مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۱, شماره ۴، ۱۳۸۹ (۴۰۳-۳۹۱)

اثر کاهش ترکیبات فنولیک با استفاده از فرآوری‌های مختلف بر ترکیبات شیمیایی و طبقه‌بندی پروتئین خام علوفه اسپرس به روش کیسه‌های نایلونی، CNCPS و AFRC

حامد خلیل‌وند بهروزیار[1]، مهدی دهقان بنادکی[2]* و کامران رضایزدی[3]
۱، ۲، ۳، دانشجوی دکتری، استادیار و دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۹/٤/۳ - تاریخ تصویب: ۸۹/۱۱/۲۰)

چکیده

این پژوهش بر اساس سیستم‌های رایج خوراکدهی نشخوارکنندگان، به بررسی تأثیر تانن‌های متراکم بر قابلیت دسترسی پروتئین خام علوفه اسپرس پرداخته است. فرآوری‌های مورد استفاده شامل پلی‌اتیلن گلیکول (وزن مولکولی ٦۰۰۰)، سدیم هیدروکسید، سدیم بیکربنات، پتاسیم پرمنگنات، خاکستر چوب، آب و اوره بود. توزیع پروتئین خام علوفه با استفاده از روش کیسه‌های نایلونی، سیستم پروتئین قابل متابولیسم و سیستم کربوهیدرات و پروتئین خالص کورنل (CNCPS) تعیین شد. کل ترکیبات فنولیک، کل تانن و تانن‌های متراکم علوفه شاهد به ترتیب ۳۹/٤، ۳۸/۵ و ۲۱/۳ گرم در کیلوگرم ماده‌خشک بود. در بین فرآوری‌های مختلف پلی اتیلن گلیکول و آب بیشترین تأثیر را در کاهش آنها داشتند. میزان تجزیه‌پذیری، تجزیه‌پذیری مؤثر و پروتئین قابل متابولیسم به‌صورت معنی‌داری (P<۰/۰۵) در اثر فرآوری افزایش یافت. کاهش تانن‌های متراکم در اثر فرآوری سبب کاهش پروتئین غیرقابل دسترس در سیستم CNCPS شده و قابلیت استفاده از پروتئین خام را افزایش داد. کاهش میزان تانن‌های متراکم در این آزمایش قادر به افزایش قابلیت استفاده از پروتئین علوفه بود. فرآوری با پلی اتیلن گلیکول، آب و خاکستر چوب بیشترین تأثیر را بر افزایش قابلیت دسترسی نیتروژن داشت. بین این روش‌ها، فرآوری با آب می‌تواند به‌دلیل عدم مصرف مواد شیمیایی، توجیه اقتصادی و سهولت استفاده، در دامداری‌های کشور دارای کابرد باشد.

واژه‌های کلیدی: تانن متراکم، فرآوری، پروتئین قابل متابولیسم، CNCPS.

مقدمه

علوفه اسپرس (*Onobrychis vicifolia*) متعلق به خانواده بقولات بوده و خصوصیات ویژه از جمله عدم ایجاد نفخ، قابلیت کشت در مناطق سنگلاخی، کوهپایه‌ای و خاک‌های آهکی (که امکان کشت یونجه در آن وجود ندارد)، مقاومت زیاد در برابر سرما، کم آبی وآفاتی مثل سرخرطومی (Ditterline & Cooper, 1975; Reid et al., 1974)، و قابلیت استفاده در سیستم‌های چرای کوتاه‌مدت (Pecetti et al., 2009) سبب افزایش توجه به کشت این گیاه شده است. میزان تانن‌های متراکم اسپرس بین ۲۵ تا ۱۱۳ گرم بر کیلوگرم ماده خشک (McMahon et al., 1999; Fraser et al., 2000; Frame, 2005; Griggs&Matches, 1991; Hoste et al., 2007a; Scharenberg et al.,2007b; Waghorn et al., 2005; Parker & Moss, 1981; Scharenberg et al., 1987)، و میزان پروتئین خام آن بین ۱۰۲ تا ۲۸۵

* نویسنده مسئول: مهدی دهقان بنادکی تلفن: ۰۹۱۲-۲۶۰۸۰۳۱ E-mail: dehghan@can.ut.ac.ir

گرم در کیلوگرم ماده خشک (Scharenberg et al., 2007b; McMahon et al., 1999; Krueger et al., 1999) گزارش شده است. نتیجه پژوهش‌ها در ارتباط با تأثیر تانن‌های متراکم بر خصوصیات تغذیه‌ای اسپرس با هم متفاوت بوده است. در برخی پژوهش‌ها (Fraser et al., 2000; Scharenberg et al., 2007a) وجود تانن‌های متراکم در اسپرس مصرفی، سبب ایجاد تعادل منفی نیتروژن در حیوان شده و حتی در آزمایش انجام شده توسط Scharenberg et al. (2007b) استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول برای غیرفعال کردن تانن‌های اسپرس، قادر به برطرف کردن تعادل منفی نیتروژن نبود. درمقابل نتایج برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که جذب خالص روده‌ای اسیدهای‌آمینه در دام‌های مصرف کننده‌ی اسپرس نسبت به دام‌های مصرف کننده‌ی علوفه‌ی یونجه با نیتروژن یکسان، ۵۰ درصد بهبود یافته است (Waghorn et al., 1987; Thomson et al., 1971). در تازه‌ترین تحقیقات در این‌باره مشخص شده است که تانن‌های متراکم اسپرس تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای الیاف، پروتئین‌خام غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه را کاهش می‌دهند (Khiaosa-Ard et al., 2009). در مقابل وجود غلظت‌های متوسط تانن‌های متراکم (۴۵-۲۰ گرم بر کیلوگرم ماده‌خشک) در برخی مطالعات، عاملی مؤثر در جهت افزایش کارایی استفاده از پروتئین خوراک بوده است (Min et al., 2003). به استثنای نتایج پژوهش‌های ذکر شده در ارتباط با ارزش غذایی علوفه اسپرس و تأثیر فراوری با پلی‌اتیلن گلیکول بر آن، هیچ گزارشی در ارتباط با تأثیر فرآوری‌های مختلف غیرفعال کننده تانن بر ارزش غذایی و طبقه بندی پروتئین علوفه اسپرس در سیستم‌های مختلف وجود ندارد. با توجه به نبود اطلاعات دقیق در ارتباط با ارزش غذایی علوفه اسپرس تولیدی در کشور، به‌ویژه در ارتباط با طبقه‌بندی پروتئین خام در سیستم‌های مختلف تغذیه‌ای نشخوارکنندگان، اهمیت استفاده بهینه از پروتئین در جیره نشخوارکنندگان و نبود اطلاعات در مورد اثر فرآوری‌های مختلف بر پروتئین این علوفه، پژوهش حاضر به‌منظور ارزیابی اثر فرآوری علوفه اسپرس بر ترکیب شیمیایی، قابلیت دسترسی و طبقه‌بندی پروتئین در سیستم‌های تغذیه‌ای نشخوارکنندگان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

علوفه مورد استفاده و روش فرآوری

علوفه مورد آزمایش در سال ۱۳۸۶ در مرحله ۵۰ درصد گلدهی درچین دوم از مزارع شهرستان فریدن استان اصفهان برداشت، خشک و بسته‌بندی شد. نمونه مورد نیاز جهت انجام فرآوری‌ها با نمونه‌گیری تصادفی از حداقل ۳۰ بسته علوفه (یک کیلوگرم از بالا، پایین و وسط بسته‌ها) تهیه شده و به قطعات ۳ تا ۵ سانتی‌متر خرد گردید. برای انجام هر کدام از فرآوری‌ها از دو کیلوگرم علوفه استفاده شد. بمنظور فرآوری علوفه از محلول ۰/۰۵ مولار سدیم هیدروکسید، محلول ۰/۱ مولار سدیم بیکربنات، محلول ۰/۰۳ مولار پتاسیم پرمنگنات (Makkar & Singh, 1992b)، محلول خاکستر چوب (۱۸۰ گرم خاکستر چوب به ازای هر کیلوگرم ماده خشک علوفه) (Ben Salem et al., 2005) و آب به نسبت حجم محلول به وزن ماده خشک علوفه ۴ به ۱ (به‌مدت۲۰ دقیقه، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، به همراه هم زدن یکنواخت) استفاده شد.

برای فرآوری علوفه با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)، از ۵۰ گرم PEG با وزن مولکولی ۶۰۰۰ به ازای هر کیلوگرم ماده خشک علوفه، با نسبت حجم محلول به وزن علوفه ۱ به ۱ (به مدت یک شبانه‌روز) استفاده شد. محلول مورد نظر تهیه شده و به صورت یکنواخت بر روی علوفه اسپری شد (Priolo et al., 2000). برای فرآوری علوفه با اوره، محلول ۲ گرم اوره به ازای هر کیلوگرم ماده خشک علوفه با نسبت حجم محلول به وزن ماده خشک ۱ به ۱ (Ben Salem et al., 2005) تهیه و به صورت یکنواخت بر روی علوفه خرد شده اسپری شد و بلافاصله علوفه به مدت یک هفته با استفاده از کیسه‌های نایلونی ضخیم، به صورت فشرده و تحت شرایط بی‌هوازی قرار گرفت. پس از طی دوره زمانی فوق، علوفه‌های فرآوری شده به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه با دمای ۴۰ سانتی‌گراد خشک شدند. نمونه‌ها با استفاده از آسیاب چکشی با الک‌های دارای قطر منافذ ۲، ۱ و ۰/۵ میلی‌متر به ترتیب برای انجام آزمایش‌های تجزیه‌پذیری، انجام آنالیزهای شیمیایی و

اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک آسیاب شد. در همه مراحل فرآوری و آسیاب کردن از بالارفتن دما به بیش از ۴۰ درجه سانتی گراد جلوگیری به عمل آمد.

