نشریه علوم دامی ایران
دوره ۴۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲ (ص۳۸۴-۳۷۵)

تأثیر عصارهٔ تفالهٔ انگور بر پارامترهای تولید گاز و جمعیت تک‌یاخته‌های شکمبه با استفاده از شیرابهٔ شکمبه گوسفند

محمدجواد ابرقوئی[1] و یوسف روزبهان[2*]
۱، دانش‌آموختهٔ دکتری تغذیهٔ دام و ۲، عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۳۰ - تاریخ تصویب: ۹۲/۱۱/۱۳)

چکیده

این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیرات سطوح گوناگون عصارهٔ تفالهٔ انگور بر تولید گاز به‌روش آزمایشگاهی و برخی پارامترهای تخمیر شکمبه مانند سوبسترای تجزیه‌شده، اسیدهای چرب فرّار، و تولید پروتئین میکروبی با استفاده از شیرابهٔ شکمبه گوسفند انجام شد. برای تهیهٔ عصاره، تفالهٔ انگور خشک با نسبت وزنی مساوی با آب مقطر مخلوط گردید و در سطوح صفر، ۱۵، و ۳۰ میلی‌گرم ترکیبات فنولیک کل به‌ازای گرم مادهٔ خشک به جیرهٔ پایه اضافه شد. جیرهٔ پایه شامل علف یونجه خشک، کنجالهٔ سویا، و دانهٔ جو بود. تولید گاز در زمان‌های ۳، ۶،۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، و۱۲۰ ساعت بعد ازانکوباسیون ثبت گردید. بعد از ۲۴ ساعت، انکوباسیون متوقف و سوبسترای تجزیه‌شدهٔ واقعی تعیین شد. پارامترهای تخمیر شکمبه مانند Partitioning factor (PF_{24})، تولید گاز در ۲۴ ساعت، قابلیت هضم آزمایشگاهی مادهٔ آلی، انرژی متابولیسم‌پذیر، و تولید پروتئین میکروبی محاسبه گردید. استفاده از عصارهٔ تفالهٔ انگور بر مقادیر تولید گاز مجانب (A)، زمان تاخیر (L)، سوبسترای تجزیه‌شدهٔ واقعی، تولید گازدر ۲۴ ساعت، قابلیت هضم مادهٔ آلی، و انرژی متابولیسم‌پذیر تأثیری نداشت. ولی تولید پروتئین میکروبی (Q=۰/۰۰۵) و مقدار PF_{24} (L=۰/۰۲۳ و Q=۰/۰۰۴) افزایش یافت. استفاده از عصارهٔ تفالهٔ انگور بر مقادیر کل اسیدهای چرب فرّار و استات اثر معنی‌داری نداشت. مقدار پروپیونات با افزودن عصاره افزایش یافت (Q=۰/۰۴۸) و مقدار بوتیرات (L=۰/۰۰۴) و نسبت استات به پروپیونات (Q=۰/۰۰۱) در دو سطح عصاره در مقایسه با جیرهٔ شاهدکاهش یافت. مقدار آمونیاک (P<۰/۰۰۰۱) در دو سطح عصارهٔ اضافه‌شده در مقایسه با جیرهٔ شاهد کاهش یافت. مقادیر کل پروتوزوآ و زیرخانوادهٔ انتودینینه در زمان‌های ۳، ۱۲ ، و ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون در دو سطح عصاره در مقایسه با جیرهٔ شاهد کاهش یافت. دو جنس ایزوتریچا (L<۰/۰۰۰۱ و Q<۰/۰۰۰۱) و داسی‌تریچا (L=۰/۰۰۳ و Q=۰/۰۳۰) و زیرخانواده‌های دیپلودینینه (L=۰/۰۰۰۹ و Q=۰/۰۱۲) و افریوسکالسینه (L<۰/۰۰۰۱ و Q<۰/۰۰۰۱) نیز در ساعت ۲۴ بعد از افزودن عصاره کاهش نشان داد. در کل، استفاده از عصارهٔ تفالهٔ انگور بدون تأثیر منفی بر قابلیت هضم، تولید پروتئین میکروبی را افزایش و مقدار آمونیاک و پروتوزوآ را کاهش داد.

واژه های کلیدی: پارامترهای شکمبه، تولید گاز، عصارهٔ تفالهٔ انگور، گوسفند.

مقدمه

مواد افزودنی متعددی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، یونوفرها و مواد ازبین‌برندهٔ پروتوزوآ در جیرهٔ نشخوارکنندگان برای بهبود تخمیر شکمبه با هدف افزایش بازده تولیدات نشخوارکنندگان استفاده شده‌اند (Benchaar *et al.*, 2008b). از سال ۲۰۰۶ استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌دلیل ایجاد مقاومت در باکتری‌های بیماری‌زا ممنوع گردیده است. درعین‌حال، با رشد روزافزون تولید محصولات ارگانیک و سهم آمونیاک و متان تولیدی حیوانات در ایجاد گازهای گلخانه‌ای، میکروبیولوژیست‌ها و

* نویسنده مسئول: یوسف روزبهان تلفن: ۰۹۱۲۳۹۰۵۴۸۱ E-mail: rozbeh_y@modares.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

