





Yemlere kestane ve mimoza tanen ekstraktı ilavesinin bazı *in vitro* rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkileri

Effects of chestnut and mimosa tannin extract supplementations to feeds on some *in vitro* rumen fermentation parameters

Uğur DOĞAN¹ , Mevlüt GÜNAL¹ 

¹ Isparta University of Applied Sciences, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Isparta, TURKEY.

MAKALE BİLGİSİ / ARTICLE INFO

Makale tarihçesi / Article history:


DOI: [10.37908/mkutbd.720879](https://doi.org/10.37908/mkutbd.720879)

Geliş tarihi / Received: 15.04.2020

Kabul tarihi / Accepted: 15.06.2020

Keywords:

Tannin extract, feeds, *in vitro* rumen fermentation.

 Corresponding author: Mevlüt GÜNAL

 mevlutgunal@isparta.edu.tr

ÖZET / ABSTRACT

Aims: The aim of this research was to study of the effects of mimosa and chestnut tannin on ruminal fermentation.

Methods and Results: The effects of inclusion of condensed tannin extract from mimosa and hydrolysed tannin from chestnut in the doses of 0, 25, 50, 75 g/kg dry matter (DM) feed into rumen fluid were investigated on *in vitro* ruminal fermentation characteristics, gas production, dry matter degradability and microbial protein production. The inclusion of 25 g tannin extract /kg DM into rumen fluid had no effects ($P>0.05$) on methane (CH_4) production and fermentation parameters except for ammonia (NH_3) -N concentration. The addition of 75 g tannin extract /kg DM into rumen fluid reduced ($P<0.01$) gas production from the insoluble fraction, potential gas production, the total volatile fatty acids (VFA), acetic acid, propionic acid, butyric acid and acetic acid/propionic acid ratio and NH_3 level. Relative to chestnut tannin extract; gas production from the insoluble fraction, NH_3 and CH_4 concentration reduced ($P<0.05$), propionic acid increased ($P<0.01$) and tended to reduce ($P>0.05$) with mimosa tannin extract.

Conclusions: Chestnut or mimosa tannin extract up to 50 g/kg DM feed can be used in ruminant nutrition but but high doses of these extract may decrease the rumen function and feed efficiency. Mimosa tannin extract has a stronger influence on reduction in NH_3 and CH_4 production compared to chestnut tannin extract.

Significance and Impact of the Study: Depending on the type and concentration used, tannins can reduce microbial fermentation and diet digestibility. However, when supplied at optimal concentrations in ruminant diets, chestnut or mimosa tannin extract have potential to reduce CH_4 and NH_3 losses without adversely affecting efficiency of ruminal fermentation.

Atıf / Citation: Doğan U, Günal M (2020) Effects of chestnut and mimosa tannin extract supplementations to feeds on some *in vitro* rumen fermentation parameters. *MKU. Tar. Bil. Derg.* 25(3) : 341-351. DOI: 10.37908/mkutbd.720879

GİRİŞ

Bitki dokularında yer alan tanenler polifenolik bileşiklerdir. Hidrolize ve kondense tanen olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Hidrolize tanenler; fenolik asit, glikoz ve quinik asidin poliesterleri olup suda

çözünmediği halde, kondense tanenler; flavan-3-ol'un yoğunlaşmasıyla oluşmuştur (McSweeney ve ark., 2001). Bazı meşe, kestane, ökalüptus, çam türlerinin yaprak ve sürgünleri % 20 ye kadar hatta % 50'ye kadar hidrolize tanenleri içerebildiği, buna karşın, kondense tanenlerin hidrolize tanenlere göre daha geniş bir yayılım gösterdiği

bildirilmektedir (Reed, 1995; Lowry ve ark., 1996). Ilıman ve tropikal baklagil otları % 0-5 oranında kondense tanen içermektedir. Örneğin gazal boynuzu (% 2-5), korunga (% 2-4), sulla (ispanyol korungası) (% 2-4), *Sericea lespedeza* (bir çeşit labada türü) (6-7 %) kondense tanen içermektedir (Reed, 1995; Lowry ve ark., 1996; Min ve ark., 2003).

Tanenlerde bulunan fenolik hidroksil gruplar yemlerdeki besin maddeleriyle, özellikle proteinlerle, bileşik oluşturma eğilimindedirler. Düşük düzeydeki tanenin şişmeyi önlediği, proteinlerin bypass özelliğini artırdığı, buna karşın yüksek düzeydeki tanenin ise yem tüketimini düşürdüğü, rumen mikrobiyal faaliyeti kısıtladığı, sindirim sistemindeki enzimlerinin aktivitelerini düşürerek yada besin maddeleri ile bileşik oluşturarak onların sindirilme derecesini düşürdüğü, sindirim sisteminde bazı organlarda dejenerasyona sebep olduğu ve besin maddelerinin emilimini kötüleştirdiği bildirilmektedir (McSweeney ve ark., 2001; Tabacco ve ark., 2006). Çoğunlukla kestane, mimoza ve quebracho ağaçlarından elde edilen tanenlerin ekstraktları genellikle dericilik ve boyacılık dışında şarap ve biranın berraklaştırılmasında, petrol kuyularındaki sondaj çamurunun akışkanlığının artırılmasında ve buhar kazanlarının çeperlerinde birikinti oluşumunun engellenmesinde kullanılmaktadır. Hayvan yemlerine tanen ekstraktlarının yem katkı maddesi olarak katılmasına yönelik ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Tabacco ve ark., 2006; Krueger ve ark., 2010; Jayanegara ve ark., 2012; Min ve ark., 2014).

