BÖLÜM 7

ALTERNATİF VE FONKSİYONEL YEMLERİN RUMİNANTLARDA IN VİTRO SİNDİRİLEBİLİRLİK, FERMANTASYON VE METAN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Gürkan SEZMİŞ [1]

1. GİRİŞ

Küresel iklim değişikliği tartışmalarında hayvancılık sektörünün payı, son yirmi yılda giderek daha fazla bilimsel ilginin odağı haline gelmiştir. Ruminant hayvanlarda rumen fermantasyonu sırasında ortaya çıkan enterik metan (CH_4), antropojenik sera gazı emisyonlarının %3-5'ini oluşturmaktadır; bu oran, tek bir biyolojik süreç için oldukça dikkat çekicidir (1). Metan molekülünün atmosferik ısınma potansiyeli karbondioksitten kat kat yüksek olduğundan, enterik kaynaklı emisyonların azaltılması iklim politikalarında öncelikli bir hedef olarak konumlanmıştır.

Rumen, kendine özgü anaerobik mikrobiyal ekosistemi sayesinde ruminantların selülozca zengin, düşük kaliteli ligno-selülozik materyalleri değerlendirebilmesini sağlayan olağanüstü bir organdır. Ancak bu fermantasyon sürecinin doğal bir yan ürünü olarak metanojenik arkeler, hidrojenin birikimini önlemek amacıyla karbondioksit ve hidrojeni metana indirgemektedir. Söz konusu biyokimyasal yol, hem çevresel açıdan istenmeyen bir gaz emisyonuna hem de hayvan için brüt enerjinin %2-12'sine varan bir kayba yol açmaktadır. Dolayısıyla metan üretiminin azaltılması, yalnızca çevresel sürdürülebilirlik açısından değil, aynı zamanda yem enerjisinin daha verimli kullanılması bakımından da önem taşımaktadır.

Bu çerçevede geliştirilen etkiyi azaltma stratejileri son derece geniş bir yelpazeye yayılmaktadır. Kapsamlı bir derlemede ortaya konduğu üzere, mevcut yaklaşımlar üretim yoğunlaştırması, rasyon manipülasyonu, rumen mikrobiyotasının doğrudan modülasyonu (iyonoforlar, 3-nitrooksipropanol, makroalgler, alternatif elektron alıcıları, fitokimyasal-

[1] Dr. Öğr. Üyesi, Yozgat Bozok Üniversitesi, Zootekni Bölümü, gurkan.sezmis@yobu.edu.tr, ORCID iD: 0000-0001-8114-2729

DOI: 10.37609/akya.4339.c20390

lar) ve düşük metan üreten hayvanların genetik seleksiyonu gibi başlıklar altında toplanabilir (2). Bununla birlikte her stratejinin etkinliği, güvenliği ve pratik uygulanabilirliği farklı düzeylerde kalmakta; özellikle mera ağırlıklı, ekstansif üretim sistemlerinde uygulanabilir seçeneklerin sayısı halen sınırlı görünmektedir.

Alternatif ve fonksiyonel yem kaynakları hem çevresel hem de ekonomik gerekçelerle bu alanda özel bir konuma sahiptir. Tarımsal yan ürünlerin, böcek bazlı proteinlerin, deniz yosunlarının ve çeşitli bitkisel biyoaktif bileşiklerin ruminant beslemesinde değerlendirilmesi, döngüsel ekonomi ilkeleriyle örtüşen, atık materyallerin katma değere dönüştürüldüğü bir yaklaşımı temsil etmektedir. Aynı zamanda bu materyallerin bir kısmı -tanenler, saponinler, uçucu yağlar ve halojenli bileşikler gibi- doğrudan metanojenler üzerinde inhibitör etki göstermekte, dolayısıyla hem besleyici hem de fonksiyonel bir rol üstlenmektedir. Örneğin kırmızı deniz yosunu Asparagopsis taxiformis'in içerdiği bromoform, metanojenlerin metil-koenzim M redüktaz enzimini hedef alarak metan üretimini *in vitro* koşullarda %99'a varan oranlarda baskılayabilmektedir (3). Ancak aynı bileşiğin yüksek dozlarda rumen mukozasında lezyonlara yol açabildiği de bildirilmiştir (4); bu durum, etkinlik ile güvenlik arasındaki dengenin her materyal için ayrı ayrı değerlendirilmesi gerektiğini açıkça göstermektedir.

Tropikal koşullarda yürütülen çalışmalar da benzer bir tabloyu doğrulamaktadır. Düşük kaliteli tropikal otlaklarla beslenen sığırlarda ortalama metan salınımı 17,0 g CH_4/kg kuru madde tüketimi düzeyinde seyrettiği, ağaç yaprakları ve baklalarının rasyona katılmasıyla bu değerin %10-25 oranında azaltılabildiği bildirilmiştir (5). Kondanse tanenlerin etki mekanizması üzerine odaklanan bir derlemede ise bu bileşiklerin hem protein-tanen kompleksleri oluşturarak ruminal protein degradasyonunu yavaşlattığı hem de metanojenlere doğrudan toksik etki gösterdiği vurgulanmaktadır (6). Boğa ve ark. (2021) Ruminant hayvanlarda metan gazının doğaya salınımı yemle alınan brüt enerjinin % 2-12 aralığında kaybına sebep olabildiğini belirtmiştir. Metan salınımı çevreye verdiği zararın yanında enerji kaybı ile de verim kayıplarına neden olmaktadır (46).

Bu denli çeşitli ve bazen çelişkili sonuçlar veren bir literatürün taranması, hayvan denemelerine geçmeden önce güvenilir bir ön eleme aracına duyulan ihtiyacı ortaya koymaktadır. İşte tam bu noktada *in vitro* fermantasyon teknikleri devreye girmektedir. Gaz üretim tekniği, rumen sıvısı inokulumu kullanılarak kontrollü laboratuvar koşullarında substratın fermente edilmesi esasına dayanmakta; kümülatif gaz üretimi, kuru/organik madde sindirilebilirliği, uçucu yağ asidi profili, amonyak-azot konsantrasyonu ve metan üretimi gibi parametrelerin ölçülmesine imkân tanımaktadır. Bu yöntemin en önemli avantajı, çok sayıda muamelenin nispeten düşük maliyetle, hayvan refahını riske atmadan ve kısa sürede taranabilmesidir. Nitekim bir meta-analiz çalışmasında da vurgulandığı üzere, *in vitro* sistemler genellikle *in vivo* denemelerden daha belirgin bir mitigasyon etkisi göstermekte; bu durum, laboratuvar bulgularının saha koşullarında doğrulanmasının vazgeçilmez olduğuna işaret etmektedir (7).

Bu bölümün amacı, alternatif ve fonksiyonel yem kaynaklarının ruminantlarda *in vitro* sindirilebilirlik, fermantasyon karakteristikleri ve metan üretimi üzerindeki etkilerini güncel literatür ışığında sistematik biçimde ele almaktır. Tarımsal yan ürünlerden böcek bazlı proteinlere, deniz yosunlarından sentetik inhibitörlere kadar uzanan geniş bir yelpazedeki materyaller hem besleyici değerleri hem de metan azaltım potansiyelleri açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirilecek; ayrıca bu stratejilerin sürdürülebilirlik, güvenlik ve pratik uygulanabilirlik boyutlarına da değinilecektir.

2. IN VİTRO YÖNTEMLERİN BİLİMSEL TEMELİ VE ÖNEMİ

Ruminant beslemesinde yeni bir yem hammaddesinin ya da fonksiyonel katkı maddesinin değerlendirilmesi, geleneksel olarak zaman alıcı, maliyetli ve etik açıdan hassas hayvan denemelerini gerektirmektedir. Solunum odaları, GreenFeed sistemleri veya SF_6 izleyici tekniği gibi in vivo metan ölçüm yöntemleri, yüksek fizyolojik geçerlilik sunmalarına karşın sınırlı sayıda hayvanla, uzun deneme sürelerinde ve yüksek maliyetle uygulanabilmektedir (8). Bu kısıtlar, araştırmacıları çok sayıda materyalin nispeten hızlı ve ucuz biçimde ön elenebileceği laboratuvar temelli yöntemlere yöneltmiştir. Nitekim güncel bir derlemede vurgulandığı üzere, hayvan bazlı çalışmalar en yüksek fizyolojik ve metabolik bilgiyi sunsa da *in vitro* yöntemler diyetlerin ve yem hammaddelerinin ilk taramasında vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir (8).

2.1. Temel In Vitro Sistemler

Literatürde yaygın olarak kullanılan başlıca *in vitro* sistemler, kapalı sistem mantığıyla çalışan batch kültür (*in vitro* batch culture, IVBC) teknikleri ile daha karmaşık, yarı-sürekli akışlı rumen simülasyon tekniği (RUSITEC) olmak üzere iki ana grupta toplanabilir (8). Batch kültür sisteminde rumen sıvısı inokulumu, tampon çözelti ve substrat sabit hacimli bir kap içerisinde belirli bir süre (genellikle 24-72 saat) inkübe edilmekte; bu süre zarfında üretilen kümülatif gaz hacmi manometrik veya basınç transdüseri temelli olarak kaydedilmektedir. ANKOM RF Gaz Üretim Sistemi (AGPS) gibi otomatize düzenekler, bu ölçümü sürekli ve gerçek zamanlı biçimde yaparak hem gaz üretim kinetiğinin hem de metan gibi spesifik gazların takibini kolaylaştırmaktadır (8). Buna karşın rumen simülasyon tekniği (RUSITEC), rumen sıvısının günlük olarak yenilenmesi ve substratın naylon torbalar içinde günlük değiştirilmesi esasına dayandığından, mikrobiyal popülasyonun daha uzun süreler boyunca (haftalar mertebesinde) stabil tutulmasına imkân tanımakta ve gerçek rumen koşullarına en yakın sistem olarak kabul edilmektedir (8). Bu iki yaklaşımın yanı sıra, kaba yem sindirilebilirliğinin toplu biçimde belirlenmesinde ANKOM Daisy İnkübatörü de sıklıkla tercih edilen, pratik ve verimli bir alternatif olarak öne çıkmaktadır (8).

