



Araştırma Makalesi (Research Article)

Cilt 2 - Sayı 1: 1-5 / Ocak 2019

(Volume 2 - Issue 1: 1-5 / January 2019)

BAZI AĞAÇ YAPRAKLARININ ANTI METANOJENİK ÖZELLİKLERİNİN *IN VITRO* GAZ ÜRETİM TEKNİĞİ İLE BELİRLENMESİ

Nurullah ŞİMŞEK¹, Adem KAMALAK^{1*}

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, 46100, Kahramanmaraş, Türkiye

Gönderi: 21 Eylül 2018; **Kabul:** 11 Ekim 2018; **Yayınlanma:** 01 Ocak 2019

(Received: September 21, 2018; **Accepted:** October 11, 2018; **Published:** January 01, 2019)

Özet

Bu çalışmanın amacı tanen içeren bazı ağaç yapraklarının anti-metanojenik özelliklerini *in vitro* gaz üretim testiyle belirlemektir. Çalışmada tesbih (*Styrax officinalis*), söğüt (*Salix alba*) ve karaağaç (*Alnus glutinosa*) ağacı yapraklarının kimyasal kompozisyonları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Ham kül içeriği % 4.42 ile 13.33 arasında olup en yüksek kül içeriği tesbih yaprağında bulunmuştur. Ham yağ içeriği % 5.68 ile 9.28 olurken en yüksek ham yağ içeriği tesbih ve söğüt yaprağında bulunmuştur. Ham protein içeriği % 11.64 ile 18.40 arasında olup en yüksek ham protein içeriği karaağaç yaprağında bulunmuştur. NDF ve ADF içerikleri sırasıyla % 28.95 ile 50.21 ve 22.73 ile 33.09 arasında değişmiş en yüksek NDF ve ADF içeriğine söğüt yaprağı sahip olmuştur. Ağaç yapraklarının kondense tanen içerikleri % 1.59 ile 14.29 arasında değişmiş en yüksek değere tesbih çalışmada rastlanmıştır. Ağaç yapraklarının polyethylene glycol (PEG)'li ve PEG'siz ortamlardaki gaz, metan üretimleri, organik madde sindirim derecesi ve metabolik enerji değerleri arasında önemli farklar bulunmuş olup PEG ilavesi tüm parametrelerde artışa neden olmuştur. Bu çalışmada ağaç yapraklarının metan içerikleri % 11 ile 14 arasında olduğundan dolayı söz konusu yaprakların hepsinin düşük seviyede anti-metanojenik potansiyele sahip olduğu söylenebilmektedir. Anti-metanojenik özellik bakımından bu çalışmaya konu olan ağaçları söğüt, karaağaç ve tesbih ağacı şeklinde sıralamak mümkündür. Bu çalışmaya konu olan ağaç yapraklarının anti-metanojenik özelliklerinin *in vivo* denemelerle test edilmesine ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Ağaç yaprağı, *In vitro* gaz, Kondense tanen, Metan

Determination of Anti Methanogenic Characteristics of Some Tree Leaves Using *In Vitro* Gas Production Technique


Abstract: The aim of the current experiment was to determine the antimethanogenic properties of some tree leaves containing condensed tannin. It has been found that there are significant differences among tree leaves of *Styrax officinalis*, *Salix alba* and *Alnus glutinosa* in terms of chemical composition. Crude ash contents of tree leaves ranged from %4.42 to 13.33 with highest being for *Styrax officinalis*. Ether extract contents of tree leaves ranged from %5.68 to 9.28 with highest being for *Styrax officinalis* and *Salix alba*. Crude protein contents of tree leaves ranged from %11.64 to 18.40 with highest being for *Alnus glutinosa*. Neutral detergent fiber and acid detergent fiber contents of


tree leaves ranged from %28.95 to 50.21 and 22.73 to 33.09 respectively, with highest being for *Salix alba*. Condensed tannin contents of tree leaves ranged from %1.59 to 14.29 with highest being for *Styrax officinalis*. It has been found that there are significant differences among tree leaves in terms of gas, methane production, organic matter digestibility, metabolisable energy contents in the absence and presence of PEG. Supplementation of PEG improved all parameters measured in the gas production experiment. It can be said that the tree leaves studied in the current experiment has a low anti-methanogenic potential since the percentage of methane ranged from %11 to 14. It is required that these tree leaves should be tested with *in vivo* experiment to determine the anti-methanogenic potential of these tree leaves.

