نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۰۶، بهار ۱۳۹٤
ص‌ص: ۱۳~۲۸

تاثیر سطوح متفاوت عصاره تفاله انگور بر قابلیت هضم روده‌ای گاو شیری به روش برون‌تنی

- **محمد جواد ابرقوئی**
دانش‌آموخته دکتری تغذیه دام دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.
- **یوسف روزبهان** (نویسنده مسئول)
دانشیار، گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

تاریخ دریافت : مرداد ۹۲ تاریخ پذیرش : خرداد ۹۳

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۹۰۵۴۸۱

Email: rozbeh_y@modares.ac.ir

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی سطوح مختلف عصاره تفاله انگور بر تجزیه‌پذیری و قابلیت‌هضم جیره معمول گاو شیری با استفاده از روش تولید گاز دو مرحله‌ای تغییریافته، انجام پذیرفت. مقادیر اسیدهای چرب فرار، تولید آمونیاک و جمعیت پروتوزوآ تعیین گردیدند. شش سطح عصاره مورد استفاده قرار گرفت که شامل GE0: جیره پایه بدون عصاره، GE1، GE2، GE3، GE4، GE5 به ترتیب ۱۲، ۲٤، ۳٦، ٤۸ و ٦۰ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح بود. تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای ماده‌خشک تیمارهای GE3، GE4 و GE5 در مقایسه با GE0 کاهش یافت، ولی تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین‌خام در کل تیمارهای حاوی عصاره نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد. قابلیت‌هضم ماده‌خشک و پروتئین‌خام در تیمارهای GE4 و GE5 در مقایسه با تیمار GE0 کاهش یافت. استفاده از عصاره، مقدار پروتئین عبوری و قابلیت‌هضم پروتئین‌خام عبوری در محلول پپسین- اسید هیدروکلریدریک را در مقایسه با تیمار شاهد، افزایش داد. جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیک در تیمارهای GE4 و GE5 نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. مقدار کل اسیدهای چرب فرار، استات و نسبت استات به پروپیونات در تیمارهای GE3، GE4 و GE5 در مقایسه با تیمار شاهد کمتر بود. افزودن عصاره باعث کاهش مقدار تولید آمونیاک، جمعیت کل پروتوزوآ، زیرخانواده انتودینینه[1] و جنس داسی‌تریچا[3] شد. جنس ایزوتریچا[2]، زیرخانواده دیپلودینینه[4] و زیرخانواده افریوسکالسینه[5] در زمان‌های ۱۲ و ۲٤ ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری با افزودن عصاره کاهش یافت. در کل، استفاده از عصاره تفاله انگور، مقدار آمونیاک، جمعیت پروتوزوآ و تجزیه پروتئین را کاهش و قابلیت هضم‌پروتئین عبوری از شکمبه را افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: گاو شیری، تفاله انگور، آزمون تولید گاز، قابلیت‌هضم، پروتوزوآ، برون‌تنی.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 106 pp: 13-28

The effects of several levels of grape pomace extract on in vitro intestinal digestibility of dairy cow

Abarghuei, Mohammad Javad[1], Rouzbehan, Yousef[*2]
1:PhD graduated, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran 2:Faculty member, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran,Email: rozbeh_y@modares.ac.ir.Tel: +989123905481

Received: August 2013 **Accepted: June 2014**

The experiment was carried out to study the effect of different doses of grape pomace extract (GE) on ruminal degradation and post-ruminal digestion of basal diet in dairy cow using a modified two-step *in vitro* method. The VFA, ammonia production and protozoa population determined. Six levels of extract were used: GE0: basal diet, GE1, GE2, GE3, GE4, GE5 contains 12, 24, 36, 48 and 60 µl extract/50 ml inoculum respectively. Ruminal degradation of DM (rdDM) in GE3, GE4, GE5 was lower comparing to GE0, but ruminal degradation of CP (rdCP) by adding GE was decreased. Digestibility of DM (tdDM) and CP (rdCP) in GE4 and GE5 diets were lower with comparing to GE0. Addition of GE increased the proportion of rumen escape CP (pdBCP) and degradability of bypass CP in HCl/pepsin (dBCP). The population of proteolytic bacteria only declined in GE4 and GE5 diets comparing to GE0. Total VFA, acetate concentrations and acetate propionate ratio were lower in GE3, GE4, GE5 diets compared to GE0. NH_3-N production, total number of protozoa, subfamily of *Entodiniinae* and genus of *Dasytricha* were decreased as the level of GE increased. With the By addition of GE, genus of *Isotricha* and subfamilies of *Diplodiniinae* and *Ophrioscolecinae* at the 12 and 24 h of incubation was lower than the control. In conclusion, GE supplementation has reduced protozoa population, NH_3-N and protein degradation in the rumen and increased degradability of bypass CP.

Key words: Dairy cow, grape pomace, gas test, digestibility, protozoa and *in vitro*.

مقدمه

یکی از بخش‌های هزینه‌بر جیره غذایی نشخوارکنندگان، مکمل‌های پروتئینی است که متاسفانه به دلیل تبدیل بخشی از آن‌ها به آمونیاک، در شکمبه بازده متابولیسمی مطلوبی ندارد(Van Soest و همکاران، ۱۹۹۱). بنابراین تحقیقات برای افزایش بازده متابولیسم پروتئین و حداکثرکردن عملکرد حیوان و کاهش هزینه‌های خوراک دامی رو به افزایش است. برخی افزودنی‌های شیمیایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و یونوفرها در جیره نشخوارکنندگان، برای بهبود متابولیسم پروتئین استفاده شده‌اند (Tamminga و Hobson، ۱۹۹۶؛ Benchaar و همکاران، ۲۰۰۸b)، اما به دلیل خطر وجود باقی‌مانده‌ی این ترکیبات در شیر و گوشت و اثرات احتمالی آنها بر سلامتی انسان، استفاده‌ی آن‌ها در خوراک‌های دامی ممنوع گردیده است (OJEU ۲۰۰۳). به همین دلیل، متخصصین تغذیه دام به استفاده از جایگزین‌های دیگری برای متعادل کردن تخمیر شکمبه علاقمند شده‌اند (Busquet و همکاران، ۲۰۰۶؛ Patra و همکاران، ۲۰۰۶). از این جایگزین‌ها می‌توان به مخمرها، اسیدهای‌آلی، پروبیوتیک‌ها، آنتی‌بادی‌ها و ترکیبات فعال گیاهی اشاره کرد (Calsamiglia و همکاران، ۲۰۰۷؛ Rochfort و همکاران، ۲۰۰۸). متابولیت‌های ثانویه یا ترکیبات فعال گیاهی، ترکیبات آلی مشتق شده از متابولیسم ثانویه گیاهی هستند و عملکرد مستقیمی در رشد و توسعه گیاه ندارند. طبقه‌بندی این متابولیت‌های ثانویه به دلیل اینکه مسیرهای سنتز متابولیکی و مکانیسم‌های عمل آن‌ها اغلب مشترک می‌باشد، مشکل است اما عموماً به ۴ گروه پلی‌فنول‌ها و تانن‌ها، ساپونین‌ها، ارگانوسولفورها و اسانس‌های ضروری تقسیم می‌شوند (Calsamiglia و همکاران، ۲۰۰۷؛ Hart و همکاران، ۲۰۰۸). هم‌اکنون تمایل و تحقیقات در مورد استفاده از این افزودنی‌ها در صنعت دام رو به افزایش است، زیرا اگر این ترکیبات در مقدار و شکل مناسب استفاده گردند می‌توانند تولید دام را بهبود دهند (Bickell و همکاران، ۲۰۱۰؛ Durmic و Blache ، ۲۰۱۲). Dentinho و همکاران (۲۰۰۷)، کاهش تجزیه‌پذیری موثر و

قابلیت هضم پروتئین کنجاله سویای فرآوری شده با عصاره تانن گیاه *Citrus ladanifer* را نشان دادند. در مقابل Alipour و Rouzbehan (۲۰۱۰) نشان دادند که عصاره تانني تفاله انگور، تجزیه پروتئین کنجاله سویا را در شکمبه کاهش داد و قابلیت‌هضم پروتئین عبوری این کنجاله با افزایش مقدار عصاره افزایش یافت. تفاله انگور یکی از محصولات فرعی کارخانجات آب میوه‌گیری در ایران است که سالانه تولید آن در حدود ۵۰۰۰۰ تن می‌باشد (Alipour و Rouzbehan، ۲۰۰۷). این محصول فرعی، حاوی مقدار زیادی متابولیت‌های ثانویه مانند تانن, ساپونین و آلکالوئیدها، ترکیبات فنولیک می‌باشد که دارای خواص ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهاب و تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی است (Abarghuei و همکاران، ۲۰۱۳؛ Oliveira و همکاران، ۲۰۱۰).

