

تأثیر عصاره تفاله انگور بر پارامترهای تولید گاز و جمعیت تک‌یاخته‌های شکمبه با استفاده از شیرابه شکمبه گوسفند

محمدجواد ابرقوئی^۱ و یوسف روزبهان^{۲*}

۱، دانش‌آموخته دکتری تغذیه دام و ۲، عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس (تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۳۰ - تاریخ تصویب: ۹۲/۱۱/۱۳)

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی تأثیرات سطوح گوناگون عصاره تفاله انگور بر تولید گاز به روش آزمایشگاهی و برخی پارامترهای تخمیر شکمبه مانند سوسترای تجزیه‌شده، اسیدهای چرب فرار، و تولید پروتئین میکروبی با استفاده از شیرابه شکمبه گوسفند انجام شد. برای تهیه عصاره، تفاله انگور خشک با نسبت وزنی مساوی با آب مقطر مخلوط گردید و در سطوح صفر، ۱۵، و ۳۰ میلی‌گرم ترکیبات فنولیک کل به‌ازای گرم ماده خشک به جیره پایه اضافه شد. جیره پایه شامل علف یونجه خشک، کنجاله سویا، و دانه جو بود. تولید گاز در زمان‌های ۳، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، و ۱۲۰ ساعت بعد از انکوباسیون ثبت گردید. بعد از ۲۴ ساعت، انکوباسیون متوقف و سوسترای تجزیه‌شده واقعی تعیین شد. پارامترهای تخمیر شکمبه مانند PF_{24} Partitioning factor، تولید گاز در ۲۴ ساعت، قابلیت هضم آزمایشگاهی ماده آلی، انرژی متابولیسم‌پذیر، و تولید پروتئین میکروبی محاسبه گردید. استفاده از عصاره تفاله انگور بر مقادیر تولید گاز مجانب (A)، زمان تاخیر (L)، سوسترای تجزیه‌شده واقعی، تولید گاز در ۲۴ ساعت، قابلیت هضم ماده آلی، و انرژی متابولیسم‌پذیر تأثیری نداشت. ولی تولید پروتئین میکروبی ($Q=0/005$) و مقدار PF_{24} ($L=0/023$ و $Q=0/004$) افزایش یافت. استفاده از عصاره تفاله انگور بر مقادیر کل اسیدهای چرب فرار و استات اثر معنی‌داری نداشت. مقدار پروپیونات با افزودن عصاره افزایش یافت ($Q=0/048$) و مقدار بوتیرات ($L=0/004$) و نسبت استات به پروپیونات ($Q=0/001$) در دو سطح عصاره در مقایسه با جیره شاهد کاهش یافت. مقدار آمونیاک ($P<0/0001$) در دو سطح عصاره اضافه‌شده در مقایسه با جیره شاهد کاهش یافت. مقادیر کل پروتوزوا و زیرخانواده انتودینینه در زمان‌های ۳، ۱۲، و ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون در دو سطح عصاره در مقایسه با جیره شاهد کاهش یافت. دو جنس ایزوتریچا ($L<0/0001$ و $Q<0/0001$) و داسی‌تریچا ($L=0/003$ و $Q=0/030$) و زیرخانواده‌های دیپلودینینه ($L=0/0009$ و $Q=0/012$) و افریوسکالسینه ($L<0/0001$) نیز در ساعت ۲۴ بعد از افزودن عصاره کاهش نشان داد. در کل، استفاده از عصاره تفاله انگور بدون تأثیر منفی بر قابلیت هضم، تولید پروتئین میکروبی را افزایش و مقدار آمونیاک و پروتوزوا را کاهش داد.

واژه‌های کلیدی: پارامترهای شکمبه، تولید گاز، عصاره تفاله انگور، گوسفند.

مقدمه

(2008b). از سال ۲۰۰۶ استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل ایجاد مقاومت در باکتری‌های بیماری‌زا ممنوع گردیده است. درعین‌حال، با رشد روزافزون تولید محصولات ارگانیک و سهم آمونیاک و متان تولیدی حیوانات در ایجاد گازهای گلخانه‌ای، میکروبیولوژیست‌ها و

مواد افزودنی متعددی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، یونوفرها و مواد از بین‌برنده پروتوزوا در جیره نشخوارکنندگان برای بهبود تخمیر شکمبه با هدف افزایش بازده تولیدات نشخوارکنندگان استفاده شده‌اند (Benchaar et al.,

