak üzere kullanılmıştır.
Spektrofotometre: Schimadzu UV mini-1240	İnokulasyon aşamasında kullanılacak biyomas-steril fizyolojik su karışımlarındaki bakteri yoğunluğunu ölçmek amacıyla kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 (devam)

Buzdolabı Arçelik, Türkiye, 8190NF	Besiyerlerinin, kimyasalların, çözeltilerin ve boyaların depolanmasında, saf kültürlerin saklanması için kullanılmıştır.
Santrifüj cihazı, Universal Hettich 320R	Mikroorganizma inoküle edilmiş besiyerinden pelet eldesinde kullanılmıştır.
Işık Mikroskobu: Olympus BX51, Japonya	İnokülasyonda kullanılacak küf sporlarının sayımında kullanılmıştır.
Steril kabin	Mikrobiyolojik işlemlerin aseptik koşullar altında gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır.
Kjeldahl Cihazı	Ham protein analizi için kullanılmıştır.
Yakma Fırını	Yemlerin organik kısımlarını yakmak amacıyla kullanılmıştır.
ANKOM NDF/ADF Lif Analiz Cihazı, ANKOM 200 FIBER ANALYZER	ADF, NDF ve ADL analizi için kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan nutrient agar (NA), nutrient broth (NB), patates dekstroza agar (PDA) ve patates dekstroza broth (PDB), tripton soy agar (TSA), czapek dox agar (CDA), karboksimetilselüloz agar (CMCA), minimal tuzlar ortamı-lignin (MSML), selüloz Kongo kırmızısı agar (CCRA) (Lu *et al.* 2004) besiyerleri; çözelti ve boyalar için gerekli kimyasallar OXOID, DIFCO, FLUKA, MERCK, SIGMA ve ANKOM firmalarından temin edilmiştir.

3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışı

Nutrient Agar (NA): 20 g NA 1 litre saf su içerisinde homojenize edilmiştir. 121°C’de 15 dak otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan NA, katılaşmadan steril petrilere dökülüp, katılaşmaya bırakılmıştır.

Nutrient Broth (NB): 8 g NB, 1 litre saf su içerisinde homojenize edilmiştir. 121°C’de 15 dak otoklavda steril edilmiştir.

Patates Dekstroz Agar (PDA): 39 g PDA, 1 litre saf su içerisinde homojenize edilmiştir. 121°C’de 15 dak otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan PDA steril petrilere dökülüp, katılaşmaya bırakılmıştır.

Patates Dekstroz Broth (PDB): 24 g PDB, 1 litre saf su içerisinde homojenize edilmiştir. 121°C’de 15 dak otoklavda steril edilmiştir.

Trypton Soy Agar (TSA): 40 g TSA 1 litre saf su içerisinde homojenize edilmiştir. 121°C’de 15 dak otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan TSA steril petrilere dökülüp, katılaşmaya bırakılmıştır.

Czapek Dox Agar (CDA): 49 g CDA, 1 litre saf su içerisinde homojenize edilmiştir. 121°C’de 15 dak otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan CDA steril petrilere dökülüp, katılaşmaya bırakılmıştır.

Karboksimetilselüloz Agar (CMCA): Mandels ve Weber (1969) tarafından hazırlanan Mandel ortamı (MO) tarafımızdan modifiye edilerek kullanılmış ve CMCA olarak isimlendirilmiştir (Çizelge 3.2). Hazırlanan besiyeri 121°C’de 15 dak otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan CMCA katılaşmadan steril petrilere dökülüp, katılaşmaya bırakılmıştır.

Çizelge 3.2. Karboksimetilselüloz agarın içeriği (Mandels and Weber 1969)

İçerik	1000 ml için
Amonyum sülfat	1,4 g
Potasyum dihidrojen fosfat	2 g
Mangan sülfat	0,0016 g
Çinko sülfat	0,0014 g
Magnezyum sülfat	0,3 g
Demir sülfat	0,005 g
Kalsiyum klorür	0,3 g
Kobalt klorür	0,002 g
Karboksimetilselüloz (CMC)	1,5 g
Agar agar	20 g

Minimal Tuzlar Ortamı-Lignin (MSML): 121°C’de 15 dak otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan MSML katılaşmadan steril petrilere dökülüp, katılaşmaya bırakılmıştır. MSML’nin içeriği Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Minimal tuzlar ortamı-lignin besiyerinin içeriği

İçerik	1000 ml için
Potasyum dihidrojen fosfat	1 g
Dipotasyum hidrojen fosfat	1 g
Amonyum nitrat	1 g
Magnezyum sülfat heptahidrat	0,2 g
Kalsiyum klorür	0,2 g
Demir sülfat	0,01 g
Agar agar	15 g
Lignin	5 g

Selüloz Kongo Kırmızısı Agar (CCRA): 121°C’de 15 dak otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan CCRA katılaşmadan steril petrilere dökülüp, katılaşmaya bırakılmıştır. CCRA’nın içeriği Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Selüloz Kongo Kırmızısı Agarın İçeriği

İçerik	1000 ml için
Potasyum dihidrojen fosfat	0,5 g
Magnezyum sülfat	0,25 g
Karboksimetilselüloz (CMC)	2 g
Agar agar	15 g
Kongo kırmızısı	0,2 g
Jelatin	2 g

Asit Deterjanda Çözünmeyen Lif Çözeltisi (ADF Çözeltisi) : 40 g ANKOM FAD20C kodlu kimyasal saf su içerisinde 54,8 ml %97’lik sülfirik asit eklenerek manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiş ve toplam hacim 1900 ml’ye tamamlanmıştır (Kutlu 2008; Vansoset *et al.* 1991).

Nötral Deterjanda Çözünmeyen Lif Çözeltisi (NDF Çözeltisi): 120 g ANKOM FND20C kodlu kimyasal saf su içerisinde 20 ml etilen glikol ve 4 ml alfa amilaz eklenerek manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiş ve toplam hacim 1800 ml'ye tamamlanmıştır (Kutlu 2008; Vansoset *et al.* 1991).

0,1 N HCl Çözeltisi: 8,07 ml HCl saf su ile 1 l'ye tamamlanmıştır (Kutlu 2008).

%4'lük Borik Asit Çözeltisi: 40 g borik asit saf su ile 1 l'ye tamamlanmış ve ısıtılarak çözdürülmüştür. Üzerine renk vermesi için 3 ml bromekroset green mavi + metil kırmızısı çözeltisi eklenmiştir (Kutlu 2008).

Bromokresol Green Mavi + Metil Kırmızısı Çözeltisi: 0,2 g metil kırmızısı 100 ml alkolde çözdürülmüştür. 1 g bromokresol green 500 ml alkolde çözdürülmüş ve bu iki solüsyon karıştırılmıştır (Kutlu 2008).

%3'lük Potasyum Hidroksit (KOH) Çözeltisi: 3 g KOH 100 ml steril saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Kristal Violet Çözeltisi: 0,5 g kristal violet 100 ml steril saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Safranin Çözeltisi: 0,25 g safranin 100 ml steril saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan izolasyon kaynakları ve saman örnekleri

İzolasyon kaynağı olarak Erzurum Ovası Çayırca Köyü'ndeki eski ahır ve merelerden temin edilen çürük saman, çürümekte olan dam örtüsü odunları ve talaş kullanılmıştır.

İnokülasyon için kullanılan arpa ve buğday samanları ise aynı köyden hasat mevsiminde alınmıştır.

3.1.5. Çalışmada inokulant olarak kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada 2 farklı bakteri türü ve 3 farklı mikrofungus türü kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan Ss kodlu *Streptomyces setonii* B-2555 türü ARS adlı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. E7 kodlu bakteri ve Yk, Mu, X kodlu mikrofunguslar kendi izolatlarımız olup 3.2.1’de belirtilen yöntemle çürümüş saman, odun ve talaş örneklerinden izole edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu ve saflaştırılması

Erzurum Çayırca Köyü’ndeki ahır ve merelerden toplanan çürümüş odun, çürümüş saman ve talaş karışımından bakteriler için NB’ye, mikrofunguslar için PDB’ye ekim yapılarak oda sıcaklığındaki çalkalamalı inkübatörde iki gün inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra selülitik mikroorganizmaların izolasyonu için karbon kaynağı olarak sadece karboksimetil selüloz içeren CMCA’ya yayma ekim yapılmıştır. 30°C’de 4 günlük inkübasyon süresi sonunda gelişen koloniler incelenerek belirgin morfolojik karakterlerine göre seçildikten sonra bakteriler NA’ya, küfler ise PDA’ya ekim yapılarak saflaştırılmıştır. Selülitik izolatların ligninolitik özelliklerinin belirlenmesi için karbon kaynağı olarak sadece lignin bulunan MSML’ye ekim yapılmıştır. 30°C’de 4 günlük inkübasyon süresi sonunda MSML’de üreyen selülitik izolatlar lignini de metabolize edebilme yeteneklerinden dolayı aynı zamanda lignoselülitik mikroorganizmalar olarak belirlenmişlerdir. 3.1.5’de belirtildiği üzere her birine ayrı bir kod numarası verilmiş, gliserinli ortamda ve yatık agarda stok kültürler halinde saklanmıştır.

3.2.2. İzolatların selüloolitik aktivitelerinin belirlenmesi

Selüloolitik mikroorganizmalar arasından en yüksek performansa sahip olanların seçimi için NA'da gelişen 24 saatlik kültürlerden alınan bakteriler CCRA'ya dört fazlı çizgi ekim metoduyla, PDA'da gelişen 48 saatlik kültürlerden alınan küfler ise CCRA'nın orta kısmına tek bir nokta halinde değdirilmek suretiyle inoküle edilmiş ve 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kolonilerin etrafında meydana gelen zonlar karşılaştırılarak selüloolitik aktivitesi en yüksek olan türler seçilmiştir.

3.2.3. İzolatların ligninolitik aktivitelerinin belirlenmesi

Ligninolitik mikroorganizmalar arasında en yüksek performansa sahip olanların seçimi için NA'da gelişen 24 saatlik kültürlerden alınan bakteriler ile PDA'da gelişen 48 saatlik kültürlerden alınan küfler MSML'ye inoküle edilmiş ve 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bakteriler tek koloni düşecek şekilde çizgi ekim yapılarak, küfler ise tek nokta halinde değdirilmek suretiyle inoküle edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kolonilerin geliştiği alanlarda meydana gelen renk açılımı karşılaştırılarak ligninolitik aktivitesi en yüksek olan türler seçilmiştir.

3.2.4. Etkili izolatların morfolojik, sitolojik ve fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi

Yapılan çalışmalar sonucunda lignoselülotik oldukları belirlenen bakterilerin tanısı için bazı biyokimyasal testler yapılmıştır.

3.2.4.a. Kültürel testler

Koloni morfolojisi: Saflaştırılan bakteri kültürlerinin her birinden alınan örnekler, çizgi ekimle tek koloni düşecek şekilde NA besiyerine transfer edilmiş ve 25°C'de 24-48 saat

süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen kolonilerin şekilleri ve renkleri incelenmiştir (Saygılı 1995).

Hücre morfolojisi: Stoklardan alınan saf bakteri izolatlarının 24 saatlik genç kültürleri geliştirilmiş ve bu kültürlerden preparatlar hazırlanmıştır. Gram boyama yöntemleri ile boyanan preparatlar incelenerek bakterilerin gram özelliğine ve hücre şekillerine bakılmıştır (Saygılı 1995).

Ayrıca %3'lük KOH çözeltisi kullanılarak yine bakterilerin gram özelliğine bakılmıştır.

Endospor testi: Stoklardan alınan saf bakteri strainleri, çizgi ekimle tek koloni düşecek şekilde NA besiyerine aktarıldıktan sonra 55-60°C'de 24-48 saat süreyle üremeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu gelişen kolonilerden preparat hazırlanmış, 20 kez alevden geçirildikten sonra üzerleri tamamen boyayla kaplanacak şekilde malaşit yeşiliyle boyanmış ve 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Saf su ile 10 sn muamele edildikten sonra, safranin ile preparatın yüzeyi kaplanmış ve 15 sn beklenmiştir. Boyanın fazlası su ile muamele edilerek atıldıktan sonra preparat kurutulmuş ve mikroskopta immersiyon merceği ile incelenmiştir (Temiz 1996).

Katalaz testi: 24-48 saatlik genç bakteri kültürlerinin her birinden bir öze dolusu alınarak lam üzerine konulmuş ve üzerlerine bir damla H₂O₂ damlatılmıştır. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif, oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Klement *et al.* 1990).

3.2.4.b. Moleküler metotlar

MIS (Microbial Identification System) analizi: Kültür ortamında (standart suni besiyerlerinde) çoğalabilen mikroorganizmaların gerek tanısı gerekse taksonomik yerlerinin belirlenmesi için, yağ asitleri profillerinin kullanılabileceği, birçok bilimsel çalışma ile kanıtlanmıştır (Wayne Moss *et al.* 1973; Roy 1988; Vauterin *et al.* 1996).

Lignoselülolitik bakımdan etkili bakterilerin MIS analizi aşağıdaki protokole göre yapılmıştır:

Hücre kültürlerinin hazırlanması: İstenilen özelliklere uygun olarak izole edilip saflaştırılan bakteriler, tanısı yapılmak üzere kodlanarak, nutrient agar (NA) besiyeri içeren petrilerde muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu bakterilerin yağ asiti profillerinin belirlenmesi için, tripton soy agar (TSA) besiyeri hazırlanmıştır. Tanısı yapılacak bakteri türlerinin daha önce saflaştırılmış olan kültürlerinden (tek bir koloniden) steril platin öze ile alınan örnekler; ayrı ayrı TSA besiyerlerine transfer edilerek 4 fazlı çizgi ekim yapılmıştır. Petriler silinmeyecek şekilde etiketlendikten sonra 28°C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Yağ asiti ekstraksiyonu için gerekli çözeltilerin hazırlanışı: Mikroorganizmaların yağ asitlerini saf olarak izole etmek için 4 farklı çözelti kullanılmıştır:

Çözelti 1: Hücre parçalayıcı: Sırasıyla 150 ml metil alkol (HPCL saflığında) ve 150 ml dH₂O, 1 l’lik renkli çözelti şişesine konulmuş, daha sonra katı formdaki 45 g sodyum hidroksit (ACS saflığında) bu çözeltiliye eklenip iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır.

Çözelti 2: Metilleştirme: Sırasıyla 325 ml hidroklorik asit (6,00N) ve 255 ml metil alkol (HPCL saflığında), 1 l’lik renkli çözelti şişesinde iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır.

Çözelti 3: Saflaştırma: Sırasıyla 200 ml metil-tert-butil eter (MTBE-HPCL saflığında) 200 ml hekzan üzerine ilave edilerek 1 l’lik renkli çözelti şişesinde iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır.