با توجه به این که اطلاعات محدودی در مورد استفاده از عصاره کامل تفاله انگور و اثرات متابولیت‌های ثانویه موجود در آن بر گاو شیری وجود دارد، بنابراین، هدف از تحقیق حاضر بررسی سطوح متفاوت عصاره تفاله انگور بر تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای و قابلیت‌هضم روده‌ای جیره کامل گاو شیری با هدف شناسایی سطح مناسب برای بهبود قابلیت‌هضم روده‌ای پروتئین جیره بود.

مواد و روش ها

تهیه عصاره تفاله انگور

تفاله انگور به صورت تازه از شهرستان ارومیه خریداری و به آزمایشگاه انتقال داده شد و در آون در دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک گردید و سپس عصاره‌گیری از آن به عمل آمد. برای عصاره‌گیری، تفاله انگور خشک شده با آب مقطر ۴۰ درجه سلسیوس به نسبت ۱ به ۱ مخلوط گردید و در یک ظرف دربسته برای مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس، ظرف حاوی تفاله انگور در دمای ۴۰ درجه سلسیوس برای مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد و بعد از آن با استفاده از پارچه تنظیف عصاره‌گیری انجام شد و عصاره به دست آمده با استفاده از دستگاه فریزدرایرخشک و برای استفاده بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید (Abarghuei و همکاران، ۲۰۱۳).

تیمارهای آزمایشی

در ابتدا یک جیره غذایی بر اساس نیاز گاوهای شیری با استفاده از نرم‌افزار NRC (۲۰۰۱) تنظیم گردید. مقدار ۳۲۱ میلی‌گرم ماده خشک جیره، درون شیشه‌های ویتن ۱۲۰ میلی‌لیتری وزن گردید. ۶ سطح عصاره (صفر، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۶۰ میکرولیتر به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح) تهیه گردید و در روز انجام آزمایش به شیشه‌ها اضافه شد. برای هر نسبت و زمان گرمخانه‌گذاری، نمونه‌ها در ۵ تکرار تهیه گردیدند. شیشه‌ها در ۳ سری آماده شدند. سری اول: تعیین تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای ماده‌خشک (rdDM) و پروتئین‌خام (rdCP) به روش آزمایشگاهی، سری دوم: قابلیت‌هضم ماده‌خشک (tdDM) و پروتئین‌خام (tdCP) به روش آزمایشگاهی، سری سوم: شیشه‌هایی جهت نمونه‌برداری برای تعیین آمونیاک، اسیدهای چرب فرار و پروتوزوآ در زمان های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری و شمارش باکتری‌های پروتئولیتیک.

تعیین ترکیب شیمیایی

ابتدا نمونه‌های تهیه شده از جیره آزمایشی به وسیله آسیاب دارای غربال ۱ میلی‌متری آسیاب شده و سپس مقادیر ماده خشک، ماده آلی و خاکستر خام، پروتئین خام و چربی خام بر اساس روش‌های AOAC (۱۹۹۵) اندازه‌گیری شد. دیواره سلولی طبق روش Van Soest و همکاران (۱۹۹۱)، دیواره سلولی بدون همی سلولز بر اساس AOAC (۱۹۹۵) و لیگنین نیز طبق روش Van Soest و Robertson (۱۹۸۱)، اندازه گیری شدند. مقدار ازت ادرار و مدفوع به وسیله دستگاه کجلدال تعیین گردید (AOAC ۱۹۹۵). کل ترکیبات فنولیک با استفاده از فولین‌سیوکالتو[۶]، تانن-های قابل هیدرولیز با استفاده از رودانین[۷] و تانن کل و تانن متراکم طبق روش Makkar (۲۰۰۰) برآورد گردیدند. مقدار ساپونین با استفاده از بوتانول و بر اساس روش Makkar و همکاران (۱۹۹۸) برآورد گردید.

تخمیر آزمایشگاهی

در این بخش از آزمـایش، ترکیبـی از روش ۳ مرحلـه‌ای اسـتفاده گردید (Cortes و همکاران، ۲۰۰۹؛ Tilley و Terry، ۱۹۶۳). در ایـن روش بـر خـلاف روش Tilley و Terry (۱۹۶۳)، محتوای یک سری از شیشه‌ها بعد از ۴۸ سـاعت گرمخانـه‌گـذاری برای تخمین تجزیه شکمبه‌ای مـاده‌خشـک و پـروتئین‌خـام صـاف شدند و سری دوم به مدت ۲۴ ساعت دیگر بـا اضـافه‌کـردن اسـید کلریـدریک و پپسـین بـرای تعیـین قابلیـت‌هضـم مـاده‌خشـک و پروتئین‌خام گرمخانه گذاری گردیدند. نمونـه شـیرابه شـکمبه از ۳ رأس گاو هلشـتاین فیسـتولادار قبـل از غـذای صـبح گرفتـه شـد و درون آب گـرم بـه آزمایشـگاه انتقـال داده شـد. گاوهـا بـرای عادت‌پذیری بـا جیـره‌ای شـامل مخلـوط علوفـه (یونجـه و سـیلوی ذرت) و کنسانتره با نسبت ۴۴:۵۶ به مدت دو هفتـه تغذیـه شـدند. نمونه شیرابه شکمبه به وسیله ۴ لایه پارچه تنظیف صاف گردیـد و درون یک قیف جداکننده تحـت گـاز CO_2 در دمـای ۳۹ درجـه سلسیوس ریخته شد. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه، بخش بالایی شـیرابه شکمبه دور ریخته شد و شیرابه باقی‌مانده به نسـبت ۱ بـه ۴ بـا بـافر مـگ‌دوگـال مخلـوط گردیـد (Cortes و همکـاران، ۲۰۰۹؛ Tilley و Terry، ۱۹۶۳). مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح درون شیشه‌های حاوی تیمارهای آزمایشی ریخته شد و بعد از گـاز دادن بـا CO_2 در شیشـه‌هـا بسـته شـد و شیشـه‌هـا در دمـای ۳۹ درجـه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت، سری اول نمونـه‌هـا از گرمخانه برداشته شدند و با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر محلول کلریـد جیوه (۵۰ میلی‌گـرم بـه ازای میلـی‌لیتـر)، تخمیـر در ایـن شیشـه‌هـا متوقف گردید. به سـری دوم نمونـه‌هـا، ۶ میلـی‌لیتـر محلـول اسـید کلریدریک ۶/۲۱ نرمال و ۲ میلی‌لیتر محلـول پپسـین (۵۰ گـرم در لیتـر، 2844-01, Mallinckrodt Baker, Phillipburg, NJ, USA; 1:3000) اضافه گردیـد و گرمخانـه‌گـذاری بـرای مدت زمان ۲۴ ساعت دیگر جهت تحریک هضـم بعـد شـکمبه‌ای ادامه یافت. بعد از گرمخانه‌گذاری، محتوای شیشه‌ها بـا اسـتفاده از کاغـذ صـافی فاقـد نیتـروژن (واتمـن شـماره ۱۰۳۰۰۰۱۲) صـاف گردید. مواد باقیمانده در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت خشک و وزن گردید. سپس میـزان پـروتئین‌خـام نمونـه‌هـا تعیین گردید (AOAC ۱۹۹۰). برای اولین سری شیشه‌ها، مقـادیر rdDM و rdCP از مقادیر ماده‌خشک و پروتئین‌خام قبـل و بعـد از صاف‌کردن با کاغذ صافی بعد از گرمخانه‌گذاری تعیین گردید. همـین روش بـرای تعیـین مقـادیر tdDM و tdCP در سـری دوم شیشه‌ها استفاده گردید.

$$pdBCP = tdDM - tdCP$$

pdBCP: پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه ولی تجزیـه شـده بـا مخلوط اسید کلریدریک و پپسین (پروتئین عبوری).