Alipour & Rouzbehan, 2007; Abarghuei *et al.*, 2010). در عین حال تحقیقات محدودی در زمینه استفاده از عصاره تفاله انگور در تغذیه دام انجام شده است. معمولاً استخراج متابولیت‌های ثانویه با حلال‌هایی مانند استن، اتانول، و متانول انجام می‌شود (Makkar, 2003) که مقرون به صرفه نیست. بنابراین استفاده از روش‌هایی که هم از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد و هم بتوان از آن‌ها در سطح مزرعه استفاده کرد، لازم است. پژوهش حاضر برای ارزیابی تأثیرات عصاره تفاله انگور بر تولید گاز آزمایشگاهی و پارامترهای تخمیر شکمبه گوسفند مانند تولید پروتئین میکروبی، آمونیاک، اسیدهای چرب شکمبه، و جمعیت پروتوزوای شکمبه انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه تفاله انگور و عصاره‌گیری

تفاله انگور قرمز به صورت تازه از کارخانه آذراک شهرستان ارومیه تهیه شد و به آزمایشگاه انتقال یافت. در دمای ۶۰ درجه سلسیوس آن خشک گردید. برای عصاره‌گیری یک گرم تفاله انگور با یک میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و درون ظرف دربسته در دمای آزمایشگاه برای ۷۲ ساعت قرار داده شد. سپس مخلوط تفاله انگور و آب مقطر به مدت یک ساعت در دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و با پارچه تنظیف مخلوط صاف گردید. عصاره حاصل در دمای ۴ درجه سلسیوس برای انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

تعیین متابولیت‌های ثانویه عصاره

کل ترکیبات فنولیک با فولین سیوکالتو، به روش Makkar (2000) برآورد گردیدند. مقدار ساپونین با بوتانول و به روش Makkar *et al.* (1998) تعیین گردید. مقدار بخش آبی (شامل لکتین، پلی‌پیتید، و نشاسته) نیز براساس روش Cowan (1999) اندازه‌گیری شد.

تخمیر آزمایشگاهی

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

متخصصان تغذیه به دنبال روش‌ها و جایگزین‌های مناسب برای تغییر متابولیسم شکمبه به منظور بهبود بازده خوراک و تولیدات حیوانی بوده‌اند (Calsamiglia *et al.*, 2007; Rochford *et al.*, 2008). از این جایگزین‌ها می‌توان به ترکیبات فعال گیاهی اشاره کرد (Benchaar *et al.*, 2008b; Vasta *et al.*, 2011). ترکیبات فعال گیاهی، ترکیبات آلی مشتق شده از متابولیسم ثانویه گیاه هستند که به نظر می‌رسد عملکرد مستقیمی در رشد و توسعه گیاه ندارند. این ترکیبات گیاهی مسئول بو و رنگ گیاهان، عملکردهای اکولوژیکی مهمی به عنوان پیام‌آورهای شیمیایی بین گیاه و محیط اطراف دارند و معمولاً فعالیت ضد میکروبی بر علیه تعداد زیادی از مخمرها، باکتری‌ها، و کپک‌ها دارند. طبقه‌بندی این متابولیت‌های ثانویه به دلیل اینکه عموماً مسیرهای سنتز متابولیکی و مکانیسم‌های عمل مشترکی دارند، مشکل است. آن‌ها به ۴ گروه پلی‌فنول‌ها و تانن‌ها، ساپونین‌ها، ارگانوسولفورها، و روغن‌های ضروری تقسیم می‌شوند (Calsamiglia *et al.*, 2007). به تازگی تحقیقات زیادی برای اثبات نقش این متابولیت‌ها به منظور بهبود بازده نیتروژن و انرژی شکمبه و غربال‌گری گیاهان و محصولات حاوی این متابولیت‌ها انجام شده است (Patra *et al.*, 2006; Benchaar *et al.*, 2008b). میزان تأثیر آن‌ها به وضعیت سودمندی این متابولیت‌های ثانویه به منبع، ساختار شیمیایی، و مقدارشان بستگی دارد (Abarghuei *et al.*, 2010). روش تولید گاز تکنیکی مناسب برای ارزیابی سریع و غربال‌گری این متابولیت‌هاست (Makkar, 2010). تفاله انگور محصول فرعی کارخانجات آب‌میوه‌گیری است. این محصول فرعی در ایران در حدود ۵۰۰۰۰ تن در سال تولید می‌شود. این محصول فرعی حاوی متابولیت‌های ثانویه فعالی مانند پلی‌فنول‌ها، ساپونین، تانن، و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است (Alipour & Rouzbehan, 2007; Abarghuei *et al.*, 2010)، که تأثیرات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد تورم دارند و تقویت‌کننده سیستم ایمنی هستند (Adams *et al.*, 2006). تاکنون بیشتر تحقیقات انجام شده از تفاله انگور بوده است و در این مطالعات ارزش تغذیه‌ای کم این محصول فرعی به دلیل داشتن مقدار زیادی تانن و لیگنین مشخص شده است



