

# ALKAN İNDİKATÖR TEKNİĞİ KULLANILARAK YEM TÜKETİMİ ve SİNDİRİLEBİLİRLİK TAHMİNİ

(DERLEME)

(Estimating Feed Intake and Digestibility Using Alkane Indicator Technique)

(A Review)

Yücel ÜNAL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastahkları ABD., KARS.

## ÖZET

Ruminantlardan maksimum verim, dengeli bir rasyon uygulaması ile sağlanabilir. Besin maddesi tüketimi ve özellikle enerji alımı, öncelikle Yem Kuru Madde Tüketimi (YT) ve Sindirilebilirliği (YS) tarafından etkilendiği için YT ve YS hayvan beslemede en yaygın olarak kullanılan iki parametredir. YT ve YS tahmini için bir çok indikatör teknikleri kullanılmıştır. Son yıllarda bu iki parametrenin tahmini için bitkilerin kütikular mum yapısında bulunan alkanların çift zincirli ve doz olarak verilen sentetik alkanlarla kombine edilmesine dayanan alkan tekniği geliştirilmiştir. Dozlama işlemi alkan indikatör tekniğinin en önemli sorunudur. Ancak doğal olarak yemde bulunan ve sindirilmeyen steroller gibi bir maddenin doz olarak kullanılan alkanların yerine kullanılabilmesi durumunda bu sorun çözülmüş olacaktır. Sonuç olarak alkan tekniğinin YT ve YS tahmini için faydalı bir teknik olduğu söylenebilir.

**Anahtar kelimeler:** Alkan, indikatör, yem tüketimi, sindirilebilirlik.

## SUMMARY

Maximum output from ruminants can only be achieved by applying an accurate dietary formulation. Dry matter intake (DMI) and digestibility (DMD) are the most commonly used parameters in animal nutrition since nutrient intake, particularly energy, from forage is primarily influenced by DMI and DMD. Several indicator-based techniques have been used to estimate DMI and DMD. During the last decade the alkane technique has been developed for the estimation of these parameters, based on the use of alkanes, plant cuticular wax component, as indicators, in combination with dosed synthetic even-chain alkanes. Dosing is one of the major limitations of the alkane indicator technique. However, if an other indigestible material naturally present in diet could be used, instead of a dosed alkane such as sterols, this problem would be solved. It is concluded that alkane technique might be a useful technique for estimating DMI and DMD.

**Keywords:** Alkane, indicator, intake, digestibility.

## GİRİŞ

Ruminantlardan maksimum verim, dengeli bir rasyon uygulaması ile sağlanabilir. Besin maddesi tüketimi ve özellikle enerji alımı, Yem Kuru Madde Tüketimi (YT) ve Sindirilebilirliği (YS) tarafından öncelikle etkilendiği için YT ve YS hayvan beslemede en yaygın olarak kullanılan iki parametredir. YT ve YS tahmini (YTt, YSt) için bir çok indikatör teknikleri kullanılmıştır.

Literatürlerde bilinen ilk indikatör kullanımı (7) 100 yıl kadar önce tavşanlarda kullanılan küçük cam boncuklar olmuş ve daha

sonra mangal kömürü, sindirilmeyen tohumlar (darı tohumu), boyalar (karmina), metal oksitler (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), mineral tuzları (BaSO<sub>4</sub>), suda eriyen indikatörler (Cr-EDTA), radyoaktif maddeler (<sup>51</sup>Cr), mikroorganizmalar (Bacillus anthracis) gibi eksternal indikatörler; silika, lignin, dışkı azotu, ADF-NDF, gibi internal indikatörler değişik amaçlarla kullanılmışlardır (14).

Alkan İndikatör Tekniği ise son yıllarda geliştirilen yeni bir tekniktir. Alkanlar bitkilerin kütikular mum yapısında yer alan yapıtaşdırlar. Alkanlardan önce, kaba yemlerin kütikular

yapı-sında bulunan uzun zincirli yağ asitlerinin (C<sub>19</sub>-C<sub>32</sub>) dışkıda önemli miktarda mevcut olduğu ve bunların sindirilmediği için internal indikatör olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (11). Ancak bunların analizinin zor olması nedeniyle daha sonra bu maddeler çalışılmamış ve bunların yerine alkanların sindirilmeyen internal indikatör olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (21).