Bu çalışmada, hidrolize tanen kaynağı olarak kestane tanen ve kondense kaynağı olarak tanen mimoza tanen ekstraktı kullanımının *in vitro* gaz üretimi, kuru madde sindirimi ve rumen fermentasyonuna etkileri araştırılmaya çalışılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Yem ve Hayvan Materyali

Araştırmanın yem materyalini, % 60 kaba yem (yonca, mısır silajı, buğday samanı) % 40 yoğun yem (arpa, ayçiçeği küspesi) içeren yem karması (toplam karma rasyon) oluşturmuştur (Çizelge 1). Rumen içeriği aynı yemle beslenen (% 60 kaba yem, % 40 yoğun yemi) laktasyondaki iki baş Holstein inekten alınmıştır. Yem materyali *in vitro* gaz üretim tekniği uygulanmadan önce 55 °C'de 48 saat ön kurutmaya tabi tutulmuş ve 1 mm elekten geçecek şekilde öğütülmüştür.

Üretici firmanın beyanına göre kestane (*Castanea sp.*) tanen ekstraktı (FARMATAN 75- Tanin Sevnica, Slovenya) % 74 hidrolize tanen; mimoza (*Mimosa tenuiflora*) tanen

ekstraktı (Mimosa Wattle Bark Extract- Teka Kimya-Tuzla-İstanbul) % 50.7 kondense tanen içermektedir.

In vitro Gaz Üretim Tekniğinin Uygulanması

Yem materyalinin *in vitro* koşullarda değerlendirilmesinde Menke ve ark. (1979) tarafından bildirilen *in vitro* gaz üretim tekniği kullanılmıştır. Gaz üretim miktarının saptanmasında 100 ml'lik özel cam tüplere (Model Fortuna, Häberle Labortechnik, Lonsee-Ettlenschieß, Germany) dört paralel olarak mimoza ve kestane tanen ekstraktının farklı dozları (0, 25, 50 ve 75 g/kg kuru madde (KM)) konarak, yem örneği ile yaklaşık 200±10 mg'a tamamlanmıştır. Daha sonra üzerine Menke ve ark. (1979)'nın bildirdiği yöntem göre hazırlanan rumen sıvısı/tampon çözeltisinden 30 ml ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler 39°C'deki su banyosunda fermentasyona bırakılmışlar ve sırasıyla 3, 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde fermentasyonla oluşan gaz miktarları saptanmıştır.

Zamana bağlı olarak gaz üretim parametreleri Orskov ve McDonald (1979) tarafından önerilen $y = a + b(1 - e^{-ct})$ modeli kullanılarak a, b ve c değerleri NEWAY adlı PC paket program yardımıyla hesaplanmıştır.

y = Herhangi bir t anındaki üretilen gaz miktarı (ml)

a = Kolay bir şekilde fermentasyona uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarı (ml)

b = Yavaş bir şekilde fermentasyona uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarı (ml)

c = b'nin fermente olma hızı (%)

t = Zaman (saat)

Fermentasyon sonunda tüpler içerisinde kalan rumen sıvısında pH, amonyak (NH₃) ve toplam uçucu yağ asidi (UYA) ile birlikte bireysel olarak uçucu yağ asitleri saptanmıştır. *In vitro* ortamda fermentasyonla oluşan karbondioksit (CO₂) ve metan (CH₄) gazları ise elde edilen rumen sıvılarında yapılan UYA'den yararlanarak aşağıdaki eşitlikler ile hesaplanmıştır (Blümmel ve ark., 1999).

CO₂ = asetik asit (mmol)/2 + propiyonik asit (mmol)/4 + 1.5 x butirik asit (mmol)

CH₄ = (asetik asit (mmol) + 2 x butirik asit (mmol)) - CO₂

In vitro kuru madde gerçek sindirim derecesi ve mikrobiyal protein üretiminin saptanması

Yaklaşık 0.5 g yem örneği 30 ml çözeltiyle (10 ml rumen sıvısı + 20 ml yapay tükürük) 100 ml'lik cam şırıngalar içerisinde 24 saat 39 °C'de fermentasyona bırakılmıştır (Menke ve ark., 1979). Yirmi dört saatlik fermentasyonun tamamlanmasından sonra şırıngalarda kalan artık kısım beher içerisine taşınarak üzerine 50 ml nötral deterjan lif (NDF) çözeltisine ilave edilerek bir saat kaynamaya bırakılmış, daha sonra beher içeriği cam kroze (Grooch

groze, porozite: 1)'de süzölmüştür. Gerçek sindirilmiş kuru madde (GSKM) miktarı, kuru madde gerçek sindirim derecesi (KMGSD), mikrobiyal protein üretimi ve taksimat faktörü Blümmel ve ark. (1997)'nin bildirdiği yönteme göre yapılmıştır.

GSKM (mg) = fermentasyona bırakılan KM (mg) – kalan KM (mg)

KMGSD (%)=(GSKM/ fermentasyona bırakılan KM)

Mikrobiyal protein (MP) (mg/g KM) = GSKM (mg)– (gaz üretimi (GÜ) X 2.2 mg/ml)

Taksimat Faktörü (PF) = GSKM/GÜ

Kimyasal Analizler

Yem örneği besin madde içerikleri Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Laboratuvarında AOAC (1990) tarafından bildirilen analiz yöntemine göre, hücre duvarı bileşimi Van Soest ve ark. (1991)'nin bildirdiği deterjan lif analiz yöntemine göre ANKOM 200 Fiber Analyzer (ANKOM Technology)'da analiz edilmiştir. Fermentasyon pH'sı dijital pH metre ile (HANNA HI 221) ile yapılmıştır. Fermentasyon sıvısından NH₃ analizi için alınan örnekler, daha sonra analiz yapılmak üzere, doğrudan -20 °C'ye konulurken, UYA'ların analizi için alınan örnekler ise 10 N H₂SO₄'den 100 µl eklendikten sonra -20 °C'ye konulmuştur. Örnekler analiz sırasında 5°C'de çözdürölmüştür. Örneklerin NH₃ konsantrasyonu Kjeldahl metodundan yararlanarak belirlenmiştir (Preston, 1995). Uçucu yağ asidi analizi için ayrılan örneklerde 10 dakika 4.000 g'de santrifüj edildikten sonra üstte kalan berrak kısımda uçucu yağ asidi analizi (Galyean, 1989) yapılmıştır. Uçucu yağ asitleri, SDÜ Deneysel ve Gözlemsel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gaz kromatografisinde (QP-5050 detektörlü Shimadzu 2010 Plus) CP-Wax 52 CB (50 m x

0.32 mm. 0.25 µm) kapiller kolon kullanılarak belirlenmiştir. Enjektör sıcaklığı 240 °C, detektör sıcaklığı 250 °C olarak ayarlanmış ve helyum gazı taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır.