تجزیه ترکیبات شیمیایی

مقدار ماده خشک با قراردادن نمونه‌ها در آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت ([AOAC, 2000], ID 930.15)، نیتروژن موجود در نمونه‌ها و باقیمانده‌های تجزیه‌پذیری، بخش‌های مختلف دیواره‌سلولی و سیستم کربوهیدرات و پروتئین خالص کورنل با استفاده از دستگاه کجلدال (Kjeldahl method, Kjeltec 1030 Autoanalyzer, Foss Tecator AB, Hogans, Denmark) به روش ([AOAC, 2000], ID 990.06)، و دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی‌سلولز با روش Van Soest et al. (1991) بدون استفاده از سدیم سولفیت و با استفاده از دستگاه اتوماتیک فایبرتک (Fibertech Foss Tecator 1010 automated apparatus) تعیین گردید. کل ترکیبات فنولیک، کل تانن و تانن‌های متراکم قابل استخراج نمونه‌ها قبل و پس از فرآوری با استفاده از روش Makkar (2000) و پس از استخراج ترکیبات فنولیک با استفاده از محلول استون ۷۰درصد از نمونه های ریز آسیاب شده و به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از حمام آبی اولتراسونیک به قدرت ۳۵ کیلوهرتز، به‌ترتیب با استفاده از واکنش‌گر فولین- سیوکالتو[1]، پلی‌وینیل‌پلی پیرولیدون و روش بوتانول- اسیدکلریدریک تعیین شد. عصاره استخراج شده در زمان نمونه‌برداری برای انجام آنالیزها تا پایان مراحل اندازه‌گیری در یخ قرار داده شد. کلیه تجزیه‌های شیمیایی در سه تکرار و تعیین میزان ترکیبات فنولیک در ده تکرار انجام شد.

تجزیه‌پذیری با روش کیسه‌های نایلونی و پروتئین قابل متابولیسم

مقادیر تجزیه‌پذیری با استفاده از ۳ رأس گاو شیری هلشتاین غیر شیرده چند بار زایش مجهز به فیستولای شکمبه‌ای، با میانگین وزنی ۲۰±۶۸۰ کیلوگرم تعیین شد. خوراک حیوانات مورد آزمایش به روش پیشنهادی AFRC (1992) با نسبت علوفه به کنسانتره برابر با ۶۰:۴۰ با استفاده از نرم‌افزار CNCPS-V5، توسط دستگاه خوراک ساز اتوماتیک تهیه شد. خوراک به میزان ۱۰ درصد بالاتر از سطح نگهداری در ۲ وعده یکسان در ساعات ۸ صبح و ۱۸ عصر به حیوانات داده شد (جدول ۱). حیوانات در جایگاه‌های انفرادی نگهداری شده و به آب و بلوک‌های لیسیدنی مواد معدنی دسترسی آزاد داشتند. ۱۵ روز قبل از شروع آزمایش به عنوان دوره عادت‌دهی و ۳ روز بین تعیین تجزیه‌پذیری تیمارهای مختلف برای استراحت حیوان و اطمینان از شرایط مناسب شکمبه در نظر گرفته شد.

جدول ۱- ترکیب جیره غذایی حیوانات فیستولادار جهت تعیین تجزیه‌پذیری پروتئین خام علوفه اسپرس (گرم بر کیلوگرم ماده خشک)

ماده خوراکی	مقدار	ماده خوراکی	مقدار
یونجه خشک	۲۱۷/۸	سبوس گندم	۴۵/۳
ذرت سیلو شده	۲۴۹/۹	سبوس برنج	۲۹/۵
کاه گندم	۸۷/۳	سدیم بیکربنات	۳/۲
تفاله چغندر	۲۸/۴	کلسیم کربنات	۴/۹
دانه جو	۹۹/۸	دی‌کلسیم فسفات	۰/۸
دانه ذرت	۲۸/۴	مکمل مواد معدنی- ویتامینی*	۳/۹
دانه گندم	۴۸/۸	نمک سفید	۱/۶
کنجاله کلزا	۶۹/۲		
کنجاله سویا	۳۶/۳		

* هر کیلوگرم مکمل شامل: ۵۰۰۰۰۰IU ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ IU ویتامین D3، ۱۰۰ mg ویتامین E، Ca۱۹۰۰۰۰ mg، P ۹۰۰۰۰ mg، Na۵۰۰۰۰ mg، Mg۱۹۰۰۰ mg، Fe۳۰۰۰ mg، Cu۳۰۰ mg، Mn۲۰۰۰ mg، Zn۳۰۰۰ mg، Co۱۰۰ mg، I۱۰۰ mg، Se۱ mg و ۳۰۰۰ mg آنتی‌اکسیدان (B.H.T)

تجزیه‌پذیری پروتئین خام بر اساس روش استاندارد شده Vanzant et al. (1998) با استفاده از کیسه‌های پلی‌استری با ابعاد ۱۰×۲۰ سانتی‌متر و با قطر منافذ ۵۰ میکرومتر اندازه‌گیری شد. پس از الک کردن با الک با اندازه منافذ ۵۰ میکرون، ۵ گرم از نمونه علوفه آسیاب شده (با قطر توری ۲ میلی‌متر) در داخل کیسه‌های نایلونی ریخته شد تا نسبت اندازه نمونه به سطح کیسه‌ها، برابر با ۱۲/۵ میلی‌گرم به ازای هر سانتی‌مترمربع شود (Vanzant et al., 1998). تمامی کیسه‌ها بلافاصله پس از خوراکدهی صبح در شکمبه قرار گرفت. زمان‌های خروج کیسه‌ها از شکمبه ۴، ۸،

1. Folin-ciocalteu

۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بود و دو کیسه برای هر زمان انکوباسیون در شکمبه هر گاو قرار گرفت. کیسه‌ها بلافاصله پس از خارج شدن از شکمبه در آب سرد قرار داده شد و با دست به روش پیشنهادی Coblentz et al. (1997) به مدت ۲۰ دقیقه و تا صاف شدن آب خروجی از سطل شستشو شد. برای تعیین تجزیه-پذیری در زمان صفر، کیسه‌ها بدون انکوباسیون در شکمبه با استفاده از آب ۳۹ درجه سانتی‌گراد، همانند کیسه‌های خارج شده از شکمبه شسته شدند. کیسه‌ها پس از شستشو به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. درصد تجزیه‌پذیری، تجزیه‌پذیری مؤثر و فراسنجه‌های a، b و c با استفاده ازمعادلات غیرخطی Orskov & McDonald (1979) و McDonald (1981) با استفاده از نرم‌افزارNeway تعیین شد.

معادلات AFRC (1995) برای تعیین مقادیر پروتئین قابل تجزیه سریع در شکمبه (QDP)، پروتئین قابل تجزیه آهسته در شکمبه (SDP)، پروتئین قابل تجزیه مؤثر در شکمبه (ERDP)، کل پروتئین قابل تجزیه در شکمبه (RDP)، پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه (UDP)، پروتئین غیرقابل تجزیه قابل هضم (DUP) و پروتئین قابل متابولیسم (MP) مورد استفاده قرار گرفت.

بخش‌های پروتئینی بر اساس سیستم کربوهیدرات و پروتئین خالص کورنل

برای تعیین بخش‌های مختلف نیتروژن علوفه شاهد و فرآوری شده از نمونه‌های خشک و آسیاب شده با الک ۰/۵ میلی‌متر، بر اساس روش استاندارد شده Licitra et al. (1996)، با ۳ تکرار، استفاده شد. برای تعیین بخش نیتروژن غیرپروتئینی (A) از تری‌کلرواستیک اسید (محلول ۱۰درصد وزن به حجم) استفاده شد. بافر بورات فسفات با pH ۶/۸-۶/۷ و محلول ۱۰ درصد سدیم آزید، به‌منظور تعیین میزان پروتئین محلول در بافر مورد استفاده قرار گرفت. برای برآورد مقادیر بخش B3 و C از تعیین نیتروژن بقایای تعیین دیواره سلولی (NDIN) و دیواره سلولی منهای همی‌سلولز (ADIN) با دستگاه فایبرتک استفاده شد. نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی به‌عنوان بخش C، و تفاوت بین NDIN و ADIN به‌عنوان بخش B3 درنظر گرفته شد. بخش B2 پروتئین به روش تفاوت محاسبه شد. کاغذ صافی واتمن کد ۵۴۱ برای فیلتراسیون مورد استفاده قرار گرفت و نتایج بصورت درصد پروتئین خام گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری

طرح آزمایشی مورد استفاده در تعیین میزان تجزیه‌پذیری (مؤلفه‌های تجزیه‌پذیری) پروتئین‌خام، طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۸ تیمار (۷ علوفه فرآوری شده و علوفه شاهد) و ۳ حیوان به عنوان بلوک و ۶ تکرار برای هر زمان انکوباسیون بود (مدل شماره ۱). بمنظور آنالیز آماری داده‌های کینتیک تجزیه‌پذیری پروتئین خام و تأثیر فرآوری بر آن از رویه MIXED به روش داده‌های تکرار شونده و اثر تصادفی حیوان استفاده شد (مدل شماره ۲). برای انجام مقایسات آماری در ارتباط با تجزیه شیمیایی، میزان ترکیبات فنولیک و تأثیر فرآوری بر کاهش آنها، سیستم CNCPS و پروتئین متابولیسمی از طرح کاملا تصادفی با ۸ تیمار و ۳ تکرار استفاده شد (مدل شماره ۳). رویه مدل خطی تعمیم یافته (GLM) نرم‌افزار آماری SAS9.1 (2002) برای انجام تجزیه و تحلیل آماری و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت. رویه CORR برای محاسبه ضرایب همبستگی پیرسون مورد استفاده قرار گرفت.