Çözelti 4: Bazik yıkama çözeltisi: Sırasıyla 10,8 g katı sodyum hidroksit (ACS saflığında) 900 ml dH₂O içerisinde, 1 l’lik renkli çözelti şişesinde iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır.

Yöntem:

1. TSA besiyerinde 25°C’de 24 saat inkübasyon sürecini takiben gelişen bakterilerin, 3 ve 4 numaralı fazlarından, canlı bakteri hücreleri steril bir öze ile toplanarak (yaklaşık 40 mg) ağızları teflon kapaklı steril test tüplerine (5 ml’lik) aktarılmış ve kapakları kapatılarak üzerleri etiketlenmiştir.
2. Her bir test tüpüne 1ml çözelti 1 ilave edilerek, 5-10 saniye çalkalandıktan sonra 5 dak süreyle 100°C’lik su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan tüpler tekrar 5-10 saniye çalkalanarak 25 dak süreyle 100°C’lik su banyosunda beklemeye bırakılmıştır. Bu muamele ile canlı hücreler parçalanarak, yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır.
3. Test tüplerine 2 ml çözelti 2 eklenerek 5-10 saniyelik bir çalkalamadan sonra 80°C’de 10 dak su banyosunda bekletilmiş ve bunu takiben 2 dak süreyle hızlı soğutma uygulanmıştır (-80°C’de 5dk kadar).
4. Soğutulmuş tüplere 1,25 ml çözelti 3 eklenerek 10 dak süreyle hematoloji çalkalayısında çalkalanmıştır. Bu aşamada tüplerin alt kısmında asidik, üst kısmında da organik sıvı fazları olmak üzere iki ayrı faz oluşmuştur. Tüplerin üst kısmındaki asidik faz pastör pipeti yardımıyla atılmış, organik faz muhafaza edilmiştir.
5. En son aşamada ise her bir tüpe 3 ml çözelti 4 ilave edilmiş ve 5 dak süreyle hematoloji çalkalayısında çalkalandıktan sonra 10 dak süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çözelti 4, bazik bir solüsyon olup serbest yağ asidi metil esterlerinin daha saf olarak elde edilmesine yardımcı olmaktadır. Tüp içerisinde yine iki ayrı faz oluşmuştur. Üst fazda toplanan ve yağ asidi metil esterleri içeren faz, pastör pipeti ile alınarak 2 ml’lik gaz kromatografi tüplerine transfer edilmiş ve ağızları sıkıca kapatılarak etiketlenmiştir.

6. Ağızları sıkıca kapatılarak etiketlenen gaz kromatografi tüpleri, MIS cihazı üzerindeki örnek depolama tepsisine göre yerleştirildikten sonra, cihaz çalıştırılarak sistem kılavuzunda belirtildiği gibi örnekler tek tek analiz edilmiş ve her bakteri için ayrı ayrı olmak üzere tanı sonuçları, bilgisayardan çıktı olarak alınmıştır (Stead 1992; Küfrevioğlu vd 1999).

3.2.5. İnokulum materyalinin hazırlanması

3.2.6'da belirtildiği gibi katı hal fermentasyonuna hazır hale getirilen samanlara inokule edilecek olan bakteriler oda sıcaklığında NB'de 20 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hazırlanan sıvı kültür, steril santrifüj tüplerine 50 ml olacak şekilde aktarılıp 4°C'de 5000 rpm'de 10 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılıp tüplere toplam hacim 50 ml olacak şekilde önceden hazırlanmış steril fizyolojik su eklenip vortekste homojenize edilmiştir. Daha sonra spektrofotometre küvetlerine her bir örnekten 3 ml olacak şekilde eklenip 600 nm'de absorbans değerlerine bakılmıştır. 600 nm'de 0,6 civarında absorbans değeri veren örnekler inokulum materyali olarak kullanılmıştır. Numunelerin 0,6 civarında absorbans değeri vermesi samanlara inokule edilecek aşı materyalinin eşit olması bakımından önem arz etmektedir. Küfler ise 30°C'de, 48 saat PDA'da geliştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında ml'sinde 10^7 adet spor bulunan spor süspansiyonu hazırlanmıştır. Spor süspansiyonundan 45 ml steril fizyolojik su bulunan santrifüj tüplerine 5 ml eklenmiş ve hazırlanan 50 ml'lik örnekler inokulum materyali olarak kullanılmıştır.

3.2.5.a. Spor süspansiyonunun hazırlanması

50 ml saf su, içerisine binde bir oranında Tween 80 ilave edilerek 121°C'de 15 dak otoklavda steril edilmiştir. Spor oluşumu gözlenen 24-168 saatlik kültürlerden öze dolusu inokule edilerek homojenize edilmiştir. Hazırlanan spor süspansiyonundan temiz bir thoma lamına örnek alınarak mikroskopta spor sayımı yapılmıştır. .

3.2.6. Katı hal fermentasyonu

Öncelikle arpa, buğday ve arpa-buğday karışımı samanlardan 30 g tartılarak plastik poşetlere (ARGEM fırın torbası) konulmuştur. Kontrol grubu olarak inokulum ve CSL içermeyen samanlar ile sadece CSL içeren samanlar kullanılmıştır. Deney grupları ise CSL katılmış ve katılmamış saman örneklerine mikroorganizma inokulasyonu ile oluşturulmuştur. Poşetlerin içerisine %60'lık nem oranı oluşturacak şekilde 60 ml'lik distile su ilave edilmiştir. Hem distile suyun hem de CSL'nin saman içerisine homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Daha sonra ağızları kapatılan saman örnekleri otoklavda 121°C'de 1,5 atm basınçta 20 dak steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra soğuyan saman poşetlerine 3.2.5'de hazırlanışı anlatılan aşı materyalleri inoküle edilerek ağızları sıkıca kapatılmış ve üzerlerine ağırlık konulmuştur. Bakterilerin inoküle edildiği saman poşetleri 30 günlük, küflerin inoküle edildiği saman poşetleri ise 20 günlük inkübasyona bırakılmıştır. Fermentasyona bırakılan saman örnekleri Şekil 3.1'de; kısa adları ve içerikleri ise Çizelge 3.5, 3.6, ve 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Fermentasyona bırakılan saman örnekleri

Çizelge 3.5. Kontrol ve deney grubu arpa samanı örnekleri

Kodu	Su (ml)	CSL (ml)	Saman çeşidi	Aşı materyali
A (kontrol)	60	-	Arpa	-
ACSL (kontrol)	58,5	1,5	Arpa	-
AYk	60	-	Arpa	Yk
ACSLYk	58,5	1,5	Arpa	Yk
AMu	60	-	Arpa	Mu
ACSLMu	58,5	1,5	Arpa	Mu
ASs	60	-	Arpa	Ss
ACSLSs	58,5	1,5	Arpa	Ss
AE7	60	-	Arpa	E7
ACSLE7	58,5	1,5	Arpa	E7
AX	60	-	Arpa	X
ACSLX	58,5	1,5	Arpa	X

Çizelge 3.6. Kontrol ve deney grubu buğday samanı örnekleri

Kodu	Su (ml)	CSL (ml)	Saman çeşidi	Aşı materyali
B (kontrol)	60	-	Buğday	-
BCSL (kontrol)	58,5	1,5	Buğday	-
BYk	60	-	Buğday	Yk
BCSLYk	58,5	1,5	Buğday	Yk
BMu	60	-	Buğday	Mu
BCSLMu	58,5	1,5	Buğday	Mu
BSs	60	-	Buğday	Ss
BCSLSs	58,5	1,5	Buğday	Ss
BE7	60	-	Buğday	E7
BCSLE7	58,5	1,5	Buğday	E7
BX	60	-	Buğday	X
BCSLX	58,5	1,5	Buğday	X

Çizelge 3.7. Kontrol ve deney grubu arpa-buğday samanı örnekleri

Kodu	Su (ml)	CSL (ml)	Saman çeşidi	Aşı materyali
AB (kontrol)	60	-	Arpa-Buğday	-
ABCSL (kontrol)	58,5	1,5	Arpa-Buğday	-
ABYk	60	-	Arpa-Buğday	Yk
ABCSLYk	58,5	1,5	Arpa-Buğday	Yk
ABMu	60	-	Arpa-Buğday	Mu
ABCSLMu	58,5	1,5	Arpa-Buğday	Mu
ABSs	60	-	Arpa-Buğday	Ss
ABCSLSs	58,5	1,5	Arpa-Buğday	Ss
ABE7	60	-	Arpa-Buğday	E7
ABCSLE7	58,5	1,5	Arpa-Buğday	E7
ABX	60	-	Arpa-Buğday	X
ABCSLX	58,5	1,5	Arpa-Buğday	X

3.2.7. İnkübasyon sonunda elde edilen üründe yapılan analizler

3.2.7.a. Kuru Madde (KM) analizi

Kurutma kapları temizlenmiş ve etüvde 1 saat kurutulmuştur. 1 saat sonunda kaplar maşa ile desikatöre alınmıştır. 10-15 dak sonra desikatördeki kapların daraları alınmıştır. Darası alınan kaplara analizi yapılacak saman örneğinden 1,5-2 g konulup, tartılmıştır. Samanla birlikte tartılan kurutma kapları 105°C'ye ayarlanmış etüve konmuş ve bu sıcaklıkta bir gece tutulmuştur. Kurutma süresi sonunda kaplar maşa ile desikatöre alınmış ve oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra tartılmıştır (Kutlu 2008).

3.2.7.b. Ham Kül (HK) analizi

Önceden yakılmış, desikatörde soğutulmuş ve darası alınmış krozelere saman numunesinden 1,5-2 g konularak tartılmıştır. Krozeler 550°C'ye ayarlı yakma fırınına konulmuştur. Krozeler bu sıcaklıkta kömürleşme olmayacak şekilde, kül açık griden beyaza kadar değişen bir renge ulaşana kadar yakma fırınında tutulmuştur. Yakma

sonunda fırının elektriği kesilerek soğumaya bırakılmıştır. Yaklaşık 100°C'ye kadar soğutulduktan sonra krozeler maşa yardımıyla doğrudan desikatöre alınmıştır. Krozeler desikatörde yeterince soğutulduktan sonra tartılmıştır (Kutlu 2008).

3.2.7.c. Ham Protein (HP) Analizi

İlk olarak ham protein tüplerinin her birine yaklaşık 1 gr saman örneği konulup üzerlerine 1 adet katalizör tableti [950 g potasyum sülfat (K_2SO_4)+50 g bakır sülfat ($CuSO_4$)] katılmıştır. Daha sonra bu örneklerin üzerine 25 ml sülfirik asit (%95-97) ilave edilmiş ve tüpler ham protein cihazına yerleştirilmiştir. 430°C'de çalıştırılan cihaz tüplerin içerisindeki örnekler şeffaf sarımsı renge dönüştüğünde kapatılmıştır ve örnekler soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan örneklerin üzerine dikkatli bir şekilde 50 ml saf su ilave edilmiştir (Kutlu 2008).

Üzerlerine soğuk saf su dökülen örnekler iyice soğuduktan sonra distilasyon aşamasına geçilmiştir. Her bir örnek önceden hazırlanmış 25 ml'lik %4'lük borik asit çözeltisiyle beraber cihaza yerleştirilmiş ve distilasyon işlemi başlatılmıştır. Örnek içerisindeki amonyum sülfat sodyum hidroksitle (NaOH) muamele edilerek amonyak (NH_3) oluşturulmuş ve takibinde amonyak borik asit tarafından tutularak amonyum borata ($(NH_4) BO_3$) dönüştürülmüştür (Kutlu 2008).

Distilasyon aşamasından sonra ise titrasyon aşamasına geçilmiştir. Distilasyon sonucu oluşan mavi renk kırmızılaşınca kadar azar azar HCl damlatılmış ve harcanan HCl miktarı örnekler içerisindeki ham protein ve toplam nitrojen değerlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Kutlu 2008).

3.2.7.d. Asit Deterjanda Çözünmeyen Lif (ADF) Analizi

Vansoset *et al.* (1991) metodundan modifiye edilmiş ADF analizinde toz haline getirilen samanlar yaklaşık 0,5 g tartılıp darası alınmış ADF torbalarına (ANKOM F57

filter bags) konulmuş ve ağızları sıkıca yapıştırılmıştır. Hazırlanan örnekler cihaz aparatına uygun bir şekilde yerleştirilmiş ve ADF çözeltisi eklenerek cihaz 60 dak boyunca çalıştırılmıştır. Daha sonra kaynamış saf su eklenerek 10 dak karıştırılmıştır. En son ise soğuk su ilave edilerek 5 dk karıştırılmıştır (Kutlu 2008).

Cihazdan çıkarılıp süzülen numuneler 1-2 dak boyunca aseton içerisinde bekletilip süzülmüştür. Boş bir alana serilen örnekler 5 dak sonra 105°C'lik etüvde bir gece bekletilmiş ve soğutma işlemi sonrası hassas terazide tartımları yapılmıştır (Kutlu 2008).

3.2.7.e. Nötral Deterjanda Çözünmeyen Lif (NDF) Analizi

Vansoset *et al.* (1991) metodundan modifiye edilmiş NDF analizinde ADF analizindeki gibi hazırlanan torbalar cihaz aparatına yerleştirilip cihaz 75 dak boyunca çalıştırılmıştır. Daha sonra kaynamış saf su ile 4 ml alfa amilaz eklenip 15dk karıştırılmıştır. Son olarak da soğuk su ilave edilip 5 dak karıştırılmıştır ve ADF analizindeki işlemler NDF analizi için de uygulanmıştır (Kutlu 2008).

3.2.7.f. Asit Deterjan Lignin (ADL) Analizi

Saman numunelerinin ADL içeriği, ADF analizinde kullanılan örnekler üzerinden yapılan analizler aracılığı ile belirlenmiştir. Bu amaçla ADF sonrası torbalar %72'lik sülfürik asit içerisinde 30 dak süre ile çalkalanmıştır. Daha sonra bu numuneler %72'lik sülfürik asit içerisinde 3 saat boyunca bekletilmiştir. Bekleme sonrasında torbalar çeşme suyu ile pH nötr oluncaya kadar yıkanmıştır. Torbalar, suları süzdürüldükten sonra 250 ml aseton içerisinde 3 dak bekletildikten sonra 105°C'lik etüvde bir gece kurutulmuştur. Soğutma işlemi sonrası hassas terazide tartımları yapılmıştır.

Çalışmada ADF, NDF ve ADL içerikleri belirlendikten sonra yem örneklerinin hemiselüloz, selüloz ve lignin miktarları aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

Hemiselüloz, %=NDF-ADF

Selüloz, %=ADF-ADL

Lignin, %=ADL

Ayrıca tüm parametreler için her örnekten üç tekerrür yapılmış olup selüloz, hemiselüloz, ADF, NDF ve ADL analiz değerleri belirlenirken sonuçların ortalaması Duncan çoklu karşılaştırma SPSS15 (2013) programıyla yapılmıştır.

