

# ***In-vitro* gaz üretim metoduyla yemlerin parçalanma kinetik parametrelerinin hesaplanmasında kullanılan matematiksel modeller**

**Nurcan ÇETİNKAYA, Funda ERDEM**

<sup>1</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları AD, Samsun, Türkiye

<sup>2</sup> Samsun Halk Sağlığı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İlkadım, Samsun

**Geliş Tarihi** / Received: 03.06.2015, **Kabul Tarihi** / Accepted: 28.12.2015

**Özet:** Ruminantlar için yem değerlendirmede *in-vitro* gaz üretim metodu en çok kullanılan metotlardan birisidir. Bu makalede, literatür taramasıyla ulaşılan bulgulara dayalı olarak yemlerin sindirilebilirliklerini ifade eden kinetik parametrelerin hesaplanmasında yaygın kullanılan Ekponensiyal, Lojistik, France, Gompertz ve Groot matematiksel modeller tartışılmıştır. Yemlerin gaz üretim metoduyla *in-vitro* değerlendirilmesi rumen sıvısının miktarı, inkübasyonda kullanılan yem miktarı, yemin rumen sıvısına oranı ve inkübasyon ortamının hacminden etkilenmektedir. Bu değişkenler gaz üretim miktarını doğrudan etkileyen faktörlerdir. Bu nedenle *in-vitro* gaz üretim metodunda gaz üretim profilinin yorumu ve tanımlanmasını yapmak doğru modelin seçimi ile mümkün olacaktır. Mevcut modellerin otomasyona uygunluğu, biyolojik olarak anlamlılığı, avantaj ve dezavantajlarıyla ortaya konularak en uygunu önerilmelidir. Sonuç olarak, mevcut kullanılan otomatik modüller *in-vitro* gaz üretim siteleri ile kinetik parametrelerin hesaplanması için yeni matematiksel modellerin geliştirilmesi gereklidir.

**Anahtar Kelimeler:** *in-vitro* gaz üretim metodu, kinetik parametreler, matematiksel modeller.

## **Mathematical models used for the estimation of degradation kinetic parameters of feeds by *in-vitro* gas production method**

**Abstract:** *In-vitro* gas production method is one of the generally used method in ruminant feed evaluation systems. In this paper, commonly used models such as Exponential, Logistic, France, Gompertz and Groot to estimate kinetic parameters which describe diestibility of feeds were discussed regarding to published papers in the field. Application of *in-vitro* gas production methods in determination of nutritive values of feeds have been changed with rumen liquid volume, quantity of feed, ratio of feed to rumen liquid and volume and incubation volume. These variations directly affect the gas production volume. Thus, description and interpretation of gas production profiles could be possible with the right choice of mathematical model. Compatibility of available models to automatization, biologically meaningfulness, advantage and disadvantage of models are required critical consideration to propose the most appropriate one. In conclusion, new mathematical models should be developed for the estimation of kinetic parameters with the current automated moduller *in-vitro* gas production systems.

**Key Words:** *in-vitro* gas production method, kinetic parameters, mathematical models.

## **Giriş**

*In-vitro* gaz üretim metotlarından Menke ve arkadaşları tarafından geliştirilen gaz üretim metodu kaba yemlerin *in-vitro* parçalanma hızı, miktarı, metabolik enerji, net enerji, organik madde sindirim derecesi ve mikrobiyal proteinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır [5,6,18,19,22,30].

Son yıllarda gaz üretim verilerinin daha iyi yorumlanabilmesi için birçok farklı matematiksel modelleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir [14,28,29,31]. Kaba yem kinetikleri bu matematiksel modellerin kullanımı ile daha doğru bir şekilde

hesaplanabilir. *In-vitro* gaz üretim metodunda sıklıkla kullanılan modellerin başında, Ekponensiyal, Lojistik, France, Gompertz ve Groot modelleri gelmektedir [26].

Eksponensiyal model hariç bu modellerin çoğu sigmoidal şekillidir [11,12]. Sigmoidal fonksiyonlar arasında, genelleştirilmiş Mitscherlich ve Michaelis-Menten modellerinde eğriler, sabit kıvrılma noktası olmayan sigmoidal eğriler şeklindeki [1,13,15], Lojistik ve Gompertz modellerinde ise eğriler sabit kıvrılma noktasına sahip sigmoidal eğrilerdir [25]. Tek bir modelde birden çok bileşen

tüm eğrideki uyumu artırmak için kullanılabilir [15,25], ancak bu durum modelin kararlılığında bir azalmaya sebep olabilir [20].

