

III. DERLEMELER

ÇAYIR MER'A ve YEM BİTKİLERİNDE YAPISAL OLMAYAN KARBONHİDRATLARIN ANALİZ METODLARI

İbrahim MANGA¹

Ö Z E T

Çayır mer'a yem bitkilerinden 20-30 bitki analiz için kökleriyle sökülür. Analizi yapılacak kısım kesilir, yıkanır, kurutulur, elenerek kutulara konur.

Şimdiye dek yapılan analizlerde; hidrolizde, % 80' lik ethanol, soğuk su, sıcak su, 0.005'ten 0.8 N'e dek değişen H₂SO₄ solusyonları; sakkarifikasyonda Clarase, Diazyme gibi enzimler veya bunların karışımları kullanılmıştır.

Asitlerle tamamen hidrolize edilmediği için yedek karbonhidratları nişasta şeklinde depo eden yem bitkilerinin analizinde enzim metodu kullanılmaktadır.

Asitler, früktozanları hidrolize edebilmektedir. Ancak, 0.02N'den daha kuvvetli H₂SO₄ solusyonları früktozanları tahrip etmektedirler.

Hidrolize veya sakkarifiye edilmiş eriyikler Shaffer-Somogy metoduyla «Reagent 50» ayırıcı yardımıyla glikoza dönüştürüldükten sonra titre edilerek örneklerdeki yapısal olmayan karbonhidratlar (TNC) glikoz cinsinden saptanmaktadır.

GİRİŞ

Weinmann (1947) bitkilerdeki toplam elverişli karbonhidratların tayini için ilk defa ortaya bir metod koyan kişidir.

Genel olarak, serin mevsim yem bitkilerinin yedek besin maddelerini früktozanlar, ılık mevsim bitkilerinin yedek besin maddelerini früktozanlar, ılık mevsim bitkilerinin ise nişasta teşkil etmekte-

(1) Atatürk Üniversitesi Zir.Fak. Tarla Bitkileri Bölümü Doçenti.

dir. Bu iki polissakkarit, enerji kaynağı olarak aynı şekilde rol oynarlar. Ancak analizlerinde değişik yol izlenmesi gereklidir.

A. Örneklerin Alınması ve Analiz İçin Hazırlanması:

Wolf ve arkadaşları (1962), Dobrenz ve Massengale (1962) Cooper ve Watson (1968)'un belirttikleri üzere her işlemin bütün tekerürlerinden 20-30 bitki kazma veya sivri uçlu bellerle çıkarılır. Analiz yapılacak kök bölgesi veya taç kısmı kesilip ayrılır. Genellikle baklagil köklerinin toprak yüzeyine yakın 15 cm'lik kısımları analiz edilir. Bu kök bölgesinin seçilme nedeni baklagillerde bu kısımda daha fazla yedek besin maddeleri ihtiva etmesidir.

Nitekim Bryant (1967) 4, 16, 28 aylık yonca köklerinin 0-5 cm., 5-10 cm. 10-20 cm. ve 30-60 cm.'lik kısımlarının ihtiva ettiği karbonhidrat oranları bakımından çok önemli farklılıklar olduğunu, en yüksek karbonhidrat miktarının 0-5 cm. ve 10-20 cm. lik kısımlarının teşkil ettiğini belirtmektedir.

Yıkayıp, temizlenen kökler solunum kayıplarını önlemek ve solunumdaki enzim faaliyetini durdurmak üzere 100°C de iki saat ve geri kalan kurumayada 24 saat 70°C de devam edilir. Kuruyan kökler öğütülür. 0.42 mm'lik elekten elenerek analiz yapılmak üzere aliminyum kutulara konulur.

B. Kullanılan Karbonhidrat Tayin Metodunun Seçimi:

Çayır mer'a ve yem bitkilerinin köklerindeki toplam elverişli karbonhidratların (TAC) miktar olarak tayin edilebilmesi için yapısal karbonhidratların minimum, yapısal olmayan polisakkaritlerin, sakkaroz, früktoz ve glükozun ise azami seviyede depolanan dokulardan çıkarılarak früktozun tahrip edilmeksizin hidrolizine ihtiyaç vardır (Greub ve Wedin, 1969).