3.2.7.g. Kuru madde sindirilebilirliği (KMS), kuru madde tüketilebilirliği (KMT) ve nispi yem değerlerinin (NYD) belirlenmesi

Nispi yem değeri Van Dyke ve Anderson (2000) tarafından geliştirilen aşağıdaki eşitlikler ile saptanmıştır. Nispi yem değerini hesaplamak için öncelikle kuru madde sindirimi ADF değeri üzerinden hesaplanmıştır (Kaya 2008).

$$\%KMS=88,9-(0,779\times\%ADF)$$

Hayvanın canlı ağırlığına bağlı olarak kuru madde tüketimi NDF değeri üzerinden hesaplanmıştır.

$$\%KMT=120/NDF$$

Nispi yem değerini hesaplamak için %KMS ve %KMT değerleri formülde yerine konularak hesaplanmıştır.

$$NYD=\%KMS\times\%KMT\times0,775$$

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Potansiyel Etkili İzolatlar

Çalışmamızda toplam 36 mikroorganizma lignoselüloolitik özellikleri bakımından incelenmiştir. Bu mikroorganizmalardan 4'ü bakteri, 1'i mikrofungus olmak üzere 5 tanesi ARS kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Geriye kalan 25'i bakteri, 6'sı mikrofungus 31 mikroorganizma ise kendi izolatlarımızdır. İzolasyon işlemi sonunda 29 bakteri, 7 mikrofungus türünün karbon kaynağı olarak sadece karboksimetil selülozun bulunduğu CMCA'da geliştiği gözlemlenmiş ve bu mikroorganizmalar selüloolitik olarak kabul edilmiştir. Bu 36 mikroorganizma daha sonra karbon kaynağı olarak sadece ligninin bulunduğu MSML'ye inokule edilmiş ve bu ortamda gelişen türler ligninolitik mikroorganizmalar olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 2'si ARS kültür koleksiyonundan temin edilmiş 9 bakteri ve 5 mikrofungus türü hem CMCA'da hem de MSML'de gelişmiş potansiyel etkili izolatlar olarak belirlenmiştir.

4.2. İzolatların Lignoselüloolitik Aktiviteleri

4.1'de potansiyel etkili izolatlar olarak belirlenmiş 14 mikroorganizma, selüloolitik ve ligninolitik aktiviteleri ayrı ayrı belirlenmek üzere 4.2.1 ve 4.2.2'de anlatıldığı üzere iki farklı besiyerine ekim yapılmış ve etkili türler inokulum materyali olarak değerlendirilmiştir.

4.2.1. İzolatların selüloolitik aktiviteleri

4.1'de anlatıldığı üzere seçilen 14 mikroorganizma, selüloolitik aktivitelerinin karşılaştırılması için CCRA'a inokule edilmiştir. CCRA'a ekimi yapılan izolatların besiyerinde meydana getirdikleri renk açılımı ve zon oluşumu karşılaştırılarak selülozu degrade etme potansiyeli en yüksek olan türler seçilmiştir. En yüksek performansa sahip olan mikroorganizmalar ARS kültür koleksiyonundan temin edilen Ss (*Streptomyces*

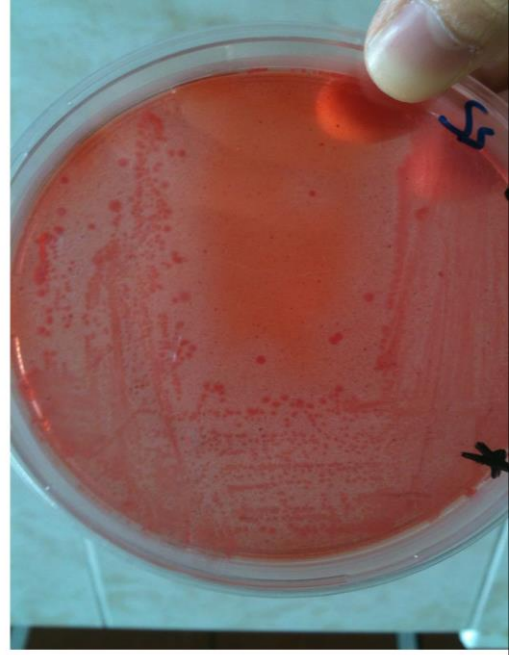
setonii B-2555) kodlu bakteri ve kendi izolatımız olan E7 kodlu bakteri ile Yk, X, Mu kodlu küfler olarak belirlenmiş ve kontrol numune ile birlikte bazıları Şekil 4.1 ve 4.2’de gösterilmiştir.

4.2.2. İzolatların ligninolitik aktiviteleri

4.1’de anlatıldığı üzere seçilen 14 mikroorganizma, ligninolitik aktivitelerinin karşılaştırılması için MSML’ye ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinde meydana gelen renk açılımı karşılaştırılarak ligninolitik potansiyeli en yüksek olanlar seçilmiştir. En yüksek performansa sahip olan türler ARS kültür koleksiyonundan temin edilen Ss kodlu bakteri ile kendi izolatımız olan X kodlu küf olarak belirlenmiş ve kontrolle birlikte Şekil 4.3 ve 4.4’de gösterilmiştir. E7 kodlu bakteri ile Yk ve Mu kodlu küfler ise Ss ve X türlerine oranla daha az renk açılımı meydana getirmişlerdir. Sonuç olarak lignoselüloolitik potansiyelleri belirlenen 2 bakteri ve 3 mikrofungus türü 3.2.4’de anlatıldığı şekilde aşı materyali olarak kullanılmıştır.



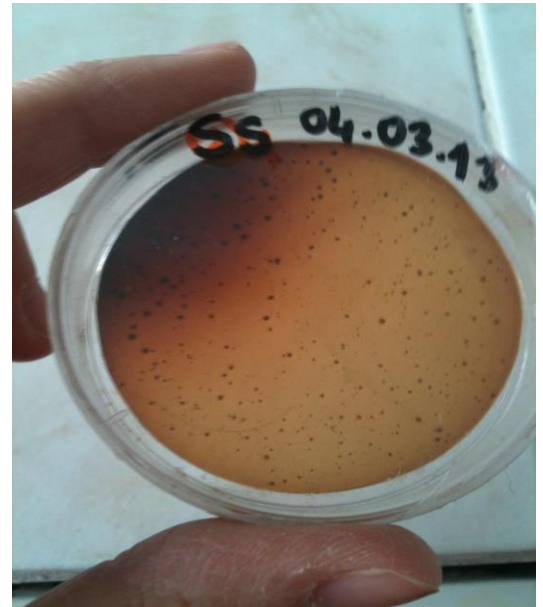
Şekil 4.1. Ekim yapılmamış selüloz kongo kırmızısı agar (kontrol)



Şekil 4.2. Ss'nin selüloz kongo kırmızısı agarda meydana getirdiği renk açılımı



Şekil 4.3. Ekim yapılmamış minimal tuzlar ortamı-lignin (kontrol)



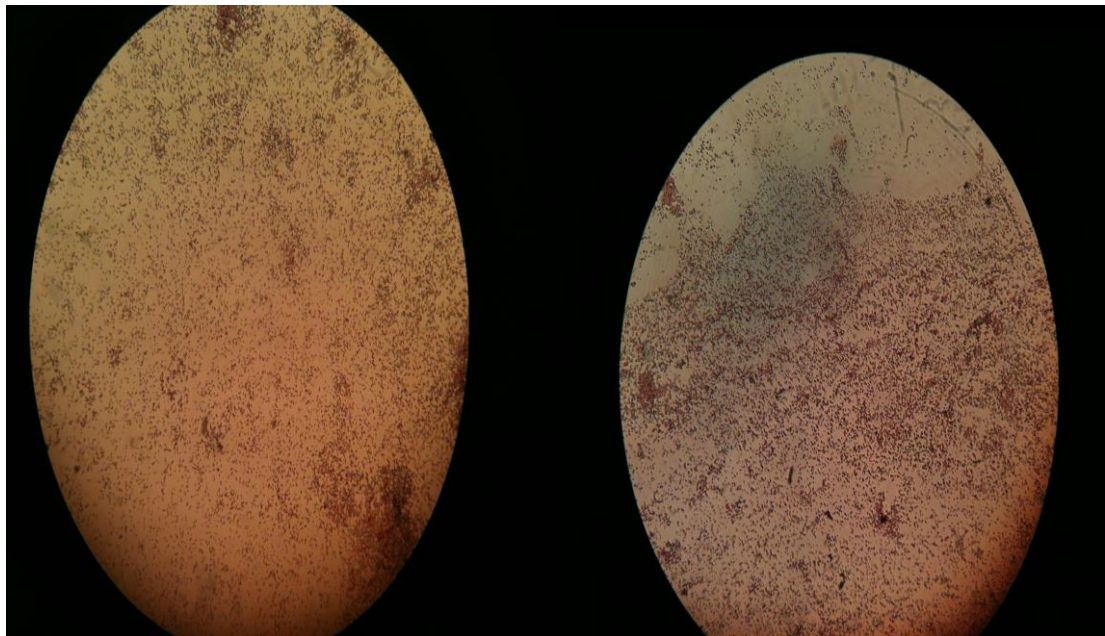
Şekil 4.4. Ss'nin minimal tuzlar ortamı-ligninde meydana getirdiği renk açılımı

4.3. Etkili İzolatların Bazı Morfolojik, Sitolojik ve Fizyolojik Özellikleri

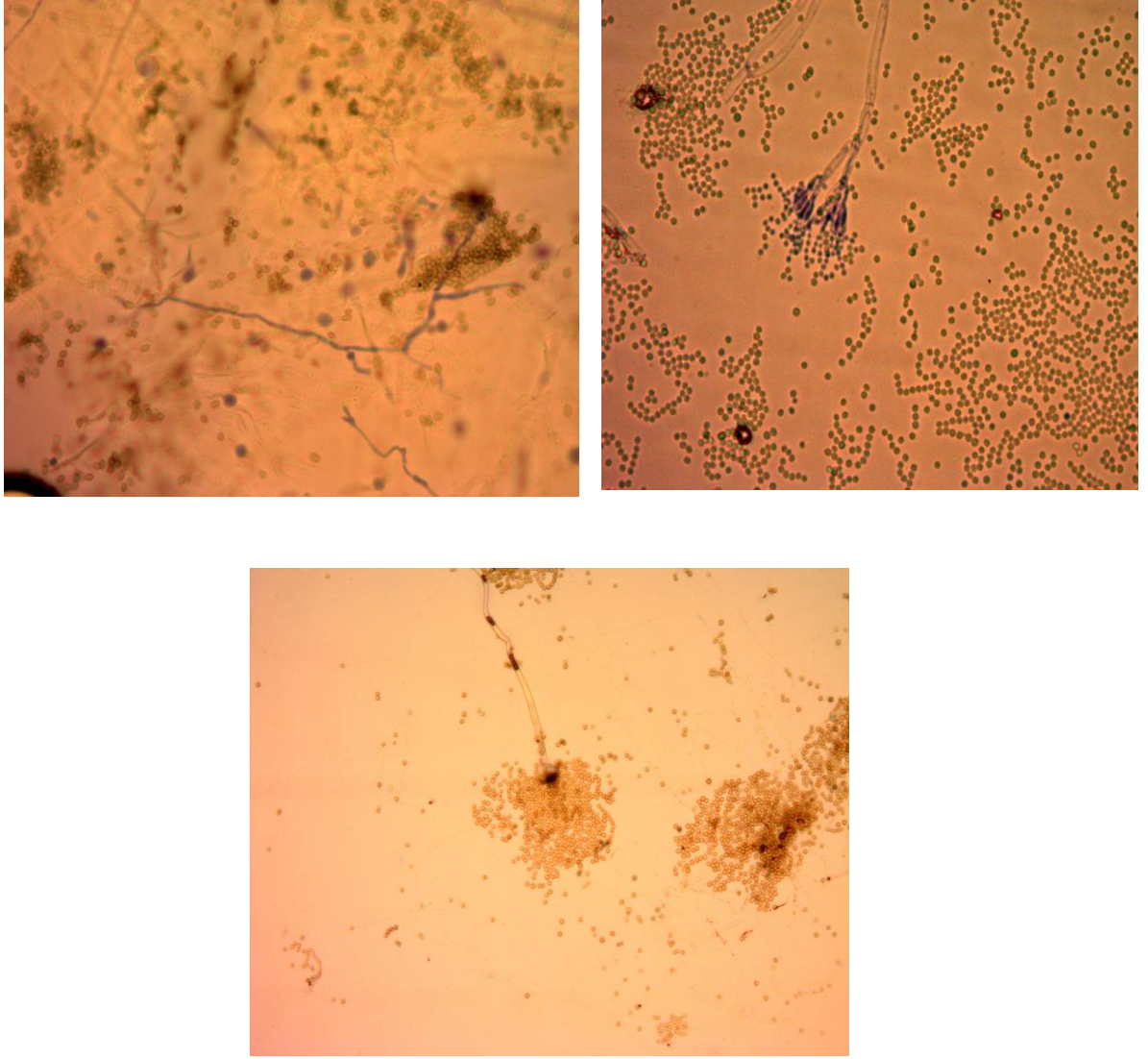
Potansiyel etkili bakterilerin bazı morfolojik, sitolojik ve fizyolojik özellikleri Çizelge 4.1 ve Şekil 4.5’de, mikrofungusların mikroskopik görüntüleri ise Şekil 4.6’da gösterilmiştir. MIS analizi sonuçlarına göre, etkili izolatlardan E7 kodlu bakterinin yağ asiti profili Çizelge 4.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Etkili bakterilerin bazı morfolojik, sitolojik ve fizyolojik özellikleri

Özellikler	Ss	E7
Koloni morfolojisi	Besiyerine gömülü	Mukoid
Hücre morfolojisi	Zincir şeklinde	Çubuk şeklinde
Gram özelliği	+	-
Endospor	-	-
Katalaz	+	+



Şekil 4.5. Çalışmada kullanılan bakterilerin mikroskopik görüntüleri (Solda *Streptomyces setonii*, sağda *Pseudomonas putida*)



Şekil 4.6. Katı hal fermentasyonunda kullanılan mikrofungusların mikroskopik görüntüleri (*Trichoderma harzianum*, *Penicillium* sp. ve *Aspergillus* sp.)