مدل شماره ۱)

$$Y_{ij}= \mu + T_i+ R_j + e_{ij}$$

مدل شماره ۲)

$$Y_{ijk}= \mu +A_i+T_j+t_k+ (AT)_{ij}+(Tt)_{jk}+e_{ijk}$$

مدل شماره ۳)

$$Y_i= \mu + T_i + e_i$$

Y: مقدار هر مشاهده

μ: میانگین کل

T: نوع فرآوری

R: اثر حیوان (بلوک)

A: اثر تصادفی حیوان

t: اثر زمان اندازه‌گیری

(AT): اثر متقابل حیوان و تیمار

(Tt): اثر متقابل تیمار و زمان اندازه گیری

e: اثر اشتباه آزمایشی

نتایج و بحث

جدول ۲ تأثیر فرآوری‌ها بر ترکیب شیمیایی گیاه را نشان می‌دهد. میزان پروتئین خام علوفه شاهد ۱۲۱/۳ گرم بر کیلوگرم ماده خشک بود که در دامنه گزارش شده توسط Scharenberg et al. (2007a) قرار داشت (۱۰۲ تا ۲۸۵ گرم بر کیلوگرم ماده خشک) همان‌گونه که در جدول ۲ ملاحظه می‌شود، فرآوری علوفه با مواد اکسیدکننده، ترکیبات قلیایی، آب و پلی اتیلن گلیکول سبب ازدست رفتن بخشی از ماده خشک علوفه و تغلیظ و افزایش پروتئین خام شدند که نتایج بدست آمده در این پژوهش با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد (Ben Salem et al., 2005; Makkar& Singh, 1992b). افزایش بیشتر غلظت پروتئین خام در علوفه فرآوری شده با اوره، به سبب افزوده شدن نیتروژن غیرپروتئینی حاصل از آزاد سازی آمونیاک طی مراحل بی‌هوازی فرآوری بوده و با نتایج مطالعات Ben Salem et al. (2005) مطابقت دارد. تمامی فرآوری‌ها سبب کاهش نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی و در نتیجه افزایش نیتروژن قابل دسترس علوفه شد. به طوری که بیشترین تأثیر مربوط به فرآوری با آب و پلی‌اتیلن گلیکول و سپس خاکستر چوب بود. افزایش میزان نیتروژن قابل دسترس در اثر استفاده از ترکیبات غیرفعال‌کننده تانن‌های متراکم و کاهش میزان نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی و خنثی را می‌توان به دلیل کاهش اتصالات تانن-پروتئین دانست (Sniffen et al., 1992). این پژوهشگران نیتروژن متصل به تانن را جزو نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی و غیرقابل دسترس دانسته‌اند. این نتایج با نتایج مربوط به تأثیر فرآوری‌ها بر میزان غیرفعال شدن ترکیبات فنولیک علوفه (جدول ۴) مطابقت دارد.

افزایش میزان دیواره سلولی بدون خاکستر و کاهش ماده آلی در اثر استفاده از خاکستر چوب با آزمایش Ben Salem et al. (2005) مطابقت دارد. بر خلاف نتایج Ben Salem et al. (2005) افزودن اوره تحت شرایط بی‌هوازی دیواره سلولی بدون خاکستر را کاهش داد. با توجه به مدت زمان کم سیلو کردن علوفه همراه با اوره در این آزمایش نمی‌توان این امر را به تجزیه همی‌سلولز در سیلو (Bagheripour et al., 2008) در اثر کاهش اتصالات لیگنین و کربوهیدرات‌های دیواره سلولی (Makkar, 2003)، نسبت داد. بخشی از این کاهش را می‌توان به کاهش پروتئین نامحلول در شوینده اسیدی (جدول ۲) در اثر غیرفعال شدن تانن‌های متراکم نسبت داد.

کل ترکیبات فنولیک، کل تانن و تانن‌های متراکم قابل استخراج علوفه اسپرس به ترتیب برابر با ۳۹/۴، ۳۸/۵ و ۲۱/۳ گرم در کیلوگرم ماده خشک بود. حدود ۹۸ درصد از کل ترکیبات فنولیک در این علوفه از نوع تانن بود. میزان تانن‌های متراکم اسپرس در پژوهش‌های مختلف بین ۲۵ تا ۱۱۳ گرم در کیلوگرم ماده خشک متغیر بوده است (McMahon et al., 1999; Hoste et al., 2005; Aufrer're et al. (2008) میزان تانن متراکم علوفه خشک اسپرس را ۶ گرم در کیلوگرم ماده خشک گزارش کرده است. در آزمایش Scharenberg et al. (2007b) بخش زیادی از تانن‌های متراکم در بخش‌های متصل به پروتئین‌ها و دیواره سلولی قرار داشته است. به‌علاوه Terrill et al. (1992) نشان دادند در لگوم‌های

جدول ۲- اثر فرآوری بر ترکیب شیمیایی علوفه اسپرس خشک (بر حسب گرم در کیلوگرم ماده خشک)

تیمار	DM	OM	CP	NDF	ADF	NDFOM	NDIN	ADIN	AN
شاهد	۹۴۰/۴ ^{b}	۹۳۴/۳^{b}	۱۲۱/۳ ^{f}	۴۷۸/۷ ^{e}	۴۳۳/۳^{a}	۴۶۴/۶^{e}	۸/۷ ^{a}	۶/۰ ^{a}	۱۳/۴ ^{g}
آب	۹۱۸/۴ ^{e}	۹۳۳/۲^{b}	۱۲۹/۴^{d}	۴۹۶/۰ ^{c}	۴۲۲/۹^{b}	۴۸۶/۳^{bc}	۵/۷ ^{e}	۲/۱ ^{f}	۱۸/۶ ^{d}
پلی اتیلن گلیکول	۹۲۷/۲ ^{c}	۹۲۹/۱^{c}	۱۲۴/۵ ^{e}	۴۶۱/۰^{f}	۳۸۳/۲ ^{g}	۴۵۰/۴^{f}	۵/۱ ^{f}	۲/۲ ^{f}	۱۷/۷ ^{e}
اوره	۹۰۹/۸ ^{g}	۹۱۹/۷^{d}	۱۶۱/۹ ^{a}	۴۵۷/۴^{f}	۴۱۳/۳ ^{d}	۴۴۳/۴^{g}	۷/۴ ^{b}	۵/۵ ^{b}	۲۰/۴ ^{a}
پتاسیم پرمنگنات	۹۴۸/۴ ^{a}	۹۱۷/۳^{e}	۱۳۹/۶ ^{b}	۵۱۸/۸ ^{a}	۴۲۳/۱ ^{b}	۵۰۱/۲^{a}	۷/۳ ^{b}	۳/۴ ^{d}	۱۸/۹ ^{c}
خاکستر چوب	۹۰۷/۹ ^{g}	۸۷۶/۴^{h}	۱۳۸/۲ ^{bc}	۴۹۲/۱ ^{d}	۴۰۵/۴ ^{f}	۴۷۸/۹^{d}	۶/۲ ^{d}	۲/۶ ^{e}	۱۹/۶ ^{b}
سدیم هیدروکسید	۹۱۶/۵ ^{f}	۹۱۱/۳^{g}	۱۲۲/۴ ^{ef}	۴۹۱/۹ ^{d}	۴۰۹/۲ ^{e}	۴۸۲/۹^{c}	۸/۸ ^{a}	۴/۱ ^{c}	۱۵/۵ ^{f}
سدیم بیکربنات	۹۲۵/۷ ^{d}	۹۱۳/۸^{f}	۱۳۶/۰ ^{c}	۵۰۲/۰ ^{b}	۴۱۸/۷ ^{c}	۴۸۷/۲^{b}	۷/۰ ^{c}	۳/۳ ^{d}	۱۸/۴ ^{d}
SEM	۰/۱۱	۰/۰۹	۰/۰۸	۰/۱۱	۰/۰۹	۰/۰۷	۰/۰۰۸	۰/۰۰۶	۰/۰۱

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح آماری $p<۰/۰۵$ می باشند.

مناطق معتدله که حاوی مقادیر کمی تانن می‌باشند، تانن‌های متراکم قابل استخراج فقط ۳۰ تا ۳۵ درصد کل تانن‌های متراکم را تشکیل داده و بقیه به صورت ترکیب شده با الیاف و پروتئین‌ها دیده می‌شوند. لذا ممکن است علت پایین بودن غلظت تانن‌های متراکم در این مطالعه، عدم اندازه‌گیری بخش متصل به دیواره سلولی و پروتئین خام باشد. در این مطالعه تانن‌های متراکم ۵۵ درصد از کل ترکیبات تانن‌دار و ۵۳ درصد از کل ترکیبات فنولیک علوفه را تشکیل داده و با نتایج McLeod (1974) که بخش اعظم تانن‌های اسپرس را از نوع تانن‌های متراکم عنوان کرده‌اند، مطابقت دارد.