Poli ve disakkaritlerin bir değerli şekerlere dönüştürülmeleri sakkarifiye veya hidrolize ile temin edilebilir. Sakkarifikasyon'da Clarase, Diazyme gibi enzimler veya bunların karışımları; hidrolizde % 80'lik etanol, soğuk su, sıcak su, 0.005'ten 0.8 N'e kadar değişen H₂SO₄ kullanılmaktadır. Sakkarifiye veya hidrolize edilmiş şekerler ise kâğıt kromatografisi, polari metre, spektrophotometre veya çeşitli kimyasal ayıraçlarla belirli şekerlere çevrildikten sonra miktarları tayin edilmektedir. Nitekim Loomis (1935) Früktoz, glikoz ve sakkaroz'un % 80'lik etanol ile aynı zamanda ekstrake edilebileceğini, daha sonra nişasta kısmının enzim sakkarifikasyonu (Grabber 1927, Loomis 1935) veya asit hidrolizi (Hassid ve Nevfeld 1964) ile bir değerli şekerlere dönüştürülebileceğine işaret etmişlerdir.

Bazı araştırmacılar H₂SO₄ solusyonları kullanarak bir operasyonla karbonhidratları ekstrake ve

hidrolize etmeye teşebbüs etmişlerdir (Reynolds ve Smith 1962; Smith ve arkadaşları 1964). Bununla beraber Grotelueschen ve Smith (1967), Loomis (1927) gibi araştırmacılar nişastanın hidrolizinin sakkaroz ve früktozanlardan daha güçlü olduğunu belirtmişlerdir.

Burris ve arkadaşları (1967) tarafından, bitkilerin ihtiva ettiği (TAC) seviyeleri dikkate alınmaksızın, (TAC)'nin ekstraksiyonlarında H_2SO_4 solusyonları, su, alpha amylase ve clarase 900 metodlarıyla örnekte şekere dönüşebilen nişasta miktarı bulunmuştur.

Grotelueschen ve Smith (1967) yonca kökleri ve kelp kuyruğu gövdesindeki yapısal olmıyan karbonhidratları ekstrake etmek için takadiase, soğuk su, sıcak 0.005, 0.02, 0.2 ve 0.8 N H_2SO_4 kullanılmış ve ekstraktlar kağıt kromatografisi ve titrasyonla değerlendirildiğinde soğuk su ile yonca köklerinden maltoz, rafinoz ve bazı dekstrinlerin ekstrake edildiğini; takadiase ekstraksiyonu sonucunda suda kalan artığın esas olarak glikoz olduğunu sıcak 0.005 N H_2SO_4 ile bütün früktozanların sakkaroz, glikoz ve früktoza dönüşmesine rağmen, kuvvetli asitlerin yaptığı gibi nişasta veya ham sellülozu hidrolize etmediğini 0.02 N H_2SO_4 'ten kuvvetli asitlerin früktozu tahrip ettiğini, 0.8N H_2SO_4 ile dahi nişastanın tamamının glikoza hidrolize olmadığını bildirmektedirler. Yine Smith ve arkadaşları (1964) yapmış oldukları araştırmada yem bitkileri türlerinde yapısal olmıyan karbon-

hidratlardan nişastanın 0.2 N H_2SO_4 le tamamen glikoza dönüştürülemediği, daha yüksek konsantrasyonların ise früktozu tahrip ettiğine işaret etmektedirler.

Bundan dolayı Greub ve Weid (1969) iki ticari enzim olan Clarase 900 ve Diazyme 160 kullanarak baklagil köklerinde karbonhidratların ekstraksiyon ve sakkarifikasyonunun asitlerle mukayesesinde kullanmışlardır. 0.2N H_2SO_4 ekstraksiyon metoduyla yonca köklerinden çıkarılan (TAC) değerleriyle, enzim metodlarının değerini mukayese ettiklerinde önemli derecede fazla sakkaroz ve önemli derecede az nişastanın enzim metodlarıyla elde edilen ekstraksiyonlarda kaldığını görmüşlerdir. Yine aynı araştırmacılar, enzim kombinasyonunun (TNC)'nin nisbi olarak yüksek, nişastanın başlıca karbonhidrat fraksiyonu olduğu yaz sonları ve sonbaharda 0.2N H_2SO_4 'e nazaran 2-3 deha daha yüksek değer verdiğini; (TNC) seviyeleri düşük olduğu zaman ise asit metodunun önemli derecede yüksek değerler verdiğini; erken ilkbahar boyunca (TNC)'nin en büyük fraksiyonunun sakkaroz olduğunu ve bu iki tarih arasında (TNC)'nin orta değerde olduğu zamanlarda her iki metoddan da birbirine benzer değerler elde ettiklerini ifade etmişlerdir.

