משרד החקלאות - דו"ח לתוכניות מחקר

להנהלת ענף בקר- וועדת הזנה

קוד זיהוי	א. נושא המחקר (בעברית)
820-0377-17	יעלות ניצולת פחמימות וויסות צריכת המזון על ידי תוספי ארומות וטעמים למנת מעלי גירה: ברמת המעי הדק ובעל החיים השלם.

ב. צוות החוקרים

	שם משפחה	שם פרטי
חוקר ראשי	מבג'יש	סמיר
חוקרים משניים		
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		

ג. כללי

מוסד מחקר של החוקר הראשי

הפקולטה לחקלאות

סוג הדו"ח	תקופת המחקר עבורה מוגש הדו"ח – התחלה (שנה חודש)	תקופת המחקר עבורה מוגש הדו"ח – סיום (שנה חודש)	תאריך משלוח הדו"ח למקורות המימון (שנה חודש)
שנתי			
שנת המחקר: 3/3	01/2017	12/2019	06 / 2020

ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח

שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים
הנהלת ענף בקר - משרד החקלאות	02-0021	70

ה. תקציר שים לב - על התקציר להיכתב בעברית לפי סעיף ה' שבהנחיות לכתיבת דיווחים

ו. אישורים

הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

חוקר ראשי	מנהל המחלקה	מנהל המכון (פקולטה)	אמרכלות (רשות המחקר)	רשות המחקר	תאריך (שנה) (חודש) (יום)

תוכן עניינים

דו"ח לתכנית מחקר מספר : 820-0377-17 3
תקציר: 3
Abstract: 4
מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי 4
הצהרת החוקר הראשי: 5
מבוא ותיאור הבעיה: 6
מטרות המחקר: 8
שיטות העבודה ומהלך הניסויים: 8
ניסוי מטבולי עם טלאים: 9
אנליזות כימיות וחישובים: 11
תכולות ואנליזה כימית: 11
חישוב נעכלות לכאורה של רכיבי המנה: 11
חישוב מאזן אנרגיה: 11
מאזן חנקן: 11
תוכלת שומן (Ether extract): 12
ביטוי גנים: 12
אנליזת פרופיל חומצות אמינו: 13
אנליזת מיפוי הרכב המיקרוביום: 13
שיטת 16S, ריצוף וניתוח (16S Sequencing and analysis): 13
ניתוח סטטיסטי: 14
תוצאות עיקריות: 14
השפעת תוספי טעם מלאכותיים על התבטאות גנים תפקודיים שונים באזור הג׳ג׳ונום הקדמי בכבשים: 20
השפעת תוספי טעם מלאכותיים על פרופיל חומצות האמינו במעכל: 22
השפעת תוספי טעם על הרכב המיקרוביום באזור הג׳ג׳ונום הקדמי בכבשים: 23
השוואת קבוצת הטיפול Control לעומת קבוצת הטיפול Sucram על הרכב המיקרוביום: 26
השוואת קבוצת הטיפול Control לעומת שאר הטיפולים השונים על הרכב המיקרוביום: 28
דיון ומסקנות: 29
השפעת תוספי הטעם על צריכת רכיבי המנה, ביצועי הכבשים, ועלייה במשקל 30
השפעת תוספי הטעם על נעכלות רכיבי המנה: 31
השפעת תוספי טעם על הביטוי היחסי של קולטני הטעם המתוק ו- SGLT1: 32
השפעת תוספי הטעם על נעכלות ומאזן החנקן, הביטוי היחסי של APN ופרופיל חומצות אמינו: 34
השפעת תוספי הטעם על הביטוי היחסי של ההורמונים GLP-1, GLP-2, CCK: 35
השפעת תוספי הטעם על הרכב המיקרוביום: 36
מקורות ספרות: 38

דו"ח לתכנית מחקר מספר : 820-0377-17

תקציב-039-0405

דוח שנה שלישית – מסכם

השפעת טעמים שונים על צריכת מזון במעלי גירה: וויסות צריכת מזון, תפקוד מערכת העיכול והגדלת ניצולת המזון ליצרנות.

Effect of different flavors on feed intake in ruminants: Control of feed intake, function of digestive tract, and increase feed efficiency for production.

מוגש לקרן הנהלת ענף בקר - משרד החקלאות

ע"י

פרופ' סמיר מבג'יש - המחלקה לבעלי חיים, הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, האוניברסיטה העברית, ירושלים. Sameer.mabjeesh@mail.huji.ac.il. עובד תקן. שטח הפעולה: הזנת מעלי גירה, פיזיולוגיה של יצור חלב ברמת האיבר וברמה הבסיסית, וטרינריה ובריאות. החוקר יהיה פעיל בביצוע הניסוי, המדידות וריכוז הנתונים והממצאים. לחוקר יש מעבדות מחקר כולל דיר מטבולי בקמפוס הפקולטה לחקלאות, עם תמיכה טכנית וצוות תלמידי מחקר.

תקציר:

צריכת מזון על ידי מעלי גירה (מע"ג) מושפעת מבעל החיים עצמו (מצב פיזיולוגי וגנוטיפ), גורמים הקשורים בטיב המזון (כימיים ופיזיקאליים) וגורמי סביבה. לכן, הטעם והריח (ארומה) של מזון מסוים בנוסף למרקם הפיזיקאלי שלו יקבעו את צריכתו והעדפתו על מע"ג. מערכת העיכול של מע"ג מצוידת בחלל הפה והלשון בגבשושיות טעם רבים המבחינים בין טעמים שונים. יכולת האבחנה לטעם מתוק מאפשרת למע"ג להבחין במזונות בעלי ערך תזונתי גבוהה; עשיר באנרגיה, ותגרום להגברת צריכת המזון. מאידך, היכולת להבחין בטעם המר מאפשרת למע"ג להימנע מצריכת מזון המכיל תרכובות רעילות או מכאלה שיפגעו בפיזיולוגיה התקינה של מערכת העיכול ובעיכול המזון. ***בשנה ראשונה של המחקר*** בחנו השפעת החדרת תוספי טעם וריח (ארומה) מלאכותיים במנת טלאים ועגלות חלב על צריכה או דחיית מזון. יצרנו סולם ומדרג של הארומות והטעמים השונים מהמקובל ביותר ועד הנחדה ביותר. הטעם המתוק והארומות המתוקות דורגו על ידי שני בעלי החיים בראשית הטבלה ואילו ארומות כמו חִלבה ואניס דורגו אחרונים. כלומר, הארומה והטעם המתוק גורמים לצריכה מוגברת של המנה. מעניין לציין, שמיצוי צ'ילי חריף הועדף על ידי כבשים ונדחה על ידי העגלות. ***בהמשך המחקר (שנה ב' ו-ג')*** בחנו השפעת הוספת ממתיק מלאכותי (Sucram) ומיצוי צ'ילי חריף (Caps) שנמאנו בתחילת הטבלה והשילוב ביניהם על ביצועי טלאים במטרה ללמוד את המנגנון שעומד מאחורי ההשפעות של הגדלת צריכת המזון. הראנו שיש השפעה מובהקת לתוספי טעם על ביצועי כבשים. באופן כללי, תוסף הקפסיקום העלה נעכלות המזון, שפר מאזן אנרגיה ויעילות נצולת המזון דבר שהתבטא ביותר אנרגיה מטבולית וקצב גדילה. למיטב ידיעתנו, הניסוי הנוכחי מספק בפעם הראשונה נתונים על השפעת תוספי טעם על יעילות המזון לגדילה בכבשים. אחת המסקנות מהניסוי הנה שסוקראם לא גורם לעליה בצריכת המזון ואיננו משפיע על ביטוי גנים שקשורים במערך הטעם המתוק וספיגת סוכרים בתחילת המעי הדק במנות עטירות עמילן. שילוב של שני התוספים הביא לעליה בביטוי הגנים הנ"ל מחד, ותוסף הצ'ילי לא הביא לשינוי מאידך. תוצאות הניסוי הנוכחי מראות שיש סינרגיזם בפעולת שני התוספים ביחד במנות הנ"ל על ביטוי הגנים של קולטני הטעם המתוק וטרנספורטר הגלוקוז במעי הקדמי של כבשים שנזונו במנה עטירת אנרגיה. במחקר הנוכחי לא נצפו הבדלים בהרכב המיקרוביום אצל הכבשים בקבוצות

הטיפול השונות, עם זאת, אפיון קהילת המיקרוביום הנו אינפורמטיבי מאוד להבנת האינטראקציות בין המיקרוביום לבין מצבים פיזיולוגיים שונים כמו בריאות, גדילה, מחלות וכו'... נדרשים מחקרים עתידיים נוספים כדי לבחון את המסלולים המטבוליים בהם תוסף הטעם Capsicum משפע על צריכת המזון, יעילות ההזנה, והרכב המיקרוביום.

Abstract:

Feed intake by ruminants is influenced by the animal itself (physiological condition and genotype), factors related to the nature of the feed (chemical and physical) and environmental factors. Hence, flavor and taste (aroma) are determinantal factors of feed intake. The gastrointestinal digestive system is equipped beginning with the oral cavities at the tongue, with many taste buds that differentiate between different flavors. Therefore, feed rich in energy (sugars; sweet taste) will increase feed intake. On the other hand, the ability to discern bitter taste allows ruminants to avoid consuming feeds containing toxic or similar compounds that would impair the proper digestive physiology and digestion. During the 1st year of the project we created a graded list of commercial taste and flavor in sheep and dairy hiefers. Sweet tastes and flavours were listed at the top in both sheep and hiefers and encouraged feed intake while, Fenugreek and Anis were at the bottom and discouraged feed consumption. During the 2nd and 3rd year of the project we examined the effect of adding artificial sweetener (Sucram) and hot chilli extract (Caps) and their combination on lambs performance to study the mechanism behind the effects of increasing feed intake. We have shown that there is a significant effect of flavor supplements on sheep performance. In general, the Caps supplement increased feed digestibility, improved energy balance and feed conversion efficiency which was most pronounced by metabolic energy and growth rate. Moreover, the first year results clearly show that taste and smell supplements may encourage eating and some may reject feed intake. To the best of our knowledge, the present experiment provides, for the first time, data on the effect of flavor supplements on feed efficiency for sheep growth. One of the conclusions of the experiment is that Sucram does not cause an increase in feed consumption and neither affect the expression of genes associated with the sweet taste receptors and the absorption of sugars at the beginning of the small intestine in starch-rich diets. Combination of the two additives resulted in over expression of the above genes and on the one hand, and the Caps supplement alone did not. The results of the present experiment show that there is synergism in the action of the two supplements together on the expression of the sweet taste receptors and glucose transporter at the proximal small intestine of sheep fed diets rich in energy. The microbiome analysis is very informative at the best in understanding the interactions between the microbiome profile and various physiological conditions such as health, growth, disease, etc. ... Further studies are needed to examine the metabolic pathways in which the Capsicum flavor supplement affects feed intake, feed efficiency, and microbiome composition.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. דר' יהושע מירון, מכון וולקני
2. דר' גבי עדין, שה"מ.
3. פרופ' חיים תגרי, פקולטה לחקלאות.

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן

חתימת החוקר: ________ תאריך: 04/02/2018

<u>רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:</u>

תקציר (הרצאה) בכנס מדעי הבקר 2017. השפעת טעמים וארומות שונים במנת כבשים על העדפת ודחיית מנת המזון. עמוד 42.
תקציר (הרצאה) בכנס מדעי הבקר 2018. השפעת טעמים וארומות על צריכת מזון, נעכלות ואצירת אנרגיה. עמוד 48.
תקציר(הרצאה) בכנס מדעי הבקר 2018. השפעת תוספי טעם מלאכותיים במנת מעלי גירה על התבטאות גנים תפקודיים במערכת העיכול ופרופיל המיקרופלורה החיידקית בתחילת המעי הדק. עמוד 173.

עבודת גמר MSc: השפעת תוספי טעם שונים וממתקים מלאכותיים במנת מעלי גירה על העדפת וקבלת המזון, יעילות ההזנה וביצועי גדילה בכבשים: ביטוי הרצפטור SGLT1 וקולטני הטעם המתוק במעי הדק הפרוקסימלי. 2018 האוניברסיטה העברית, הפקולטה לחקלאות. מחברת העבודה: פליסטה מוואנגי.
עבודת גמר MSc: השפעת תוספי טעם מלאכותיים במנת מעלי גירה על צריכת המזון, התבטאות גנים תפקודיים במערכת העיכול, ופרופיל המיקרוביום בתחילת המעי הדק. 2019 האוניברסיטה העברית, הפקולטה לחקלאות. מחברת העבודה: ערין דלאשה.

מבוא ותיאור הבעיה:

צריכת מזון על ידי מעלי גירה (מע"ג) מושפעת מבעל החיים עצמו (מצב פיזיולוגי וגנוטיפ), גורמים הקשורים בטיב המזון (כימיים ופיזיקאליים) וגורמי סביבה (Ketelaars and Tolkamp, 1991, Baumont et al., 2000). בחירת המזון (העדפה) על ידי מעלי הגירה באופן מובהק תלויה בהרכב הכימי של המזון, הסטטוס האנרגטי של בע"ח וניסיון קודם לגבי מזון מסוים (Provenza et al., 1996, Wang and Provenza, 1996). כמו כן, העדפת מזון מסוים על ידי מע"ג קשורה לאלמנטים חושיים של המזון ואירועים המתרחשים לאחר צריכת המזון (Provenza et al., 1996, Kyriazakis et al., 1998). לכן, הטעם והריח של מזון מסוים בנוסף למרקם הפיזיקאלי שלו יקבעו את צריכתו והעדפתו על מע"ג. מערכת העיכול של מע"ג מצוידת בחלל הפה והלשון בגבשושיות טעם רבים המבחינים בין טעמים שונים. למעלי גירה יש את היכולת להבחין בין טעמים וארומות (מתוק, מר וכו'......) שונים דבר שיאפשר להעדיף מזון מסוים על אחר (Moran et al., 2014b). יכולת האבחנה לטעם מתוק מאפשרת למע"ג להבחין במזונות בעלי ערך תזונתי גבוה; עשיר באנרגיה, ותגרום להגברת צריכת המזון. מאידך, היכולת להבחין בטעם המר מאפשרת למע"ג להימנע מצריכת מזון המכיל תרכובות רעילות או מכאלה שיפגעו בפיזיולוגיה התקינה של מערכת העיכול ובעיכול המזון (Arnold et al., 1980, Provenza et al., 1996). הדעה כיום היא כי חישת טעם מר התפתחה לאורך האבולוציה כמנגנון הגנה להימנעות מתרכובות רעילות, בעיקר כאלו שמקורן בצמחים (Bell and Kitchell, 1966). מכאן, ניתן להסיק שטעמים וארומות מועדפים במנה של מע"ג יצרניים תאפשר שליטה על צריכת המזון ותתבטא בהגדלה, דחיה או וויסות צריכת המזון לאורך היממה. אסטרטגיה של החדרת טעמים מלאכותיים מועדפים למנת מע"ג תאפשר השימוש בין היתר בחומרי גלם בעלי טעימות "לא מועדפת" כגון מזונות לוואי של תעשיית המזון של בני אדם וגרעינים בעלי טעם מר. מאידך, על מנת לנצל את האסטרטגיה הנ"ל ידע בסיסי על חישת הטעם והבנת המנגנונים הכרוכים בהגברת צריכת המזון וניצולת המזון ברמת בעל החיים, איבר והתא מתבקשים.