İstatistiksel Analizler

Araştırma tesadüf parsellerinde 2 (tanen kaynağı) x 4 (tanen dozu) faktöriyel deneme desenine göre planlanmış ve aşağıdaki matematik model kullanılmıştır (Düzgüneş ve ark., 1983).

$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$

Y_{ijk} = i'inci tanen ekstrakt kaynağının j'inci tanen ekstrakt dozunun 1'inci gözlem değeri

μ = genel ortalama

α_i = i'inci tanen ekstrakt kaynağının etkisi (i =2; 1=kestane; 2 = mimoza)

β_j = j'inci tanen ekstrakt dozunun etkisi (j =4; 1=0, 2=25 g, 3 = 50 g, 4 = 75 g//kg KM yem)

$\alpha\beta_{ij}$ = i'inci tanen ekstraktı kaynağı ile j'inci tanen ekstrakt dozları arasındaki interaksiyonun etkisi

ϵ_{ijk} = deneme hatası

Araştırmadan elde edilen verilerin ortalamaları arasındaki farklılıkların saptanmasında varyans analizi (General Linear Model-MINITAB), farklılıkların önem düzeylerinin belirlenmesinde ise Duncan çoklu karşılaştırma testinden yararlanılmıştır (Düzgüneş ve ark., 1983).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Araştırmada kullanılan toplam karma rasyonun kimyasal içeriği saptanmış ve Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Toplam karma rasyon (TMR)'un kimyasal bileşimi
Table 1. Chemical composition of total mixed ration (TMR)

Kuru madde (KM), %	90.12
Organik madde, % KM	91.47
Ham protein, % KM	14.68
Ham kül, % KM	8.53
Asit deterjan lif, % KM	21.38
Nötral detarjan lif, % KM	39.56

Çizelge 2. Mimoza ve kestane tanen ekstraktının farklı dozlarının *in vitro* gaz üretimi (ml) ile gaz üretim parametreleri üzerine etkisi

Table 2. Effect of different doses of mimosa and chestnut tannin extract on *in vitro* gas production (ml) and gas production parameters

Tanen kaynağı	Tanen dozu , g/kg KM	Gaz üretimi (ml)								a	b	c	a+b
		İnkübasyon zamanı (saat)											
		3	6	12	24	48	72	96					
Mimoza	0	21.75	41.50	52.75	67.00	72.50	75.75	76.75	6.76	68.14	0.101	74.90	
	25	20.75	40.50	51.25	63.75	70.00	73.00	74.00	6.40	65.51	0.100	71.91	
	50	21.50	38.25	51.75	62.25	67.75	70.75	72.00	6.05	63.84	0.103	69.89	
	75	20.19	34.50	50.00	58.50	63.25	66.25	67.75	5.02	61.16	0.104	66.17	
Kestane	0	21.75	41.50	52.75	67.00	72.50	75.75	76.75	6.76	68.14	0.101	74.90	
	25	22.25	38.25	54.50	66.75	72.00	75.00	76.25	5.69	68.57	0.100	74.26	
	50	20.75	39.75	52.50	63.50	69.00	73.25	74.50	5.33	66.57	0.103	71.90	
	75	21.00	36.00	51.25	61.50	66.50	69.00	70.50	5.37	63.13	0.102	68.50	
SEM									0.557	1.470	0.001	0.094	
Tanen kaynağı	Mimoza									6.01	64.99	0.103	71.00
	Kestane									5.81	67.12	0.102	72.94
P										0.62	0.04	0.75	0.07
Tanen dozu	0									6.46	69.58a	0.101	76.04a
	25									6.04	67.04a	0.100	73.08ab
	50									5.69	65.20ab	0.104	70.89b
	75									5.45	62.41b	0.102	67.86c
	P									0.34	0.01	0.17	0.01
Tanen kaynağı*tanen dozu													
Mimoza	0									6.76	68.15	0.101	74.91
	25									6.40	65.51	0.100	71.91
	50									6.05	63.84	0.103	69.89
	75									5.02	61.16	0.104	66.18
Kestane	0									6.76	68.15	0.101	74.91
	25									5.69	68.57	0.100	74.26
	50									5.33	66.57	0.103	71.90
	70									5.38	63.14	0.101	68.52
P										0.56	0.69	0.82	0.72

^{a,b,c}Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.05).

a : kolay bir şekilde fermentasyona uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarı (ml), b : yavaş bir şekilde fermentasyona uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarı (ml), c : b'nin fermente olma hızı (%), a+b:potansiyel gaz üretimi, KM: kuru madde

Mimoza ve kestane tanen ekstraktının farklı dozlarının *in vitro* gaz üretimi ile gaz üretim parametreleri üzerine etkisi

Mimoza ve kestane tanen ekstraktının farklı dozlarının *in vitro* gaz üretimi ile gaz üretim parametreleri üzerine etkisi Çizelge 2'de verilmiştir.