متخصصان تغذیه به دنبال روش‌ها و جایگزین‌های مناسب برای تغییر متابولیسم شکمبه به‌منظور بهبود بازده خوراک و تولیدات حیوانی بوده‌اند (Calsamiglia *et al*., 2007; Rochford *et al*., 2008). از این جایگزین‌ها می‌توان به ترکیبات فعال گیاهی اشاره کرد (Benchaar *et al*., 2008b; Vasta *et al*., 2011). ترکیبات فعال گیاهی، ترکیبات آلی مشتق‌شده از متابولیسم ثانویهٔ گیاه هستند که به نظر می‌رسد عملکرد مستقیمی در رشد و توسعهٔ گیاه ندارند. این ترکیبات گیاهی مسئول بو و رنگ گیاهان، عملکردهای اکولوژیکی مهمی به‌عنوان پیام‌آورهای شیمیایی بین گیاه و محیط اطراف دارند و معمولاً فعالیت ضدمیکروبی بر علیه تعداد زیادی از مخمرها، باکتری‌ها، و کپک‌ها دارند. طبقه‌بندی این متابولیت‌های ثانویه به‌دلیل اینکه عموماً مسیرهای سنتز متابولیکی و مکانیسم‌های عمل مشترکی دارند، مشکل است. آن‌ها به ۴ گروه پلی‌فنول‌ها و تانن‌ها، ساپونین‌ها، ارگانوسولفورها، و روغن‌های ضروری تقسیم می‌شوند (Calsamiglia *et al*., 2007). به‌تازگی تحقیقات زیادی برای اثبات نقش این متابولیت‌ها به‌منظور بهبود بازده نیتروژن و انرژی شکمبه و غربال‌گری گیاهان و محصولات حاوی این متابولیت‌ها انجام شده است (Patra *et al*., 2006; Benchaar *et al*., 2008b). میزان تأثیر آن‌ها به وضعیت سودمندی این متابولیت‌های ثانویه به منبع، ساختار شیمیایی، و مقدارشان بستگی دارد (Abarghuei *et al*., 2010). روش تولید گاز تکنیکی مناسب برای ارزیابی سریع و غربال‌گری این متابولیت‌هاست (Makkar, 2010). تفالهٔ انگور محصول فرعی کارخانجات آب‌میوه‌گیری است. این محصول فرعی در ایران در حدود ۵۰۰۰۰ تن در سال تولید می‌شود. این محصول فرعی حاوی متابولیت‌های ثانویهٔ فعالی مانند پلی‌فنول‌ها، ساپونین، تانن، و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است (Alipour & Rouzbehan, 2007; Abarghuei *et al*., 2010)، که تأثیرات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد تورم دارند و تقویت‌کنندهٔ سیستم ایمنی هستند (Adams *et al*., 2006). تاکنون بیشتر تحقیقات انجام‌شده از تفالهٔ انگور بوده است و در این مطالعات ارزش تغذیه‌ای کم این محصول فرعی به‌دلیل داشتن مقدار زیادی تانن و لیگنین مشخص شده است (Alipour & Rouzbehan, 2007; Abarghuei *et al*., 2010). درعین‌حال تحقیقات محدودی در زمینهٔ استفاده از عصارهٔ تفالهٔ انگور در تغذیه دام انجام شده است. معمولاً استخراج متابولیت‌های ثانویه با حلال‌هایی مانند استن، اتانول، و متانول انجام می‌شود (Makkar, 2003) که مقرون به صرفه نیست. بنابراین استفاده از روش‌هایی که هم از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد و هم بتوان از آن‌ها در سطح مزرعه استفاده کرد، لازم است. پژوهش حاضر برای ارزیابی تأثیرات عصارهٔ تفالهٔ انگور بر تولید گاز آزمایشگاهی و پارامترهای تخمیر شکمبهٔ گوسفند مانند تولید پروتئین میکروبی، آمونیاک، اسیدهای چرب شکمبه، و جمعیت پروتوزوآی شکمبه انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ تفالهٔ انگور و عصاره‌گیری

تفالهٔ انگور قرمز به‌صورت تازه از کارخانهٔ آذرکام شهرستان ارومیه تهیه شد و به آزمایشگاه انتقال یافت. و در دمای ۶۰ درجهٔ سلسیوس آون خشک گردید. برای عصاره‌گیری یک گرم تفالهٔ انگور با یک میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و درون ظرف دربسته در دمای آزمایشگاه برای ۷۲ ساعت قرار داده شد. سپس مخلوط تفالهٔ انگور و آب مقطر به‌مدت یک ساعت در دمای ۴۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد و با پارچهٔ تنظیف مخلوط صاف گردید. عصارهٔ حاصل در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس برای انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

تعیین متابولیت‌های ثانویهٔ عصاره

کل ترکیبات فنولیک با فولین‌سیوکالتو[1]، به‌روش Makkar (2000) برآورد گردیدند. مقدار ساپونین با بوتانول و به‌روش Makkar *et al*. (1998) تعیین گردید. مقدار بخش آبی (شامل لکتین، پلی‌پپتید، و نشاسته) نیز براساس روش Cowan (1999) اندازه‌گیری شد.

تخمیر آزمایشگاهی

از سه رأس گوسفند فیستولادار برای گرفتن شیرابهٔ شکمبه استفاده گردید. حیوانات با جیره‌ای حاوی علف یونجه خشک، کنجالهٔ سویا، دانهٔ جو، و مخلوط مواد معدنی ویتامینی دو بار در روز، ساعت ۸ و ۱۷، و

1. Folin Ciocalteau

Archive of SID

www.SID.ir

دسترسی آزاد به آب و بلوک‌های معدنی تغذیه شدند. عصارهٔ تفالهٔ انگور در سه سطح (صفر، ۱۵، و ۳۰ میلی‌گرم ترکیبات فنولیک کل به گرم مادهٔ خشک جیرهٔ پایه) اضافه شد.

برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. تأثیرات عصاره در سه آزمایش جداگانهٔ تولید گاز انجام شد. مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم جیرهٔ پایه درون سرنگ‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری وزن گردید (Makkar, 2010). جیرهٔ پایه شامل مخلوط علف یونجهٔ خشک (۶۳۸ گرم به کیلوگرم مادهٔ خشک)، کنجالهٔ سویا (۱۳۹/۱ گرم به کیلوگرم مادهٔ خشک)، و دانهٔ جو (۱۸۳/۹ گرم به کیلوگرم مادهٔ خشک) بود. سرنگ‌ها قبل از اضافه‌کردن ۴۰ میلی‌لیتر مخلوط بافر در دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. شیرابهٔ شکمبه هر گوسفند قبل از خوراک‌دادن صبح جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. شیرابه با استفاده از ۴ لایه پارچهٔ مخصوص پنیرسازی و تحت گاز CO_2 و دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس صاف گردید. قرائت حجم گاز تولیدی در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶، و ۱۲۰ ساعت بعد از انکوباسیون صورت‌پذیرفت. در پایان ساعت ۲۴ سرنگ‌ها باز شدند و pH با دستگاه pH متر (GLP 22, Crison Instruments, Barcelona, Spain) اندازه‌گیری شد و تخمیر به‌وسیلهٔ چرخاندن سرنگ‌ها روی یخ متوقف گردید. محتوای سرنگ‌ها در دور ۲۰۰۰g برای ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس سانتریفیوژ گردید و از محلول بالایی برای تعیین آمونیاک و اسیدهای چرب فرّار استفاده شد.

باقی‌ماندهٔ تخمیر با آون و در دمای ۶۰ درجهٔ سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. اتلاف وزن سوبسترا بعد از آون به‌عنوان مادهٔ خشک تجزیه‌شده در نظر گرفته شد. مقدار سوبسترای تجزیه‌شده به‌صورت میلی‌گرم به گرم مادهٔ خشک تعیین شد (Makkar, 2010).

محاسبات

برای تخمین تولید گاز از معادلهٔ غیر خطی فرانس و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد.