اندازه‌گیری آمونیاک

در زمـان ۱۲، ۲۴ و ۴۸ سـاعت بعـد از گرمخانـه‌گـذاری، شـیرابه شکمبه نمونه‌برداری شده با نسبت ۵ به ۱ با اسـید کلریـدریک ۰/۲ نرمـال رقیـق گردیـد و تـا روز انـدازه‌گیـری در دمـای ۲۰- درجـه سلسیوس نگهداری شد. در روز اندازه‌گیری آمونیاک، سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه با ۱۵۰۰ rpm) انجـام شـد و مقـدار آمونیـاک نمونـه‌هـا تعیین گردید (Broderick و Kang، ۱۹۸۰).

اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار

در پایان ۲۴ ساعت گرمخانه گـذاری، بعـد از سـانتریفیوژ محتـوای شیشـه، ۱ میلـی‌لیتـر از محلـول بـالایی سـانتریفیوژ شـده درون میکروتیـوب‌هـای سـانتریفیوژ ریختـه شـد و ۰/۲۰ میلـی‌لیتـر اسـید متافسفریک ۲۵ درصد به آن اضافه گردیـد. محلـول، ۲ سـاعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد و در دور g ۱۴۰۰۰ برای ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید.

محلول بالایی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس ذخیره گردیـد. بـرای تخمین اسیدهای چرب فرار، یک میکرولیتر از محلول تهیه شده به دسـتگاه کرومـاتوگراف (شـیماتزو ژاپـن) تزریـق شـد. ۲- اتیـل بوتیریک اسید به عنوان استاندارد داخلی استفاده گردید (Cottyn و Boucque، ۱۹۶۸).

کشت و شمارش باکتری‌های پروتئولیتیک

این مرحله، بر طبق روش Dehority (۲۰۰۳) انجام شد. ابتدا لوله‌های هانگیت حاوی محیط کشت و پودر ژلاتین به عنوان منبع پروتئین تهیه گردید. سپس مقدار ۵ گرم از نمونه شیرابه شکمبه گرفته شده با مایع رقیق کننده مخلوط گردید و به لوله‌های هانگیت تلقیح شد. محیط‌های کشت برای مدت ۱۴ روز در دمای ۳۹ درجه سلسیوس رشد داده شدند. تعداد باکتری‌های پروتئولیتیک با استفاده از روش MPN (most probable number) شمارش گردید.

شمارش جمعیت پروتوزوآ

جمعیت پروتوزوآ طبق روش Dehority (۲۰۰۳) تعیین گردید. نمونه‌ای از محتوای شیشه ویتن در زمان ۲۴ ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری برداشته شد، دو میلی‌لیتر از محتوای شیرابه شکمبه درون لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر فرمال سالین ریخته شد. سپس دو قطره محلول رنگ‌آمیزی سبز روشن به لوله اضافه گردید و مخلوط شد و به مدت یک شبانه روز در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. به وسیله میکروسکوپ با بزرگنمایی x ۱۰ و لام هموسیتومتر، تعداد پروتوزوآ (کل پروتوزوآ، جنس ایزوتریچا، جنس داسی‌تریچا، زیرخانواده‌های انتودینینه، دیپلودینینه و افریوسکالسینه) تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

با استفاده از نرم افزار SAS (۲۰۰۲) و با رویه GLM و بر اساس مدل آماری زیر تجریه واریانس داده‌ها (تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک و پروتئین خام، قابلیت‌هضم ماده خشک و پروتئین خام، مقدار اسیدهای چرب فرار، آمونیاک، جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیک و پروتوزوآ) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۵ تکرار صورت گرفت و اثرات خطی و درجه دو برآورد گردید.

$$Y_{ij}= \mu+ T_i+\varepsilon_{ij}$$

Y_{ij}: میانگین کل؛ μ: میانگین نمونه، T_i: اثر تیمار و ε_{ij}: خطای آزمایشی

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده جیره آزمایشی (بر حسب ماده خشک)

اجزای جیره (درصد)	
یونجه خشک	۲۲/۹۰
سیلاژ ذرت	۲۱/۲۰
دانه جو آسیاب‌شده	۱۳/۴۵
دانه ذرت آسیاب‌شده	۸/۲۰
دانه گندم آسیاب‌شده	۲/۸۰
سبوس گندم	۹/۹۵
کنجاله سویا ۴۴٪ پروتئین	۶/۶۵
کنجاله کانولا	۲/۸۰
کنجاله پنبه دانه	۳/۹۳
روغن گیاهی	۱/۲۴
سنگ آهک	۰/۶۲
مخلوط معدنی ویتامینی[1]	۱/۲۴
نمک	۰/۶۲
ملاس	۱/۴۵
بیکربنات سدیم	۱/۲۴
پودر ماهی	۱/۷۰

۱- محاسبه شده بر اساس فرمول NRC (۲۰۰۱).

نتایج و بحث

جیره آزمایشی

ترکیب شیمیایی جیره آزمایشی (گرم در کیلوگرم ماده خشک) در جدول ۲ آورده شده است.

جدول۲- ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی (گرم در کیلوگرم ماده خشک)

ترکیب شیمیایی	GE0	GE1	GE2	GE3	GE4	GE5
ماده‌خشک	۹۶۰	۹۶۰	۹۶۰	۹۶۰	۹۶۰	۹۶۰
ماده‌آلی	۹۲۶	۹۲۶	۹۲۶	۹۲۶	۹۲۶	۹۲۶
پروتئین‌خام	۱۶۰	۱۶۰	۱۶۰	۱۶۰	۱۶۰	۱۶۰
انرژی خالص شیردهی(مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک)	۱/۵۷	۱/۵۷	۱/۵۷	۱/۵۷	۱/۵۷	۱/۵۷
دیواره سلولی	۳۴۰	۳۴۰	۳۴۰	۳۴۰	۳۴۰	۳۴۰
دیواره سلولی منهای همی‌سلولز	۲۰۱	۲۰۱	۲۰۱	۲۰۱	۲۰۱	۲۰۱
لیگنین	۴۷/۳	۴۷/۳	۴۷/۳	۴۷/۳	۴۷/۳	۴۷/۳
عصاره اتری	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰
ترکیبات فنولیک کل (گرم به کیلوگرم)	۰	۰/۶۵	۱/۳۰	۱/۹۵	۲/۶۰	۳/۲۵
تانن کل (گرم به کیلوگرم)	۰	۰/۴۷	۰/۹۴	۱/۴۱	۱/۸۸	۲/۳۵
ترکیبات فنولیک غیرتانن (گرم به کیلوگرم)	۰	۰/۱۸	۰/۳۶	۰/۵۴	۰/۷۲	۰/۹۰
ساپونین (گرم به کیلوگرم)	۰	۰/۶۲	۱/۲۴	۱/۸۶	۲/۴۸	۳/۱۰

GE0: جیره پایه بدون عصاره، GE1: جیره پایه بعلاوه ۱۲ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE2: جیره پایه بعلاوه ۲۴ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE3: جیره پایه بعلاوه ۳۶ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE4: جیره پایه بعلاوه ۴۸ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE5: جیره پایه بعلاوه ۶۰ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح.

تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای و قابلیت‌هضم ماده خشک

تیمارهای آزمایشی

تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای و قابلیت‌هضم ماده‌خشک و پروتئین‌خام در نمونه های آزمایشی (جدول ۳ و ۴) نشان داد که استفاده از عصاره تفاله انگور، تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای ماده‌خشک ($P < ۰/۰۱$) تیمارهای GE3، GE4 و GE5 را در مقایسه با GE0 کاهش داد، ولی تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین‌خام ($P < ۰/۰۱$) در کل تیمارها با افزودن عصاره کاهش یافت. قابلیت‌هضم ماده‌خشک و پروتئین‌خام در تیمارهای GE4 و GE5 در مقایسه با تیمار GE0 کاهش یافت ($P < ۰/۰۱$) ولی در تیمارهای GE1، GE2 و GE3 نسبت به GE0 تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در تحقیقات دیگر نیز استفاده از متابولیت‌های ثانویه بخصوص تانن متراکم، تجزیه‌پذیری ماده‌خشک و پروتئین‌خام را در شیرابه شکمبه کاهش داد (Cortes و همکاران، ۲۰۰۹؛ Frutos و همکاران، ۲۰۰۴؛ ، Stürm و همکاران، ۲۰۰۷).