Gaz üretim profillerinin derecede polinomial değerler göstermesi ve çoğunlukla sigmoidal bir eğri olması uygun bir model seçimini zorlaştırmaktadır. Profilin eğimi fermentasyonun ilk safhasında sıfır olma yönündedir, çok az veya hiç gaz üretimi yoktur, bu durumda lag faz oluşur. Daha sonra substrat bitinceye ve asimtota ulaşana kadar kararlı bir artış gözlenir. İdeal olan, eğride kıvrılma olan ve olmayan sigmoidal şekilleri kapsayan bir modelleme yapabilmektir [12,11].

Sindirim ve mikrobiyal büyüme ile ilişkilendirilen gaz üretim modelinde; hücre kütesinin sindirilen substratla ve ikinci olarak da üretilen gazın sindirilen substratın miktarıyla orantılı olduğu varsayılır. Bu kabullerin birleştirilmesinin sonucu mikrobiyal kütle ve gaz üretiminin birbirleriyle orantılı olduğudur.

Gaz üretiminin genel diferansiyel eşitliği;  $dV/dt = f(M,S)$

M: Mikrobiyal kütle, S: Sindirilebilir substratın kütesi ve V: t zamanına kadar üretilen gaz hacmi.

Tamponlanmış rumen sıvısında yem örneğinin *in-vitro* inkübasyonu sırasında gözlenen kümülatif gaz üretiminin zamanla değişimi birinci derece substratla sınırlı model Ørskov ve McDonald'ın modifiye ettiği Mitscherlich eşitliği [21], genelleştirilmiş Mitscherlich modeli [13] ve bakteriyal büyüme modelleri, Gompertz modeli [3], Groot modeli [15] ve lojistik modeldir [25]. Lojistik ve Gompertz eşitliklerinin her ikisinde de sigmoidal eğri oluşur fakat büyüme hızı üzerine substrat sınırlamasının matematiksel etkisinde farklılık vardır. Gaz üretim hızı ve potansiyeli ölçümlerin uygun modellere uygulanmasıyla bulunur. Yaygın olarak kullanılan modifiye Ørskov ve McDonald, Lojistik, Gompertz, France ve Groot matematiksel modelleri:

### Modifiye Ørskov ve McDonald modeli

Gaz hacmi değişim hızı mikrobiyal kütle ile orantılı kabul edilir, fakat substrat seviyesi son t zamanında sıfır oluncaya kadar substratın miktarından bağımsız olarak dikkate alınır. Birinci derece substratla sınırlı Ørskov ve McDonald modeli [21] (modifiye

Mitscherlich eşitliği) aşağıda verilen eşitlikle tanımlanır.

Lag fazsız  $\rightarrow y=b(1-e^{-ct})$  ve Lag fazlı  $\rightarrow y=b(1-e^{-c(t-L)})$

y: t zamanında gaz üretimi (mL), b: Potansiyel gaz üretimi (mL), c: Hız sabiti, L: Lag zaman

İki bölmeli model;

$$y=b_1(1-e^{-c_1(t-L_1)})+y=b_2(1-e^{-c_2(t-L_2)})$$

y: t zamanında gaz üretimi,  $b_1$  ve  $b_2$ :  $t \rightarrow \infty$  da maksimum gaz üretimi,  $c_1$  ve  $c_2$ : Spesifik hızların hız sabiti,  $L_1$  ve  $L_2$ : Lag faz değerleri.

Toplam gaz hacminin yarısını üretmek için geçen zaman ( $T_{1/2}$ ) aşağıdaki eşitlikle hesaplanır.

$$T_{1/2} = \ln 2 / c = 0.693 / c$$

### Lojistik model

Tek bölmeli lojistik model; gaz üretim hızının biriken mikrobiyal kütle ve kalan sindirilebilir substrat miktarı ile orantılı olduğu kabulünden türetilmiştir [10,25]. Lojistik model aşağıdaki eşitlikle tanımlanır.

$$Y = \frac{b}{\{1 + e^{[2 + 4c(L - t)]}\}}$$

Y: Gaz üretimi (mL) t zaman sonra, b: Potansiyel gaz üretimi (mL), c: Hız sabiti, L: lag zaman

Kıvrılma noktasında,  $y = b/2\mu$ .