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

(رابطه ۲)

$$IVOMD(MJ/kg DM) = 2/20 + 0/126GP + 0/05XP$$

(رابطه ۳)

$$ME = 14/88 + 8/89GP + 4/5XP + 0/651XA$$

GP: حجم گاز تولیدی تصحیح‌شده برای ۲۴ ساعت (ml/200mg of DM)
 XP: پروتئین خام (g/100g DM)، XA: خاکستر خام (g/100g DM)
 محصول گاز (GY₂₄) از رابطه ۴ محاسبه گردید (Makkar, 2010):

(رابطه ۴)

میلی‌لیتر گاز به‌ازای ماده خشک/گرم سوبسترای هضم‌شده

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

(رابطه ۵)

$$MP (mg/g DM) = \frac{\text{میلی‌گرم سوبسترای هضم‌شده میلی‌لیتر}}{(2 \times \text{گاز})}$$

نسبت ماده آلی هضم‌شده (میلی‌گرم) به میلی‌لیتر گاز تولیدشده بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون برای تخمین PF₂₄ در نظر گرفته شد (Makkar, 2010). اسیدهای چرب فرآر با دستگاه گاز کروماتوگرافی تعیین گردید (Cottyn and Boucque, 1968).

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

دسترسی آزاد به آب و بلوک‌های معدنی تغذیه شدند. عصاره تفاله انگور در سه سطح (صفر، ۱۵، و ۳۰ میلی‌گرم ترکیبات فنولیک کل به گرم ماده خشک جیره پایه) اضافه شد.

برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. تأثیرات عصاره در سه آزمایش جداگانه تولید گاز انجام شد. مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم جیره پایه درون سرنگ‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری وزن گردید (Makkar, 2010). جیره پایه شامل مخلوط علف یونجه خشک (۶۳۸ گرم به کیلوگرم ماده خشک)، کنجاله سویا (۱۳۹/۱ گرم به کیلوگرم ماده خشک)، و دانه جو (۱۸۳/۹ گرم به کیلوگرم ماده خشک) بود. سرنگ‌ها قبل از اضافه‌کردن ۴۰ میلی‌لیتر مخلوط بافر در دمای ۳۹ درجه سلسیوس قرار داده شدند. شیرابه شکمبه هر گوسفند قبل از خوراک‌دادن صبح جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. شیرابه با استفاده از ۴ لایه پارچه مخصوص پنیرسازی و تحت گاز CO₂ و دمای ۳۹ درجه سلسیوس صاف گردید. قرائت حجم گاز تولیدی در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶، و ۱۲۰ ساعت بعد از انکوباسیون صورت‌پذیرفت. در پایان ساعت ۲۴ سرنگ‌ها باز شدند و pH با دستگاه pH متر (GLP 22, Crison Instruments, Barcelona, Spain) اندازه‌گیری شد و تخمیر به‌وسیله چرخاندن سرنگ‌ها روی یخ متوقف گردید. محتوای سرنگ‌ها در دور ۲۰۰۰g برای ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید و از محلول بالایی برای تعیین آمونیاک و اسیدهای چرب فرآر استفاده شد.

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

محاسبات

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

$$A = b \times (1 - e^{-c(t-L)}) \quad (\text{رابطه ۱})$$

گرفت و میانگین‌های به‌دست‌آمده با آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه آماری شد.

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

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

نتایج و بحث

مقادیر متابولیت‌های ثانویه عصاره تفاله انگور و مقادیر اجزاء جیره پایه در جدول ۱ و مقادیر ترکیب شیمیایی جیره پایه در جدول ۲ آورده شده‌است.

جدول ۱. مقادیر متابولیت‌های ثانویه عصاره تفاله انگور و

جیره پایه (برحسب گرم در کیلوگرم ماده خشک)

مقادیر متابولیت‌های ثانویه	میلی‌گرم به گرم عصاره
ترکیبات فنولیک کل	۲۸/۸
سایونین	۲۷/۲
بخش آبی	۱۳۳/۶
جیره (گرم به کیلوگرم ماده خشک)	
علوفه یونجه	۶۳۸
کنجاله سویا	۱۳۹/۱
دانه جو	۱۸۳/۹
مخلوط معدنی ویتامینی ^۱	۳۹

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

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

شمارش جمعیت پروتوزوا

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

تجزیه و تحلیل آماری

به‌وسیله سه آزمون تولید گاز مجزا و چهار تکرار برای هر نمونه انکوباسیون انجام شد. داده‌های تخمیر شکمبه برای هر سه آزمون میانگین‌گیری شد. با نرم‌افزار SAS (2002) براساس رابطه ۶ تجزیه واریانس داده‌ها صورت