(رابطهٔ ۱)

$$A=b\times(1-e^{-c(t-L)})$$

A: حجم گاز تولیدی در زمان t، b: تولید گاز مجانب (میلی‌لیتر به گرم مادهٔ خشک)، c: سرعت تولید گاز (به‌ازای ساعت) از بخش خوراکی آهسته تخمیر، و b و L زمان تأخیر تولید گاز هستند. قابلیت هضم مادهٔ آلی (IVOMD) و انرژی متابولیسم‌پذیر (ME) با استفاده از حجم گاز حاصل از تخمیر ۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک در طول ۲۴ ساعت و روابط ۲ و ۳ محاسبه شد (Menke, 1979).

(رابطهٔ ۲)

$$IVOMD(MJ/kg\ DM)=۲/۲۰+۰/۱۳۶GP+۰/۰۵۷XP$$

(رابطهٔ ۳)

$$ME=۱۴/۸۸+۸/۸۹GP+۴/۵XP+۰/۶۵۱XA$$

GP: حجم گاز تولیدی تصحیح‌شده برای ۲۴ ساعت (ml/200mg of DM)

XP: پروتئین خام (g/100g DM)، XA: خاکستر خام (g/100g DM)

محصول گاز (GY_{24}) از رابطهٔ ۴ محاسبه گردید (Makkar, 2010):

(رابطهٔ ۴)

GY_{24} = میلی‌لیتر گاز به‌ازای مادهٔ خشک/گرم سوبسترای هضم‌شده

تولید پروتئین میکروبی با رابطهٔ ۵ (Makkar, 2010) محاسبه شد:

(رابطهٔ ۵)

MP (mg/g DM)= میلی‌گرم سوبسترای هضم‌شده/میلی‌لیتر گاز×۲/۲)

نسبت مادهٔ آلی هضم‌شده (میلی‌گرم) به میلی‌لیتر گاز تولیدشده بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون برای تخمین PF_{24} در نظر گرفته شد (Makkar, 2010). اسیدهای چرب فرّار با دستگاه گاز کروماتوگرافی تعیین گردید (Cottyn and Boucque, 1968).

در پایان ساعت ۲۴ انکوباسیون، محتوای هر سرنگ سانتریفیوژ شد و ۱ میلی‌لیتر از محلول بالایی سانتریفیوژشده درون میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شد و ۰/۲۰ میلی‌لیتر اسید متافسفریک ۲۵

Archive of SID

www.SID.ir

درصد به آن اضافه شد. محلول ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد و در دور ۵۰۰۰g برای ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس سانتریفیوژ گردید. محلول بالایی در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس برای تزریق به دستگاه کاز کروماتوگرافی ذخیره گردید. مقدار آمونیاک به‌روش فنول هیپوکلریت تعیین گردید (Broderick & Kang, 1980).

شمارش جمعیت پروتوزوآ

جمعیت پروتوزوآ طبق روش Dehority (2003) تعیین گردید. دو میلی‌لیتر از محتوای هر سرنگ در زمان‌های ۳، ۶، ۱۲، و ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون برداشته و درون لوله آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیتر فرمال‌سالین ریخته شد. سپس دو قطره محلول رنگ‌آمیزی سبز روشن به لوله اضافه گردید و محتویات لوله‌ها مخلوط و به مدت یک شبانه روز در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس به‌وسیلهٔ میکروسکوپ و لام هماسیتومتر تعداد پروتوزوآ تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماری

به‌وسیلهٔ سه آزمون تولید گاز مجزا و چهار تکرار برای هر نمونه انکوباسیون انجام شد. داده‌های تخمیر شکمبه برای هر سه آزمون میانگین‌گیری شد. با نرم‌افزار SAS (2002) براساس رابطهٔ ۶ تجزیهٔ واریانس داده‌ها صورت گرفت و میانگین‌های به‌دست‌آمده با آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسهٔ آماری شد.

$$Y_{ij}=\mu+x_i+x_j+\varepsilon_{ij} \quad \text{(رابطهٔ ۶)}$$

Y_{ij}: میانگین کل؛ μ: میانگین نمونه؛ x_i: اثر جیره؛ x_j: اثر تکرار؛ ε_{ij}: خطای آزمایشی

نتایج و بحث

مقادیر متابولیت‌های ثانویهٔ عصارهٔ تفالهٔ انگور و مقادیر اجزاء جیرهٔ پایه در جدول۱ و مقادیر ترکیب شیمیایی جیرهٔ پایه در جدول ۲ آورده شده‌است.

جدول ۱. مقادیر متابولیت‌های ثانویهٔ عصارهٔ تفالهٔ انگور و جیرهٔ پایه (برحسب گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک)

متابولیت‌های ثانویه	میلی‌گرم به گرم عصاره
ترکیبات فنولیک کل	۲۸/۸
ساپونین	۲۷/۲
بخش آبی	۱۳۳/۶
جیره (گرم به کیلوگرم مادهٔ خشک)	
علوفهٔ یونجه	۶۳۸
کنجالهٔ سویا	۱۳۹/۱
دانهٔ جو	۱۸۳/۹
مخلوط معدنی ویتامینی[1]	۳۹

۱: شامل ۱۸۵ گرم کلسیم به کیلوگرم، ۱۰۴ گرم منیزیم به کیلوگرم، ۲/۲۵ گرم کبالت به کیلوگرم، ۴۴ گرم منگنز به کیلوگرم، ۳۶/۴ گرم روی به کیلوگرم، ۱/۳ گرم ید به کیلوگرم، ۱۰۰۰۰۰۰ واحد iu رتینول، ۲۰۰۰۰۰۰ واحد iu ویتامین D3، و ۴۰۰۰۰ iu بتاتوکوفرول.

جدول ۲. ترکیب شیمیایی جیرهٔ پایه

ترکیب شیمیایی (برحسب گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک)	جیره		
	صفر	۱۵	۳۰
ماده خشک	۹۰۲/۷	۹۰۲/۷	۹۰۲/۷
مادهٔ آلی	۹۲۶/۳	۹۲۶/۳	۹۲۶/۳
پروتئین خام	۱۶۶/۲	۱۶۶/۲	۱۶۶/۲
انرژی متابولیسم‌پذیر	۹/۶	۹/۶	۹/۶
چربی خام	۲۲/۴	۲۲/۴	۲۲/۴
دیوارهٔ سلولی	۳۳۰/۳	۳۳۰/۳	۳۳۰/۳
دیوارهٔ سلولی نامحلول در شویندهٔ اسیدی	۲۴۰/۵	۲۴۰/۵	۲۴۰/۵
لیگنین	۵۴/۰	۵۴/۰	۵۴/۰
ترکیبات فنولیک کل تفالهٔ انگور	۰	۷/۵	۱۵/۰
ساپونین تفالهٔ انگور	۰	۷/۰	۱۴/۰
بخش آبی تفالهٔ انگور	۰	۳۴/۷	۶۹/۴

جیرهٔ صفر: جیرهٔ شاهد، جیرهٔ ۱۵: جیرهٔ شاهد به‌علاوه ۱۵ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل، جیرهٔ ۳۰: جیرهٔ شاهد به‌علاوه ۳۰ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل.

