

اثرات گل بومادران و برگ اکالیپتوس بر قابلیت هضم یونجه به روش برون تنی

فردین هژبری^{۱*}، علی شمشادی^۲ و فرخ کفیل زاده^۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۱۸

^۱ بترتیب دانشیار و استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی

^۲ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی

*مسئول مکاتبه: Email: hozhabri@razi.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: گل بومادران و برگ اکالیپتوس دارای ترکیبات فنولی هستند که می‌توانند الگوی تخمیر شکمبه را تحت تاثیر قرار دهند. هدف: این مطالعه به منظور تعیین میزان ترکیبات فنولی گل بومادران و برگ اکالیپتوس و بررسی اثر این دو گیاه روی قابلیت هضم ماده آلی، پروتئین خام و دیواره سلولی یونجه انجام شد. روش کار: مایع شکمبه از دو رأس کوچ سنجابی فیستولا شده، جمع‌آوری و به روش برون تنی قابلیت هضم مواد مغذی اندازه گیری شد. تیمارها شامل یونجه (کنترل) و یونجه به همراه سطوح ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد ماده خشک گل بومادران یا برگ اکالیپتوس بود. نتایج: کل ترکیبات فنولی یونجه، گل بومادران و برگ اکالیپتوس به ترتیب ۵/۹، ۲۳/۳ و ۸۹/۳ گرم در کیلوگرم ماده خشک بود در حالی که کل تانن به ترتیب ۰/۴، ۱۵/۳ و ۷۲/۲ و ساپونین ۱۰/۴، ۶۷/۵ و ۱۷۴/۱ گرم در کیلوگرم ماده خشک بود. افزودن سطوح مختلف گل بومادران به محیط کشت محتوی یونجه تغییر معنی‌داری بر قابلیت هضم مواد مغذی در هیچکدام از ساعات انکوباسیون نداشت. در ساعات اولیه انکوباسیون (۱۸ ساعت) قابلیت هضم ماده آلی تحت تاثیر سطوح مختلف برگ اکالیپتوس قرار نرفت ولی در ساعات پایانی با افزودن سطوح بالاتر از ۱۰ درصد، قابلیت هضم فراسنجه‌های مورد اندازه گیری، روند کاهشی داشت ($p < 0/05$). قابلیت هضم پروتئین خام یونجه تحت تاثیر سطوح مختلف برگ اکالیپتوس قرار گرفت و بیشترین کاهش در حضور ۲۰ درصد این گیاه بود. قابلیت هضم دیواره سلولی یونجه نیز در حضور سطوح مختلف برگ اکالیپتوس کاهش یافت و بیشترین کاهش در سطح ۲۰ درصد مشاهده شد. نتیجه گیری نهایی: نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که دو گیاه مذکور اثرات متفاوتی روی قابلیت هضم مواد مغذی یونجه گذاشتند، به نحوی که برگ اکالیپتوس ضرایب هضم را کاهش داد در صورتی که گل بومادران تاثیر معنی‌داری بر آن نداشت.

واژگان کلیدی: دیواره سلولی، ضرایب هضم، فراسنجه تخمیر، ترکیبات فنولی

مقدمه

در شکمبه می‌توانند منبع انرژی مهمی برای حیوان باشند (در حدود ۸۰ درصد؛ فرانس و سیدونز ۱۹۹۳). در حالی‌که پروتئین میکروبی که شکمبه را ترک می‌کند (به طور نمونه ۸۵-۶۰ درصد؛ ارسکف ۱۹۸۲) بخش

محصولات تخمیری در شکمبه به‌طور عمده اسیدهای چرب فرار و پروتئین میکروبی است که قابل جذب در شکمبه و روده کوچک می‌باشند. اسیدهای چرب فرار

مواد و روش‌ها

گیاهان مورد مطالعه و ترکیبات شیمیایی

گل بومادران (*Achillea millefolium*) و برگ اکالیپتوس (*Eucalyptus globulus*) از مزرعه دانشکده کشاورزی بخش گیاهان دارویی، برداشت و در شرایط محیط آزمایشگاه خشک گردید. تجزیه تقریبی مواد آزمایشی شامل ماده خشک، ماده آلی، رطوبت، خاکستر، پروتئین خام و عصاره اتری بر اساس روش AOAC (۱۹۹۰) و الیاف نامحلول در شوینده خنثی بر اساس روش ونسوست و همکاران (۱۹۹۱) انجام شد. نمونه‌های گیاهی خشک شده آسیاب و از غربال یک میلی‌متری عبور داده شدند.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی و تانن

نمونه‌های گیاهی پس از خشک شدن در سایه و سپس آسیاب نمودن و عبور از غربال یک میلی‌متری مورد استفاده قرار گرفتند.

عصاره‌گیری نمونه

مقدار ۲۰۰ میلی گرم نمونه خشک شده (چهار تکرار) در لوله‌های سانتریفیوژ وزن کرده و با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر محلول استن ۷۰ درصد در ظرف محتوی یخ و به کمک اولتراسوند به مدت ۱۰ دقیقه عصاره‌گیری شد. سپس نمونه حاصل، به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و در پایان عصاره شفاف بالائی محلول سانتریفیوژ شده به وسیله سمپلر جدا شد و به عنوان "عصاره اصلی" برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولی و تانن مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین کل ترکیبات فنولی

محتوی کل ترکیبات فنولی قابل استخراج طبق روش جالکونن-تیتو (۱۹۸۵) و با استفاده از اسید تانیک به عنوان استاندارد، اندازه‌گیری شد. به این طریق که ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره شفاف، ۰/۹ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۵ میلی‌لیتر فولین فنول شیکالتو یک مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد، در لوله‌های سانتریفیوژ با هم مخلوط شدند. بعد از اضافه کردن هر