فرآوری سبب کاهش قابل ملاحظه میزان ترکیبات فنولیک مختلف شد (جدول۳). فرآوری با پلی‌اتیلن گلیکول دارای بیشترین تأثیر در غیرفعال کردن تانن‌های متراکم بود. که میزان غیرفعال‌سازی در اثر استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول با نتایج Mlamboa et al. (2008) مطابقت داشت. پلی اتیلن گلیکول قادر است با اتصال به ترکیبات فنولیک از ایجاد ترکیبات مقاوم به هضم تانن-پروتئین جلوگیری نماید. در بین اوزان مولکولی مختلف، پلی‌اتیلن گلیکول با وزن مولکولی ۶۰۰۰ دارای بیشترین کارایی در اتصال به تانن‌ها عنوان شده است (Makkar, 2003). سدیم هیدروکسید با وجود کاهش ۹۳/۷ درصدی تانن‌های متراکم قابل استخراج دارای توانایی کمتری برای کاهش کل ترکیبات فنولیک و کل تانن بود. به‌علاوه باوجود کاهش بسیار زیاد تانن‌های متراکم، میزان نیتروژن نامحلول در شوینده خنثی نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. یکی از مشکلات در ارتباط با فرآوری مواد تانن‌دار با مواد قلیایی، عدم استخراج کامل تانن‌ها توسط حلال‌های مورد استفاده جهت استخراج و اندازه‌گیری تانن‌ها و در نتیجه برآورد کمتر ار حد تانن‌های متراکم موجود در مواد فرآوری شده با مواد قلیایی است (Makkar & Becker, 1996). Makkar& Singh (1992b) علت کاهش میزان تانن‌ها در اثر استفاده از مواد قلیایی را اکسیداسیون ترکیبات فنولیک به وسیله اکسیژن موجود در جو در مقادیر بالای pH بیان کرده‌اند. در این میان می‌توان خصوصیات ساختاری متفاوت تانن‌های متراکم از منشأ مختلف را عاملی اساسی در پاسخ به مواد قلیایی و اکسیدکننده دانست. میزان فعالیت اسیدی حلقه بنزنی در تانن‌های متراکم از منشأهای مختلف ممکن است متفاوت بوده و عامل اصلی تفاوت‌های مشاهده شده بین پاسخ گیاهان مختلف به این مواد باشد (Vermeris& Nicholson, 2006). مطالعه‌ای در زمینه استفاده از ترکیبات قلیایی و اکسیدکننده بر فعالیت و میزان تانن‌های متراکم اسپرس گزارش نشده است.

جدول ۳- میزان ترکیبات فنولیک، کل تانن و تانن متراکم علوفه اسپرس شاهد و فرآوری شده (گرم بر کیلوگرم ماده خشک)

	کل ترکیبات فنولی	کل تانن	تانن متراکم
شاهد	۳۹/۴ ^{a}	۳۸/۵ ^{a}	۲۱/۳ ^{a}
آب	۹/۷ ^{g}	۹/۰ ^{f}	۱/۷ ^{b}
پلی اتیلن گلیکول	۱۳/۲ ^{e}	۱۲/۷ ^{d}	۰/۳ ^{d}
اوره	۱۵/۶ ^{d}	۱۵/۶ ^{c}	۱/۶ ^{bc}
پتاسیم پرمنگنات	۱۱/۱ ^{f}	۱۱/۴ ^{e}	۱/۶ ^{bc}
خاکستر چوب	۱۶/۸ ^{c}	۱۵/۶ ^{c}	۱/۸ ^{b}
سدیم هیدروکسید	۱۸/۱ ^{b}	۱۷/۳ ^{b}	۱/۳ ^{c}
سدیم بیکربنات	۱۷/۸ ^{b}	۱۷/۳ ^{b}	۱/۷ ^{b}
SEM	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۰۵

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح آماری p<۰/۰۵ می‌باشند.

Makkar (2003)، pH محلول خاکستر چوب را عامل مهمی در تعیین کارائی خاکستر چوب برای غیرفعال کردن تانن‌ها عنوان کرده و تفاوت‌های مشاهده شده بین خاکستر تهیه شده از درختان مختلف را به این امر نسبت داده است. میزان pH محلول خاکستر چوب مورد استفاده در این آزمایش ۱۲/۱۳ بود. در این آزمایش بر خلاف آزمایش Ben Salem et al. (2005) که خاکستر چوب کارایی بهتری نسبت به آب در غیرفعال کردن مواد فنولیک داشت، میزان غیرفعال‌سازی تانن‌های متراکم علوفه اسپرس در اثر فرآوری با آب و خاکستر چوب اختلاف معنی‌داری با هم نداشته و در ارتباط با کل تانن و کل ترکیبات فنولیک فرآوری با آب به ترتیب با ۷۶/۵۷ و ۷۵/۴۰ درصد غیرفعال‌سازی در مقابل ۵۹/۵۷ و ۵۷/۴۱ درصد غیرفعال‌سازی در اثر فرآوری با خاکستر چوب به طورمعنی‌داری (P<۰/۰۵) عملکرد بهتری داشت.

در آزمایش حاضر میزان غیرفعال‌سازی تانن‌های متراکم در اثر افزودن اوره ۹۲/۵۳ درصد بود. عامل اصلی تاثیر گذار بر ترکیبات فنولیک و غیرفعال کردن آنها را آزاد شدن آمونیاک طی مراحل بی‌هوازی فرآوری است که با افزایش pH سبب غیرفعال شدن ترکیبات فنولیک می شود.

جدول ۴ روند و مؤلفه‌های تجزیه‌پذیری پروتئین خام را نشان می‌دهد. کلیه فرآوری‌های انجام شده به منظور غیرفعال کردن تانن‌های متراکم سبب افزایش حد نهایی تجزیه‌پذیری پروتئین خام در مقایسه با علوفه شاهد شدند. در این میان پلی‌اتیلن گلیکول و اوره سبب افزایش بیشتری در میزان تجزیه‌پذیری در اولین ساعات انکوباسیون در مقایسه با سایر فرآوری‌ها شدند. درارتباط با اوره، احتمالاً میزان بیشتر نیتروژن غیرپروتئینی در اثر آزادسازی آمونیاک در طی مراحل فرآوری سبب این امر بوده و به نظر نمی‌رسد بخش زیادی از این میزان افزایش یافته در مقایسه با شاهد، مربوط به آزادسازی پروتئین از کمپلکس‌های پروتئین-تانن باشد. در مجموع کاهش بیشتر ترکیبات فنولیک توسط پلی‌اتیلن گلیکول را می‌توان دلیل اصلی بالاتر بودن مقادیر تجزیه‌پذیری پروتئین خام در اثر فرآوری با پلی‌اتیلن گلیکول دانست. دلیل احتمالی افزایش تجزیه‌پذیری پروتئین در اثر فرآوری (بخصوص در ارتباط با پلی‌اتیلن گلیکول) را می‌توان افزایش جمعیت باکتری‌های پروتئولتیک (Jones et al., 1994; Min et al., 2002a) و جلوگیری از لیز شدن دیواره باکتری‌ها و ممانعت از ایجاد ترکیبات مقاوم تانن- باکتری و تانن- آنزیم (Jones et al., 1994) دانست. کلیه فرآوری‌ها سبب افزایش بخش پروتئین به سرعت قابل حل شده و بیشترین میزان بخش بالقوه قابل تجزیه و بیشترین سرعت تجزیه این بخش، مربوط به فرآوری با خاکستر چوب بود. بیشترین میزان تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین خام مربوط به علوفه فرآوری شده با پلی‌اتیلن‌گلیکول بود و پتاسیم پرمنگنات کمترین اثر را داشت. به هر حال، کلیه فرآوری‌ها سبب افزایش میزان تجزیه‌پذیری مؤثر در مقایسه با علوفه شاهد شدند. کارائی کمتر سدیم بی‌کربنات در افزایش تجزیه‌پذیری پروتئین خام، می‌تواند به دلیل دناتوره شدن پروتئین‌ها در اثر استفاده از ترکیبات قلیایی باشد (Frensdorff et al., 1953).