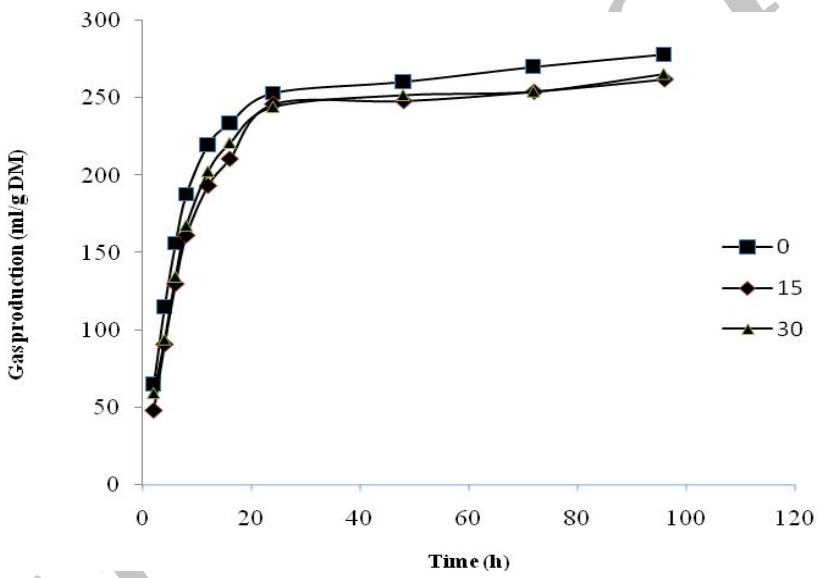
تخمیر آزمایشگاهی

نمودار تولید گاز برای عصارهٔ استفاده‌شده در آزمون تولید گاز در مدت ۱۲۰ ساعت در شکل ۱ آورده شده است. مقادیر پارامترهای تخمیر در جدول ۳ نشان داده شده است. اطلاعات محدودی در زمینهٔ تأثیر عصارهٔ تفالهٔ انگور بر تولید گاز و تخمیر شکمبه وجود دارد. افزودن عصارهٔ تفالهٔ انگور تأثیری بر تولید گاز نداشت. مقدار A و سرعت تخمیر و زمان تأخیر تحت تأثیر

Archive of SID

www.SID.ir

عصاره قرار نگرفت ولی سرعت تخمیر تمایل به کاهش و زمان تأخیر با افزودن عصاره تمایل به افزایش داشت. تغییرنکردن تولید گاز می‌تواند به‌دلیل مقدار و نوع عصاره مصرفی باشد (Busquet *et al.*, 2005). برخلاف نتایج تحقیق حاضر Getachew *et al.* (2008) افزایش تولید گاز و مقدار A را با مقادیر ۵۰، ۱۰۰، و ۱۵۰ گرم اسید گالیک در کیلوگرم مادهٔ خشک جیره نشان دادند. ولی این محققان شرح دادند که با افزودن سه سطح ۵۰، ۱۰۰، و ۱۵۰ گرم تانن کوبراچو و اسیدتانیک در کیلوگرم مادهٔ خشک جیره، مقدار A کاهش یافت. همچنین در پژوهشی دیگر تانن باعث کاهش مقدار تولید گاز گردید (Hervas *et al.*, 2000). Jiménez-Peralta *et al.* (2011) نشان دادند که افزودن عصارهٔ دو گیاه L.leucocephala و S.babylonica به جیرهٔ شاهد، تولید گاز را در مقایسه با جیرهٔ شاهد زیاد کرد، ولی تفاوتی در مقادیر A، سرعت تخمیر، و زمان تأخیر مشاهده نشد. تفاوت در تأثیرات متابولیت‌های ثانویه بر تولید گاز و پارامترهای گاز می‌تواند به‌دلیل سوبسترای استفاده‌شده، مقدار عصاره، ساختار عصاره، و متابولیت‌های ثانویه باشد (Getachew *et al.*, 2008; Jiménez-Peralta *et al.*, 2011).



شکل ۱. نمودار حجم تولید گاز (میلی‌لیتر گاز به گرم مادهٔ آلی) تخمیر آزمایشگاهی در طول زمان

مقادیر تولید گاز در ۲۴ ساعت، قابلیت هضم مادهٔ آلی، عملکرد تولید گاز در زمان ۲۴، سوبسترای هضم‌شده، و انرژی متابولیسم‌پذیر در دو سطح عصارهٔ افزوده‌شده در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. افزودن عصارهٔ مقادیر PF_{24} (L=۰/۰۲۳ و Q=۰/۰۰۴) و تولید پروتئین میکروبی (Q=۰/۰۰۵) را در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داد. مشابه نتایج ما Jiménez-Peralta et al. (2011) از مقادیر ۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸ میلی‌لیتر عصارهٔ دو گیاه L.leucocephala و S. babylonica استفاده کردند و نشان دادندکه تولید پروتئین میکروبی و PF_{24} در مقایسه با شاهد افزایش یافت. این افزایش احتمالاً به‌دلیل همزمان‌سازی آزادشدن انرژی و پروتئین در شکمبه در اثر وجود برخی ترکیبات شیمیایی عصاره است (Jiménez-Peralta *et al.*, 2011). برخی از ترکیبات فنولیک با تولید اسیدهای آمینهٔ آروماتیک واکنش می‌دهند. گزارش شده است که فنیل‌پروپانئیک اسید و فنیل‌لاکتیک اسید تجزیهٔ سلولز را زیاد می‌کنند و رشد گونه‌های باکتریایی رومینوکوکوس آلبوس را افزایش می‌دهند (Stack & Cotta, 1986). در تحقیقی دیگر نیز بیان شد که استفاده از مقادیر ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم به‌ازای میلی‌لیتر از عصارهٔ گیاه *M. oleifera* بر قابلیت هضم مادهٔ آلی

www.SID.ir

تأثیری نداشت ولی مقدار PF_{24} را افزایش داد (Alexander et al., 2008).