اثرات متابولیت‌ها در شیرابه شکمبه در مقایسه با شرایط شیردان بیشتر بود که احتمالاً به دلیل اثر متقابل قوی‌تر این متابولیت‌ها با پروتئین‌ها در pH شکمبه می‌باشد (Makkar ۲۰۰۳). بیشترین ترکیب تانن و پروتئین در pH بین ۴ تا ۷ تشکیل می‌گردد (Jones و Mangan، ۱۹۷۷).

در pH متعادل مانند محیط شکمبه، (۶/۸ تا ۷/۲) معمولاً رسوب پروتئین رخ می‌دهد و به یکباره در شیردان که pH ۲ تا ۲/۵ دارد، کمپلکس تانن - پروتئین شکسته می‌شود. همچنین pH روده کوچک بویژه در نواحی بالایی بیشتر از ۷ است که در آن ناحیه نیز کمپلکس تانن - پروتئین شکسته می‌شود (Makkar ۲۰۰۳؛ McSweeney و همکاران، ۲۰۰۱؛ Vaithiyanathan و همکاران، ۲۰۰۶).

جدول ۳- تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای و قابلیت‌هضم ماده خشک جیره های آزمایشی

پارامتر	تیمار								سطح معنی‌داری		
	GE0	GE1	GE2	GE3	GE4	GE5	SEM	خطی	درجه دو
rdDM	۶۹۸/۲^{a}	۶۷۲/۳^{a}	۶۶۳/۲^{ab}	۵۹۷/۱^{bc}	۵۸۳/۹^{c}	۵۶۹/۷^{c}	۲۳/۸۱	**	ns
tdDM	۷۳۶/۹^{a}	۷۳۳/۹^{a}	۷۳۲/۵^{a}	۷۰۲/۳^{b}	۶۷۰/۲^{c}	۶۶۱/۴^{c}	۶/۶۸	**	**

GE0: جیره پایه بدون عصاره، GE1: جیره پایه بعلاوه ۱۲ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE2: جیره پایه بعلاوه ۲۴ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE3: جیره پایه بعلاوه ۳۶ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE4: جیره پایه بعلاوه ۴۸ میکرولیتر عصاره به ازای۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE5: جیره پایه بعلاوه ۶۰ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، rdDM: تجزیه ماده‌خشک در زمان گرمخانه‌گذاری با شیرابه شکمبه (تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک) (میلی‌گرم به گرم ماده‌خشک گرمخانه‌گذاری شده)، tdDM: تجزیه ماده‌خشک در زمان گرمخانه‌گذاری با شیرابه شکمبه و محلول پپسین- اسیدکلریدریک (قابلیت‌هضم ماده خشک) (میلی‌گرم به گرم ماده‌خشک گرمخانه‌گذاری شده). حروف لاتین غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P < ۰/۰۵، P < ۰/۰۱). ns: عدم معنی‌داری.

جدول ٤- تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای و قابلیت‌هضم پروتئین و جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیک (بر اساس لگاریتم بر مبنای ۱۰) در تیمارهای آزمایشی

	تیمار								سطح معنی‌داری		
	GE0	GE1	GE2	GE3	GE4	GE5	SEM	خطی	درجه دو
rdCP	۸۲۹/۷۹^{a}	۷۳۸/۷۵^{b}	۷۳۴/۵۸^{c}	۷۲۶/۰۴^{d}	۷۲۰/۴۲^{e}	۷۱۷/۰۸^{e}	۱/۲۳۰	**	**
tdCP	۸۵۵/۰۸^{a}	۸۴۴/۶۶^{a}	۸۴۴/۱۶^{a}	۸۴۳/۰۵^{a}	۸۱۷/۵۸^{b}	۸۰۲/۶۴^{b}	۵/۲۰۶	**	ns
pdBCP	۲۵/۲۹^{d}	۱۰۵/۹۱^{ab}	۱۰۹/۵۸^{ab}	۱۱۷/۰۱^{a}	۹۷/۱۶^{bc}	۸۵/۵۶^{c}	۴/۶۴۹	**	**
dBCP	۰/۱۵^{c}	۰/۴۰^{a}	۰/۴۱^{a}	۰/۴۳^{a}	۰/۳۵^{b}	۰/۳۰^{b}	۰/۰۱۸	**	**
باکتری‌های پروتئولیتیک	۷/۴۲^{a}	۷/۴۱^{a}	۷/۴۱^{a}	۷/۴۰^{a}	۷/۳۰^{b}	۷/۲۹^{b}	۰/۰۰۸	**	**

GE0: جیره پایه بدون عصاره، GE1: جیره پایه بعلاوه ۱۲ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE2: جیره پایه بعلاوه ۲۴ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE3: جیره پایه بعلاوه ۳۶ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE4: جیره پایه بعلاوه ۴۸ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE5: جیره پایه بعلاوه ۶۰ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، rdCP: تجزیه پروتئین در زمان گرمخانه‌گذاری با شیرابه شکمبه (میلی‌گرم به گرم پروتئین خام گرمخانه‌گذاری شده)، tdCP: تجزیه پروتئین در زمان گرمخانه‌گذاری با شیرابه شکمبه و محلول پپسین- اسید کلریدریک (قابلیت‌هضم) (میلی‌گرم به گرم پروتئین خام گرمخانه‌گذاری شده)، pdBCP: پروتئین تجزیه نشده در شیرابه شکمبه (پروتئین عبوری) ولی تجزیه شده با محلول پپسین- اسید کلریدریک (میلی‌گرم به گرم پروتئین خام گرمخانه‌گذاری شده)، dBCP: قابلیت‌هضم پروتئین خام عبوری در محلول پپسین- اسید کلریدریک (میلی‌گرم به گرم پروتئین‌خام عبوری). حروف لاتین غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P < ۰/۰۵، P < ۰/۰۱). ns: عدم معنی‌داری.

مقدار پروتئین عبوری در تیمارهای حاوی عصاره بیشتر از تیمار شاهد بود ($P < ۰/۰۱$) (جدول ۴). این افزایش نشان‌دهنده عبور بیشتر پروتئین از شکمبه در حضور متابولیت‌های ثانویه است. زیرا مشخص شده است که این متابولیت‌ها، تجزیه پروتئین در شکمبه را کاهش داده و پروتئین را از هیدرولیز میکروبی و دی‌آمیناسیون در شکمبه محافظت کرده و در نتیجه قابلیت‌دسترسی پروتئین‌های خوراک را برای هضم افزایش داده و سبب جذب بیشتر اسیدهای‌آمینه بعد از شکمبه می‌شوند (Min و همکاران، ۲۰۰۲).

مشابه با تحقیق حاضر، توسط Alipour و Rouzbehan (۲۰۱۰) نیز گزارش گردید که با افزودن ۴ سطح تانن متراکم تفاله انگور (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ گرم به کیلوگرم ماده خشک) به کنجاله سویا، مقدار تجزیه‌پذیری موثر در شکمبه کاهش، و با افزایش مقدار تانن متراکم، قابلیت‌هضم روده‌ای کنجاله سویا نیز افزایش یافت. برخلاف پژوهش حاضر، در تحقیقی دیگر گزارش گردید که فرآوری تیمار سویا با ۱۰٪ تانن باعث کاهش هضم پانکراسی پروتئین گردید (Driedger و Hatfield، ۱۹۷۲).

همچنین Cortes و همکاران (۲۰۰۹) نیز عصاره تانن متراکم سه گیاه *Calliandra calothyrsus*، *Flemingia macrophylla* و *Leucaena leucocephala* را به کنجاله سویا در ۳ سطح ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم به ازاء هر گرم پروتئین‌خام افزوده و گزارش کردند که سطوح متوسط این گیاهان تجزیه پروتئین را در شکمبه و روده کاهش داد و مصرف آنها در حیوان می‌تواند مفید باشد. به طور کلی، تاثیر این متابولیت‌ها به مقدار و نوع متابولیت مصرفی، منبع متابولیت استفاده شده و سازگاری میکروارگانیسم‌های شکمبه به وجود این ترکیبات بستگی دارد.