Bu sistemlerin geliştirilmesine yönelik arayış güncel literatürde de sürmektedir; örneğin düşük gelirli tarımsal araştırma ortamları için tasarlanmış, modüler ve düşük maliyetli bir sürekli rumen biyoreaktörünün (Continuous Rumen Bioreactor, CRB) manda rumen sıvısıyla test edildiği ve haftalarca süren inkübasyonlarda tutarlı fermantasyon sonuçları verdiği yakın zamanda bildirilmiştir (9). Bu tür düzeneklerin geliştirilmesi, özellikle kaynakların kısıtlı olduğu bölgelerde metan azaltım araştırmalarının yaygınlaştırılması açısından önemli bir katkı sunmaktadır.

2.2. Ölçülen Parametreler ve Standardizasyon

İn vitro fermantasyon deneylerinde tipik olarak izlenen parametreler; kümülatif gaz üretimi ve üretim kinetiği (genellikle üstel veya çok fazlı modellerle tanımlanır), kuru madde ve organik madde sindirilebilirliği (IVDMD/IVOMD), uçucu yağ asidi (UYA) profili ve toplam konsantrasyonu, amonyak-azot (NH_3-N) düzeyi, ortam pH'ı ve gaz kromatografisi ile ölçülen metan üretimi olarak sıralanabilir. Sun ve ark. (10), Hohenheim Gaz Testi'ni kullandığı bir çalışmada gösterildiği üzere, deney tasarımında kullanılan emülgatör türü dahi fermantasyon sonuçlarını anlamlı biçimde etkileyebilmekte; bu da yöntemsel standardizasyonun ne denli kritik olduğunu ortaya koymaktadır. Nitekim yakın tarihli bir derlemede de bu yöntemlerin tekrarlanabilirliğini ve sağlamlığını artırmaya yönelik standardizasyon kılavuzlarına özellikle vurgu yapılmaktadır (8).

Yöntemler arası tutarlılık konusunda dikkat çekici bir bulgu da Krizsan ve ark. (11) meta-analizinden gelmektedir: araştırmacılar, in situ naylon torba yöntemiyle elde edilen nötr deterjan lifi (NDF) sindirim hızlarının, otomatik gaz üretim sistemiyle elde edilenlere kıyasla yem türüne bağlı olarak sistematik farklılıklar gösterdiğini ve *in situ* yöntemin *in vivo* sindirilebilirliği çoğunlukla düşük tahmin ettiğini bildirmiştir. Bu bulgu, tek bir *in vitro* yöntemin "altın standart" olarak kabul edilemeyeceğini, yöntem seçiminin araştırma sorusuna göre dikkatle yapılması gerektiğini göstermektedir.

2.3. Avantajlar, Kısıtlar ve Yorumlama Sınırları

İn vitro tekniklerin en belirgin avantajı, hayvan varyasyonunu ortadan kaldırarak standart bir inokulum üzerinden çok sayıda muamelenin paralel olarak test edilebilmesidir; bu da hem istatistiksel gücü artırmakta hem de hayvan refahı açısından daha az girişimsel bir yaklaşım sunmaktadır (8). Bununla birlikte kapalı sistem yapısı, konak-mikroorganizma-çevre etkileşimlerinin tam olarak yansıtılamamasına yol açmakta; metabolit birikiminin engellenememesi, tükürük benzeri tamponlamanın sınırlı kalması ve emilim süreçlerinin simüle edilememesi gibi faktörler, *in vitro* sonuçların *in vivo* koşullara doğrudan aktarılmasını güçleştirmektedir (8). Nitekim önceki bölümde de değinildiği üzere, katkı maddelerinin metan azaltım etkinliğine dair meta-analitik bulgular, *in vitro* sistemlerde gözlenen etkilerin genellikle *in vivo* denemelerdekinden daha belirgin olduğunu göster-

mektedir; bu durum, laboratuvar bulgularının hayvan düzeyinde doğrulanmasının neden vazgeçilmez bir adım olduğunu bir kez daha ortaya koymaktadır (7).

Sonuç olarak *in vitro* fermantasyon teknikleri, alternatif ve fonksiyonel yem kaynaklarının taranmasında etkin maliyet ile hızlı ve etik açıdan avantajlı bir ilk basamak sunmaktadır. Ancak bu yöntemlerden elde edilen bulgular, nihai öneriler haline getirilmeden önce mutlaka *in vivo* koşullarda da doğrulanmalı; yöntem seçimi de araştırmanın amacına (tarama mı, besin maddelerinin metabolik yollarını anlamaya yönelik temel analizler mi, yoksa uzun süreli mikrobiyota etkisi mi) göre özenle yapılmalıdır.

3. ALTERNATİF YEM KAYNAKLARI

Ruminant beslemesinde geleneksel yem hammaddelerine (mısır, soya küspesi, yonca vb.) olan bağımlılığın azaltılması hem maliyet hem de sürdürülebilirlik açısından giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bu bölümde tarımsal yan ürünler, böcek kaynaklı protein alternatifleri, deniz yosunları ve tropikal ağaç yaprakları olmak üzere dört ana kategori, *in vitro* sindirilebilirlik, fermantasyon karakteristikleri ve metan üretimi üzerindeki etkileri bakımından ele alınacaktır.

3.1. Tarımsal Yan Ürünler

Gıda ve tarım endüstrisinin çeşitli aşamalarında ortaya çıkan yan ürünler, döngüsel ekonomi ilkeleriyle örtüşen, düşük maliyetli bir besin kaynağı potansiyeli taşımaktadır. Ahmed ve ark. (12), turunçgil posası ile soğan kabuğunun ruminant rasyonlarına %10-20 düzeyinde katılmasını *in vitro* koşullarda değerlendirmiş; turunçgil posasının enerjice zengin bir materyal olarak %20 düzeyine kadar konsantre karışımının yerini güvenle alabildiğini, buna karşın soğan kabuğunun %10'u aşan katılımının rumen fermantasyonunu olumsuz etkilediğini bildirmiştir. Aynı çalışmada her iki materyalin de enterik metan üretimini azaltma potansiyeli göstermediği vurgulanmıştır.

Asidojenik fermantasyon yoluyla elma posası ve patates protein sıvısından elde edilen uçucu yağ asitlerinin (UYA) rasyonun enerji bileşeni olarak kullanılması da dikkat çekici sonuçlar vermiştir. Parchami ve ark. (13), konsantre enerjisinin %20'sinin bu VFA karışımıyla ikame edilmesinin metan üretimini anlamlı biçimde azalttığını, üstelik simüle rumen ortamındaki UYA üretimini de olumsuz etkilemediğini rapor etmiştir. Benzer biçimde, atık papaya silajının (%60 düzeyinde) buzağı rasyonlarına katılmasının *in vitro*, *in situ* ve *in vivo* yöntemlerle paralel biçimde değerlendirildiği bir çalışmada, muamele grubunun kontrol grubuna kıyasla benzer performans gösterdiği; hatta günlük canlı ağırlık artışı ve kuru madde tüketimi açısından daha olumlu sonuçlar verdiği Gómez-Trinidad ve ark. (14) tarafından bildirilmiştir.

Enerji kaynağı ikamesi bağlamında hurma çekirdeğinin mısırın yerini alması da incelenmiştir. Sabry ve ark. (15), mısırın %50'sinin hurma çekirdeğiyle ikame edilmesini önermiş; bu düzeyin hem fermantasyon parametrelerini iyileştirdiğini hem de fenolik bileşiklerin katkısıyla metan üretimini azalttığını göstermiştir. Kanola tohumu kabuğu unu üzerine yapılan bir başka çalışmada ise Wanapat ve ark. (16), bu materyalin konsantrenin yerine farklı oranlarda ikame edildiğinde gaz üretim kinetiğini ve *in vitro* sindirilebilirliği artırdığını; kaba/konsantre yem oranının metan üretimi üzerinde materyalin kendisinden daha belirleyici olduğunu ortaya koymuştur.

3.2. Böcek Bazlı Protein Kaynakları

Böcek proteinleri, özellikle yüksek yağ ve protein içerikleri ile doymamış yağ asidi profilleri nedeniyle soya küspesine alternatif olarak son yıllarda yoğun ilgi görmektedir. Ahmed ve ark. (17), ipekböceği pupasının (hem dut yaprağıyla hem yapay diyetle beslenen formları) ve domuz gübresinde yetiştirilen karasineğin larva/pupa formlarının soya küspesinin yerine geçmesini test etmiş; ipekböceği türevlerinin %40'a varan katılım düzeylerinde bile UYA üretimini olumsuz etkilemediğini, amonyak-azot konsantrasyonu ile besin madde sindirilebilirliğini artırdığını ve metan üretimini %20 oranında azalttığını bildirmiştir. Buna karşın karasinek larva ve pupasının %10'u aşan katılım düzeylerinde rumen fermantasyonunu baskıladığı, dolayısıyla bu materyaller için daha düşük katılım oranlarının önerildiği vurgulanmıştır.

Aynı araştırma grubunun daha önceki bir çalışmasında, dört farklı yenilebilir böcek türünün soya küspesinin %25'ini ikame ettiğinde besin madde sindirilebilirliğini ya da UYA üretimini etkilemediği; bunun yanında iki türün (Gryllus bimaculatus ve Bombyx mori) metan üretimini sırasıyla %18 ve %16 oranında azalttığı Ahmed ve ark. (18) tarafından gösterilmiştir. Bu bulgular, böcek bazlı proteinlerin yalnızca besin değeri açısından değil, aynı zamanda çevresel ayak izinin azaltılması bakımından da umut verici bir alternatif olduğuna işaret etmektedir; ancak katılım düzeyinin türe özgü olarak dikkatle belirlenmesi gerektiği açıktır.