Wolf (1969) muhtelif baklagillerin vegetatif organlarından aldığı örnekleri, asit, su ve enzimle ekstraksiyonu yapılan işlemleri kimyasal ayırıcılarla bir değerli şeker-

lere dönüştürerek ve anthrone ayıracı kullanarak kolorometrik metodlarla miktar analizi yapmıştır. Ekstraksiyon için 0.005'den 0.8 N'e kadar artan asitlerle hidrolizinde, ölçülen % CHO oranını artırdığını mamafih bir miktar artışın anthrone ayıracıyla yapılanda da vukua geldiğini, 0.005N H₂SO₄ ile ekstraksiyondan sonra Anthrone ayıracıyla miktar analizi yapılanların; enzim metoduyla yapılanlara yakın değerler verdiğini ve bu denemelerin, metodların değişik olduğu yerlerde, elde olunan sonuçların literatür içerisinde mukayesesinde bir rehber olabileceğini, ekstraksiyon ve bir değerli şekerlere dönüştürme yollarından dolayı CHO muhteiyatlarının geniş ölçüde değişebileceğini bildirmektedir.

İşte yukarıda zikredilen bütün bu münakaşaların ışığı altında serin mevsim yem bitkilerinin analizinde Smith (1962) Cooper ve Watson (1968) ve diğer bir çok araştırmacıların belirttiği üzere (TAC) veya (TNC)'nin tayininde hidrolizasyon 0.2N H₂SO₄ sıcak solusyonu; ılık mevsim yem bitkilerinin analizlerinde ise enzim ile (Smith 1968), glikoza dönüştürme Reagent 50 ile sağlanarak titrasyon metoduyla miktarı ölçülmektedir.

C. Düzeltilmiş Weinmann Metoduyla örneklerden toplam yapısal olmıyan karbonhidratların çıkarılması:

(1) 125 cc. lik erlenmayer içe-

risine 100-500 mg. örnek tartılır ve üzerine 15 ml. saf su ilâve edilerek nişastanın jelatinleşmemesi için 1-2 dakika ocakta kaynatılır. Bir veya iki erlenmayer'e sadece saf su konulur (ileride yapılacak hesaplanmalarda kullanılmak üzere).

(2) Erlenmayerler oda sıcaklığına (18-20 °C) kadar soğutulur.

(3) Bu erlenmayerlerin içine pipetle 10 ml. buffer solusyonu ve 10 ml.'de hazırlanmış enzim solusyonundan konulur.

(4) Erlenmayerler 38' °C de 44 saat süreyle inkübasyona tabi tutulur. Bazı örnekler, solusyon seviyesinin üstüne doğru tırmanırsa kapaklı erlenmayerleri çalkalamak icap eder.

(5) İnkubasyon sonunda örnekler, 100 cc.lik balon jöjeler içine Whatman's filtre kağıdından süzülür. Erlenmayer ve süzgeç kağıdı birkaç sefer saf suyla güzelce yıkanmalıdır.

(6) Her balon jöjenin içine % 10'luk kurşun asetat'dan 2 ml. ilâve edilir, çalkalanır ve balon jöje çizgiye kadar saf suyla tamamlanır.

(7) Her balon jöjeden alınan 30 ml. solusyon 50 ml. lik tüplere konur ve 3500-4000 devirde 5 dakika santrifüje edilir.

(8) Santrifüje edilmiş solusyon içerisinde 100 mg. toz potasyum oksalat bulunan erlenmayer-

lere alınır ve Whatman's 42 filitre kağıdı ile süzülür, ancak saf su dahil hiçbir şey ilâve edilmeden daha küçük erlanmeyerlere alınır.