زیادی از پروتئین ورودی به روده کوچک دام را تأمین می‌کند. با توجه به اهمیت شکمبه در تغذیه حیوان میزبان، تا کنون علاقه‌مندی و تلاش‌های بسیاری برای بررسی روش‌هایی برای دستکاری این اکوسیستم پیچیده انجام پذیرفته یا در حال انجام است. اخیراً قوانینی در اتحادیه اروپا برای ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک به‌عنوان محرک رشد در خوراک‌های دامی وضع شده است. مبنای علمی برای این ممنوعیت براساس نگرانی‌هایی است که استفاده از این آنتی-بیوتیک‌ها در دام می‌تواند موجب انتقال بقایای آنها شود که ممکن است استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را در درمان انسان‌ها به مخاطره اندازد (کاسول و همکاران ۲۰۰۳). با این حال، حذف آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد، علاقه‌مندی به جایگزین‌هایی مناسب برای دستکاری تخمیر شکمبه ایجاد کرد. متابولیت‌های ثانویه در گیاهان به عنوان عامل محافظت گیاه در برابر میکروب‌ها و حمله حشرات تولید می‌شوند (آیسون ۲۰۰۵). اکثر این ترکیبات در میان تانن‌ها، ساپونین‌ها و آلکالوئیدها طبقه‌بندی می‌شوند. فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات زیاد است، بنابراین ممکن است از آن برای دستکاری تخمیر شکمبه با ممانعت از یک گروه میکروبی خاص در اکوسیستم شکمبه استفاده نمود. بخش‌های مختلف گیاهان مانند دانه و برگ توسط آب، متانول یا اتانول عصاره‌گیری می‌شوند و برای ارزیابی فعالیت‌های ضد پروتوزوایی و ضد تولید متان از طریق آزمایش تولید گاز (برون-تنی) مورد استفاده قرار می‌گیرند (کامرا و همکاران ۲۰۰۶). بسیاری از این ترکیبات برای دستکاری عملکرد گوارش در حیوانات نشخوارکننده و غیرنشخوارکننده استفاده می‌شوند (گریتید ۲۰۰۳). بنابراین، در تحقیق حاضر سعی شده است اثرات اضافه نمودن گیاه گل بومادران و برگ اکالیپتوس محتوی متابولیت‌های ثانویه روی قابلیت هضم به‌روش برون‌تنی در ساعت‌های مختلف انکوباسیون مورد ارزیابی قرار گیرد.

میلی لیتر از عصاره متانولی ۵۰ درصد به آن اضافه شد. محتوای داخل لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه به خوبی مخلوط و تکان داده شد و در دور ۳۵۰۰ مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس از مایع شفاف بالای لوله سانتریفیوژ برای تخمین ساپونین استفاده شد. ساپونین‌ها (استروئیدی) در عصاره‌های گیاهی با استفاده از روش کالریتری باکو و همکاران (۱۹۷۷) اندازه گیری شد. ۰/۲۵ میلی لیتر عصاره ساپونین به لوله آزمایش حاوی ۱/۷۵ میلی لیتر اتیل استات اضافه شد. سپس یک میلی لیتر محلول A (۹۹/۵ میلی لیتر اتیل استات^۲ + ۰/۵ میلی لیتر آنیز آلدهید^۳) و یک میلی لیتر محلول B (۵۰ میلی لیتر اتیل استات + ۵۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ) به لوله اضافه شد و به‌طور کامل مخلوط و مدت زمان ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی-گراد در حمام بخار نگهداری شد. بعد از سرد شدن در دمای اتاق، جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

اندازه گیری قابلیت هضم ماده آلی، پروتیین خام و دیواره سلولی سطوح استفاده شده گیاهان در آزمایش مورد نظر شامل یونجه کامل به عنوان کنترل (صفر) و یونجه به همراه سطوح ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد از گل بومادران یا اکالیپتوس بود. برای بررسی اثر گیاهان روی قابلیت هضم در ساعت‌های مختلف انکوباسیون از مرحله اول (مرحله هضم بی‌هوای یا هضم شکمبه‌ای) روش تیلی و تری (۱۹۶۳) استفاده شد. مایع شکمبه از دو رأس گوسفند نر بالغ نژاد سنجابی (۲-۳ ساله) با فیستولای شکمبه‌ای تهیه شد که روی یک جیره بر پایه علوفه همراه با کنسانتره تغذیه شدند. دی اکسید کربن به مدت ۲ دقیقه بدرون مایع شکمبه تزریق و سپس از پارچه پنیر چهار لایه عبور داده شد. محلول مورد نیاز انکوباسیون با بافر به نسبت ۱:۴ مخلوط شد. به محلول جدید دی اکسید کربن تزریق و در حمام بخار کاملاً

محلول، عمل مخلوط کردن و تکان دادن به خوبی صورت گرفت. در این مرحله ۳ تکرار برای هر نمونه در نظر گرفته شد. محلول تهیه شده به مدت ۳۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. عصاره شفاف بالائی برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولی برداشته شد و میزان جذب در ۷۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر^۱ قرائت شد.

تعیین کل تانن قابل استخراج

دو میلی لیتر از عصاره اصلی هر تکرار به لوله‌های آزمایش حاوی پلی وینیل پلی پیرولیدون اضافه شد. سپس مدت ۵ دقیقه محلول کاملاً مخلوط شد. محلول حاصل مدت زمان ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و از عصاره شفاف بالائی برای اندازه‌گیری تانن استفاده شد. بدین طریق که ۰/۱ میلی لیتر عصاره شفاف پلی وینیل پلی پیرولیدون، ۰/۹ میلی لیتر آب مقطر، ۰/۵ میلی لیتر فولین فنول شیکالتو (۱ مولار) و ۲/۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد در لوله آزمایش با هم مخلوط و مدت زمان ۱۰ دقیقه در حمام یخ نگهداری شدند و هر چند وقت یکبار تکان داده و مخلوط شدند. سپس مدت زمان ۳۰ دقیقه در ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. از عصاره بالائی برای اندازه‌گیری کل تانن (تانن متراکم و قابل هیدرولیز) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. کل تانن‌های قابل استخراج از طریق تفاوت بین محتوی ترکیبات فنولی بعد و قبل از اضافه کردن پلی وینیل پلی پیرولیدون تخمین زده شد که شامل تانن‌های قابل استخراج متراکم و قابل هیدرولیز بود.