### Tekniğin Temeli ve Avantajları

Alkan indikatör tekniği bir çift indikatör metodudur ve diğer geleneksel indikatör metodlarından farklı bir temeli vardır. Geleneksel metodlarda genellikle YTT'de toplam dışkı miktarı ve sindirilebilirlik kullanılarak YTT yapılmaktadır (Şekil 1A).

**Şekil 1.** Geleneksel indikatör metodlarında YTT için kullanılan formüller.

<b>A</b>	<b>B</b>
$YTT = \frac{\text{Toplam dışkı miktarı}}{(1 - \text{Sindirilebilirlik})}$	$\text{Toplam dışkı} = \frac{\text{Verilen indikatör miktarı (g/gün)}}{\text{Dışkıdaki indikatör konsantrasyonu}}$
<b>C</b>	
$\text{Sindirilebilirlik} = \frac{\text{indikatör(g) / dışkı(kg)} - \text{indikatör(g) / yem(kg)}}{\text{indikatör(g) / dışkı(kg)}}$	

Ancak toplam dışkı toplama zor ve zahmet gerektiren bir işlem olduğu için geleneksel metodlarda indikatör kullanılarak önce toplam dışkı miktarı (Şekil 1 B) ve yemin sindirilebilirliği (Şekil 1 C) hesap edilmekte ve sonra Şekil 1 A'daki formül kullanılarak YTT yapılmaktadır (8). Yani iki aşamalı bir hesap-lama vardır ve bu da bu yöntemlerin en büyük dezavantajıdır. Çünkü her hesaplamadaki hata paylarının birikmesi sonucu son hesaplamada hata payı artmaktadır (5, 9, 24).

Yemin sindirilebilirliğini tespit etmek için *in vitro* ve *in sacco* metodlar da vardır. Ancak bu metodlarla elde edilen sindirilebilirlik-lerin *in vivo* çalışmalara adaptasyonunda dezavantajlar olduğu bildirilmiştir (9, 15, 24). Bunlardan en önemlisi bu metodlarda bir yem maddesi için tek bir sindirilebilirlik değeri elde edilmesi ve hayvanlar arasında ortaya çıkabile-cek bireysel farklılıkların hesaba katılmamış olmasıdır(24). Alkan metodunda ise toplam dışkı

miktarı ve sindirilebilirlik kullanılmadan metodun kendi özel formülü ile YTT yapılmaktadır (Şekil 2). Formülde de görüleceği gibi tekniğin temeli dışkıdaki tek zincirli: çift zincirli alkan oranına dayanmaktadır. Tekniğin en büyük avantajı ise bireysel YTT ve YSt'ne olanak vermesidir (4).

Tek numaralı alkanlar (C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>, C<sub>33</sub> gibi) bitkilerde yoğun olarak bulunurken, çift numaralı alkanlar (C<sub>32</sub>, C<sub>34</sub>, C<sub>36</sub> gibi) düşük düzeyde bulunmaktadır. Dolayısıyla yapılan çalışmalarda genellikle C<sub>33</sub> dahili indikatör (Dİ) olarak kullanılırken, harici indikatör (Hİ) olarak C<sub>32</sub> de her gün dışardan verilmektedir (dozlama). Ayrıca C<sub>31</sub>:C<sub>32</sub>, C<sub>31</sub>:C<sub>36</sub> ve C<sub>33</sub>:C<sub>36</sub> alkan çiftleri kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilen çalışmalar da mevcuttur (10, 12). Alkan C<sub>34</sub> miktarında bitkilerde çok düşük olduğu için analizlerde standart olarak kullanılmaktadır (4).