جدول ۳. اثر عصارهٔ تفالهٔ انگور بر پارامترهای تولید گاز آزمایشگاهی

پارامتر	جیره			SEM	P value	
	صفر	۱۵	۳۰		L	Q
A	۲۷۳/۶۰	۲۶۱/۷۰	۲۶۴/۶۷	۴/۲۶۲	۰/۱۸۹	۰/۲۰۴
c	۰/۱۳۴	۰/۱۱۴	۰/۱۱۹	۰/۰۰۴	۰/۰۸۷	۰/۰۷۱
L	۰/۰۰	۰/۱۳۱	۰/۱۶۳	۰/۰۵۲	۰/۰۶۹	۰/۴۷۱
تولید گاز در زمان ۲۴	۲۵۳/۰۰	۲۴۶/۰۰	۲۴۴/۳۳	۳/۸۶۳	۰/۱۶۴	۰/۵۹۳
PF_{24}	۲/۶۴	۳/۰۸	۲/۸۹	۰/۰۵۸	۰/۰۲۳	۰/۰۰۴
قابلیت هضم مادهٔ آلی	۶۷/۲۵	۶۶/۰۰	۶۵/۷۱	۰/۶۸۷	۰/۱۶۴	۰/۵۹۳
تولید پروتئین میکروبی	۱۱۰/۷۹	۱۳۸/۲۰	۱۱۷/۹۶	۴/۴۳۴	۰/۲۹۶	۰/۰۰۵
عملکرد تولید گاز در زمان ۲۴	۳۱۵/۲۲	۳۰۱/۶۶	۳۰۶/۲۶	۴/۱۵۴	۰/۱۷۸	۰/۱۲۵
سوبسترای هضم‌شده	۸۰۲/۶۰	۸۱۵/۵۰	۷۹۷/۹۲	۸/۴۱۴	۰/۷۰۸	۰/۱۹۰
انرژی متابولیسم‌پذیر	۹/۹۳	۹/۷۵	۹/۵۱	۰/۱۸۹	۰/۱۶۲	۰/۹۲۶

جیرهٔ صفر: جیرهٔ شاهد، جیرهٔ ۱۵: جیرهٔ شاهد به‌علاوهٔ ۱۵ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل، جیرهٔ ۳۰: جیرهٔ شاهد به‌علاوهٔ ۳۰ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل، A: تولیدگازمجانب (میلی‌لیتر)، C: سرعت تخمیر (/ ساعت)، L: زمان تأخیر (ساعت)، PF_{24}: partitioning factor، L: خطی، Q: درجهٔ دو.

پارامترهای شکمبه

مقادیر پارامترهای شکمبه در جدول ۴ نشان داده شده‌است. افزودن عصارهٔ تفالهٔ انگور تأثیری بر مقادیر کل اسیدهای چرب فرّار، استات، و ایزووالرات نداشت که احتمالاً به این دلیل است که در قابلیت هضم تفاوتی ندارد، ولی باعث افزایش مقدار پروپیونات در جیرهٔ ۱۵در مقایسه با شاهد شد (Q=۰/۰۴۸). مقدار بوتیرات به‌طور خطی با افزودن عصاره کاهش یافت (L=۰/۰۰۴). این کاهش احتمالاً به‌دلیل کاهش در تعداد پروتوزوآ است (Babayemi *et al*., 2004). افزودن عصاره باعث کاهش نسبت استات به پروپیونات در بین تیمارهای آزمایشی گردید (Q=۰/۰۰۱). اسیدهای چرب فرّار محصولات نهایی تخمیر میکروبی شکمبه‌اند و نشان‌دهندهٔ عرضهٔ انرژی متابولیسم‌پذیر برای حیوان هستند (Van Soest, 1982) و کاهش این اسیدها برای حیوان مضر است. مقدار کل اسیدهای چرب فرّار در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت و عصارهٔ تفالهٔ انگور قابلیت تخمیر و دسترسی انرژی را تغییر نداده است. مشابه با پژوهش حاضر در مطالعات دیگر نیز تأثیری بر مقدار کل اسیدهای چرب فرّار با افزودن عصارهٔ حاوی متابولیت‌های ثانویه مشاهده نشد (Busquet *et al*., 2005 Getachew *et al*., 2008; Cardozo *et al*., 2004;). برخلاف نتایج تحقیق حاضر Jiménez-Peralta *et al*. (2011) افزایش مقدار کل اسیدهای چرب فرّار را با افزودن مقادیر ۰/۶، ۱/۲، و ۱/۸ میلی‌لیتر عصارهٔ دو گیاه *L. leucocephala* و *S. babylonica* به جیرهٔ پایه گزارش کردند و Oh et al. (1968) کاهش در تولید کل اسیدهای چرب فرّار را ارائه کردند. افزودن عصاره مقدار پروپیونات را افزایش و نسبت استات به پروپیونات را کاهش داد. افزایش در مقدار پروپیونات می‌تواند به‌دلیل تأثیرات ترکیباتی مانند فنول‌ها و ساپونین بر کاهش در تعداد پروتوزوآ (جدول ۵) باشد که با نتایج تحقیق‌های دیگر نیز مطابقت دارد (Patra *et al*., 2006; Busquet *et al*., 2006; Lila *et al*., 2003). با وجود اینکه تولید متان را اندازه‌گیری نکردیم ولی به‌هرحال این تغییرات احتمالاً می‌تواند سبب کاهش تولید متان گردد. این تغییرات مشابه با نتایج گزارش‌شدهٔ Busquet et al.(2005) بود. تولید متان در شکمبه در اثر فعالیت متانوژن‌ها و پروتوزوآ است. کاهش متان می‌تواند درنتیجهٔ تأثیرات مستقیم متابولیت‌های ثانویه بر فعالیت متانوژن یا تأثیرات غیرمستقیم بر هضم فیبر باشد (Newbold & Rode, 2006). در این پژوهش چون قابلیت هضم مادهٔ آلی تحت تأثیر عصاره قرار نگرفت، افزایش پروپیونات و کاهش نسبت استات به پروپیونات می‌تواند نشان‌دهندهٔ تأثیر مستقیم مواد مؤثر موجود در عصارهٔ تفالهٔ انگور بر میکروارگانیسم‌های تولیدکنندهٔ متان و احتمالاً کاهش تولید متان باشد (Calsamiglia *et al*., 2007; Vasta *et al*., 2011). مقدار آمونیاک با افزودن عصاره به‌صورت خطی کاهش یافت (L<۰/۰۰۰۱). کاهش مقدار آمونیاک با افزودن عصارهٔ تفالهٔ انگور می‌تواند به‌دلیل اثر مهارکنندگی مواد مؤثر موجود در عصاره بر فعالیت پروتئولیتیکی در شکمبه باشد (Frutos *et al*., 2004;