Bu çalışmada en düşük dozda (25 g/kg KM) tanen ekstraktı kullanımının, *in vitro* gaz üretim parametrelerini etkilememesi (P<0.05) bu seviyede mikrobiyal aktivitenin etkilenmediğini göstermektedir. Daha önce bazı araştırmacılar da (Makkar ve ark., 1995; Waghorn ve Shelton, 1997) rasyonda 50 g/kg KM'nin altında tanen bulunmasının rumen fermentasyon parametrelerini etkilemediğini bildirmişlerdir. Buna karşın en yüksek dozda (75 g/kg KM) tanen ekstraktı kullanımının, yavaş bir şekilde fermentasyona uğramış

kısımdan elde edilen gaz miktarını düşürmüştür (P<0.01). Tanenler mikroorganizmalarla ve/veya onların enzimleriyle ya da karbonhidratlarla kompleks bileşikler oluşturarak substrat sindirimini düşürmektedir (Bae ve ark., 1993; Jones ve ark., 1994; Nsahlai ve ark., 2011). Karbonhidratların mikrobiyal sindirimini düşmesi gaz üretimini düşürmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda 50 g/kg KM'nin üzerinde tanen içeren rasyonların *in vitro* gaz üretimini azalttığı (Bento ve ark., 2005; Jayanegara ve ark., 2015) bildirilmektedir. Hidrolize tanenler kondense tanenlere göre daha küçük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Küçük moleküler ağırlıklı tanenlerin mikroorganizmalar için daha toksik olduğu belirtilmektedir (Patra ve Saxena, 2011). Ancak mevcut çalışmada mimoza tanen ekstraktı kullanımı kestane tanen ekstraktına göre yavaş bir şekilde fermentasyona

uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarını azaltmıştır (P=0.04). Bu sonuçlar kestane tanesindeki hidrolize tanenin bir kısmının mikrobiyal yıkımıyla açıklanabilir. Kondense tanenler mikrobiyal yıkıma dirençli olduğu halde, hidrolize tanenler mikrobiyal olarak kısmen yıkılmaktadır (Field ve Lettinga, 1987; McSweeney ve ark., 2001). Daha önce Cieslak ve ark. (2014) kestane tanen ekstraktının kondense tanence zengin *Vaccinium vitis-idaea* ekstraktından daha fazla gaz üretimi ürettiğini bulmuşlardır.

Mimoza ve kestane tanen ekstraktının farklı dozlarının rumen fermentasyonuna etkisi

Mimoza ve kestane tanen ekstraktının farklı dozlarının rumen fermentasyonuna etkisi Çizelge 3’de verilmiştir.

Çizelge 3. Mimoza ve kestane tanen ekstraktının farklı dozlarının rumen fermentasyonu üzerine etkileri
Table 3. Effects of different doses of mimosa and chestnut tannin extract on rumen fermentation

Etkiler	Toplam UYA mmol/L	Uçucu yağ asitleri, mmol/100mmol						C ₂ /C ₃	pH	NH ₃ N mg/dL	
		C ₂	C ₃	C ₄	isoC ₄	C ₅	isoC ₅				
Tanen kaynağı											
Mimoza	123.25	51.32	20.85a	17.99	2.91	3.25	3.59	2.55	6.52	27.87b	
Kestane	126.00	51.98	19.61b	18.18	3.12	3.29	3.79	2.67	6.47	29.96a	
SEM	1.129	0.508	0.422	0.322	0.096	0.094	0.114	0.053	0.026	0.304	
P	0.09	0.17	0.01	0.39	0.07	0.72	0.16	0.07	0.23	0.01	
Tanen dozu, g/kg KM											
0	128.50a	52.74a	18.12c	18.52	3.17a	3.45	3.98ab	2.92a	6.43	33.20a	
25	126.75a	52.97a	18.19c	18.24	3.16a	3.24	4.11a	2.82a	6.45	30.59b	
50	124.38ab	51.15ab	21.15b	17.91	3.05ab	3.38	3.48bc	2.47b	6.54	27.77c	
75	118.88b	49.76b	23.47a	17.67	2.67b	3.02	3.28c	2.23b	6.55	23.60d	
SEM	1.597	0.890	0.597	0.455	0.137	0.133	0.162	0.076	0.037	0.429	
P	0.01	0.01	0.01	0.06	0.01	0.07	0.01	0.01	0.08	0.01	
Tanen kaynağı*tanen dozu											
0	128.50	52.74	18.12	18.52	3.17	3.45	3.98	2.92	6.43	33.20a	
25	126.25	52.07	19.03	18.41	3.88	3.32	3.99	2.78	6.48	29.56b	
Mimoza	50	123.00	51.06	21.66	17.70	3.43	3.41	3.28	2.41	6.58	26.60cd
75	115.25	49.45	24.59	17.32	2.99	2.83	3.11	2.08	6.56	21.60e	
0	128.50	52.74	18.12	18.52	3.17	3.45	3.98	2.92	6.43	33.20a	
Kestane	25	127.25	53.88	17.33	18.08	3.26	3.16	4.23	2.85	6.41	31.62ab
50	125.75	51.24	20.63	18.11	3.29	3.36	3.69	2.54	6.50	28.94bc	
75	122.50	50.07	22.35	18.02	2.75	3.21	3.27	2.37	6.53	25.60d	
SEM	2.259	1.258	0.845	0.644	0.193	0.188	0.229	0.107	0.053	0.607	
P	0.41	0.53	0.23	0.51	0.45	0.39	0.78	0.43	0.84	0.02	

^{a,b,c,d,e} Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.05).

UYA: uçucu yağ asidi, C₂: asetik asit, C₃:propiyonik asit, C₄: butirik asit, C₅: valerik asit, NH₃N: amonyak N, KM:kuru madde