افزودن عصاره تفاله انگور، مقدار قابلیت‌هضم پروتئین‌خام عبوری (dBCP) را در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داد ($P < ۰/۰۱$). این افزایش احتمالاً نشان‌دهنده این است که استفاده از این عصاره تاثیری بر قابلیت‌هضم بعد شکمبه‌ای پروتئین نداشته است. به طور مشابه، در پژوهش دیگری گزارش گردید که ترکیب بین تانن متراکم و پروتئین در شرایط محیط شیردان که pH آن پایین است کاملاً شکسته می‌شود (Jones و Mangan، ۱۹۷۷). همچنین در آزمایش دیگری نیز افزایش مقدار قابلیت‌هضم روده‌ای پروتئین با استفاده از سطوح افزایشی عصاره تفاله انگور گزارش گردید (Abarghuei و همکاران، ۲۰۱۳).

ولی توسط Cortes و همکاران (۲۰۰۹) نشان داده شد که با افزایش مقدار عصاره تانن متراکم، این فراسنجه کاهش یافت. به هر حال قابلیت‌هضم در تیمارهای GE4 و GE5 نسبت به تیمارهای GE1، GE2 و GE3 کمتر بود. این کاهش احتمالاً به دلیل مقدار عصاره مصرفی است. تفاوت در بین مطالعات احتمالاً به دلیل اختلاف در منابع پروتئین و متابولیت‌ها و مقدار استفاده آن‌ها می‌باشد (Cortes و همکاران، ۲۰۰۹).

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت باکتریایی شکمبه

با افزودن عصاره تفاله انگور، تعداد باکتری‌های پروتئولیتیک در تیمارهای GE5 و GE6 در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت ($P < ۰/۰۱$) (جدول ۴). کاهش در این جمعیت‌ها به وسیله چند مکانیسم قابل توضیح است: ۱- مهار مستقیم میکروارگانیسم‌ها به وسیله واکنش‌های متقابل متابولیت‌های ثانویه با دیواره سلولی و آنزیم‌های کاتابولیک ترشح شده ۲- کاهش دسترس‌پذیری سوبسترا در نتیجه ترکیب شدن این متابولیت‌ها با مواد مغذی (کربوهیدرات، پروتئین و مواد معدنی). این واکنش‌های متقابل احتمالاً، انتقال مواد مغذی را به درون سلول مهار کرده و رشد ارگانیسم را کاهش می‌دهد (McSweeney و همکاران، ۲۰۰۱؛ Min و همکاران، ۲۰۰۲). مشابه با پژوهش حاضر، در تحقیقی نشان داده شد که استفاده از گیاه اسپرس باعث کاهش تعداد ۴ سویه از باکتری‌های پروتئولیتیک گردید.

این محققین نشان دادند که تانن متراکم با پلیمرهای پوششی سلول‌ها ترکیب شده و در واقع هدف تانن‌ها دیواره سلولی بود. همچنین تانن‌های متراکم در غلظت‌های زیاد به درون دیواره سلولی نفوذ کرده و با یک یا تعداد بیشتری از ترکیبات سلولی واکنش می‌دهند و به طور انتخابی ساخت دیواره سلولی را مهار می‌کنند که باعث خروج آنزیم پروتئاز از سلول می‌شود (Jones

و همکاران، ۱۹۹۴). همچنین در تحقیق دیگری نیز نشان داده شد که استفاده از تفاله انگور (حاوی تانن و ساپونین) در جیره گوسفندان سبب کاهش تعداد باکتری‌های پروتئولیتیک گردید (Abarghuei و همکاران، ۲۰۱۰).

برخلاف تحقیقات مذکور، توسط Newbold و همکاران (۱۹۹۷) گزارش شد که افزودن تانن به جیره، تأثیری بر فعالیت پروتئولیتیک در شکمبه نداشت و این عدم تاثیر می‌تواند به دلیل کاهش تجزیه باکتری باشد. به هر حال در پژوهش‌های دیگری نشان داده شد که استفاده از تانن متراکم گیاه *Leucaena diversifolia* در جیره بره و گیاه *Garcinia Mangostana* در جیره گاو گوشتی، جمعیت کل باکتری‌ها را افزایش داد (Calsamiglia و همکاران، ۲۰۰۷؛ Ngamsaeng و Wanapat، ۲۰۰۶).

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر اسیدهای چرب فرار و آمونیاک

مقدار کل اسیدهای چرب ، استات و نسبت استات به پروپیونات در تیمارهای GE3، GE4 و GE5 در مقایسه با تیمار GE0 کمتر بود ($P < ۰/۰۱$)، ولی مقادیر پروپیونات و بوتیرات در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۵). اسیدهای چرب فرار، محصولات نهایی تخمیر میکروبی شکمبه بوده و نشان‌دهنده عرضه انرژی قابل‌متابولیسم برای حیوان هستند و کاهش این اسیدها برای حیوان مضر است (Van Soest و همکاران، ۱۹۹۱).

به هر حال در این پژوهش، مقدار کل اسیدهای چرب فرار تیمارهای GE1 و GE2 در مقایسه با تیمار GE0 تفاوت معنی‌داری نداشت و پیشنهاد می‌شود که این سطوح عصاره تفاله انگور، تجزیه سوبسترا و قابلیت‌دسترسی انرژی را تغییر نداده است. مشابه با نتایج حاضر، در مطالعات دیگری نیز تاثیری بر مقدار کل اسیدهای چرب فرار با افزودن عصاره حاوی متابولیت‌های ثانویه مشاهده نگردید (Busquet و همکاران، ۲۰۰۵؛ Getachew و همکاران، ۲۰۰۸). به هر حال برخلاف نتایج تحقیق حاضر، Jiménez-Peralta و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که استفاده از مقادیر ۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸ میلی‌لیتر عصاره دو گیاه *L. leucocephala* و *S. babylonica*، مقدار کل اسیدهای چرب فرار را افزایش داد.

همچنین در تحقیقی دیگر گزارش گردید که استفاده از روغن‌های ضروری چندین گیاه دارویی تولید کل اسیدهای چرب فرار را کاهش داد (Oh و همکاران، ۱۹۶۸). از اثرات اصلی متابولیت‌های ثانویه (تانن و ساپونین) می‌توان به کاهش استات، افزایش پروپیونات و کاهش نسبت استات به پروپیونات اشاره کرد. کاهش استات می‌تواند در نتیجه اثر منفی متابولیت‌ها بخصوص ساپونین بر پروتوزوآ باشد.

محصولات اصلی نهایی تخمیر پروتوزوآ، استات و پروپیونات است و بنابراین کاهش در جمعیت پروتوزوآ (جدول ۶) می‌تواند دلیلی برای کاهش استات باشد (Dehority ۲۰۰۳). در کل به نظر می‌رسد که اثرات این متابولیت‌ها بر ترکیب اسیدهای چرب فرار به مقدار و منبع متابولیت و ترکیب سوبسترا بستگی داشته باشد.

تولید آمونیاک با افزودن عصاره به ترتیب در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری کاهش یافت ($P < ۰/۰۱$) . کاهش مقدار آمونیاک احتمالاً به دلیل تاثیر مهارکنندگی مواد موثر موجود در عصاره بر فعالیت پروتئولیتیکی در شکمبه می‌باشد (Frutos و همکاران، ۲۰۰۴؛ Hervas و همکاران، ۲۰۰۰). بعلاوه، معمولاً زمانی که جمعیت پروتوزوآ در شکمبه مهار می‌شود (جدول ۶) و به دنبال آن کاهش تجزیه باکتریایی اتفاق می‌افتد، مقدار آمونیاک در شکمبه نیز کاهش می‌یابد (Williams و Coleman، ۱۹۹۱).