MIS analiz sonucuna göre E7 kodlu izolatın *Pseudomonas putida* olduğu belirlenmiştir ve bu türün yağ asidi profili Çizelge 4.2’de özetlenmiştir. Yk, Mu, X kodlu mikrofunguslar ise sırasıyla *Trichoderma harzianum*, *Penicillium* sp. ve *Aspergillus* sp. olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.2. Potansiyel etkili E7 kodlu bakterinin MIS sistemine göre içerdiği yağ asiti çeşitleri ve bulunma oranları

YAĞ ASİTLERİ	E7
10:0	0.47
10:0 3OH	6.27
12:0	2.22
12:0 2OH	4.83
12:1 3OH	0.68
12:0 3OH	3.64
14:0	0.72
16:1 w7c/15 ISO 2OH	34.50
16:0	28.81
17:0 CYCLO	4.46
18:1 w7c	13.39
15:0 ISO 2OH/16:1w7c	34.50

Pseudomonas putida olarak tanımlanan E7 suşu 10:0; 10:0 3OH; 12:0; 12:0 2OH; 12:1 3OH; 12:0 3OH; 14:0; 16:1 w7c/15 ISO 2OH; 16:0; 17:0 CYCLO; 18:1 w7c; 15:0 ISO 2OH/16:1w7c yağ asitlerini içermektedir (Çizelge 4.2).

4.4. Mikroorganizmalarla Enfekte Edilmiş Samanlarda İnkübasyon Sonrası Oluşan Morfolojik Değişiklikler

Saman örneklerinin lignoselülitik küflerle 20 günlük, bakterilerle 30 günlük katı hal fermentasyonu süreci sonunda deney gruplarında özellikle küf örneklerinin gözle görülebilir şekilde değişiklik meydana getirdiği, bakteriler ile aşılınmış saman torbalarında ise köpük oluşumu ve koku değişimi tespit edilmiştir. Saman poşetlerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



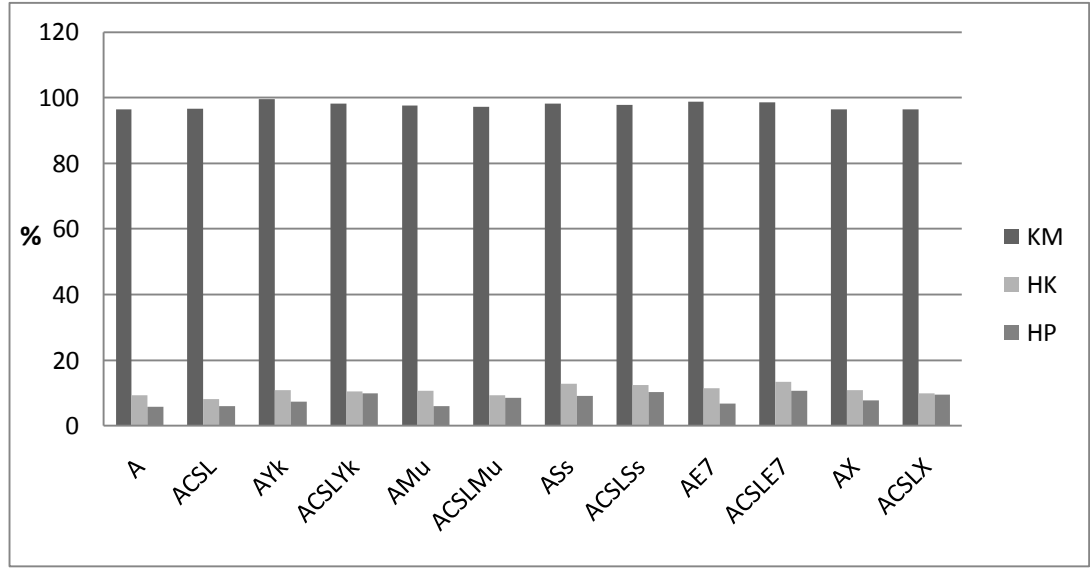
Şekil 4.7. Katı hal fermentasyonu aşamasında kontrol ve deney gruplarına ait örnekler

4.5. İnkübasyon Sonunda Elde Edilen Üründe Yapılan Analiz Sonuçları

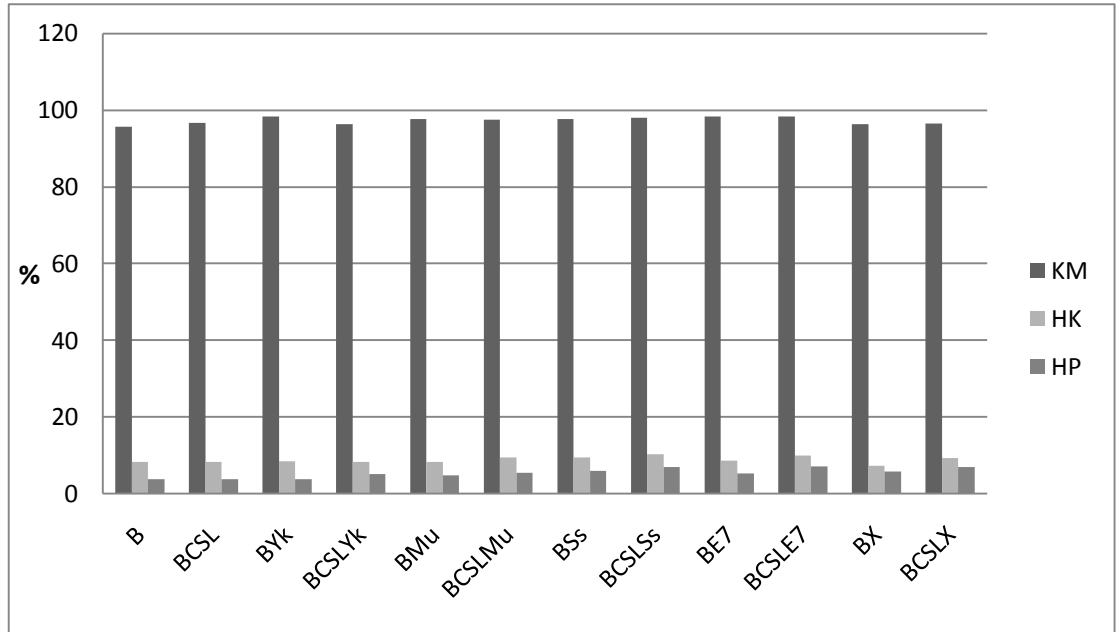
İnkübasyon süresi sonunda saman örneklerinin yem değerlerini belirlemek üzere kuru madde (KM), ham kül (HK), ham protein (HP), asit deterjanda çözünmeyen lif (ADF), nötral deterjanda çözünmeyen lif (NDF), lignin (ADL) analizleri yapılarak selüloz, hemiselüloz, kuru madde sindirilebilirliği (KMS), kuru madde tüketilebilirliği (KMT), nispi yem değeri (NYD), yem kalitesi (YK) değerleri hesaplanmış ve sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

4.5.1. Kuru madde, ham kül ve ham protein analiz sonuçları

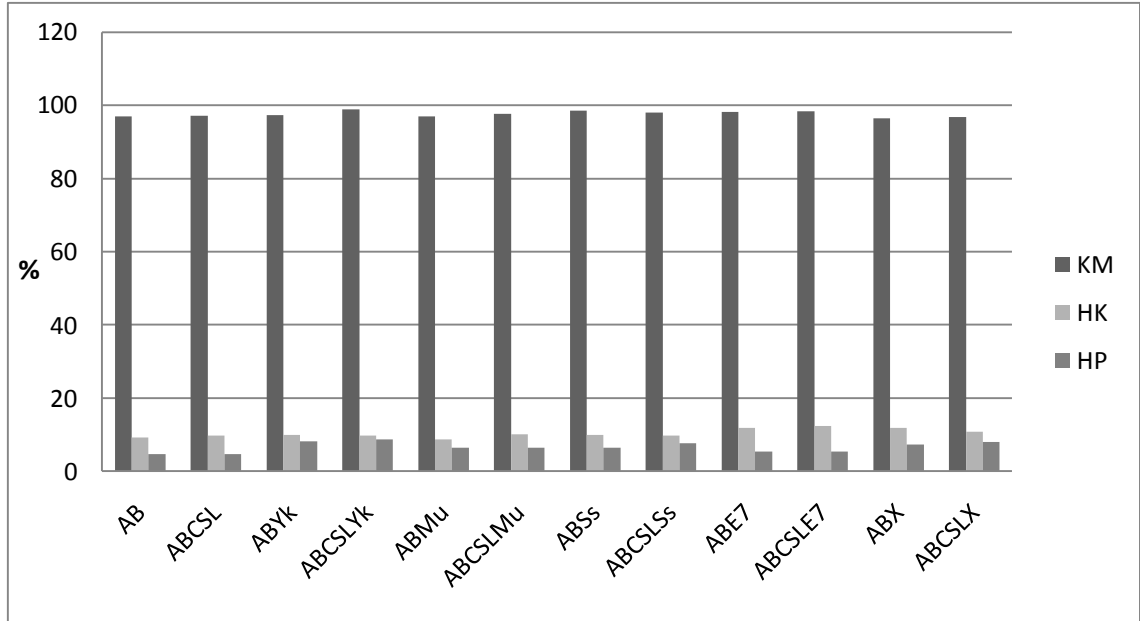
Arpa, buğday, arpa-buğday samanlarında yapılan KM, HK ve HP analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.8, 4.9 ve 4.10’da verilmiştir.



Şekil 4.8. Arpa samanının kontrol ve deney gruplarında KM, HK ve HP analiz sonuçları



Şekil 4.9. Buğday samanının kontrol ve deney gruplarında KM, HK ve HP analiz sonuçları



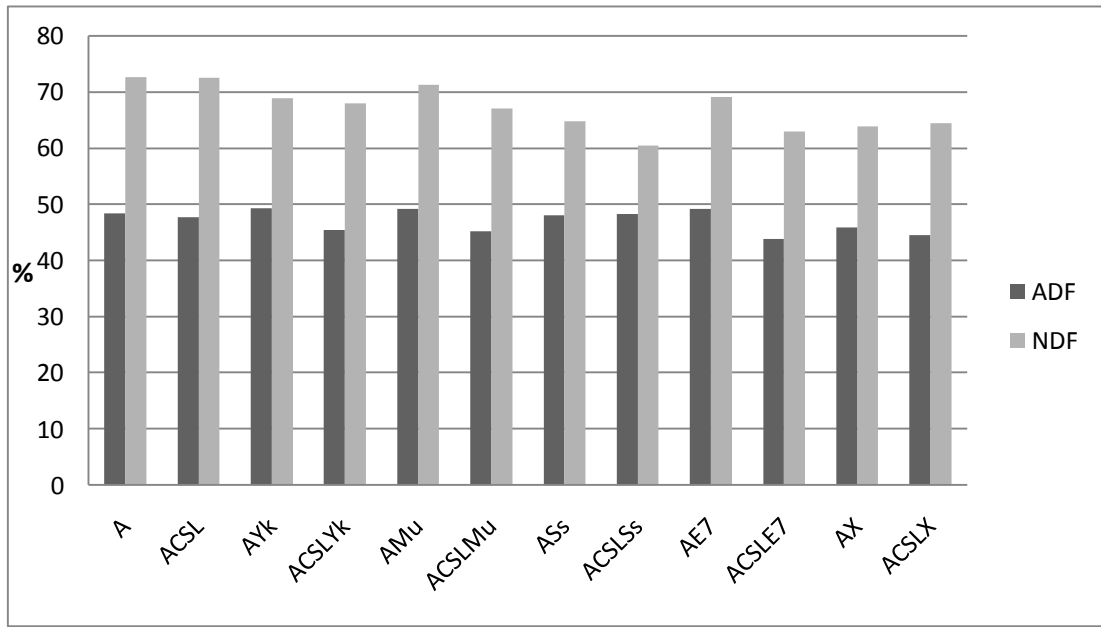
Şekil 4.10. Arpa-buğday samanının kontrol ve deney gruplarında KM, HK ve HP analiz sonuçları

İnokülasyon ve inkübasyon işlemleri sonucunda saman örneklerinin kuru madde ve ham kül miktarlarında önemli değişiklik görülmemiş ancak beklenildiği gibi protein değerlerinde %90'a varan artışlar elde edilmiştir. Örneğin; arpa samanında protein miktarı 5,67 iken E7 (*Pseudomonas putida*) kodlu izolat ile aşılانmış samanda ise bu oran 10,63'e (%88 artış) yükselmiştir. Buğday samanının ham protein oranı 3,88 olarak belirlenmiştir. İnokülasyon ve inkübasyon işlemleri sonucunda E7 kodlu izolat bu saman örneğinin protein oranını 7,11'e (%83 artış) çıkarmıştır. Arpa-buğday samanında ise protein miktarının 4,7 olduğu gözlenmiştir. Bu samanda maksimum protein artışını (%88 artış) ise Yk (*Trichoderma harzianum*) kodlu izolat meydana getirmiştir.

Ayrıca Şekil 4.8, 4.9 ve 4.10'da görüldüğü üzere Yk (*Trichoderma harzianum*) kodlu izolat ile inoküle edilmiş buğday samanı dışında tüm saman örneklerinin ham protein değerleri kontrollerinin değerlerine göre yüksektir.