Rasyona en düşük dozda (25 g/kg KM) tanen ekstraktı ilavesi toplam UYA üretimini etkilememesine (P>0.05) rağmen, en yüksek dozun (75 g/kg KM) toplam UYA miktarını düşürmesi (P<0.01); tanenlerin rumen mikroorganizmaları üzerine antimikrobiyal etkilerinin kullanılan dozla ilişkili olduğu sonucunu göstermektedir. Hassanat ve Benchaar (2013) hidrolize ve kondense

tanenlerin 50 g /kg KM’den daha yüksek düzeylerde rasyona ilavesinin toplam UYA üretimi düşürme eğilimine yönelttiğini saptamışlardır. Rumen sıvısına 25 g/kg KM tanen ekstraktı ilavesi UYA bileşenleri üzerine etkili olmamıştır (P>0.05). Poncet ve R’emond (2002) ve Krueger ve ark. (2010) rasyona 24 g/kg KM ‘ye kadar kestane tanen ekstraktı ilavesinin asetik, propiyonik ve

bütirik asit üretimini etkilemediğini saptamışlardır. Buna karşın Carulla ve ark. (2005) ve Hess ve ark. (2006) koyun rasyonlarına kondense tanen kaynağı olarak akasya tanen ilavesinin asetik asit üretimini düşürdüğünü, propiyonik asit üretimini ise artırdığını bulmuşlardır. Rumen sıvısına 75 g/kg KM tanen ekstraktı ilavesi propiyonik asit düzeyini artırmış ($P<0.01$), asetik asit ve *iso* asitlerini düşürmüştür ($P<0.01$), bütirik ve valerik asitlerini düşürme eğilimine ($P=0.06$) sokmuştur. Benzer şekilde Khiaosa-Ard ve ark. (2009) rumen sıvısına 79 g/kg KM akasya tanen ilavesinin asetik/propiyonik asit oranını düşürdüğünü bildirmektedirler. Rumende selülotik mikroorganizmalar genellikle asetik ve bütirik asit üretmektedirler (Stewart, 1991). Bu yüzden mevcut araştırmada çoğunlukla selülotik mikroorganizmaların etkilendiği söylenebilir. Jayanegara ve ark. (2015) rumen sıvısına artan düzeylerde mimoza ya da kestane tanen ilavesinin *Fibrobacter succinogenes* ve *Ruminococcus flavefaciens* gibi selülotik bakteriler ile anaerobik fungusların sayısının paralel olarak azaldığını saptamışlardır. Nelson ve ark. (1997) tanenlerin *Fibrobacter succinogenes* türü selülotik bakterilerin aktivitelerini *Prevotella ruminicola* ve *Streptococcus bovis* gibi amilolitik bakterilerin aktivitelerine göre daha çok etkilediklerini bulmuşlardır. Mevcut çalışmada mimoza tanen ekstraktı kullanımı toplam UYA miktarı ($P=0.09$) ile *isobütirik* asiti ($P=0.07$) kestane tanen ekstraktına göre düşürme eğilimine yöneltirken, propiyonik asit düzeyini artırması ($P<0.01$) özellikle yüksek konsantrasyonda kondense tanenlerin hidrolize tanenlere göre selülotik mikroorganizmalar üzerinde daha etkili bir antimikrobiyal olduğuyla açıklanabilir. Jayanegara ve ark. (2015) rumen sıvısına kestane tanen ekstraktı ilavesinin mimoza tanen ekstraktına göre toplam UYA üretimindeki azalmanın daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Min ve ark. (2014) meradaki keçi rasyonlarına günde 100 g kestane tanen ekstraktı ilavesinin kondense tanen ekstraktı ilavesine göre daha fazla toplam UYA üretimi gerçekleştiğini saptamışlardır. Hassanat ve Benchaar (2013)'a göre hidrolize tanenler asetatik/propiyonik asit oranını ekilememesine rağmen, kondense tanenler düşürmektedirler. En düşük dozda (25 g/kg KM) tanen ekstraktı kullanımının rumen pH'sını etkilememesine rağmen, 50 ve 75 g/kg KM tanen ekstraktı ilavesiyle artış eğilimi ($P=0.08$), asetik ve bütirik asit üretimi ile toplam UYA miktarındaki azalış eğilimi ve propiyonik asit üretimindeki artış ile açıklanabilir (Çizelge 3). Bu bulgular hidrolize ve kondense tanenler ile çalışan Hassanat ve Benchaar (2013)'nın bildirdikleri sonuçlarla da uyum içinde bulunmuştur. Tanenler proteinlerle kompleks bileşikler oluşturarak ya da mikroorganizmalarla ve/veya onların proteaz

enzimleriyle rumende amonyak seviyesinin azalmasına neden olmaktadır. Rumende oluşan protein-tanen kompleksi abomasumda (pH 2.5-3.5) ve ince barsakta (pH 8.0) kendini oluşturan birimlere parçalanmaktadır. Serbest kalan proteinler ince barsakta emilime uğramaktadır (Patra ve Saxena, 2011). Mevcut araştırmada rumen sıvısına bütün seviyelerde tanen ekstraktı ilavesi rumende amonyak seviyesini düşürmüştür ($P<0.01$). Hassanat ve Benchaar (2013) rumen sıvısına 20 g/kg KM akasya yada kestane tanen ekstraktı ilavesinin amonyak oranını düşürdüğünü bildirmektedirler. Rumende amino asitlerin deaminasyonunun azalması da rumende amonyak seviyesinin azalmasına katkıda bulunmaktadır. Rumen sıvısına 75 g/kg KM tanen ekstraktı ilavesinin *iso* asitleri düşürmesi ($P<0.01$) deaminasyonun azalışıyla açıklanabilir. Mevcut araştırmada toplam UYA ve UYA bileşenleri ile karşılaştırıldığında amonyak düzeyi daha fazla etkilenmiştir. Bu sonuç tanenlerin proteinlerle karbonhidratlardan daha fazla bileşik oluşturma eğilimiyle açıklanabilir (Min ve ark., 2003). Tanenlerin moleküler ağırlığı arttıkça proteinlerle bileşik oluşturma kapasitesi düşmektedir (Hagerman ve Butler, 1989). Ancak mevcut çalışmada mimoza tanen ekstraktı kullanımıyla kestane tanen ekstraktı göre NH_3 'ü düşürmüştür ($P<0.01$), *isobütirik* asidi düşürme eğilimine yöneltmiştir ($P=0.07$). Bu sonuçlar hidrolize tanen-protein kompleksinin bir kısmının mikrobiyal enzimlerle yıkılmasıyla açıklanabilir. Kondense tanen-protein kompleksi mikrobiyal yıkıma dirençli olduğu halde (McSweeney ve ark., 1999), hidrolize tanen-protein kompleksi mikrobiyal olarak kısmen yıkılmaktadır (Patra ve Saxena, 2011).