חישת הטעם המתוק במע"ג מפותחת בדומה ליונקים אחרים למרות העובדה שמ"ג בחייהם הבוגרים בטבע מתבססים על צריכת מזון גס שבו כמות הפחמימות הזמינות נמוכה ביותר. מאידך, בממשק אינטנסיבי של גידול מע"ג יצרניים בארץ רוב המנה מתבססת על תכולה גדולה של פחמימות זמינות ממקור גרעינים או מזונות לוואי לאספקת הצרכים האנרגטיים הגבוהים של בע"ח. יכולת ההעדפה בין טעמים וארומות שונים על ידי פרות חלב נבחנה לאחרונה בניסוי קפטריה (Harper et al., 2015). מטרת הניסוי היתה לבחון את יכולת הפרה להעדיף מזון עם טעם מסוים במטרה לבחון את האפשרות להגדיל את צריכת המזון בתקופה לאחר ההמלטה בה הפרה נמצאת במאזן אנרגיטי שלילי. בניסוי הוצע לפרות טעמים (מסחריים) שונים שנוספו לפרימקס תערובת מזון מרוכז. הטעמים היו: ביקורת (ללא טעם נוסף), אניס, חלבה, דבש, תפוז, תימין, מולסה וניל. תוצאות הניסוי הראו שהפרות העדיפו את הטעמים חלבה וניל הכי הרבה ($P < 0.03$) וההעדפה הנמוכה ביותר היתה לטעמים תפוז ואניס. בדומה לניסוי הנ"ל נערך במעבדתנו ניסוי שבחן את צריכת המזון של עיזים צעירות (צפירות) למנות שנוסף להן ארומות שונות בשיעור של 0.5% על בסיס חומר יבש. הארומות נרכשו ממפעל המייצר

ארומות לצרכים של בני אדם וכללו: לימון, אשכוליות, תפוז, ענבים, וגזר וביקורת. הטעמים עורבבו עם בליל מאוזן שהכיל ברובו תחמיץ חיטה וסיפק צרכיי קיום לצפירות. בניסוי השתתפו 12 צפירות שחולקו לשתי קבוצות שוות ונמדדה צריכת המזון הקבוצתית במשך 4 ימים לאחר תקופת אדפטציה של 7 ימים. רצף הטעמים היה אקראי בין שתי קבוצות הניסוי. המנה הוגשה פעמיים ביום ב-0700 וב-1700. תוצאות צריכת חומר יבש על ידי העיזים הראתה העדפה מובהקת (P< 0.01) שהתבטאה בהגדלת צריכת חומר יבש לפי הסדר הבא: לימון ותפוז > גזר > ענבים > ביקורת > אשכוליות. הטעמים לימון ותפוז הגדילו את צריכת המזון יחסית לבקרות בשיעור של 41% ואילו אשכוליות הקטין את צריכת המזון ב-14%. הניסוי הנ"ל מצביע באופן מובהק שהשימוש בארומות מביא לשינוי בהתנהגות אכילה של עליה או הקטנת צריכת חומר יבש. ניסוי זה גם מוכיח שלמרות שהמנה הבסיסית היתה מנה מאוזנת וניתנה לצפירות במשך 11 ימים, עדיין צריכת חומר יבש היתה מושפעת מהטעם למרות הדעה שצריכת המזון בין היתר מושפעת מתהליכים פוסט אובסרבטיביים של מזינים במערכת העיכול המשפיעים על הסטטוס האנרגטי של בעל החיים.

לאחרונה בספרות המדעית מצטבר מידע על חישת טעמים במערכת העיכול של יונקים שונים ואת חשיבות חישת הטעם המתוק בתהליכי צריכת מזון, עיכול וספיגת סוכרים לאורך מערכת העיכול. במקביל, מידע רב קיים על תהליכי אדפטציה של טעמים שונים (בדרך כלל טעמים דוחים) עוד בתקופה העוברית והינקות בבני אדם (Gerrish and Mennella, 2001, Liem and Mennella, 2002, Beauchamp and Mennella, 2009). ניסוי מקיף במע"ג שכלל פרות (יבשות ובתחלובה) כבשים (במרעה ופיטום) הראה שקולטני טעם מתוק בחלל הפה המשתייכים למשפחת הקולטנים T1R1 ו- T1R3 מצומדי חלבון G (GPCR) מתבטאים לאורך המעי הדק של כבש ופרה ומשמשים לחישת נוכחות מונוסכרידים (כולל ממתיקים מלאכותיים Sucram®) ויש להם תפקיד מרכזי בוויסות ביטוי קו-טנספורטר גלוקוז במעי SGLT1 על גבי האנטרוציטים (Shirazi-Beechey et al., 2011, Moran et al., 2014b). המחקרים הנ"ל הראו שחישת הטעם המתוק במעי על ידי קולטני טעם המתוק מביא להגברת ביטוי ופעילות ה-SGLT1 ללא קשר למטבוליזם הגלוקוז בתאים. במחקרים הנ"ל הציעו שהמתווכים האחראיים על המנגנון בין חיישני הטעם המתוק המתבטאים בבלוטות אנטרו-אנדוקריניים (תאי L; המצומדים לתאי אנטרוציטים) הנן GLP-2 (Glucagon-like peptide 2) ו-GIP (glucose-dependent insulinotrophic peptide) שמופרשים לזרם הדם המקומי ומשפיעים באופן פארא-קריני על קצוות העצבים האנטריים במעי, ואחרונים משפיעים באופן ישיר על האנטרוציטים. כלומר, נוכחות של פחמימות זמינות או ממתיקים מלאכותיים בחלל המעי הדק תביא להגברת ספיגת סוכרים במנגנון המווסת על ידי חיישני הטעם המתוק המפוזרים לכל אורך המעי הדק.

לסיכום, ישנה חשיבות רבה בממשק האינטנסיבי לגידול בע"ח, המשמש לאספקת צרכי בני אדם במוצרי מזון, להבין את הגורמים המשפיעים על צריכת מזון של חיות משק יצרניים. השליטה בצריכת המזון ויעילות ניצול המנה הנצרכת הם אבני יסוד בגידול בעלי חיים הן בכיוון הגדלת והן בהקטנת הצריכה. כלומר וויסות צריכת המזון בתקופות שונות בחיי מע"ג למשל בתקופת היובש לעומת תקופת התחלובה המוקדמת והגדלת ניצולת המזון בתקופת פיטום יביאו לתועלת כללית אדירה. במחקר זה אנו ננצל את

הידע הקיים והעתידי שנגלה ברמת בעל החיים השלם וברמה הבסיסית הקשור לחוש הטעם והעדפת המזון למטרה שתייעל את ניצולת המזון והשימוש במזונות לוואי לגידול חיות משק.

מטרות המחקר:

אפיון השפעת טעמים מלאכותיים בהרכב מנות שונה על ניצולת המזון בבעלי חיים יצרניים במטרה לווסת את צריכת המזון ולהגדיל את השימוש במזונות לוואי למטרות גידול בממשק אינטינסיבי. ניצול הידע הקיים ברמה הבסיסית התאית להוכחת הקשר ברמת הספיגה של רכיבים אנרגטיים במעי הדק. מטרות המחקר היו:

א. יצירת סולם העדפה ודחיה של מספר רחב של טעמים וארומות בטלאים ועגלות.

ב. ניסוי מטבולי בטלאים שיצרכו מנה עם התוספים בראשית הטבלה משלב א'. ניסוי זה בחן השפעת הרכב מנה שהתאפיין בהובלת כמות עמילן גדולה למעי הדק של מעלי גירה (גרעיני תירס שלמים) עם התוספים הנ"ל על ניצולת מזון.

ג. לבחון השפעת התוספים על ביטוי קולטני הטעם המתוק T1R2-T1R3 ונשא הגלוקוז SGLT1 באזור Proximal Jejunum, ולהעריך את האפקט על מטבוליזם של גלוקוז במעיים.

ד. לבחון את השפעת התוספים על ביטוי גנים והורמונים מעורבים בספיגת הנוטריינטים במעיים: GLP-1, GLP-2, CCK, APN, ATPase.

ה. לבחון את השפעת התוספים על פרופיל המיקרוביום במעיים, וקביעת המיקרופלורה החיידקית.

ו. לבחון את השפעת התוספים על פרופיל חומצות האמינו במעי הכבשים

ז. להעריך השפעת הממתקים המלאכותיים על מאזן החנקן בכבשים.

שיטות העבודה ומהלך הניסויים:

בשלב הראשון של המחקר (שנה א') בנינו סולם (מדרג) של הטעמים וארומות שהיו זמנים באופן מסחרי. הניסוי בשנה א' בוצע על טלאים בדיר המטבולי בפקולטה לחקלאות ובעגלות לחלב מיד לאחר גמילה ברפת (יונקיה) מכון וולקני, בית דגן. מתוכנת הניסוי בעגלות לצורך המטרה הנ"ל היתה דומה לזו של הטלאים למעט אכלוס העגלות שהיה במבנים אישיים על הקרקע. לצורך ביצוע הפרויקט בשלב הראשוני השתמשנו ב-8 טלאים תמימים (4 נקבות ו-4 זכרים) שנרכשו מדיר מסחרי. מספר העגלות ששימש אותנו לניסוי היה 14 עגלות. בשלב ראשון של המחקר ערכנו מבחני טעימה והעדפה של תוספות מסחריים (שחולקו בהתאם להוראות היצרן כטעמים או ארומות). הטלאים שוכנו בכלובים מטבוליים עם מערכת אבוס אוטומטיים וגישה למים בצורה חופשית. הטלאים בכל יום ירדו מהכלובים בשעות הבוקר לתקופה של 1.5-2 שעות בזמן ניקוי הכלובים וסופי שבוע תקופת הפעילות היתה בין 3-4 שעות. מנת הבסיס של הטלאים היתה מנת פיטום שמורכבת מתערובת פיטום מסחרית, 90% מהצריכה היומית עם 10% חציר קצוץ. מבחני הטעימה לצורך הדירוג תוספי הטעם הוגשו לטלאים לאחר ערבוב ידני (בהתאם להוראות היצרן) ביחד עם 100 גר' שעורה לחוצה ו-100 גר' תירס גרוס. בכל מבחן טעימה שני טעמים הוגשו בכלים (דלאים שחורים) נפרדים לאחר שעה מארוחת הבוקר במשך 3 דקות. מבחן טעימה זה יחזור על עצמו פעם ביומיים לכל זוג טעמים (במיקום הפוך מבחינת

מיקום הכלים באבוס) לכל כבש במשך 6 ימים כך שכל כבש יראה את הטעם המסוים 3 פעמים לכל הטעמים הנבדקים. מתכונת דומה אומצה לניסוי עם העגלות למעט הזמן שניתן לעגלות היה 7 דקות בגלל ההפרעות שהיו בסביבה. יש לציין, שהניסוי עם עגלות בוצע רק לאחר שהיתה הרגלה לעבוד איתן. לכן, עוד לפני הגמילה, צוות המחקר החל לעבוד עם העגלות על מנת לייצור מערכת יחסים נוחה והרגלה של העגלות. צריכת התערובת עם הטעם המסוים נמדדה ויוחסה לדקה (עגלות) או למשקל גוף מטבולי (טלאים). בתום הניסוי בוצע ניתוח סטטיסטי לתוצאות הצריכה ועל ידי כך, ייצרנו סולם העדפה של הטעמים השונים שנבחנו.

ניסוי מטבולי עם טלאים:

בשלב השני של המחקר (שנה ב' ו-ג') ביצענו ניסוי מטבולי (בכלובים מטבוליים ייעודים בדיר הפקולטה) עם 8 טלאים (4 נקבות ו-4 זכרים) במטרה לבדוק את השפעת שני תוספי הטעמים שגרמו לצריכת מזון גדולה יחסית לטיפול הבקרות: מיצוי צ'ילי חריף וסוקרם.

טבלה מס' 1. הרכב המזון של מנת הטלאים עם בסיס חומר יבש; בליל וכופתיות.

Feeds	TMR	Pellets
Corn grains	13.9	10.4
Wheat bran	19.6	1.7
Gluten feed		5.3
Barley grain		11.4
Soybean meal		31.2
Sunflower meal	9.5	6.1
Wheat grain		11.3
Dried Distillers' Grains (DDGs)		7.0
Vegetable oil		1.2
Grass hay	15.1	
Wheat silage	11.3	
Wheat straw	15.8	
Citrus pulps	2.5	
Soybean hulls	9.5	0.9
Lime stone	1.3	5.0
Salt	0.5	5.0
NH_4Cl		0.5
Na bicarbonate		1.0
Cu sulfate	0.02	
Vitamin mix*	0.9	1.9
Composition,		
Moisture, %	37.1	10.4
Crude protein, %	12.5	26.0
Crude fat, %	2.76	3.63
ME, Mcal/ kg DM	2.30	2.70
NDF, %	48.2	16.6
Ca, %	0.85	2.30
P, %	0.46	0.48
Cu, %	0.49	0.51
Vit A, IU	5,862	14,000

הטיפולים היו: 1. ביקרות, מנת בסיס, 2. תוסף סוקרם למנת הבסיס, 3. מיצוי צ'לי חריף ו-4 שילוב של שני התוספים. השערת הניסוי היתה ששני התוספים יגדילו את צריכת המזון ובכך יגרמו להובלת כמות עמילן גדולה יותר (יחסית לטיפול הבקרות). הסוקרם ישפיע על עיכול וספיגה של נוטריינטים במעי הדק במיוחד גלוקוז ולכן, הן ברמת בעל החיים וברמת המעי אנו מצפים לראות שינויים חיוביים בנעכלות לכאורה ובביטוי גנים במעי הדק במנגנונים המעורבים בתהליכי עיכול וספיגה כמתואר במבוא. כמו כן, אומנם מיצוי צ'ילי איננו טעם אך גרם לעליה בצריכת המזון במבחני הטעימה, אנו מצפים שיהו לו השפעות פוסט ספיגה חיוביים שיגרמו להגברת צריכת המזון ו/או לשינוי בבטוי גנים תפקודיים במעי הדק. בזמן הביופסיה נאספו מעכלים מתוכן המעי הדק במטרה לערוך אנליזה לפרופיל החיידקים וחומצות אמינו. הדוגמאות נשלחו למעבדתו של פרופ' ערן אליאב במכון ויצמן לצורך אנליזות המיקרוביוטה.

מהלך הניסוי (שנה ב' ו-ג') : הניסויים אושרו ע"י ועדת אתיקה לניסויים בבעלי חיים של האוניברסיטה העברית. הניסוי כלל תקופת אדפטציה למנה של 14 ימים ועוד 5 ימים של איסוף כללי. במהלך, תקופת האיקלום הטאלים הורדו מהכלובים לחצרות רגילות ללא מזון, בכל יום למשך 3 שעות על מנת לתרגל ולמתוח שרירים, ואילו בתקופת האיסוף הטלאים שהו בכל התקופה על הכלובים. המנה חולקה ל- 12 חלקים שווים, שניתנו באמצעות מערכת אבוס אוטומטיים כל שעתיים (ANKOM Technology, USA), עם גישה חופשית למים. שני התוספים המלאכותיים נרכשו מחברת (Pancosma®, Geneva, Switzerland). במהלך תקופת האיסוף הוחדר לנקבות קטטר פולי (16F) למטרת איסוף שתן כמותי. השתן נאסף בשקיות ייעודיות עם תוספת של 100 מ"ל חומצה סולפורית (בריכוז 10% על בסיס משקלי). הטלאים נשקלו על מנת לחשב את קצב הגדילה שלהם בכל סיבוב. ביטוי קצב הגדילה חושב בהתאם למשקל גוף מטבולי (BW^0.75). לאחר תום האיסוף הטלאים הוכנסו לחדר ניתוח לצורך הוצאת רקמת מעי באמצעות ביופסיה מתחילת הג'אוג'נום. במהלך הניתוח לאחר זיהוי האזור לביופסיה, נלקחה דוגמת מעי דק בגודל של 3-5 ס"מ עם מעכל. כאמור דגימה של מעכל מעי נלקחה באמצעות סחיטת המעכל מהאיזורים הדיסטאלים לכיוון החתך. לאחר לקיחת הדוגמא, האזור נתפר(resection and anastomosis) בחוט נספג (PDS 004) בתפר כפול. בדרך כלל, לאחר 36 שעות מהניתוח הטלאים חזרו לפעילות מלא כולל צריכת מזון.