جدول ۲. ترکیب شیمیایی جیره پایه

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

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

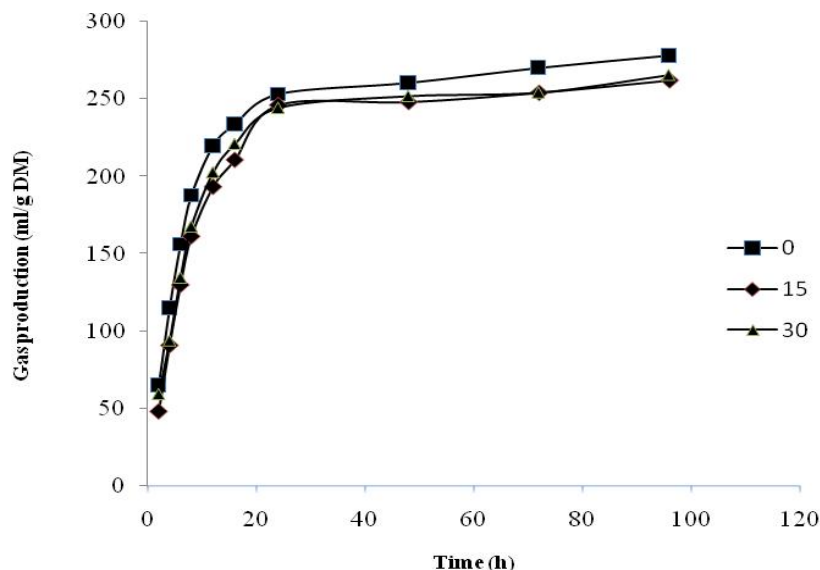
شده است. اطلاعات محدودی در زمینه تأثیر عصاره تفاله انگور بر تولید گاز و تخمیر شکمبه وجود دارد. افزودن عصاره تفاله انگور تأثیری بر تولید گاز نداشت. مقدار A و سرعت تخمیر و زمان تأخیر تحت تأثیر

تخمیر آزمایشگاهی

نمودار تولید گاز برای عصاره استفاده‌شده در آزمون تولید گاز در مدت ۱۲۰ ساعت در شکل ۱ آورده شده است. مقادیر پارامترهای تخمیر در جدول ۳ نشان داده

تولید گاز گردید (Hervas *et al.*, 2000). Jiménez-Peralta *et al.* (2011) نشان دادند که افزودن عصاره دو گیاه *L.leucocephala* و *S.babylonica* به جیره شاهد، تولید گاز را در مقایسه با جیره شاهد زیاد کرد، ولی تفاوتی در مقادیر A، سرعت تخمیر، و زمان تأخیر مشاهده نشد. تفاوت در تأثیرات متابولیت‌های ثانویه بر تولید گاز و پارامترهای گاز می‌تواند به دلیل سوبسترای استفاده‌شده، مقدار عصاره، ساختار عصاره، و متابولیت‌های ثانویه باشد (Getachew *et al.*, 2008; Jiménez-Peralta *et al.*, 2011).

عصاره قرار نگرفت ولی سرعت تخمیر تمایل به کاهش و زمان تأخیر با افزودن عصاره تمایل به افزایش داشت. تغییر نکردن تولید گاز می‌تواند به دلیل مقدار و نوع عصاره مصرفی باشد (Busquet *et al.*, 2005). برخلاف نتایج تحقیق حاضر (Getachew *et al.*, 2008) افزایش تولید گاز و مقدار A را با مقادیر ۵۰، ۱۰۰، و ۱۵۰ گرم اسید گالیک در کیلوگرم ماده خشک جیره نشان دادند. ولی این محققان شرح دادند که با افزودن سه سطح ۵۰، ۱۰۰، و ۱۵۰ گرم تانن کوبراچو و اسیدتانیک در کیلوگرم ماده خشک جیره، مقدار A کاهش یافت. همچنین در پژوهشی دیگر تانن باعث کاهش مقدار



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

یافت. این افزایش احتمالاً به دلیل همزمان‌سازی آزاد شدن انرژی و پروتئین در شکمبه در اثر وجود برخی ترکیبات شیمیایی عصاره است (Jiménez-Peralta *et al.*, 2011). برخی از ترکیبات فنولیک با تولید اسیدهای آمینه آروماتیک واکنش می‌دهند. گزارش شده است که فنیل پروپانئیک اسید و فنیل لاکتیک اسید تجزیه سلولز را زیاد می‌کنند و رشد گونه‌های باکتریایی رومینوکوکوس آلبوس را افزایش می‌دهند (Stack & Cotta, 1986). در تحقیقی دیگر نیز بیان شد که استفاده از مقادیر ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم به‌ازای میلی‌لیتر از عصاره گیاه *M. oleifera* بر قابلیت هضم ماده آلی