**Şekil 2.** Alkan metodunda YTt için kullanılan formül.

$$YTt = \frac{\frac{D_{33}}{D_{32}} (Dz_{32} + K * K_{32}) - K * K_{33}}{KY_{33} - \frac{D_{33}}{D_{32}} * KY_{32}}$$

Burada;

**YTt:** Yem tüketimi tahmini (kg KM/gün)

**KY<sub>33</sub>, K<sub>33</sub>, D<sub>33</sub>:** Alkan C<sub>33</sub> ün kaba yem, konsantre yem ve dışkıdaki miktarları (mg/kg KM)

**KY<sub>32</sub>, K<sub>32</sub>, D<sub>32</sub>:** Alkan C<sub>32</sub> nin kaba yem, konsantre yem ve dışkıdaki miktarları (mg/kg KM)

**K:** Konsantre yem (kg KM/gün)

**Dz<sub>32</sub>:** Dışardan doz olarak verilen alkan C<sub>32</sub> miktarı (0.5 g/gün), nı ifade etmektedir.

### Dozlama Teknikleri

Alkan tekniği kullanarak YTt yapmak için öncelikle hayvana yemle birlikte belli bir miktarda Hİ verilmesi gerekmektedir. Doz olarak kullanılan ve sentetik olan Hİ ile doğal olarak kaba yemde (KY) bulunan Dİ'nin dışkı-dan geri alınabilirliği birbirine yakın olmalıdır. Dozlama eğer günde bir kere ise her gün aynı saatte ve aynı miktarda yapılmalıdır. Eşit miktarlarda olmak şartıyla günde birden fazla dozlama da yapılabilmektedir. Dozlama, Hİ'ün bütün haldeki filtre kağıdına emdirilmiş şekilde rumen fistülünden doğrudan rumene verilme-siyle (28), alkan emdirilmiş filtre kağıtlarının kapsül haline getirilmesiyle (22), jelatin kapsül halinde hayvana yutturulmasıyla (3) olabilmektedir. Ayrıca bu teknik için yeni bir uygulama olarak alkan doğrudan hayvana verilecek olan bir miktar konsantre yeme (29) ya da melasa (13) katılabilmektedir. Yine rumen içine yerleş-tirilen ve hemen hemen sabit bir düzeyde (CV % 4.07) Hİ bırakan ve Slow Release Device (SRD) adı verilen düzenek de son bir kaç yıldır ticari olarak satılmaktadır (1).

### Dışkı Numunesi Alımı

Dozlama başlangıcından Hİ'ün dışkıda sabit bir düzeye çıkması için 7 günlük bir süre yeterli olmaktadır (27). Doz olarak verilen alka-

nının dışkıdaki konsantrasyonunda görülen gün içi ve günlük dalgalanmalar konusunda çeşitli görüşler vardır. Bir kısım çalışmalarda (2, 6) anlamlı varyasyon bildirilirken, bazı çalışma-larda ise tespit edilen varyasyonlar önemli bulunmamıştır (20, 22). Günde 2 kere dozlama ile oluşan varyasyon, günde bir kere dozlamaya göre daha düşük bulunmuştur (2). Her gün aynı saatte dışkı numunesi alınmasıyla bu olumsuz etkinin en aza indirilebileceği bildirilmiştir (27).

### Kaba Yemden Numune Alımı

Alkan metodunda YTt için kullanılan formülde kaba yem C<sub>32</sub> ve C<sub>33</sub> düzeyleri hesaplamalarda kullanıldığından tüketilen kaba yemi en iyi temsil edecek numune alımı önem arz etmektedir. Bu durum özellikle mera çalışmalarında çok önemlidir. Homojen özellik gösteren meralarda elle toplanan numune yeterli olurken, homojen olmayan meralarda ösefagus fistüllü hayvanların (ÖFh) kullanımı gerekmektedir (16). Ancak ÖFh'dan alınan numunelerle elde edilen verilerin normal hayvanlarda kullanımı ve kullanılması gereken ÖFh sayısı da tartışma konusudur (17). ÖFh'dan alınması gereken numune sayısının fazla olması

gerektiği önemle üzerinde durulan bir konudur (4).