רקמת המעי והתוכן (מעכל) שהופרד נשמרו בחנקן נוזלי להמשך אנליזות. מהרקמות הופק RNA לצורך אנליזה ב-rRT-PCR כמותי לביטוי גנים המעורבים בתהליך עיכול וספיגת סוכרים. כאמור, דוגמת המעכל נשמרה על מנת למדוד בשיטות מתקדמות ביטוי פרופיל אוכלוסיות מיקרוביאליות במעי ובנוסף פרופיל של חומצות אמינו במעכל.

אנליזות כימיות וחישובים:

תכולות ואנליזה כימית:

אנליזות למזונות, צואה ושתן בוצעו בהתאם למתואר בפירוט בדוחות שנה א' ו-ב'. כאן יבואו אנליזות שלא פורטו במהלך הדוחות הקודמים או תזכורת לחלק מהחישובים.

חישוב נעכלות לכאורה של רכיבי המנה:

נעכלות לכאורה של רכיבי המנה חושבה בהתאם לנוסחה: נעכלות, % = (רכיב נצרך – רכיב בצואה)/רכיב נצרךX100.

אנרגיה מטבולית חושבה לאחר החסרת ערך אנרגיה בשתן (נמדד) ואנרגיה ביתור מתן (ערך מחושב בהתאם ל-NRC, 2007).

חישוב מאזן אנרגיה:

DE = GE - FE

ME = GE - FE – UE - MeE

MeE = 6%*GE

HP = ME - NE

$NE = (1.42*ME) - (0.174*ME^2) + (0.0122*ME^3) - 1.65$

כאשר DE = אנרגיה נעכלת (קילו קלוריות; כמתואר בנוסחה לעיל אך הביטוי כמותי ולא באחוזים) ME = אנרגיה מטבולית, GE = אנרגיה כללית, FE = אנרגיה בצואה, UE = אנרגיה בשתן, MeE = אנרגיה במתאן, HP = יצור חום. NE = אנרגיה נטו, מחושבת בהתאם לנוסחאות NRC, 2007.

מאזן חנקן:

קביעת מאזן החנקן משקפת את ניצול הכולל של מרכיבי החנקן במנה (חלבון כללי) הנצרכת ע"י בעל. חישוב מאזן החנקן (אצירת חנקן = Retention) מוגדר כהפרש בין כמותם המתקבלת לגוף מן המזון לזו המופרשת ממנו בצואה ובשתן יחדיו.

מאזן חנקן= (חנקן נאכל)- (חנקן נפרש בצואה ובשתן)

B= I - (U+F)

Apparent N Absorption (g/d) = I –F

N Retention (g/d) = I –(R+F+U)

$$\text{N Digestibility (\%)} = \frac{(\text{I} - \text{R} - \text{F})}{\text{I} - \text{R}}$$

B = Balance, I = Intake, U = Urine, F = Feces, R= Refusals

תוכלת שומן (Ether extract):

קביעת תכולת השומן בדוגמאות נעשה ע"י שקילת השארית לאחר מיצוי אתרי באמצעות מערכת סוקסלט (AOAC.,1990).

ביטוי גנים:

הרקמות שימשו לצורך הפקת RNA והפיכתו ל-cDNA בשיטת RT-PCR ולאחר מכן בדיקת רמת ההתבטאות של הגנים הנ"ל בשיטת Real-Time PCR לצורך השוואה כמותית של הגנים בטיפולים השונים. ביטוי גנים נורמל לפחות ל-2 house keeping genes (ראה טבלה מס' 2).

כימות ה- mRNA התבצעה תוך שימוש בשיטת הכימות Delta-Delta CT (ΔΔCt)

ΔCt = Ct (target gene) – Ct (house keeping gene)

ΔΔCt= ΔCt (experimental group- ΔCt (control group)

$R= 2^{-\Delta\Delta Ct}$

רצפי הפריימרים נקבעו ונבדקו בעזרת Blast (National center for biotechnology information, NCBI) על מנת לוודא את הספציפיות שלהם לגן הדרוש. לכל זוג פריימרים נערך כיול (standard curve) בכדי לקבוע את המיהול הדרוש להגברה של הגן. הפריימרים הוזמנו מחברת (Sigma-Aldrich, Israel), מופיעים בטבלה מס' 2.

טבלה מס' 2 : כלל הפריימרים שתוכננו לשימוש לראקציית RT-PCR בעבודה.

Gene	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')	Product Size	Gene accession number
G6PDH	ATTGTGGAGAAGCCCTTCGG	GGTAGTGGTCGATGCGGTAG	106	NM_001093780.1
B2M	TGCTGAAGAACGGGGAGAAG	GAACTCAGCGTGGGACAGAA	92	NM_001009284.2
GAPDH	GGCGTGAACCACGAGAAGTA	GGCGTGGACAGTGGTCATAA	141	NM_001190390.1
T1R2	TTGGCCCCAAGTGTTACCTG	CCCTGGATCACGCTGTTGAA	76	KC469057.1
T1R3	TGACCGATGGGCTGCTATAC	GCAGAGGTGAAGTGCGTGG	80	XM_015099284.1
SLC5A1 (SGLT1)	GAGGGTACAGTGCCTTCGTG	GGATCGCGGAAGATGTGGAA	127	NM_001009404.1
GLP-1	TGATGAATTTGAGAGACATGC	CCTTTCACCAGCCAAGCAATG	89	WARDA et al.2006
GLP-2	CGATGGCTCTTTCTCTGATGA	TTCCTGTCAGTAATTTTCGTC	105	WARDA et al.2006
CCK	CTCGGAAAGCTCCTTCTGGC	CACTTATCCTGTGGCTGGGG	75	XM-004018250.2
AP-N	ACAGTCAGTCGTCCATCATGC	ATGGTCCCTGTGTTAGTGTCC	109	XM-015089479.1
ATPase	TATCCCTACTATGGCAAGCTC	AATGTTCTCACCATACGCCTT	123	NM_001009360.1

אנליזת פרופיל חומצות אמינו:

אנליזת פרופיל חומצות אמינו בוצעה על דוגמאות תוכן המעי (המעכל) שנשמרו ב- ‎-80°C. לאחר הפשרת הדוגמאות, נשקלו 200µl מעכל ויובשו בהקפאה באמצעות מכשיר הליאופיליזר (Labconco, USA) למשך לילה. לאחר ייבוש בהקפאה, בוצעה הידרוליזה לדוגמאות באמצעות חומצת HCl בריכוז 6N ב-108˚C למשך 22 שעות כאשר היחס בין החומצה לדוגמה היה 1 מ"ל חומצה לאחד מ"ג חומר יבש. לאחר הידרוליזה, כל הדוגמאות נשלחו למחלקת ציוד בין מחלקתי של האוניברסיטה העברית לשם ביצוע אנליזה לריכוז חומצות אמינו חופשיות (FAA) באמצעות קולונת HPLC בשיטת Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS analysis).

אנליזת מיפוי הרכב המיקרוביום:

אנליזת זיהוי המיקרוביום וקביעת המיקרופלורה החיידקית בוצעה במעבדת פרופ' ערן אלינב, המחלקה לאימונולוגיה, מכון ויצמן למדע. דוגמאות תוכן המעי (המעכל) נשמרו בחנקן נוזלי בזמן הניתוח ומיד לאחר מכן הוקפאו ב- ‎-80°C, והועברו למעבדת פרופ' אלינב להמשך העבודה. העבודה בוצעה באמצעות טכנולוגיות ריצוף מתקדמות של הדור הבא Next Generation Sequencing, הגברה וריצוף מקטעים קצרים של הגן 16S rRNA, והשוואת תוצאות הריצוף למאגרים ביואינפורמטים. מיפוי המיקרוביום ובדיקת השונות בין אוכלוסיות החיידקים השונות בוצע באמצעות שיטות ניתוחי מטאגנומיקה (alpha diversity, beta diversity analysis).

שיטת 16S, ריצוף וניתוח (16S Sequencing and analysis):

DNA הופק מדגימות המעכל באמצעות ערכת Qiagen (DNeasy PowerLyser, PawerSoil, USA) בהתאם להוראות היצרן. ריכוז ה- DNA המתאים חושב באמצעות עקומת כיול שבוצעה לריכוזי DNA שונים שהופק מהדגימות. כמות של DNA 1ng שימש לריאקציית הגברת PCR עבור הגן 16S rRNA. תכנון הפריימרים של הגן 16S rRNA בוצע מאזור V3-V4 ושימשו לריאקציית ההגברה: Fwd 5’ GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3’, Rev 5’- GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3’. תוצרי ריאקציית PCR עברו ניקוי באמצעות הקיט (PCR clean kit, Promega) ואוחסנו להמשך העבודה. שיטת ריצוף התוצרים בוצעה באמצעות הקיט Illumina MiSeq, (Illumina MiSeq, UK) עם קביעת 500bp קריאות (250 בסיסים מכל כיוון). אנליזה נעשתה באמצעות QIIME2 (Quantitative insights into microbial ecology) גרסה 1.8. סיווג טקסונומי נעשה באמצעות RDP מסווג (RDP-classifier), ויצירת יחידות OTUs (operational taxonomic unit) מותאמות. מיפוי OTUs בוצע באמצעות מסד הנתונים של Greengenes database ו- UCLUST algorithm. רציפים עם רמת זיהוי ודמיון כ- 97% ומעלה נוקלאוטידים עבור הגן 16S הוכנסו ליחידת טקסונומיות (97% ID OTUs) זהה. קיבעת מפת המיקרוביום והשונות בין אוכלוסיות החיידקים השוואתה באמצעות (alpha diversity, beta diversity analysis). שיטת alpha diversity מאפשרת בדיקת עושר המינים ומגוון קהילות החיידקים השונות הנמצאות באותה דוגמה. שיטת beta diversity מאפשרת השוואת אוכלוסיות החיידקים על פי מרחקים אוקלידים.

ניתוח סטטיסטי:

ניתוח סטטיסטי בוצע באמצעות ניתוח שונות בהתאם למתכנת cross over design בתכנת JMP Pro software version גרסה 13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, 2016). תוצאות מוצגות כממוצע ± סטיית תקן. המודל כלל את השפעת תוספי הטעם Sucram, Capsicum , משקל הגוף המטבולי כמשתנים (Covariate), בעוד שהכבשים, והסבבים נכללו כמשתנים אקראיים (Random effect). מבחן Tukey HSD בוצע כאשר היו הבדלים מובהקים בין הטיפולים השונים. אותיות שונות בין הטיפולים באיורים ובטבלאות מציינות הבדלים מובהקים ברמת מובהקות (P <0.05, P <0.1). העמודות הקטנות מעל העמודות או הערכים מציינים את שגיאת התקן (Standard deviation). כמו כן, בוצעו השוואות קונטראסט בין ממוצעים.

אנליזת המיקרוביום: ההשוואה בין החיידקים נעשתה באמצעות Multiple Mann-Whitney U test ותיקנון האלפא של שגיאת הקריאה (false positive) תוקנה באמצעות FDR correction (False discovery rate). הצגת הנתונים נעשתה באמצעות תוכנת Prism. מפת המיקרופלורה החיידקית בוצעה ע"י מבחני alpha diversity, beta diversity למטרת בדיקת מספר המינים ועושר קהילות החיידקים השונות הנמצאות בין הטיפולים השונים. הבדלים נחשבו משמעותיים ברמת מובהקות סטטיסטית (P <0.05).

תוצאות עיקריות:

טבלה מס' 3 מתארת את תוצאות מבחני הטעימה לכל הטעמים שנבחנו ***(שנה א')***. כאמור הטעמים חולקו בהתאם להגדרות היצרן לטעמים וארומות בצורת אבקה או נוזלית. אבקה הנה מוצר מיוחד (תכשיר) שמאפשר שחרור הטעם או הריח בצורה מבוקרת ואילו הנוזל הנו חומר שמכיל מיצוי אתרי (סנטתי) של ארומות שונים. ניתן לראות שהטעם המתוק סוקרם ומיצוי צ'ילי חריף היו בראשית הטבלה ואילו ניקסולין היה לו את ההשפעה החזקה ביותר לדחיית תערובת הגרעינים. בקבוצת התוספים הארומטיים, הארומה החלבי היה בראש הטבלה ואילו בתחתית היו הארומות של חלבי וונילה שייק. ההבדל בצריכת תערובת הגרעינים לדקה היה כ-58% יותר לטובת הארומה החלבית. בקבוצת הארומות הנוזליים, הוונילה היה בראשית הטבלה בצריכת תערובת הגרעינים (23 גר' לדקה) ואילו אננס (18 גר' לדקה) ותפוזים (12 גר' לדקה) היו בתחתית הטבלה. יש לציין שהביקורת בדרך כלל, היתה ממוקמת בראשית הטבלה (מקום שני או שלישי) ולא נבדלה באופן מובהק מהמקום הראשון אלא היתה במקום ביניים.

טבלה מס' 4 מתארת את סולם הטעמים לעגלות. ניתן להבחין בדמיון כל שהוא בין טבלה זו לטבלה מס' 3. ניתן להבין שהעגלות העדיפו את הטעם המתוק, בדומה לטלאים והסוקרם היה בראשית הטבלה של הטעמים. מאידך, תמצית צ'ילי חריף היה הדוחה ביותר מבחינת העגלות ואילו הטלאים העדיפו אותו באותה מידה כמו הטעם המתוק. ניתן להבחין שהארומות המתוקות כמו מולסה ווונילה שייק היו

בראשית הטבלה ואילו החלבה והאניס היו בתחתית הטבלה. גם כאן, יש דמיון בסדר העדפת הארומות המתוקות כמו שנצפה בניסוי עם הטלאים.

טבלה מס' 3. צריכת תערובת הגרעינים עם תוספת הטעמים או הארומות (גר'/ דקה) בכבשים.

Item	Grain mixture intake		
Non Aroma	**gr/ min**	**SEM**	***P*<**
Extract CAPS XL	15.76[a]	3.85	0.008
Scram C150	15.66[a]		
Control	13.72[ab]		
Nexulin FM	11.51[b]		
Powder Aroma			
Pan Tec Milky	16.29[a]	2.89	0.007
Pan Anise	14.44[ab]		
Control	14.15[ab]		
Pan Vanier	13.06[ab]		
Pan Tec Molasses Extra	12.71[ab]		
Pan Juicy Orange	12.62[ab]		
Pan Red Summer Fruits	11.98[ab]		
Coveted Citrus	11.86[ab]		
Honey Vanilla Jasmin	11.84[ab]		
Pan vanilla shake	10.44[b]		
Fenugreek	10.19[b]		
Liquid Aroma			
Vanilla	23.10[a]	3.54	0.005
Control	22.01[ab]		
Pineapple	18.16[b]		
Orange	11.79[c]		

טבלה מס' 4. צריכת תערובת הגרעינים עם תוספת הטעמים או הארומות (גר'/ דקה) בעגלות.