Keywords: Tree leaves, Condensed tannin, Methane, *In vitro* gas

***Corresponding author:** Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, 46100, Kahramanmaraş, Türkiye

E mail: akamalak@ksu.edu.tr (A. KAMALAK)

Nurullah ŞİMŞEK  <https://orcid.org/0000-0001-9566-1036>

Aden KAMALAK  <https://orcid.org/0000-0003-0967-4821>

Cite as: Şimşek N, Kamalak A. 2019. Determination of anti methanogenic characteristics of some tree leaves using *in vitro* gas production technique. BSJ Agri, 2(1): 1-5.

1. Giriş

Ruminant hayvanlar tarafından alınan karbonhidratlar rumende fermentasyona tabi tutularak uçucu yağlar, karbondioksit, metan ve hidrojen sülfür sentezine neden olmaktadır. Fermentasyon sırasında açığa çıkan H₂ rumen mikro-organizmaları için toksik olmasından dolayı ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Rumen mikro-organizmaları için zararlı etkiye sahip olan H₂ karbondioksit ile birleşerek metana dönüşmekte ve dışarı salınmaktadır. Bu yüzden metan üretimi rumen ortamın korunması için elzem bir işlemdir. Ruminantlar tarafından üretilen bu metana enterik metan denmekte olup, bunun yaklaşık % 85'i geğirme yoluyla dışarı atılmaktadır. Diğer taraftan enterik metan üretimi enerji kaybına neden olduğu için hayvan besleme açısından arzu edilen bir işlem değildir.

Ruminant hayvan tarafından alınan enerjinin % 2-12 enterik metan üretimi olarak kaybedilmektedir (Johnson ve Johnson, 1995). Enterik metan üretiminin istenmemesinin diğer bir sebebi ise küresel ısınmaya önemli katkısının olmasındandır. Enterik metan üretimi insan kaynaklı metan üretiminin % 73'ü gibi önemli bir kısımdan sorumludur (Johnson ve Johnson, 1995). Çevreye verdiği zararlardan dolayı enterik metan üretimi çevreciler tarafından da arzu edilmemektedir. Bu yüzden, son zamanlarda ruminant beslemeciler enterik metan üretimini azaltmak için birçok araştırma yürütmektedirler. Bu araştırmalardan metan üretimini azaltmak için en fazla ümit vaat eden çalışmalar tanen içeren ağaç yaprakları ile yapılan çalışmalar olmuştur. Bu çalışmalar ağaç yapraklarında bol miktarda bulunan kondense tanenin anti-metanojenik olduğu ve enterik metan üretimini önemli derecede azalttığını göstermiştir (Woodward ve ark., 2004; Carulla ve ark., 2005; Puchala ve ark., 2005; Tiemann ve ark., 2008; Grainger ve ark., 2009; Hariadi ve Santoso 2010; Jayanegara ve ark., 2012; Delgado ve ark., 2013; Bhatta ve ark., 2014).

Bu sebeple, mevcut çalışmanın amacı tesbih, söğüt ve karaağaç ağacı yapraklarının anti-metanojenik

özelliklerinin *in vitro* gaz üretim tekniği kullanarak belirlemektir.