مقادیر تولید گاز در ۲۴ ساعت، قابلیت هضم ماده آلی، عملکرد تولید گاز در زمان ۲۴، سوبسترای هضم‌شده، و انرژی متابولیسم‌پذیر در دو سطح عصاره افزوده‌شده در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. افزودن عصاره مقادیر PF_{24} ($L=0/023$) و $Q=0/004$ (تولید پروتئین میکروبی ($Q=0/005$)) را در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داد. مشابه نتایج ما Jiménez-Peralta *et al.* (2011) از مقادیر ۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸ میلی‌لیتر عصاره دو گیاه *L.leucocephala* و *S. babylonica* استفاده کردند و نشان دادند که تولید پروتئین میکروبی و PF_{24} در مقایسه با شاهد افزایش

تأثیری نداشت ولی مقدار PF₂₄ را افزایش داد (Alexander et al., 2008).

جدول ۳. اثر عصاره تفاله انگور بر پارامترهای تولید گاز آزمایشگاهی

P value	SEM		جیره		پارامتر
	Q	L	۱۵	۳۰	
۰/۲۰۴	۰/۱۸۹	۴/۲۶۲	۲۶۴/۶۷	۲۶۱/۷۰	A
۰/۰۷۱	۰/۰۸۷	۰/۰۰۴	۰/۱۱۹	۰/۱۱۴	c
۰/۴۷۱	۰/۰۶۹	۰/۰۵۲	۰/۱۶۳	۰/۱۳۱	L
۰/۵۹۳	۰/۱۶۴	۳/۸۶۳	۲۴۴/۳۳	۲۴۶/۰۰	تولید گاز در زمان ۲۴
۰/۰۰۴	۰/۰۲۳	۰/۰۵۸	۲/۸۹	۳/۰۸	PF ₂₄
۰/۵۹۳	۰/۱۶۴	۰/۶۸۷	۶۵/۷۱	۶۶/۰۰	قابلیت هضم ماده آلی
۰/۰۰۵	۰/۲۹۶	۴/۴۳۴	۱۱۷/۹۶	۱۳۸/۲۰	تولید پروتئین میکروبی
۰/۱۲۵	۰/۱۷۸	۴/۱۵۴	۳۰۶/۳۶	۳۰۱/۶۶	عملکرد تولید گاز در زمان ۲۴
۰/۱۹۰	۰/۷۰۸	۸/۴۱۴	۷۹۷/۹۲	۸۱۵/۵۰	سویسترای هضم شده
۰/۹۲۶	۰/۱۶۲	۰/۱۸۹	۹/۵۱	۹/۷۵	انرژی متابولیسم پذیر

جیره صفر: جیره شاهد، جیره ۱۵: جیره شاهد به علاوه ۱۵ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل، جیره ۳۰: جیره شاهد به علاوه ۳۰ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل، A: تولید گاز مجانب (میلی لیتر)، C: سرعت تخمیر (ل/ساعت)، L: زمان تأخیر (ساعت)، PF₂₄ partitioning factor، L: خطی، Q: درجه دو.

پارامترهای شکمبه

مقادیر پارامترهای شکمبه در جدول ۴ نشان داده شده است. افزودن عصاره تفاله انگور تأثیری بر مقادیر کل اسیدهای چرب فرار، استات، و ایزووالرات نداشت که احتمالاً به این دلیل است که در قابلیت هضم تفاوتی ندارد، ولی باعث افزایش مقدار پروپیونات در جیره ۱۵ در مقایسه با شاهد شد (Q=۰/۰۴۸). مقدار بوتیرات به طور خطی با افزودن عصاره کاهش یافت (L=۰/۰۰۴). این کاهش احتمالاً به دلیل کاهش در تعداد پروتوزوا است (Babayemi et al., 2004). نسبت استات به پروپیونات در بین تیمارهای آزمایشی گردید (Q=۰/۰۰۱). اسیدهای چرب فرار محصولات نهایی تخمیر میکروبی شکمبه اند و نشان دهنده عرضه انرژی متابولیسم پذیر برای حیوان هستند (Van Soest, 1982) و کاهش این اسیدها برای حیوان مضر است. مقدار کل اسیدهای چرب فرار در بین تیمارها تفاوت معنی داری نداشت و عصاره تفاله انگور قابلیت تخمیر و دسترسی انرژی را تغییر نداده است. مشابه با پژوهش حاضر در مطالعات دیگر نیز تأثیری بر مقدار کل اسیدهای چرب فرار با افزودن عصاره حاوی متابولیت های ثانویه مشاهده نشد (Busquet et al., 2005; Getachew et al., 2008; Cardozo et al., 2004). برخلاف نتایج تحقیق حاضر (Jiménez-Peralta et al., 2011) افزایش مقدار کل اسیدهای چرب فرار را با افزودن مقادیر ۰/۶، ۱/۲، و ۱/۸ میلی لیتر عصاره دو گیاه *L. leucocephala* و *S. babylonica* به جیره پایه