Böcek türleri arasında kara asker sineği (Hermetia illucens) larvası, organik atıklar üzerinde hızla çoğalabilmesi ve yüksek protein-yağ içeriği nedeniyle ayrı bir ilgi görmektedir. Jayanegara ve ark. (19), bu larvanın soya küspesinin yerine napier otu bazlı bir rasyonda %40 düzeyinde kullanılmasını *in vitro* koşullarda değerlendirmiş; larva ikamesinin kuru madde ve organik madde sindirilebilirliğini bir miktar düşürmesine karşın metan üretimini soya küspesine kıyasla anlamlı biçimde azalttığını bildirmiştir. Araştırmacılar bu azalmayı, larva dış iskeletinde bulunan kitin içeriğine ve daha yaşlı (iki haftalık) larvaların daha düşük metan/sindirilebilir organik madde oranı vermesine bağlamıştır; bu da böceğin gelişim evresinin fermantasyon sonuçlarını etkileyen bir değişken olduğunu göstermektedir.

Böcek biyokütlesinin yalnızca protein değil, yağ bileşeni de değerlendirilebilmektedir. Prachumchai ve ark. (20), kara asker sineği larvasından elde edilen yağı farklı kaba/konsantre yem oranlarındaki rasyonlara %0-6 düzeyinde ekleyerek *in vitro* gaz üretim tekniğiyle test etmiş; %4 larva yağının 40:60 kaba/konsantre oranıyla birlikte kullanılmasının propiyonat konsantrasyonunu artırdığını, metan üretimini azalttığını ve kuru madde sindirilebilirliğini koruduğunu göstermiştir. Buna karşın %6 düzeyindeki yağ ilavesinin *in vitro* kuru ve organik madde sindirilebilirliğini, amonyak-azot düzeyini ve protozoa popülasyonunu baskıladığı bildirilmiştir. Bu bulgular, böcek yağının metan azaltımında işlevsel bir bileşen olabileceğini, ancak katkı düzeyinin dikkatle ayarlanması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Böcek proteininin fiziksel işleme formu da fermantasyon sonuçlarını etkileyen bir faktör olarak öne çıkmaktadır. Phowang ve ark. (21), kara asker sineği larvasını toz ve pelet formlarında hazırlayarak soya küspesinin farklı düzeylerde (%25-100) yerine ikame etmiş ve Ankom Daisy inkübatörü kullanarak *in vitro* gaz üretim kinetiği ile rumen-abomasum degradabilitesini değerlendirmiştir. Araştırmacılar, her iki formun da asetik asit konsantrasyonunu düşürüp propiyonik asidi artırdığını; en belirgin metan azaltımının %50 toz form ile %75-100 pelet form katkısında gözlendiğini bildirmiştir. Genel değerlendirmede pelet formun, temel fermantasyon parametreleri açısından toz forma kıyasla daha uygun sonuçlar sunduğu vurgulanmıştır. Bu bulgu, böcek bazlı yem hammaddelerinin yalnızca içeriğinin değil, sunum formunun da ürün performansını belirleyen bir değişken olduğunu göstermektedir.

3.3. Deniz Yosunları ve Mikroalgler

Deniz yosunları hem besleyici içerikleri hem de bazı türlerinde bulunan güçlü anti-metanojenik bileşikler nedeniyle bu alandaki en yoğun araştırılan materyal grubunu oluşturmaktadır. Kırmızı deniz yosunu *Asparagopsis taxiformis*'in içerdiği bromoform, Machado ve ark. (3) tarafından gösterildiği üzere, metanojenlerin üç ana takımını (Methanobacteriales, Methanomassiliicoccales, Methanomicrobiales) baskılayarak *in vitro* koşullarda metan üretimini %99'un üzerinde azaltabilmektedir. Bu etkinin *in vivo* koşullarda da geçerliliği Stefenoni ve ark. (22) tarafından süt ineklerinde test edilmiş; %0,50 düzeyindeki *Asparagopsis* katkısının metan emisyonunu ilk iki dönemde %55-65 oranında azalttığı, ancak bromoformun depolama sırasında bozulması nedeniyle etkinin sonraki dönemlerde azaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada kuru madde tüketimi ve süt veriminin de olumsuz etkilendiği kaydedilmiştir.

Bromoformun rumen içindeki akıbeti ayrı bir araştırma konusu olmuştur. Romero ve ark. (23), bromoformun rumende hızla dibromometana dönüştüğünü, bu sürecin rasyon tipinden bağımsız seyrettiğini ve yedi farklı metanojen suşu üzerinde doza bağlı inhibisyon etkisi gösterdiğini ortaya koymuştur. Ticari uygulanabilirlik açısından önemli bir ge-

lişme, bromoform bileşiklerinin kanola yağında stabilize edilmesidir. Cowley ve ark. (24), bu şekilde hazırlanan formülasyonun besi sığırlarında metan verimini %64-99 oranında azalttığını, karkas ve et kalitesi ile tüketici duyusal değerlendirmeleri üzerinde olumsuz bir etki yaratmadığını bildirmiştir.

Etki mekanizması açısından ise Indugu ve ark. (25), yüksek doz *Asparagopsis* uygulamasının metanol kullanan Methanomassiliicoccales popülasyonunu neredeyse tamamen ortadan kaldırdığını, ancak bu popülasyonun zamanla bromoformu redüktif dehalojenasyon yoluyla etkisiz hale getirerek yeniden çoğaldığını; dolayısıyla etkinin kalıcılığının tek başına yeterli olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte güvenlik boyutu göz ardı edilmemelidir: Muizelaar ve ark. (26), bromoformun süt ve idrarda tespit edilebildiğini, bazı hayvanlarda rumen mukozasında histolojik inflamasyon bulgularına rastlandığını rapor etmiştir; bu bulgu, Sena ve ark. (4) tarafından kuzularda gözlenen rumen lezyonlarıyla da örtüşmektedir.

Diğer alg türlerine yönelik çalışmalar da literatürde yer bulmaktadır. Ahmed ve ark. (27), mikroalg (Euglena) ile *Asparagopsis*'in kombine kullanımının sinerjistik bir etki gösterdiğini, bu kombinasyonun metan verimini tek başına uygulamalara kıyasla daha fazla (%40'a varan oranlarda) azalttığını bildirmiştir. Hindistan kıyılarından toplanan beş farklı deniz yosunu türünün karşılaştırıldığı bir çalışmada ise Malik ve ark. (28), tanen ve saponince zengin türlerin %31-48 aralığında metan azaltımı sağladığını, ancak bu azalmanın fermantasyon paternini bozmadan gerçekleştiğini göstermiştir. Abbott ve ark. (29) tarafından kaleme alınan kapsamlı derleme ise deniz yosunu biyoaktiflerinin (bromoform, floridzin türevleri, saponinler) potansiyelini özetlerken, sürdürülebilir tedarik zinciri ve olası çevresel yan etkiler (ozon tabakası üzerindeki etkiler dahil) konusunda dikkatli olunması gerektiğini vurgulamaktadır.

3.4. Ağaç Yaprakları ve Diğer Ligno-selülozik Materyaller

Tropikal bölgelerde yaygın olarak bulunan ağaç ve çalı yapraklarının rasyona katılması hem protein takviyesi hem de doğal biyoaktif bileşiklerin (kondanse tanenler başta olmak üzere) sağlanması açısından çift yönlü bir fayda sunmaktadır. Albores-Moreno ve ark. (30), *Pennisetum purpureum* bazlı bir rasyona altı farklı ağaç yaprağının %30 düzeyinde katılmasının etkilerini incelemiş; *Leucaena leucocephala*, *Piscidia piscipula*, *Neomillspaughia emargiata* ve *Tabernaemontana amygdalifolia* katkılarının mikrobiyal biyokütle sentezini artırdığını, propiyonik ve bütirik asit oranlarını yükselttiğini ve metan üretimini %15,6-31,6 oranında azalttığını bildirmiştir. Aynı araştırma ekibinin bir sonraki çalışmasında, tropikal ağaç yapraklarının rasyona katılmasının bakteriyel profili de seçici biçimde değiştirdiği, fibrolitik ve non-fibrolitik bakteri kompozisyonunun yaprak türüne göre farklılaştığı Alayón-Gamboa ve ark. (31) tarafından gösterilmiştir.

Boğa ve ark., (2022) farklı baklagil (Fabaceae) ağaçlarından (*Leucaeno leucacephala, Robinia pseudoacacia, Colutea arborescens, Cercis siliquastrum, Wisteria sinensis*) topla-

nan yaprakların besin madde içerikleri ve *in vitro* sindirilebilirliklerinin belirlenmesini amaçlamışlardır. Baklagil yapraklarının birinci hasadında HP değerleri ikinci hasada göre sayısal olarak daha fazla olduğu, birinci dönemde hasat edilen *Robınıa pseudoacacıa* (RP) HP değerinin (%18.16) en fazla olduğu bulunmuştur. Ağaç yapraklarının KM içerikleri %86.34-93.04 arasında, HK içerikleri %5.79-18.49 arasında, HP içerikleri %9.43-18.16 arasında, HY içerikleri %4.98-8.14 arasında NDF içerikleri %21.18-37.75 arasında olduğu belirtilmiştir. GÜ (Gaz üretimi): 21.50-36.75, ME: 6.63-8.85 MJ kg-1 KM, NE_L: 2.11-4.67, MJ kg-1 KM OMS: %33.13-56.65, Metan: %11.75-14.75 arasında bulunmuştur. Gaz üretimi, ME, NE_L ve OMS değerleri, birinci dönemde toplanan *Gleditsia triancanthos* L. türünde daha fazla elde edilmiştir (sırasıyla 36.75, 8.85, 4.67 ve 56.65). Metan üretiminin birinci dönemde *Robinia pseudoacacıa* tür ağaç yapraklarında daha fazla olduğu belirlenmiştir. Çalışmalarında, besin madde içerikleri ve gaz üretim değerleri bakımından baklagil ağaç yapraklarının ruminant hayvan beslemede kullanılabileceğini belirtmişlerdir (45).