2. Materyal ve Metot

Çalışmada tesbih, söğüt ve karaağaç ağacı yaprakları kullanılmıştır. Ağaç yaprakları 10 farklı ağaçtan toplanarak KSÜ Ziraat Fakültesi Yemler ve Hayvan Besleme laboratuvarına getirilerek öncelikle kuru madde içerikleri belirlenmiştir (AOAC, 1990). Arta kalan ağaç yaprakları gölgede kurutulmuş ardından öğütme değirmeninde öğütülerek analize hazır hale getirilmiştir. Öğütme işlemi 1 mm elekten geçecek şekilde yapılmıştır.

2.1. Besin madde analizleri

Toplanan ağaç yapraklarının kimyasal kompozisyonunu belirlemek amacı ile kuru madde, ham kül, ham protein, ham yağ, NDF, ADF ve kondense tanen analizleri en az üç tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır (AOAC, 1990; Van Soest ve ark., 1991).

2.2. *In vitro* gaz üretim miktarları ve metan üretimlerinin belirlenmesi

Gaz üretiminde kullanılan rumen sıvısı, 3 adet ivesi cinsi 2 yaşlı koçlardan alınarak homojen bir şekilde karıştırılmıştır (Etil Kurul Rapor No: 2016/6-4). Yem örnekleri (0.20 g), 30 ml çözeltiyle (10 ml rumen sıvısı + 20 ml yapay tükürük) 100 ml'lik şırıngalar içerisinde 39 °C'de üç tekerrürlü inkübasyona bırakılmış ve gaz ölçümleri inkübasyondan 24 saat sonra ölçülmüştür (Menke ve ark, 1979). İnkübasyonlarda şırıngalara 1 g PEG kullanılarak yemlerde bulunan kondense tanenin olası etkileri belirlenmiştir. Kör denemeden elde edilen gaz değerleri ölçümlerden çıkartılarak yem materyallerinden elde edilen net toplam gazlar belirlenmiştir. Yirmi dört saatlik fermentasyon sonunda oluşan gaz plastik şırınga vasıtasıyla alınarak Infrared metan analiz cihazına (Sensor Europe GmbH, Erkrath, Germany) aktarılarak metan içeriği belirlenmiş ve hem % hem de ml olarak ifade edilmiştir (Goel ve ark., 2008).

2.3. Metabolik enerji içeriklerinin belirlenmesi

Ağaç yapraklarının 24 saatlik gaz ölçüm değerleri ve HP

içerikleri kullanılarak, Metabolik enerji değerleri aşağıdaki formül aracılığıyla hesaplanmıştır (Menke ve Steingass, 1988).

$$\text{Metabolik Enerji (ME) (MJ/kg KM)} = 2.20 + 0.1397\text{GP} + 0.057\text{HP} + 0.002859\text{HY}^2$$

GÜ: 24 saatlik gaz üretimi (ml).

HP: Ham protein (%)

HY: Ham yağ (%)

2.4. Organik madde sindirim derecelerinin belirlenmesi

Ağaç Yaprağının 24 saatlik gaz ölçüm değerleri, HP ve kül içerikleri kullanılarak organik madde sindirim derecesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Menke ve Steingass, 1988).

$$\text{OMSD (\%)} = 14.88 + 0.8893\text{GP} + 0.448\text{HP} + 0.651\text{HK}$$

OMSD: Organik madde sindirime derecesi

GÜ: Gaz üretimi (mL)

HP: Ham protein (%)

HK: Ham kül içeriği (%)

2.5. İstatistik analiz

Elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklar Tukey çoklu karşılaştırma testleri ile belirlenmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Türün ağaç yaprakları üzerine etkisi

Türün ağaç yaprakların kompozisyonu olan etkileri Tablo 1'de belirtilmiş olup ağaç yaprakların kompozisyonunu türden türe önemli değişiklikler göstermiştir. Ağaç yaprakların kuru madde içerikleri aynı olmakla birlikte diğer parametreler bakımından türler arasında belirgin farklar görülmektedir. Ham kül içeriği % 4.42 ile 13.33 arasında olup en yüksek kül içeriği tesbih çalışında bulunmuştur. Ham yağ içeriği % 5.68 ile 9.28 olurken en yüksek ham yağ içeriği tesbih ve söğüt yaprağında bulunmuştur.