Item	Grain mixture intake		
Non Aroma	**gr/ min**	**SEM**	***P*<**
Sucram C150	13.51[a]	2.67	0.0001
Nexulin FM	4.58[b]		
Control	4.37[b]		
Xtract CAPS	2.70[b]		
Powder Aroma			
Pan Tek Molasses	9.49[a]	3.35	0.0001
Pan Vaniila Shake	9.12[a]		
Pan Juicy Orange	7.62[ab]		
Control	4.37[bc]		
Pan Tek Anis	3.86[bc]		
Fenugreek	2.94[c]		

בניסוי עם העגלות בגלל אילוצים של הרפת, לא נבחנו כל הארומות בדומה לניסוי הטלאים. אבל ניתן להבחין שהמגמה דומה בין שני בעלי החיים כאשר הטעם והארומות המתוקות כבשו את המקומות הראשונים בטבלה ואילו טעמים כמו אניס וחלבה נחשבו לדוחים.

בעקבות תוצאות הניסוי הנ"ל, המשכנו לניסוי המטבולי עם טלאים שהמטרה העיקרית שלו בשלב זה, לבדוק את ההשפעות הפיזיולוגיות ברמת בעל החיים וברמת המעי הדק. כאמור, צריכת מזון מוגברת אמורה להשפיע על פרמטרים פיזיולוגיים כמו נעכלות לכאורה ואנרגיה מטבולית. כמו כן, הטעמים השונים מורגשים במעי הדק בדומה לחלל הפה ואף הוכח שיש להם פעילות חיובית בספיגת הנוטריינטים במעי הדק במנגנונים שתוארו בפרק המבוא.

תוצאות שנה ב' ושנה ג', ניסוי מטבולי בטאלים: טבלה מס' 5 מתארת את צריכת כלל החומר היבש ורכיבי המנה בכבשים בטיפולים השונים. ניתן לראות שצריכת המזון ורכיבי המנה השונים דמו בין הטיפולים השונים מאידך, קצב גדילת הטלאים (גר' ליום למשקל מטבולי) נבדל והיה הגבוה ביותר בטיפול עם תוסף הצ'ילי. קצב הגדילה הנמוך ביותר נמדד בקבוצת הביקורת. צריכת חלבון כללי הממוצעת היתה 10.6 גר' חלבון לק"ג משקל גוף מטבולי.

גרף מס' 1 מראה קצב גדילה של הטלאים גר' ליום. ניתן לראות שתוספת הקפסיקום גרמה לעליה במשקל גוף (360 גר'/ יום) יחסית לטיפול הביקורת (128 גר'/ יום) אבל לא בטיפול המשולב עם סוקראם (194.4 גר'/ יום) או בטיפול הסוקראם לבד (198.5 גר'/ יום; SEM=159.5 , P = 0.018).

טבלה מס' 5. השפעת תוספי טעם על צריכת רכיבי המזון, משקל גוף וקצב גדילה של טלאים. מספרים מבוטאים כגרמים למשקל מטבולי.

	Treatments[1]						Orthogonal contrast[4] P <		
Item[5]	Control	Sucram	Mix	Caps	SEM[2]	P <[3]	CxCa	SxCa	MxCa
Daily Intake, g/MBW									
DMI	69.9	72.9	75.2	79.1	14.7	0.886	0.441	0.625	0.720
OM	60.1	62.3	66.2	68.7	13.7	0.896	0.477	0.602	0.818
CP	9.7	10.4	10.9	11.5	2.4	0.791	0.337	0.569	0.730
NDF	22.3	22.8	24.2	24.8	4.7	0.939	0.578	0.647	0.880
ADF	9.2	9.4	10.0	10.1	1.9	0.954	0.620	0.692	0.921
Hemicellulose	13.1	13.4	14.3	14.7	2.9	0.928	0.548	0.618	0.851
EE	2.8	2.9	3.1	3.3	0.7	0.862	0.418	0.575	0.800
ADG[5]	5.6[b]	8.5[ab]	8.1[ab]	16.2[a]	6.5	**0.020**	**0.011**	**0.068**	**0.048**

[a,b]Within a row, means without a common superscript letter differ (P< 0.05)
[1]Control = basal feed without flavor; Sucram = basal feed supplemented with 150g/ton Sucram; Caps = basal feed supplemented with 150g/ton Capsicum; and Mix = basal feed supplemented with 150g/ton Sucram + Capsicum at 1:1 ratio.
[2]Standard error Mean; n =15 (n represents number of observations used in the statistical analysis)
[3]Main effect of treatment
[4]Capsicum compared with other treatments. C=Control; S= Sucram; Ca= Caps and M=Mix
[5]ADG = average daily gain

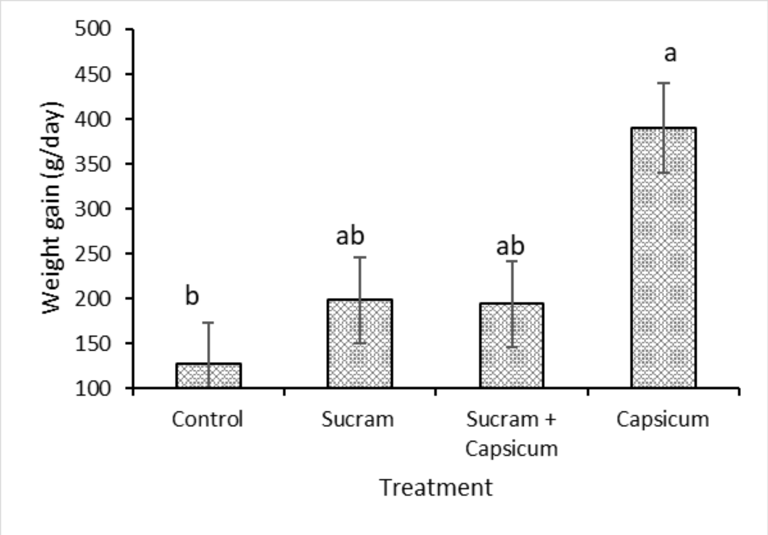


Figure 1. Daily weight gain in sheep fed on unflavored diet (total mixed ration, corn and concentrated pellets) or diet flavored with Sucram, Capsicum or both (SEM = 159.5; $P = 0.018$). Letters (a, b) indicate that consumption differ ($P < 0.05$).

טבלה מס' 6 מכילה את נתוני נעכלות לכאורה של רכיבי המנה השונים. ניתן לראות שלא היתה השפעה עיקרית של תוסף הטעם של הפרמטקים שנבדקו. מאידך, השוואת ממוצעים (זוגית) מראה שהיתה נטיה לנעכלות לכאורה של חומר יבש בטיפול מיצוי צ'ילי חריף לעומת הביקורת. באופן דומה היתה נטיה לנעכלות גבוהה יותר בטיפול הנ"ל בהשוואה לטיפול המשולב או הסוקראם בנעכלות לכאורה של NDF.

טבלה מס' 6. השפעת תוספי טעם על נעכלות לכאורה של רכיבי המזון בטלאים. מספרים מבוטאים ב-%.

	Treatments[1]						Orthogonal contrast [4] $P <$		
Item[5]	Control	Sucram	Mix	Caps	SEM[2]	P value[3]	CxCa	SxCa	MxCa
Digestibility, %									
DM	73.3	74.0	73.9	78.5	3.7	0.296	**0.092**	0.156	0.105
GE	78.4	78.5	78.4	81.7	3.3	0.602	0.275	0.281	0.231
OM	77.1	77.5	77.4	81.3	3.6	0.469	0.173	0.223	0.172
CP	73.1	73.2	74.2	78.1	3.7	0.544	0.231	0.200	0.292
NDF	57.1	55.6	55.3	63.7	5.1	0.223	0.140	**0.085**	**0.051**
ADF	45.6	44.8	43.5	53.9	9.0	0.312	0.143	0.180	**0.091**
Hemicellulose	65.3	63.2	63.5	70.7	3.4	0.106	0.121	**0.037**	**0.031**
EE	72.5	66.6	67.5	79.5	7.7	0.220	0.264	**0.070**	**0.055**

[1]Control = basal feed without flavor; Sucram = basal feed supplemented with 150g/ton Sucram; Caps = basal feed supplemented with 150g/ton Capsicum and Mix = basal feed supplemented with 150g/ton Sucram C 150+ Capsicum at 1:1 ratio
[2]Standard error Mean; n=15 (n represents number of observations used in the statistical analysis)
[3]Main effect of treatment
[4]Capsicum compared with other treatments. C =Control; S = Sucram; Ca = Caps and M = Mix
[5]DMI = dry matter intake; GE = Gross energy; OM = Organic matter; CP = crude protein; NDF = Nutrient detergent fiber; ADF = Acid detergent fiber and EE = Ether extract

טבלה מס' 7 מתארת מאזן האנרגיה כולל חישוב של אנרגיה מטבולית ופליטת חום. ניתן לראות שפליטת החום הייתה זהה בין הטיפולים השונים ואילו אנרגיה נטו לייצור הייתה גבוהה יותר בטיפול עם

התוסף צ'ילי לעומת הביקורת ודומה לטיפול ה-Mix והסוקראם. מצב דומה נמצא בערכים של אנרגיה מטבולית. למרות ההבדלים המספריים בצריכת אנרגיה כללית לא היו הבדלים סטטיסטים בין הטיפולים. לכאורה בשני הטיפולים ה-MIX וה-CAPS היתה צריכת אנרגיה כללית גבוהה יותר משאר הטיפולים.

טבלה מס' 7. השפעת תוספי טעם על מאזן אנרגיה בטלאים. מספרים מבוטאים בקילו קלוריות למשקל גוף מטבולי.

	Treatments[1]						Orthogonal contrast[4] $P <$		
Item[5]	Control	Sucram	Mix	Caps	SEM[2]	*P* <[3]	CxCa	SxCa	MxCa
Energy, Kcal/MBW									
GEI	304.8	318.3	340.0	350.7	71.6	0.854	0.421	0.593	0.836
FE	71.2	71.4	77.5	63.8	21.6	0.900	0.724	0.708	0.463
DE	231.7	247.7	261.7	290.0	54.8	0.493	0.149	0.330	0.442
MeE	18.3	19.1	20.4	21.0	4.3	0.854	0.421	0.593	0.836
UE	6.3	10.1	6.2	7.4	3.3	0.110*	0.457	0.217	0.551
ME	207.4	218.8	234.8	261.4	49.7	0.178	**0.048**	0.112	0.125
HP	102.0	103.4	108.6	111.5	16.0	0.895	0.484	0.564	0.807
NE	106.5	115.6	126.0	149.2	33.5	0.309	**0.082**	0.201	0.300

[1]Control = basal feed without flavor; Sucram = basal feed supplemented with 150g/ton Sucram; Caps = basal feed supplemented with 150g/ton Capsicum and Mix = basal feed supplemented with 150g/ton Sucram + Capsicum at 1:1 ratio.
[2]Standard error Mean; n =15 (n represents number of observations used in the statistical analysis)
[3]Main effect of treatment

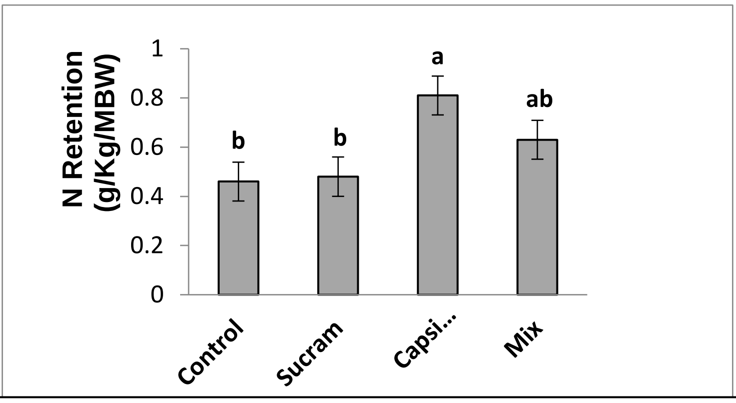
טבלה מס' 8: השפעת תוספי טעם מלאכותיים על מאזן החנקן בכבשים המבוטא בגרם/יום (g/day), ונעכלות החנקן לכאורה המבוטאת באחוזים.

	Treatments[1]						contrast $P <$		
Item	Control	Sucram	Caps	Mix	SEM[2]	*P* <[3]	Ca*C[4]	Ca*S[5]	Ca*M[6]
N Intake	41.22	41.14	44.62	42.74	5.78	0.838	0.435	0.432	0.655
N Refusals	2.84	2.40	2.75	2.16	1.16	0.936	0.918	0.754	0.552
N Fecal	10.61	10.31	8.86	10.84	2.21	0.581	0.342	0.435	0.213
N Urine	17.63	18.70	16.22	15.82	2.75	0.524	0.631	0.248	0.840
Apparent N Absorption	30.76	30.83	35.96	31.96	4.6	0.420	0.151	0.171	0.255
N Retention	10.66^b	9.83^b	17.84^a	13.9^{ab}	3.8	**0.059***	**0.024***	**0.015***	0.173
N Digestion %	73.07^b	73.79^{ab}	78.24^a	73.61^{ab}	3.3	**0.058***	**0.049***	**0.083***	**0.073***

אותיות שונות a,b בין הטיפולים השונים מציינות הבדלים מובהקים ברמת מובהקות P <0.05, P <0.1
[1]קבוצות הטיפול: קבוצת Control בקורת ללא תוספי טעם מלאכותיים, קבוצת תוסף הטעם Sucram, קבוצת תוסף הטעם Capsicum, וקבוצת MIX עם שני תוספי הטעם Sucram+Capsicum ביחס 1:1.
[2] SEM: סטיית תקן ממוצעת
[3] רמת מובהקות
[4] השוואות בין הטיפולים: Conrol vs. Caps, [5] Sucram vs. Caps, [6] Mix vs. Caps

טבלה מס' 8 מתייחסת להשפעת הטיפולים השונים על מאזן החנקן בכבשים המבוטאת בגרם/יום. לא נצפו השפעות מובהקות של תוספי הטעם השונים על כמות החנקן הנצרכת במזון (*P=0.838*), כמות

החנקן המופרשת בצואה *(P=0.581)*, כמות החנקן המופרשת בשתן *(P=0.524)* והחנקן הנספג לכאורה *(P=0.420)*. לעומת זאת, לתוסף הטעם Capsicum הייתה השפעה מובהקת על אצירת החנקן (17.84g/day, *P=0.059*) בהשוואה לשאר קבוצות הטיפול. נוסף לכך, הייתה השפעה מובהקת של תוסף הטעם Capsicum על כמות החנקן הנעכלת המבוטאת באחוזים(78.24%,*P=0.058*) לעומת שאר קבוצות הטיפול, כפי שרואים באיור מס' 2.



איור מס' 2: השפעת תוספי טעם מלאכותיים על אצירת החנקן בכבשים, המבוטאת בגרם/ משקל גוף מטבולי (g/Kg/MBW). הכבשים צרכו במשך שלושה שבועות בכל סבב את המנות הבאות: מנת ביקורת (ללא תוספי טעם ככלל), מנה כולית עם תוסף הטעם Sucram, מנה כולית עם תוסף הטעם Capsicum, וקבוצה שקיבלה מנה

השפעת תוספי טעם מלאכותיים על התבטאות גנים תפקודיים שונים באזור הג'ג'ונום הקדמי בכבשים:

טבלה מס' 9: השפעת תוספי טעם מלאכותיים על הביטוי היחסי של קולטני הטעם המתוק T1R2,T1R3, נשא הגלוקוז SGLT1, Aminopeptidase N, ומשאבת נתרן- אשלגן ATPase באזור הג'ג'ונום הקדמי בכבשים.