اندازه گیری ساپونین

پنجاه میلی گرم عصاره گیاهی (عصاره آبی گیاه) در لوله‌های سانتریفیوژ ۱۵ میلی لیتری قرار داده شد و ۵

2. Ethyl acetate
3. Anisaldehyde

1. SP-200 Spectrophotometer (Pye Unicam, Cambridge, UK).

۱۹۹۷) و محتویات برای تعیین دیواره سلولی مورد استفاده قرار گرفت.

روش محاسبات

قابلیت هضم ماده آلی، پروتیین خام و دیواره سلولی یونجه پس از افزودن سطوح مختلف گل بومادران یا برگ اکالیپتوس بر اساس روش تفاوت چرچ و پوند (۱۹۸۸) محاسبه و ارایه شد.

روش آماری

چهار تکرار برای هر آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از مدل خطی عمومی (GLM) در نرم افزار SAS ویرایش ۸/۱ آنالیز شدند. مدل آماری مورد استفاده به صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + e_{ij}$$

در این مدل Y_{ij} مشاهده، μ میانگین هر فراسنجه، D_i اثر سطح گیاه و e_{ij} خطای آزمایش می‌باشد. میانگین‌ها بر اساس روش دانکن مقایسه شدند.

نتایج

ترکیب شیمیایی و متابولیت‌های ثانویه

داده‌های حاصل از ترکیب شیمیایی و همچنین متابولیت‌های ثانویه یونجه، گل بومادران و برگ اکالیپتوس در جدول شماره ۱ ارایه شده است. یونجه محتوی مقادیر زیاد دیواره سلولی و مقدار متوسط پروتیین خام بود. دیواره سلولی گل بومادران بیشتر از برگ اکالیپتوس ولی چربی خام آن کمتر بود. مقادیر پروتیین خام هر دو گیاه نزدیک به هم بود. یونجه محتوی مقادیر کم کل تانن و ساپونین بود. برگ اکالیپتوس دارای بیشترین مقدار ترکیبات فنولی بود و مقادیر کل تانن و ساپونین آن بیشتر از مقادیر مشابه در گل بومادران بود.

مخلوط شد. حدود ۵۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌ها (۵۰۰ میلی-گرم یونجه به عنوان کنترل، ۴۷۵ میلی‌گرم یونجه باضافه ۲۵ میلی‌گرم گل بومادران یا اکالیپتوس، به همین ترتیب برای سایر تیمارها) توزین و درون بطری‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. به این بطری‌ها ۵۰ میلی‌لیتر از محلول انکوباسیون اضافه شد. درجه‌های بونسن روی هر کدام از بطری‌ها قرار گرفت و سپس بطری‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد برای زمان‌های ۱۲، ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار داده شدند. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. دو سری بطری در انکوباسیون قرار داده شد: یک سری برای محاسبه قابلیت هضم ماده آلی و پروتیین خام و سری دوم برای اندازه گیری قابلیت هضم دیواره سلولی. بطری‌های بلانک شامل محتویات صاف شده شکمبه همراه بافر و بدون نمونه بود. پس از هر زمان انکوباسیون، محتویات بطری‌های سری اول به درون لوله‌های جداگانه ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (۱۱۰۰g) شدند. مایع بالای لوله‌ها جمع‌آوری شد. بطری‌ها با ۴۰ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم (۲۰ گرم در لیتر) شستشو داده و به لوله‌های محتوی باقیمانده سانتریفیوژ قبلی اضافه شد و مجدداً در دمای ۴ درجه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (۱۱۰۰g) شد. مایع بالای لوله‌ها دور ریخته شد و باقیمانده در دمای ۵۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت خشک شد تا ماده خشک باقیمانده بدست آید. باقیمانده خشک شده آسیاب و جهت اندازه گیری پروتیین خام و ماده آلی بر اساس روش (AOAC ۱۹۹۰) مورد استفاده قرار گرفت. قابلیت هضم ماده آلی و پروتیین خام به ترتیب بر اساس ماده آلی و پروتیین خام ناپدید شده از مقدار ماده خشک اولیه که در بطری‌ها ریخته شد، محاسبه گردید. محتویات بطری‌های سری دوم به درون فلاسک ۶۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و دوبار با ۲۵ میلی-لیتر محلول شوینده خنثی شسته شد (بلومل و بکر

جدول ۱- میانگین ترکیبات شیمیایی و میانگین ترکیب برخی متابولیت های ثانویه (گرم در کیلوگرم ماده خشک)

یونجه، گل بومادران و برگ اکالیپتوس

برگ اکالیپتوس	گل بومادران	یونجه	
۹۴۳	۹۲۰	۹۰۶/۱	ماده آلی
۹۹/۲	۱۰۲/۳	۱۳۷	پروتئین خام
۱۵۹/۲	۷۱/۷	۱۲/۲	عصاره اتری
۳۸۰	۵۰۳/۶	۵۹۶/۲	الیاف نامحلول در شوینده خنثی (دیواره سلولی)
۸۹/۳	۲۳/۳	۵/۹	کل ترکیبات فنولی
۱۷/۱	۸/۰	۵/۵	ترکیبات فنولی غیر تانن
۷۲/۲	۱۵/۳	۰/۴	کل تانن
۱۷۴/۱	۶۷/۵	۱۰/۴	ساپونین استروئیدی

اکالیپتوس مشاهده شد. روند تغییرات قابلیت هضم دیواره سلولی یونجه در حضور اکالیپتوس مشابه قابلیت هضم پروتئین بود و در کلیه ساعات انکوباسیون سبب کاهش قابلیت هضم شد. اثر سطح جایگزینی نیز معنی دار بود و بیشترین کاهش به سبب ۲۰ درصد برگ اکالیپتوس ثبت شد.