گزارش کردند و Oh et al. (1968) کاهش در تولید کل اسیدهای چرب فرار را ارائه کردند. افزودن عصاره مقدار پروپیونات را افزایش و نسبت استات به پروپیونات را کاهش داد. افزایش در مقدار پروپیونات می تواند به دلیل تأثیرات ترکیباتی مانند فنول ها و ساپونین بر کاهش در تعداد پروتوزوا (جدول ۵) باشد که با نتایج تحقیق های دیگر نیز مطابقت دارد (Patra et al., 2006; Busquet et al., 2003; Lila et al., 2006; al.). با وجود اینکه تولید متان را اندازه گیری نکردیم ولی به هر حال این تغییرات می تواند سبب کاهش تولید متان گردد. این تغییرات مشابه با نتایج گزارش شده Busquet et al. (2005) بود. تولید متان در شکمبه در اثر فعالیت متانوزن ها و پروتوزوا است. کاهش متان می تواند در نتیجه تأثیرات مستقیم متابولیت های ثانویه بر فعالیت متانوزن یا تأثیرات غیرمستقیم بر هضم فیبر باشد (Newbold & Rode, 2006). در این پژوهش چون قابلیت هضم ماده آلی تحت تأثیر عصاره قرار نگرفت، افزایش پروپیونات و کاهش نسبت استات به پروپیونات می تواند نشان دهنده تأثیر مستقیم مواد مؤثر موجود در عصاره تفاله انگور بر میکروارگانیزم های تولیدکننده متان و احتمالاً کاهش تولید متان باشد (Calsamiglia et al., 2007; Vasta et al., 2011). مقدار آمونیاک با افزودن عصاره به صورت خطی کاهش یافت (L<۰/۰۰۰۱). کاهش مقدار آمونیاک با افزودن عصاره تفاله انگور می تواند به دلیل اثر مهارکنندگی مواد مؤثر موجود در عصاره بر فعالیت پروتئولیتیکی در شکمبه باشد (Frutos et al., 2004;)

جیره از عصاره تانن متراکم گیاه *calothyrsus* *Calliandra* مقدار آمونیاک را کاهش داد، که با نتایج این مطالعه هم‌سو است. همچنین *Cortes et al.* (2009) و *Abarghuei et al.* (2010) نیز کاهش در مقدار آمونیاک را نیز ذکر کردند. برخلاف نتایج تحقیق حاضر، *Busquet et al.* (2005) تفاوتی در مقدار آمونیاک تولیدشده با افزودن عصاره گیاه *Syzygium aromaticum* (حاوی ۸۵۰ گرم به کیلوگرم یوگونول) مشاهده نکردند.

(Mueller-Harvey, 2006). به‌علاوه معمولاً زمانی که جمعیت پروتوزوا در شکمبه مهار می‌شود و پس‌از آن کاهش تجزیه باکتریایی اتفاق می‌افتد، مقدار آمونیاک در شکمبه نیز کاهش می‌یابد (Williams & Coleman, 1991). کاهش در مقدار آمونیاک همراه با افزایش مقدار تولید پروتئین میکروبی، جریان اسیدهای آمینه را به روده افزایش می‌دهد و به بهبود بازده نیتروژن در حیوان کمک می‌کند (Wallace & Cotta, 1988; Makkar, 2003). *Tiemann et al.* (2010) نیز مشاهده کردند که استفاده از مقدار ۶۰۰ میلی‌گرم به گرم پروتئین خام

جدول ۴. اثر عصاره تفاله انگور بر مقدار اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول به گرم ماده آلی هضم‌شده) و آمونیاک (میلی‌گرم به دسی‌لیتر) شیرابه شکمبه

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

جیره صفر: جیره شاهد، جیره ۱۵: جیره شاهد به‌علاوه ۱۵ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل، جیره ۳۰: جیره شاهد به‌علاوه ۳۰ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل، L: خطی، Q: درجه دو.