جدول ۵ نتایج تجزیه واریانس مربوط به برآورد بخش‌های مختلف پروتئین خام علوفه شاهد و علوفه فرآوری شده بر اساس سیستم پروتئین قابل متابولیسم را نشان می‌دهد. کلیه فرآوری‌ها قادر به افزایش پروتئین قابل تجزیه سریع در این علوفه بودند (P<۰/۰۵)، با این

جدول ۴- کینتیک و فراسنجه‌های تجزیه پذیری پروتئین خام علوفه اسپرس شاهد و فرآوری شده

زمان انکوباسیون	شاهد	فرآوری آب	فرآوری پلی اتیلن گلیکول	اوره	پتاسیم پرمنگنات	خاکستر چوب	سدیم هیدروکسید	سدیم بیکربنات	SEM
۴	۲۴/۶۵ ^{e}	۴۳/۹۵ ^{bc}	۵۶/۴۴ ^{a}	۴۶/۹۱ ^{b}	۴۴/۶۰ ^{bc}	۳۶/۴۰ ^{d}	۴۴/۴۷ ^{bc}	۴۰/۴۶ ^{cd}	۱/۵۲
۸	۳۰/۲۹ ^{f}	۵۳/۹۴ ^{bc}	۶۵/۳۹ ^{a}	۵۶/۶۶ ^{b}	۴۸/۳۸ ^{de}	۵۱/۷۲ ^{cd}	۵۳/۶۴ ^{bc}	۴۷/۰۲ ^{e}	۱/۲۶
۱۲	۳۵/۰۴ ^{d}	۶۱/۵۹ ^{b}	۷۱/۸۱ ^{a}	۶۳/۴۶ ^{b}	۵۱/۶۵ ^{c}	۶۲/۰۹ ^{b}	۶۰/۷۴ ^{b}	۵۲/۲۹ ^{c}	۱/۳۱
۲۴	۴۵/۳۶ ^{d}	۷۵/۴۰ ^{b}	۸۲/۱۳ ^{a}	۷۴/۱۰ ^{b}	۵۹/۱۳ ^{c}	۷۷/۱۵ ^{b}	۷۳/۸۴ ^{b}	۶۲/۸۳ ^{c}	۱/۳۸
۴۸	۵۵/۶۳ ^{f}	۸۴/۶۳ ^{ab}	۸۷/۴۱ ^{a}	۷۹/۶۳ ^{c}	۶۷/۳۸ ^{e}	۸۳/۴۵ ^{b}	۸۲/۸۹ ^{bc}	۷۲/۰۴ ^{d}	۱/۱۳
۷۲	۵۹/۷۴ ^{f}	۸۶/۶۷ ^{ab}	۸۸/۱۵ ^{a}	۸۰/۶۳ ^{c}	۷۱/۱۲ ^{e}	۸۴/۱۱ ^{b}	۸۴/۹۴ ^{ab}	۷۵/۳۳ ^{d}	۱/۰۲
۹۶	۶۱/۴۹ ^{f}	۸۷/۱۵ ^{ab}	۸۸/۲۵ ^{a}	۸۰/۸۲ ^{c}	۷۲/۸۹ ^{e}	۸۴/۱۸ ^{b}	۸۵/۴۲ ^{ab}	۷۶/۶۷ ^{d}	۱/۰۴
فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری									
a (%)	۱۷/۰۶ ^{h}	۳۹/۵۳ ^{c}	۴۱/۸ ^{a}	۳۸/۱ ^{b}	۳۱/۷۸ ^{f}	۲۸/۶۱ ^{g}	۴۰/۰۴ ^{b}	۳۵/۴۶ ^{e}	
b (%)	۴۵/۹۲ ^{bcd}	۴۷/۷۸ ^{b}	۴۶/۴۷ ^{bc}	۴۲/۷۷ ^{cd}	۴۲/۹۵ ^{cd}	۵۵/۵۸ ^{a}	۴۵/۵۳ ^{bcd}	۴۲/۲۴ ^{d}	۱/۱۸
c (h^{-1})	۰/۰۴۱ ^{cd}	۰/۰۶۶ ^{bc}	۰/۰۸۲ ^{ab}	۰/۰۸۵ ^{ab}	۰/۰۳۴ ^{d}	۰/۰۹۷ ^{a}	۰/۰۶۳ ^{bc}	۰/۰۴۷ ^{dc}	۰/۰۳
P(k=۰/۰۲)	۴۷/۶۳ ^{d}	۷۴/۲۳ ^{b}	۷۹/۷۰ ^{a}	۷۱/۶۳ ^{b}	۶۲/۳۳ ^{c}	۷۲/۴۳ ^{b}	۷۲/۹۷ ^{b}	۶۴/۲۰ ^{c}	۰/۸۱
P(k=۰/۰۵)	۳۷/۸۷ ^{d}	۶۳/۳۳ ^{b}	۷۱/۷۳ ^{a}	۶۳/۱۳ ^{b}	۵۶/۰۳ ^{c}	۶۰/۹۷ ^{b}	۶۲/۵۷ ^{b}	۵۵/۱۰ ^{c}	۰/۹۶
P(k=۰/۰۸)	۳۳/۰۷ ^{e}	۵۷/۱۰ ^{b}	۶۶/۷۳ ^{a}	۵۷/۹ ^{b}	۵۳/۱۳ ^{d}	۵۳/۶۳ ^{cd}	۵۶/۶۳ ^{bc}	۵۰/۵۳ ^{d}	۱/۰۶

حروف غیر مشابه در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح آماری p<۰/۰۵ می باشند.

a: بخش محلول b: بخش بالقوه قابل تجزیه c: سرعت تجزیه بخش بالقوه قابل تجزیه k: نرخ عبور از شکمبه P : تجزیه پذیری مؤثر

حال فرآوری با پتاسیم‌پرمنگنات، سدیم بیکربنات و سدیم هیدروکسید قادر به افزایش بخش قابل تجزیه آهسته نسبت به علوفه شاهد نبودند (P>۰/۰۵). میزان پروتئین قابل تجزیه و پروتئین قابل تجزیه مؤثر در شکمبه در اثر کلیه فرآوری‌ها به صورت معنی‌داری افزایش یافت که در این میان پلی‌اتیلن گلیکول سبب بیشترین افزایش شد. غیرفعال شدن تانن‌ها و عدم وجود فرصت ایجاد ترکیبات مقاوم به تجزیه تانن- پروتئین، سبب افزایش بخش قابل تجزیه در شکمبه شده و میزان پروتئین غیرقابل تجزیه رسیده به بخش‌های پایین‌تر دستگاه گوارش (نسبتی از پروتئین خام علوفه) نسبت به علوفه شاهد کاهش یافت (جدول ۵).

جدول ۵- بخش‌های مختلف پروتئین خام علوفه اسپرس شاهد و فرآوری شده بر اساس سیستم پروتئین قابل متابولیسم (گرم بر کیلوگرم پروتئین خام)

تیمار	QDP	SDP	RDP	ERDP	UDP	DUP	MP	DUP/UDP
شاهد	۱۷۰/۶ ^{h}	۲۱۱/۵ ^{cd}	۳۸۲/۱ ^{e}	۳۴۸/۰ ^{e}	۶۱۷/۹ ^{a}	۲۷۷/۸ ^{b}	۴۹۹/۷ ^{d}	۴۴۹/۶ ^{c}
آب	۳۹۵/۳ ^{c}	۲۶۵/۳ ^{b}	۶۶۳/۹ ^{ab}	۵۸۱/۶ ^{ab}	۳۳۶/۱ ^{de}	۲۱۴/۲ ^{c}	۵۸۴/۹ ^{a}	۶۳۰/۴ ^{a}
اوره	۳۸۱/۰ ^{d}	۲۶۵/۰ ^{b}	۶۳۹/۳ ^{b}	۵۶۹/۸ ^{b}	۳۵۴/۰ ^{d}	۱۲۷/۵ ^{d}	۴۹۰/۷ ^{d}	۳۵۸/۲ ^{d}
پتاسیم پرمنگنات	۳۱۷/۸ ^{f}	۱۶۷/۲ ^{d}	۴۸۴/۹ ^{d}	۴۲۱/۴ ^{d}	۵۱۵/۱ ^{b}	۳۲۶/۶ ^{a}	۵۹۵/۱ ^{a}	۶۳۳/۳ ^{a}
پلی اتیلن گلیکول	۴۱۸/۰ ^{a}	۲۸۵/۳ ^{b}	۸۸۳/۲ ^{a}	۶۲۳/ ۹ ^{a}	۲۹۳/۴ ^{e}	۱۶۳/۸ ^{d}	۵۶۱/۶ ^{c}	۵۵۹/۴ ^{b}
خاکستر چوب	۲۸۶/۱ ^{g}	۳۶۵/۵ ^{a}	۷۰۷/۵ ^{b}	۵۹۴/۴ ^{ab}	۳۴۸/۴ ^{d}	۲۰۷/۷ ^{c}	۵۸۶/۶ ^{a}	۵۹۶/۰ ^{ab}
سدیم هیدروکسید	۴۰۰/۴ ^{b}	۲۵۲/۶ ^{bc}	۶۵۳/۰ ^{b}	۵۶۹/۷ ^{b}	۳۴۷/۰ ^{d}	۱۲۳/۹ ^{d}	۴۸۹/۰ ^{d}	۳۵۷/۷ ^{d}
سدیم بیکربنات	۳۵۴/۶ ^{e}	۱۹۷/۴ ^{d}	۵۵۱/۹ ^{c}	۴۸۱/۰ ^{c}	۴۴۸/۱ ^{c}	۲۶۶/۲ ^{b}	۵۷۳/۳ ^{b}	۵۹۳/۱ ^{ab}
SEM	۱۲/۱	۱۴/۴	۱۴/۹	۱۴/۳	۱۴/۶	۱۲/۹	۳/۸	۱۲/۹

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح آماری (p<۰/۰۵) می باشند.

برای محاسبه بخش SDP از نرخ عبور ۰/۰۵ استفاده شده است.