Yaprak ve dal ile farklı mevsimlerde ve farklı yaşlardaki bitkilerde alkan seviyelerinin farklılık gösterdiği (18), ancak bu etkenlerin numune alımı ve hayvanların yemesi esnasında eş zamanlı olarak mevcut olacağı için yem YTT için olumsuz bir etkisinin olmayacağı bildirilmiştir (27).

### Alkanların Analizi

Freeze dryer ile kurutulmuş 0.5 g dışkı (KY için 1.5 g) 25 ml'lik kapaklı şişeye konularak üzerine 0.25mg C<sub>34</sub> (standart) içeren 0.5 ml heptan ve 7 ml % 5 etanol'lü 1M KOH ilave edilerek 8 saat 90° C de tutularak sabunlaş-tırmaya tabii tutulur. Numuneyi alkan yönünden saflaştırmak için yapılan bu işlemde esterler ilgili alkol ve potasyum tuzlarına dönüşür. Sonra numune soğutulurak üzerine 7 ml heptan (KY için 14 ml) ve 2 ml distile su (KY için 4 ml) ilave edilerek karıştırılır ve 2000 rpm de 15 dak. santrifüj edilerek üstte kalan sıvı kısım alınır ve 5 ml silika jel (0.2-0.5 mm) kolonundan geçirilir. Bu işlemle bitki pigmentleri ve yağları

numune-den uzaklaştırılmış olur. Kolon üzerine tekrar 10 ml heptan konularak kolon yıkanır ve alttaki tüm solüsyon hotplate üzerine ağız açık olarak konulup hafif ısıtılarak heptan uçurulur. Numune tekrar 0.5 ml heptan ile sulandırılarak bundan 0.2 ml alınıp Gas Kromatografi (GK) analizi için mikrovial'e konur ve 2 µl GK'ye enjekte edilir. GK'de detektör ve enjektör ısısı 300 ° C ve kolon ısısı 285° C de tutulurken taşıyıcı gaz olarak 20 ml/d düzeyinde helyum kullanılır (27).

### Alkan Tekniği ile Yem Tüketimi ve Sindirilebilirlik Tahmini Sonuçları

Tablo 1'de C<sub>33</sub>:C<sub>32</sub> alkan çifti kullanılarak YTT için yapılan bazı çalışmaların sonuçları görülmektedir. C<sub>33</sub>:C<sub>32</sub> alkan çiftinin YTT çalışmalarında daha çok kullanılmasının nedeni bu iki alkanın geri alınabilirliklerinin birbirine yakın olması ve C<sub>33</sub>'ün yem olarak kullanılan bitkilerdeki düzeyinin YTT için ihtiyaç duyulan minimum düzeyin (>50 mg/kg KM (18)) çok üzerinde olmasıdır.

**Tablo 1.** C<sub>33</sub>:C<sub>32</sub> alkan çifti kullanılarak YTT yapılan bazı çalışmalar.

Kaynak	Hayvan ve yem	Dozlama yöntemi	Gerçek YT (kg KM/gün)	YT ile YTT fark (kg KM/gün)	% fark
Dillon ve Stakelum (2)	Süt ineği (laktasyonda) taze çayır otu	Pelet	14.18	0.09	-0.63
Gedir ve Hudson (10)	Geyik, kuru çayır otu	SRD	9.18	0.2	+2.18
Mayes ve ark. (23)	Genç inek (kuruda) taze çayır otu	Pelet	4.0	0.07	-1.75
Stakelum ve Dillon (26)	Süt ineği (laktasyonda) taze çayır otu	Pelet	13.27	0.10	-0.75
Unal ve Garnsworthy (30)	Süt ineği (kuruda) kuru çayır otu	Filtre kağıdı	8.21	0.13	+1.58

Unal ve Garnsworthy (30)	Süt ineği (kuruda) silaj	Filtre kağıdı	9.17	0.10	+1.09
--------------------------	--------------------------	---------------	------	------	-------