İki bölmeli model;

$$Y = \frac{b_1}{\{1 + e^{[2 + 4c_1(L_1 - t)]}\}} + \frac{b_2}{\{1 + e^{[2 + 4c_2(L_2 - t)]}\}}$$

Y: t zamanında gaz hacmi,  $b_1$  ve  $b_2$ :  $t \rightarrow \infty$  da maksimum hacim,  $c_1$  ve  $c_2$ : Spesifik hız olarak adlandırılan hız sabitleri,  $L_1$  ve  $L_2$ : Lag değerine eşit sabitler.

İki bölmeli lojistik model ile fermentasyon eğrisinin tanımlanması gazın iki ayrı hızda üretildiğini gösterir. Oysa tek bölmeli modelde tek bir fermentasyon hızı vardır. İki bölme iki farklı substrat fermentasyonundan, farklı iki mikrobiyal popülasyondan veya her iki faktörün kombinasyonundan dolayı meydana gelir. Stefanon ve arkadaşları farklı olgunlaşma basamağında brom otu ve yoncanın suda çözünebilir fraksiyonlarının fermentasyonundan iki bölmeli lojistik model parametreleri hesaplamışlar-

dır [27]. Schofield ve Pell, yonca'da nötral deterjan çözümlerinde çözünen karbonhidratlar için iki bölmeli lojistik modelden parametreler hesaplamış ve yayınlamışlardır [24].

### Gompertz modeli

Gompertz modeli gaz üretiminin mikrobiyal aktivite ile orantılı olduğunu kabul eder fakat orantı parametreleri zamanla azalır, fermentasyonda verim kaybından dolayı birinci dereceden kinetiğe göre işlem olur veya substrat sınırlanmasının büyüme üzerine etkisi yoktur [3]. Büyüme hızı hücre kütlesi ile ilişkilidir ve büyüme hızı eksponensiyel olarak bakteri inaktivasyonundan dolayı zamanla azalır.

Sigmoidal Gompertz modeli parçalanma eğrilerine üç fazda uygulanabilir.

İlk Faz: Hidrasyonda yavaş veya hiç parçalanma yoktur, yemde mikrobiyal tutunma ve kolonizasyon olur. Eksponensiyel Faz: Hızlı parçalanma olur ve substrat mikroorganizmalar ve enzimlerle sature edilir. Asimptotik Faz: Parçalanma, asimptota yaklaştıkça yavaşlar. Fermentasyona uğrayacak materyalin tükendiği fazdır.

Beuving ve Kogut, kıvrılma noktasındaki maksimum parçalanma hızını, fermentasyon hızını, maksimum fermentasyon zamanını ve substratın % 95'inin fermente olduğu zamanın kullanılmasını önermişlerdir [1].

$$y = B e^{-C e^{At}}$$

y: Gaz Üretimi (mL) t zaman sonra, B: Asimtotik değer (toplam potansiyel gaz üretimi), C: Nispi gaz üretim hızı, A: Mikrobiyal verim sabit faktörü, Fraksiyonel parçalanma hızı ( $\mu h^{-1}$ ),  $t_{1/2}$  de aşağıdaki eşitlikle hesaplanır.

$$\mu = C + \frac{A}{2\sqrt{t}}$$

İki bölmeli Gompertz fonksiyonu gaz üretimine aşağıdaki eşitlikle hesaplanır.

$$V_t = V_1 \exp\{-\exp[1-k_1(t-L_1)]\} + V_2 \exp\{-\exp[1-k_2(t-L_2)]\}$$

Vt: t zamanda ölçülen hacim,  $V_1$ ,  $k_1$  ve  $L_1$ : Birinci bölmede birikimli gaz üretim hacmi, hız sabiti ve lag parametreleri,  $V_2$ ,  $k_2$  ve  $L_2$ : İkinci böl-

mede birikimli gaz üretim hacmi, hız sabiti ve lag parametreleri, t: Her iki bölmede de saat olarak geçen zaman.