(9) Bu eriyik, yedek besin maddeleri sakkaroz ve nişasta ihtiva eden ılık mevsim çayır mera yem bitkilerinin toplam yapısal olmıyan karbonhidratlarının hidroliz mahsulüdür. Enzimler früktozanları hidrolize etmez. Bunun içindir ki früktozon ihtiva eden serin mevsim yem bitkilerinde toplam yapısal olmıyan karbonhidratların analizleri (D) kısmında açıklandığı üzere asit hidroliz metodu analiz edilir.

(10) Nişasta ve sakkaroz ihtiva eden bu solusyonlardaki şeker muhteviyatı 1.0 - 3.0 mg. ise, bunlar, doğrudan doğruya Reagent 50 ayırıcı ile glikoza dönüştürülerek örneklerdeki yapısal olmıyan karbonhidrat oranları saptanır.

D. Asit Metodu:

(1) Bünyelerinde 1.0—3.0 mg. şeker ihtiva eden örneklerden 0.5 gr. alınıp 100 cc lik ağızları kapaklı erlanmeyerlere konur.

(2) Örnekler üzerine 0.2N lik H_2SO_4 'den 50 ml. ilâve edilir.

(3) Erlanmeyerlerdeki solusyon bir saat 90—95°C sıcak su banyosu üzerine geriye soğutma cihazıyla kaynatılır.

(4) Sıcak solusyon Whatman's I filitre kağıdından süzülerek soğutulur.

(5) Üzerine birkaç damla phenolphtalein damlatılarak % 25 lik NaOH ile pembe renk verene kadar titre edilir ve daha sonra IN-HCl'den teşekkül eden pembe renk giderilene dek birkaç damla damlatılır.

(6) Filtre edilen solusyon 250 ml. ye tamamlanır. Bu solusyon da örnekteki şekerlerin glikoza dönüştürülmesi için hazırdır.

E. Örneklerdeki Şekerlerin Heinz ve Murneekin tarif ettiği Shaffer Somogyi metoduyla glikoza dönüştürülmesi:

(1) 25 x 200 mm. lik tüplere enzim metoduyla hidrolize edilmiş solusyondan 15 ml. suya asitle hidrolize edilenden 10 ml. alınır ve üzerlerine 10 ml. Reagent 50 ilâve edilir.

(2) Aynı şekilde enzim + su + Reagent 50, su + reagent 50; glikoz (0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.0 mg.) + Reagent 50 kontrol tüpler hazırlanır.

(3) Su banyosu içerisinde ağızları mermer kürelerle kaplı tüpler 90 — 100 °C de 15 dakika kaynatılır.

(4) Kaynamış tüpler 30 °C den soğuk su içerisinde soğutulur.

(5) Tüplerin içerisinde 2 ml. potasyum iyodür x potasyum oksalat eriğinden konup üzerlerine 10' ar ml. IN H_2SO_4 ilâve edilir.

(6) Tüpler çalkalanır.

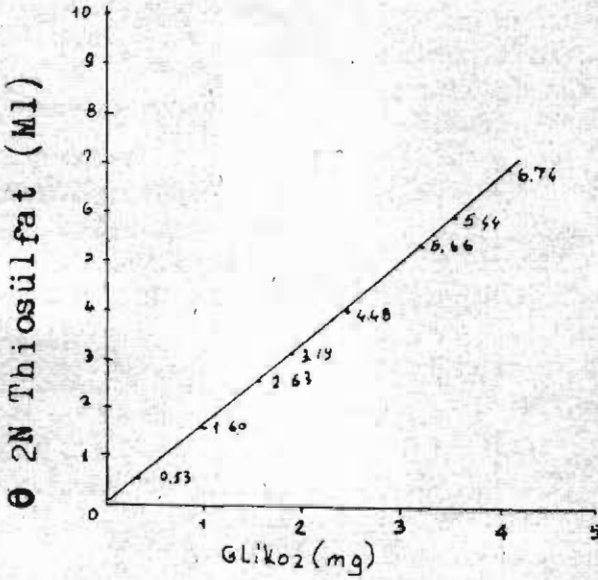
(7) 0.02 N sodyum thiosülfatla nişasta indikatör olarak kullanıla-

rak mavi renk teşekkül edene kadar titre edilir.