Mimoza ve kestane tanen ekstraktının farklı dozlarının *in vitro* kuru madde gerçek sindirim derecesi ve mikrobiyal protein üretimi üzerine etkisi

Mimoza ve kestane tanen ekstraktının farklı dozlarının *in vitro* kuru madde gerçek sindirim derecesi ve mikrobiyal protein üretimi üzerine etkisi Çizelge 4'de verilmiştir. Bu çalışmada 75 g/kg KM dozda tanen ekstraktı kullanımı *in vitro* kuru madde gerçek sindirim derecesini azaltmış ($P<0.01$), mimoza tanen ekstraktı kullanımı kestane tanen ekstraktına göre düşürme eğilimine yöneltmiştir ($P=0.09$). Daha önce Jayanegara ve ark. (2015) kestane ya da sumak gibi hidrolize tanenler ile akasya yada quebracho tanen gibi kondense tanenlerin artan dozlarıyla (0.5, 0.75 ve 1.0 mg/ml) *in vitro* kuru madde sindirilebilirliğinde quadratik bir azalma saptamışlardır. Azalma kondense tanenlerde daha fazla olmuştur. Makkar ve ark. (1995) kondense tanenlerin yemlerin *in*

vitro sindirilebilirliğini hidrolize tanenlere göre daha fazla düşürdüğünü bulmuşlardır.

Çizelge 4. Mimoza ve kestane tanenin farklı dozlarının *in vitro* kuru madde gerçek sindirim derecesi ve mikrobiyal protein üretimi üzerine etkileri

Table 4. Effects of different doses of mimosa and chestnut tannin extract on *in vitro* true dry matter digestibility and microbial protein production

Etkiler	KMGSD, %	MPÜ, g	PF	
Tanen kaynağı				
Mimoza	70.66	130.72	3.70	
Kestane	72.38	132.47	3.67	
SEM	0.692	2.105	1.028	
P	0.09	0.62	0.68	
Tanen dozu, g/kg KM				
0	74.48a	129.80	3.55b	
25	73.46ab	133.97	3.66ab	
50	70.87ab	133.38	3.74ab	
75	67.26b	129.25	3.79a	
SEM	0.978	2.976	1.453	
P	0.01	0.70	0.04	
Tanen kaynağı* tanen dozu				
	0	74.48	129.80	36.39
	25	72.62	132.85	32.66
Mimoza	50	69.40	134.35	30.96
	75	63.39	125.90	25.82
	0	74.48	129.80	36.39
	25	74.31	135.10	34.53
Kestane	50	71.25	132.40	33.16
	75	66.66	132.40	28.88
SEM		1.235	3.878	2.009
P		0.68	0.83	0.88

^{a,b} Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.05).

KMGSD: *in vitro* kuru madde gerçek sindirim derecesi, MPÜ: mikrobiyal protein üretimi, PF: taksimat faktörü, KM:kuru madde

Mikrobiyal protein üretimi tanen ekstraktı kaynağı ve dozundan etkilenmemiştir (P>0.05). Yemlerin PF değerinin mikrobiyal protein sentezleme etkinliğini gösteren önemli bir gösterge olduğu ve PF değeri yüksek olan yemlerin mikrobiyal protein sentezleme etkinliğinin de yüksek olduğu bildirilmektedir (Blümmel ve Lebzien, 2001). Mevcut çalışmada rumen sıvısına tanen ekstraktı kullanımıyla PF değerleri yükselme eğilimi göstermiş, 75 g/kg KM dozda tanen ekstraktı kullanımı kontrolden farklı bulunmuştur (P<0.05). Yapılan bazı çalışmalarda da rasyonlarda tanen kullanımıyla PF faktörün artma eğilimine yöneldiği görülmüştür (Baba ve ark., 2002; Getachew ve ark., 2000; Makkar ve ark., 1995).

Mimoza ve kestane tanen ekstraktının farklı dozlarının karbondioksit ve metan gazı üretimine etkisi

Mimoza ve kestane tanen ekstraktının farklı dozlarının CO₂ ve metan CH₄ gazı üretimi üzerine etkileri saptanmış ve Çizelge 5'de verilmiştir. Rumen sıvısı UYA'lerinden yararlanarak saptanan CO₂ gazı üretimi tanen ekstraktı dozuna bağlı olarak önemli düzeyde azalmıştır (P<0.01). Metan gazı üretimi ise 25 g/kg KM doz hariç artan dozla önemli derecede düşmüştür (P<0.01). Beauchemin ve ark. (2007) rasyona 25 g/kg KM'ye kadar quebracho tanen ekstraktı ilavesinin metan salınımını etkilemediğini bulmuşlardır. Jayanegara ve ark. (2012) *in vivo* ve *in vitro* araştırmalara dayalı bir meta analiz sonunda, rasyondaki tanen oranının % 17'ye kadar artışıyla, artan tanen oranıyla metan salınımının doğrusal olarak düştüğü

sonucuna varmışlardır. Genel olarak tanenlerin metan üretimindeki düşürücü etkisi tanenlerin metanojenlere direkt toksik etkisinden kaynaklanmaktadır. Jayanegara ve ark. (2009) 1 mg/ml quebracho, mimoza ve kestane tanen ekstraktı içeren rasyonlarda metanojen sayılarının sırasıyla % 24, 29 ve 37 oranında düştüğünü saptamışlardır. Tanenler ayrıca yem organik madde sindirimi ile selüloz sindirimini düşürerek toplam UYA, asetik ve bütirik asit üretimini azaltmak yoluyla metan üretimindeki düşüşe katkıda bulunmaktadır. Mevcut

araştırmada metan üretimindeki azalma; asetik ve bütirik asit ile toplam UYA miktarındaki azalış ile propiyonik asit üretimindeki artışa bağlanabilir. Mimoza tanen ekstraktıyla metan üretimindeki azalma kestane tanen ekstraktından daha fazla olmuştur. Bu duruma propiyonik asit oranındaki artış, asetik ve bütirik asit üretimindeki sayısal düşüş ile toplam UYA miktarındaki azalış eğilimi sebep olmuştur. Field ve Lettinga (1987) tanenlerin kaynağı ve dozunun onların antimetanojenik aktivitelerini etkilediğini bildirmektedirler.