همچنین کاهش مقدار آمونیاک می‌تواند در نتیجه پیوند با ترکیباتی مانند ساپونین باشد (McSweeney و همکاران، ۲۰۰۱). کاهش در مقدار آمونیاک همراه با افزایش مقدار پروتئین عبوری، جریان اسیدهای‌آمینه را به روده افزایش داده و به بهبود بازده نیتروژن در حیوان کمک می‌کند (Makkar، ۲۰۰۳). موافق با نتایج پژوهش حاضر، محققین دیگری نیز گزارش کردند که افزودن عصاره تانن متراکم گیاه *Calliandra calothyrsus*

با مقدار ۶۰۰ میلی‌گرم به گرم پروتئین‌خام جیره، مقدار آمونیاک را کاهش داد (Tiemann و همکاران، ۲۰۱۰). به طور مشابه در تحقیقات دیگری نیز کاهش در مقدار آمونیاک با استفاده از ترکیباتی مانند تانن و ساپونین مشاهده گردید (نوریان و روزبهان، ۱۳۹۱؛ Abarghuei و همکاران، ۲۰۱۰؛ Cortes و همکاران، ۲۰۰۹؛ McSweeney و همکاران، ۲۰۰۱). به هر حال مخالف با پژوهش حاضر، Busquet و همکاران (۲۰۰۵) تفاوتی در مقدار آمونیاک با استفاده از عصاره گیاه *Syzygium aromaticum* حاوی ۸۵۰ گرم به کیلوگرم یوگنول مشاهده نکردند.

جمعیت پروتوزوآ

پروتوزوآی شکمبه‌ای دارای تاثیر منفی بر متابولیسم نیتروژن در نشخوارکنندگان می‌باشند. بنابراین حذف پروتوزوآ از شکمبه، از چرخه نیتروژن بین باکتری‌ها و پروتوزوآ جلوگیری کرده و جریان نیتروژن میکروبی را از شکمبه افزایش می‌دهد (Tiemann و همکاران، ۲۰۱۰). مقادیر کل پروتوزوآ و زیرخانواده انتودینینه در زمان‌های ۱۲ و ۴۸ ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری با افزودن عصاره کاهش یافت ($P < ۰/۰۱$) (جدول ۶). جنس ایزوتریچا در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری و جنس داسی-تریچا در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری با افزودن عصاره، کاهش ($P < ۰/۰۱$) یافت.

زیرخانواده دیپلودینینه نیز با افزودن عصاره در زمان‌های ۱۲ ($P < ۰/۰۵$) و ۲۴ ($P < ۰/۰۱$) ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری کاهش یافت ولی در زمان ۴۸ساعت شناسایی نگردید. زیرخانواده افریوسکالسینه با افزودن عصاره تفاله انگور در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری کاهش یافت ($P < ۰/۰۱$) ولی در زمان ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شناسایی نگردید. اطلاعات محدودی در مورد اثر این افزودنی و ترکیبات موثر آنها بر جمعیت پروتوزوآ وجود دارد و تاثیر متابولیت‌ها بر این میکروارگانیسم‌ها نیز در بین مطالعات مختلف متفاوت بوده است. کاهش پروتوزوآ به وسیله متابولیت‌های ثانویه، احتمالاً به دلیل ساختار فنولیکی این متابولیت‌ها می‌باشد.

این ساختار منجر به پاره شدن غشاء سلول، غیرفعال شدن آنزیم‌ها و کاهش سوبسترا و یون‌های فلزی مورد نیاز برای متابولیسم سلولی می‌گردد (Calsamiglia و همکاران، ۲۰۰۷؛ Goel همکاران، ۲۰۰۵). مشابه با نتایج تحقیق حاضر، در پژوهش‌های دیگری نیز کاهش در تعداد پروتوزوآ به دلیل استفاده از متابولیت‌های ثانویه ذکر گردید (نوریان و روزبهان، ۱۳۹۱؛ Abarghuei و همکاران، ۲۰۱۰؛ Calsamiglia و همکاران، ۲۰۰۷؛ Talebzadeh و همکاران، ۲۰۱۲).

همچنین به ترتیب توسط Newbold و همکاران (۱۹۹۷) و نوریان و روزبهان (۱۹۹۱) ویژگی ضدپروتوزوآیی قوی مطابق با محتوای ساپونین موجود در گیاه *Sesbania sesban* و عصاره گل گاوزبان دیده شد.

بر خلاف نتایج پژوهش حاضر، در تحقیقی دیگر ذکر گردید که استفاده از ۱۵۰ گرم تانن متراکم و ۶۰ گرم عصاره ساپونین گیاه یوکا در روز به ازای هر گاو، تاثیری بر تعداد کل پروتوزوآ، جنس داسی‌تریچا، دیپلودینیوم، انتودینیوم و پلی‌پلاسترون نداشت (Benchaar و همکاران، ۲۰۰۸a).

به هر حال نتیجه قانع‌کننده‌ای از مطالعات در مورد اثر متابولیت‌های ثانویه بر جمعیت پروتوزوآ در شکمبه به دست نیامده (Chiquette و همکاران، ۱۹۸۹؛ Sliwiniski و همکاران، ۲۰۰۲)، که احتمالاً به دلیل تنوع در شکل جیره، مقدار متابولیت‌ها، گونه، ساختار شیمیایی متابولیت‌ها، تفاوت‌های حیوانی و روش-های نمونه‌گیری می‌باشد (Yanez Ruiz و همکاران، ۲۰۰۴).

جدول ۵- تاثیر عصاره تفاله انگور بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای برون تنی با استفاده از شیرابه شکمبه گاو

	تیمار							سطح معنی‌داری	
	GE0	GE1	GE2	GE3	GE4	GE5	SEM	خطی	درجه دو
فراسنجه های تخمیر									
اسیدهای چرب فرار کل (میلی‌مول)	۷۴/۰۰^{a}	۷۳/۵۰^{a}	۷۲/۵۱^{ab}	۶۱/۶۵^{bc}	۵۹/۴۶ ^{c}	۵۷/۱۵^{c}	۳/۶۰۵	**	ns
اسیدهای چرب فرار مجزا (میلی‌مول /۱۰۰ مول)									
استات	۴۶/۵۸^{a}	۴۷/۱۸^{a}	۴۵/۲۳^{a}	۳۰/۲۳^{b}	۳۴/۵۲^{b}	۳۰/۷۱^{b}	۲/۵۱۱^{b}	**	ns
پروپیونات	۱۵/۵۱^{a}	۱۴/۶۶^{b}	۱۵/۰۳^{ab}	۱۸/۴۸^{a}	۱۴/۱۴^{b}	۱۴/۰۳ ^{b}	۱/۱۲۷	ns	ns
بوتیرات	۷/۰۱	۶/۹۹	۷/۹۹	۷/۰۲	۷/۲۳	۶/۸۵	۰/۵۰۱	ns	ns
ایزبوتیرات	۲/۵۴^{c}	۳/۵۳ ^{abc}	۲/۹۷ ^{bc}	۴/۶۰^{a}	۲/۶۲^{c}	۴/۱۴^{ab}	۰/۴۰۷	ns	*
ایزووالرات	۰/۸۴^{ab}	۰/۸۸ ^{ab}	۱/۰۲ ^{a}	۱/۰۴^{a}	۰/۷۱^{b}	۱/۱۴^{a}	۰/۰۹۱	ns	*
والرات	۰/۲۵^{ab}	۰/۲۵^{ab}	۰/۲۷^{ab}	۰/۲۷^{ab}	۰/۲۳^{b}	۰/۲۸^{a}	۰/۰۱۳	ns	*
استات به پروپیونات	۳/۱۲^{a}	۳/۲۲^{a}	۳/۰۳^{a}	۱/۶۳^{c}	۲/۵۴^{b}	۲/۲۱^{bc}	۰/۲۱۵	**	ns
آمونیاک (میلی‌گرم به لیتر مایع شکمبه)									
۱۲ ساعت بعد گرمخانه‌گذاری	۴۹/۹۰^{a}	۴۴/۸۵^{b}	۳۹/۳۴^{c}	۳۵/۷۷ ^{d}	۳۰/۹۳ ^{e}	۳۰/۸۲^{e}	۰/۵۱۹	**	ns
۲۴ ساعت بعد گرمخانه‌گذاری	۱۰۲/۰۷^{a}	۹۰/۷۳^{b}	۸۱/۳۷^{c}	۷۴/۴۲^{c}	۶۵/۴۰^{d}	۶۴/۶۴^{d}	۲/۷۶۵	**	ns
۴۸ ساعت بعد گرمخانه‌گذاری	۸۳/۵۴ ^{a}	۷۶/۱۱^{b}	۷۰/۷۱^{c}	۶۴/۹۲^{d}	۵۸/۵۳^{e}	۵۸/۳۹^{e}	۱/۲۵۴	**	ns

GE0: جیره پایه بدون عصاره، GE1: جیره پایه بعلاوه ۱۲ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE2: جیره پایه بعلاوه ۲۴ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE3: جیره پایه بعلاوه ۳۶ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE4: جیره پایه بعلاوه ۴۸ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE5: جیره پایه بعلاوه ۶۰ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، حروف لاتین غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ($P < ۰/۰۵$، $P < ۰/۰۱$). ns: عدم معنی‌داری.