Ham protein içeriği % 11.64 ile 18.40 arasında olup en yüksek ham protein içeriği karaağaç yaprağında bulunmuştur. NDF ve ADF içerikleri sırasıyla % 28.95 ile 50.21 ve 22.73 ile 33.09 arasında değişmiş en yüksek NDF ve ADF içeriğine söğüt yaprağı sahip olmuştur. Ağaç yapraklarının kondense tanen içerikleri % 1.59 ile 14.29 arasında değişmiş en yüksek değere tesbih çalışında rastlanmıştır.

Görüldüğü gibi araştırmaya konu olan ağaç yaprakların ham protein içerikleri rumende normal bir fermentasyon için gerekli olan protein seviyesinin üzerinde bulunmuştur. Özellikle söğüt ve karaağacın ham protein içeriği ruminant hayvanların ihtiyaçlarını karşılayacak seviyede olduğu görülmektedir. Diğer taraftan ağaç yapraklarında bulunan kondense tanen miktarının yüksek olması özellikle proteinlerin kullanımını kısıtlayıcı bir unsur olarak görülmektedir. Bilindiği gibi kondense tanen yemlerde bulunan proteinlerle bileşik oluşturarak proteinlerin rumende parçalanmasını azaltmakta buna bağlı olarak ta sindirimini azaltmaktadır. Tesbih yapraklarında yüksek miktarda bulunan kondense tanen

tam sınırdaki bulunan ham proteinin kullanımını sınırlayabilir. Bilindiği gibi kondense tanen miktarının rasyonda % 5 fazla bulunması hayvan besleme açısından ciddi sonuçlar doğurabilir.(Dawson ve ark., 1999; Waghorn ve Shelton, 1997) Bu yüzden tesbih çalışının kullanımında kondense tanenin protein üzerinde olası zararlı etkisini azaltmak için bazı önlemlerin alınması gereklidir. Kondense tanenin negatif etkisini azaltmak için yem katkı maddesi olarak PEG gibi bağlayıcılar ekonomik olması durumunda kullanılması tavsiye edilebilir.

Tablo 1. Farklı türden elde edilen ağaç yaprakların kompozisyonları

Parametreler	Türler				
	Tesbih	Söğüt	Karaağaç	SHO	p
KM	34.26	32.97	33.47	0.456	0.000
HK	13.33 ^a	4.42 ^c	6.99 ^b	0.279	0.000
HY	9.28 ^a	8.23 ^a	5.68 ^b	0.518	0.001
HP	11.64 ^c	14.71 ^b	18.40 ^a	0.547	0.000
NDF	28.95 ^c	50.21 ^a	40.35 ^b	0.950	0.000
ADF	22.94 ^b	33.09 ^a	22.73 ^b	1.444	0.001
KT	14.29 ^a	1.59 ^c	10.28 ^b	0.678	0.000

^{abc} Aynı satırda farklı harf olan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir (P<0.05), SHO= standard hata ortalaması; KM= kuru madde (%), HK= ham kül (%), HY= ham yağ (%), HP= ham protein (%), NDF= nötral deterjan fiber (%), ADF= asit deterjan fiber (%), KT= kondense tanen (%)

3.2. Türün ağaç yaprakları gaz, metan üretimi, organik madde sindirim derecesi ve metabolik enerji üzerine etkisi

Türün ağaç yaprakları gaz, metan üretimi, organik madde sindirim derecesi ve metabolik enerji üzerine etkisi Tablo 2'de verilmiştir. Ağaç yaprakların PEG'siz ortamda fermentasyona tabi tutulması sonucu oluşan gaz miktarı 37.34 ile 43.94 ml arasında olup en yüksek gaz üretimi tesbih ve karaağaç yapraklarında bulunmuştur. Ağaç yaprakların PEG'li ortamda fermentasyona tabi tutulması sonucunda gaz üretimi 43.30 ile 49.36 ml arasında olmuş en yüksek gaz üretimi karaağaç yapraklarında olmuştur. Ağaç yaprakların PEG ile muamelesi gaz üretimini önemli miktarda artırmıştır. PEG'den dolayı gaz üretimindeki artış söğüt yaprağında bulunmuştur.