Birinci ve ikinci bölmelerdeki kinetik parametrelerin hesaplanmasıyla rumende açığa çıkan enerji ve azot miktarları hesaplanır. Hesaplanan değerlerden senkroni indeksi hazırlanabilir.

### France modeli

France modeli France ve arkadaşları tarafından tasarlanmış genelleştirilmiş Mitscherlich'dir [13]. Hız sabiti  $c=0$  olduğunda Ørskov ve McDonald modeli ile aynıdır. Bileşenlere bağlı olarak zamanın karekökü modele eklenmiştir [8].

$$y = A \{1 - e^{-[b(t-T) + c(\sqrt{t-T})]}\}$$

y: t zaman sonra gaz üretimi (mL), A: Asimptotik değer (Toplam potansiyel gaz üretimi), T: Lag zamanı, b ve c: Hız sabitleri, Fraksiyonel hızın ( $\mu$ ,  $h^{-1}$ ) zamanla değişimi dikkate alınır.

$$\mu = \frac{b+c}{2\sqrt{t}} \geq T$$

b ( $h^{-1}$ ) ve c ( $h^{-1/2}$ ) sabitler,  $b \geq 0$ ,  $c \geq -2b\sqrt{T}$  koşullarında  $\mu$  değeri negatif olamaz.

### V.Groot modeli

Groot ve arkadaşları tarafından tanımlanan tek fazlı sigmoidal modeldir [15].

$$G = \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{1 + \frac{B_i C_i}{t^{C_i}}}$$

Bu eşitlikte, G (mL/g OM) inkübasyona konan t sürede gram OM başına üretilen gaz miktarını,  $A_i$  (mL/g OM) asimtotik gaz üretimini,  $B_i$  (h) asimtotik gaz üretim değerlerinin yarısına ulaşılması için geçen zamanı ve  $C_i$  profilin değişen karakteristiklerinin kesinliğini belirten sabittir. Değer (i) profile faz sayılarını göstermektedir ( $i=1, n$ ).  $C \leq 1$  ise ( $t \geq 0$ ) da profile kırılma yoktur. C değeri arttıkça profil sigmoidal şekil alır, eğim artar. C,  $\infty$  olunca basamaklı fonksiyon oluşur başlangıç eğim de sıfırdır.

Gaz üretimini tanımlamaya çalışan bu eğrilerle her zaman biyolojik olarak anlamlı parametreler üretilmez. Gaz üretim denemelerinin sonuçları sıklıkla yanlış yorumlanır ve uygun olmayan eğriler çizilir.

Gaz üretiminin substrat sindirimi ve besin değeriyle doğrudan ilişkili olduğu varsayılır. Bu durum tam doğru değildir, çünkü gaz üretimi substrat kompozisyonuna, mikrobiyal popülasyona ve mikrobiyal verim için heksoz kullanımına bağlıdır.

Bazı araştırmacılar yemden daha az gaz ürettiğinde propiyonat öncül maddelerinin asetat ve bütirat öncül maddelerine göre daha fazla bulunduğunu bildirmişlerdir [2,32]. Schofield tarafından yüksek protein içeren yemlerde amonyağın uçucu yağ asiti (UYA) ile birlikte kullanılmasından dolayı gaz üretiminin azaldığı ortaya konmuştur [23]. Bütün bu faktörler substrat fermentasyonu süresince üretilen gaz miktarını belirler. *İn-vitro* gaz üretim değerleri tek başına direkt olarak yemle ilgili az bilgi sağlar. Bu nedenle gaz üretim ölçümleri substratın azalması UYA profilleri ve mikrobiyal verimle birlikte incelenen yemin besin değerini ortaya koymak için birleştirilir [4,23].