4.5.2. ADF ve NDF analiz sonuçları

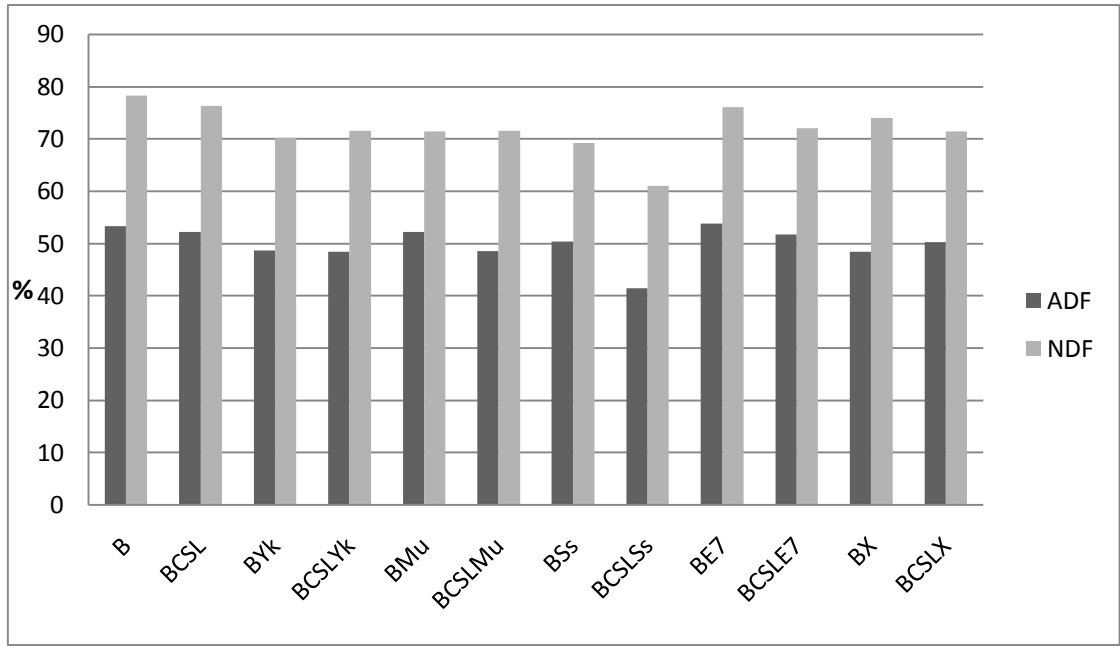
Arpa, buğday, arpa-buğday samanlarında yapılan ADF ve NDF analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.14. Arpa samanının kontrol ve deney gruplarında ADF ve NDF analiz sonuçları

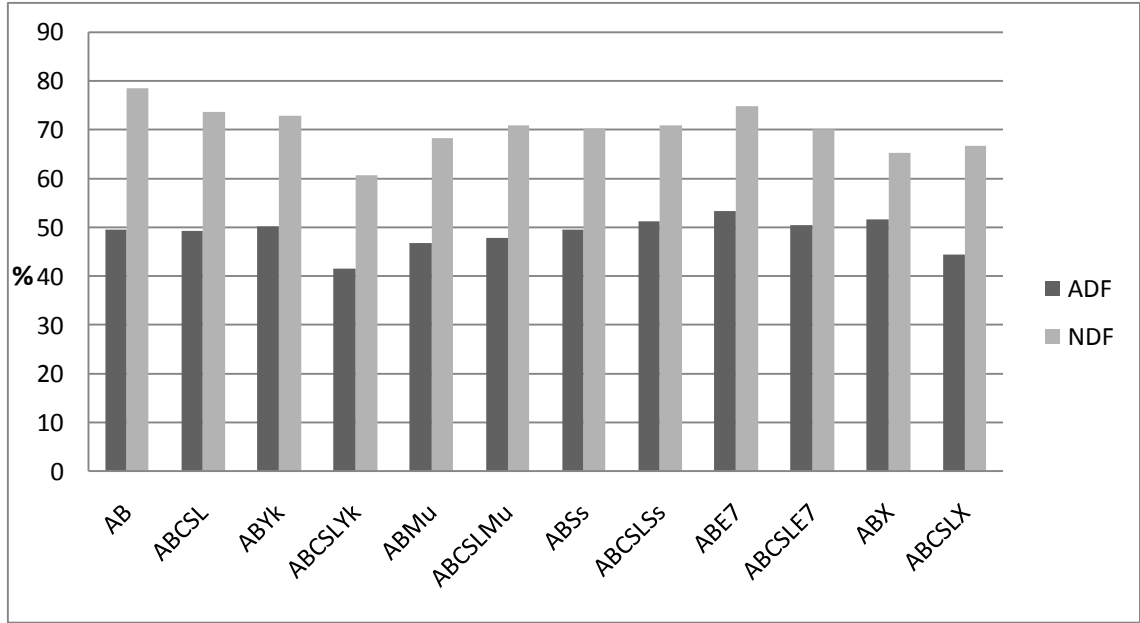
Şekil 4.11’de görüldüğü üzere mikroorganizmalarla aşılanmış bazı saman örneklerinin ADF oranlarında azalmalar meydana gelmiştir. Özellikle E7 kodlu *Pseudomonas putida* izolatu arpa samanının 48,31 olan ADF değerini 43,82 yaparak %10’a yakın bir azalma gerçekleştirmiştir. Ayrıca X kodlu *Aspergillus* sp. izolatomız da arpa samanının ADF yüzdesini düşürmüştür (%8 oranında). Bunun aksine fermentasyon sonucu Yk kodlu *Trichoderma harzianum*, Mu kodlu *Penicillium* sp. mikrofungusları ve Ss kodlu *Streptomyces setonii* ile enfekte edilmiş bazı saman örneklerinin ADF değerlerinde kısmi artışlar görülmüştür.

Mikroorganizmalarla inoküle edilmiş tüm arpa saman örneklerinin NDF değerleri ise kontrollerinin değerlerine göre düşük olmakla beraber maksimum NDF azalması %17 olup *Streptomyces setonii* ile muamele edilmiş samanda gerçekleşmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Buğday samanının kontrol ve deney gruplarında ADF ve NDF analiz sonuçları

Şekil 4.12'den de anlaşıldığı üzere mısır maserasyon sıvısı (CSL) katılmamış ve *Pseudomonas putida* ile enfekte edilmiş buğday samanı dışında tüm saman örneklerinin ADF değerleri kontrollerinin değerlerine göre düşüktür. Bununla birlikte inokülasyon ve inkübasyon sonucu tüm buğday samanlarının NDF oranları da düşmüştür. Buğday samanında maksimum ADF ve NDF azalması her ikisinde de %22'lik bir düşüşle *Streptomyces setonii* ile gerçekleşmiştir.



Şekil 4.13. Arpa-buğday samanının kontrol ve deney gruplarında ADF ve NDF analiz sonuçları

Özellikle mısır maserasyon sıvısı katılmış ve Yk kodlu *Trichoderma harzianum* izolat ile inoküle edilmiş arpa-buğday samanının ADF ve NDF değerlerinde önemli oranlarda azalmalar meydana gelmiştir (Şekil 4.13). Bu mikrofungus ile muamele sonucu arpa-buğday samanının ADF değerinde %16; NDF değerinde ise %23'lük bir düşüş gerçekleşmiştir. ABCSLYk, ABMu, ABCSLMu, ABSs ve ABCSLX saman örneklerinin ADF değerleri kontrollerinin değerlerine göre düşüktür. Şekil 4.13'de görüldüğü üzere tüm saman örneklerinin NDF değerleri kontrollerinin değerlerine göre düşük bulunmuştur.

4.5.3. Selüloz, hemiselüloz değerleri ve ADL analiz sonuçları

Arpa, buğday, arpa-buğday samanlarında yapılan selüloz, hemiselüloz değerleri ve ADL analiz sonuçları sırasıyla Çizelge 4.3, 4.4, ve 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Arpa samanının kontrol ve deney gruplarında selüloz, hemiselüloz değerleri ve ADL analiz sonuçları*

Saman Örnekleri	Selüloz	Hemiselüloz	ADL
A	34,4±2,28a	24,32±1,63ab	13,91±1,28de
ACSL	35,52±0,88a	24,78±3,10ab	12,14±0,17e
AYk	33,38±0,93a	19,58±2,11bc	15,92±1,10bcd
ACSLYk	29,55±0,61abc	22,51±2,55abc	15,86±1,65bcd
AMu	30,08±1,96abc	22,07±2,37bc	19,11±1,49ab
ACSLMu	27,21±0,36cd	21,87±1,50bc	17,96±0,71abc
ASs	24,59±0,81de	16,73±6,15cd	23,46±1,68a
ACSLSs	21,88±1,60e	12,26±2,59d	26,33±3,99a
AE7	32,45±1,71a	19,93±2,69bc	16,66±0,65bcd
ACSLE7	23,72±3,19e	19,11±3,74bc	20,09±0,63a
AX	27,62±2,18c	17,89±4,00c	18,28±2,80abc
ACSLX	28,95±0,91bc	19,95±1,00bc	15,55±1,36cd

*: Aynı harfle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiki bakımdan önemsizdir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.3’de mikroorganizmalarla aşılınmış saman örneklerinde selüloz ve hemiselüloz oranları verilmiştir. Çizelgeden de anlaşıldığı üzere CSL katılmış ve katılmamış arpa samanında selüloz ve hemiselüloz oranları arasında önemli bir değişiklik olmamakla beraber selüloz oranında maksimum düşüş Ss (*Streptomyces setonii*) kodlu mikroorganizma ile aşılınmış saman örneğinde meydana gelmiştir. Nitekim arpa samanında selüloz ve hemiselüloz oranı sırasıyla 34,4 ve 24,32’dir. İnkübasyon işlemi sonucunda Ss kodlu mikroorganizma ile inoküle edilmiş saman örneğinde ise bu değerler 21,88 (%36 düşüş) ve 12,26 (%50 düşüş) olarak belirlenmiştir ve bu düşüşler istatistiki bakımdan ($p < 0,05$) önemlidir.

Çizelge 4.4. Buğday samanının kontrol ve deney gruplarında selüloz, hemiselüloz değerleri ve ADL analiz sonuçları*

Saman Örnekleri	Selüloz	Hemiselüloz	ADL
B	39,7±1,57a	25±3,43a	13,52±0,61d
BCSL	38,25±1,05a	24,04±0,78a	13,97±0,63cd
BYk	30,81±1,83b	21,59±2,91a	17,78±2,52abcd
BCSLYk	32,04±1,37bc	23,05±0,99a	16,37±0,73bcd
BMu	31,21±2,31bc	19,27±4,81a	20,94±4,42ab
BCSLMu	29,37±2,80c	23,03±1,58a	19,11±0,77ab
BSs	30,68±0,67bc	18,92±5,13a	19,6±1,48ab
BCSLSs	19,74±5,14d	19,68±5,98a	21,6±5,71a
BE7	35,31±0,87ab	22,32±3,92a	18,43±0,95abc
BCSLE7	31,81±0,95bc	20,4±5,16a	19,83±1,67ab
BX	31,47±0,21bc	25,66±4,54a	16,86±1,69abcd
BCSLX	32,27±1,45bc	21,28±0,72a	17,88±2,31abcd

*: Aynı harfle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiki bakımdan önemsizdir ($p<0,05$).

Çizelge 4.4’de mikroorganizmalarla inokülasyonun saman örneklerindeki selüloz ve hemiselüloz miktarları üzerindeki etkileri verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi, kontrol grubunda selüloz ve hemiselüloz oranları sırasıyla 39,7 ve 25 olarak belirlenmiştir. İnokülasyon ve inkübasyon işlemleri sonucunda elde edilen üründe maksimum selüloz ve hemiselüloz azalması Ss (*Streptomyces setonii*) kodlu organizma ile gerçekleşmiş olup değerler selüloz için 19,74 (%50 düşüş), hemiselüloz için de 18,92 (%24 düşüş) olarak belirlenmiştir.

İstatistiki olarak olarak değerlendirildiğinde kontrole oranla selüloz azalmaları $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Ancak hemiselüloz oranındaki düşüşler ise istatistiki yönden önemli değildir. İnokülasyon işlemi sonunda ADL oranlarında artış olduğu görülmektedir. Üstelik kontrolle karşılaştırıldığında bu artışların istatistiki bakımdan önemli ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Arpa-buğday samanının kontrol ve deney gruplarında selüloz, hemiselüloz değerleri ve ADL analiz sonuçları*

Saman Örnekleri	Selüloz	Hemiselüloz	ADL
AB	35,66±1,12ab	28,95±1,44a	13,84±0,61e
ABCSL	34,8±0,53ab	24,29±4,96ab	14,47±1,46de
ABYk	33,13±0,90ab	22,63±2,15ab	17,04±1,08cd
ABCSLYk	20,64±4,29f	19,2±4,38bc	20,83±2,36b
ABMu	28,24±1,43cd	21,52±3,84b	18,49±0,19bc
ABCSLMu	28,6±0,50cd	23,09±1,78ab	19,2±1,51bc
ABSs	30,13±1,20bc	20,71±5,49bc	19,34±1,55bc
ABCSLSs	34,51±1,36ab	19,61±3,46bc	16,72±0,96cd
ABE7	33,86±2,30ab	21,48±2,22b	19,46±0,32bc
ABCSLE7	30,19±1,77bc	19,67±3,12bc	20,21±2,14b
ABX	23,24±2,11ef	13,59±7,16c	28,35±1,86a
ABCSLX	26,14±3,01de	22,33±2,04ab	18,22±1,88bc

*: Aynı harfle gösterilen değerler arasındaki fark istatistiki bakımdan önemsizdir (p<0,05).

Çizelge 4.5’de mikroorganizmalarla inoküle edilmiş arpa-buğday saman örneklerinde selüloz, hemiselüloz ve ADL oranları verilmiştir. Çizelgeden de anlaşıldığı üzere arpa-buğday samanında selüloz ve hemiselüloz oranları sırasıyla 35,66 ve 28,95’dir. Selüloz oranının en fazla düştüğü örnek Yk (*Trichoderma harzianum*) kodlu mikroorganizma ile aşılanmış samandır ve selüloz oranının 20,64 (%42 düşüş) olduğu gözlenmiştir. Bu düşüş p<0,05 düzeyinde önemlidir. Maksimum hemiselüloz azalması ise X (*Aspergillus* sp.) kodlu organizma ile gerçekleşmiş olup bu değer 13,59 (%53 düşüş) olarak belirlenmiştir ve istatistiki yönden önemlidir.