**Tablo 2.** Alkanlar kullanılarak YSt yapılan bazı çalışmalar.

Kaynak	Hayvan ve yem	Alkan	Gerçek YS	YSt
Gedir ve Hudson (10)	Geyik, kuru çayır otu	C <sub>36</sub>	-	0.63
Hendricksen ve ark. (12)	Dana, kuru çayır otu	C <sub>31</sub>	0.49	0.49
Mayes ve ark. (23)	Süt ineği (kuruda) taze çayır otu	C <sub>36</sub>	0.77	0.75
Ordakowski ve ark. (25)	At, kuru çayır otu	C <sub>33</sub>	0.54	0.54
Unal ve Garnsworthy (30)	Süt ineği (kuruda) kuru çayır otu	C <sub>33</sub>	0.68	0.69
Unal ve Garnsworthy (30)	Süt ineği (kuruda) silaj	C <sub>33</sub>	0.73	0.74

Her ne kadar alkan tekniğinde YSt de YS'e ihtiyaç olmasa da, verilen yemin YS'i bilinmek istenir. Tablo 2'de alkanlar kullanılarak yapılan bazı çalışmalardaki YSt'i verilmiştir. YSt'de kullanılacak olan alkanın dışkıdan geri alınabilirliğinin yüksek olması gerekir (%94-96). En çok kullanılan alkan ise C<sub>35</sub> dir. Ancak diğer alkanlarında YSt de kullanılması mümkün gözükmemektedir.

## SONUÇ

Geleneksel indikatör tekniklerinde YSt yapabilmek için dışkı miktarı ve YS' ne ihtiyaç vardır. Dışkı toplama klasik olarak 24 saat boyunca dışkı toplama ile ya da indikatörle tahmin edilebilir. YS ise indikatörle tahmin edilebileceği gibi *in vitro* olarak da tespit edilebilir. Klasik dışkı toplama özellikle büyük ruminantlarda zahmetli ve örneğin mera şartların-da pratik olmayan bir yoldur. İndikatörle dışkı miktarı ve YS tahmin edip sonra YSt de bulunma durumunda ise her işlemde ortaya çıkan hatalar olduğu için YSt deki hata daha büyük olmaktadır (17). *In vitro* YSt durumunda ise rumen sıvısı alınan hayvanlar ile deney hayvanlarını YS'nin her zaman farklılık içermesi YSt'de hatalara neden olmaktadır. Ayrıca

geleneksel indikatör yöntem-lerinde elde edilen YSt'leri grup ortalamasıdır.

Alkan metodunun 2 büyük avantajı vardır. Birincisi direkt olarak YSt yapılabilmesi yani YSt için toplam dışkı ve YS'e ihtiyaç olmamasıdır. İkincisi bireysel YSt'nin yapılabilmesidir. Buna karşılık alkan metodunun da en büyük dezavantajı hayvanların sentetik bir Hİ ile dozlanmasının gerekliliğidir. Ancak SRD adı verilen ve rumene yerleştirildikten sonra yavaş bir düzeyde 20-25 gün süreyle Hİ salan düzeneklerin son bir kaç yıldır ticari olarak satılmasıyla bu sorun kısmen çözülmüş görünmektedir. Ancak alkan tekniğinde normalde yemlerde doğal olarak bulunan Dİ'nin (C<sub>33</sub>), Hİ olarak dozlamayla verilen sentetik çift zincirli alkanlar yerine (C<sub>32</sub>) yine yemlerde bulunan ve sindirilmeyen sterol gibi 2. bir Dİ ile kombine edilebilmesi durumunda dozlama sorunu tamamen ortadan kalkmış olacaktır. Nitekim C<sub>29</sub> sterol, coprostanol gibi maddelerin indikatör olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (19).