Archive of SID

www.SID.ir

Mueller-Harvey, 2006). به‌علاوه معمولاً زمانی که جمعیت پروتوزوآ در شکمبه مهار می‌شود و پس‌ازآن کاهش تجزیهٔ باکتریایی اتفاق می‌افتد، مقدار آمونیاک در شکمبه نیز کاهش می‌یابد (Williams & Coleman, 1991). کاهش در مقدار آمونیاک همراه با افزایش مقدار تولید پروتئین میکروبی، جریان اسیدهای آمینه را به روده افزایش می‌دهد و به بهبود بازده نیتروژن در حیوان کمک می‌کند (Wallace & Cotta, 1988; Makkar, 2003). Tiemann *et al.* (2010) نیز مشاهده کردند که استفاده از مقدار ۶۰۰ میلی‌گرم به گرم پروتئین خام جیره از عصارهٔ تانن متراکم گیاه *Calliandra calothyrsus* مقدار آمونیاک را کاهش داد، که با نتایج این مطالعه هم‌سو است. همچنین Cortes *et al.* (2009) و Abarghuei et al. (2010) نیز کاهش در مقدار آمونیاک را نیز ذکر کردند. برخلاف نتایج تحقیق حاضر، Busquet *et al.*(2005) تفاوتی در مقدار آمونیاک تولیدشده با افزودن عصارهٔ گیاه *Syzygium aromaticum* (حاوی ۸۵۰ گرم به کیلوگرم یوگنول) مشاهده نکردند.

جدول ۴. اثر عصارهٔ تفالهٔ انگور بر مقدار اسیدهای چرب فرّار (میلی‌مول به گرم مادهٔ آلی هضم‌شده) و آمونیاک (میلی‌گرم به دسی‌لیتر) شیرابهٔ شکمبه

پارامتر	جیره			SEM	P value	
	صفر	۱۵	۳۰		L	Q
کل اسیدهای چرب فرّار	۱۰/۵۱	۱۰/۹۳	۱۰/۱۰	۰/۲۹۱	۰/۳۵۶	۰/۱۳۵
استات	۴/۷۷	۴/۶۲	۴/۶۵	۰/۱۱۴	۰/۱۰۴	۰/۹۸۸
پروپیونات	۲/۱۱	۲/۷۵	۲/۳۶	۰/۱۷۱	۰/۳۴۶	۰/۰۴۸
بوتیرات	۲/۰۹	۱/۹۶	۱/۹۰	۰/۰۳۰	۰/۰۰۴	۰/۴۱۱
ایزووالرات	۰/۹۸	۱/۰۰	۰/۸۷	۰/۰۵۶	۰/۲۰۳	۰/۳۱۴
والرات	۰/۵۵	۰/۵۸	۰/۵۰	۰/۰۱۴	۰/۰۵۳	۰/۰۲۱
استات به پروپیونات	۲/۰۱	۱/۶۸	۱/۸۹	۰/۰۴۰	۰/۰۷۸	۰/۰۰۱
آمونیاک	۴۳/۵۴	۳۴/۰۸	۲۹/۷۶	۱/۵۲۴	<۰/۰۰۰۱	۰/۱۸۲

جیرهٔ صفر: جیرهٔ شاهد، جیرهٔ ۱۵: جیره شاهد به‌علاوهٔ ۱۵ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل، جیرهٔ ۳۰: جیرهٔ شاهد به‌علاوهٔ ۳۰ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل، L: خطی، Q: درجهٔ دو.

جدول ۵. اثر عصارهٔ تفالهٔ انگور بر مقدار جمعیت پروتوزوآی شکمبه (log_{10}/g digesta)

زمان	جیره	پروتوزوآ					
		کل	ایزوتریچا	داسی‌تریچا	انتودینیمه	دیپلودینیمه	افریوسکالسینه
۳	صفر	۵/۸۵	۰/۰۰	۲/۲۲	۵/۷۹	۱/۶۲	۰/۵۵
	۱۵	۴/۹۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۴/۹۶	۰/۵۰	۰/۰۰
	۳۰	۴/۹۱	۰/۵۰	۲/۵۴	۴/۸۰	۲/۴۸	۰/۰۰
SEM		۰/۰۳۸	۰/۲۸۶	۰/۴۴۳	۰/۰۴۹	۱/۰۲۰	۰/۳۲۱
P value							
خطی		<۰/۰۰۰۱	۰/۲۶۷	۰/۶۲۹	<۰/۰۰۰۱	۰/۵۷۲	۰/۲۶۷
درجهٔ دو		۰/۰۰۰۱	۰/۵۰۶	۰/۰۰۵	۰/۰۰۱	۰/۲۹۵	۰/۵۰۶
۶	صفر	۵/۳۸	۰/۵۲	۱/۰۴	۵/۴۰	۰/۰۰	۱/۱۱
	۱۵	۵/۴۴	۰/۰۰	۱/۴۸	۵/۳۷	۳/۰۴	۰/۹۹
	۳۰	۵/۲۵	۰/۰۰	۱/۵۳	۵/۱۵	۲/۵۳	۰/۰۰
SEM		۰/۰۷۹	۰/۳۰۱	۰/۶۰۳	۰/۰۷۴	۰/۳۰۲	۰/۴۳۰
P value							
خطی		۰/۲۸۲	۰/۲۶۶	۰/۵۸۵	۰/۰۵۴	۰/۰۰۱	۰/۱۱۷
درجهٔ دو		۰/۲۲۸	۰/۵۰۶	۰/۷۹۸	۰/۳۲۹	۰/۰۰۳	۰/۴۳۹
۱۲	صفر	۵/۴۸	۰/۰۰	۱/۵۷	۵/۴۵	۰/۵۵	۰/۵۲
	۱۵	۵/۰۵	۰/۰۰	۰/۵۰	۵/۰۲	۱/۴۸	۰/۰۰
	۳۰	۵/۸۶	۰/۰۰	۰/۹۹	۴/۷۹	۰/۰۰	۰/۰۰
SEM		۰/۰۷۴	۰/۰۰	۰/۴۰۵	۰/۰۷۱	۰/۵۹۱	۰/۳۰۱
P value							
خطی		۰/۰۰۱	۰/۰۰	۰/۳۵۵	۰/۰۰۶	۰/۵۳۱	۰/۲۶۷
درجهٔ دو		۰/۲۵۴	۰/۰۰	۰/۱۶۵	۰/۲۹۵	۰/۱۴۵	۰/۵۰۶
۲۴	صفر	۵/۶۰	۳/۱۳	۲/۰۹	۵/۶۰	۲/۶۱	۱/۵۷
	۱۵	۴/۸۶	۰/۰۰	۰/۰۰	۴/۸۲	۰/۰۰	۰/۰۰
	۳۰	۴/۶۹	۰/۰۰	۰/۰۰	۴/۶۹	۰/۰۰	۰/۰۰
SEM		۰/۰۷۹	۰/۰۰	۰/۳۰۱	۰/۰۸۳	۰/۳۰۱	۰/۰۰
P value							
خطی		۰/۰۰۰۲	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۹	<۰/۰۰۰۱
درجهٔ دو		۰/۰۲۵	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۳۰	۰/۰۱۹	۰/۰۱۲	<۰/۰۰۰۱