4.5.4. Kuru madde sindirilebilirliği, kuru madde tüketilebilirliği, nispi yem değeri ve yem kalitesi değerleri

Arpa, buğday, arpa-buğday samanlarında yapılan KMS, KMT, NYD ve YK değerleri sırasıyla Çizelge 4.5, 4.6, ve 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Arpa samanının kontrol ve deney gruplarında KMS, KMT, NYD ve YK değerleri

Saman Örnekleri	KMS	KMT	NYD	Yem kalitesi
A	50,37	1,65	64,41	5
ACSL	50,87	1,66	65,44	5
AYk	50,5	1,74	68,23	5
ACSLYk	53,53	1,77	73,35	5
AMu	50,58	1,68	66,02	5
ACSLMu	53,71	1,79	74,53	4
ASs	51,47	1,86	74,18	5
ACSLSs	51,34	1,98	79,03	4
AE7	50,64	1,74	68,49	5
ACSLE7	54,77	1,91	81,34	4
AX	53,14	1,88	77,57	4
ACSLX	54,23	1,86	78,28	4

Çizelge 4.6'dan anlaşıldığı üzere bütün saman örneklerinin kuru madde sindirilebilirliği, kuru madde tüketilebilirliği ve nispi yem değerleri kontrol gruplarındaki değerlere göre yüksektir. Arpa samanında maksimum kuru madde sindirilebilirliği E7 kodlu *Pseudomonas putida* izolatu ile aşılanmış örnekte gerçekleşmiş olup bu değer 54,77 (%9'luk artış) iken maksimum kuru madde tüketilebilirliği Ss kodlu *Streptomyces setonii* ile enfekte olmuş arpa samanında gözlenmiştir ve 1,98'dir (%20'lik artış). Normalde arpa samanının nispi yem değeri 64,41 iken *Pseudomonas putida* ile inoküle edilmiş örnekte bu değer 81,34'e (%26'lık artış) yükselmiştir (Çizelge 4.6). Ayrıca arpa samanı 5. kalite yem olarak değerlendirilirken mısır maserasyon sıvısı ilave edilmiş ve Mu kodlu *Penicillium* sp., Ss kodlu *Streptomyces setonii*, E7 kodlu *Pseudomonas putida*, X kodlu *Aspergillus* sp. ile inoküle edilmiş saman örnekleri ise 4. kalite yemler olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.7. Buğday samanının kontrol ve deney gruplarında KMS, KMT, NYD ve YK değerleri

Saman Örnekleri	KMS	KMT	NYD	Yem kalitesi
B	46,54	1,53	55,33	5
BCSL	47,32	1,57	57,58	5
BYk	51,04	1,71	67,63	5
BCSLYk	51,19	1,68	66,63	5
BMu	48,28	1,68	62,97	5
BCSLMu	51,13	1,68	66,61	5
BSs	49,73	1,74	66,97	5
BCSLSs	56,7	1,97	86,6	3
BE7	47,04	1,58	57,6	5
BCSLE7	48,68	1,67	63,09	5
BX	51,25	1,62	64,46	5
BCSLX	49,83	1,68	64,94	5

Mikroorganizmalarla inokülasyon ve inkübasyon işlemleri sonunda bütün buğday samanı örneklerinin kuru madde sindirilebilirliği, kuru madde tüketilebilirliği ve nispi yem değerleri kontrollerinin değerlerine göre yüksektir. Maksimum kuru madde sindirilebilirliği, tüketilebilirliği ve nispi yem değerine sahip olan örnek ise Çizelge 4.7’de de belirtildiği üzere Ss kodlu *Streptomyces setonii* ile enfekte olmuş buğday samanıdır. Buğday samanında kuru madde sindirilebilirliği değeri 46,54; kuru madde tüketilebilirliği değeri 1,53 ve nispi yem değeri 55,33 iken *Streptomyces setonii* ile muamele edilmiş samanda bu değerler sırasıyla 56,7’ye (%22’lik artış); 1,97’ye (%29’luk artış) ve 86,6’ya (%57’lik artış) yükselmiştir. Bunlara ek olarak *Streptomyces setonii* ile aşılanmış buğday samanı 3. kalite yem olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.8. Arpa-buğday samanının kontrol ve deney gruplarında KMS, KMT, NYD ve YK değerleri

Saman Örnekleri	KMS	KMT	NYD	Yem kalitesi
AB	49,44	1,53	58,6	5
ABCSL	49,62	1,63	60,77	5
ABYk	49,82	1,65	63,7	5
ABCSLYk	56,59	1,98	86,74	3
ABMu	52,5	1,76	71,57	5
ABCSLMu	51,66	1,69	67,88	5
ABSs	50,36	1,71	66,88	5
ABCSLSs	49	1,7	64,39	5
ABE7	47,37	1,6	58,9	5
ABCSLE7	49,64	1,71	65,95	5
ABX	48,71	1,85	69,52	5
ABCSLX	54,34	1,81	76,34	4

Çizelge 4.8’de görüldüğü üzere birçok arpa-buğday saman örneğinin kuru madde sindirilebilirliği değerleri kontrollerininkine göre yüksektir. Eşit oranda karıştırılmış arpa-buğday samanının kuru madde sindirilebilirliği değeri 49,44 iken Yk kodlu *Trichoderma harzianum* mikrofungusu ile enfekte olmuş örnekte bu değer 56,59’a (%15’lik artış) yükselmiştir. Fermentasyon işlemi sonunda tüm örneklerin kuru madde tüketilebilirliği ve nispi yem değerleri ise arpa-buğday samanına oranla yüksektir. Kontrolde bu değerler sırasıyla 1,53 ve 58,6’dır. Maksimum kuru madde tüketilebilirliği ve nispi yem değeri artışı ise yine *Trichoderma harzianum* izolatu ile gerçekleşmiş olup sırasıyla 1,98 (%29’luk artış) ve 86,74 (%48’lik artış)’e yükselmiştir. Bununla beraber bu mikrobun inokülasyonu ile arpa-buğday saman örneğinin 3. kalite yem değerinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca X kodlu *Aspergillus* sp. izolat ile aşılanmış örnek de 4. kalite yem olarak değerlendirilmiştir. (Çizelge 4.8).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Potansiyel Etkili İzolatlar

Bu araştırmada hem standart suşlar (*Streptomyces setonii*, Ss; *Streptomyces badius*, Sb; *Streptomyces psammoticus*, Sp; *Streptomyces viridosporus*, Sv; *Phanerochaete chrysosporium*, Pc) hem de çürümüş odun, saman ve talaş örneklerinden izole edilen 31 izolat kullanılmıştır. Kendi izolatlarımızdan 7 tanesi mikrofungus, 24 tanesi de bakteriyel izolatlardır.

Standart suş olarak kullanılan *Streptomyces* ve *Phanerochaete* türleri literatür taramaları sonucu benzer çalışmalarda önerildikleri için tercih edilmiştir. Hem standart suşlar hem de kendi izolatlarımız selüloz ve ligninaz aktiviteleri bakımından özel tarama (screening) yöntemleri kullanılarak performansı en iyi olanlar (*Streptomyces setonii*, Ss; *Pseudomonas putida*, E7; *Aspergillus* sp., X; *Trichoderma harzianum*, Yk; *Penicillium* sp., Mu) seçilmiş ve çalışmanın daha ileriki aşamaları bu izolatlarla yürütülmüştür.

5.2. Potansiyel İzolatların Morfolojik, Sitolojik ve Fizyolojik Özellikleri

Çizelge 4.1’de de görüldüğü üzere Ss standart suşu besiyerine gömülü koloni oluşturmakta, zincir şeklinde ve katalaz üreten gram (+) bir bakteri olmakla beraber endospor oluşturmamaktadır. E7 izolatu ise mukoid koloni morfolojisine sahip, çubuk şeklinde olup gram (-) bir bakteridir. Endospor oluşturmayan bu tür katalaz üretmektedir. Bu özellikler literatürde aynı türler için verilen özelliklerle uyumaktadır (Breed *et al.* 1957).

Diğer taraftan bakteriyel izolatların MIS ve 16S rRNA analizleri, fungal izolatların da mikroskopik analizleri ile tanıları yapılmıştır. Mikroorganizmaların kültürel özelliklerini takiben MIS ile taranması sonucu E7 kodlu izolatın 0,7 tanı indeksi ile *Pseudomonas putida* olduğu değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2). Buna ilaveten daha

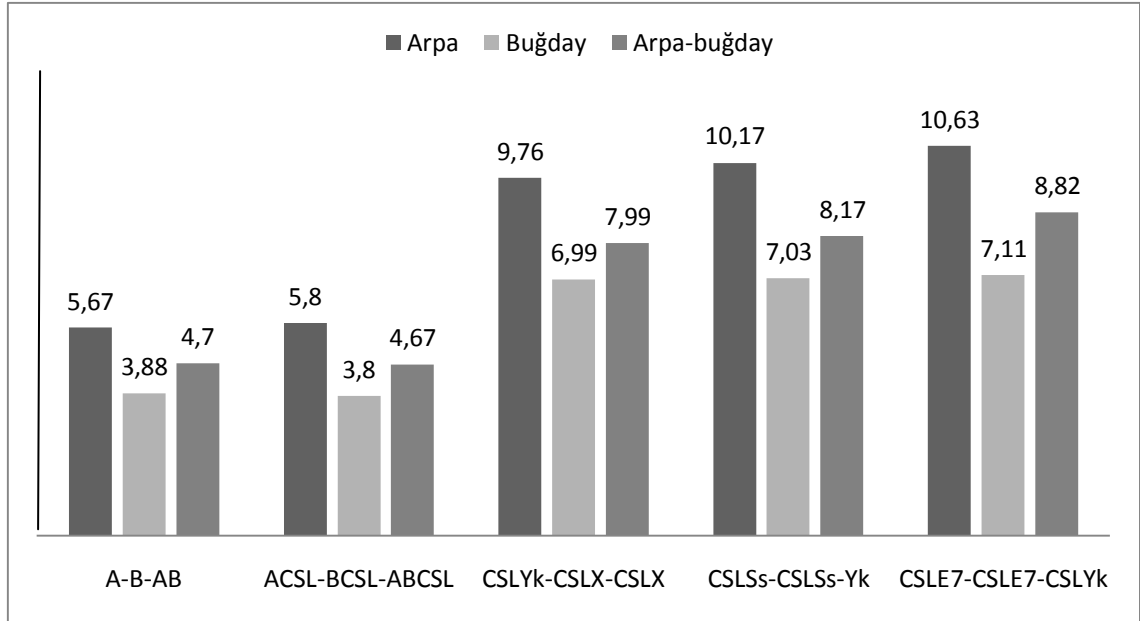
hassas moleküler bir teknik de (16S rRNA) kullanılarak bu izolatın *Pseudomonas putida* olduğu doğrulanmıştır.

5.3. Kuru Madde, Ham Kül ve Ham Protein Analiz Sonuçları

Ham kül tayini, bir yem maddesinin 550°C’de yakılmasından sonra geriye kalan inorganik maddelerden oluşmuş kül miktarının % olarak ifade edilmesidir. Yemdeki ham kül miktarı yemin mineral madde kapsamı hakkında bilgi verir (Kutlu 2008). Şekil 4.12, 4.13, ve 4.14’da görüldüğü üzere deney grubu örneklerinin ham kül ve kuru madde değerlerinde kayda değer bir değişiklik meydana gelmemiş, düşük oranda artışlar gözlenmiştir. Maksimum ham kül artışı gözlenen örnekler CSL katılmış ve *Pseudomonas putida* ile inoküle edilmiş samanlardır. Muamele görmemiş arpa, buğday ve arpa-buğday samanlarının kuru madde düzeyleri %95,62-97,19; CSL katılmış ve mikroorganizmalarla aşılanmış samanların kuru madde düzeyleri ise %96,31-99,47 arasında değişmektedir. Güngör vd (2008), kuru madde değeri %90’ın üzerinde olan kaba yemlerin iyi bir kurutma dönemi geçirdiklerini belirtmiştir.

İnokülasyon ve inkübasyon işlemleri sonunda ham protein değerlerinde önemli değişiklikler gözlenmiştir. Kutlu (2008) bir yemin protein içeriğinin yüksek olmasının, kolay çözünebilir karbonhidratların tersine sindirime olumlu etki yaptığını; protein düzeyinin düşük olması halinde, mikroorganizma faaliyetlerinin azalmakta ve dolayısıyla yemin sindirilme derecesinin düşmekte olduğunu ifade etmiştir.

Fermentasyon işlemleri sonunda mikroorganizmalarla muamele edilmiş samanların ham protein yüzdelerinde kontrollerine oranla önemli oranlarda artış meydana geldiği şekil 5.1’de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. Arpa, buğday ve arpa-buğday samanlarının kontrol ve bazı deney gruplarına ilişkin protein değerleri (%)

Şekil 5.1’den anlaşıldığı üzere mikroorganizmalarla enfekte edilmiş arpa, buğday ve arpa-buğday samanlarının protein değerlerinde önemli oranda artışlar gözlenmiştir. Üç çeşit saman örneğinde de en fazla artış meydana getiren üç izolat Şekil 5.1’de gösterilmiş ve bu türlerin Yk kodlu *Trichoderma harzianum* ve X kodlu *Aspergillus* sp. İle Ss kodlu *Streptomyces setonii* ve E7 kodlu *Pseudomonas putida* olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda maksimum protein artışı %88’lik artışla CSL katılmış ve *Pseudomonas putida* ile enfekte olmuş arpa (ACSLE7) ile CSL katılmış ve *Trichoderma harzianum* ile inoküle edilmiş arpa-buğday (ABCSLYk) samanlarında gerçekleşmiştir. CSL katılmış ve *Pseudomonas putida* ile enfekte edilmiş buğday samanında (BCSLE7) ise %83’lük ham protein artışı gözlenmiştir. Bu konu ile ilgili literatür taraması sonucu bu artışların Kutlu vd (2000)’nin çalışmasındaki üre ile muamele edilmiş ve *Pleurotus florida* ile aşılanmış buğday samanındaki ham protein artışından (%54’lük artış) daha yüksek olduğu, Bayram (1997)’in çalışmasındaki arpa samanının *Pleurotus sajor caju*

ile 20 günlük inkübasyon süreci sonunda saptanan maksimum protein artışıyla benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Ayrıca en fazla protein artışı mısır maserasyon sıvısı (CSL) katılmış deney grubu örneklerinde gerçekleşmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak azot içeriği yüksek olan CSL'nin mikroorganizma gelişimini teşvik ettiğini, dolayısıyla samanların yem kalitesinin artırılmasında olumlu işlevi olduğunu söyleyebiliriz.

5.4. ADF ve NDF Analiz Sonuçları

Kutlu (2008)'ya göre ADF yemin kalitesi, NDF yemin hacmi-kabalığı hakkında fikir verir ve yüksek ADF içerikli yemlerin sindirilebilirliği ile enerji değeri düşüktür. Yüksek NDF içerikli yemlerin ise hacim kaplama özelliği yüksektir (Kutlu 2008). Ayrıca çalışmamızda kuru madde sindirilebilirliği değeri ADF, kuru madde tüketilebilirliği değeri ise NDF analiz sonucuna dayandırılarak belirlenmiştir. Buna ek olarak nispi yem değerinin hesaplanmasında ADF ve NDF değerlerinden yararlanılmaktadır (Rohweder *et al.* 1978; Moore and Undersander 2002; Canbolat ve Karaman 2009). Bu sebeplerle muamele görmüş saman örneklerinde ADF ve NDF oranlarının düşük olması yem kalitesinin yüksek olması açısından önem arz etmektedir. Katı hal fermentasyonu süreci sonunda bu parametrelerin analiz sonuçlarının değerlendirilmesi Çizelge 5.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. Mikroorganizmalarla enfekte edilen saman örneklerinin ADF ve NDF analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

		Mikroorganizmalar									
		Yk	Yk	Mu	Mu	Ss	Ss	E7	E7	X	X
		ADF	NDF	ADF	NDF	ADF	NDF	ADF	NDF	ADF	NDF
Samanlar	A	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	ACSL	-	-	-	-	+	_*	_*	_*	-	_*
	B	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	BCSL	-	-	-	-	_*	_*	-	-	-	-
	AB	+	-	-	-	-	-	+	-	+	_*
	ABCSL	_*	_*	-	-	+	-	+	-	-	-

(+): Hem kontrole göre hem de istatistiki yönden önemsiz. (-): Kontrole göre önemli, istatistiki yönden önemsiz. (-*): Hem kontrole göre hem de istatistiki yönden önemli ($p<0,05$)

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde mikroorganizmalarla inokülasyonun hem ADF hem de NDF değerlerinde $p<0,05$ düzeyinde önemli düşüşler meydana getirdiği belirlenmiştir. Çizelge 5.1'den de görüldüğü üzere arpa samanı için maksimum ADF azalması *Pseudomonas putida* ile, maksimum NDF azalmaları *Streptomyces setonii*, *Pseudomonas putida* ve *Aspergillus* sp. izolatları ile; buğday samanında ise maksimum ADF ve NDF azalması *Streptomyces setonii* ile gerçekleşmiştir. Arpa-buğday samanında ADF ve NDF azalması yönünde en yüksek performansı gösteren mikroorganizma ise *Trichoderma harzianum*'dur ve tüm bu azalmalar istatistiki bakımdan önemlidir ($p<0,05$).