(8) Titrasyonda kullanılan sodyum thiosülfat miktarı tesbit edilir.

a — Standart Grifiğin Çizilmesi: İçerisinde 0.5 mg. dan 4.0 mg.'a kadar değişik konsantrasyonlarda saf glikoz ihtiva eden solusyonlar-

dan 10'ar ml. örnek alınarak Heinze ve Murneek'in tarif ettiği Shaffer—Somogyi metoduna göre 15 dakika kaynatılır. Soğuyan değişik konsantrasyonlardaki çözeltiler örnekleri titre ettiğimiz 0.02N thiosülfat solusyonu ile titre edilerek sarfedilen thiosülfat miktarı tesbit edilerek aşağıdaki grafik çizilmiştir.



Şekil: Harcanan Thiosülfata tekabül eden glikoz miktarını gösterir standart grafiği.

b. Enzim metodunda örnekteki şeker miktarının hesabı:

Örneğin:

(a) Su + Reagent 50 solusyonu için 9.80 ml. sodyum thiosülfat.

(b) Su + Enzim + Reagent 50 solusyon 8.95 ml. sodyum thiosülfat.

(c) 2.0 mg. glikoz + Reagent 50 solusyonu için 5.10 ml. sodyum thiosülfat.

(d) Bilinmeyen örnek solusyonu için 4.00 ml. sodyum thiosülfat sarfedilmiş olsun.

$$a - c = 4.70$$

$$b - d = 4.95$$

$$\text{Eriyikteki glikoz} = \frac{2.0}{4.70} \times 4.95 = 2.11 \text{ mg.}$$

Dokulardaki % toplam yapısal olmıyan karbonhidratlar.

$$(\% \text{ TNC}) = \frac{2.11 \text{ mg.} \times \text{sulandırma faktörü} \times 100}{\text{Örnek ağırlığı (mg)}}$$

c. Asit metodunda örnekteki şeker miktarının hesabı:

Örnekteki şeker miktarı her sette blank (boş) örnek için sarf edilen thiosülfat miktarından, bitki örnekleri için sarfedilen thiosülfat miktarı çıkarılarak bulunan thi-

osülfat değerlerine tekabül eden mg. cinsinden glikoz miktarları standart grafiğinden bulunur. Bu değerler 10 ml. örnekteki glikoz miktarıdır. 0.5 gr. örnekteki mg. cinsinden glikoz ve bunun % değeri ise aşağıdaki formülle bulunur.

$$\% \text{ Glikoz} = \frac{100 \times \frac{V_{\text{ö.}} \cdot \text{Ş}_{\text{ö.}}}{V_{\text{h.}}}}{\text{Ö}_{\text{t.}}}$$

100 : Səbit Rakam

$V_{\text{ö.}}$: Yarım gram örneğin tamamlandığı hacim (250 ml.)

$\text{Ş}_{\text{ö.}}$: 10 ml. örnekteki glikoz (Standart grafikten)

V_{h} : Glikoz miktarı tayin edilen eriyik hacmi (10 ml.)

$\text{Ö}_{\text{t.}}$: Tartılan örnek miktarı

F. Analizler için gerekli solus- Solusyonların Hazırlanması: 1. % 0.5 Enzim solusyonu

5 gr. Takadiastase veya Cla-
rase enzimi 1 litre saf su içerisinde eritilir. İçerisinde bir miktar toz Thymol ilâve edilir ve bu eriyik Whatman's 40 filitre kağıdından süzülür. Süzülen bu enzim solusyonu renkli şişelerde buz dolabında 6 hafta kadar saklanır.

2. Buffer Solusyonu:

3 hacim 0. 2N Asetik asit ve 2 hacim 0. 2N sodyum asetat karıştırılarak pH'sı 4.45 olan buffer solusyonu hazırlanır. Solusyonda üreyebilecek çeşitli mikroorganizmaların önlenmesini sağlayan Thymol tozundan bir miktar ilâve edilir. Renkli şişelerde konulur.