Alkan indikatör tekniği ile başarılı YSt yapılabilmesi için 2 durum önemlidir: Birincisi, tüketilen kaba yemi iyi temsil edecek bir numune alımı. Bu özellikle mera çalışmalarında çok

önemlidir. İkincisi, seçilecek olan Dİ ve Hİ'nin (C<sub>33</sub>:C<sub>32</sub> gibi) dışkıdan geri alınabilirlikle-rinin birbirine yakın olması.

Sonuç olarak alkan indikatör tekniğinin YTt için mevcut teknikler içinde en doğru sonucu verdiği ve rutin olarak kullanılabileceği söylenebilir. Ancak en önemli sorun olan dozla-manın ortadan kalkması için teknikte kullanılan Hİ yerine yemlerde bulunan sterol gibi sindiril-meyen bir maddenin kullanılabilirliği üzerine yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. **Anonim (2003) Products** <http://www.captec.info/web/captecinfo/captecinfohp.nsf/web/index.html>.
2. **Dillon P, Stakelum G (1989) Herbage and Dosed Alkanes as a Grass Measurement Techn-ique for Dairy Cows.** Irish Journal of Agricultural Research, 28: 104.
3. **Dove H, Freer M, Foot JZ (1988) Alkane Cap-sules for Measuring Pasture Intake.** Proceedings of the Nutrition Society of Australia, 13: 131.
4. **Dove H, Mayes RW (1991) The Use of Plant Wax Alkanes as Markers Substances in Studies of the Nutrition of Herbivores. A Review.** Aust-ralian Journal of Agricultural Research, 42: 913-952.
5. **Dove H, Mayes RW (1996) Plant Wax Components: A New Approach to Estimating Intake and Diet Composition in Herbivores.** Journal of Nutrition, 126: 13-26.
6. **Dove H, Mayes RW, Lamb CS, Ellis KJ (1991) Evaluation of an Intra-ruminal Controlled-release Device for Estimating Herbage Intake Using Synthetic and Plant Cuticular Wax Alkanes.** Proceedings of 3<sup>rd</sup> International Symposium on Nutrition of Herbivores, Penang, Malaysia, p. 82.
7. **Elliott TT, Barclay-Smith E (1904) The Use of Coloured Glass Beads to Determine Distribution of Food Along the Digestive Tract of Rabbits.** Journal of Physiology, 31:272.
8. **Faichney G J (1975) The Use of Markers to Partition Digestion Within the Gastro-intestinal Tract of Ruminants,** p 277-291. In Digestion and Metabolism in the Ruminants. Edit. McDonald IW& Warner ACI. University of New England, Armidale.
9. **Galyean ML, Krysl LJ, Estell RE (1986) Marker-based Approaches for Estimation of Fecal Output and Digestibility in Ruminants** p 96-113. In Symposium proceedings of Feed Intake by Beef Cattle, Animal Science Department, Agricultural Experiment Station, Division of Agriculture. Oklahoma State University.
10. **Gedir JV, Hudson RJ (2000) Estimating Dry Matter Digestibility and Intake in Wapiti (Cervus elaphus canadensis) Using the Double N-alkane Ratio Technique.** Small Ruminant Research, 36: 57-62.
11. **Grace ND, Body R (1981) SHORT NOTE. The Possible Use of Long Chain (C19-C32) Fatty Acids in Herbage as an Indigestible Faecal Marker.** Journal of Agricultural Science, Cambridge, 97: 743-745.
12. **Hendricksen RE, Reich MM, Robertson RF, Reid DJ, Gazzola C, Rideout JA, Hill RA (2002) Estimating the Voluntary Intake and Digestibility of Buffel-grass and Lucerne Hays Offered to Brahman-cross Cattle Using N-alkanes.** Animal Science, 74: 567-577.
13. **Hendricksen RE, Gazzola C, Reich MM, Robertson RF, Reid DJ, Hill RA (2003) Using Molasses as an Alternative to Controlled Release Devices for Administering N-alkane Markers to Cattle.** Animal Science, 76: 471-480.
14. **Kotb A R, Luckey T D (1972) Markers in Nutrition.** Nutrition Abstracts and Reviews, 42: 813-845.
15. **Krysl LJ, Galyean ML, Estell RE, Sowell BF (1988) Estimating Digestibility and Faecal Output in Lambs Using Internal and External Markers,** Journal of Agricultural Science, Cambridge, 111: 19-25.
16. **Langlands JP (1974) Studies on the Nutritive Value of the Diet Selected by the Grazing Sheep VII. A Note on Hand Plucking as a Technique for Estimating Dietary Composition.** Animal Production, 19: 249-252.
17. **Langlands J P (1975) Techniques for Estimating Nutrient Intake and Its Utilization by the Grazing Ruminant,** p. 320-332. In Digestion and Metabolism in the Ruminant, Edit. McDonald IW and Warner ACI. University of New England, Armidale.
18. **Laredo MA, Simpson GD, Minson DJ, Orpin CG (1991) The Potential for Using N-alkanes in Tropical Forages as a Marker for the Determination of Dry Matter by Grazing Ruminants.** Journal of Agricultural Science, Cambridge, 117: 355-361.
19. **Leeming R, Ball A, Ashbolt N, Nichols P (1996) Using Faecal Sterols from Human and Animals to**

