

**ANKARA KEÇİLERİNDE AYÇİÇEĞİ KÜSPESİ VE ÜRENİN
RUMENDE MİKROBİYAL PROTEİN SENTEZLEME
VERİMLİLİĞİNE ETKİLERİ**

**(The Effects of Sunflower Seed Meal and Urea Upon Microbial
Protein Synthesis in the Rumen of Angora Goats)**

Nurcan ÇETİNKAYA*

Hüseyin ÖZCAN *

Serap ULUTÜRK *

Tayfur BAKİOĐLU *

SUMMARY

The effects of protein and non-protein nitrogen sources (sunflower seed meal and urea) upon microbial protein synthesis in the rumen of Angora goats were investigated. Three Angora goats of 40-45 kg live weight and approximately 5 year-old fitted with ruminal and abomasal (T -type) cannulas were housed in an individual pens. The animals were randomly allocated to the treatments according to 3 x 3 latin square desing and fed with control diet consisted of barley and grass hay (A) (15.45 MJ ME/d. head, 13.50 g RDN/d. head), control diet supplemented with urea (B) (15.45 MJ ME/d. head, 20.4 g RDN/d. head) and sunflower seed cake (15.45 MJ ME/d. head, 20.4 g RDN/d. head) (C). Diets were given by authomatic feeders. At each period 200 µCi / d Na² ³⁵S04 was infused with infusion pump. ³⁵S labelled cysteine and methionine were isolated from collected abomasal samples and activity of ³⁵S labelled amino acids were counted. Specific activity of total non-ammonia nitrogen (NAN) was analysed in total abomasal samples. Daily flow rate of OM and NAN from rumen to abomasum were determined by using solide (Cr₂ O₃) and liquid phase flow markers (PEG).

The estimated efficiency of microbial protein synthesis in the rumen for diets A, B and C were 23, 33 and 30 g MN (mikrobiaal azot)/kg ADOM (Apparently Digestible Organic Matter) respectively. In conclusion, supplementation of control diet with sunflower seed cake and urea /NPN) were positively affected the microbial protein synthesis in the rumen of Angora goats. The effects of protein and non-protein nitrogen sources on microbial protein synthesis were similar.

* : TAEK, Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Arařt. Enstitüsü, 06852-Lalahan / ANKARA.

ÖZET

Rumende mikrobiyal protein sentezleme verimliliği üzerine protein yapısında olan ve protein yapısında olmayan azot kaynakları. sırasıyla ayçiçeği tohumu küspesi ve ürenin etkisi incelendi. Denemede rumen ve abomasumuna kanül takılmış 5 yaşlı, 40-45 kg üç baş Ankara keçisi kullanıldı. Hayvanlar 3x3 Latin kare düzenine göre arpa ve kuru çayır otundan hazırlanan kontrol rasyonu (A) (15,45 MJ ME / gün. baş, 13.50 g RDN (rumende parçalanabilir azot) / gün baş), kontrol rasyona üre (15.45 MJ ME / gün baş, 20.4 g RDN / gün baş) (B) ve ayçiçeği tohumu küspesi (15,45 MJ ME / gün baş, 20.4 g RDN / gün, baş (C) eklenerek otomatik yemleyicilerle beslendi. Her bir dönemde rumene 200 µCi / gün Na³⁵S₀₄ infüzyonu yapıldı. Toplanan abomasum örneklerinden ³⁵S ile işaretlenen sistin ve metiyonin ayrıldı ve amonyak olmayan azot başına ³⁵S belirlendi. Ayrıca rumenden abomasuma geçen günlük OM ve NAN (non-ammonia nitrogen) miktarlarını belirlemek için katı ve sıvı faz akış markırları olarak Cr₂ O₃ ve PEG kullanıldı.

Rumende mikrobiyal protein sentezi verimliliği rasyon A, B ve C için sırasıyla 23, 33 ve 30 g MN (Microbial nitrogen)/kg ADOM (Görünür Sindirilebilir Organik Madde) olarak hesaplandı. Sonuç olarak protein yapısında olan (ATK) ve protein yapısında olmayan (üre) azot kaynaklarının rumende mikrobiyal protein sentezi üzerine etkisi kontrol rasyonuna göre sentezi artırıcı yöndedir, fakat kendi aralarında önemli bir fark gözlenmemiştir.