	Treatments[2]						contrast [5] P <		
Gene[1]	Control	Sucram	Caps	Mix	SEM[3]	P[4]<	MxC[5]	MxCa[6]	MxS[7]
T1R2	1.1	0.9	0.6	1.1	0.40	0.138	0.731	**0.026***	0.214
T1R3	1.1^{b}	1.0^{b}	0.7^{b}	2.5^{a}	0.62	**0.001***	**0.001***	**0.001***	**0.001***
SGLT1	1.1	1.0	0.7	1.2	0.44	0.296	0.663	**0.068***	0.574
ATPase	1.73^{b}	2.14^{b}	6.2^{a}	2.1^{b}	1.21	**0.008***	0.754	**0.005***	0.953
AP-N	2.21^{b}	2.75^{b}	6.05^{a}	1.92^{b}	1.74	**0.040***	0.799	**0.007***	0.586

אותיות שונות a,b בין הטיפולים השונים מציינות הבדלים מובהקים ברמת מובהקות *P* <0.05, *P* <0.1

[1] T1R2= Taste receptor family 1 member 2, T1R3= Taste receptor family 1 member 3, SGLT1= Sodium-dependent glucose transporter isoform 1, ATPase =sodium-potassium adenosine triphosphatase (Na^{+}/K^{+} pump), A-PN = Aminopeptidase N

[2]קבוצות הטיפול: קבוצת Control בקורת ללא תוספי טעם מלאכותיים, קבוצת תוסף הטעם Sucram, קבוצת תוסף הטעם Capsicum, וקבוצת MIX עם שני תוספי הטעם Sucram+Capsicum ביחס 1:1.

[3] SEM: סטיית תקן ממוצעת

[4] רמת מובהקות *(P<0.05)*

[5] השוואות בין הטיפולים: Mix vs. Control, [6] Mix vs. Caps, [7] Mix vs. Sucram

הביטוי היחסי של הרצפטור T1R3 הגבוה ביותר נצפה בקבוצת הטיפול Mix *(P<0.001)* בהשוואה לשאר הטיפולים (טבלה מס' 9). מאידך, הטיפולים Sucram ו- Capsicum לא השפיעו על הביטוי היחסי של הרצפטור T1R2 *(P=0.138)* ונשא הגלוקוז SGLT1 *(P=0.296)*. כאשר משווים בין תוסף הטעם Mix לשאר הטיפולים, רואים שהביטוי היחסי של הרצפטור T1R2 גבוה ביותר בקבוצת ה- Mix לעומת קבוצת הטיפול Capsicum *(P=0.026)*, והביטוי היחסי של SGLT1 גבוהה ביותר בקבוצת ה- Mix בהשוואה לקבוצת הטיפול Capsicum *(P=0.068)*. תוספי הטעם השונים השפיעו על הביטוי היחסי של ATPase, התוסף Capsicum הגביר את הביטוי היחסי של ATPase בהשוואה לקבוצת הביקורת, Sucram והטיפול Mix *(P=0.008)*. *בנוסף לכך*, תוסף הטעם Capsicum הגביר את הביטוי היחסי של החלבון AP-N בהשוואה לשאר הטיפולים *(P=0.040)*.

טבלה מס' 10 מציגה את הביטוי היחסי של הורמונים תפקודיים GLP-1, GLP-2, CCK באזור הג'ג'ונום הקדמי בכבשים. תוספי הטעם השונים לא השפיעו על הביטוי היחסי של הורמון GLP-1, אך כאשר משווים בין תוסף הטעם MIX לשאר הטיפולים השונים, רואים שהביטוי היחסי הגבוה ביותר נצפה בקבוצת הטיפול MIX לעומת קבוצת הטיפול Capsicum *(P=0.013)*. הטיפולים Sucram ו- Capsicum לא השפיעו על הביטוי היחסי של הורמון GLP-2 *(P=0.254)*, אך בהשוואה בין הטיפולים עצמם רואים שיש נטייה לביטוי יחסי גבוה יותר בקבוצת טיפול ה- Mix בהשוואה לקבוצת ה- Control *(P=0.09)*, ובהשוואה לקבוצת ה- Sucram *(P=0.096)*. הביטוי היחסי הגבוה ביותר של ההורמון CCK נצפה בקבוצת הטיפול Mix בהשוואה לשאר קבוצות הטיפול *(P=0.05)*.

טבלה מס' 10: השפעת תוספי טעם מלאכותיים על הביטוי היחסי של ההורמונים GLP-1, GLP-2, CCK באזור הג'ג'ונום הקדמי בכבשים.

	Treatments[2]						contrast P <		
Gene[1]	Control	Sucram	Caps	Mix	SEM[4]	P<[3]	M*C[5]	M*Ca[6]	M*S[7]
GLP-1	1.13^{ab}	0.97^{ab}	0.63^{b}	1.58^{a}	0.52	0.124	0.124	**0.013***	0.108
GLP-2	1.1	0.93	1.2	2.21	1.4	0.254	**0.090***	0.158	**0.096***
CCK	1.04^{b}	0.91^{b}	1.03^{b}	1.93^{a}	0.62	**0.050***	**0.017***	**0.027***	**0.029***

אותיות שונות a,b בין הטיפולים השונים מציינות הבדלים מובהקים ברמת מובהקות *P* <0.05, *P* <0.1

[1] [2]קבוצות הטיפול: קבוצת Control בקורת ללא תוספי טעם מלאכותיים, קבוצת תוסף הטעם Sucram, קבוצת תוסף הטעם Capsicum, וקבוצת MIX עם שני תוספי הטעם Sucram+Capsicum ביחס 1:1.

[3] SEM: סטיית תקן ממוצעת, [4] רמת מובהקות *(P<0.05)*

5 השוואות בין הטיפולים: Mix vs. Control, [6] Mix vs. Caps, [7] Mix vs. Sucram

השפעת תוספי טעם מלאכותיים על פרופיל חומצות האמינו במעכל:

טבלה מס' 11: השפעת תוספי טעם מלאכותיים על פרופיל חומצות האמינו במעכל (% of total AA)

	Treatments[1]					
Items	Control	Sucram	Caps	Mix	SEM[2]	*P* <[3]
Essential amino acids						
His	3.14	2.08	2.82	2.25	1.67	0.785
Arg	4.35	3.62	3.80	3.13	1.54	0.742
Lys	6.85	5.50	6.35	5.20	2.78	0.856
Met	0.67	0.58	0.83	0.48	0.50	0.880
Phe	4.66	3.46	4.11	3.37	2.0	0.786
Thr	5.01	3.73	4.22	3.60	1.78	0.758
BCAA						
Ile	2.40	2.03	2.23	1.85	0.98	0.835
Leu	8.05	5.92	7.06	5.83	3.48	0.782
Val	5.62	4.10	5.05	4.16	2.24	0.751
Non-essential amino acids						
Asp	8.80	6.81	7.92	6.64	3.34	0.786
Glu	9.41	8.18	8.81	7.16	3.42	0.821
Ala	5.50	3.98	4.87	4.03	2.24	0.750
Pro	4.03	3.23	3.64	3.0	1.44	0.764
Gly	4.20	3.0	3.41	3.15	1.40	0.640
Tyr	3.15	2.72	2.31	2.43	1.06	0.807
Ser	2.66	2.34	2.50	2.42	1.05	0.976
Other amino acids						
Cys	0.02	0.06	0.01	0	0.04	0.436
Taurine	20.10	37.24	27.8	40.1	29.33	0.773
Ornithine	0.15	0.08	0.12	0.11	0.08	0.781
Hydroxyproline	0.06	0.03	0.06	0.04	0.05	0.842
Cystine	1.18	1.31	1.57	1.03	0.76	0.88
Citrulline	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.95

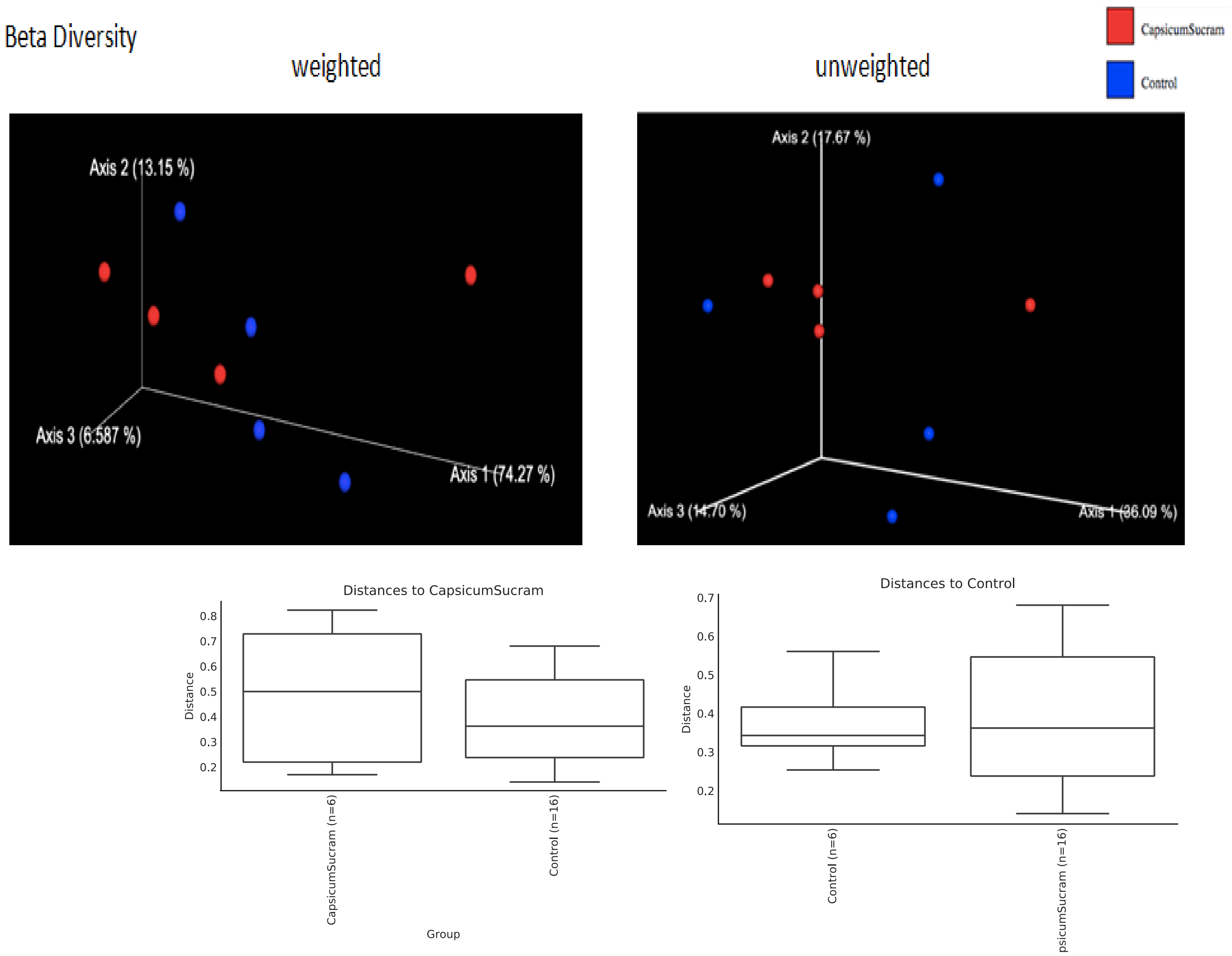
[1]קבוצות הטיפול: קבוצת Control בקורת ללא תוספי טעם מלאכותיים, קבוצת תוסף הטעם Sucram, קבוצת תוסף הטעם Capsicum, וקבוצת MIX עם שני תוספי הטעם Sucram+Capsicum ביחס 1:1.
[2] SEM: סטיית תקן ממוצעת
[3] רמת מובהקות

טבלה מס' 11 מתייחסת לפרופיל חומצות האמינו החופשיות הנמצאות במעכל, אשר נמדדו באמצעות שיטת LC-MS. טבלת פרופיל חומצות אמינו חופשיות מחולקת לכמה קטגוריות: חומצות אמינו חיוניות, חומצות אמינו לא חיוניות, חומצות אמינו מסועפות, וחומצות אמינו אחרות. בהתאם לטבלה, לא נצפו הבדלים מובהקים של תוספי הטעם השונים על פרופיל חומצות האמינו החופשיות במעכל, בכלל קבוצות הטיפול השונות נצפה פרופיל חומצות אמינו זהה, ללא הבדלים משמעותיים, ובדגש על חומצות האמינו החיוניות מתיונין (P <0.88) וחומצת האמינו ליזין (P <0.856).

השפעת תוספי טעם על הרכב המיקרוביום באזור הג'ונום הקדמי בכבשים:

השוואה בין קבוצת הטיפול Control לעומת קבוצת הטיפול Mix על הרכב המיקרוביום

איור מס' 3: השוואה בין קבוצת הטיפול Control לעומת קבוצת הטיפול Mix

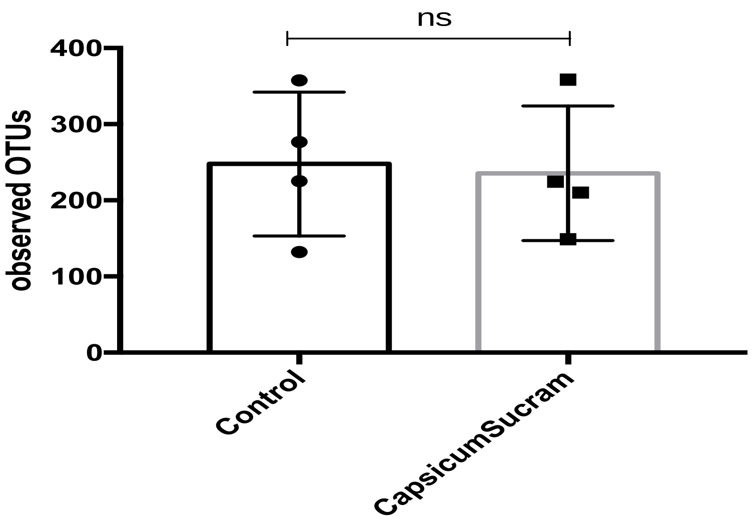


P= 0.975

הצגת הנתונים נעשתה באמצעות תוכנת Prism. איור מס' 3 מציג את הרכב המיקרוביום בהשוואה בין קבוצת Control לעומת קבוצת Mix. ההשוואה בין החיידקים נעשתה באמצעות Multiple Mann-Whitney U test ותיקנון האלפא לשגיאת הקריאה (false positive) תוקנה באמצעות FDR correction. בהתאם לאיור ולפי שיטת beta diversity המאפשרת השוואת אוכלוסיות החיידקים על פי מרחקים אוקלידים. תוספי הטעם המלאכותיים לא השפיעו על הרכב המיקרוביום במעכל המעי. לא נמצאה מובהקות סטטיסטית בין הטיפולים השונים *P*= 0.975, כלומר הרכב המיקרוביום זהה.