Şeker kamışı yaprakları gibi lif bakımından zengin ama besin değeri düşük materyallerin işlenerek değerlendirilmesi de ayrı bir yaklaşımı temsil etmektedir. Jamarun ve ark. (32), fermente şeker kamışı yaprakları ile Tithonia diversifolia'nın tapyoka nişastasıyla birlikte yem plakası formunda işlenmesinin hem fiziksel kaliteyi hem de besin madde sindirilebilirliğini iyileştirdiğini; %10 tapyoka nişastası içeren formülasyonun en dengeli sonucu verdiğini bildirmiştir. Bu tür işleme teknolojileri, düşük kaliteli ligno-selülozik materyallerin depolama kararlılığını ve pratik kullanılabilirliğini artırarak, özellikle kurak dönemlerde alternatif bir kaba yem kaynağı sunma potansiyeli taşımaktadır.

Ilıman iklim kuşağına özgü ağaç yan ürünleri de benzer bir potansiyel taşımaktadır. Shakeri ve ark. (33), zeytin ağacından elde edilen yaprak, meyve ve çekirdek materyallerini tek başlarına substrat olarak *in vitro* fermantasyona tabi tutmuş; bu materyallerin çoğunun kontrol substratına kıyasla benzer düzeyde toplam gaz ve UYA üretimi sağlarken metan üretimini %55,6'ya varan oranda azalttığını bildirmiştir. Aynı çalışmada, yaprak ekstraktları arasında yalnızca kloroform ekstraktının metan üretimini düşürdüğü, bu etkinin asetat/propiyonat oranındaki ve amonyak üretimindeki azalmayla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, zeytin yaprağının -Akdeniz havzasında bolca bulunan bir tarımsal yan ürün olarak- fonksiyonel bir katkı maddesi adayı olabileceğine işaret etmektedir.

Farklı tanen fraksiyonlarının karşılaştırmalı etkisi de literatürde ayrıca ele alınmıştır. Aderao ve ark. (34), polifenolce zengin çeşitli ağaç yapraklarını *in vitro* gaz üretim tekniğiyle değerlendirmiş; hidrolize edilebilir tanence zengin yaprakların kondanse tanence zengin olanlara kıyasla daha yüksek toplam gaz üretimi ile birlikte daha düşük metan üretimi sağladığını, buna karşın kondanse tanence zengin materyalde gecikme fazının daha uzun sürdüğünü ve substrat sindirilebilirliğinin daha düşük kaldığını bildirmiştir. Bu sonuç, tanen tipinin (hidrolize edilebilir veya kondanse) fermantasyon üzerindeki etkisinin tek düze olmadığını, materyale özgü değerlendirmenin önemini bir kez daha vurgula-

maktadır. Boğa ve ark., (2021) Bu amaçla metan salınımının azaltılması amacıyla hayvan beslemede tanen kullanımı ile çevreye metan salınımının ve buradaki enerji kayıplarının azaltılması da sağlanabileceği belirtilmiştir (46).

Genel olarak değerlendirildiğinde, ağaç yaprakları ve beraberindeki tarımsal yan ürünler büyük ölçüde besin değeri ve maliyet avantajı sunarken metan azaltım etkileri değişken kalmakta; buna karşın deniz yosunları -özellikle *Asparagopsis taxiformis*- güçlü ve tutarlı bir anti-metanojenik etki göstermekte, ancak güvenlik ve sürdürülebilir tedarik gibi ciddi kısıtlarla gündeme gelmektedir. Böcek bazlı proteinler ise her iki avantajı (besin değeri ve mütevazı metan azaltımı) bir arada sunan, ancak katılım düzeyi konusunda dikkatli olunması gereken bir ara kategori olarak öne çıkmaktadır.

4. FONKSİYONEL YEM KATKI MADDELERİ

Alternatif yem kaynaklarından farklı olarak fonksiyonel katkı maddeleri, rasyona genellikle çok düşük düzeylerde eklenmelerine karşın rumen fermantasyonunu ve metanojenezi hedefli biçimde yönlendirebilen bileşiklerdir. Bu bölümde bitkisel ikincil metabolitler (saponinler, tanenler, uçucu yağlar), sentetik enzim inhibitörü 3-nitrooksipropanol (3-NOP), alternatif elektron alıcısı olarak nitrat, biyokömür (karbonize biyokütle) ve mikrobiyal katkılar (probiyotikler) ele alınmaktadır. Bu stratejilerin karşılaştırmalı etkinliğine dair kapsamlı bir çerçeve, 110 *in vivo* çalışmayı derleyen bir meta-analizde ortaya konmuş; saponin ve biyokömür metan üretimini ortalama %21, nitrat, yağlar ve 3-NOP'un ise metan verimini %15 azalttığı, tanen ve 3-NOP'un asetat/propiyonat oranını yaklaşık %13 düşürdüğü bildirilmiştir (35).

4.1. Saponinler

Saponinler, birçok bitki familyasında yaygın olarak bulunan, bir steroid ya da triterpenoid çekirdeğe bağlı bir veya daha fazla şeker zincirinden oluşan, yapısal olarak amfifilik (hem suda hem yağda çözünebilen) ikincil metabolitlerdir. Sulu ortamda çalkalandıklarında kalıcı köpük oluşturma özellikleriyle bilinen bu bileşikler, adını Latince "sapo" (sabun) kökünden almaktadır. Doğada yonca, çördük (*Yucca schidigera*), sabun ağacı (*Quillaja saponaria*), sabunotu (*Sapindus mukorossi*), çemen ve çeşitli baklagil türleri gibi kaynaklarda yüksek konsantrasyonlarda yer almaktadır. Hayvan beslemede saponinler uzun süre yalnızca yem tüketimini olumsuz etkileyen anti-besinsel faktörler olarak değerlendirilmiştir; ancak son yıllarda ruminantlarda protozoa popülasyonunu baskılama, azot kullanım etkinliğini iyileştirme ve enterik metan üretimini azaltma yönündeki fonksiyonel potansiyelleri, onları doğal bir rumen modülatörü olarak öne çıkarmıştır. Bu ikili nitelik -bir yandan besleme fizyolojisini olumsuz etkileme riski, öte yandan çevresel ve metabolik fayda sağlama potansiyeli- saponinlerin doz ve kaynak bazında dikkatle değerlendirilmesini gerekli kılmaktadır.

Saponinler, protozoa hücre membranındaki sterollerle kompleks oluşturarak protozoa popülasyonunu baskılayan ve dolaylı olarak protozoa ilişkili metanojenleri hedefleyen yüzey aktif bitkisel bileşiklerdir. Bu alandaki en kapsamlı sentez, 36 *in vitro* çalışmadan 379 veri noktasını değerlendiren bir meta-analizdir; Yanza ve ark. (36), saponin ekstraktlarının metan üretimini kaynağa bağlı olarak %11-40,6 aralığında azalttığını, en güçlü etkinin Sapindus mukorossi'de gözlendiğini bildirmiştir. Aynı analizde, saponin katkısının kuru madde sindirilebilirliğini genellikle %8-19 oranında düşürdüğü, ancak bazı kaynakların (örneğin çay saponini) toplam UYA ve propiyonat üretimini artırdığı; dolayısıyla etkinin doza ve kaynağa bağlı, ikinci dereceden (kuadratik) bir yanıt gösterdiği vurgulanmıştır.

Kaynağa özgü değişkenliğin altını çizen bir başka çalışmada, Kozłowska ve ark. (37), on farklı yonca (*Medicago sativa*) çeşidini saponin içeriği açısından değerlendirmiş; silaj formundaki Kometa ve Verko çeşitlerinin temel fermantasyon parametrelerini olumsuz etkilemeden metan üretimini azalttığını, kökten ekstrakte edilen belirli saponin fraksiyonlarının (medikajenik saponin türevleri) en belirgin etkiyi gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, saponinlerin yalnızca miktarının değil, moleküler yapısının da metan azaltım etkinliğini belirlediğini göstermektedir.

4.2. Tanenler ve Fitokimyasal Kombinasyonlar

Tanenler, bitkilerin yaprak, kabuk, meyve ve tohumlarında bol miktarda bulunan, proteinlerle ve diğer makromoleküllerle geri dönüşümlü kompleksler oluşturabilen yüksek molekül ağırlıklı polifenolik bileşiklerdir. Kimyasal yapılarına göre başlıca iki gruba ayrılırlar: gallik asit veya ellagik asit türevlerinin şekerlerle esterleştiği hidrolize olabilen tanenler ile flavan-3-ol birimlerinin polimerleşmesiyle oluşan kondanse tanenler (proantosiyanidinler). Yem bitkileri arasında özellikle baklagil yem bitkileri (Lotus türleri, Onobrychis viciifolia), ağaç ve çalı yaprakları ile çeşitli tarımsal yan ürünler önemli tanen kaynaklarını oluşturmaktadır. Saponinlerde olduğu gibi, tanenler de uzun süre yalnızca sindirilebilirliği ve yem tüketimini düşüren anti-besinsel bileşikler olarak görülmüştür; oysa günümüzde, orta düzeylerde kullanıldıklarında proteini ruminal parçalanmadan koruyarak bağırsakta emilime yönlendirme (bypass protein etkisi), şişkinliği önleme, iç parazitlere karşı etki gösterme ve enterik metan üretimini azaltma gibi çok yönlü işlevsel faydaları nedeniyle değerli fonksiyonel katkılar olarak kabul edilmektedir. Bu etkilerin yönü ve şiddeti; tanenin tipine, molekül ağırlığına, konsantrasyonuna ve rasyonun bileşimine göre belirgin biçimde değişmekte, bu da tanen içeren materyallerin kaynağa özgü olarak değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Tanenler, giriş bölümünde de değinildiği üzere, hem protein-tanen kompleksleri oluşturarak ruminal degradasyonu yavaşlatan hem de metanojenlere doğrudan etki gösteren polifenolik bileşiklerdir (6). Fitokimyasalların kombine kullanımının potansiyeli, Totakul ve ark. (38) tarafından incelenmiş; mangostan, rambutan ve muz çiçeği içeren bir fitobesin peleti (MARABAC) ile limon otu (Cymbopogon citratus) tozunun birlikte kullanılma-

sının gaz üretim kinetiğini ve propiyonat üretimini artırırken metan üretimini azalttığı, %2 pelet + %2 limon otu kombinasyonunun en iyi sonucu verdiği gösterilmiştir. Bu çalışma, farklı fitokimyasal sınıfların (saponin ve kondanse tanen) bir arada kullanıldığında sinerjik bir etki oluşturabileceğine işaret etmektedir.