جیرهٔ صفر: جیرهٔ شاهد، جیرهٔ ۱۵: جیرهٔ شاهد به‌علاوهٔ ۱۵ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل، جیرهٔ ۳۰: جیرهٔ شاهد به‌علاوهٔ ۳۰ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل،L: خطی، Q: درجهٔ دو.

Archive of SID

www.SID.ir

جمعیت پروتوزوآ

با افزودن عصارهٔ مقادیر کل پروتوزوآ و زیرخانوادهٔ انتودینینه در زمان‌های ۳، ۱۲، و ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون در مقایسه با جیرهٔ شاهد کاهش یافت. با افزودن عصارهٔ دو جنس ایزوتریچا (L<۰/۰۰۰۱ و Q<۰/۰۰۰۱) و داسی‌تریچا (L=۰/۰۰۳ و Q=۰/۰۳۰) و زیرخانواده‌های دیپلودینینه (L=۰/۰۰۰۹ و Q=۰/۰۱۲) و افریوسکالسینه (L<۰/۰۰۰۱ و Q<۰/۰۰۰۱) نیز در زمان ۲۴ انکوباسیون کاهش یافتند (جدول ۵). اطلاعات محدودی در زمینهٔ اثر عصارهٔ تفالهٔ انگور و ترکیبات فعال موجود در آن بر جمعیت پروتوزوآ وجود دارد.کاهش پروتوزوآ در اثر متابولیت‌های ثانویه احتمالاً به‌دلیل ساختار فنولیکی این متابولیت‌ها است. این ساختار به پاره‌شدن غشاء سلول، غیرفعال‌شدن آنزیم‌ها، و کاهش سوبسترا و یون‌های فلزی لازم برای متابولیسم سلولی می‌انجامد (Calsamiglia *et al*., 2007; Goel *et al*., 2005). مشابه با نتایج پژوهش حاضر Abarghuei *et al*. (2005) و Calsamiglia *et al*. (2007) نیز کاهش در تعداد پروتوزوآ را به‌دلیل استفاده از تانن‌ها و متابولیت‌های ثانویه ذکر کردند. Cardozo et al. (2006) مشاهده کردند که مخلوطی از سینمالدهید (۱۸۰ میلی‌گرم در روز) و یوگنول (۹۰ میلی‌گرم در روز) در جیرهٔ گوساله‌های گوشتی تعداد کل پروتوزوآی هولوتریچا را افزایش داد و اثری بر انتودینومورف‌ها نداشت، ولی زمانی‌که مخلوط حاوی مقدار بیشتری از سینمالدهید (۶۰۰ میلی‌گرم در روز) و یوگنول (۳۰۰ میلی‌گرم در روز) بود، بر این پروتوزوآ تأثیری نداشت. در تحقیقی دیگر Benchaar *et al*. (2008a) نشان دادند که استفاده از مقدار از ۱ گرم در روز به‌ازای هر گاو (۴۳ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم مادهٔ خشک مصرفی) سینمالدهید و ۱۵۰ گرم در روز به‌ازای هر گاو تانن متراکم در تغذیهٔ گاوهای شیری هیچ تأثیری بر تعداد کل پروتوزوآ، جنس داسی‌ترچا، دیپلودینیوم، انتودینیوم، و پلی‌پلاسترون نداشت. درکل، نتیجهٔ قانع‌کننده‌ای از مطالعات در زمینهٔ اثر متابولیت‌های ثانویه بر جمعیت پروتوزوآ در شکمبه به‌دست نمی‌آید (Chiquette *et al*., 1989; Sliwiniski *et al*., 2002)، که احتمالاً به‌دلیل تنوع در شکل جیره، مقدار متابولیت‌ها، گونه، ساختار شیمیایی متابولیت‌ها، تفاوت‌های حیوانی، و روش‌های نمونه‌گیریست (Yanez Ruiz *et al*., 2004).

نتیجه‌گیری کلی

عصارهٔ تفالهٔ انگور بدون تأثیر منفی بر قابلیت هضم، تولید پروتئین میکروبی را افزایش و مقدار آمونیاک و پروتوزوآ را کاهش داد. کاهش در مقدار آمونیاک همراه با افزایش مقدار تولید پروتئین میکروبی، ممکن است جریان اسیدهای آمینه را به روده افزایش دهد و به بهبود بازده نیتروژن در حیوان کمک کند. افزایش در مقدار پروپیونات و کاهش در نسبت استات به پروپیونات احتمالاً می‌تواند در کاهش تولید متان و بهبود بازده انرژی در حیوان و همچنین در کاهش ورود متان به محیط زیست نقش داشته باشد. انجام مطالعات روی دام برای تأثیر این عصاره بر بازده کاربرد انرژی و پروتئین در نشخوارکنندگان لازم است.

REFERENCES

1. Abarghuei M. J., Rouzbehan, Y. & Alipour, D. (2010). The influence of the grape pomace on the ruminal parameters of sheep. *Livestock Science*, 132, 73–79.
2. Adams, L. S., Seeram, N. P., Aggarwal, B. B., Takada, Y., Sand, D. & Heber, D. (2006). Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 980–985.
3. Alexander, G., Singh, B., Sahoo, A. & Bhat, T. K. (2008). In vitro screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 229–244
4. Alipour, D. & Rouzbehan, Y. (2007). Effects of ensiling grape pomace and addition of polyethylene glycol on in vitro gas production and microbial biomass yield. Animal Feed Science and Technology, 137, 138-149.
5. Babayemi, O. J., Demeyer D. & Fievez, V. (2004). *In vitro* fermentation of tropical browse seeds in relation to their content of secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 13, 31-34.