بحث

برخی مطالعات نشان می‌دهد که گیاهان حاوی متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه ساپونین‌ها عمدتاً با افزایش جمعیت باکتریایی در اکوسیستم شکمبه از طریق ممانعت شکارشدن توسط پروتوزوا (چیک ۱۹۹۹؛ وینا و همکاران ۲۰۰۵) باعث افزایش نرخ تخمیر و به دنبال آن، هضم ماده خشک می‌شوند (تالیب و همکاران ۱۹۹۶). به عنوان نمونه در حضور عصاره آبی بومادران (به میزان ۰/۱۲۵ و ۰/۶۲۵ میلی‌گرم در میلی-لیتر مایع انکوباسیون) قابلیت هضم ظاهری ماده خشک افزایش یافت (آلکساندر و همکاران ۲۰۰۷). در حالی که در مطالعه حاضر اثر معنی‌داری بر فراسنجه‌های هضم مواد مغذی مشاهده نشد. احتمالاً مقادیر گل بومادران اضافه شده و محتوای متابولیت‌های ثانویه به اندازه کافی نبوده است که بتواند اثر قابل ملاحظه‌ای بر این

اثرات گیاهان دارویی بر قابلیت هضم

افزودن گل بومادران در سطوح مختلف تاثیر معنی‌داری بر قابلیت هضم ماده‌آلی، پروتئین خام و دیواره سلولی یونجه نداشت (جدول ۲).

به عبارتی می‌توان اذعان نمود که مقادیر تانن و ساپونین موجود در گل بومادران به اندازه‌ای بالا نبود که بتواند در مقادیر اضافه شده تاثیر بر فعالیت میکروارگانیسم‌های محیط کشت داشته باشد و قابلیت هضم مواد مغذی را تحت تاثیر قرار دهد. در ساعات اولیه انکوباسیون (۱۸ ساعت اولیه) قابلیت هضم ماده - آلی تحت تاثیر برگ اکالیپتوس قرار نگرفت (جدول ۳). ولی در ساعات پایانی سطوح ۱۰ درصد و بالاتر از آن سبب کاهش قابلیت هضم ماده آلی شد به نحوی که بیشترین کاهش (۹ درصد) در سطح ۲۰ درصد برگ اکالیپتوس مشاهده شد. روند تاثیرگذاری برگ اکالیپتوس بر قابلیت هضم پروتئین خام و دیواره سلولی کاملاً متفاوت از اثرات گل بومادران بود. به نحوی که در ساعات اولیه انکوباسیون، حضور برگ اکالیپتوس سبب کاهش معنی‌دار قابلیت هضم پروتئین خام یونجه شد. افزایش سطوح برگ اکالیپتوس کاهش قابل ملاحظه‌ای در قابلیت هضم این فراسنجه داشت به نحوی که بیشترین اثر به جهت جایگزینی ۲۰ درصدی یونجه با

فراسنجه‌ها داشته باشد. اثرات کاهش‌ی برگ اکالیپتوس بر فراسنجه‌های هضم به خصوص قابلیت هضم پروتئین خام و دیواره سلولی (جدول ۳) نشان داد که علی‌رغم اینکه سطوح اضافه شده به جیره پایه، مشابه گل بومادران بود، ولی روند تغییر کاملاً متفاوت بود.

جدول ۲- اثر سطوح مختلف (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد ماده خشک) گل بومادران بر قابلیت هضم مواد مغذی (درصد ماده خشک) یونجه در ساعات مختلف انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی؛ (میانگین ± انحراف معیار)