Tanen kompozisyonunun metan azaltımındaki belirleyici rolü, saflaştırılmış ekstraktlarla yapılan çalışmalarda daha da netleşmektedir. Verma ve ark. (39), dört farklı ılıman iklim yem bitkisinden (gazalboynuzu *Lotus corniculatus*, sulla *Hedysarum coronarium*, büyük gazalboynuzu *Lotus pedunculatus* ve çayır düğmesi *Sanguisorba minor*) saflaştırdıkları tanen ekstraktlarını çok yıllık çim substratına farklı düzeylerde ekleyerek *in vitro* koşullarda test etmiştir. Tüm ekstraktların metan üretimini kontrole kıyasla azalttığı; ancak en yüksek azalmayı sağlayan sulla ve büyük gazalboynuzu ekstraktlarının (%15) aynı zamanda gaz üretimini de düşürerek sindirilebilirlikte gerilemeye yol açtığı belirlenmiştir. Buna karşın gazalboynuzu ve çayır düğmesi ekstraktları, yem sindirilebilirliğini anlamlı biçimde düşürmeden metanı %12'ye kadar azaltmıştır. Araştırmacılar bu farkı, ekstraktların baskın tanen tipine (prosiyanidin ağırlıklı düşük polimerizasyon dereceli yapılar ile prodelfinidin ağırlıklı yüksek polimerizasyonlu yapılar arasındaki ayrıma) bağlamıştır; bu da bir önceki bölümde vurgulanan "tanen tipinin etkiyi belirlediği" ilkesini pekiştirmektedir.

4.3. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, bitkilerin yaprak, çiçek, tohum, kabuk ve kök gibi çeşitli dokularında sentezlenen, düşük molekül ağırlıklı ve yüksek buhar basıncına sahip aromatik bileşiklerin kompleks karışımlarıdır. Başlıca terpenoidler (mono- ve seskiterpenler) ile fenolik bileşiklerden (timol, karvakrol, öjenol, sinamaldehit gibi) oluşan bu uçucu maddeler, bitkinin savunma ve kokusal iletişim işlevlerinde rol oynar; damıtma veya soğuk presleme yoluyla elde edilirler. Antimikrobiyal, antioksidan ve antiparaziter özellikleriyle geleneksel olarak bilinen uçucu yağlar, hayvan beslemede özellikle antibiyotik büyütme faktörlerinin yasaklanmasının ardından doğal alternatifler olarak yoğun ilgi görmeye başlamıştır. Ruminantlarda uçucu yağların lipofilik yapıları, hücre membranına nüfuz ederek başta Gram-pozitif bakteriler olmak üzere seçili mikrobiyal grupları etkilemelerine olanak tanır; bu yolla protein ve nişasta degradasyonunu yavaşlatabilir, amonyak üretimini azaltabilir ve metanojenez ile hidrojen üreten mikroorganizmaları baskılayarak enterik metan üretimini düşürebilirler. Bununla birlikte etkinlikleri bileşime, doza ve rasyon tipine göre büyük değişkenlik gösterir; düşük dozlarda seçici ve faydalı bir modülasyon sağlarken, yüksek dozlarda geniş spektrumlu antimikrobiyal etkileri nedeniyle toplam fermantasyonu ve yem sindirilebilirliğini baskılayabilmeleri, bu bileşiklerin dikkatle dozlanmasını gerektirmektedir.

Bu doğrultuda uçucu yağlar, bitkilerin aromatik ikincil metabolitleri olup geniş spektrumlu antimikrobiyal etkileriyle rumen fermantasyonunu modüle edebilmektedir. Bene-

tel ve ark. (40), on farklı uçucu yağı, tropikal mera otuyla beslenen Nellore sığırlarından alınan rumen sıvısı kullanarak dört ayrı dozda test etmiş; oregano ve beyaz kekik yağlarının 250 mg/L düzeyinde substrat degradasyonunu etkilemeksizin net metan üretimini azalttığını bildirmiştir. Araştırmacılar bu iki yağın, iyonoforlara alternatif bir doğal katkı maddesi olarak umut vaat ettiğini vurgulamıştır. Bununla birlikte uçucu yağların etkinliği doza yüksek oranda bağımlıdır; yüksek dozlarda geniş ve seçici olmayan antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle yem degradasyonunu ve toplam UYA üretimini baskılayabildikleri de bildirilmiştir (8).

4.4. 3-Nitrooksipropanol (3-NOP)

Sentetik bir bileşik olan 3-NOP, metanojenezin son basamağını katalize eden metil-koenzim M redüktaz enzimini spesifik olarak inhibe ederek metan üretimini hedefleyen, günümüzde ticari olarak da onaylanmış en umut verici katkı maddelerinden biridir. Ancak 3-NOP'un metanojenezi baskılarken rumende hidrojen birikimine yol açması, indirgeyici eşdeğerlerin (dolayısıyla yem enerjisinin) israfına neden olan bir dezavantaj oluşturmaktadır. Liu ve ark. (41), bu sorunu aşmak amacıyla 3-NOP'u vitamin B_{12} ile kombine etmiş; bu kombinasyonun propiyonat üretim yolunu teşvik ederek hidrojen kullanımını yönlendirdiğini, kuru madde sindirilebilirliğini etkilemeden metan emisyonunu %12 oranında azalttığını ve asetat/propiyonat oranını düşürdüğünü *in vitro* simüle fermantasyonla göstermiştir. Bu yaklaşım, tek başına inhibisyon yerine hidrojenin verimli metabolik yollara yönlendirilmesinin önemini vurgulamaktadır.

4.5. Nitrat

Nitrat, rumende alternatif bir elektron alıcısı olarak işlev görmekte; nitrattan nitrite, oradan da amonyağa indirgenme sürecinde hidrojen tüketerek metanojenezle rekabet etmektedir. Bu mekanizma etkili bir metan azaltımı sağlasa da ara ürün olan nitritin birikmesi hayvan sağlığı açısından risk oluşturarak metabolik hastalıklara kapı aralamaktadır. Pang ve ark. (42), keçi rumeninden izole ettikleri, nitrat/nitrite bağımlı metan oksidasyonu yapabilen bir *Pseudomonas aeruginosa* suşunun *in vitro* fermantasyona eklenmesinin hem metan salımını azalttığını hem de nitrat katkısının yol açtığı nitrit birikimini ve propiyonik asit düşüşünü hafiflettiğini göstermiştir. Bu bulgu, nitratın metan azaltım potansiyelinin, güvenlik risklerini yönetecek biyolojik stratejilerle birlikte değerlendirilmesi gerektiğine işaret etmektedir.

4.6. Biyokömür (Biyoçar)

Biyoçar, organik biyokütlenin oksijensiz ortamda ısıl olarak parçalanmasıyla (piroliz) elde edilen, gözenekli bir karbon materyalidir; metanojenler için bir yüzey sağlayarak veya

elektron transferini etkileyerek fermantasyonu modüle edebileceği öne sürülmüştür. Ancak literatürdeki bulgular tutarsızdır. Benchaar ve ark. (43), farklı biyokütle kaynaklarından üretilmiş, fiziksel ve kimyasal özellikleri belirgin biçimde farklılaşan yedi biyokütleyi üç ayrı katılım düzeyinde (%1, %2, %5) test etmiş; bu materyallerin hiçbirinin -özelliklerindeki büyük farklılıklara rağmen- gaz ve metan üretimini, UYA profilini ya da amonyak-azot konsantrasyonunu değiştirmediğini bildirmiştir. Araştırmacılar, bu *in vitro* bulgular ışığında biyokömürün enterik metan azaltımı için uygulanabilir bir strateji olmadığı sonucuna varmıştır. Bu net olumsuz sonuç, önceki bölümlerde değinilen bazı olumlu bulgularla birlikte değerlendirildiğinde, biyokütle etkisinin üretim koşullarına ve deneysel tasarıma yüksek oranda bağımlı olduğunu göstermektedir.