Analiz sonuçlarına göre saman örneklerinde meydana gelen maksimum NDF azalmalarının Bayram (1997)'ın çalışmasında *Phanerochaete chrysosporium* 'la 60 gün muamele edilen tarımsal artıklarda saptanan maksimum değerlerle benzerlik gösterdiği, *Pleurotus sajor caju* ile enfekte edilmiş olanlarda 20. gün sonunda meydana gelen maksimum NDF azalmalarına göre ise fazla olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca ADF değerlerinin kontrollerine göre düşük olması kuru madde sindirimi (KMS), NDF değerlerinin kontrollerine göre düşük olması kuru madde tüketimi (KMT) bakımından önemlidir (Çizelge 4.6, 4.7 ve 4.8).

5.5. Selüloz, Hemiselüloz Değerleri ve ADL Analiz Sonuçları

Lignoselülozik kalıntıların yüksek oranda selüloz ve hemiselüloz, düşük miktarda protein içerdiğini belirten Singh *et al.* (1996), bu durumun ideal bir hayvan besini olarak bu artıkların kullanımını sınırlandırdığını bildirmiştir. Ayrıca selüloz ve hemiselülozun, sindirilebilirliği ve lezzeti azalttığını savunan yazar, bunların kullanılabilirliğini artırmak için besin kalitesinin yükseltilmesinin gerektiğini vurgulamıştır. Bu yüzden söz konusu karbonhidratların sindirilebilirlik üzerindeki negatif etkisinin samanların yem kalitesini de düşürdüğü kanısındayız.

ADL ise ADF'nin içerdiği selülozu çözebilen oldukça güçlü bir asitle işlendikten sonra geriye kalan hücre duvarı bileşeni olarak tanımlanmaktadır (Kurt, 2008). Karunanandaa *et al.* (1995), ligninin rumen bakterilerini ve bu mikroorganizmaların enzimlerini bloke ederek selüloz ve hemiselüloz degradasyonunu önleyici rol üstlendiğini belirtmiştir. Ayrıca ruminal mikrobiyal popülasyonlar ligninolitik aktiviteye sahip değildir (Zadrazil *et al.* 1995). Bu nedenlerle çalışmamızda yem kalitesini ve hayvansal üretimi artırmak için samanlar 5.1.'de sözü geçen mikroorganizmalarla enfekte edilmiştir. İnokülasyon ve inkübasyon sonucu elde edilen üründe selüloz, hemiselüloz ve ADL oranları belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3, 4.4, ve 4.5'de özetlenmiştir. Çizelgelerde de görüldüğü üzere hem arpa hem buğday hem de arpa-buğday karışımı samanlarda selüloz, hemiselüloz ve ADL miktarlarında mikrobiyal inokülasyon istatistikî anlamda önemli ($p<0,05$) değişiklikler (azalış ve artışlar) oluşturmuştur.

Arpa, buğday ve arpa-buğday samanları için, maksimum selüloz azalmaları *Streptomyces setonii* ve *Trichoderma harzianum* izolatları ile; maksimum hemiselüloz azalmaları ise *Streptomyces setonii* ve *Aspergillus* sp. izolatları ile gerçekleşmiştir. İlginç bir gözlem olarak inokülasyon ve inkübasyon işlemleri sonucunda örneklerin ADL düzeylerinde önemli ($p<0,05$) artışlar belirlenmiştir. Bu artışların iki sebebe bağlı olabileceği düşüncesindeyiz:

1. ADL, selüloz ve hemiselüloz değerleri miktarsal olarak değil oransal olarak verilmiştir. Bu nedenle inokülasyon işlemi hemiselüloz ve selülozun miktarını ADL'nin miktarını azalttığından daha fazla azaltırsa doğal olarak ADL oranı artmış görünmektedir. Muhtemelen ADL'yi miktar olarak veren bir metot kullanmış olsaydık olumsuz gibi görünen bu ADL artışlarına rastlamayacaktık.

2. Yukarıdaki varsayım doğru bile olsa inokülasyon işlemlerinin ADL'yi etkili bir oranda düşüremediği açıktır. Bunun muhtemel sebebi ligninin mikroorganizmalar tarafından tercih edilen bir karbon kaynağı olmaması ile açıklanabilir. Bir başka ifadeyle mikroorganizma, ortamda selüloz ve hemiselüloz varlığında lignini tercih etmemektedir. Nitekim Sanchez (2009), lignin yıkımının enerji maliyetinin yüksek olmasından dolayı mikroorganizmanın selüloz ve hemiselüloz bileşenlerine hücum etmeyi tercih ettiğini belirtmiştir. İnkübasyon süresini 3 ay gibi daha uzun bir süre uygulamış olsaydık ortamda selüloz ve hemiselülozun kalmaması nedeni ile tek karbon kaynağı olarak mikroorganizmanın lignini daha yüksek oranlarda kullanması ve ADL oranlarının istenilen düzeylere düşürülmesi mümkün olabilirdi.

5.6. Kuru Madde Sindirilebilirliği, Kuru Madde Tüketilebilirliği ve Nispi Yem Değerleri

Nispi yem değeri (NYD) indeksi, kaba yem değerlendirme ve pazarlamada ABD'de uzun yıllardır kullanılan, kaba yemin içerdiği ADF ve NDF varlığına ve kaba yemin hayvan tarafından tüketimi ile sağlayacağı enerji değerinin tahminine dayanan bir indekstir (Kaya 2008).

ABD'de yonca bitkisinde kalite kontrolü için geliştirilen nispi yem değeri (NYD, Relative Food Value, RFV) metodu, bütün yem bitkileri için kullanılmaktadır. NYD, hali hazırda kaba yemin pazarlanması ve kalitesinin belirlenmesinde önemli bir araçtır. Kaba yem üreticileri ve alıcılar kaba yemin fiyatlandırılmasında NYD indeksini kullanmaktadırlar. NYD indeksi tam çiçekteki yonca kuru otunun içerdiği %41 ADF ve %53 NDF içeriğinden hesaplanan 100 indeksini baz alır. NYD 150'nin üzerinde ise en

iyi kalite, 125-150 ise 1. kalite, 103-124 ise 2. kalite, 87-102 ise 3. kalite, 75-86 ise 4. kalite ve 75'in altında ise 5. kalite olarak kabul edilmektedir (Rohweder *et al.* 1978; Moore and Undersander 2002; Kaya 2008; Canbolat ve Karaman 2009).

Analiz sonuçlarına göre mikroorganizmalarla enfekte edilmiş arpa, buğday ve arpa-buğday saman örneklerinin maksimum kuru madde sindirilebilirlik artışları sırasıyla %9, %22 ve %15'dir. Bu değerler Bayram (1997)'ın çalışmasında iki farklı fungusla (*Pleurotus sajor caju* ve *Phanerochaete chrysosporium*) 20 gün inkübasyona bırakılan tarımsal artıklarda tespit edilen değerlerle benzerlik göstermekte, 40 ve 60 günlük inkübasyon süreleri sonunda elde ettiği değerlerden ise düşük olduğu görülmektedir.

Bu araştırmada mikrobiyal inokülasyon sonucu arpa samanı yem kalitesi bakımından 5'den 4'e; buğday samanı 5'den 3'e; arpa-buğday samanı da yine 5'den 3'e yükseltilmiştir. Yem kalitesi yüksek saman örneklerinin nispi yem değerleri de yüksektir. Nispi yem değeri (NYD) hesaplaması kuru madde sindirilebilirliği (KMS) ve kuru madde tüketilebilirliği (KMT) üzerinden yapıldığı için dolaylı olarak ADF ve NDF analiz sonuçları da yem kalitesi açısından büyük önem arz etmektedir. 3.2.7.g'de bu hesaplamaların nasıl yapıldığı anlatılmıştır. Söz konusu açıklamalardan yola çıkarak düşük ADF ve NDF içerikli yemlerin KMS ve KMT değerleri yükselmekte ve bu da nispi yem değeri ve yem kalitesi artışına yol açmaktadır. Sonuç olarak yem sanayisi için olumlu katkılar sağlanarak nitelikli hayvan yemi temininin gerçekleşmesi ümit edilmektedir.

Diğer taraftan bazı araştırmacılar (Sun and Cheng 2002) lignoselülitik mikroorganizmaların hem lignin hem de selüloz içeren substratlar üzerinde çok başarılı olmadıklarını, dolayısıyla lignin içeriği çok az veya hiç lignin içermeyen substratların bu çeşit araştırmalarda tercih edilmesi gerektiğini belirtmektedirler. Özellikle bol miktarda yaprak içeren toprak üstü tarımsal yan ürünler bakımından zengin olan ülkemizde bu tez kapsamında uyguladığımız yöntemin bahse konu atıklara uygulanması, yem değeri daha yüksek ürünlerin elde edilmesine imkan sağlayabilecektir.

Şüphesiz bu iyileştirmeler yeterli bulunmayabilir. Ancak çalışmanın farklı türlerle modifiye edilmesi, inkübasyon süresinin uzatılması ve inkübasyon sıcaklığının optimize edilmesi durumunda daha yüksek iyileştirmeler yapılabileceği ve bu yöntemin ülkemizdeki kaba yemlerin değerlendirilmesinde alternatif bir yöntem olarak kullanılabilmesi mümkündür. Ayrıca mikrobiyal inokülasyonun yem sanayisinde kullanımı halinde ruminantlarda ve dolayısıyla insanlarda toksik etki yaratıp yaratmayacağı, eğer böyle bir etki varsa nasıl giderileceği de diğer bir araştırma konusudur.

KAYNAKLAR

- Abd-Elsalam, H.E. and El-Hanafy, A.A., 2009. Lignin biodegradation with ligninolytic bacterial strain and comparison of *Bacillus subtilis* and *Bacillus sp.* isolated from Egyptian soil. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 5: 39-44.
- Abdulla, H.M., 2007. Enhancement of rice straw composting by lignocellulolytic Actinomycete strains. *International Journal of Agriculture and Biology*, 106-109.
- Abou-El-Emin. O. H., J. G. Fadel and D.J Mackill. 1999. Differences in chemical in chemical composition and fibre digestion of rice straw with, without, anhydrous ammonia from 53 rice varieties. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79: 129-136
- Antai, S.P. and Crawford, D.L. "Degradation of softwood, hardwood and grass lignocellulose by two *Streptomyces* strains", *Appl. Environ. Microbiol.*, 42:378-380, (1981).
- Arora, D.S., Chander, M., and Gill, P.K. "Involvement Of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase And Laccase In Degradation And Selective Ligninolysis Of Wheat Straw", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50: 115-120, (2002).
- Bachmann, S.L. and McCarthy, A.J. "Purification and co-operative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2121-30, (1991)
- Balat, H. and Kırtay, E., 2010. Hydrogen from biomass - Present scenario and future prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35 (2010), 7416-7426.
- Bandounas, L., Wierckx, N. JP, Winder, J. H de and Ruijsenaars, H. J., 2011. Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *BMC Biotechnology*, 11: 94.
- Bayram, İ., 1997. Bazı tarımsal artıkların beyaz çürükçül mantarlarla delignifiye edilerek yem değerlerinin artırılma olanaklarının araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 44: 1-9.
- Bisaria, V.S., Saxena, S.K., Manihar, R.B., Gopalkrishnan, K.S, 1984. Solid state Fermentation of Plant Residues for Improved Animal Feed by *Pleurotus sp.* *Appl Biochem Biotechnol* 9:341
- Bobleter, O. 1994. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog. Polym. Sci.* 19: 797-841.
- Breed, R. S., Murray, E. G. and Smith, N. R., 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 1003 p, USA.
- Buranov, A. and Mazza, G., 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Journal of Industrial Crops and Products*, 28, 237-259.
- Buswell, J.A. and Odier, E. "Lignin biodegradation", *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 6:1-60, (1987).
- Canbolat, Ö. ve Karaman, Ş., 2009. Bazı Baklagil Kaba Yemlerinin in Vitro Gaz Üretimi, Organik Madde Sindirimi, Nispi Yem Değeri ve Metabolik Enerji İçeriklerinin Karşılaştırılması. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 15 (2), 188-195.

- Cardinal, E. V. and Hedrick, L. R., 1947. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. *The Journal of Biological Chemistry*, 172:609-612.
- Coleman, G.S. "The metabolism of cellulose, glucose and starch by the rumen ciliate protozoa *Eudiplodinium maggii*", *J. Gen. Microbiol.*, 107:359- 366, (1978).
- Crawford, D.L. "Growth of *Thermomonospora fusca* on lignocellulosic pulps of varying lignin content", *Can. J. Microbiol.*, 31:714-717, (1974).
- Crawford, D. L., 1981. Microbial conversions of lignin to useful chemicals using a lignin-degrading *Streptomyces*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium Series*, 11, 275-291.
- Crawford, R. L. and Crawford, D. L., 1984. Recent advances in studies of the mechanisms of microbial degradation of lignins. *Enzyme and Microbial Technology*, 6, 434-442.
- Delmer, D.P. and Amor, Y. 1995. Cellulose biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 987-1000.
- Demirbaş, A. 2006a. Turkey's renewable energy facilities in the near future. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, 28: 527-536.
- Erikson, K.E. 1984. Advances in microbial delignification *Biotechnol advs vol2*. pp..149-160
- Eriksson, K.-E., Blanchette, R.A. and Ander, P. "Biodegradation of cellulose", K.-E. Eriksson (Ed), "Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components", Springer Series in Wood Sciences, Springer-Verlag, Berlin, 407s. (1990).
- Fang, T. J. Liao, B. C. And Lee, S. C., 2010. Enhanced production of xylanases by *Aspergillus carneus* M34 in solid-state fermentation with agricultural waste using statistical approach. *New Bioethanol*, 27(1), 25-32.
- Freitas, Y.J.M. and Bhat, J.V. "Micro-organisms associated with the deterioration of fish-nets and cordage", *J. Univ. Bombay*, 23:53-59, (1954).
- Galbe, M. and Zacchi, G. 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 108: 41–65.
- Garrote, G., Dominguez, H. and Parajo, J.C. 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Roh Werkst.* 57: 191–202.
- Genç, N., 2011. Atıkların biyohidrojen üretim potansiyellerinin değerlendirilmesi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17 (2), 63-77.
- Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Margues, S. and Bobel-Lukasik, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 101: 4775-4800.
- Gomez, G., Lee, J.H., Veldman, M.B., Lu, J., Xiao, X., and Lin, S., 2012. Identification of Vascular and Hematopoietic Genes Downstream of etsrp by Deep Sequencing in Zebrafish. *Journal of PLoS One*, 7(3)
- Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynski, A, Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L. and Xu, G. "Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood", *J. Biotechnol.*, 53: 133-162, (1997).
- Gupta, V., Discenza, M., Guyon, J.R., Kunkel, L.M., and Beggs, A.H., 2012. alpha-Actinin-2 deficiency results in sarcomeric defects in zebrafish that cannot be