ساعات انکوباسیون				
۴۸	۲۴	۱۸	۱۲	۶
ماده آلی				
یونجه				
۴۵/۳۶±۱/۹۲	۳۷/۵۹±۰/۸۱ ^{ab}	۳۲/۰۶±۰/۲۶	۲۷/۷۰±۰/۶۸	۲۱/۷۱±۱/۵۶
یونجه به همراه سطوح مختلف گل بومادران*				
۴۴/۳۱±۱/۶۶	۳۶/۹۲±۰/۷۵ ^b	۳۳/۶۳±۱/۷۶	۲۸/۱۵±۰/۴۶	۲۱/۸۷±۰/۲۵
۴۳/۶۱±۲/۸۱	۳۷/۷۴±۰/۳۰ ^{ab}	۳۵/۱۷±۲/۰۷	۲۸/۹۷±۰/۰۷	۲۱/۷۶±۰/۰۸
۴۴/۰۴±۱/۷۸	۳۷/۰۴±۰/۹۸ ^b	۳۵/۳۶±۲/۴۱	۲۸/۲۲±۱/۱۱	۲۰/۸۴±۲/۰۹
۴۴/۶۳±۱/۰۰	۴۰/۶۳±۰/۴۸ ^a	۳۵/۱۹±۰/۰۵	۲۹/۱۷±۰/۴۶	۲۱/۰۷±۰/۷۵
۰/۴۹۰۳	۰/۱۰۸۸	۰/۴۰۱۴	۰/۴۸۲۴	۰/۹۱۳۲
۰/۶۷	۰/۵۱	۰/۶۹	۰/۲۸	۰/۴۲
پروتئین خام				
یونجه				
۵۷/۲۳±۲/۰۴	۵۳/۰۶±۰/۲۸	۴۸/۷۵±۰/۳۱	۴۳/۶۲±۱/۴۲ ^a	۳۷/۴۴±۱/۳۳
یونجه به همراه سطوح مختلف گل بومادران*				
۵۷/۵۴±۰/۸۷	۵۱/۷۰±۰/۷۲	۴۸/۱۱±۰/۶۱	۴۳/۲۵±۱/۳۶ ^{ab}	۳۷/۲۱±۱/۹۰
۵۶/۹۵±۱/۶۱	۵۱/۵۸±۲/۰۵	۴۷/۷۸±۲/۲۳	۴۲/۶۲±۱/۹۵ ^{ab}	۳۷/۱۶±۱/۶۷
۵۷/۲۳±۱/۸۷	۵۱/۹۶±۲/۳۴	۴۸/۱۹±۲/۳۹	۴۲/۶۷±۲/۹۷ ^{ab}	۳۷/۳۰±۲/۳۰
۵۵/۶۲±۰/۷۸	۵۱/۷۸±۰/۴۳	۴۷/۲۱±۱/۱۴	۴۰/۸۸±۲/۳۳ ^b	۳۶/۱۲±۰/۹۳
۰/۳۱۲۱	۰/۸۰۵۳	۰/۸۹۴۶	۰/۲۰۰۷	۰/۴۹۵۰
۰/۵۵	۰/۵۱	۰/۵۵	۰/۷۶	۰/۵۸
دیواره سلولی (NDF)				
یونجه				
۳۰/۷۳±۰/۲۶	۲۲/۹۹±۰/۴۱	۲۱/۰۵±۰/۷۹	۱۷/۵۲±۱/۳۸	۱۲/۸۰±۱/۵۶ ^b
یونجه به همراه سطوح مختلف گل بومادران*				
۳۰/۴۵±۰/۳۹	۲۳/۰۹±۰/۶۲	۲۱/۲۳±۰/۹۱	۱۷/۹۲±۱/۱۱	۱۳/۲۸±۱/۴۷ ^a
۲۹/۹۴±۰/۳۹	۲۳/۴۲±۱/۲۷	۲۱/۰۹±۱/۳۹	۱۷/۶۷±۱/۱۶	۱۲/۸۸±۱/۳۹ ^{ab}
۲۹/۶۷±۰/۷۳	۲۲/۰۵±۱/۶۲	۲۰/۰۷±۱/۶۷	۱۷/۹۴±۰/۷۲	۱۲/۸۹±۱/۲۸ ^{ab}
۲۹/۴۶±۰/۸۳	۲۲/۸۰±۰/۶۵	۱۹/۹۴±۱/۵۷	۱۷/۴۱±۲/۴۸	۱۲/۹۳±۱/۳۲ ^{ab}
۰/۱۵	۰/۵۰	۰/۲۰	۰/۸۱	۰/۱۶
۰/۲۲۸۳	۰/۳۷۳۱	۰/۴۷۵۹	۰/۴۳۰۴	۰/۴۷۳۱

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

* داده‌ها پس از تصحیح انجام شده بنابر توصیه چرچ و پوند (۱۹۸۸) آرایه شده است.

جدول ۳- اثر سطوح مختلف (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد ماده خشک) برگ اکالیپتوس بر قابلیت هضم مواد مغذی (درصد ماده خشک) یونجه در ساعات مختلف انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی؛ (میانگین ± انحراف معیار)

ساعات انکوباسیون				
۴۸	۲۴	۱۸	۱۲	۶
ماده آلی				
یونجه				
۴۴/۸۵±۰/۳۶ ^a	۴۰/۴۱±۰/۷۸ ^a	۳۷/۹۶±۰/۵۲	۳۰/۵۴±۱/۲۴	۲۲/۲۸±۲/۰۲
یونجه به همراه سطوح مختلف برگ اکالیپتوس*				
۴۵/۴۹±۰/۵۵ ^a	۴۱/۲۸±۰/۴۷ ^a	۳۸/۵۶±۰/۰۴	۳۱/۶۳±۰/۶۱	۲۴/۱۰±۱/۰۵
۴۳/۱۱±۰/۰۳ ^b	۳۸/۷۲±۰/۰۹ ^{ab}	۳۶/۲۶±۲/۵۱	۲۹/۸۳±۰/۹۴	۲۲/۶۷±۰/۳۱
۴۲/۱۳±۰/۰۷ ^{bc}	۳۶/۵۷±۰/۷۵ ^{bc}	۳۵/۵۳±۱/۴۸	۲۸/۲۷±۰/۴۹	۲۰/۹۰±۰/۳۰
۴۰/۸۸±۰/۳۲ ^c	۳۵/۴۸±۰/۶۳ ^c	۳۴/۸۱±۱/۳۴	۲۸/۰۱±۱/۹۳	۱۹/۸۳±۰/۹۱
۰/۰۰۳۱	۰/۰۱۳۷	۰/۳۱۱۶	۰/۲۷۸۰	۰/۲۶۲۳
۰/۰۵۷	۰/۰۷۶	۰/۰۶۷	۰/۰۵۹	۰/۰۶۱
پروتئین خام				
یونجه				
۶۵/۹۱±۰/۷۸ ^a	۵۶/۱۶±۰/۶۰ ^a	۵۱/۰۶±۰/۵۳ ^a	۴۶/۰۹±۰/۱۲ ^a	۳۹/۴۹±۰/۸۸ ^a
یونجه به همراه سطوح مختلف برگ اکالیپتوس*				
۶۳/۳۸±۱/۵۳ ^b	۵۴/۰۴±۱/۶۲ ^b	۴۹/۷۱±۰/۶۳ ^{ab}	۴۵/۴۳±۰/۸۵ ^a	۳۹/۲۷±۱/۵۲ ^a
۶۱/۵۸±۱/۹۲ ^c	۵۲/۰۶±۱/۴۵ ^c	۴۸/۰۵±۰/۴۱ ^b	۴۴/۱۸±۰/۵۸ ^a	۳۸/۴۲±۱/۱۵ ^a
۵۶/۷۹±۱/۰۴ ^d	۴۸/۳۸±۱/۳۴ ^d	۴۴/۷۸±۰/۴۵ ^c	۴۱/۳۸±۰/۴۴ ^b	۳۵/۹۰±۰/۸۱ ^b
۵۶/۳۳±۱/۴۵ ^d	۴۷/۶۴±۱/۵۶ ^d	۴۴/۲۴±۰/۶۸ ^c	۳۹/۶۱±۰/۶۷ ^b	۳۴/۷۰±۱/۱۵ ^c
۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۵۴	۰/۰۰۰۸
۱/۳۲	۱/۱۷	۰/۹۱	۰/۸۴	۰/۷۴
دیواره سلولی (NDF)				
یونجه				
۳۰/۸۹±۰/۷۳ ^a	۲۳/۷۶±۱/۷۵ ^a	۲۰/۳۵±۱/۱۴ ^a	۱۶/۶۸±۰/۶۷ ^a	۱۰/۷۷±۰/۳۸ ^a
یونجه به همراه سطوح مختلف برگ اکالیپتوس*				
۳۱/۲۷±۰/۶۸ ^a	۲۳/۱۶±۱/۲۶ ^a	۱۹/۹۱±۰/۷۱ ^a	۱۶/۶۱±۰/۴۱ ^a	۱۰/۴۴±۰/۵۷ ^{ab}
۲۸/۸۱±۰/۶۵ ^b	۲۰/۶۶±۰/۵۳ ^b	۱۸/۴۳±۰/۸۷ ^b	۱۴/۵۸±۰/۳۲ ^{ab}	۹/۹۸±۰/۱۷ ^{bc}
۲۷/۵۱±۰/۳۴ ^c	۲۰/۴۸±۰/۷۲ ^b	۱۸/۱۶±۰/۷۲ ^{bc}	۱۴/۴۰±۰/۷۵ ^{ab}	۹/۸۰±۰/۳۳ ^c
۲۷/۰۱±۱/۱۲ ^c	۱۹/۷۶±۱/۰۱ ^b	۱۷/۴۶±۱/۰۵ ^c	۱۴/۰۰±۰/۲۵ ^b	۹/۱۵±۰/۳۵ ^d
۰/۰۰۱۲	۰/۰۱۳۴	۰/۰۰۱۷	۰/۰۷۵۵	۰/۰۰۷۷
۰/۰۶۲	۰/۰۶۵	۰/۰۴۷	۰/۰۴۲	۰/۰۲۲