GİRİŞ ve LİTERATÜR ÖZETİ

Mikrobiyal maddenin akışı ve dağılımı her zaman ilgi odağı olmuştur ve olmayada devam edecektir. Çünkü mikroorganizmalar hayvan tarafından direkt olarak kullanılmayan substratların parçalanmasından ve düşük kaliteli bitkisel protein ve protein yapısında olmayan azotun hayvan tarafından kullanılabilir mikrobiyal proteine çevrilmesinden sorumludurlar.

Ruminantlarda ince barsağa gelen amonyak yapısında olmayan azotun (NAN) kaynaklarını rumende sentezlenen mikrobiyal protein, rumen fermentasyonundan kaçan yem proteini, dökülen epitel hücreler ve abomasal-sekresyon oluşturur (9). Son zamanlardaki araştırmalarda bunların kantitatif tayinleri, yem maddeleriyle ve beslenme durumları ile nasıl değiştikleri, yem proteininin değerlendirilmesi ve günlük protein ihtiyaçlarının hesaplanması ile ilgili yeni metodların temelini teşkil etmektedir (1, 2, 5, 10, 13, 17). Yem proteini ve mikrobiyal proteinin her ikisinde katkısı; NAN nın ince barsağa geçişinden ve abomasal veya duodenal digestadaki toplam NAN un mikrobiyal NAN kısmının tayin edilmesi ile hesaplanmaktadır.

İnce barsağa gelen azotlu bileşiklerdeki mikrobiyal kaynaklı NAN kısmını tayin etmek için farklı metodlar kullanılmaktadır. Modern metodlar endojen (RNA, DAPA, AEPA, AAP ve purin türevleri) veya ekzojen (^{35}S , ^{35}N veya ^{32}P) mikrobiyal markırların kullanılmasına dayanılmaktadır. Genel olarak izotopik metodlar bakteri ve protozoayı işaretlediklerinden dolayı tercih edilmektedir. ^{35}S metodunun kullanılması ^{35}N e göre ölçümünün basitliği ^{32}P ye göre radyasyon güvenliği yönünden avantajlıdır (9). Mikrobiyal verimin ölçülmesi için şimdiye kadar geliştirilmiş metodların hepsinde birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (13). Purin türevleri tekniği (3) pratikliği yönünden avantajlı görülmesine rağmen standardize edilmesine gerek vardır.

Bu çalışmada ^{35}S infüzyon metodu kullanılarak Ankara keçisi rumeninde mikrobiyal protein sentezleme verimliliği üzerine ayçiçeği tohumu küspesi ve ürenin etkisi incelenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Rumen ve abomasumuna kanül takılmış 5 yaşlı üç baş Ankara keçisi tekesi (40-45 kg) kullanıldı. Denemeler 3 x 3 latin kare düzenine göre yürütüldü. Keçiler otomatik yemleyici kullanılarak kontrol rasyon (Kuru çayır otu + arpa, 15,45 MJ ME / gün, baş, 13.5 g (RDN) / gün, baş (A), kontrol rasyon + üre (B) ve kontrol rasyon + ayçiçeği tohumu küspesi (C) (15,45 MJ ME / gün, baş, 20.4 g RDN / gün, baş) ile beslendi. Rumende mikrobiyal protein sentezleme verimliliğini belirlemek için İAEA- TECDOC (6)'da verilen ^{35}S -infüzyon metodu kullanıldı.

Abomasuma rumenden günlük geçen OM ve NAN akış hızının tayini

Organik madde NAN akış hızlarının tayini ve hesaplamalarında İAEA- TECDOC (6)'da belirtilen metot uygulandı.

Krom oksit (Cr_2O_3 , 6 g) ve 6 g polietilen glikol (PEG, M. W 4000, 10 mL % 60 lık PEG) rumen kanülü yoluyla 2 hafta süreyle verildi. Denemenin başlamasından 15 gün sonra abomasumdan 3 saat aralıklarla 50 mL lik 8 örnek alındı ve örnekler birleştirildi. (50 x 8 = 400 mL). 16. gün 4 saat aralıklarla rumen örneği 1 gün süre ile alındı ve birleştirildi. Abomasum örneği 30.000 g de 30 dk. santrifüjlendi, sıvı fazlada PEG (16) ve $\text{NH}_3\text{-N}$ (7), katı fazlada OM, Cr (16), toplam N (15) tayinleri yapıldı. Toplanan rumen içeriği iki kat tülbentten süzüldü ve 30.000 g' da 30 dk. santrifüjlendi. Oluşan pelet karışık rumen bakterileri dondurularak kurutuldu ve OM, toplam N tayin edildi. Sıvı fazda $\text{NH}_3\text{-N}$ tayin edildi.