איור מס' 4: השוואה בין קבוצת הטיפול Control לעומת קבוצת הטיפול Mix

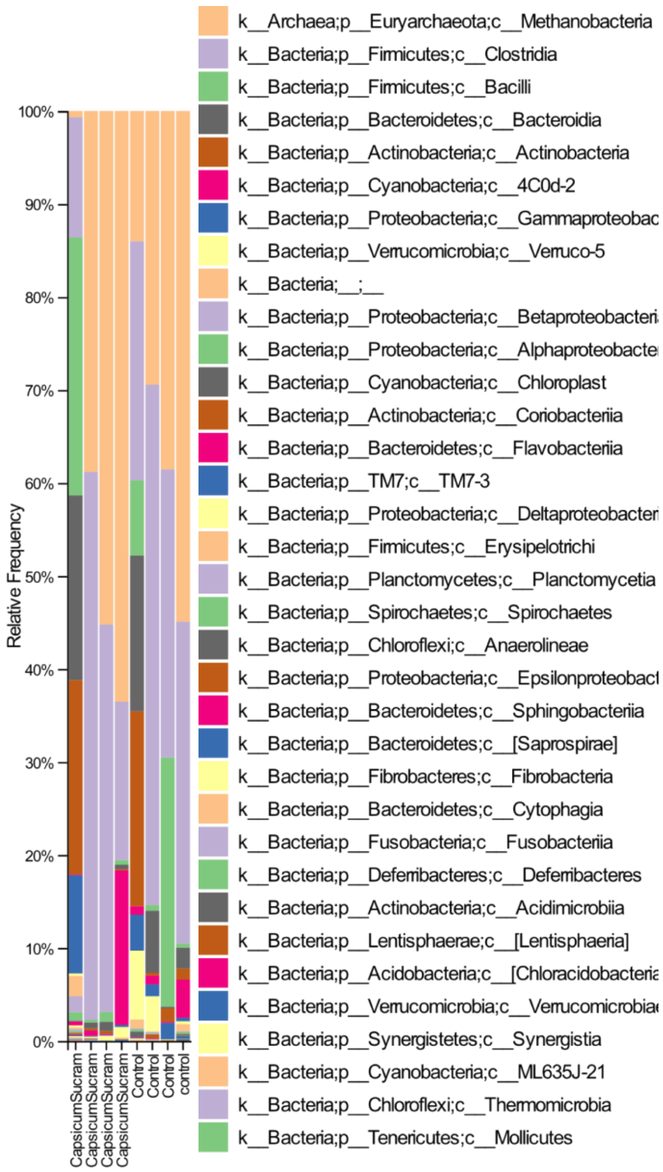
<u>Alpha Diversity</u>



שיטת alpha diversity מאפשרת בדיקת עושר המינים, ובהתאם לאיור, אין השפעה מובהקת סטטיסטית של תוספי הטעם השונים על הרכב המיקרוביום בהשוואה בין שתי קבוצות הטיפול Control ו- Mix.

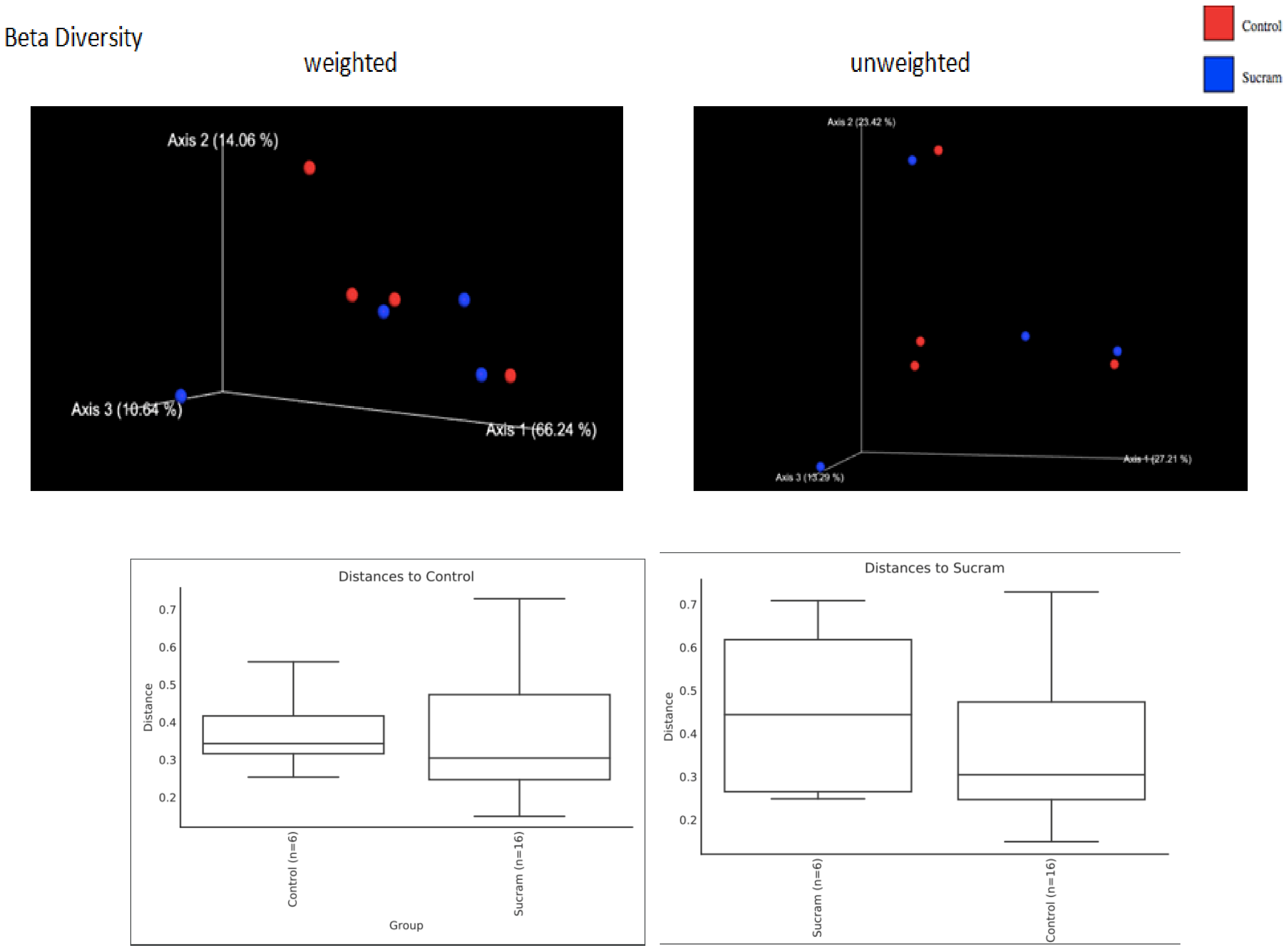
במפת פרופיל החיידקים (ראה למטה), בהשוואה בין קבוצת הטיפול Control לעומת קבוצת הטיפול Mix, לא נצפו הבדלים מובהקים סטטיסטית להשפעת תוספי הטעם השונים על הרכב המיקריוביום בין שתי קבוצות הטיפול.

Taxa Summary (Class level)



השוואת קבוצת הטיפול Control לעומת קבוצת הטיפול Sucram על הרכב המיקרוביום:

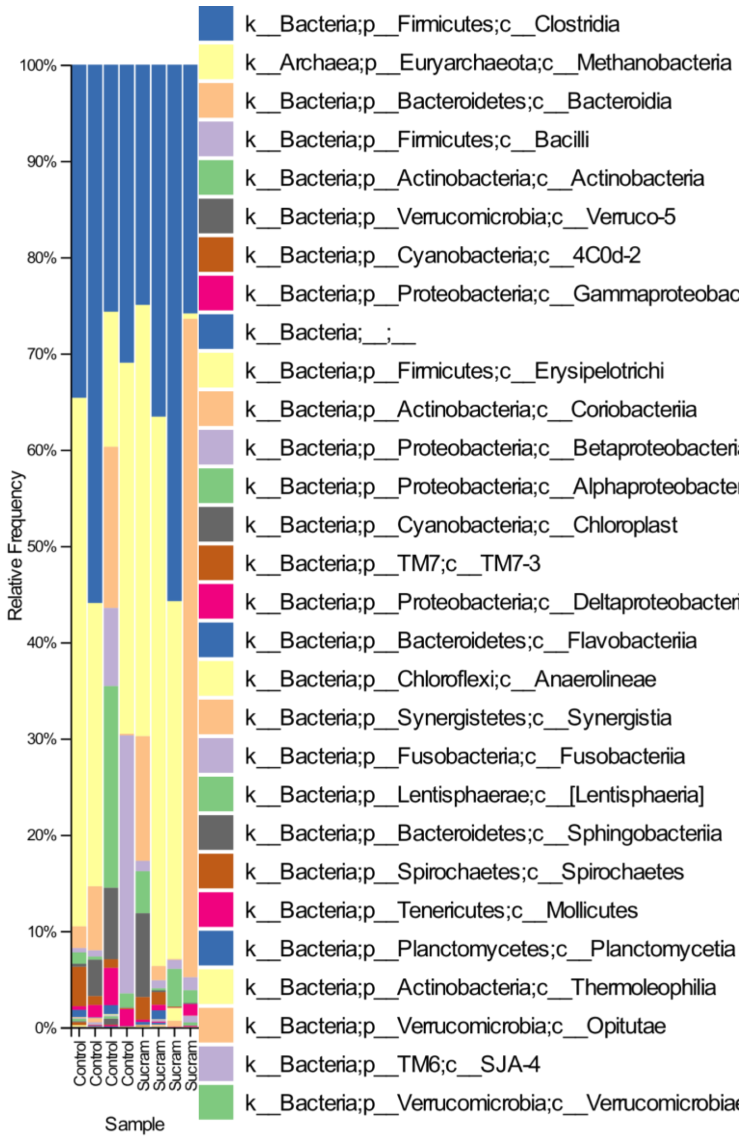
איור מס' 5: השוואה בין קבוצת הטיפול Control לעומת קבוצת הטיפול Sucram



P =1

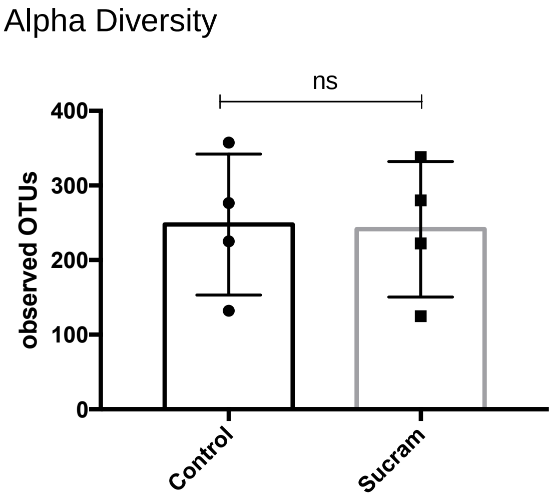
איור מס' 5 מציג הרכב המיקרוביום בין קבוצת הטיפול Control לעומת קבוצת הטיפול Sucram. בהתאם לאיור ולפי שיטת beta diversity המאפשרת השוואת אוכלוסיות החיידקים על פי מרחקים אוקלידים, תוספי הטעם המלאכותיים לא השפיעו על הרכב המיקרוביום במעכל המעי, (רואים שהם לא מקובצים לאזור מסוים או מקום מסוים, כלומר אין הפרדה) לא נמצאה מובהקות סטטיסטית בין הטיפולים השונים 1 =*P*, כלומר הרכב מיקרוביום זהה.

Taxa Summary (Class level)



מפת פרופיל החיידקים, השוואה בין קבוצת הטיפול Control לעומת קבוצת הטיפול Sucram, לא נצפו הבדלים מובהקים סטטיסטית להשפעת תוספי הטעם השונים על הרכב המיקריוביום בהשוואה בין שתי קבוצות הטיפול.

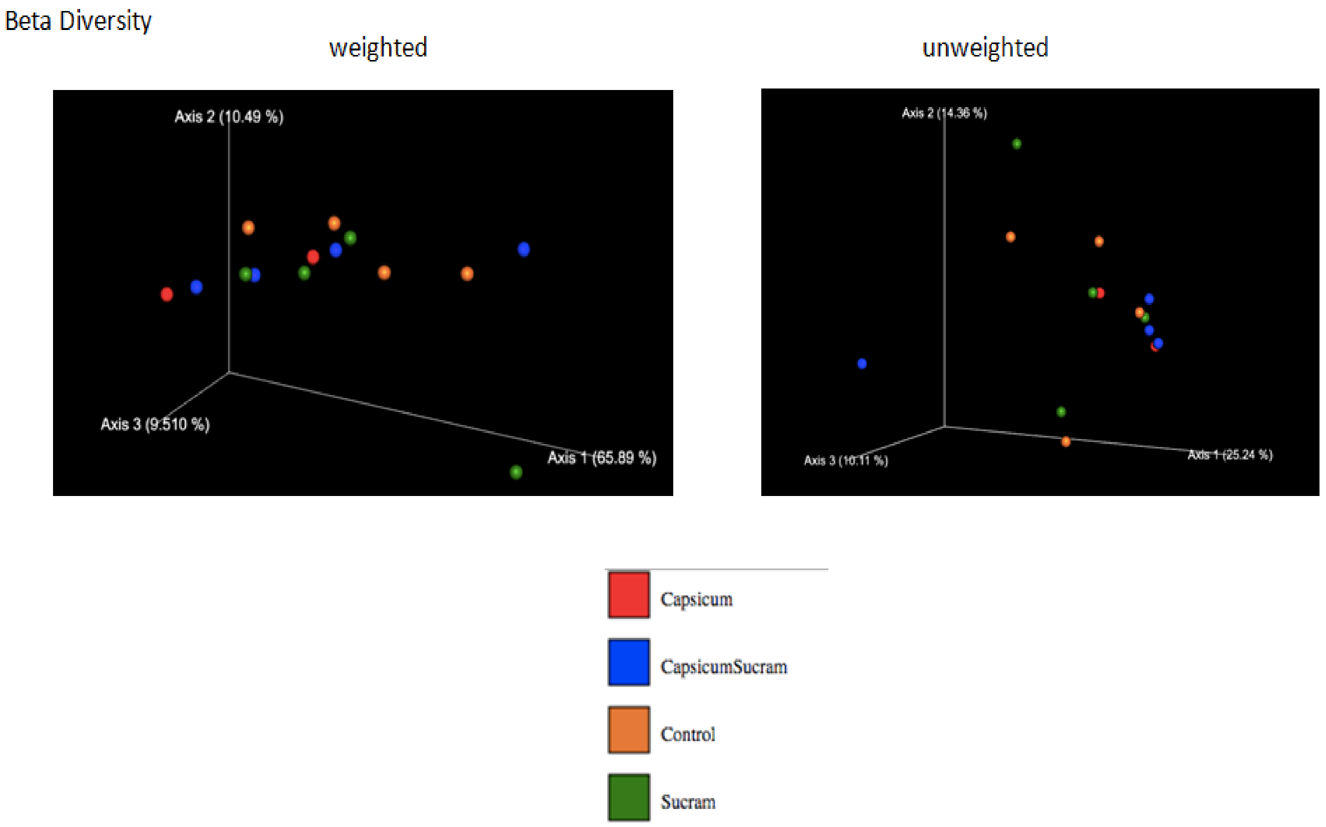
איור מס' 6: השוואה בין קבוצת הטיפול Control לעומת קבוצת הטיפול Sucram



שיטת alpha diversity מאפשרת בדיקת עושר המינים, ובהתאם לגרף, אין השפעה מובהקת סטטיסטית של תוספי הטעם השונים על הרכב המיקרוביום בשתי קבוצות הטיפול Control ו-Sucram.