4.7. Probiyotikler

Probiyotikler, yeterli miktarda verildiğinde konağın sağlığına ve verim performansına olumlu katkı sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Ruminant beslemede bu amaçla en sık kullanılan mikroorganizmalar; canlı maya kültürleri (başta *Saccharomyces cerevisiae*), belirli bakteri türleri (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* türleri gibi) ve bunların kombinasyonlarıdır. Tek mideli hayvanlardan farklı olarak ruminantlarda probiyotiklerin başlıca etki alanı, halihazırda son derece yoğun ve karmaşık bir mikrobiyal ekosistem barındıran rumendir. Bu ortamda probiyotikler doğrudan sindirime katkıdan çok, mevcut mikrobiyotayı modüle ederek etki göstermektedir; canlı maya kültürleri rumendeki artık oksijeni tüketerek anaerobik koşulları stabilize etmekte, laktat kullanan bakterileri destekleyerek ani pH düşüşlerini (subakut ruminal asidoz riskini) önlemekte ve selülolitik bakteri aktivitesini artırarak lif sindirimini iyileştirmektedir. Bakteri temelli probiyotikler ise mikrobiyal dengeyi düzenleyerek besin madde kullanımını ve bağışıklık yanıtını güçlendirebilmektedir. Bu mekanizmalar sayesinde probiyotikler; yem değerlendirme etkinliğini, canlı ağırlık artışını ve genel hayvan sağlığını iyileştiren fonksiyonel katkılar olarak konumlanmakta, enterik metan üzerindeki etkileri ise doğrudan bir inhibisyondan çok fermantasyon verimliliğindeki dolaylı iyileşmeye bağlı olarak değerlendirilmektedir.

Mikrobiyal katkılar arasında en yaygın kullanılanı, canlı maya *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Maya, rumende oksijeni temizleyerek anaerobik ortamı stabilize etmekte, laktat kullanan bakterileri destekleyerek pH dengesine katkı sunmakta ve fibrolitik aktiviteyi artırabilmektedir. Maamouri ve Ben Salem (44), besi buzağılarında canlı maya takviyesinin günlük canlı ağırlık artışını ve yem değerlendirme etkinliğini anlamlı biçimde iyileştirdiğini, *in vitro* sindirilebilirliği artırdığını bildirmiştir. Maya katkısının başlıca avantajı, metan azaltımından çok besin madde kullanım etkinliğini ve hayvan performansını iyileştirmesidir; bu yönüyle diğer katkı maddelerini tamamlayıcı bir rol üstlenebileceği düşünülmektedir.

5. KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRME VE ETKİ MEKANİZMALARI

Önceki bölümlerde alternatif yem kaynakları ve fonksiyonel katkı maddeleri ayrı ayrı ele alınmıştır. Bu bölümde ise söz konusu stratejiler, başlığın üç temel ekseni -sindirilebilirlik, fermantasyon ve metan üretimi- boyunca karşılaştırmalı olarak değerlendirilmekte; etkinlikleri ile bu etkinliğin bedeli arasındaki dengeye özellikle dikkat çekilmektedir.

Metan azaltım stratejilerinin ortak paydası, rumende hidrojenin akıbetini değiştirmeleridir. Metanojenez, fermantasyon sırasında açığa çıkan hidrojen için başlıca "atık kanalı" işlevi gördüğünden, bu yolun baskılanması kaçınılmaz olarak hidrojenin başka bir yöne akmasını gerektirir. Etkinliği yüksek stratejiler tam da bu noktada ayrışır: 3-NOP gibi enzim inhibitörleri metanojenezin son basamağını doğrudan bloke ederken, nitrat alternatif bir elektron alıcısı olarak hidrojeni kendi indirgenmesinde tüketir; saponin ve uçucu yağ gibi bitkisel bileşikler ise protozoa ve seçili bakteri gruplarını hedefleyerek hidrojen üretimini dolaylı biçimde azaltır. İdeal sonuç, açığa çıkan hidrojenin propiyonat gibi enerjice değerli uçucu yağ asitlerine yönlendirilmesidir; nitekim tanen ve 3-NOP'un asetat/propiyonat oranını yaklaşık %13 düşürdüğünün bildirilmesi, bu yönelimin bir göstergesidir (35). Liu ve ark.'nın (41) 3-NOP'u vitamin B_{12} ile birleştirerek hidrojeni propiyonat üretimine kanalize etme yaklaşımı da aynı mantığın rafine bir uygulamasıdır.

Ne var ki metanojenezin baskılanması ile yem sindirilebilirliğinin korunması çoğu zaman birbiriyle çelişen iki hedeftir. Deniz yosunu *Asparagopsis taxiformis*, *in vitro* koşullarda metan üretimini %99'un üzerinde baskılayabilmesine karşın (3), *in vivo* uygulamalarda kuru madde tüketiminde ve süt veriminde düşüşe yol açabilmekte (22), yüksek dozlarda ise rumen mukozasında lezyonlar oluşturabilmektedir (4, 26). Benzer biçimde saponin ekstraktları metan üretimini kaynağa bağlı olarak %40'a varan oranda azaltırken kuru madde sindirilebilirliğini de %8-19 düşürebilmekte (36); tanen ekstraktlarında da en yüksek metan azaltımını sağlayan kaynaklar aynı anda gaz üretimini, dolayısıyla sindirilebilirliği geriletmektedir (39). Uçucu yağların yüksek dozlarda toplam uçucu yağ asidi üretimini baskılaması da (8) aynı çelişkiyi meydana getirmektedir. Bu tablo, "en güçlü metan azaltıcı en iyi stratejidir" biçimindeki yalın bir çıkarımın yanıltıcı olduğunu; asıl hedefin, sindirilebilirliği koruyarak anlamlı bir metan azaltımı sağlayan bir denge noktası bulmak olduğunu göstermektedir.

Bu dengeyi yakalama başarısı doğruya en yakın strateji ve bakış açısının uygulanabilirliği ile sürdürülebilirliğine göre farklılaşmaktadır. Bazı yaklaşımlar sindirilebilirlikten ödün vermeden metan azaltımı sunabilmektedir; örneğin belirli tanen kaynakları yem sindirilebilirliğini anlamlı biçimde düşürmeden metanı %12'ye kadar azaltmış (39), bazı böcek bazlı protein kaynakları ise besin madde sindirilebilirliğini etkilemeden metan üretimini %16-18 oranında geriletmiştir (18). Buna karşın biyokömür gibi bazı katkılar, farklı üretim koşullarında birbiriyle çelişen -kimi zaman etkisiz (43), kimi zaman sınırlı-

sonuçlar vererek güvenilir bir strateji profili çizememektedir. Probiyotikler ise doğrudan metan azaltımından çok, fermantasyon verimliliğini ve hayvan performansını iyileştirerek dolaylı bir katkı sunmakta (44), bu yönüyle diğer stratejilerin tamamlayıcısı olarak konumlanmaktadır.

Karşılaştırmalı değerlendirmede göz ardı edilmemesi gereken bir diğer boyut, *in vitro* bulguların *in vivo* koşullara aktarılabilirliğidir. Bölüm 2'de de vurgulandığı üzere, meta-analitik kanıtlar *in vitro* sistemlerde gözlenen metan azaltım etkisinin genellikle *in vivo* denemelerdekinden daha belirgin olduğunu ortaya koymaktadır (7). Bunun başlıca nedenleri; kapalı *in vitro* sistemlerde emilim ve geçiş hızı gibi konak kaynaklı düzenleyici süreçlerin bulunmaması, mikrobiyal adaptasyonun sınırlı sürede değerlendirilmesi ve bileşik konsantrasyonunun sabit tutulabilmesidir. *Asparagopsis*'te gözlenen bir örnek bu noktayı somutlaştırır: metanol kullanan bazı metanojen gruplarının zamanla bromoformu etkisiz hale getirerek yeniden çoğalması (25), *in vitro*'da güçlü görünen bir etkinin *in vivo*'da neden zayıflayabileceğini gözler önüne sermektedir. Dolayısıyla *in vitro* tarama, güçlü ve vazgeçilmez bir ilk basamak olmakla birlikte, tek başına nihai bir kanıt değil; hayvan denemeleriyle doğrulanması gereken bir yönlendirme aracıdır.

Son olarak, stratejilerin pratik uygulanabilirliği ve sürdürülebilirliği de karşılaştırmanın ayrılmaz bir parçasıdır. Tropikal üretim sistemlerinde ağaç yaprakları ve tarımsal yan ürünler gibi yerel, düşük maliyetli kaynaklar öne çıkarken (5), bu materyallerin metan azaltım etkisi genellikle mütevazı kalmaktadır. Buna karşın *Asparagopsis* gibi güçlü etkili materyaller, sürdürülebilir tedarik zinciri, bromoformun çevresel etkileri ve güvenlik gibi ciddi kısıtlarla gündeme gelmektedir (29). Bu nedenle en uygun stratejinin seçimi; üretim sisteminin tipine, kaynağın bölgesel bulunabilirliğine, maliyet-fayda dengesine ve güvenlik profiline bağlı olarak değişim gösteren özgün bir karardır. Tek ve evrensel bir "en iyi" çözümün bulunmayışı, bu alandaki araştırmaların çok yönlü ve entegre bir yaklaşımla sürdürülmesini zorunlu kılmaktadır. Genel değerlendirme Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Alternatif ve Fonksiyonel Yem Stratejilerinin Karşılaştırmalı Özeti

Strateji	Temel Mekanizma	Metan Azaltımı	Sindirilebilirlik / Fermantasyon Etkisi	Kaynak
Asparagopsis taxiformis	Metil-koenzim M redüktaz inhibisyonu (bromoform)	%55–99 (*in vitro*'da >%99)	Yüksek dozda KM tüketimi/süt verimi düşüşü, mukoza lezyonu riski	3, 4, 22, 26
Saponinler	Protozoa membran lizisi, dolaylı metanojen baskılama	%11–40,6 (kaynağa bağlı)	KM sindirilebilirliğinde %8–19 düşüş (bazı kaynaklarda UYA artışı)	36, 37

Tanenler (saflaştırılmış)	Protein-tanen kompleksi, metanojenlere doğrudan toksisite	%12–15 (tanen tipine bağlı)	Yüksek dozda gaz üretimi/sindirilebilirlik düşüşü; düşük-orta dozda etkisiz	39
Uçucu yağlar	Gram-pozitif bakteri/membran etkisi	Doza bağlı, orta düzey (250 mg/L'de anlamlı)	Yüksek dozda toplam UYA baskılanması	8, 40
3-NOP (± vitamin B_{12})	Metanojenez son basamağı inhibisyonu	%12 (kombinasyonla)	KM sindirilebilirliği etkilenmez; asetat/propiyonat düşer	41
Nitrat (± biyolojik destek)	Alternatif elektron alıcısı	Güçlü (mekanizma bazlı)	Nitrit birikimi riski; propiyonat düşüşü (destekle hafifler)	42
Biyokömür	Yüzey etkisi / elektron transferi (varsayım)	Tutarsız / etkisiz	Belirgin etki yok	43
Böcek bazlı proteinler	Kitin içeriği, dolaylı etki	%16–20	Genellikle sindirilebilirliği etkilemez (düşük dozda)	18, 19, 20
Probiyotikler (maya)	Anaerobik ortam stabilizasyonu, dolaylı	Doğrudan azaltım sınırlı	Sindirilebilirlik ve performansı iyileştirir	44

KM = kuru madde; UYA = uçucu yağ asidi. Kaynak numaraları, bölümün kümülatif kaynakça listesindeki (1–44) sıralamaya karşılık gelmektedir.