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار است (p<۰/۰۵).

* داده‌ها پس از تصحیح انجام شده بنابر توصیه چرچ و پوند (۱۹۸۸) ارایه شده است.

در روند تغییر باشد، هر چند نوع و نسبت ترکیبات متابولیت‌های ثانویه نیز عامل مهمی در اثرگذاری

بالاتر بودن میزان متابولیت‌های ثانویه این گیاه (جدول ۱) در مقایسه با گل بومادران می‌تواند دلیلی بر تفاوت

عصاره بخش هوایی بومادران به جیره، تجزیه پذیری دیواره سلولی جیره را به میزان ۱۳ درصد افزایش داد ($p < 0.05$) (برودیسکو و همکاران ۲۰۰۲). همچنین با افزودن ساپونین‌های سسبانیا، افزایشی در جمعیت فیروباکتر سوکسینوژنز (۴۵-۲۱ درصد) و رومینوکوکوس فلاوفاسینز (۴۰-۲۳ درصد) مشاهده گردید (گل و همکاران ۲۰۰۸a). برخی مطالعات نشان می‌دهد که ساپونین نقش مهمی در افزایش باکتری‌های تجزیه‌کننده فیبر (گل و همکاران ۲۰۰۸b؛ پاترا و همکاران ۲۰۰۸) و همچنین قارچ‌های بی‌هوازی دارد (گل و همکاران ۲۰۰۸b). در مطالعه کنونی روند تغییرات کاملاً متفاوت از نتایج این محققین بود و افزودن گل بومادران تغییری بر قابلیت هضم پروتئین خام و دیواره سلولی نداشت ولی برگ اکالیپتوس به میزان قابل ملاحظه‌ای هر دو فراسنجه را کاهش داد. مطالعات متعددی به منظور بررسی اثرات گیاهان دارویی بر قابلیت هضم انجام شده و نتایج متفاوتی گزارش شده است. ناصری و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که تخم شنبلیله تاثیر معنی‌داری بر قابلیت هضم ماده آلی نداشت هرچند سبب افزایش قابلیت هضم پروتئین خام و کاهش قابلیت هضم دیواره سلولی شد. از طرفی ریشه مارچوبه در سطوح پایین (حداکثر ۱۰ درصد ماده خشک) سبب بهبود هضم ماده آلی شد ولی سطوح بالاتر آن سبب کاهش معنی‌دار قابلیت هضم این فراسنجه شد. روند تاثیر ریشه مارچوبه بر قابلیت هضم پروتئین خام و دیواره سلولی شبیه اثرات برگ اکالیپتوس بود و کاهش این دو فراسنجه را در ساعات مختلف انکوباسیون به همراه داشت. این در حالی است که ترکیب درصد و میزان ترکیبات فنولی این گیاهان کاملاً با هم متفاوت است. علاوه بر آن، ال-حسن (۱۹۹۴) بیان نمود که اثرات سمی گونه‌های واجد تانن روی پروتوزوا تنها به سبب خود تاننها نیست بلکه حضور سایر متابولیت‌ها نظیر ساپونین‌ها است. آزمایشاتی مبنی بر توان عادت‌پذیری میکروبی‌های