RDP : پروتئین قابل تجزیه در شکمبه

QDP: پروتئین به سرعت قابل تجزیه در شکمبه

ERDP : پروتئین قابل تجزیه ی مؤثردر شکمبه

SDP: پروتئین قابل تجزیه ی کند در شکمبه

DUP: پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه قابل هضم

UDP: پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه

MP: پروتئین قابل متابولیسم

میزان پروتئین غیرقابل تجزیه قابل هضم در روده (نسبتی از پروتئین خام علوفه) برای علوفه فرآوری شده با پتاسیم پرمنگنات در مقایسه با علوفه شاهد افزایش یافت ولی سایر فرآوری‌ها قادر به افزایش پروتئین قابل هضم غیرقابل تجزیه نبودند. کاهش بیشتر میزان پروتئین غیرقابل تجزیه جریان یافته به روده (افزایش بیشتر تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای) توسط سایر فرآوری‌ها می‌تواند دلیل اصلی عدم افزایش بخش قابل هضم غیرقابل تجزیه (نسبتی از پروتئین خام علوفه) نسبت به علوفه شاهد با وجود عملکرد مناسب این فرآوری‌ها در کاهش ترکیبات فنولیک باشد. استفاده از نسبت پروتئین قابل هضم در روده به پروتئین غیرقابل تجزیه (DUP/UDP) برای ارزیابی اثرات فرآوری‌ها بر قابلیت هضم روده‌ای پروتئین عبوری می‌تواند محدودیت‌های ناشی از تأثیر میزان پروتئین ورودی را از میان بردارد (مقادیر همبستگی بین میزان UDP و DUP برابر با ۰/۷۸۲ و بسیار معنی‌دار بود در حالی که همبستگی بین میزان UDP و میزان پروتئین قابل هضم در روده به نسبتی از پروتئین ورودی به این بخش فقط ۰/۰۵۱ و غیرمعنی‌دار بود). بر این اساس به غیر از اوره و سدیم هیدروکسید، سایر فرآوری‌ها سبب افزایش نسبت پروتئین هضم شده در روده باریک به پروتئین ورودی به این بخش، در مقایسه با علوفه شاهد شدند. فرآوری علوفه با اوره و سدیم هیدروکسید علی‌رغم کاهش تانن‌های متراکم تأثیری بر پروتئین قابل متابولیسم علوفه نداشت که این امر ممکن است به دلیل ایجاد ترکیبات مقاوم پروتئینی در طول مراحل فرآوری باشد (Frensdorff et al., 1953; Makkar, 2003). این فرضیه با مقادیر بالاتر نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی و بخش c پروتئین خام در سیستم CNCPS در مقایسه با

سایر فرآوری‌ها حمایت می‌شود. فرآوری با آب، پتاسیم پرمنگنات و خاکستر چوب سبب بیشترین افزایش در پروتئین قابل متابولیسم درمقایسه با سایر فرآوری‌ها شدند، با این حال پلی‌اتیلن گلیکول به طور معنی‌داری عملکرد بهتری نسبت به پتاسیم پرمنگنات و خاکستر چوب در کاهش میزان پروتئین نامحلول درشوینده اسیدی و خنثی داشت. دلیل احتمالی این امر را می‌توان بالاتر بودن پروتئین غیرقابل تجزیه و قابل هضم در علوفه‌های فرآوری شده با پتاسیم پرمنگنات و خاکستر چوب نسبت به پلی‌اتیلن گلیکول و ضریب بالاتر پروتئین قابل هضم عبوری در محاسبه میزان پروتئین قابل متابولیسم، نسبت به پروتئین قابل تجزیه مؤثر در شکمبه دانست. همبستگی معنی‌داری بین میزان تانن‌های متراکم علوفه فرآوری شده و نشده با بخش‌های مختلف قابل تجزیه در شکمبه، میزان پروتئین عبوری و میزان پروتئین قابل متابولیسم وجود داشت (جدول ۸). وجود همبستگی مثبت بین میزان تانن متراکم با پروتئین عبوری قابل هضم در روده (نسبت از کل پروتئین خام) که به علت کاهش میزان تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه ایجاد می‌شود، در مقابل همبستگی منفی بین غلظت تانن‌های متراکم و پروتئین عبوری قابل هضم به صورت نسبتی از پروتئین ورودی به روده، مؤید مطالب فوق‌الذکر در ارتباط با تأثیر میزان ورودی پروتئین غیرقابل تجزیه به روده در تعیین میزان پروتئین عبوری قابل هضم می‌باشد. همبستگی بالاتر و معنی‌دارتر بین میزان نیتروژن نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی با میزان پروتئین عبوری قابل هضم (نسبتی از میزان ورودی به دوازدهه) و پروتئین متابولیسمی، نسبت به همبستگی بین میزان تانن متراکم و این بخش‌ها، تأییدی بر نتایجی است که در آن با وجود کاهش تانن‌های متراکم در اثر فرآوری، میزان نیتروژن نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی به علت دناتوره شدن پروتئین‌ها در حین فرآوری کاهش نیافته و لذا بهبودی در میزان پروتئین قابل متابولیسم نسبت به علوفه فرآوری نشده، مشاهده نشده است. با توجه به بالاتر بودن ضرایب همبستگی بین مقادیر تانن‌های متراکم با بخش‌های تعیین‌کننده میزان پروتئین قابل تجزیه در شکمبه، نسبت به ضرایب همبستگی این بخش‌ها با نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی، و وجود حالت عکس در ارتباط با ضرایب همبستگی بین تانن‌های متراکم و نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی با میزان پروتئین عبوری قابل هضم و پروتئین قابل متابولیسم (جدول ۸)، و نیز نتایج منعکس شده در جدول‌های ۴ و ۵، می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که اولاً میزان تانن‌های متراکم و پروتئین باند شده با آن در تعیین میزان پروتئین قابل تجزیه در شکمبه، نقش مهمتری نسبت به کل نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی داشته و فرآوری برای کاهش غلظت تانن‌های متراکم با هدف افزایش میزان پروتئین قابل متابولیسم، به شرطی موفقیت‌آمیز خواهد بود که با کاهش همزمان و قابل مقایسه نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی همراه بوده و به بیان بهتر فرآوری‌ها سبب از دسترس خارج شدن بخش جدیدی از پروتئین در اثر ایجاد تغییرات کنفورماسیونی و متعاقباً تغییر در خصوصیات فیزیکی پروتئین مثل حلالیت، نشوند. ثانیا بخش‌های قابل تجزیه در شکمبه خوراک نقش کمتری نسبت به بخش قابل هضم در روده، در تعیین میزان پروتئین قابل متابولیسم ایفا می‌کنند (ضرایب همبستگی بین بخش‌های مختلف قابل تجزیه در شکمبه با میزان پروتئین قابل متابولیسم، بسیار ضعیف و غیرمعنی‌دار بود. درحالی‌که ضریب همبستگی بین میزان پروتئین قابل هضم در روده (نسبتی از میزان پروتئین ورودی) با پروتئین قابل متابولیسم برابر با ۰/۹۷۷ و بسیار معنی‌دار بود).

نتایج آزمایشات *In vitro* به منظور تعیین اثر فرآوری بر ترکیبات غیرفعال‌کننده تانن‌ها و مواد فنولیک بر بخش‌های پروتئینی خوراک بر اساس سیستم CNCPS در جدول ۶ آورده شده است. فرآوری علوفه با سدیم بی‌کربنات، خاکستر چوب، پتاسیم پرمنگنات و آب سبب افزایش بخش A شد، در حالی که کلیه تیمارها بخش C را (که ازنظر زیستی برای حیوان غیرقابل استفاده است) کم کردند. ازآنجاکه پروتئین متصل به تانن در سیستم CNCPS جز بخش C محسوب می‌شود (Sniffen et al., 1992)، لذا می‌توان غیرفعال شدن تانن‌های متراکم در اثر فرآوری با مواد شیمیایی را دلیل کاهش پروتئین موجود در بخش C عنوان کرد. بیشترین میزان بخش

جدول ۶- تأثیر فراوری بر بخش‌های مختلف پروتئین خام اسپرس بر اساس سیستم کورنل (گرم بر کیلوگرم پروتئین خام)

تیمار	A	B1	B2	B3	C
شاهد	۱۶۸/۵ ^{c}	۹۶/۷ ^{b}	۲۸۶/۵ ^{c}	۱۳۹/۲ ^{d}	۳۰۹/۱ ^{a}
آب	۳۴۲/۲ ^{ab}	۱۲/۹ ^{e}	۳۷۱/۹ ^{b}	۱۷۱/۱ ^{b}	۱۰۲/۱ ^{d}
اوره	۱۷۱/۲ ^{c}	۱۳۳/۷ ^{a}	۴۰۹/۰ ^{b}	۷۴/۸ ^{e}	۲۱۱/۲ ^{b}
پتاسیم پرمنگنات	۳۰۰/۹ ^{b}	۹۶/۸ ^{b}	۲۷۶/۹ ^{c}	۱۷۳/۱ ^{b}	۱۵۲/۳ ^{c}
پلی اتیلن گلیکول	۱۶۶/۵ ^{c}	۶۷/۵ ^{c}	۵۲۴/۳ ^{a}	۱۳۶/۲ ^{d}	۱۰۵/۶ ^{d}
خاکستر چوب	۳۶۳/۷ ^{a}	۱۳/۵ ^{e}	۳۴۱/۵ ^{bc}	۱۶۵/۶ ^{b}	۱۱۵/۸ ^{d}
سدیم هیدروکسید	۱۱۰/۲ ^{d}	۷۴/۷ ^{c}	۳۶۵/۲ ^{b}	۲۴۰/۳ ^{a}	۲۰۹/۷ ^{b}
سدیم بیکربنات	۳۵۵/۳ ^{a}	۴۴/۵ ^{d}	۲۸۰/۱ ^{c}	۱۶۷/۸ ^{bc}	۱۵۲/۴ ^{c}
SEM	۱۵/۳	۴/۵	۲۱/۱	۹/۵	۱۰/۵

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح آماری (p<۰/۰۵) می باشند.