6. SONUÇ VE GELECEK PERSPEKTİFLERİ

Bu kitap bölümde, alternatif ve fonksiyonel yem kaynaklarının ruminantlarda *in vitro* sindirilebilirlik, fermantasyon ve metan üretimi üzerindeki etkileri güncel literatür ışığında ele alınmıştır. Ortaya çıkan tablo, tek bir stratejinin tüm koşullar için ideal olmadığını; her materyalin kendine özgü avantajları, kısıtları ve denge noktaları ile değerlendirilmesi gerektiğini açıkça göstermektedir.

Alternatif yem kaynakları açısından bakıldığında, tarımsal yan ürünler ve bitkisel materyaller öncelikle besin değeri ve maliyet avantajı sunmakta; metan azaltım etkileri ise genellikle mütevazı ve değişken kalmaktadır. Böcek bazlı proteinler, besin değeri ile ılımlı metan azaltımını bir arada sunan umut verici bir ara kategori oluşturmakla birlikte, katılım düzeyinin türe ve forma özgü olarak dikkatle belirlenmesini gerektirmektedir. Deniz yosunları, özellikle *Asparagopsis taxiformis*, bilinen en güçlü antimetanojenik etkiyi göstermekte; ancak bromoformun güvenlik profili, kalıntı sorunu ve sürdürülebilir tedarik

gibi kısıtlar, bu materyalin pratik uygulamasının önündeki en ciddi engelleri oluşturmaktadır.

Fonksiyonel katkı maddeleri arasında ise sentetik enzim inhibitörü 3-NOP, spesifik hedefi ve *in vivo* koşullarda doğrulanmış etkinliğiyle en olgun seçenek olarak öne çıkmaktadır. Bitkisel biyoaktif bileşikler (saponinler, tanenler, uçucu yağlar) kaynağa ve doza bağlı olarak anlamlı bir potansiyel taşımakta, fakat etkilerinin değişkenliği standardizasyonu güçleştirmektedir. Nitrat güçlü bir metan azaltıcı olmakla birlikte güvenlik kaygıları taşımakta, biyokömür tutarsız sonuçlar vermekte, probiyotikler ise doğrudan metan azaltımından çok performans iyileştirmesiyle tamamlayıcı bir rol üstlenmektedir.

Bu literatürün ortaya koyduğu en temel ilke, metan azaltımı ile yem sindirilebilirliğinin korunması arasındaki dengedir. Metanojenezi en güçlü biçimde baskılayan stratejiler, çoğu zaman sindirilebilirlik ve yem tüketimini de olumsuz etkilemektedir. Dolayısıyla asıl hedef, mümkün olan en yüksek metan azaltımı değil, sindirilebilirliği koruyarak sağlanan sürdürülebilir ve pratik bir azaltımdır. Bu dengenin nasıl kurulacağı; üretim sisteminin tipine, kaynağın bölgesel bulunabilirliğine ve maliyet-fayda ilişkisine göre değişen, saha koşullarına göre belirlenmesi gereken bir karardır.

Metodolojik açıdan, *in vitro* teknikler bu alandaki araştırmaların vazgeçilmez ilk basamağını oluşturmaya devam edecektir. Düşük maliyetli, hızlı ve etik açıdan avantajlı yapılarıyla çok sayıda materyalin ön elenmesine imkân tanımaktadırlar. Ancak *in vitro* koşullarda gözlenen etkilerin genellikle *in vivo*'dan daha belirgin olması, laboratuvar bulgularının mutlaka hayvan denemeleriyle doğrulanması gerektiğini vurgulamaktadır. Bu bağlamda, *in vitro* sistemlerin standardizasyonuna yönelik çabaların sürdürülmesi ve *in vitro–in vivo* korelasyonunu güçlendiren çalışmaların artırılması, alanın güvenilirliği açısından kritik önem taşımaktadır.

Gelecek araştırmalar için birkaç öncelikli yön öne çıkmaktadır. Birincisi, farklı stratejilerin bir arada kullanıldığı kombinasyon yaklaşımlar; örneğin bir metan inhibitörü ile hidrojeni değerli ürünlere yönlendiren bir bileşenin birlikte kullanılması, negatif sonuçları azaltarak pozitif katkı sunma potansiyeli taşıyacaktır. İkincisi, mikrobiyal adaptasyon ve etkinin zamanla zayıflaması sorununu aşacak, uzun süreli ve geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Üçüncüsü, özellikle güçlü etkili materyallerde güvenlik, kalıntı ve çevresel sürdürülebilirlik boyutlarının bütüncül biçimde değerlendirilmesi gerekmektedir. Son olarak, bölgesel kaynakların -tarımsal yan ürünler, yerel ağaç yaprakları ve atık materyaller- döngüsel ekonomi ilkeleriyle değerlendirilmesi hem çevresel hem ekonomik açıdan sürdürülebilir çözümler sunacağı aşikardır.

Sonuç olarak, ruminant kaynaklı enterik metan emisyonlarının azaltılması, tek bir "mucize çözüm" ile değil; üretim sistemine, coğrafi koşullara ve hayvan sağlığına duyarlı, çok yönlü ve entegre bir yaklaşımla mümkün olacaktır. Alternatif ve fonksiyonel yemler bu bütünün önemli bir parçasıdır; ancak potansiyellerinin tam olarak gerçekleştirilebil-

mesi, titiz *in vitro* taramaların *in vivo* doğrulamalarla desteklendiği, güvenlik ve sürdürülebilirliğin gözetildiği kanıta dayalı bir araştırma anlayışını gerektirmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Yu G, Beauchemin KA, Dong R. A review of 3-nitrooxypropanol for enteric methane mitigation from ruminant livestock. Animals, 2021; 11(12). https://doi.org/10.3390/ani11123540
2. Beauchemin KA, Ungerfeld EM, Abdalla AL, et al. Invited review: Current enteric methane mitigation options. Journal of Dairy Science, 2022; 105(12), 9297–9326. https://doi.org/10.3168/jds.2022-22091
3. Machado L, Tomkins N, Magnusson M, et al. In vitro response of rumen microbiota to the antimethanogenic red macroalga Asparagopsis taxiformis. Microbial Ecology, 2018; 75(3), 811–818. https://doi.org/10.1007/s00248-017-1086-8
4. Sena F, Portugal AP, Dentinho MT, et al. Effect of the dietary supplementation with sunflower oil-enriched bromoform from Asparagopsis taxiformis on lambs' growth, health, and ruminal methane production. Animal, 2024; 18(8), 101249. https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101249
5. Ku-Vera JC, Castelán-Ortega OA, Galindo-Maldonado FA, et al. Review: Strategies for enteric methane mitigation in cattle fed tropical forages. Animal, 2020; 14(S3), s453–s463. https://doi.org/10.1017/S1751731120001780
6. Min BR, Solaiman S, Waldrip HM, et al. Dietary mitigation of enteric methane emissions from ruminants: A review of plant tannin mitigation options. Animal Nutrition, 2020; 6(3), 231–246. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.05.002
7. Hodge I, Quille P, O'Connell S. A review of potential feed additives intended for carbon footprint reduction through methane abatement in dairy cattle. Animals, 2024; 14(4). https://doi.org/10.3390/ani14040568
8. Chávez-Solis AU, Ábrego-García A, Albores-Moreno S, et al. In vitro methods for assessing gas production and rumen digestibility: Methodological considerations, advantages, and limitations. Journal of Microbiological Methods, 2026; 247, 107566. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2026.107566
9. Kour H, Malik R, Datt C, Rana P. A low-cost continuous rumen simulation system for sustainable in vitro fermentation and feed evaluation in ruminant production. MethodsX, 2025; 15, 103581. https://doi.org/10.1016/j.mex.2025.103581
10. Sun X, Li Y, Giller K, et al. Comparative assessment of emulsifiers for in vitro ruminal gas production and fermentation measurements: Tween 80 is a suitable emulsifier. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2024; 108(3), 680–690. https://doi.org/10.1111/jpn.13924
11. Krizsan SJ, Jančík F, Ramin M, Huhtanen P. Comparison of some aspects of the in situ and in vitro methods in evaluation of neutral detergent fiber digestion. Journal of Animal Science, 2012; 91(2), 838–847. https://doi.org/10.2527/jas.2012-5343
12. Ahmed E, Gaafar A, Nishida T. Agro-industrial by-products as ruminant feed: Nutritive value and in vitro rumen fermentation evaluation. Animal Science Journal, 2024; 95(1), e13974. https://doi.org/10.1111/asj.13974
13. Parchami M, Rustas BO, Taherzadeh MJ, Mahboubi A. Effect of Agro-Industrial by Products Derived from Volatile Fatty Acids on Ruminant Feed In Vitro Digestibility. Animals, 2024; 14(16). https://doi.org/10.3390/ani14162330
14. Gómez-Trinidad M, Sánchez-Santillán P, Ayala-Monter MA, et al. In vitro gas production, in situ digestibility, intake, weight gain and ruminal characteristics of calves fed a diet containing 60% waste papaya silage. Tropical Animal Health and Production, 2024; 56(8), 370. https://doi.