Ağaç yaprakların PEG'siz ortamda fermentasyona tabi tutulması sonucu oluşan metan miktarı 4.03 ile 5.59 ml arasında olup en yüksek metan üretimi tesbih ve karaağaç yapraklarında bulunmuştur. Ağaç yaprakların PEG'li ortamda fermentasyona tabi tutulması sonucunda metan üretimi 4.08 ile 6.35 ml arasında olmuş en yüksek metan üretimi karaağaç yapraklarında olmuştur. Ağaç yaprakların PEG ile muamelesi metan üretimini önemli miktarda artırmıştır. PEG'den dolayı metan üretimindeki artış karaağaç yaprağında bulunmuştur.

Ağaç yaprakların PEG siz ortamda fermentasyona tabi tutulması sonucu oluşan metan % 10.79 ile 13.05 arasında olup en yüksek metan yüzdesi tesbih ve karaağaç yapraklarında bulunmuştur. Ağaç yaprakların PEG'li ortamda fermentasyona tabi tutulması sonucunda metan % 11.52 ile 12.86 arasında olmuş en yüksek metan

yüzdesi tesbih ve karaağaç yapraklarında olmuştur. Ağaç yaprakların PEG ile muamelesi metan yüzdesini önemli miktarda artırmıştır. PEG'den dolayı metan yüzdesindeki artış söğüt ve karaağaç yaprağında bulunmuştur. Fermentasyon sonunda açığa çıkan gazın metan içeriği (%) o yemin anti-metanojenik potansiyelini değerlendirmede önemli bir kriterdir. Normal koşullarda kaba yemin 24 saatlik fermentasyonu sonucunda üretilen gazın metan içeriği % 16-18 arasında değişmektedir. Lopez ve ark. (2010) anti-metanojenik özellik taşıyan

yemleri üç gruba ayırmıştır. Metan içeriği % 11 ile 14 arasında olan yemlerin düşük, % 6 ile 11 arasında orta ve % 0 ile 6 arasında olanların yüksek anti-metanojenik özellikte olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada ağaç yaprakların metan içerikleri 11 ile 14 arasında olduğundan dolayı söz konusu yapraklarının hepsinin düşük seviyede anti-metanojenik potansiyele sahip olduğu söylenebilir. Anti-metanojenik özellik bakımından bu çalışmaya konu olan ağaçları söğüt, karaağaç ve tesbih ağacı şeklinde sıralamak mümkündür.

Tablo 2. Türün ağaç yaprakları gaz, metan üretimi, organik madde sindirim derecesi ve metabolik enerji üzerine etkisi

	Gaz (ml)		Metan (ml)		Metan (%)		ME (MJ/ kg KM)		OMSD (%)	
	PEG'siz	PEG'li	PEG'siz	PEG'li	PEG'siz	PEG'li	PEG'siz	PEG'li	PEG'siz	PEG'li
Tesbih	42.85a	47.36b	5.59a	5.87b	13.05a	12.39a	9.05a	9.66a	62.45b	66.47b
Söğüt	37.34b	43.30c	4.03c	4.08c	10.79c	11.52b	8.41b	9.21b	60.86b	66.18b
Karaağaç	43.94a	49.36a	5.06b	6.35a	11.53b	12.86a	9.07a	9.81a	67.85a	72.66a
Ö.S	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
SHO	0.727	0.586	0.131	0.081	0.171	0.237	0.099	0.078	0.847	0.519
Tür	***		***		***		***		***	
PEG	***		***		***		***		***	
TürxPEG	***		***		***		ÖD		ÖD	

^{abc} Aynı satırda farklı harf olan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir (P<0.05), Ö.S= önem seviyesi, ÖD: önemli değil, SHO= standard hata ortalaması; ME= metabolik enerji (MJ/kg KM), OMSD= organik madde sindirim derecesi (%).