Cone ve arkadaşları *in-vitro* sistemlerde inkübe edilen yem miktarının tamponlanmış rumen sıvısı hacmine göre ayarlanması gerektiğini belirtmişlerdir [7]. Gaz üretim metodunun uygulanmasında farklı araştırmacılar tarafından farklı uygulamalar yapılmaktadır. Uygulamalardaki bu farklılıklar rumen sıvısının alınma zamanı, rumen içeriğinin sıvı faz veya katı faz olması, inkübasyonda kullanılan rumen sıvısının miktarı, yem miktarı, yem miktarının rumen sıvısına oranı, kullanılan şırıngaların hacmi, inkübasyon yeri su banyosunda şırıngada, su banyosunda şişelerde, rotor içinde şırıngalarda vb. gaz üretim miktarını da etkilemektedir. Bu nedenle *in-vitro* gaz üretim sonuçlarının yorumlanmasında kullanılan matematiksel modellerin uygunluğu da dikkate alınmalı, aksi takdirde veri kayıplarının olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Yem ham maddelerinin *in-vitro* koşullarda sindirilebilirlik özelliklerinin değerlendirilmesinde Menke ve Steingass tarafından bildirilen gaz üretim metodunu esas alan şırınga yönteminin yerine son zamanlarda basınç ölçümüne dayalı ANKOM<sup>RF</sup> gaz üretim sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır [9,16,17]. (ANKOM<sup>RF</sup> gaz üretim sistemi konfigürasyonu psi veya mbar biriminde gaz basınç ölçümlerine dayanmaktadır. Bu nedenle gaz üretiminin mL olarak hesaplanmasında 39°C'de ölçülen gaz basıncı (P<sub>psi</sub>) kullanılmaktadır.

Ölçülen gaz basınçları ideal gaz kanunu eşitliği kullanılarak önce mol'e çevrilip ardından Avagadro kanunu eşitliği kullanılarak mL olarak üretilen gaz hacmi (GÜ) hesaplanmaktadır. Analizde 1g yem örneği kullanıldığından hesaplanan mL gaz üretim (GÜ) hacimlerinin beşte biri alınmalıdır. Çünkü 200 mg yem örneği kullanımına dayalı şırınga yöntemi için geliştirilen matematiksel modeller ve formüller kinetik parametrelerin hesaplanmasında kullanılmaktadır.

Sonuç olarak mevcut modellerin otomasyona uygunluğu, biyolojik olarak anlamlılığı, avantaj ve dezavantajlarıyla ortaya konularak en uygun model önerilmelidir. Bununla birlikte, mevcut kullanılan otomatik modüler *in-vitro* gaz üretim sistemleri ile deneysel çalışmalar yaparak kinetik parametrelerin hesaplanması için yeni matematiksel modellerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

## Kaynaklar

1. Beuvinck J, Kogut J (1993): Modeling gas roduction kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. *Journal of Animal Science*, 71,1041-1046.
2. Beuvinck J, Spoelstra S (1992): Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganism *in-vitro*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37,505-509.
3. Bidlack JE, Buxton DR (1992): Content and deposition rates of cellulose, hemicellulose, and lignin during regrowth of forage grasses and legumes. *Canadian Journal of Plant Science*, 72, 809-818.
4. Blummel M, Karsli A, Russell JR (2003): Influence of diet on growth yields of rumen micro-organisms *in-vitro* and *in-vivo*: influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. *British Journal of Nutrition*, 90, 625-634.
5. Boğa M, Güven İ, Atalay Aİ, Kaya E (2013): Effect of varieties on potential nutritive value of pistachio hulls. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19, 699-703.
6. Canbolat Ö, Kara H, Filya İ (2013): Bazı baklagil kaba yemlerinin *in-vitro* gaz üretimi, metabolik enerji, organik madde sindirimi ve mikrobiyal protein üretimlerinin karşılaştırılması. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27, 71-81.
7. Cone JW, Van Gelder AH, Visscher GJW, Oudshoorn L (1996): Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology*, 61,113-128.
8. Dhanoa MS, France J, Siddons RC, Lopez S, Buchanan-Smith JG (1995): A non-linear compartmental model to describe forage degradation kinetics during incubation in polyester bags in the rumen. *British Journal of Nutrition*, 7, 3-15.
9. Erdem F (2014): *Juncus acutus*'un *in-vitro* Gaz üretim metodu ile sindirilebilirliğinin ve real-time per ile selüloolitik rumen bakterileri üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Türkiye.