org/10.1007/s11250-024-04219-0
15. Sabry M, Nasser MEA, Kamel HEM, et al. Effect of replacing corn grains with date palm kernels on ruminal fermentation, feed degradability, and methane production under different initial pH conditions. *Animal Biotechnology*, 2021; 33(6), 1268–1279. https://doi.org/10.1080/10495398.2021.1886941
16. Wanapat M, Huang B, Viennasay B, et al. Rapeseed pod meal can replace concentrate and enhance utilization of feed on in vitro gas production and fermentation characteristics. *Tropical Animal Health and Production*, 2020; 52(5), 2593–2598. https://doi.org/10.1007/s11250-020-02296-5
17. Ahmed E, Ishikawa T, Batbekh B, et al. From waste to feed: *In vitro* assessment of spent silkworm by-products and manure-raised housefly as soybean meal substitutes in ruminant feed. *Scientific Reports*, 2025; 15(1), 19403. https://doi.org/10.1038/s41598-025-99934-5
18. Ahmed E, Fukuma N, Hanada M, et al. Insects as Novel Ruminant Feed and a Potential Mitigation Strategy for Methane Emissions. *Animals*, 2021; 11(9). https://doi.org/10.3390/ani11092648
19. Jayanegara A, Novandri B, Yantina N, Ridla M. Use of black soldier fly larvae (Hermetia illucens) to substitute soybean meal in ruminant diet: An in vitro rumen fermentation study. Veterinary World, 2017; 10(12), 1439–1446. https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1439-1446
20. Prachumchai R, Cherdthong A. Black Soldier Fly Larva Oil in Diets with Roughage to Concentrate Ratios on Fermentation Characteristics, Degradability, and Methane Generation. *Animals*, 2023; 13(15). https://doi.org/10.3390/ani13152416
21. Phowang N, Suntara C, Cherdthong A. Effects of Replacing Soybean Meal With Black Soldier Fly Larvae on In Vitro Gas Production Kinetics, Rumen Fermentation, and Rumen-Abomasum Degradability Using an Ankom Daisyii Incubator. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2025; 110(1), 100–111. https://doi.org/10.1111/jpn.70022
22. Stefenoni HA, Räisänen SE, Cueva SF, et al. Effects of the macroalga Asparagopsis taxiformis and oregano leaves on methane emission, rumen fermentation, and lactational performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2021; 104(4), 4157–4173. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19686
23. Romero P, Belanche A, Jiménez E, et al. Rumen microbial degradation of bromoform from red seaweed (Asparagopsis taxiformis) and the impact on rumen fermentation and methanogenic archaea. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2023; 14(1), 133. https://doi.org/10.1186/s40104-023-00935-z
24. Cowley FC, Kinley RD, Mackenzie SL, et al. Bioactive metabolites of Asparagopsis stabilized in canola oil completely suppress methane emissions in beef cattle fed a feedlot diet. *Journal of Animal Science*, 2024; 102. https://doi.org/10.1093/jas/skae109
25. Indugu N, Narayan K, Stefenoni HA, et al. Microbiome-informed study of the mechanistic basis of methane inhibition by Asparagopsis in dairy cattle. *mBio*, 2024; 15(8), e0078224. https://doi.org/10.1128/mbio.00782-24
26. Muizelaar W, Groot M, van Duinkerken G, et al. Safety and Transfer Study: Transfer of Bromoform Present into Milk and Urine of Lactating Dairy Cows. *Foods*, 2021; 10(3). https://doi.org/10.3390/foods10030584
27. Ahmed E, Suzuki K, Nishida T. Micro- and Macro-Algae Combination as a Novel Alternative Ruminant Feed with Methane-Mitigation Potential. *Animals*, 2023; 13(5). https://doi.org/10.3390/ani13050796
28. Malik PK, Kolte AP, Trivedi S, et al. Anti-Methanogenic Potential of Seaweeds and Impact on Feed Fermentation and Rumen Microbiome In Vitro. *Microorganisms*, 2025; 13(1). https://doi.org/10.3390/microorganisms13010123
29. Abbott DW, Aasen IM, Beauchemin KA, et al. Seaweed and Seaweed Bioactives for Mitigation of Enteric Methane: Challenges and Opportunities. Animals, 2020; 10(12). https://doi.

org/10.3390/ani10122432
30. Albores-Moreno S, Alayón-Gamboa JA, Miranda-Romero LA, et al. Effect of tree foliage supplementation of tropical grass diet on in vitro digestibility and fermentation, microbial biomass synthesis and enteric methane production in ruminants. *Tropical Animal Health and Production*, 2018; 51(4), 893–904. https://doi.org/10.1007/s11250-018-1772-7
31. Alayón-Gamboa JA, Albores-Moreno S, Jiménez-Ferrer G, et al. Tropical tree foliage supplementation in ruminants improves rumen fermentation and the bacterial profile and decreases methane production. *Animal Biotechnology*, 2023; 34(9), 4510–4522. https://doi.org/10.1080/10495398.2023.2165935
32. Jamarun N, Ikhlas Z, Zain M, et al. Feed wafers from fermented sugarcane tops and Tithonia diversifolia with added tapioca starch: Effects on physical quality and in vitro parameters for ruminant feed. *Open Veterinary Journal*, 2024; 14(12), 3599–3613. https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i12.41
33. Shakeri P, Durmic Z, Vadhanabhuti J, Vercoe PE. Products derived from olive leaves and fruits can alter in vitro ruminal fermentation and methane production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016; 97(4), 1367–1372. https://doi.org/10.1002/jsfa.7876
34. Aderao GN, Sahoo A, Bhatt RS, et al. In vitro rumen fermentation kinetics, metabolite production, methane and substrate degradability of polyphenol rich plant leaves and their component complete feed blocks. *Journal of Animal Science and Technology*, 2018; 60, 26. https://doi.org/10.1186/s40781-018-0184-6
35. Pepeta BN, Hassen A, Tesfamariam EH. Quantifying the Impact of Different Dietary Rumen Modulating Strategies on Enteric Methane Emission and Productivity in Ruminant Livestock: A Meta-Analysis. *Animals*, 2024; 14(5). https://doi.org/10.3390/ani14050763
36. Yanza YR, Setiawan MA, Fitri A, et al. Influence of saponin extracts on enteric methane emission and rumen fermentation: a meta-analysis of in vitro experiments. *BMC Veterinary Research*, 2026; 22(1). https://doi.org/10.1186/s12917-026-05487-8
37. Kozłowska M, Cieślak A, Jóźwik A, et al. The effect of total and individual alfalfa saponins on rumen methane production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020; 100(5), 1922–1930. https://doi.org/10.1002/jsfa.10204
38. Totakul P, Matra M, Sommai S, Viennasay B, Wanapat M. Combination effects of phytonutrient pellet and lemongrass (Cymbopogon citratus) powder on rumen fermentation efficiency and nutrient degradability using in vitro technique. *Tropical Animal Health and Production*, 2024; 56(2), 97. https://doi.org/10.1007/s11250-024-03936-w
39. Verma S, Akpensuen TT, Wolffram S, et al. Investigating the efficacy of purified tannin extracts from underutilized temperate forages in reducing enteric methane emissions in vitro. *Scientific Reports*, 2024; 14(1), 12578. https://doi.org/10.1038/s41598-024-63434-9
40. Benetel G, Silva TDS, Fagundes GM, et al. Essential Oils as In Vitro Ruminal Fermentation Manipulators to Mitigate Methane Emission by Beef Cattle Grazing Tropical Grasses. *Molecules*, 2022; 27(7). https://doi.org/10.3390/molecules27072227
41. Liu Z, Wang K, Nan X, et al. Effects of combined addition of 3-nitrooxypropanol and vitamin B_{12} on methane and propionate production in dairy cows by in vitro-simulated fermentation. *Journal of Dairy Science*, 2022; 106(1), 219–232. https://doi.org/10.3168/jds.2022-22207
42. Pang J, Liu L, Liu X, et al. A novel identified Pseudomonas aeruginosa, which exhibited nitrate- and nitrite-dependent methane oxidation abilities, could alleviate the disadvantages caused by nitrate supplementation in rumen fluid fermentation. *Microbial Biotechnology*, 2020; 14(4), 1397–1408. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13726
43. Benchaar C, Hassanat F, Côrtes C. Assessment of the Effects of Commercial or Locally Engineered Biochars Produced from Different Biomass Sources and Differing in Their Physical and Chemical Properties on Rumen Fermentation and Methane Production In Vitro. *Animals*, 2023; 13(20). https://doi.org/10.3390/ani13203280

44. Maamouri O, Ben Salem M. The effect of live yeast Saccharomyces cerevisiae as probiotic supply on growth performance, feed intake, ruminal pH and fermentation in fattening calves. *Veterinary Medicine and Science*, 2021; 8(1), 398–404. https://doi.org/10.1002/vms3.631
45. Boğa, M., Avcı, B., C., Kılıç, H., N., Fılık, A. Bazı Baklagil Ağaç Yapraklarının Alternatif Yem Kaynağı Olarak Besin Madde İçerikleri ve Sindirilebilirliklerinin Belirlenmesi, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi,* 2022; 25(5): 1191-1197. https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.993655
46. Boğa, M., Kocadayıoğulları, F., Erkan Can, M. Tanenlerin ruminant hayvan beslemede kullanımı. *Black Sea Journal of Engineering and Science*, 2021; 4(4): 217-225. https://doi: 10.34248/bsengineering.937301