*** P<0.001.

Ağaç yaprakların PEG'siz ortamda fermentasyona tabi tutulması sonucu oluşan gaz değerleri kullanılarak hesaplanan ME içerikleri 8.41 ile 9.07 MJ arasında olup en yüksek ME içeriği tesbih ve karaağaç yapraklarında bulunmuştur. Ağaç yaprakların PEG'li ortamda fermentasyona tabi tutulması sonucu oluşan gaz değerleri kullanılarak hesaplanan ME değerleri 9.21 ile 9.81 arasında olmuş en yüksek ME değerleri tesbih ve karaağaç yapraklarında bulunmuştur. Ağaç yaprakların PEG ile muamelesi ME değerlerini önemli miktarda artırmıştır. PEG'den dolayı ME içeriklerinde artış söğüt yaprağında bulunmuştur

Ağaç yaprakların PEG'siz ortamda fermentasyona tabi tutulması sonucu oluşan gaz değerleri kullanılarak hesaplanan OMSD % 60.86 ile 67.85 arasında olup en yüksek OMSD tesbih ve karaağaç yapraklarında bulunmuştur. Ağaç yaprakların PEG'li ortamda fermentasyona tabi tutulması sonucu oluşan gaz değerleri kullanılarak hesaplanan OMSD değerleri % 66.18 ile 72.66 arasında olmuş en yüksek OMSD değerleri tesbih yapraklarında bulunmuştur. Ağaç yaprakların PEG ile muamelesi ME değerlerini önemli miktarda artırmıştır. PEG'den dolayı ME artış söğüt yaprağında bulunmuştur.

Tablo 2'de görüldüğü gibi ağaç yapraklarında bulunan kondense tanen PEG ile bağlanması sonucu hem gaz üretiminde hem de metan üretiminde ciddi artışlar meydana gelmektedir. PEG ile bağlanan kondense tanenler rumen mikro-organizmalar üzerindeki negatif etkisinin kalkmasıyla birlikte hem gaz üretiminde hem de metan üretiminde ciddi artışlar olmuştur. Fakat gaz ve metan üretimindeki artışlar kondense tanen miktarı ile doğru orantılı olmamıştır. Kondense tanen miktarı en düşük söğüt yapraklarında olmasına rağmen PEG

ilavesiyle en fazla gaz üretim artışı söğüt yapraklarında bulunmuştur. Metan üretimindeki artış ise kondense tanen içeriği en yüksek olan karaağaç yapraklarında bulunmuştur. Yemlerde bulunan kondense tanenin negatif etkisinin sadece miktarına bağlı olmadığı bunun yanında moleküler ağırlığı ve polimerizasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir. Daha önceki yapılan benzer çalışmalarda farklı ağaç yapraklarının PEG muamelesine farklı tepki verdiği bildirilmiştir (Canbolat ve ark., 2005). Bu çalışmaya konu olan tesbih, söğüt ve karaağaç yapraklarının kompozisyonları arasında önemli farklılıklar olduğu, özellikle protein ve enerji açısından düşünüldüğünde ruminant hayvanların besin madde ihtiyacını karşılamada alternatif bir yem kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Fakat yüksek miktarda kondense tanen içeren tesbih ve karaağaç yaprakların ruminant hayvanların rasyonlarına ilavesi durumunda proteinlerin kullanım etkinliğinin düşebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada ağaç yaprakların metan içerikleri % 11 ile 14 arasında olduğundan dolayı söz konusu yapraklarının hepsinin düşük seviyede anti-metanojenik potansiyele sahip olduğu söylenebilir. Anti-metanojenik özellik bakımından bu çalışmaya konu olan ağaçları söğüt, karaağaç ve tesbih ağacı şeklinde sıralamak mümkündür. Bu çalışmaya konu olan ağaç yapraklarının anti-metanojenik özelliklerin *in vivo* denemelerle test edilmesine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın *in vitro* kısmında, ağaç yapraklarında bulunan kondense tanenin gaz, metan, organik madde sindirim derecesi ve metabolik enerji içeriğine negatif etkisinin olduğu ve bu negatif etkisinin PEG muamelesiyle bertaraf edilebileceğini göstermiştir. Fakat PEG'in pahalı olmasından dolayı uygun ve ekonomik dozun

belirlenmesi için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu aşikârdır.