Çizelge 5. Mimoza ve kestane tanenin farklı dozlarının karbondioksit ve metan gazı üretimi üzerine etkileri

Table 5. Effects of different doses of mimosa and chestnut tannin extract on carbon dioxide and methane gas production

Etkiler	CO ₂ , mmol/L	CH ₄ , mmol/L	
Tanen kaynağı			
Mimoza	71.45	36.32b	
Kestane	72.88	37.83a	
SEM	0.746	0.407	
P	0.18	0.02	
Tanen dozu, g/kg KM			
0	75.41a	39.96a	
2.5	74.90ab	39.67a	
5	71.08bc	36.00b	
7.5	67.24c	32.70c	
SEM	1.055	0.576	
P	0.01	0.01	
Tanen kaynağı* Tanen dozu			
	0	75.41	39.96
	2.5	75.49	39.05
Mimoza	5	69.29	34.88
	7.5	65.57	31.41
	0	75.41	39.96
	2.5	74.31	40.28
Kestane	5	72.87	37.13
	7.5	68.91	33.99
SEM		1.492	0.815
P		0.29	0.40

^{a,b,c}Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.05).

CO₂: karbondioksit, CH₄: metan, KM:kuru madde

Sonuç olarak; yeşillere kestane ve mimoza tanen ekstraktı ilavesinin *in vitro* gaz üretimi, kuru madde sindirimi ve rumen fermentasyonu üzerine etkileri tanen kaynağı ve dozundan etkilenmektedir. Rumen sıvısına 25 g/kg KM tanen ekstraktı ilavesi NH₃ hariç fermentasyon parametreleri üzerinde etkili olmamaktadır. Rasyona 75 g/kg KM tanen ekstraktı ilavesi asetik/ propiyonik asit oranı, NH₃ düzeyi ile CH₄ gazı üretimini önemli düzeyde azaltmasına rağmen, toplam UYA üretimini olumsuz yönde etkilememektedir. Bu yüzden rasyondaki tanen konsantrasyonu 50 g/kg KM'ı geçmemelidir. Mimoza

tanen ekstraktının amonyak ve metan üretimindeki düşürücü etkisi kestane tanen ekstraktından daha yüksektir. Ancak mevcut bulgular yapılacak *in vivo* çalışmalarla desteklenmelidir.

ÖZET

Amaç: Bu araştırmada; mimoza ve kestane tanen ekstraktı ilavesinin rumen fermentasyonu üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem ve Bulgular: Rumen sıvısına 0, 25, 50 ve 75 g/kg kuru madde (KM) dozlarında mimoza ve kestane tanen

ekstraktı ilavesinin *in vitro* gaz üretimi, kuru madde sindirilebilirliği, mikrobiyal protein üretimi ile rumen fermentasyonu üzerine olan etkileri incelenmiştir. Rumen sıvısına 25 g/kg KM tanen ekstraktı ilavesi amonyak (NH₃) hariç fermentasyon parametreleri üzerinde etkili olmamıştır (P>0.05). Buna karşın rumen sıvısına 75 g/kg KM tanen ekstraktı ilavesi yavaş bir şekilde fermentasyona uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarı, potansiyel gaz üretimi ve rumen sıvısı parametrelerinden toplam uçucu yağ asitleri (UYA), asetik asit, butirik asit, asetik/ propiyonik asit oranı, NH₃ düzeyi ile karbondioksit (CO₂) ve metan (CH₄) gazı üretimini önemli düzeyde azaltmıştır (P<0.01). Kestane tanen ekstrakt ilavesiyle karşılaştırıldığında mimoza tanen ekstrakt ilavesi NH₃ düzeyi (P<0.01), yavaş bir şekilde fermentasyona uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarı ile CH₄ miktarını düşürmüştür (P<0.05), propiyonik asit miktarını artırmıştır (P<0.01), toplam UYA, *isobütirik asit*, kuru maddenin gerçek sindirim derecesi ile asetik/propiyonik asit oranını ise düşürme eğilimine yöneltmiştir (P>0.05).

Genel Yorum: Sonuç olarak, ruminant beslemede 50 g/kg KM'a kadar tanen ekstraktının rasyonda kullanılmasının uygun olacağı, daha yüksek dozda kullanılması durumunda rumen fermentasyonu ve yemden yararlanmayı olumsuz etkileyebileceği, mimoza tanen ekstraktının NH₃ ve CH₄ üretimindeki düşürücü etkisinin kestane tanen ekstraktından daha yüksek olduğu söylenebilir.

Çalışmanın Önemi ve Etkisi: Tanenler kaynağı ve dozuna bağlı olarak, mikrobiyal fermentasyon ve rasyon sindirilebilirliğini düşürebilir. Buna karşın kestane yada mimoza tanen ruminant rasyonlarına uygun düzeylerde katıldığı zaman, ruminal fermentasyon olumsuz etkilenmeksizin CH₄ ve NH₃ salınımının düşürülmesine yardımcı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Tanen ekstraktı, yem, *in vitro* rumen fermentasyon

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAP) tarafından desteklenen SDUBAP 4008-YL1-14' nolu projenin bir bölümünü içermektedir. Projeyi destekleyen SDUBAP Komisyonu Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMA BEYANI