جدول ۵. اثر عصاره تفاله انگور بر مقدار جمعیت پروتوزوای شکمبه (\log_{10}/g digesta)

افریوسکال‌سینه	دیپلودینینه	انتودینینه	داسی‌تریچا	ایزوتریچا	پروتوزوا		زمان
					کل	جیره	
۰/۵۵	۱/۶۲	۵/۷۹	۲/۲۲	۰/۰۰	۵/۸۵	صفر	۳
۰/۰۰	۰/۵۰	۴/۹۶	۰/۰۰	۰/۰۰	۴/۹۷	۱۵	
۰/۰۰	۲/۴۸	۴/۸۰	۲/۵۴	۰/۵۰	۴/۹۱	۳۰	
۰/۳۲۱	۱/۰۲۰	۰/۰۴۹	۰/۴۴۳	۰/۲۸۶	۰/۰۳۸		SEM
۰/۲۶۷	۰/۵۷۲	<۰/۰۰۰۱	۰/۶۲۹	۰/۲۶۷	<۰/۰۰۰۱		P value
۰/۵۰۶	۰/۳۹۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۵۰۶	۰/۰۰۰۱		خطی
۱/۱۱	۰/۰۰	۵/۴۰	۱/۰۴	۰/۵۲	۵/۳۸	صفر	۶
۰/۹۹	۳/۰۴	۵/۳۷	۱/۴۸	۰/۰۰	۵/۴۴	۱۵	
۰/۰۰	۲/۵۳	۵/۱۵	۱/۵۳	۰/۰۰	۵/۲۵	۳۰	
۰/۴۳۰	۰/۳۰۲	۰/۰۷۴	۰/۶۰۳	۰/۳۰۱	۰/۰۷۹		SEM
۰/۱۱۷	۰/۰۰۱	۰/۰۵۴	۰/۵۸۵	۰/۲۶۶	۰/۲۸۲		P value
۰/۴۳۹	۰/۰۰۳	۰/۳۲۹	۰/۷۹۸	۰/۵۰۶	۰/۲۲۸		خطی
۰/۵۲	۰/۵۵	۵/۴۵	۱/۵۷	۰/۰۰	۵/۴۸	صفر	۱۲
۰/۰۰	۱/۴۸	۵/۰۲	۰/۵۰	۰/۰۰	۵/۰۵	۱۵	
۰/۰۰	۴/۷۹	۴/۷۹	۰/۹۹	۰/۰۰	۵/۸۶	۳۰	
۰/۳۰۱	۰/۵۹۱	۰/۰۷۱	۰/۴۰۵	۰/۰۰	۰/۰۷۴		SEM
۰/۲۶۷	۰/۵۳۱	۰/۰۰۶	۰/۳۵۵	۰/۰۰	۰/۰۰۱		P value
۰/۵۰۶	۰/۱۴۵	۰/۲۹۵	۰/۱۶۵	۰/۰۰	۰/۲۵۴		خطی
۱/۵۷	۲/۶۱	۵/۶۰	۲/۰۹	۳/۱۳	۵/۶۰	صفر	۲۴
۰/۰۰	۰/۰۰	۴/۸۲	۰/۰۰	۰/۰۰	۴/۸۶	۱۵	
۰/۰۰	۰/۰۰	۴/۶۹	۰/۰۰	۰/۰۰	۴/۶۹	۳۰	
۰/۰۰	۰/۳۰۱	۰/۰۸۳	۰/۳۰۱	۰/۰۰	۰/۰۷۹		SEM
<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۳	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۲		P value
<۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۲	۰/۰۱۹	۰/۰۳۰	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۵		خطی

جیره صفر: جیره شاهد، جیره ۱۵: جیره شاهد به‌علاوه ۱۵ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل، جیره ۳۰: جیره شاهد به‌علاوه ۳۰ گرم به کیلوگرم ترکیبات فنولیک کل، L: خطی، Q: درجه دو.

جمعیت پروتوزوا

با افزودن عصاره مقادیر کل پروتوزوا و زیرخانواده انتودینینه در زمان‌های ۳، ۱۲، و ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون در مقایسه با جیره شاهد کاهش یافت. با افزودن عصاره دو جنس ایزوتریچا ($L < 0/0001$) و ($Q < 0/0001$) و داسی‌تریچا ($L = 0/003$ و $Q = 0/030$) و زیرخانواده‌های دیپلودینینه ($L = 0/0009$ و $Q = 0/012$) و افریوسکالسینه ($L < 0/0001$ و $Q < 0/0001$) نیز در زمان ۲۴ انکوباسیون کاهش یافتند (جدول ۵). اطلاعات محدودی در زمینه اثر عصاره تفاله انگور و ترکیبات فعال موجود در آن بر جمعیت پروتوزوا وجود دارد. کاهش پروتوزوا در اثر متابولیت‌های ثانویه احتمالاً به دلیل ساختار فنولیکی این متابولیت‌ها است. این ساختار به پاره‌شدن غشاء سلول، غیرفعال‌شدن آنزیم‌ها، و کاهش سوبسترا و یون‌های فلزی لازم برای متابولیسم سلولی می‌انجامد (Calsamiglia et al., 2007; Goel et al., 2005). مشابه با نتایج پژوهش حاضر (Abarghuei et al., 2005) و (Calsamiglia et al., 2007) نیز کاهش در تعداد پروتوزوا را به دلیل استفاده از تانن‌ها و متابولیت‌های ثانویه ذکر کردند. (Cardozo et al., 2006) مشاهده کردند که مخلوطی از سینمالدهید (۱۸۰ میلی‌گرم در روز) و یوگنول (۹۰ میلی‌گرم در روز) در جیره گوساله‌های گوشتی تعداد کل پروتوزوای هولوتریچا را افزایش داد و اثری بر انتودینومورف‌ها نداشت، ولی زمانی که مخلوط حاوی مقدار بیشتری از سینمالدهید (۶۰۰ میلی‌گرم در روز) و یوگنول (۳۰۰ میلی‌گرم در روز) بود، بر این پروتوزوا تأثیری نداشت. در