جدول ٦- تاثیر عصاره تفاله انگور بر تعداد پروتوزوآی شکمبه

زمان	GE	پروتوزوآ (10^4 × در هر میلی لیتر مایع شکمبه)				
		کل	ایزوتریچا	داسی‌تریچا	انتودینیه	دیپلودینیه	افریوسکالسینه
۱۲	۰	۸۰/۰^{a}	۱۰/۰^{a}	۱۰/۰^{a}	۴۶/۳^{a}	۳/۲^{a}	۱۰/۰^{a}
	۱	۲۶/۷^{b}	۰۰/۰^{b}	۰۰/۰^{b}	۲۳/۱^{bc}	۲/۱۵^{ab}	۰/۰۰^{b}
	۲	۲۷/۷^{b}	۰۰/۰^{b}	۰۰/۰^{b}	۲۷/۳^{d}	۰/۰۰^{bc}	۰/۰۰^{b}
	۳	۱۱/۸^{c}	۰۰/۰^{b}	۰۰/۰^{b}	۱۱/۱^{c}	۰/۰۰^{c}	۰/۰۰^{b}
	۴	۱۶/۷^{c}	۰۰/۰^{b}	۰۰/۰^{b}	۱۶/۷^{c}	۰/۰۰^{c}	۰/۰۰^{b}
	۵	۱۰/۰^{c}	۰۰/۰^{b}	۰۰/۰^{b}	۱۰/۰^{d}	۰/۰۰^{c}	۰/۰۰^{b}
SEM		۲۱۸۲۶	۰	۹	۱۶۹۷۲	۴۰۸	۰
سطح معنی‌داری							
خطی		**	**	**	**	*	**
درجه دو		**	**	**	**	ns	**
۲۴	۰	۷۰/۰^{a}	۱۰/۰^{a}	۱۱/۰^{a}	۳۵/۴^{a}	۳/۳^{a}	۱۰/۰^{a}
	۱	۱۷/۰^{b}	۰۰/۰^{b}	۰۰/۰^{b}	۱۶/۷^{b}	۰۰/۰۸^{b}	۰۰/۰^{b}
	۲	۱۶/۷^{b}	۰۰/۰^{b}	۰۰/۰^{b}	۱۶/۷^{b}	۰۰/۰^{b}	۰۰/۰^{b}
	۳	۱۰/۰^{c}	۰۰/۰^{b}	۰۰/۰^{b}	۱۰/۰^{b}	۰۰/۰	۰۰/۰^{b}
	۴	۱۵/۹^{b}	۰۰/۰^{b}	۰۰/۰^{b}	۱۵/۶^{b}	۰۰/۰^{b}	۰۰/۰^{b}
	۵	۱۶/۶^{b}	۰۰/۰^{b}	۰۰/۰^{b}	۱۶/۶^{b}	۰۰/۰^{b}	۰۰/۰^{b}
SEM		۱۴۷۲۱	۰	۶	۲۱۲۷۶	۲۹۰	۰
سطح معنی‌داری							
خطی		**	**	**	**	**	**
درجه دو		**	**	**	**	ns	**
۴۸	۰	۶۳/۰^{a}	۰۰/۰	۱۰/۰^{a}	۵۳/۴^{a}	۰۰/۰	۰۰/۰
	۱	۱۷/۰^{b}	۰۰/۰	۰۰/۰۸^{b}	۱۶/۷^{b}	۰۰/۰	۰۰/۰
	۲	۱۳/۴^{c}	۰۰/۰	۰۰/۰^{b}	۱۳/۴^{bc}	۰۰/۰	۰۰/۰
	۳	۱۰/۰^{c}	۰۰/۰	۰۰/۰^{b}	۱۰/۰^{c}	۰۰/۰	۰۰/۰
	۴	۱۰/۹^{c}	۰۰/۰	۰۰/۰^{b}	۱۰/۹^{c}	۰۰/۰	۰۰/۰
	۵	۱۰/۰^{c}	۰۰/۰	۰۰/۰^{b}	۱۰/۰^{c}	۰۰/۰	۰۰/۰
SEM		۱۵۰۱۲	۶/۳	۲۹۳	۱۹۲۴۵	۰۰/۰	۰۰/۰
سطح معنی‌داری							
خطی		**	ns	**	**	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
درجه دو		**	ns	**	**	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰

GE0: جیره پایه بدون عصاره، GE1: جیره پایه بعلاوه ۱۲ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE2: جیره پایه بعلاوه ۲۴ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE3: جیره پایه بعلاوه ۳۶ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE4: جیره پایه بعلاوه ۴۸ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، GE5: جیره پایه بعلاوه ۶۰ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح، حروف لاتین غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P < ۰/۰۵، P < ۰/۰۱). ns: عدم معنی‌داری.

نتیجه‌گیری

افزودن عصاره تفاله انگور، نسبت استات به پروپیونات، تولید آمونیاک، جمعیت پروتوزوآ و تجزیه شکمبه‌ای پروتئین را کاهش داد. البته قابلیت هضم پروتئین تا مقدار ۳۶ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح کاهش نشان نداد اما افزودن سطوح بیشتر سبب کاهش قابلیت‌هضم گردید. قابلیت‌هضم پروتئین عبوری با افزایش سطح عصاره تفاله انگور افزایش یافت. این مطالعه نشان داد که تا مقدار ۳۶ میکرولیتر عصاره به ازای ۵۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح می‌توان در تاثیر منفی بر قابلیت‌هضم استفاده کرد. اگرچه انجام مطالعاتی بر روی دام زنده جهت دستیابی به تاثیر استفاده از عصاره تفاله انگور بر بازده کاربرد نیتروژن، مورد نیاز است.

پاورقی‌ها

1- Entodiniinae

2- Isotricha

3- Dasytricha

4- Diplodiniinae

5- Ophrioscolecinae

6- Folin Ciocalteau

7- Rhodanine

منابع

نوریان، ا. و روزبهان، ی. (۱۳۹۱). تاثیر عصاره گل گاوزبان بر تخمیر شکمبه‌ای، جمعیت پروتوزوآیی‌وکاهش تولید متان به روش برون‌تنی. مجله علوم دامی ایران. دوره ۴۳، شماره ۲: ص ۲۸۷-۲۹۶.

Abarghuei, M.J., Rouzbehan, Y. and Alipour, D. (2010) The influence of the grape pomace on the ruminal parameters of sheep. *Livestock Science*, 132: 73–79.

Abarghuei, M.J., Rouzbehan, Y., Salem, A.Z.M. and Zamiri, M.J. (2013) Nutrient digestion, ruminal fermentation and performance of dairy cows fed pomegranate peel extract. *Livestock Science*, 157: 452–461.

Adams, L.S., Seeram, N.P., Aggarwal, B.B., Takada, Y., Sand, D. and 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.

Alipour, D. and Rouzbehan, Y. (2010) Effects of several levels of extracted tannin from grape pomace on intestinal digestibility of soybean meal. *Livestock Science*, 128: 87-91.

Alipour, D. and 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.

AOAC, (1990) Official Methods of Analysis, vol. I., 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

Benchaar, C., McAllister, T.A. and 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 extract. *Journal of Dairy Science*, 91: 4765–4777.

Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A. and Beauchemin, K.A. (2008b) A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145: 209–228.

Bickell, S.L., Durmic, Z., Blache, D., Vercoe, P.E. and Martin, G.B. (2010) Rethinking the management of health and reproduction in small ruminants. Updates on ruminant production and medicine. In: Wittwer, F.R.C., Contreras, H., Gallo, C., Kruze, J., Lanuza, F., Letelier, C., Monti, G., Noro, M. (Eds.), Proc. 26th World Buiatrics Congress, [Andros Impresoroes: Chile]. Santiago, Chile, pp. 317–325.