³⁵S İnfüzyon çözeltisinin hazırlanması ve infüzyonu

³⁵S infüzyon çözeltisinin hazırlanması ve infüzyonu İAEA- TECDOC (6)'a göre yapıldı.

1 μ Ci ³⁵S-Na₂SO₄ (1.42 mg Na₂SO₄) içeren aktivitenin olduğu şişeye 5 mL soğuk sodyum sülfat (2.0 g / L Na₂SO₄) çözeltisi eklenerek karıştırıldı (şişedeki aktivite 200 μ Ci /mL). Bu çözeltiden 1 mL alınarak 250 ml' ye soğuk sodyum sülfat çözeltisi ile tamamlandı ve infüzyon için kullanıldı (200 μ Ci Na³⁵SO₄ + 500 mg soğuk veya kararlı Na₂ SO₄ /250 mL). İki günlük infüzyon için 400 μ Ci Na³⁵SO₄ + 1000 mg Na₂SO₄/500 mL hazırlandı. İnfüzyon pompası kullanılarak 10 mL / saat akış hızında rumen kanülü yoluyla 2 gün infüzyona devam edildi. Birinci günün sonunda abomasum örneği belirli aralıklarla 50 mL alınarak 1 günde toplam 500 mL alındı. İkinci gün sonunda infüzyon sonlandırıldı. Toplanan örnek iyice karıştırılarak 100 mL' si ayrıldı ve freez-dryer da kurutuldu.

Abomasum Örneğinde toplam ve mikrobiyal kısımda ³⁵S spesifik aktivitesinin tayini

400 mL abomasum örneğinden 25 mL iki örnek toplam sayım, NH₃-N ve toplam N tayini için ayrıldı. Kalan 350 mL örnek 2800 g de 10 dk. santrifüjlendi. Sıvı faz alındı ve çökelek atıldı. Sıvı faz 20.000 g de 30 dk. 2 °C de santrifüjlendi. Oluşan çökelek 2 kez distile su ile yıkanarak santrifüjlendi ve mikrobiyal çökelti 5 mL suda çözüldü. Mikrobiyal süspansiyon ve total abomasum digesta örneklerinden 200 mg kuru madde verecek miktarlar altı yuvarlak cam balonlara (100 mL lik) kondu. Balonlara 200 mL performik asit (18 mL % 90 lık formik asit + 2 mL H₂O₂) eklendi ve ağızları kapatılarak + 4°C da 16 saat bekletildi. Bu basamakta ³⁵S... ³⁵SO₄' sistin ve metiyonin daha kararlı sistik asit ve metiyonin sülfona çevrilmektedir. Karışıma 3 mL HBr eklendi ve düşük basınç altında 40 °C da rotary evaporatör ile hafif nemli oluncaya kadar kurutuldu. Balonlara 5 mL 6M HCl eklendi ve hidroliz tüplerine aktarıldı. Hidroliz tüpleri geri soğutucu altında 110 °C de 21 saat hidrolize bırakıldı. Hidrolizat s üzüldü ve rotary evaporatörde kuruluğa kadar tutuldu. 6 mL distile su eklenerek çözüldü ve santrifuj tüplerine aktarıldı. Karışıma 1 mL doymun BaCl₂ eklenerek karıştırıldı ve düşük hızda santrifüj edilerek çöken BaSO₄ ayrıldı. Sıvı fazdan 1 mL alınarak ³⁵S aktivitesi likit sintilasyon sayacına sayıldı. Aynı Sıvı fazda toplam N ve NH₃-N tayin edilerek NAN hesaplandı. Mikrobiyal fraksiyonda NH₃-N olmadığından bu örnekte toplam ³⁵S aktivitesi NAN daki total aktiviteyi ver-

mektedir. Bütün abomasal digestadaki spesifik aktivite (SAT) ve mikrobiyal çökelekteki spesifik aktivite (SAM) hesaplandı.