گیاهان دارویی بر قابلیت هضم محسوب می‌شود. از طرفی، ساپونین‌ها و تانن‌های موجود در گیاهان دارویی به عنوان ترکیباتی هستند که در دزهای پایین اثرات مطلوبی روی فعالیت شکمبه دارند؛ هرچند، سطوح بالای آن ممکن است اثرات معکوسی بر الگوی تخمیر شکمبه داشته باشد (هس و همکاران ۲۰۰۳). با توجه به این نکته که برگ اکالیپتوس دارای مقادیر قابل ملاحظه‌ای تانن و ساپونین می‌باشد می‌توان چنین استنباط کرد که ساپونین‌ها در محیط شکمبه یا در انکوباسیون مایع شکمبه با تجزیه کلسترول غشایی پروتوزوا و در نهایت مرگ پروتوزوا (چیک ۱۹۹۹) سبب کاهش تجزیه-پذیری پروتئین خوراک وابسته به پروتوزوا می‌شوند. علاوه بر این، گزارش شده است که ساپونین‌ها با دیواره سلول پروتوزوا کمپلکس تشکیل می‌دهند که باعث از هم گسستگی دیواره سلولی و از بین رفتن پروتوزوا می‌شوند (فرانسیس و همکاران ۲۰۰۲). تانن-ها و ترکیبات فنلی موجود در گیاه نیز در محیط شکمبه (یا مایع انکوباسیون) با ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین بخش تانن و پروتئین با ایجاد یک کمپلکس غیرقابل هضم برگشت پذیر تحت تاثیر pH، باعث کاهش قابلیت انحلال پروتئین و تجزیه‌پذیری آن توسط باکتری‌های شکمبه می‌شوند (نیگوا و همکاران ۲۰۰۲) و پروتئین را از آنزیم‌های میکروبی محافظت می‌کنند. هم چنین تانن‌ها به علت مهار آنزیم‌های پروتئولیتیک در شکمبه باعث کاهش تجزیه پذیری پروتئین می‌شوند (بلومل و همکاران ۱۹۹۷). با توجه به اینکه بخش عمده‌ای از دیواره سلولی مواد خوراکی در شکمبه توسط میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌های میکروبی مورد هضم قرار می‌گیرد، تغییر در جمعیت میکروبی شکمبه اثرات مستقیمی بر هضم این بخش از خوراک دارد به طوری که در آزمایشی گیاهان حاوی متابولیت‌های ثانویه از طریق تغییر در فلور میکروبی شکمبه و تحریک رشد میکروارگانیسم‌های مرتبط با هضم فیبر، پتانسیل هضم دیواره سلولی موادخوراکی افزایش یافت و افزودن

فعال پس از ۴ ساعت انکوباسیون، غلظت ساپونین در مایع شکمبه کاهش یافت. این محققین علت کاهش را تجزیه ساپونین توسط میکروب‌ها دانستند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از آزمایش، سطوح به کار رفته گل بومادران و برگ اکالیپتوس در این آزمایش نشان داد که روند تاثیرگذاری این دو گیاه دارویی بر هضم پذیری یونجه کاملاً متفاوت بود. احتمالاً یکی از دلایل اصلی این تفاوت، وجود مقادیر، نوع و نسبت‌های متفاوت متابولیت‌های ثانویه‌ای نظیر ساپونین و تانن باشد.

شکمبه به ترکیباتی نظیر ساپونین وجود دارد. به عنوان مثال مکار و بکر (۱۹۹۷) اظهار نمودند که تا ۶ ساعت انکوباسیون با مایع شکمبه، تغییری در ساپونین کوالاجا مشاهده نشد ولی با طولانی‌تر شدن زمان انکوباسیون، تجزیه ساپونین افزایش یافت به نحوی که در ۲۴ ساعت به ۱۰۰ درصد رسید؛ این درحالی بود که در حضور مایع شکمبه اتوکلاو شده حتی تا ۲۴ ساعت انکوباسیون تاثیری روی ساپونین نداشت. این محققین دریافتند که میکروب‌های شکمبه دارای آنزیم‌هایی هستند که قادر به تجزیه ساپونین می‌باشند. همچنین، ماتیسون و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند که در عدم حضور باکتری‌های فعال، ۷۴ درصد ساپونین‌های یونجه بعد از ۸ ساعت انکوباسیون، در مایع شکمبه ظاهر شدند و تا ۲۴ ساعت تغییری در آنها مشاهده نشد. اما در حضور باکتری‌های

منابع مورد استفاده

- Alexander G, Singh B, Sahoo A and Bhat TK, 2007. *In vitro* screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets. *Anim Feed Sci Technol* 145: 229-242.
- AOAC, 1990. Official Analytical Methods (15th ed). Association of Official Analytical Methods Inc, Arlington, VA, USA (index No. 942.04 976. 05).
- Baccou JC, Lambert F and Sauvaire Y, 1977. Spectrophotometric method for determination of total steroidal sapogenin. *Analyst* 102: 458-465.
- Blümmel M, and Becker K, 1997. The degradability characteristics of 54 roughages and roughage neutral detergent fiber as described by in-vitro gas production and their relationship to voluntary feed intake. *Brit J Nut* 77: 757-786.
- Blümmel M, Makkar HPS and Becker K, 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. *J Anim Physiol Anim Nut* 77: 24-34.
- Broudicou LP, Papon Y and Broudicou AF, 2002. Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial mass in a dual flow fermenter. *Anim Feed Sci Technol* 101: 183-189.
- Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P and Phillips I, 2003. The European ban on growth promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chem* 159: 80-93.
- Cheeke PR, 1999. Actual and potential application of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition, In: Proceedings of the American Society of Animal Science, USA, pp.1-9.
- Church DC, Pond WG, 1988. Basic Animal Nutrition and Feeding, (3rd ed). John Wiley and Sons, New York, Pp. 472.
- El-Hassen SM, 1994. Yeast Culture and Multipurpose Fodder Trees as Feed Supplements for Ruminants. PhD Thesis. University of Aberdeen, Aberdeen, UK.
- France J and Siddons RC, 1993. Volatile fatty acid production. In: JM Forbes and J France (eds), Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, pp. 107-121, CAB International, Cambridge, UK.