تحقیقی دیگر (Benchaar et al., 2008a) نشان دادند که استفاده از مقدار از ۱ گرم در روز به‌ازای هر گاو (۴۳ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم ماده خشک مصرفی) سینمالدهید و ۱۵۰ گرم در روز به‌ازای هر گاو تانن متراکم در تغذیه گاوهای شیری هیچ تأثیری بر تعداد کل پروتوزوا، جنس داسی‌ترچا، دیپلودینوم، انتودینوم، و پلی‌پلاسترون نداشت. درکل، نتیجه قانع‌کننده‌ای از مطالعات در زمینه اثر متابولیت‌های ثانویه بر جمعیت پروتوزوا در شکمبه به‌دست نمی‌آید (Chiquette et al., 2002; Sliwiniski et al., 1989)، که احتمالاً به دلیل تنوع در شکل جیره، مقدار متابولیت‌ها، گونه، ساختار شیمیایی متابولیت‌ها، تفاوت‌های حیوانی، و روش‌های نمونه‌گیریست (Yanez Ruiz et al., 2004).

نتیجه‌گیری کلی

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

REFERENCES

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

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

27. Makkar, H.P.S. (2010). *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In: Vercoe, P. E., Makkar, H. P. S., Schlink, A. C. (Eds.), *In vitro* Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies. IAEA, Dordrecht, the Netherlands, pp. 107–144.
28. Makkar, H. P. S., Sen, S., Blummel, M. & Becker, K. (1998). Effects of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* and *Acacia auriculoformis* on rumen fermentation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4324–4328.
29. Menke, K. H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal research and development*, 28, 7–55.
30. Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *Journal of Agriculture Science*, 92, 217–222.
31. Mueller-Harvey, I. (2006). Review, Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2010–2037.
32. Newbold, C. J. & Rode, L. M. (2006). Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *International congress series*, 138–147
33. Oh, H. K., Jones, M. B. & Longhurst, W. M. (1968). Comparison of rumen microbial inhibition resulting from various essential oils isolated from relatively unpalatable plant species. *Applied Microbiology*, 16, 39–44.
34. Patra, A. K., Kamra, D. N. & Neeta Agarwal. (2006). Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128, 276–291.
35. Rochfort, S., Parker, A. J. & Dunshea, F. R. (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, 69, 299–322.
36. SAS Institute. (2002). SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary, N.C. USA. 956 pp.
37. Sliwiniski, B. J., Soliva, C. R., Machmuller, A. & Kreuzer, M. (2002). Efficacy of plant rich in secondary constituents modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 101, 101-114.
38. Stack, R. J. & Cotta, M. A. (1986). Effect of 3-phenylpropanoic acid on growth of, and cellulose utilization by, cellulolytic ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 209–210.
39. Tiemann, T. T., Cortes, J. E., Pabo, M. L., Hess, H. D., Kreuzer, M. & Carulla, J. E. (2010). *In vitro* evidence for the importance of cultivation conditions on the effects of *Calliandra* tannins on ruminal escape of soybean protein and its post-ruminal degradability. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94, 225–230.
40. Van Soest, P.J. (1982). Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, O& Books, Corvallis, OR, USA, pp. 253–280.
41. Vasta, V. & Luciano, G. (2011). The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminants' products quality. *Small Ruminant Research*, 101, 150-159.
42. Wallace, R. J. & Cotta, M. A. (1988). Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: Hobson, P.N. (Ed.), *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier Applied Science, London, UK, pp. 217–249.
43. Williams, A. & Coleman, G. (1991). *The Rumen Protozoa*. Springer-Verlag, New York.
44. Yanez Ruiz, D. R., Moumen, A., Martin Garcia, A. I. & Molina Alcaide, E. (2004). Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *Journal of Animal Science*, 85, 2023-2032.