Abomasum digesta örneğinde bulunan toplam NAN un mikrobiyal-N miktarı SAT/SAM oranından hesaplandı. 1-SAT/SAM eşitliği ile by-pass protein miktarı rasyonun toplam protein içeriğinde by-pass protein miktarı çıkarılarak rumende parçalanmış protein (RDN) hesaplandı. Sıvı ve katı faz akış markırlarının kullanılmasıyla OM ve NAN nın abomasuma geçen günlük hesaplanan miktarları kullanılarak rumende mikrobiyal protein sentezleme verimliliği g MN/kg ADOM olarak belirlendi.

BULGULAR ve TARTIŞMA

^{35}S in $\text{Na } ^{35}\text{SO}_4$ şeklinde rumene infüzyonuyla rumen ortamında hızlı bir şekilde indirgenmekte ve kükürt içeren amino asitlerin sentezinde kullanılmaktadır. Mathers ve Miller (9) $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ olarak infüzyonu yapılan ^{35}g in S^{-2} olarak % 17.5 oranında kükürtlü amino asitlere katıldığını bildirmişlerdir. Bizim hesaplamamıza göre bu oranı % 17.0 bulunmuştur ve önerilen değere yakındır ^{35}S metodu her ne kadar en basit metod olarak bildirilmişse de oldukça fazla analitik basamaklar içermektedir.

Her bir rasyonun (rasyon A, B ve C) 3x3 latin kare düzenine göre üç keçide ortalama mikrobiyal protein sentezleme verimliliği sırasıyla 23, 33, ve 30 g MN/kg ADOM olarak hesaplandı. Kontrol rasyon ve kontrol rasyona üre ve ATK eklenmesiyle hesaplanan verimler Mc Allan ve Smith (10) tarafından yayınlanmış RNA metoduna dayanan sonuçlara yakındır. Kontrol rasyon için 18.3, kontrol rasyon - üre için 28.4 ve kontrol rasyon -balık unu için 29.1 g MN/kg ADOM bulmuşlardır. Aynı rasyonlar için verim DAPA metoduyla daha az hesaplanmıştır. Sırasıyla 13.2, 19.7 ve 25.8 g MN/kg ADOM. DAPA metodu protozoal fraksiyonu hesaba katmamaktadır. Bazı durumlarda tam tersine bakterilerin lizisi fazla olursa mikrobiyal verim daha yüksek hesaplanabilmektedir (13). Rumende mikrobiyal protein sentezleme verimliliği yem maddelerine ve beslenme durumuna göre değişmektedir. Whitelaw ve ark. (17)'nin ^{35}S metodu kullanarak ve 50:50 (kaba yem : konsantre yem) oranında yemleme yaparak hesapladıkları verim 25.6 g MN/kg ADOM dir. Kontrol rasyon için hesaplanan sonuca yakındır. Mikrobiyal protein sentezleme verimini hesaplamak için 2,6- diaminopimelik asit (DAPA), 2- aminoetilfosforik asit (AEPA) ve ^{35}S metodlarının karşılaştırıldığı iki çalışmada (16, 17) tekrarlanabilir ve güvenilir metod olarak ^{35}S metodu önerilmektedir.

Cerkawski (4) rumende mikrobiyal verimin 10 ile 70 g MN/kg sindirilen OM arasında değiştiğini ve 126 araştırma sonuçlarının ortalama 32 g MN/kg DOM olduğu bildirilmiştir. Rasyon B ve C için hesaplanan ortalama değerler 33 ve 30 g MN/kg ADOM, bildirilen sınırlar arasında ve ortalama değere oldukça yakındır. Ayrıca rasyon A, B ve C nin rumende protein parçalanabilirlikleri de hesaplandı. Sırasıyla %75, %83 ve %78 bulundu. Üre eklenen rasyonda (B) parçalanabilirliğin nispeten yüksek oluşu normaldir. Bu mikrobiyal verime de yansımıştır. Rasyon A, B ve C için hesaplanan mikrobiyal protein sentezi değerleri aynı metodu kullanılarak Ling ve Buttery (8) tarafından bildirilen sonuçlara yakındır.