Archive of SID

www.SID.ir

6. Beauchemin, K.A., McGinn, S. M., Martinez, T. F. & McAllister, T. A., (2007). Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *Journal of Animal Scienc*, 85, 1990–1996.
7. Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A. & Beauchemin, K. A. (2008b). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 209–228.
8. Benchaar, C., Mcallister, T. A. & Chouinard, P. Y. (2008a). Digestion, ruminal Fermentation, Ciliate protozoal populations, and milk production from Dairy Cows Fed *Cinnamaldehyde*, Quebracho Condensed tannin, or *Yucca schidigera* Saponin extracts *Journal of Dairy Scienc*, 91, 4765–4777.
9. Broderick, G. & Kang,J.H., (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Scienc*, 63, 64.
10. Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. (2005). Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 597-613.
11. Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L. & Ferret, A. (2007). Invited review: essential oils asmodifiers of rumenmicrobial fermentation. *Journal of Dairy Scienc*, 90, 2580–2595.
12. Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. (2006). Effects of alfalfa extract, *anise*, *capsicum*, and amixture of *cinnamaldehyde* and *eugenol* on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers feda high-concentrate diet. *Journal of Animal Science*, 84, 2801–2808.
13. Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. (2004). Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*, 82, 3230–3236.
14. Chiquette, J., Cheng, K. J., Rode, L. M. & Milligan, L. P. (1989). Effect of tannin content in two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) on feed digestibility and rumen fluid composition in sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 69, 1031-1039.
15. Cottyn, B. G. & Boucque, C. V. (1968). Rapid method for the gaacids in rumen fluid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16, 105–107.
16. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev, 12, 564–582.
17. Dehority, B. A. (2003). Rumen Microbiology. British Library Cataloguing in Publication Data. First published.
18. France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S., Lopez, S. & Bannink, M. (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profile observed in vitro: derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition*, 83, 143–150.
19. Frutos, P., Hervas, G., Giraldez, F. J. & Mantecń, A. R. (2004). An *in vitro* study on the ability of polyethylene glycol to inhibit the effect of quebracho tannins and tannic acid on rumen fermentation in sheep, goats, cows and deer. *Australian Journal of Agriculture Research*, 55, 1125–1132.
20. Getachew, G., Pittroff, W., Putnama, D. H., Dandekar, A., Goyal, S. & DePeters, E. J. (2008). The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on *in vitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Animal Feed Science and Technology*,140, 444–461.
21. Goel, G., Puniya, A. K., Aguliar, C. N. & Singh, K. (2005). Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften*, 92, 497–503.
22. Hervas, G., Frutos, P., Serrano, E., Mantecon, A. R. & Giraldez, F. J. (2000). Effect of tannic acid on rumen degradation and intestinal digestion of treated soybean meals in sheep. *Journal Agriculture of Science*, 135, 305–310.
23. Jiménez-Peralta, F. S., Salem, A. Z. M., Mejia-Hernández, P., González-Ronquillo, M., lbarrán-Portillo, B., Rojo-Rubio, R. & Tinoco-Jaramillo**.,** J. L. (2011). Influence of individual and mixed extracts of two tree species on *in vitro* gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs**.** *Livestock Science*, 136, 192–200.
24. Lila, Z. A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T. & Itabashi, H. (2003). Effect of sarsaponin on rumin with particular reference to methane production *in vitro*. J *Journal of Dairy Scienc*, 86, 3330–3336.
25. Makkar, H. P. S. (2003). Effects and fate tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49, 241-256
26. Makkar, H. P. S. (2000). Quantification of Tannins in Tree Foliage. A Laboratory Manual for the FAO/IAEA Co-ordinated Research Project on Use of Nuclear and Related techniques to Develop Simple Tannin Assays for Predicting and Improving the safety and Efficiency of Feeding Ruminants on Tanniniferous Tree Foliage. Joint FAO/IAEA of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Animal Production and Health Sub-programme, FAO/IAEA Working Document. IAEA, Vienna, Austria.

Archive of SID

www.SID.ir

27. Makkar, H.P.S. (2010). *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In: Vercoe, P. E., Makkar, H. P. S., Schlink, A. C. (Eds.), *In vitro* Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies. IAEA, Dordrecht, the Netherlands, pp. 107–144.
28. Makkar, H. P. S., Sen, S., Blummel, M. & Becker, K. (1998). Effects of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* and *Acacia auriculoformis* on rumen fermentation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4324–4328.
29. Menke, K. H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal research and development*, 28, 7–55.
30. Menke, K. H., 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 *in vitro*. *Journal of Agriculture Science*, 92, 217–222.
31. Mueller-Harvey, I. (2006). Review, Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,86, 2010–2037.
32. Newbold, C. J. & Rode, L. M. (2006). Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *International congress series*,138–147
33. Oh, H. K., Jones, M. B. & Longhurst, W. M. (1968). Comparison of rumen microbial inhibition resulting from various essential oils isolated from relatively unpalatable plant species. *Applied Microbiology*, 16, 39–44.
34. Patra, A. K., Kamra, D. N. & Neeta Agarwal. (2006). Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*,128, 276–291.
35.Rochfort, S., Parker, A. J. & Dunshea, F. R. (2008). Plant bioactives for ruminant health andproductivity. *Phytochemistry*, 69, 299–322.
36. SAS Institute. (2002). SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary, N.C. USA. 956 pp.
37. Sliwiniski, B. J., Soliva, C. R., Machmuller, A. & Kreuzer, M. (2002). Efficacy of plant rich in secondry constituents modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*,101, 101-114.
38. Stack, R. J. & Cotta, M. A. (1986). Effect of 3-phenylpropanoic acid on growth of, and cellulose utilization by, cellulolytic ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 209–210.
39. Tiemann, T. T., Cortes, J. E., Pabo, M. L., Hess, H. D., Kreuzer, M. & Carulla, J. E. (2010). *In vitro* evidence for the importance of cultivation conditions on the effects of *Calliandra* tannins on ruminal escape of soybean protein and its post-ruminal degradability. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94, 225–230.
40. Van Soest, P.J. (1982). Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, O& Books, Corvallis, OR, USA, pp. 253–280.
41. Vasta, V. & Luciano, G. (2011). The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminants' products quality. *Small Ruminant Research*, 101, 150-159.
42. Wallace, R. J. & Cotta, M. A. (1988). Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: Hobson, P.N. (Ed.), The Rumen Microbial Ecosystem. Elsevier Applied Science, London, UK, pp. 217–249.
43. Williams, A. & Coleman, G. (1991). The Rumen Protozoa. Springer-Verlag, New York.
44. Yanez Ruiz, D. R., Moumen, A., Martin Garcia, A. I. & Molina Alcaide, E. (2004). Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *Journal of Animal Science*, 85, 2023-2032.

Archive of SID

www.SID.ir