Teşekkür

Bu çalışma, Nurullah ŞİMŞEK' in 2018 yılında tamamlanan "Bazı ağaç yapraklarının anti metanojenik özelliklerinin in vitro gaz üretim tekniği ile belirlenmesi" başlıklı yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

Kaynaklar

- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. US.
- Bhatta R, Saravanan M, Baruah L, Prasad CS. 2014. Effects of graded levels of tannin-containing tropical tree leaves on in vitro rumen fermentation, total protozoa and methane production. *J Appl Microb*, 118: 557-564.
- Canbolat O, Kamalak A, Ozkose E, Ozkan CO, Sahin M, Karabay P. 2005: Effect of polyethylene glycol on in vitro gas production, metabolizable energy and organic matter digestibility of *Quercus cerris* leaves. *Livest Res Rural Develop*, 17: 42.
- Carulla JE, Kreuzer M, Machmüller A, Hess HD. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian J Agri Res*, 56: 961-970.
- Dawson JM, BATTERY PJ, Jenkins D, Wood CD, Gill M. 1999. Effects of dietary quebracho tannin on nutrient utilization and tissue metabolism in sheep and rats. *J Sci Food Agri*, 79(11): 1423-1430.
- Delgado DC, Galindo J, Cairo J, Orta I, Dominguez M, Dorta N. 2013. Supplementation with foliage of *L. leucocephala*. Its effect on the apparent digestibility of nutrients and methane production in sheep. *Cuban J Agri Sci*, 47(3): 267-271.
- Goel G, Makkar HPS, Becker K. 2008. Effect of *sesbania sesban* and *carduus pycnocephalus* leaves and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L) seeds and their extract on partitioning of nutrients from roughage-and concentrate-based feeds to methane. *Anim Feed Sci Technol*, 147(1-3): 72-89.
- Grainger C, Clarke T, Auldish MJ, Beauchemin KA, McGinn SM, Waghorn GC, Eckard RJ. 2009. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emission and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Can J Anim Sci*, 89: 241-251.
- Hariadi BT, Santoso B. 2010. Evaluation of tropical plants containing tannin on in vitro methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. *J Sci Food Agri*, 90: 456-461.
- Jayanegara A, Lieber F, Kreuzer M. 2012. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *Anim Physiol Anim Nutri*, 96: 365-375.
- Johnson KA, Johnson DE. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci*, 73: 2483-2492.
- Lopez S, Makkar HPS, Soliva CR. 2010. Screening plants and plant products for methane inhibitors. In, Vercoe PE, Makkar HPS, Schlink A (Eds): *In vitro Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies*, 191-231, London, New York.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *J Agri Sci*, 93: 217-222
- Menke KH, Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res Develop*. 28(7): 55.
- Puchala R, Min BR, Goetsch AL, Sahlü T. 2005. The effect of condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. *J Anim Sci*, 83(1): 182-186.
- Tiemann TT, Lascono CE, Wettstein HR, Mayer AC, Kreuzer M, Hess HD. 2008. Effect the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy in growing lamb. *Animal*, 2(5): 790-799.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci*, 74: 3583-3597
- Waghorn GC, Shelton ID. 1997. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. *J Agri Sci*, 128 (3): 365
- Woodward SL, Waghorn GC, Lassey KR, Laboyrie PG. 2004. Condensed tannin in birdshot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduce methane emission from dairy cows. *Proceed New Zealand Soc Anim Prod*, 64: 160-164.