B_2 در اثر فرآوری علوفه با پلی‌اتیلن گلیکول به دست آمد. به علاوه این فرآوری قادر به بیشترین کاهش در بخش C پروتئین خام بود. با توجه به اینکه نیتروژن کم شده از بخش C به بخش B_2 افزوده شده و قسمت غیرقابل تجزیه این بخش دارای قابلیت هضم ۸۰ درصد در روده باریک می‌باشد، می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که کاهش پروتئین موجود در بخش C به همراه افزایش بخش A در ارتباط با برخی از فرآوری‌ها و مجموع بخش‌های B توسط برخی دیگر از فرآوری‌ها، مؤید این مطلب است که فرآوری به منظور غیرفعال کردن تانن‌های متراکم در علوفه اسپرس میزان پروتئین بالقوه قابل استفاده برای حیوان را افزایش می‌دهد. ضرایب همبستگی بین تانن متراکم، نیتروژن نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی با پروتئین موجود در بخش A به ترتیب برابر ۰/۲۶۱-، ۰/۳۶۱- و ۰/۵۰۳- بود. همبستگی بسیار معنی‌داری بین مقادیر تانن‌های متراکم، نیتروژن نامحلول در شوینده خنثی و نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی با بخش C پروتئین خام علوفه اسپرس فرآوری شده و نشده وجود داشت (جدول۷).

تغییر معنی‌دای در بخش A پروتئین خام در اثر فرآوری با پلی‌اتیلن گلیکول و اوره مشاهده نشد، در حالی که میزان پروتئین قابل تجزیه در شکمبه و پروتئین قابل تجزیه مؤثر علوفه فرآوری شده با پلی‌اتیلن گلیکول و اوره در سیستم پروتئین متابولیسمی و تجزیه‌پذیری با استفاده از کیسه‌های نایلونی، بطور معنی‌داری بالاتر از سایر فرآوری‌ها بود. بعلاوه افزایش بخش A با توجه به کاهش مقادیر تانن متراکم در اثر فرآوری‌ها قابل انتظار بود. باتوجه به این موارد می‌توان عنوان کرد که کاهش تانن‌های متراکم بیش از این‌که قادر به افزایش بخش سریعاً محلول شود قادر به کاهش بخش C بوده و پروتئین آزاد شده از این بخش را به بخش B2 اضافه می‌کند (جدول ۶). باتوجه به عدم وجود همبستگی بین بخش A و اجزای قابل تجزیه در شکمبه سیستم پروتئین متابولیسمی (جدول ۹) می‌توان عنوان کرد که تفاوت‌های ساختاری دو سیستم در نحوه اندازه‌گیری پروتئین قابل تجزیه (استفاده از حلال در روش CNCPS و تجزیه‌پذیری در شکمبه) حداقل می‌تواند مسئول بخشی ازتفاوت نتایج بین دو سیستم مختلف باشد.

جدول ۷- همبستگی میان ترکیبات ضد تغذیه‌ای و بخش‌های مختلف پروتئین علوفه اسپرس در سیستم کربوهیدرات و پروتئین خالص کرنل

	بخش های مختلف پروتئین				
	A	B1	B2	B3	C
تانن متراکم	۰/۲۶۱- ^{ns}	۰/۲۶۲+ ^{ns}	۰/۳۶۷- ^{ns}	۰/۱۵۳- ^{ns}	۰/۷۸۵ ***
پروتئین خام	۰/۲۵۲+ ^{ns}	۰/۳۵۹+ ^{ns}	۰/۱۴۵+ ^{ns}	۰/۳۰۹- ^{ns}	۰/۰۵۹ ^{ns}
دیواره سلولی	۰/۴۱۷+ *	۰/۰۷۲- ^{ns}	۰/۰۹۳- ^{ns}	۰/۴۷۷ *	۰/۰۶۴ ^{ns}
دیواره سلولی بدون همی سلولز	۰/۲۵۴+ ^{ns}	۰/۱۵۲+ ^{ns}	۰/۰۹۳+ ^{ns}	۰/۲۲۵+ ^{ns}	۰/۳۶۸ ^{ns}
نیتروژن نامحلول در شوینده خنثی	۰/۳۶۱- ^{ns}	۰/۵۳۵+ **	۰/۳۵۹- ^{ns}	۰/۳۱۰+ *	۰/۸۵۵+ ***
نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی	۰/۵۰۳- **	۰/۷۷۸+ ***	۰/۲۲۷- ^{ns}	۰/۲۶۹- ^{ns}	۰/۹۵۲+ ***

*: معنی‌دار در سطح آماری p<۰/۰۵، **: معنی‌داری در سطح آماری p<۰/۰۱، ***: معنی‌داری در سطح آماری p<۰/۰۰۱ می‌باشد. ns: عدم وجوداختلاف معنی‌دار (p>۰/۰۵).

جدول ۸- همبستگی میان ترکیبات ضد تغذیه‌ای و بخش‌های مختلف پروتئین علوفه اسپرس در سیستم AFRC

	بخش های مختلف پروتئین						
	QDP	SDP	RDP	ERDP	UDP	DUP	MP	DUP/UDP
تانن متراکم	−۰/۸۶۱***	−۰/۲۵۹ ns	−۰/۷۷۳***	−۰/۷۳۵***	۰/۷۷۴***	۰/۳۶۶ ns	−۰/۴۰۴***	−۰/۲۳۹ ns
پروتئین خام	+۰/۱۲۵ns	+۰/۱۶۴ ns	−۰/۱۶۸ ns	+۰/۱۹۰ ns	−۰/۱۸۱ ns	−۰/۱۹۹ ns	+۰/۲۸۵ ns	−۰/ ۰۶۶ ns
دیواره سلولی	−۰/۰۶۷ ns	−۰/۰۲۱ ns	−۰/۰۵۹ ns	−۰/۰۶۳ ns	۰/۰۶۵ ns	۰/۱۶۷ ns	۰/۱۹۳ ns	۰/۱۶۳ ns
دیواره سلولی بدون همی سلولز	−۰/۲۲۹ ns	−۰/۰۵۹ ns	−۰/۲۰۴ ns	−۰/۱۹۴ ns	۰/۲۰۴ ns	۰/۰۹۹ ns	۰/۰۹۷ ns	−/۰۸۵ ns
نیتروژن نامحلول در شوینده خنثی	۰/۴۱۳*	−۰/۳۱۵ ns	−۰/۴۹۰*	−۰/۴۸۷*	۰/۴۸۶*	۰/۰۰۹ ns	−۰/۶۶۶***	−۰/۶۴۵***
نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی	−۰/۵۰۵**	−۰/۲۹۹ ns	−۰/۵۵۵**	−۰/۵۳۲**	۰/۵۴۳**	−۰/۰۴۹ ns	−۰/۸۰۱***	−۰/۷۴۷***

*: معنی‌دار در سطح آماری $p<۰/۰۵$، **: معنی‌داری در سطح آماری $p<۰/۰۱$، ***: معنی‌داری در سطح آماری $p<۰/۰۰۱$ می باشد. ns: عدم وجوداختلاف معنی‌دار ($p>۰/۰۵$).

جدول ۹- همبستگی میان بخش‌های مختلف پروتئین علوفه اسپرس در سیستم کربوهیدرات و پروتئین خالص کورنل و سیستم AFRC

سیستم CNCPS	سیستم AFRC							
	QDP	SDP	RDP	ERDP	UDP	DUP	DUP/UDP	MP
A	−۰/۰۸۳ ns	۰/۰۹۶ ns	۰/۰۰۴ ns	۰/۰۱۴ ns	−۰/۰۰۱ ns	۰/۴۹۱*	۰/۷۸۸***	۰/۸۱۲***
B1	−۰/۱۱۸ ns	−۰/۴۰۵*	−۰/۳۳۹ ns	−۰/۳۴۵ ns	۰/۳۲۵ ns	−۰/۱۰۹ ns	−۰/۶۴۵***	−۰/۶۴۵***
B2	۰/۵۸۶**	۰/۵۰۷*	۰/۷۱۴***	۰/۷۱۶***	−۰/۷۱۶***	−۰/۶۸۲***	−۰/۱۸۸ ns	۰/۱۳۵ ns
B3	۰/۱۱۴ ns	−۰/۰۴۹ ns	۰/۰۶۸ ns	−۰/۰۳۲ ns	−۰/۰۵۴ ns	۰/۰۴۴ ns	۰/۱۰۸ ns	۰/۱۲۹ ns
C	−۰/۶۰۸**	−۰/۳۳۸ ns	−۰/۶۴۷***	−۰/۶۲۶**	۰/۶۳۹***	۰/۰۴۱ ns	−۰/۶۸۹***	−۰/۷۷۹***

*: معنی‌دار در سطح آماری $p<۰/۰۵$ ، **: معنی‌داری در سطح آماری $p<۰/۰۱$، ***: معنی‌داری در سطح آماری $p<۰/۰۰۱$ می‌باشد. ns: عدم وجوداختلاف معنی‌دار ($p>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری

نتایج کلی به دست آمده از آزمایش اخیر نشان‌دهنده افزایش قابلیت استفاده و کاهش هدر رفت پروتئین و بهبود ارزش غذایی این علوفه در اثر فرآوری بوده و فرآوری با پلی‌اتیلن‌گلیکول، آب و خاکستر چوب بیشترین تأثیر را بر افزایش قابلیت دسترسی نیتروژن و کاهش بالقوه خطر آلودگی‌های زیست‌محیطی داشته است. بین روش‌های مختلف، فرآوری با آب قابلیت استفاده در شرایط عملی در دامداری‌های کشور را دارا می‌باشد.