3. Reagent 50 ayırıcı

Bir beher içerisine

25 gr. anhidrit sodyum karbo-

nat. 25gr. sodyum potasyum tartarat 600 ml. saf su içerisinde eritilir. Üzerine %10'luk bakır sülfat eriyiğinden 75 ml. konur.

Diğer bir beher içerisinde
20 gr. Sodyum bi karbonat

1 gr. potasyum iyodür ve (3.568 gr. tartılıp 1 lt. ye tamamlanmış) potasyum iyodat eriyiğinden 200 ml ilâve edilir. Sonra her iki beherdeki eriyik karıştırılarak saf suyla bir litreye tamamlanır. Renkli şişelere doldurulur. Ağızları kapatıldığı takdirde birkaç ay bozulmadan saklanabilir.

4. Potasyum iyodür-potasyum oksalat solusyonu:

Haftalık olarak hazırlanması gerekli bu eriyik'e 2.5 gr. potasyum iyodür, 2.5 gr. potasyum oksalat ile karıştırılarak 100 ml. saf su içerisinde eritilir.

5. I. ON H_2SO_4 :

27 ml' konsantre sülfirik asit saf su içerisine konularak 1 Lt. ye tamamlanır.

6. Nişasta İndikatörünün hazırlanması:

Erlanmeyerdeki 10-15 ml. saf su içerisine tahminen 1 gr. eriyebilir nişasta konulup iyice karıştırılır. Daha sonra ayrı bir kaptaki kaynatılmış 100 ml. saf su içerisine 1 gr. borik asit kristalleri ilâve edilir. Daha sonra kaynamış bu saf su içerisine soğuk nişasta solusyonu

dökülür ve bir dakika kadar kaynatılır ve daha sonra yavaş soğumaya bırakılır.

7. 0.02 N Sodyum Thiosulfat :

25 gr. saf sodyum thiosülfat saf su ile bir litreye tamamlanır ve 1gr. kadar sodyum hidroksit ilâve edilerek 0.1 N stok solusyon elde edilir. Karbonhidrat analizlerinde kullandığımız 0.02 N eriği elde edebilmesi için bu stok solusyonun asgari 6 saat renkli şişeler içerisinde dinlendirilmesi gerekir.

Dinlendirilmiş 100 ml. stok solusyon saf suyla 500 ml. ye tamamlanarak 0.02 N sodyum thiosülfat eriği elde edilir.

Bu eriyik stabil olmadığından 2-3 günde bir yapılmalıdır.

O. IN sodyum thiosülfat eriğinin standardizasyonu O. IN potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$) ile yapılır. Bunun için $110^\circ C$ de kurutulmuş $K_2Cr_2O_7$ 'den 4.9033 gr. tam olarak tartılır ve saf suyla 1 lt. ye tamamlanır.

Bu eriyikten alınan 25 ml. genişçe bir beher içerisine konur ve içerisine 3 gr. potasyum iyodür ilâve edilerek saf suyla 500 veya 600 ml. ye tamamlanır ve 10 ml. konsantre HCL konarak derhal elimizde mevcut thiosülfat solusyonuyla titre edilir. Titrasyonun sonuna doğru birkaç damla nişasta indikatörü konur. Solusyon maviden en sonunda açık yeşil renge döner. Eğer thiosülfat saf ise titrasyonda

25 ml. den az thiosülfat sarfedilmiş olacaktır. Sodyum thiosülfat stok solusyonu O. I N'e saf su ile sulandırılarak getirilebilir. Örneğin, titrasyonda 24.7 ml. thiosülfat kullanılmışsa, her 24.7 ml. thiosülfat için 0.3 ml. su veya $975.3/24.7 \times 0.3 = 11.8$ ml. saf su kalan 975.3 ml. thiosülfat solusyonu üzerine ilâve edilir. Su ilâve edildikten sonra O.IN dikromat solusyonu ile tekrar kontrol yapılmalıdır.