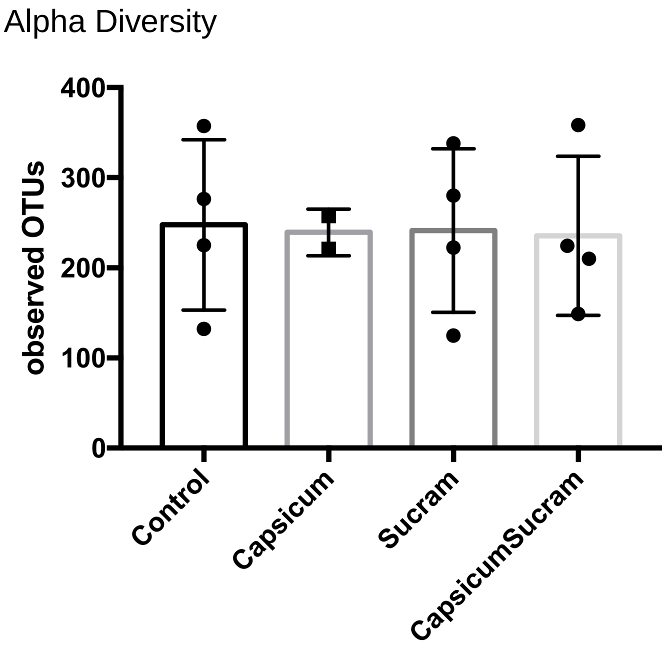
השוואת קבוצת הטיפול Control לעומת שאר הטיפולים השונים על הרכב המיקרוביום:

איור מס' 7: השוואה בין קבוצת הטיפול Control לעומת שאר קבוצות הטיפול



איור מס' 7 מציג הרכב המיקרוביום בהשוואה בין קבוצת הטיפול Control לעומת שאר קבוצת הטיפול. בהתאם לאיור רואים שאין קיבוע לאחת הקבוצות באזור מסוים, אין הפרדה ביניהם, מה שמעיד על אי הימצאות הבדלים מובהקים בהרכב המיקרוביום בקבוצות הטיפול השונות, בהתאם למתן תוספי הטעם השונים, כלומר יש הרכב מיקרוביום זהה.

איור מס' 8: השוואה בין קבוצת הטיפול Control לעומת שאר קבוצות הטיפול



איור מס' 8 מסכם את הרכב המיקרוביום בכלל קבוצות הטיפול השונות, ובהתאם לאיור, לא נצפו הבדלים מובהקים בהרכב המיקרוביום בין קבוצות הטיפול השונות, אין השפעה מובהקת סטטיסטית של תוספי הטעם השונים יחד עם המנה הכולית על הרכב המיקרוביום בהשוואה בין קבוצות הטיפול השונות.

דיון ומסקנות:

המטרה הראשונה בפרויקט הנוכחי היתה יצירת סולם דירוג לטעמים וארומות השונים שזמינים בשוק כתוספים למנות של מעלי גירה. במהלך השנה הראשונה, ביצענו ניסוי טעימה על טלאים בדיר המטבולי בפקולטה לחקלאות ועגלות ברפת בית דגן כאשר תוצאותיו הניבו טבלה שמאשרת את הנחות העבודה שהטעם המתוק הנו בין המועדפים ביותר לטלאים ועגלות כולל את הארומות המתוקות כמו מולסה או טעם חלבי. ואילו, ארומה של חלבה היתה הדחויה ביותר לשני המינים. מעניין לציין, שמיצוי צ'ילי חריף דורג על ידי הכבשים בראש הטבלה, למרות שאינו נחשב לטעם. החריף, אינו עובד על רצפטורים של טעם בחלל הפה או המעי (כמו מתוק, מר, חמוץ, אוממי) אלא על רצפטורים של כאב (עצבים סינסורים). מאידך, תוסף החריף דורג בתחתית הטבלה אצל העגלות. לכן, ניתן להסיק שעגלות וכבשים יש דמיון בחישת הטעמים או הארומות עם יוצאים מן הכלל שיש לשים לב אליהם בניסוי צריכת מזון.

בניסוי המטבולי שני התוספים שנבחרו היו ממתיק מלאכותי Sucram ומיצוי צ'ילי חריף Capsicum. כאמור, שמיצוי צ'ילי חריף דורג על ידי הכבשים בראש הטבלה, למרות שאינו נחשב לטעם. החריף, אינו עובד על רצפטורים של טעם בחלל הפה או המעי (כמו מתוק, מר, חמוץ, אוממי) אלא על רצפטורים של כאב (עצבים סינסורים). כמו כן, התוספים מוכנים באמצעות טכנולוגיה של ננו קפסולציה שאמורה להגן עליהם מפני נידוף וגם למנוע צריבה בחלל הפה במקרה של מיצוי הצ'ילי. לכן, מתוצאות צריכת המזון ניתן להניח שהיתה השפעה פוסט-אובסרפטיבית שגרמה לעליה בצרכית המזון ושיפור בביצועים של הכבשים.

השפעת תוספי הטעם על צריכת רכיבי המנה, ביצועי הכבשים, ועלייה במשקל

בניסוי הנוכחי תוספת של Caps במנה עשירה בעמילן שרידי הגדילה את קצב הגדילה של כבשים. בדומה לתוצאות הנ"ל, אומנם במינים שונים, תוספת של מיצוי צ'ילי בריכוז של 150 חל"מ במנות של ברווזים אמריקניים גרמה לעליה במשקל ושיפור ביעלות המזון (Ali et al., 2016). בדומה לכך, תוספת של מיצוי צ'ילי של 0.5, 0.75 ו-1% במנה של פטמים הביאה לשיפור בביצועי הגדילה ויעליות הפיכת המזון למשלק גוף. ההסבר לתופעה זו בעופות מתבסס על ייצוב המיקרוביוטה במעי בגלל התכונות האנטי בקטריאליות של הקפססין. תוצאות אלו נובעות כנראה בעיקר בשל תכונות אנטי-בקטריאליות שיש ב- Capsicum נגד חיידקים מזיקים הנמצאים לאורך מערכת העיכול, ותרומתו בשמירה על שלמות אפיתל המעי ע"י הגברת עובי הרירית ומיקרו-ווילי והגדלת שטח פני המעי לשיפור הספיגה (AFRC, 1993). במיני מעלי גירה אחרים (בקר לבשר) תוספת של קפסיקום גרמה לעליה בצריכת המזון (Cardozo et al., 2006, Abecia et al., 2012) מאדיך, לא נצפתה כל השפעה בפרות חלב (Tager and Krause, 2011, Oh et al., 2013, Oh et al., 2015, Oh et al., 2016, Oh et al., 2017). אי התאמה של התוצאות הוסברה באמצעות השוני בריכוזי תוסף הקפסיקום במנות כאשר היה גבוה יותר במנות עגלי הפיטום (Oh et al., 2015).

תוסף הממתיק סוקראם לבד או עם קפסיקום לא השפיעה על תוספת משקל, קצב גדילה או צריכת מזון בניסוי הנוכחי. בספרות ניתן למצוא חוסר הסכמה בתוצאות לגבי צריכת מזון או קצב גדילה כאשר ממתיקים או שילובם עם ארומות שונות, נוספים למנות של מינים שונים של בעלי חיים. למשל תוסף של ממתיק הביאה לעליה בצריכת מזון ומשקל גוף בחזירונים (McLaughlin et al., 1983) ובסוסים (Van den Berg et al., 2016). בניגוד לכך, מחקרים אחרים הראו חוסר תגובה לתוספי טעם או ממתיקים בחזירים (Munro et al., 2000, Sterk et al., 2008, Thacker and Haq, 2009). כמו כן, תוספת סוקראם למנות עגלים לפיטום לא הביאה לעליה בצריכת מזון (McMeniman et al., 2006) או בניסוי שבדק השפעות של ריכוזים עולים של התוסף על קצב גדילה של עגלים (Ponce et al., 2014). ניתן לייחס את חוסר ההתאמה בהשפעות התוסף למצב הפיזיולוגי של בעל החיים או הרכב המנה. בניסוי הנוכחי הטלאים קיבלו מנת המורכבת ברובה ממזון מרוכז כאשר הכילה גרעיני תירס שלמים במטרה להזרים כמה שיותר עמילן שרידי למעי. עמילן שרידי במעי הדק דינו כדין סוכרים מבחינת התגובה הפיזיולוגי של המעי הדק. לכן, ניתן להניח שתוספת הממתיק סוקראם לא היתה לה

השפעה על הפרמטרים הנמדדים בגלל העובדה הנ"ל. בנוסף ביטוי הגנים הקשור לחישת הטעם המתוק לא היתה שום השפעה בהשוואה לטיפול ה-Caps או הטיפול המשולב. עובדה זו מחזקת את המסקנה הנ"ל.

תוספת של מיצוי צ'ילי חריף למנות הכבשים הביאה לעליה בצריכת אנרגיה מטבוליתעם ונטיה להגדלת צריכת אנרגיה נטו. השפעה זו ניתן לשייך אותה להשפעות ישירות של קפססין על מערכת העיכול (ראה דיון בהמשך) או להשפעת הקפססין הישירה על אוכלוסיות החיידקים במערכת העיכול החל מהכרס ועד המעי הגס (Cichewicz and Thorpe, 1996, Calsamiglia et al., 2007) . עבודות מראות שתוספת של קפססין גורמת לעליה בריכוז חומצה בוטרית בצואה ו-GLP-1 בפלזמה מיאדך, ירידה בריכוז גרלין הכללי (Song et al., 2017). ריכוזים גבוהים של גרילין מסונתזים ומופרשים מהקיבה כשהיא ריקה (רעב) ובזמן מתיחת הקיבה (שובע) ריכוזו בפלזמה יורד. ניתן לשער (לא נבדק בניסוי הנוכחי) שחוסר העליה בצריכת מזון בטיפול עם תוסף הצ'ילי נגרמה מירידה בריכוזי הגרילין. מאידך, עליה בצריכת אנרגיה מטבולית ונטו בטיפול הצ'ילי בהשוואה לטיפול הביקורת יכולה להיות כתוצאה של עליה בריכוזי GLP-1 שגורם לעליה בספיגת הגלוקוז במעי הדק כתוצאה מעליה בביטוי הגן של נשא הגלוקוז SGLT1 (Sclafani, 2007).

השפעת תוספי הטעם על נעכלות רכיבי המנה:

נעכלות נוטריינטים מושפעת מפירוקם ע"י חיידקי הכרס ועיכול אנזימטי במערת העיכול, קצב המעבר והספיגה (Huntington et al., 2006, Larsen et al., 2009). במחקר הנוכחי ל- Sucram לא הייתה השפעה על נעכלות רכיבי המנה בדומה לתוצאות שנצפו במחקר שנערך על עגלים בו נמדדו נעכלות רכיבי המנה שכללו DM, OM, NDF, CP (Ponce et al., 2014). מדווחים קודמים עולה כי ממתיקים מלאכותיים משפיעים על הרכב המיקרוביום במעיים ע"י הפרה באיזון האוכלוסיות השונות והטיה במספרם (Abou-Donia et al., 2008, Palmnäs et al., 2014). נמצא שהוספת ממתיקים מלאכותיים בעכברים שקיבלו סוכרלוז במינונים שונים למשך 12 שבועות, מצאו הפחתה במספר אוכלוסיית החיידקים האנארובית במעי הגס (bifidobacteria, lactobacilli, Bacteroides, clostridia) ואירוביים באופן משמעותי (Abou-Donia et al., 2008). מדיווחים קודמים, עלה כי לתוסף הטעם Capsicum אין כל השפעה על ייצור VFA וייצור אמוניה בכרס (Tager and Krause, 2011, Oh et al., 2015). כמו כן, הפרשת נגזרות פורינים בשתן, המהוות אינדיקציה לסינתזה מיקרוביאלית בכרס, לא הושפעו מתוסף הטעם Capsicum בפרות חלב (Oh et al., 2017).

הגברת הנעכלות של הנוטריינטים במע"ג יכולה להיות תוצאה מהשפעת גירוי Capsicum על אנזימי העיכול הנמצאים במעי. תוסף הטעם Capsicum (קפסיצין) הגביר פעילות האנזימים ליפאז, עמילאז, טריפסין, כימוטריפסין (Platel and Srinivasan, 2000) סוכראז, ומלטאז בחולדות (Platel and Srinivasan, 1996). בציפורים, קפסיצין עורר ייצור והפרשות אנזימי הלבלב והמעי אשר עשויים להפחית צמיגות תוכן המעי, דבר המוביל לשיפור תהליכי העיכול והספיגה (Ali et al., 2016) .

במחקר זה, Capsicum הגביר את נעכלות חומר יבש כנראה באמצעות עיכוב גדילה מיקרואורגניזמים מזיקים הנמצאת במעי, או ע"י האטת קצב המעבר של הנוטריינטים במעי. עם זאת, בניסויי vivo לא דווח על השפעה של capsaicin על חיידקי המעי בפרות חלב במחקרים קצרי טווח במשך 5 ימים (Oh et al., 2013) או ארוכים יותר במשך 20 ימים (Oh et al., 2017).

קיים פער בספרות עבור השפעות capsaicin על תנועתיות מערכת העיכול ועל זמן המעבר. חלק מהמחקרים דיווחו כי קפסיצין מעורר ריקון קיבה ומוריד רמות לפטין, וכתוצאה מכך מוביל לעלייה בצריכת המזון בבני אדם וחולדות (McCann, 1988, Mózsik et al., 1999, Hsu and Yen, 2007) עם זאת, מחקרים דווחו כי Capsaicin מגביר תנועתיות במערכת העיכול העליונה, אך מעכב ריקון קיבה וגורם להגדלת זמן המעבר במעי האדם, בסה"כ לא נצפתה עליה בזמן המעבר הכללי בצינור מערכת העיכול (Gonzalez et al., 1998). Ali וחבריו (2016) דיווחו על נטייה להפחתת זמן מעבר המזון המשולב עם קפסיצין במחקרים שנעשו בברווזים (Ali et al., 2016).

הפחתת זמן מעבר המזון לאורך צינור מערכת העיכול מביא לעלייה בתהליך ובקצב העיכול הכללי עקב זמינות מוגברת של אנזימי העיכול השונים (Platel and Srinivasan, 2000). Oh וחבריו (2015) מקשרים את הפער בנעכלות המנה עם capsicum המוסף למנה הכולית, אשר היה נמוך יותר בפרות לחלב מאשר בבקר לבשר, לקצב המעבר (Oh et al., 2015). במחקר זה, Capsicum כנראה הגדיל את ייצור האנזימים השונים במערכת העיכול והפרשתם, ובאופן סלקטיבי דכא את החיידקים המזיקים במעי ובכרס, או האריך את זמן המעבר של המזון במערכת העיכול שגרם לעלייה שנמדדה בנעכלות המנה והחנקן.

במעלי גירה, פחמימות עוברים תהליכי עיכול ע"י מיקרואורגניזמים הנמצאים בכרס לחומצות שומן קצרות שרשרת (Mills et al., 1999). עם זאת, עד 50% מעמילן תירס "עוקף" את העיכול בכרס ומגיע אל המעי הדק . שם עובר פירוק אנזימטי למונוסכרידים פשוטים במעי הדק (Larsen et al., 2009). קליטת מונוסכרידים מתרחשת דרך הממברנה האפיקלית, באמצעות הנשאים SGLT1 ו- GLUT2 לקליטת גלוקוז וגלקטוז, ו- GLUT5 לקליטת פרוקטוז (Burant et al., 1992). מונוסכרידים נקלטים ע"י קולטני הטעם T1R2 + T1R3 במעי ומגבירים קליטת גלוקוז ברוב מיני היונקים באמצעות הגברת ביטוי ופעילות הנשאי SGLT1 (Dyer et al., 2003, Moran et al., 2014a). ממתיקים מלאכותיים בריכוזים נמוכים בעלי השפעה גבוהה על הפעלת קולטני הטעם המתוק T1R2 ו- T1R3 (פי 600 יותר מאשר גלוקוז) (Moran et al., 2014a). מכיוון שהביטוי של SGLT1 מושפע מהתזונה, תכולת האנרגיה הגבוהה במנה הכולית הבסיסית המוגשת לכבשים במחקר הנוכחי עשויה להרוות את מנגנון SGLT1 ולכן מיסכה או הקטינה את ההשפעה של תוסף הטעם Sucram על הנעכלות (-Shirazi Beechey et al., 1994, Dyer, 1997, Ferraris and Diamond, 1997).