REFERENCES

1. Agricultural and Food research Council. (1992). Nutrient requirements of ruminant Animals: Protein. Technical comitee on Responses to nutrients. Report no: 10, *Nutrition Abstracts and Reviews. Series B*, 62(2), 787-835
2. Agricultural and Food Research Council. (1995). Energy and Protein requirements of ruminants. *Technical committee on responses to nutrients*. CAB International. Wallingford, U.K.
3. AOAC. (2000). Official Methods of Analysis, (17th ed.). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Gaithersburg, MD, USA.
4. Aufrer're, J., Dudilieu, M. & Poncet, C. (2008). In vivo and in situ measurements of the digestive characteristics of sainfoin in comparison with lucerne fed to sheep as fresh forages at two growth stages and as hay. *Animal*, 2(9), 1331–1339.
5. Bagheripour, E., Rouzbehan, Y. & Alipour, D. (2008). Effects of ensiling, air-drying and addition of polyethylene glycol on in vitro gas production of pistachio by-products. *Animal Feed Science and Technology*, 146(3-4), 327-336.
6. Ben Salem, H., Saghrouni, L. & Nefzaoui, A. (2005). Attempts to deactivate tannins in fodder shrubs with physical and chemical treatments. *Animal Feed Science and Technology*, 122(1-2), 109-121.
7. Canbolat, O., Ozkan, C. O. & Kamalak, A. (2007). Effects of NaOH treatment on condensed tannin contents and gas production kinetics of tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 138(2),189-194
8. Coblentz, W. K., Fritz, J. O., Cochran, R. C., Rooney, W. L. & Bolsen, K. K. (1997). Protein

degradation in response to spontaneous heating in alfalfa hay by in situ and ficin methods. *Journal of Dairy Science*, 80(4), 700- 713.

9. Ditterline, R. L. & Cooper, C. S. (1975). Fifteen years with sainfoin. *Montana Agriculture Experiment Station Buletin*, No. 681.
10. Frame, J. (2005) Forage Legumes for Temperate Grasslands, *Science Publishers*, Inc, Enfield, New Hampshire, USA; FAO, Rome, Italy.
11. Fraser, M. D., Fychan, R. & Jones, R. (2000) Voluntary intake, digestibility and nitrogen utilization by sheep fed ensiled forage legumes. *Grass and Forage Science*, 55(3), 271-279.
12. Frensdorff, H. K., Watson, M. T. & Kauzmann, W. (1953). The Kinetics of Protein Denaturation. V. The Viscosity of Urea Solutions of Serum Albumin. *Journal of Ameriacan Chemistry Society*, 75(21), 5167–5172.
13. Griggs, T. C. & Matches, A. G. (1991). Productivity and consumption of wheatgrasses and wheatgrass-sainfoin mixtures grazed by sheep. *Crop Science*, 31(5), 1267-1273.
14. Hoste, H., Gaillard, L. & LeFrileux, Y. (2005). Consequences of the regular distribution of sainfoin hay on Gastrointestinal parasitism with nematodes and Milk production in dairy goats. *Small Ruminant Research*, 59(2-3), 265-271.
15. Jones, G. A., McAllister, T. A., Muir, A. D. & Cheng, J. (1994). Effects of sainfoin (Onobrychis viciifolia Scoop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbology*, 60(4), 1374–1378.
16. Khiaosa-Ard, R., Bryner, S. F., Scheeder, M. R. L., Wettstein, H. R., Leiber F., Kreuzer, M. & Soliva, C. R. (2009). Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal [alpha]-linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *Journal of Dairy Science*, 92(1), 177-188.
17. Krueger, C. G., Albercht, K. A., Reed, J. D., Bures, E. J. & Owens, V. N. (1999). Sodium sulphite effects on recovery and composition of detergent fibre and lignin from forage legumes varying in levels of proanthocyanidins. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 79(11), 1351 – 1356.
18. Licitra, G., Hernandez, T. M. & Van Soest, P. J. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 57(3-4), 347-358.
19. Makkar, H. P. S. & Becker, K. (1996). Effect of pH, temperature, and time on inactivation of tannins and possible implications in detannification studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1291–1295.
20. Makkar, H. P. S. & Singh, B. (1992a). Effect of wood ash on tannin content of oak (Quercus incana) leaves. *Bioresource Technology*, 41 (1), 85–86.
21. Makkar, H. P. S. & Singh, B. (1992b). Detannification of oak (Quercus incana) leaves: treatments and their optimization. *Animal Feed Science and Technology*, 36(1-2), 113-127.
22. 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'. IAEA, VIENNA.
23. Makkar, H. P. S. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant Anim.s, adaptation to Tannins ,and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small RuminantResearch*, 49(3), 241–256
24. McDonald, I. (1981). A revised model for the estimation of protein degradability in the ruminal. *Journal of Agricultural Science*, 96 (1), 251–252.
25. McLeod, M. N. (1974). Plant tannin-their role in forage quality. *Nutritional Abstracts and Reviews*, 44(21), 803–814.
26. McMahon, L. R., Majak, W., McAllister, T. A., Hall, J. W., Jones, G. A., Popp, J. D. & Cheng, K. J. (1999). Effect of sainfoin on in vitro digestion of fresh alfalfa and bloat in steers. *Canadian Journal of Animal Science*, 79(2), 203 – 212.
27. Min, B. R., Attwood, G. T., Reilly, K., Sun, W., Peters, J. S., Barry, T. N. & McNabb, W. C. (2002a). 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(4), 911–921.
28. Min, B. R., Attwood, G. T., Barry, T. N & McNabb, W. C. (2002b). The effect of condensed tannins from Lotus corniculatus on the proteolytic activities and growth of rumen bacteria. *Journal of Animal Science*, 80 (Suppl. 1), 1602.
29. Min B. R., Barry, T. N., Attwood, G. T. & 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(1-4), 3–19.
30. Mlamboa, V., Mouldb, F. L., Sikosana, J. L. N., Smith, T., Owen, E. & Mueller-Harvey, I. (2008).

Chemical composition and in vitro fermentation of tannin-rich tree fruits. *Animal Feed Science and Technology*, (140), 402-417.

31. Orskov, E. R. & McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurments weighted according to rate of passage. *Journal of Agriculture science (Cambrige)*, 92(2), 499 –503.
32. Parker, R. J. & Moss, B. R. (1981). Nutritional value of sainfoin hay compared with alfalfa hay. *Journal of Dairy Science*, 64(2), 206-210.
33. Pecetti, L., Annicchiarico, P., Battini, F. & Cappelli, S. (2009). Adaptation of forage legume species and cultivars under grazing in two extensive livestock systems in Italy. *European Journal of Agronomy*, 30(3), 199-204.
34. Priolo, A., Waghorn, G. C., Lanza, M., Biondi, L. & Pennisi, P. (2000). Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: Effects on lamb growth performance and meat quality. *Journal of Animal Science*, 78(4), 810-816.
35. Reid, C. S. W., Ulyatt, M. J. & Wilson, J. M. (1974). Plant tannins, bloat and nutritive value. In: Proceedings of *New Zealand Society*. 34, 82-92.
36. SAS. (2002). Version 9.1 SAS/STAT user's guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA.
37. Scharenberg, A., Arrigo, Y., Gutzwiller, A., Soliva, C. R., Wyss, U., Kreuzer, M. & Dohme, F. (2007a). Palatability in sheep and in vitro nutritional value of dried and ensiled sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*), and chicory (*Cichorium intybus*). *Archives of Animal Nutrition*, 61(6), 481– 496.
38. Scharenberg, A., Arrigo, Y., Gutzwiller, A., Wyss, U., Hess, H. D., Kreuzer, M. & Dohme, F. (2007b). Effect of feeding dehydrated and ensiled tanniferous sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on nitrogen and mineral digestion and metabolism of lambs. *Archives of Animal Nutrition*, 61(5), 390-405.
39. Scharenberg, A., Heckendorn, F., Arrigo, Y., Hertzberg, H., Gutzwiller, A., Hess, H. D., Kreuzer, M. & Dohme, F. (2008). Nitrogen and mineral balance of lambs artificially infected with Haemonchus contortus and fed tanniferous sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of Animal Science*, 86(8), 1879-1890.
40. Sniffen, C. J., O'Connor, J. D., Van Soest, P. J., Fox, D. G. & Russell, J. B. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, 70(11), 3562-3577.
41. Terrill, T. H., Rowan, A. M., Douglas, G. B. & Barry, T. N. (1992). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 58(3), 321-329.
42. Thomson, D. J., Beever, D. E., Harrison, D. G., Hill, I. W. & Osbourn, D. F. (1971). The digestion of dried lucerne and sainfoin by sheep. In: Proceedings of *Nutrition Society*, 30(1), 14A-15A. (Abstract).
43. Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583 – 3597.
44. Vanzant, E. S., Cochran, R. C. & Titgemeyer, E. C. (1998). Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. *Journal of Animal Science*, 76(10), 2717 - 2729.
45. Vermeris, W. & Nicholson, R. (2006). Phenolic compound biochemistry. Springer.
46. Waghorn, G. C., Utlyat, M. J., John, A. & Fisher, M. T. (1987). The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. *British Journal of Nutrition*, 57(1), 115-126.