- Distinguish Faecal Pollution in Receiving Waters.* Water Research, 30(12): 2893-2900.
20. **Malossini F, Bovolenta S, Piasentier E, Valentinotti M** (1994) *Variability of N-alkane Content in a Natural Pasture and in Faeces of Grazing Dairy Cows.* Animal Feed Science and Technology, 50: 113-122.
21. **Mayes R W, Lamb CS** (1983) *The Possible Use of N-alkanes in Herbage as Indigestible Faecal Markers.* Proceedings of the Nutrition Society, 43: 39a.
22. **Mayes RW, Lamb CS, Colgrove PM** (1986) *The Use of Dosed and Herbage N-alkanes as Markers for the Determination of Herbage Intake.* Journal of Agricultural Science, Cambridge, 107: 161-170.
23. **Mayes RW, Wright IA, Lamp CS, McBean A** (1986) *The Use of Long-chain N-alkanes as Markers for Estimating Intake and Digestibility of Herbage in Cattle.* British Society of Animal Production, 42: 457.
24. **Olivan M, Dove H, Mayes RW, Hoebee SE** (1999) *Recent Developments in the Use of Alkanes and Other Plant Wax Components to Estimate Intake and Diet Composition in Herbivores.* Revista Portuguesa de Zootecnia, 6: 1-26.
25. **Ordakowski AL, Kronfeld DS, Holland JL, Hargreaves BJ, Gay LS, Harris PA, Dove H, Sklan D,** (2001) *Alkanes as Internal Markers to Estimate Digestibility of Hay Plus Concentrate Diets in Horses.* Journal of Animal Science, 79: 1516-1522.
26. **Stakelum G, Dillon P** (1990) *Dosed and Herbage Alkanes as Feed Intake Predictors with Dairy Cows: The Effect of Feeding Level and Frequency of Perennial Ryegrass.* Proceedings of the 7th European Grazing Workshop, Wageningen, The Netherlands.
27. **Unal Y** (1998) *Estimation of Feed Intake by Housed Dairy Cows Using Alkanes and Near Infrared Reflectance Spectroscopy.* PhD Thesis; University of Nottingham, Nottingham.
28. **Unal Y, Garnsworthy PC, Gorton P** (1997) *The Use of N-alkanes for Prediction of Intake in Dairy Cows.* Proceedings of the British Society of Animal Science, p. 137.
29. **Unal Y, Garnsworthy PC** (1999) *An Alternative Method of Administering Alkane Markers for Estimating Intake in Dairy Cows.* Proceedings of the British Society of Animal Science, p. 91.
30. **Unal Y, Garnsworthy PC** (1999) *Estimating of Intake and Digestibility of Forage-based Diets in Group-fed Dairy Cows Using Alkanes as Markers.* Journal of Agricultural Science, Cambridge, 133(4) : 419-426.