- Francis G, Kerem Z, Makkar HPS and Becker K, 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Brit J Nut* 88: 587–605.
- Goel G, Makkar HPS and Becker K, 2008a. Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Anim Feed Sci Technol* 147: 72-89.
- Goel, G, Makkar HPS and Becker K, 2008b. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Appl Microbiol* 105: 770–777.
- Greathead H, 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society, Cambridge University Press* 62: 279-290.
- Hess HD, Kreuzer M, Diaz TE, Lascano CE, Carulla JE, Soliva CR and Machmüller A, 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Anim Feed Sci Technol* 109: 79–94.
- Iason G, 2005. The role of plant secondary metabolites in mammalian herbivore: Ecological perspectives. *Proceeding of the Nutrition Society, Cambridge University Press*, 64: 123–131.
- Kamra DN, Singh B, Chaudhary LC, Agarwal N and Pathak N, 2006. Soapnut as natural defaunating agent: its effect on rumen fermentation and in sacco degradability of jowar hay in buffaloes. *Buffalo J* 1: 99-204.
- Julkunen-Titto R, 1985. Phenolics constituents in the leaves of northern willows: Method for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem* 33: 213-217.
- Makkar HPS and Becker K, 1997: Degradation of Quillaja saponins by mixed culture of rumen microbes. *Lett Appl Microbiol* 25: 243–245.
- Mathison GW, Siawash R, Klita PT, Okine EK and Sedgwick G, 1999. Degradability of alfalfa saponins in the digestive tract of sheep and their rate of accumulation in rumen fluid. *Can J Anim Sci* 79: 315–319.
- Naseri V, Hozhabri F and Kafilzadeh F, 2013. Assessment of *in vitro* digestibility and fermentation parameters of alfalfa hay-based diet following direct incorporation of fenugreek seed (*Trigonella foenum*) and asparagus root (*Asparagus officinalis*). *J Anim Physiol Anim Nut* 97: 773–784.
- Nigwa A, Nsahlai IV and Iji P, 2002. Effect of supplementing veld hay with a dry meal or silage from pods of *Acacia sieberiana* with or without wheat bran on voluntary intake, digestibility, excretion of purine derivatives, nitrogen utilization and weight gain in South African merino sheep. *Livest Prod Sci* 77: 253-264.
- Patra AK, Kamra DN, Agarwal N and Chatterjee PN, 2008. Effect of *Terminalia chebula* and *Allium sativum* on rumen fermentation, enzyme activities and microbial counts in buffalo. *Indian J Anim Nut* 24: 251–255.
- Ørskov ER, 1982. *Protein Nutrition in Ruminants*. London and New York: Academic Press.
- SAS Institute Inc. 2006. *Base SAS® 9.1.3 Procedures Guide, Second Edition, Volumes 1, 2, 3, and 4*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Thalib A, Widiawatii Y, Hamid H, Suherman D and Sabrani M, 1996. The effects of saponin from *Sapindus rarak* on ruminal flora and fermentation characteristics in vitro. *J Ilmu Ternak dan Veteriner* 2: 17-20.
- Tilly JMA and Terry RA, 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J Brit Grassl Soc* 18: 104 -111.
- Van Soest PJ, Robertson JB and Lewis BA, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 74: 3583–3591.
- Wina E, Muetzel S and Becker K, 2005. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production, (a review). *J Agr Food Chem* 53: 8093–8105.

Effect of Yarrow flower (*Achillea millefolium*) and Eucalyptus leaf (*Eucalyptus globulus*) on *in vitro* digestibility of alfalfa hay

F Hozhabri^{1*}, A Shemshadi² and F Kafilzadeh¹

Received: February 27, 2015 Accepted: July 09, 2015

¹Associate Professor and Professor, respectively, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

²Former MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

*Corresponding Author: Email: hozhabri@razi.ac.ir

Abstract

BACKGROUND: Achillea flower and Eucalyptus including phenolic components which may affect rumen fermentation pattern. **OBJECTIVES:** This study carried out to evaluate effect of *Achillea millefolium* flower (AM) and *Eucalyptus globulus* leaf (EG) on alfalfa OM, CP and NDF digestibility (*in vitro*) at different incubation times (6, 12, 18, 24 and 48h). **METHODS:** Rumen liquor collected from two Sanjabi sheep fitted with permanent fistula and *in vitro* nutrients digestibility were measured using Tilly and Terry procedure. Treatments were alfalfa (control) and alfalfa plus different levels (5, 10, 15 and 20% of DM) of AM or EG. **RESULTS:** Total phenolic components of alfalfa, AM and EG were 5.9, 23.3 and 89.3 g/Kg DM, whereas total tannins were 0.4, 15.3 and 72.2 g/ Kg DM. Saponins were at the rate of 10.4, 67.5 and 174.1 g/ Kg DM, respectively. Incorporation of different levels of AM to the media containing alfalfa resulted in no significant alteration in OM, CP and NDF digestibility. Replacement of alfalfa by EG at initial stage of incubation (≤ 18 h) had no significant effect on digestibility but following prolongation of incubation it decreased ($P < 0.05$) nutrients digestibility. Crude protein digestibility start to decline due to partial replacement of alfalfa hay by EG and highest effect was observed at 20 percent. NDF digestibility of alfalfa also decreased ($P < 0.05$) by incorporation of EG to the media. **CONCLUSION:** It can be concluded that, both herbal plants were influenced nutrients digestibility of alfalfa in different manner. Although, EG decreased nutrients digestibility of alfalfa at different percentage level but AM did not influence its digestibility.

Keywords: Cell wall, Digestibility coefficients, Fermentation parameter, Phenolic compounds