Yazarlar çalışma konusunda çıkar çatışmasının olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- AOAC (1990) Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 15th ed., Vol. 1, AOAC, Washington, DC, pp. 69-79.
- Baba ASH, Castro FB, Ørskov ER (2002) Partitioning of energy and degradability of browse plants *in vitro* and the implications of blocking the effects of tannin by the addition of polyethylene glycol. Anim. Feed Sci. Technol. 95: 93–104.
- Bae HD, McAllister TA, Yanke J, Cheng K-J, Muir AD (1993) Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2132–2138.
- Beauchemin KA, McGinn SM, Martinez TF, McAllister TA (2007) Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. 85: 1990–1996.
- Bento MHL, Makkar HPS, Acamovic T (2005) Effect of mimosa tannin and pectin on microbial protein synthesis and gas production during *in vitro* fermentation of 15N-labelled maize shoots. Anim. Feed Sci. Technol. 123-124:365–377.
- Blümmel M, Makkar HPS, Becker K (1997) *In vitro* gas production- A technique revised. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 77: 24-34.
- Blümmel M, Aiple KP, Steingass H, Becker K (1999) A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas evolution *in vitro* in feedstuffs of widely differing quality. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 81: 157-167.
- Blümmel M, Lebzien P (2001) Predicting ruminal microbial efficiencies of dairy rations by *in vitro* techniques. Liv. Prod. Sci. 68(2-3): 107-117.
- Carulla JE, Kreuzer M, Machmuller A, Hess HD (2005) Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. Aust. J. Agric. Res. 56:961–970.
- Cieslak A, Zmora P, Pers-Kamczyc E, Stochmal A, Sadowinska A, Salem AZ, Szumacher-Strabel M (2014) Effects of two sources of tannins (*Quercus* L. and *Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation: an *in vitro* study. Ital. J. Anim. Sci. 13(2): 290-294.
- Düzgüneş O, Kesici T, Gürbüz F (1983) İstatistik Metodları, A.Ü. Yayınları, A831, Ankara.
- Field JA, Lettinga G (1987) The methanogenic toxicity and anaerobic degradability of hydrolysable tannins. Water Res. 21: 367–374.

- Galyean M (1989) Laboratory Procedure in Animal Nutrition Research, Department of Animal and Range Sciences, New Mexico State University, USA.
- Getachew G, Makkar HPS, Becker K (2000) Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *Brit. J. Nutr.* 84: 73–83.
- Hassanat F, Benchaar C (2013) Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production *in vitro*. *J. Sci. Food Agric.* 93(2): 332-339.
- Hagerman AE, Butler LG (1989) Choosing appropriate methods and standards for assaying tannins. *J. Chem. Ecol.* 11:1535–1544.
- Hess HD, Tiemann TT, Noto F, Carulla JE, Kreuzer M (2006) Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *Int. Congr. Ser.* 1293:164–167.
- Jayanegara A, Makkar HPS, Becker K (2009) Methane reducing properties of polyphenol containing plants simple phenols and purified tannins in *in vitro* gas production method, FAO-IAEA International Symposium 'Sustainable Improvement of Animal Production and Health', 8 to 11 June 2009, Vienna, Austria. pp 92-93.
- Jayanegara A, Leiber F, Kreuzer M (2012) Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from *in vivo* and *in vitro* experiments. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96:365–375.
- Jayanegara A, Goel G, Makkar HP, Becker K (2015) Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 209:60–68.
- Jones GA, McAllister TA, Muir AD, Cheng KJ (1994) Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1374–1378.
- Khiaosa-Ard R, Bryner SF, Scheeder MRL, Wettstein HR, Leiber F, Kreuzer M (2009) Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal α -linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *J. Dairy Sci.* 92:177–188.
- Krueger WK, Gutierrez-Banuelos H, Carstens GE, Min BR, Pinchak WE, Gomez RR (2010) Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159:1–9.
- Lowry JB, McSweeney CS, Palmer B (1996) Changing perceptions of the effect of plant phenolics on nutrient supply in the ruminant. *Aust. J. Agric. Res.* 47: 829-842.
- Makkar HPS, Blümmel M, Becker K (1995) *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and the fate of tannins in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 69: 481–493.
- McSweeney CS, Palmer B, Bunch R, Krause DO (1999) Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the tannin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus*. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 65:3075–3083.
- McSweeney CS, Palmer B, McNeil DM, Krause DO (2001) Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91: 83–93.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W (1979) The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agr. Sci.* 93 (1): 217-222.
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC (2003) The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106:3-19.
- Min B, Wright C, Ho P (2014) The effect of phytochemical tannins containing diet on rumen fermentation characteristics and microbial diversity dynamics in goats using 16S rDNA amplicon pyrosequencing. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* 4:195–211.
- MINITAB (1996) MINITAB Release 11 for Windows, State College, Pennsylvania, USA.
- Nelson KE, Pell AN, Doane PH, Giner-Chavez BI, Schofield P (1997) Chemical and biological assays to evaluate bacterial inhibition by tannins. *J. Chem. Ecol.* 23: 1175–1194.
- Nsahlai I, Fon F, Basha N (2011) The effect of tannin with and without polyethylene glycol on *in vitro* gas production and microbial enzyme activity. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 41:337–344.
- Orskov ER, McDonald I (1979) The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agr. Sci.* 92: 499-503.

- Patra AK, Saxena J (2011) Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 91:24–37.
- Poncet C, Rémond D (2002) Rumen digestion and intestinal nutrient flows in sheep consuming pea seeds: the effect of extrusion or chestnut tannin addition. *Anim. Res.* 51:201–216.
- Preston TR (1995) Biological and chemical analytical methods. In: *Tropical Animal Feeding: A Manual for Research Workers.* (Eds Preston TR), FAO, Rome, pp. 191–264.
- Reed JD (1995) Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* 73: 1516-1528.
- Stewart CS (1991) The rumen bacteria. In: *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion.* (Eds Jouany JP), INRA ed, Paris, France, pp. 15–26.
- Tabacco E, Borreani G, Crovetto GM, Galassi G, Colombo D, Cavallarin L (2006) Effect of chestnut tannin on fermentation quality, proteolysis, and protein rumen degradability of alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 89:4736–4746.
- Waghorn GC, Shelton ID (1997) Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. *J. Agric. Sci.* 128: 365–372.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis A (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.