SONUÇ

Üre ve ATK nin rasyona katılımları kontrol rasyona göre rumende protein sentezleme verimliliğini artırıcı yönde etkisi olmuştur. Üreli ve ATK eklenen rasyonlar arasında farkın olmaması rumende mikroorganizmaların N ihtiyacının her iki kaynaktada yeterli oranda karşılandığını göstermektedir. Kontrol rasyon için bulunan ortalama değerlerin rumende ortalama olarak gerçekleşmesi gereken protein sentezleme verimliliği 32 g MN/ kg DOM değerinden (4) düşük olması Ankara keçileri rasyonuna azotça zengin kaynakların eklenmesi gerekliliğini göstermektedir.

LİTERATÜR LİSTESİ

1. AGRİCULTURAL RESEARCH COUNCIL (1984):*The nutrient requirements of ruminant livestock*. Suppl. I. Commonw Agric. Bur. Slough Engl.
2. AFRC TECHNICAL COMMITTEE ON RESPONSES TO NUTRIENTS REPORT NO 9 (1992) : *Nutritive Requirements of Ruminant Animals. Protein Nutrition Abstracts and Reviews (Series B) 62 (12) 789-835.*
3. CHEN, X. B., CHEN, f. K., FRANKLİN, M. F., ORSKOW, E. R. AND SHAND, W. J. (1992a) : *The effect of feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep*. J. Anim. Sci., 70 1534-1542.
4. CZERKAWSKİ, J. W. (1978) : *Reassessment of synthesis of microbial matter in the rumen* J. Dairy Sci. 61, 1261-1270.
5. İNRA (1978) : *Alimentation des Ruminants*, Versailles İNRA Publications.

6. LABORATORY TRAINING MANUEL ON THE USE OF NUCLEAR TECHNIQUES IN ANIMAL NUTRITION IAEA, VIENNA (1985) : Tech. Reports series No:248.
7. MARKHAM. R. (1942) : *Steam distillation apparatus suitable for micro kjeldahl analysis*. Biochem J 36: 790-794.
8. LING, J. R., AND BUTTERY, P.J. (1978) : *The simultaneous use of ribonucleic acid, ³⁵S, 2,6-diamino pimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid as markers for microbial nitrogen entering the duodenum of sheep* Br. J. Nutr. 39: 165-176.
9. MATHERS, J. C., and MILLER, E. L. (1980) : *A simple procedure using ³⁵S incorporation for the measurement of microbial and undegraded food protein in ruminant digesta*. Br. J. Nutr. 43, 503-514
10. MC ALLAN, A. B. AND SMITH. R. H. (1984) : *The efficiency of microbial protein synthesis in the rumen and the degradability of feed nitrogen between the mouth and abomasum in steers given different diets*. Br. J. Nutr. 51: 77-83.
11. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1985) : *Ruminant Nitrogen Usage*. Natl. Acad Sci., Washington, DC.
12. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (1989) : *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 6th rev. ed Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
13. ORSKOW, E. R. (1982) : *Protein Nutrition in Ruminants*. Academic Press, Harrcourt Brace Jovanovich Publishers. Chap 3, p. 63.
14. SIDDONS, R. C., NOLAN. J. V., BEEVER, D. E., AND MAC RAE. (1985) : *Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of N*. Br. J. Nutr. 54: 175-185.
15. SMITH, R. H. AND MC. ALLAN, A. B. (1970) : *Nucleic acid metabolism in the ruminant 2. Formation of microbial nucleic acids in the rumen in relation to the digestion of food nitrogen and the fate of dietary nucleic acids*. Br. J. Nutr. 24: 545-556.
16. WELLER, R. A., PILGRIM, A. F., AND GRAY, F. U. (1971) : *Level of food intake and the passage of markers and nitrogen along the alimentary tract of sheep*. Br. J. Nutr. 26: 487-497.
17. WHITELAW, F. G., MARGARET EADIE, J., BRUCE, L. A. AND SHAND, W. J. (1984) : *Microbial protein synthesis in cattle given roughage-concentrate diets : the use of 2,6 -diamino pimelic acid, 2-aminoethylphosphonic acid and ³⁵S as markers*. Br. J. Nutr. 52: 249-260.