LİTERATÜR LİSTESİ

1. BRYANT, H.T., 1967. Carbohydrate distribution in alfalfa as related to fall regrowth and yield of stand. Agron. Abst. 5: 24.
2. BURRIS, J.S., R.H. Brown, and R.A. Blaser., 1967. Evaluation of reserve carbohydrates in midland bermudagrass (*Cynodon dactylon* L.). Crop Sci. 7: 22 - 24.
3. COOPER, C.S., and C.A. Weston., 1968. Total available carbohydrates in roots of sainfoin (*Onobrychis viciaefolia* Scop.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) when grown under several management regimes. Crop. Sci. 8: 83 - 85.
4. DOBRENZ, A.K., and M.A. Masengale., 1966. Changes in carbohydrate in alfalfa (*Medicago sativa* L.) roots during the period of floral initiation and seed development. Crop. Sci. 6: 604 - 607.
5. GRUEB, L.J., and W.F. Wedin., 1969 a. Determination of total available carbohydrates in forage legume roots by extraction with takadiastase, amyloglucosidase, or sulfuric acid. Crop. Sci. 9: 595 - 598.
9. ——— and ———, 1969b. Effects of fineness of grind and periodic agitation on total available carbohydrate values obtained by enzyme saccharification. Crop Sci. 9: 691 - 692.
7. GROTELUESCHEN, R.D., 1968. The development and loss of cold resistance in timothy (*Phleum pratense* L.) and associated changes in carbohydrates and nitrogen as influenced by nitrogen and potassium fertilization. Diss. Abstr. 28: 3136B.
8. ———, and Dale Smith., 1967. Determination and identification of nonstructural carbohydrates removed from grass and legume tissue by various sulfuric acid concentrations, takadiastase, and water. J. Agr. Food Chem. 15: 1048 - 1051.
9. HASSID, W.Z., and E.F. Neufeld., 1964. Quantitative determination of starch in plant tissues. Methods in carbohydrate chemistry. Academic Press, N. Y. IV: 33 - 36.
10. HEINZE, P.H., and A.E. Murnek., 1940. Comparative accuracy and efficiency in determination of carbohydrates in plant

material. Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 314.23 p.

11. LOOMIS, W.E., 1927. The determination of soluble carbohydrates. *Plant Physiol.* 2: 195 - 204.
12. MANGA, İ., 1971. Otlatmanın yonca ve korunganın köklerinde biriktirilen yedek besin maddelerine etkisi. *Ata. Üni. Zî. Fak. (2) 2 S:* 48 - 62
13. ———, 1974. Yonca ve korungada değişik olgunluk devrelerinde yapılan biçmelerin otun kalitesine ve yedek besin maddelerine etkisi üzerinde bir araştırma (doçentlik tezi basılmamış).
14. REYNOLDS, J.H. and Dale Smith., 1962. Trend of carbohydrate reserves in alfalfa, smooth brome grass, and timothy grown under various cutting schedules. *Crop Sci.* 2: 333 - 336.
15. SHAFFER, P.A., and M. Somogi., 1933. Copper - Iodometric reagents for sugar determination. *J. Biol. Chem.* 100: 695 - 713.
16. SMITH, D., G.M. Paulsen, and C.A. Ragusa, 1964. Extraction of total available carbohydrates from grass and legume tissue. *Plant Physiol.* 39: 960-962.
17. SMITH, D., 1968. Classification of several native North American grasses as starch or fructosan accumulators in relation to taxonomy. *J. Brit. Grassland Soc.* 23: 306 - 309.
18. ———, and L.F. Graber., 1948. The influence of top growth removal on the root and vegetative development of biennial sweet clover. *J. Amer. Soc. Agron.* 40: 818 - 831.
19. ———, 1962. Carbohydrate root reserves in alfalfa, red clover and birdsfoot trefoil under several management schedules. *Crop Sci.* 2: 75 - 78
20. WATSCHKE, 1947 a. Determination of total available carbohydrates in plants. *Plant Physiol* 22: 279 - 290.
21. WEINMAN, O., 1947. Determination of total available carbohydrates in plants. *Plant Physiol* 22: 279 - 290.
22. WITT, N., 1970. Water-soluble carbohydrates in various grassland plants at different stages of development. *Tidsska PIAVL* 74: 378 - 384. (Herb. Abstr. 41: 1737)
23. WOLF, D.D., 1969. Reserve carbohydrates of starch - storing forage species as measured by several methods of extraction and assay. *Virginia Polytechnic Institute Agron. Abst. S:* 31.