Broderick, G.A. and Kang, J.H. (1980) Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*, 63: 64-75.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C. (2006) Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89: 761–771.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C. (2005) Screening for the effects of natural plant extracts and secondary plant metabolites on rumen microbial fermentation in continuous cultture. *Animal Feed Science and Technology,* 123/124: 597–613.

Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L. and Ferret, A. (2007) Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science,* 90: 2580–2595.

Chiquette, J., Cheng, K.J., Rode, L.M. and 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.

Cortes, J.E., Morenob, B., Pabn, M.L., Avila, P., Kreuzerd, M., Hess, H.D. and Carulla, J.E. (2009) Effects of purified condensed tannins extracted from *Calliandra*, *Flemingia* and *Leucaena* on ruminal and postruminal degradation of soybean meal as estimated *in vitro*. *Animal Feed Science and* Technology, 151: 194–204.

Cottyn, B.G. and Boucque, C.V. (1968) Rapid method for the gas-chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 16: 105-107.

Dehority, B.A. (2003). Rumen Microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Dentinho, M.T.P., Moreira, O.C., Pereira, M.S. and Bessa, R.J.B. (2007) The use a tannin crude extract from Citrus ladanifer L. to protect soya-bean meal protein from degradation in the rumen. *Animal,* 1: 645–650.

Donovan, L.O. and Brooker, J.D. (2001) Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology,* 147: 1025–1033.

Driedger, A. and Hatfield, E.E. (1972) Influence of tannins on the nutritive value of soy bean meal for ruminants. *Journal of Animal Science,* 34: 465-468.

Durmic, Z. and Blache, D. (2012) Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Animal Feed Science and Technology,* 176: 150–162.

Frutos, P., Hervas, G., Giraldez, F.J., Fernadez, M. and Manteccon, A.R. (2000) Digestive utilization of quebracho-treated soya bean meal in sheep. *Journal of Agriculture Science,* 134: 101–108.

Frutos, P., Hervas, G., Giraldez, F.J. and Mantecn, 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 Agricultural Research,* 55: 1125–1132.

Getachew, G., Pittroff, W., Putnama, D.H., Dandekar, A., Goyal, S. and 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.

Goel, G., Puniya, A.K., Aguliar, C.N. and Singh, K. (2005) Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften,* 92: 497–503.

Hart, K.J., Yanez-Ruiz, D.R., Duval, S.M., McEwan, N.R. and Newbold, C.J. (2008) Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology,* 147: 8–35.

Hervas, G., Frutos, P., Serrano, E., Mantecon, A.R. and Giraldez, F.J. (2000) Effect of tannic acid on rumen degradation and intestinal digestion of treated soya bean meals in sheep. *Journal of Agricultural and Food Chemistry Cambridge,* 135: 305-310.

Hindrichsen, I.K., Osuji, P.O., Odenyo, A.A., Madsena, J. and Hvelplund, T. (2002) Effects of supplementation of a basal diet of maize stover with different amounts of *Leucaena diversifolia* on intake, digestibility, nitrogen metabolism and rumen parameters in sheep. *Animal Feed Science and Technology,* 98: 131–142.

Jiménez-Peralta, F.S., Salem, A.Z.M., Mejia-Hernández, P., González-Ronquillo, M., lbarrán-Portillo, B., Rojo-Rubio, R. and 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.

Jones, G.A., McAllister, T.A., Muir, A.D. and Cheng, K.J. (1994) Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop*) Condensed Tannins on Growth and Proteolysis by Four Strains of Ruminal Bacteria. *Applied and Enviromental Microbiology*, 60(4): 1374-1378.

Jones, W. and Mangan, J. (1977) Complexes of condensed tannins of sanfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) with fraction 1 leaf protein and submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28: 126–136.

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.

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.

Makkar, H.P.S., Sen, S., Blümmel, M., and Becker, K. (1998) Effects of fractions containing saponin from Yucca schidigera, Quillaja saponaria, and Acacia auriculo-formis on rumen fermentation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 4324–4328.

McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M. and Krause, D.O. (2001) Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 83–93.

Min, B.R., Attwood, G.T., Reilly, K., Sun, W., Peters, J.S., Barry, T.N. and McNabb, W.C. (2002) *Lotus corniculatus* condensed tannins decrease *in vivo* populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 911–921.

Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T. and McNabb, W.C. (2003) The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106: 3–19.

Mueller-Harvey, I. (2006) Review, Unraveling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 2010–2037.

Newbold, C.J., ElHassan, S.M., Wang, J., Ortega, M.E. and Wallace, R.J. (1997) Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *British Journal of Nutrition*, 78: 237–249.

Ngamsaeng, A. and Wanapat, M. (2006) Effects of mangosteen peel (*Garcinia mangostana*) supplementation on rumen ecology, microbial protein synthesis, digestibility and voluntary feed intake in beef steers. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5: 445-452.

NRC. (2001) Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl.Acad.Sci., Washington, DC.

Oh, H.K., Jones, M.B. and 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.

OJEU. (2003) Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition L268/236.

Oliveira, R.A., Narciso, C.D., Bisinotto, R.S., Perdomo, M.C., Ballou, M.A., Dreher, M. and Santos, J.E.P. (2010) Effects of feeding polyphenols from pomegranate extract on health. Growth, nutrient digestion, and immunocompetence of calves. *Journal of Dairy Science*, 93: 4280–4291.

Patra, A.K., Kamra, D.N. and 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.

Robertson, J.B. and Van Soest., P.J. (1981) The detergent system of analysis. In: James, W.P.T., Theander, O. (Eds.), The Analysis of Dietary Fibre in Food, vol. 158. Marcel Dekker, New York,NY, USA, Basel, Switzerland, Pp. 123 (Chapter 9).

Rochfort, S., Parker, A., Frank R. and Dunshea, F.R. (2008) Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry,* 69: 299–322.

SAS. (2002) SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0.SAS Institute, Cary, N.C. USA.956 pp.

Stürm, C.D., Tiemann, T.T., Lascano, C.E., Kreuzer, M. and Hess, H.D. (2007) Nutrient composition and *in vitro* ruminal fermentation of tropical legumes mixtures with contrasting tannin contents. *Animal Feed Science and Technology,* 138: 29–46.

Sliwiniski, B.J., Soliva, C.R., Machmuller, A. and Kreuzer, M. (2002) Efficacy of plant rich in secondary constituents modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology,* 101: 101-114.

Talebzadeh, R., Alipour, D., Saharkhiz, M.J., Azarfar, A. and Malecky, M. (2012) Effect of essential oils of *Zataria multiflora* on *in vitro* rumen fermentation, protozoal population, growth and enzyme activity of anaerobic fungus isolated from Mehraban sheep. *Animal Feed Science and Technology,* 172: 115-124.

Tamminga, S. and Hobson, P.N. (1996) A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. *Journal of Animal Science,*74; 3112–3124.

Tilley, J.M.A. and Terry, R.A. (1963) A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society,* 18; 104–111.

Tiemann, T.T., Cortes, J.E., Pabo, M.L., Hess, H.D., Kreuzer, M. and 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.

Vaithiyanathan, S., Bhatta, R., Mishra, A.S., Prasad, R., Verma, D.L. and Singh, N.P. (2006) Effect of feeding graded levels of *Prosopis cineraria* leaves on rumen ciliate protozoa, nitrogen balance and microbial protein supply in lambs and kids. *Animal Feed Science and Technology,* 133: 117-191.

Van Nevel, C.J. and Demeyer, D.I. (1988) Manipulation of rumen fermentation. Pages 387–443 in The Rumen Microbial Ecosystem.Elsevier Science Publishing, New York, NY.

Van Soest, P.J. (1994) Nutritional Ecology of the Ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. (1991) Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and nonstarch poly-saccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science,* 74: 3583–3597.

Williams, A.G. and Coleman, G.S. (1991) The Rumen Protozoa. Springer-Verlag New York Inc., New York.

Yanez Ruiz, D.R., Moumen, A., Martin Garcia, A.I. and 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.