10. France J, Thornley JHM (1984): *Mathematical models in agriculture: A quantitative approach to problems in agriculture and related sciences*. Butterworths (London and Boston) 102-297-860 Last edited on 2002/02/27 17:55:48 US/Mountain. xi-335.
11. France J, Dijkstra J, Dhanoa MS, Lopez S, Bannink A (2000b): *Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in-vitro: derivation of models and other mathematical considerations*. *British Journal of Nutrition*, 83, 143-150.
12. France J, Theodorou MK, Lowman RS, Beever DE (2000a): *Feed evaluation for animal production*. In: Theodorou MK, France J (Eds.) *Feeding system and feed evaluation models*. CAB International, Wallingford.
13. France J, Dhanoa MS, Theodorou MK, Lister SJ, Davies DR, İsaç D (1993): *A model to interpret gas accumulation profiles associated with in-vitro degradation of ruminant feeds*. *Journal of Theoretical Biology*, 163, 99-111.
14. France J, Lopez S, Kebreab E, Bannink A, Dhanoa MS, Dijkstra J (2005): *A general compartmental model for interpreting gas production profiles*. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 473-485.
15. Groot JCJ, Cone JW, Williams BA, Debersaques FMA, Latinga EA (1996): *Multiphasic analysis of gas production kinetics for in-vitro fermentation of ruminant feeds*. *Animal Feed Science and Technology*, 64, 77-89.
16. Gutierrez A, Chiva R, Guillamon JM (2015): *Arginine addition in the stationary phase influences the fermentation rate and synthesis of aroma compounds in a synthetic must fermented by three commercial wine strains*. *LWT-Food Science Technology*, 60, 1009-1016.
17. Kato DM, Elia N, Flythe M, Lynn BC (2014): *Pretreatment of lignocellulosic biomass using Fenton chemistry*. *Bioresource Technology*, 162, 273-278.
18. Menke KH, Steingass H (1988): *Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in-vitro gas production using rumen fluid*. *Animal Research and Development*, 28: 7-55.
19. Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W (1979): *The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor*. *Journal Agriculture Science*, 93, 217-222.
20. Motulsky HJ, Ransnas LA (1987) : *Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review*. *Faseb Journal*, 1, 365-374.
21. Ørskov ER, McDonald I (1979): *The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurement weighed according to rate of passage*. *Journal of Agricultural Science*, 92, 499-503.
22. Rymer C, Huntingon JA, Williams BA, Givens DI (2005): *In-vitro cumulative gas production techniques: History, ethological considerations and challenges*. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 9-30.
23. Schofield P (2000): *Gas production methods*. In: D'Mello JPF (Ed.). *Farm animal metabolism and nutrition* CAB publishing, Wallingford, UK. 209-232.
24. Schofield P, Pell AN (1995): *Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion in-vitro: A comparison involving three forages*. *Journal of Dairy Science*, 78, 2230-2238.
25. Schofield P, Pitt RE, Pell AN (1994): *Kinetics of fiber digestion from in-vitro gas production*. *Journal of Animal Science*, 72, 2980-2991.
26. Sing B, Tomar SK, Kundu SS (2010): *In-vitro gas production technique for feed evaluation*. 1. ed., Karnal-132 001, Haryana, India İntech Printers & Publishers #.353, Mughal Canal Market.1-115.
27. Stefanon B, Pell AN, Schofield P (1996): *Effect of maturity on digestion kinetics of water-soluble and waterinsoluble fractions of alfalfa and brome hay*. *Journal of Animal Science*, 74, 1104-1115.
28. Şahin M, Üçkardeş F, Canbolat O, Kamalak A, Atalay AI (2011): *Estimation of partial gas production times of some feed-stuffs used in ruminant nutrition*. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17, 731-734.
29. Üçkardeş F, Efe E (2014): *Investigation on the usability of some mathematical models in in-vitro gas production techniques*. *Slovak Journal of Animal Science*, 47, 172-179.
30. Van Soest PJ (1994): *Nutritional ecology of the ruminant*, 2 nd ed., Ithaca, NY: Cornell University Press.
31. Wang M, Tang SX, Tan SX (2011): *Modeling in-vitro gas production kinetics: derivation of logistic-exponential equations and comparison of models*. *Animal Feed Science and Technology*, 165, 137-150.
32. William BA (2000): *Cumulative gas production techniques for forage evaluation*. In Givens DI, Owen E, Axford RFE, Omed HM.(Eds.), *forage evaluation in ruminant nutrition* CAB Publishing, Wallingford, UK.,189-213.