- rescued by alpha-actinin-3 revealing functional differences between sarcomeric isoforms. *Faseb Journal*, 26 (5):1892-1908.
- Günerhan, Ü., 2011. Birleştirilmiş Alkali ve Termal Ön Artım Yöntemlerinin Lignoselülozik Atıkların Anaerobik Parçalanabilirliği Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Akdeniz Üniversitesi.
- Güngör, T., Başalan, M. and Aydoğan, İ., (2008). Kırıkkale yöresinde üretilen bazı kaba yemlerde besin madde miktarları ve metabolize olabilir enerji düzeylerinin belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 55, 111-115.
- Ha, C.S., Dubey, P., Goyal, L.K., Hess, M., Cabanillas, F. & Cox, J.D., 1998. Localized primary non-Hogkin lymphoma of the breast. *American Journal of Clinical Oncology*, 21, 376-380.
- Hendriks, A.T.W.M. and Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Biosource Technology*, 100: 10-18.
- Howard. R. L., E. Abotsi, E. L. Jansen and s. Howard. 2003. lignocelulos biotechnologi: Issues of bioconversion and enzyme production. *Afr.j. Biotechnol.* 2:602-619.
- Humphrey, A.E., Moreira, A.A., Arminger, W. and Zabriskie, D., 1977. Production of single cell protein from cellulose wastes. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 7, 45-64.
- Jahromi, M.F., Liang, J.B., Rosfarizan, M., Goh, Y.M., Shokryazdan, P. and Ho, Y.W., 2010. Effects of *Aspergillus niger* (K8) on nutritive value of rice straw. *African Journal of Biotechnology*, 9 (42), 7043-7047.
- Jorgensen, H. Kristensen, J. B. and Felby, C. 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 1: 119 134.
- Karunanandaa, K., Varga, G.A., Akin, D.E., Rigsby, L.L., Royse, D.L., 1995. Botanical fractions of rice straw colonized by white rot fungi: changes in chemical composition and structure. *Animal Feed Science and Technology*, 55, 179–99.
- Karunanadaa, K. And G. A. Varga. 1996a. Colonization of rice straw by white-rot fungi (*Cyathus stercoreus*): Effect on ruminal fermentation pattern, nitrogen metabolism, fiber utilization during continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61:1-16
- Karunanadaa, K. And G. A. Varga. 1996b. Colonization of rice straw by white-rot fungi: cell eall monosaccharides. Phenolic acids, ruminal fermentation characteristics and digestibility of cell wall fiber componenets in vintro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 63:273-288
- Kim, T.H. and Lee, Y.Y. 2005. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process. *Bioresource Technology*, 96 (18): 2007-2013.
- Kirk,T.K., Farrel, R.L. "Enzymatic "Combustion": The microbial degradation of lignin", *Ann. Rew. Microbiol.*, 41:465-505, (1987).
- Klement, Z., Rudolph K., Sands, D.C., 1990. Methods in phytopathology. *Akademiai Kiado*, 153-180, Budapest.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. and Stroeve, P. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48 (8), 3713-3729.

- Kuru, Ali. "Lignoselüloz degradasyonunu sağlayan streptomyces enzimleri hakkında bir araştırma." *Yüksek Lisans Tezi* (2003): 1-111.
- Kutlu, H. R., Görgülü, M., Baykal, L. and Özcan, N., (2000). Effects of *Pleurotus florida* inoculation or urea treatment on feeding value of wheat straw. *Journal of Turkey Veterinary Animal Science*, 24, 169-175.
- Kutlu, H.R., 2008. Yem Değerlendirme ve Analiz Yöntemleri. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, 65 s, Adana.
- Küfrevioğlu, Ö. İ., Akdağ, R., Şahin, F., Pirim, İ., Çiftçi, M., Polat, M. F., Özmen, İ., Oral, B., Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu, s: 48-53, Atatürk Üniversitesi Erzurum.
- Liggett, R. W. and Koffler, H., 1948. Corn steep liquor in microbiology. *Bacteriol. Rev. Journals.ASM.org*, 12 (4), 297.
- Liu, T. and Sung, S. 2002. Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens. *Water Sci. Technol.*, 45: 113–120.
- Liu. J.X. and E.R.Orskov. 2000. Cellulase treatment of untreated and steam pre-treated rice straw-effect on in-vitro fermentation characteristic. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88: 189-200.
- Maijala, P., "*Heterobasidion annosum* and wood decay: Enzymology of cellulose, hemicellulose, and lignin degradation", Doktora Tezi, The Faculty of Science, University of Helsinki, Helsinki, 91s, (2000).
- Malburg, Jr.L.M., Lee, J.M.T. and Forsberg, C.W. "Degradation of cellulose and hemicelluloses by rumen microorganisms", G. Winkelmann (Ed), *Microbial degradation of Natural Products*, VCH Press, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, s.128-159. (1992).
- Mandels, M. and Weber, J., 1969. Production of cellulases. *Adv. Chem. Series.*, 95, 391-414.
- McCarthy, A.J. and Broda, P. "Screening for lignin-degrading actinomycetes and characterisation of their activity against (^{14}C)-lignin-labeled wheat lignocellulose", *J. Gen. Microbiol.*, 130:2905-2913, (1984).
- McCarthy, A.J. "Lignocellulose Degrading Actinomycetes", *FEMS Microbiol. Rev.*, 46:145-163, (1987).
- Moore, J.E. and Undersander, D.J., 2002. Relative forage quality: An alternative to relative feed value and quality index. In: *Proc. 13th Annual Florida Ruminant Nutr. Symposium*. University of Florida, Gainesville. pp. 16-32.
- Mosier N, Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biores Technol* 96:673–686.
- Mueller-Harvey, L., Hartley, R.D., Harris. P.J. and Curzon, E.H. "Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw", *Carbohydr. Res.*, 148:71-85, (1986).
- NARC newsletter (rice special issue), May 2004.
- Ntaikou, I., Antonopolou, G. And Lyberatos, G. 2010a. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review, *Waste Biomass Valor.*(1), 21-39
- Orpin, C.G. "Genetic approaches to the improvement of lignocellulose degradation in the rumen", J.-P. Aubert, P. Beguin and J. Millet (Ed), *FEMS Symp. No. 43*.

- Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, Academic Press, London and New York, s.172-179, (1988).
- Orskov, E.R. and McDonald I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science Cambridge*, 92: 499-503.
- Özgür, M.A. 2008. Review of Turkey's renewable energy potential. *Renewable Energy*, 33: 2345-2356.
- Özşahin, A.D., 2006. Kahramanmaraş İli Kağıt Fabrikaları Çevresinden İzolasyonu Yapılan *Bacillus* sp. Suşlarından Elde Edilen Selüloz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Palmowski, L. and Muller, J. 1999. Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. In: *II International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste*. Barcelona 15–17 June, pp. 137–144.
- Puls, J. and Schuseil, J. "Chemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis", M.P. Coughlan, and G.P. Hazlewood (Ed), *Hemicellulose and Hemicellulases*, Portland Press, London and Chapel Hill, s.1-27, (1993).
- Reddy, D. V. 1996. Evaluation of rice straw-poultry droppings based rations supplemented with graded levels of rice bran in fistulated buffaloes. *Anim. Feed Sci Technol.* 58: 227-237.
- Ren, T., Xu, N., Cao, C., Yuan, W., Yu, X., Chen, J. And Ren, J., 2009. Preparation and therapeutic efficacy of polysorbate-80-coated amphotericin B/PLA-b-PEG nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science*, 20 (2009), 1369–1380.
- Rohweder, D.A., Barnes, R.F. and Jorgensen, N., 1978. Proposed hay grading standards based on laboratory analyses for evaluating quality. *J. Anim. Sci.*, 47: 747-759.
- Roy, M.A., 1988. Use of fatty acids for the identification of phytopathogenic bacteria. *Plant Dis.*, 72, 460.
- Salehpor, S., Rasouli, B. and Ghotbi, A.A., 2012. Evaluation of digestibility and nutritional value of processed rice straw by bacterial, enzymatic and chemical methods with gas production and chemical methods. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*, 4 (13), 1992-1996.
- Sanchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27, 185-194.
- Sarnklong, C., Cone, J. W., Pellikaan, W. and Hendriks, W. H., 2010. Utilization of rice straw and different treatments to improve its feed value for ruminants: A Review. *Asian-Aust. Journal of Animal Science*, 23 (5), 680-692.
- Saygılı, H., 1995. Fitobakteriyoloji. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 203, Bornova-İzmir.
- Selim. A. S. M., J. Pan, T. Takano, T. Suzuki, S. Koike, Y. Kobayashi and K. Tanaka, 2004. Effect of ammonia treatment on physical strength of rice straw, distribution of straw particles and particle-associated bacteria in sheep rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:117-128
- Shen, H. S., F. Sundstol, E. R. Eng and L. O. Eik. 1999. Studies on untreated and urea-treated rice straw from three cultivation seasons: 3. Histological investigations

- by light and scanning electron microscopy. *Anim. Feed Sci. Technol.* 80: 151-159
- Shen, H. S., D. B. Ni and F. Sundstol. 1998. Studies on untreated and urea-treated rice straw from three cultivation seasons: 1. Physical and chemical measurements in straw and straw fractions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 73:243-261.
- Silverstein, R.A., Chen Y., Sharma-Shivappa R.R., Boyette M.D. and Osborne, J. 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*, 98: 3000–3011.
- Sims, R. 2003. Biomass and resources bioenergy options for a cleaner environment in developed and developing countries; *Elsevier Science*: London, UK.
- Singh, K., Punia, A.K., Singh, S., 1996. Biotransformation of crop residues into animal feed by solid state fermentation. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 55: 472.
- Sorensen, L.H. "Duration of aminoacid metabolites formed in soils during decomposition of carbohydrates", *Soil Sci.*, 104:234-241, (1968).
- Stead, D.E., 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* sp. By using cellular fatty acid profiles, *Int. J. Systematic Bacteriology*, 42, 281.
- Subramaniyan, S. and Prema, P. "Biotechnology Of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, And Application", *Critical Reviews In Biotechnology*, 22(1):33-64, (2002).
- Sun, Y. and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology*, 83: 1-11.
- Swe, K.T., 2011. Screening of potential lignin-degrading microorganisms and evaluating their optimal enzyme producing culture conditions. MS Thesis, Department of Chemical and Biological Engineering Industrial Biotechnology, Chalmers University of technology, Göteborg, Sweden.
- Şık, S. ve Ünyayar, A., 1998. Pamuk Sapı ile *Phanerochaete chrysosporium* ve *Funalia trogii*'nin Yarı-Katı Fermentasyonu Sonucu Oluşan Lakkaz, Peroksidaz, Ligninaz ve Selülaz Aktiviteleri. *Tr. J. of Biology*, 22 (1998), 287-298.
- Taherzadeh, M.J. and Karimi, K. 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *Bioresources*, 2(3): 472-499.
- Taherzadeh, M.J. and Karimi, K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Science*, 9: 1621-1651.
- Talebnia, F., Bafrani, M.P., Lundin, M. and Taherzadeh, M.J., 2008. Optimization study of citrus wastes saccharification by dilute acid hydrolysis. *BioResources*, 3:108-122.
- Talebnia, F., Karakashev, D. and Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 101: 4744-4753.
- Temiz, A., 1996. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Trojanowski, J.U., Haider, K. and Sundman, V. "Decomposition of ¹⁴C-labelled lignin and phenols by a *Nocardia* species", *Arch. Microbiol.*, 114:149-153, (1977).

- Tuncer, M. and Ball, A.S. "Degradation of lignocellulose by extracellular enzymes produced by *Thermomonospora fusca* BD25", Appl. Microbiol. Biotechnol., 58:608-611, (2002).
- Tuncer, M., Ball, A.S., Rob, A and Wilson, M.T. "Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25", Enzyme and Microbial Technology, 25:38-47, (1999).
- Updegraff, D.M. 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials *Analytical Biochemistry*, 32(3): 420–424.
- Vadiveloo, J., 2000. Nutritional properties of the leaf and stem of rice straw. *Animal Feed Science and Technology* 83: 57-63.
- Vadiveloo, J., 2003. The effect of agronomic improvement and urea treatment on the nutritional value of Malaysian rice straw varieties. *Animal Feed Science and Technology* 108: 133-146.
- Van Dyke, N. J. and Anderson, P. M., 2000. Interpreting a forage analysis. Alabama cooperative extension. Circular ANR-890.
- Vansoset, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A., 1991. Method for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nostarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74:3583-3597.
- Van Soest, P. J. 2006. Review: rice straw, the role of silica and treatments to improve quality. *Anim. Feed Sci. Technol.* 130: 137-171
- Vauterin L., Yang P., Swing J., 1996. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. *Int. Journal of Systematic Bacteriology*, 298-304.
- Vu, D. D., I. X. Cuong. C. A. Dung and P. H. Hai. 1999. Use of urea-molasses-multinutrient block and urea-treated rice straw for improving dairy cattle productivity in Vietnam. *Prev. Vet. Med.* 38: 187-193.
- Waksman, S.A. and Cordon, T.C. "Thermophilic decomposition of plant residues in composts by pure and mixed cultures of microorganisms", *Soil Sci.*, 47:217-224, (1939).
- Wayne Moss C., Samuels S.B., Liddle J., McKinney R.M., 1973. Occurrence of branched-chain hydroxy fatty acid in *Pseudomonas maltophilia*. *Journal of Bacteriology*, 12, 1018-1024.
- Wenzel, M., Schöning, M., Berchtold, M., Kampfer, P. and König, H., 2001. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 32-40.
- Wilkie, K.C.B. "The hemicelluloses of grasses and cereals", *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 36:215-264, (1979).
- Yang, B. and Wyman, C.E. 2008. Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2(1): 26–40.
- Zadrazil, F., Puniya, A.K., Singh, K., 1995. Biological upgrading of feed and feed components. In: Wallace, R.J., Chesson, A. (Eds.), *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, pp. 55–70.

- Zhong, W., Zhang, Z., Luo, Y., Sun, S., Qiao, W. and Xiao, M., 2011. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. *Bioresource Technology*, 102: 11177-11182.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Erzurum’da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2006 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü’nden 2011 yılında Tezsiz Yüksek Lisans derecesi ile mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji Bilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.