השפעת תוספי טעם על הביטוי היחסי של קולטני הטעם המתוק ו- SGLT1:

במחקר הנוכחי, Sucram פעל באופן סינרגיסטי עם Capsicum והגביר את הביטוי היחסי של קולטני הטעם המתוק T1R2, T1R3 ונשא הגלוקוז SGLT1. בדומה לממצאינו, דיווח כי סוכרוז תזונתי

וסוכרלוז הגבירו את הביטוי היחסי של SGLT1 הן ברמת רנ"א והן ברמת החלבון, וכתוצאה מכך, הובילו לשיפור בספיגת הגלוקוז בעכברים (Margolskee et al., 2007). כמו כן, הסוכרלוז פעל באופן סינרגיסטי עם גלוקוז בהגברת הביטוי היחסי של ההטרודימרים T1R2 + T1R3 בתאי האנטרוציטים (Mace et al., 2007). הביטוי היחסי של נשא הגלוקוז SGLT1 מושפע מהביטוי היחסי של קולטני הטעם המתוק (Rolland et al., 2001) ומהדיאטה (Shirazi-Beechey et al., 1994; Dyer et al., 1997; Ferraris and Diamond; 1997). לתוסף הטעם Sucram לא הייתה השפעה על הביטוי היחסי של T1R2 ו- T1R3 בג'ג'ונום הקדמי במחקר זה. חוסר ההשפעה על קולטן הטעם המתוק עשוי להיות כתוצאה לקיומם של חיישני מתוקים אחרים, או כתוצאה מרוויה בגלוקוז הנמצא במעי (Margolskee et al., 2007; Moran et al., 2014). לפיכך, במחקר הנוכחי ביטוי קולטני הטעם המתוק T1R2 ו- T1R3 כנראה אינם הקולטנים היחידים המגיבים לנוכחות מונוסכרידים במעי.

רגולציה של חלבון SGLT1 עשויה להתרחש במהלך התרגום או לאחר התרגום. במחקר קודם, D-Glucose בריכוז 30 mM הוחדר לתוך תריסריון כבשים דרך קנולה (Duodenal cannula). הביטוי היחסי של SGLT1 ברמת הרנ"א גדל רק פי 2, אך ברמת החלבון הייתה עלייה פי 60-90. המחברים הסיקו כי הבקרה העיקרית של SGLT1 ע"י גלוקוז לומינאלי מתרחשת במהלך התרגום או לאחר התרגום (Lescale-Matys et al., 1993) . למרות שאנחנו לא מדדנו את הביטוי היחסי של SGLT1 ברמת החלבון בעבודה זו, ובהסתמך על תוצאות מחקרים קודמים, ניתן להסיק שתוסף הטעם Sucram עשוי לגרום לעלייה בביטוי חלבון SGLT1, והגברת פעילותו מבלי לראות השפעה ברמת הרנ"א.

קולטני הטעם המתוק ונשא הגלוקוז מתבטאים בסדרי גודל שונים לאורך מע' העיכול. SGLT1 ו- T1R2 מתבטאים יותר באזור האמצעי של ג'ג'ונום, בעוד ש- T1R3 מתבטא יותר בחלק הדיסטלי של המעי בעזים (Ileum) (Ran et al., 2016). במחקר הנוכחי, דגימות המעי הדק נלקחו מהג'ג'ונום הקדמי לכן, זה יכול להיות גורם סביר לחוסר השפעת תוסף הטעם Sucram הנצפה במחקרנו על הביטוי היחסי של SGLT1 וקולטני הטעם המתוק.

נשא הגלוקוז SGLT1 הנו קו-טרנספורטר שמכניס לתא חד סוכר ביחד עם Na^+ לכן, פעילות משאבת נתרן–אשלגן נחוצה לפעילות אופטימאלית. משאבת נתרן-אשלגן (Na^+/K^+-ATPase) היא אנזים טראנסממברנלי בקרום התא המוביל באופן פעיל יוני נתרן אל מחוץ לתא ויוני אשלגן אל תוך התא. הביטוי היחסי הגבוה ביותר של משאבת נתרן-אשלגן נצפה בקבוצת הטיפול Capsicum בהשוואה לשאר הטיפולים. תוצאה זו סבירה מאחר וקפסיצין בעל השפעות שונות על איברים פנימיים בבעלי חיים, ומעורר ייצור והפרשות אנזימי הלבלב והמעי (Lee et al., 2004, Ali et al., 2016). כתוצאה מכך, מוביל לשיפור תהליך העיכול והספיגה, דבר הדורש ביטוי גבוה יותר במשאבות נתרן-אשלגן המשפיעה על מנגנוני תא מרכזיים ואף חיוניים (Clausen et al., 2017).

השפעת תוספי הטעם על נעכלות ומאזן החנקן, הביטוי היחסי של APN ופרופיל חומצות אמינו:

קביעת מאזן החנקן (אצירת חנקן) משקפת את הניצול בפועל של חלבון מטבולי הנספג במעי במנה. בהתאם לתוצאות המחקר הנוכחי, תוסף הטעם Capsicum הגביר אצירת החנקן ונעכלות החנקן לכאורה בהשוואה לשאר קבוצות הטיפול. מאידך, מחקר קודם בדק את השפעת התוסף Capsicum בכרס, על תסיסת חיידקי הכרס, עיכול המזון, ואצירת החנקן בניסוי שכלל 21 טלאים. החוקרים דווחו שלא הייתה השפעה של תוסף Capsicum על צריכת החנקן, חנקן המופרש בשתן וצואה (Alford et al., 2016). החוקרים נימקו את ממצאיהם שריכוז ה- Capsicum הנמוך במנה לא השפיע על נעכלות החנקן והחיידקים בכרס או לחלופין, גרם לחילוף חומרים די מהיר. הסברים אפשריים הם שמקורות ה-Capsicum לא היו מוגנים מפני הפירוק החיידקי בכרס, או שלא נקלטו ונספגו במערכת העיכול. דווח שלתוסף הטעם Capsicum יש מחצית חיים כ- 47 דקות במערכת הסיסטמית כאשר ניתן דרך הפה לחולדות דבר המצביע על קצב מטבוליזם מהיר של Capsicum (O'Neill et al., 2012). לתוסף Capsaicin יש השפעה על הלבלב ואיברים פנימיים אחרים תחת בקרה ושליטה נוירו אנדוקרינית (Yamaguchi, 1992). במחקר בכלבים, הראו כי ל- Capsicum יש אפקט היפוגליקמי ע"י הגברת רמות האינסולין בדם (Tolan et al., 2001). יש לציין כי כמויות Capsicum שניתנו להזנת הכלבים היו פי 57 יותר מאלה שסופקו לטלאים במחקר Alford אשר סופקה לכבשים, והתבססה על כמות שעוררה השפעות אנטי-דלקתיות במחקרים שנעשו על חולדות (Demirbilek et al., 2004). בניגוד למחקר הנוכחי, אשר סיפקנו כמות גדולה של Capsicum בהתאם להוראות היצרן, בכמות של 150 מ"ג/ק"ג משקל גוף. כמות התוסף משפיעה ככל הנראה על ההבדלים בנעכלות החנקן לכאורה, ואצירת החנקן בין המחקר הנ"ל למחקר הנוכחי. בנוסף לכך, בדגימות נוזל הכרס הראו הפחתה בריכוזי VFA בנוכחות Capsicum ודיכוי בייצור האצטט (Cardozo et al., 2006), דבר המעיד על שינוי והטיה בתסיסת החיידקים. במחקר הנוכחי לא נבדק ריכוז VFA בכרס, אך ניתן להניח שהייתה השפעה על אופי וקצב התסיסה (יותר פרופיונט באופן יחסי) מה שגרם לניצול ואצירת חנקן טובים יותר בטיפולים עם התוסף.

בנוסף למדידת נעכלות החנקן לכאורה, ואצירת חנקן, נמדד גם הביטוי היחסי של האנזים APN בג'ג'ונום הקדמי, ונקבע פרופיל חומצות אמינו במעכל. APN אחד האנזימים השכיחים לקבוצת האמינופפטידאזות הפועל על מגוון רחב של סובסטרטים וספציפי לפפטידים עם רצף חומצות אמינו חסרי מטען בקצה ה- N טרמינלי (Stefanović et al., 1998). APN נפוץ בעיקר במיקרווילי של המעי ובקורטקס של הכליה (Kenny and Maroux, 1982). נמצא כי APN מתבטא ברמות גבוהות בממברנת ה- brush border של תאי האנטרוציטים במעי אצל עופות (Danielsen et al., 1986, Gal-Garber and Uni, 2000) ומשתתף בתהליך הפירוק הסופי של חלבונים ע"י חיתוך פפטידים מהקצוות. תוסף הטעם Capsicum הגביר את הביטוי היחסי של APN בהשוואה לשאר קבוצות הטיפול. תוצאה זו תואמת את הממצאים הגברת נעכלות לכאורה ואצירת חנקן.

בפרופיל חומצות האמינו שמדדנו, לא נמצאו הבדלים מובהקים בין קבוצות הטיפול השונות. כנראה שתוספי הטעם במנה לא השפיעו על הרכב או כמות החלבון המטבולי שזרם למעי. בהתאם לדיון בפרקים קודמים, סביר להניח שלא היתה השפעה של התוספים על אופי התסיסה בכרס או זרימת חלבון שרידי למעי.

השפעת תוספי הטעם על הביטוי היחסי של ההורמונים GLP-1, GLP-2, CCK:

תאי קולטני הטעם המתוק הנמצאים לאורך צינור העיכול גורמים להפרשת מגוון רחב של הרמוני שובע מתאים פרא- אנדוקריניים (Dyer et al., 2007, Margolskee et al., 2007), בעלי תפקיד חשוב בשמירה על הומיאוסטזיס של הגלוקוז כגון: PYY, GLP-1 ו- GIP. הורמוני השובע הנ"ל משוחררים עם כניסת יוני סידן לתוך התא, ומועברים למערכת העצבים המרכזית דרך עצב הוואגוס (Prawitt et al., 2003, Balen et al., 2008). גירוי קולטני הטעם המתוק ונשא הגלוקוז, גורם לייצור סיגנלים שונים המשפיעים על ביטוי נשא הגלוקוז. סיגנלים אלה ידועים בשם Incretins, הכוללים CCK, GLP-1, GLP-2 ועוד (Egan and Margolskee, 2008). הורמונים אלו משוחררים מתאים אנטרואינדוקרינים שונים, בעלי מגוון רחב של השפעות שונות על חילוף החומרים של הגלוקוז.

הורמון GLP-1 מופרש מתאי L-cells האינטרואינדוקרינים ובעל תפקידים חשובים בשמירה על הומיאוסטזיס של גלוקוז במעי ומעורב במסלולי ספיגה ומטבוליזם הגלוקוז. כגון, מפחית אפופטוזיס של תאי ביטא, מעכב הפרשת גלוקגון, וריקון קיבה, מגביר הפרשת אינסולין מהלבלב ומוריד צריכת המזון (Caron et al., 2017). הורמון GLP-2 גם כן מופרש מתאי L-cells ועבל תפקידים שונים כגון: הפחתת אפופטוזיס של תאים אנטרוציטים, שמירת התפתחות המעיים, מגביר צמיחת ה- villus במעיים, ובך מגביר זיקת המעיים לקליטת וספיגת חומרים מזינים (Caron et al., 2017). הורמון CCK מופרש בעיקר מתאי I-cells האינטרואינדוקרינים. פועל במסלולים שונים לוויסות צריכת המזון ורגולציית התיאבון, מגביר הפרשות לבלב ומדכא צריכת מזון (Bergen, 2015).

הראיות הניסיונות במחקר הנוכחי מראות כי חישה של מונוסכרידים וממתיקים מלאכותיים ע"י T1R2-T1R3, הביאה לעלייה בשחרור הורמון GLP-2, אשר גרם להגברת ביטוי ה- SGLT1 בקבוצת הטיפול Mix בהשוואה לשאר הטיפולים. בהתאם לכך, הביטוי היחסי הגבוה של קולטני הטעם המתוק נצפה בקבוצת הטיפול Mix. כמו כן, הביטוי היחסי הגבוה ביותר של נשא הגלוקוז SGLT1 נצפה בקבוצת הטיפול Mix לעומת קבוצת תוסף הטעם Capsicum. דבר המעיד שתוספי הטעם השפיעו באופן סינרגיסטי על ביטוי קולטני הטעם המתוק ונשא הגלוקוז. באופן דומה, הביטוי היחסי הגובה ביותר של GLP-1, GLP-2 , CCK נצפו בקבוצת הטיפול Mix בהשוואה לשאר קבוצות הטיפול.

מחקרים קודמים הוכיחו שההורמון GLP-2 מגביר את ביטוי נשא הגלוקוז SGLT1 ואת ספיגת הגלוקוז במעי הדק אצל העכברים (Cheeseman, 1997, Ramsanahie et al., 2004, Cottrell et al., 2006). יתר על כן, חשיפת המעי הדק לממתיקים מלאכותיים כגון סוכרלוז וסכרין, מעוררת הפרשת הורמון GLP-2 באופן ישיר (Ramsanahie et al., 2004). Moran ושותפיה הראו במחקרים שנעשו על כבשים שצריכת ממתיקים מלאכותיים כגון סוכרלוז וסכרין, מעוררת הפרשת GLP-2, GLP-1,

אשר הובילו להגברת ביטוי הנשא SGLT1 במסלול ניורו-פראקריני, שהביאה לשיפור בספיגת הגלוקוז במעי (Moran et al., 2014a). בהתאם לתוצאות עובדתנו ולמחקרים קודמים, ניתן להסיק שהביטוי היחסי של קולטני הטעם המתוק בקבוצת הטיפול Mix, הביאו לעלייה בהפרשת ההורמונים GLP-1, GLP-2, CCK, אשר בתורם משפיעים גם כן על הגברת הביטוי היחסי של SGLT1, וכתוצאה מכך שיפור בספיגת ובמטבוליזם של גלוקוז. למרות האמור לעיל, לא נצפתה השפעה על ביצועי הטלאים בטיפול הנ"ל.

השפעת תוספי הטעם על הרכב המיקרוביום:

במחקר הנוכחי לא מצאנו הבדלים מובהקים בהרכב המיקרוביום בעקבות הוספת תוספי הטעם Sucram ו- Capsicum למנה הכולית של הכבשים. אוכלוסיית החיידקים בצינור העיכול כוללת תערובת דינאמית של מיקרואורגניזמים בהרכבים המשתנים לאורך מערכת העיכול וגם משתנים בין חלל המעי ולמוקוזה (Isolauri et al., 2004, Malmuthuge et al., 2015). מעט מאד עבודות נעשו במע"ג על הרכב המיקרוביום הנמצאים באזור הפרוקסימלי של המעי או הרכב המיקרוביום הנמצא בתוך השכבה הרירית של המעי, אשר עשוי להיות הרכב חיידקי שונה מזה של צואה, ומההרכב החיידקי בכרס שנחקרו רבות (Bik et al., 2006, Ahmed et al., 2007, Zoetendal et al., 2012, Mann et al., 2014). זהו ניסוי ראשון שבוצע בכבשים בנושא השפעת תוספי טעם על הרכב המיקרוביום במעכל באזור הג'ג'ונום הקדמי בכבשים. הממצאים מראים כי לכל הכבשים היה הרכב מיקרוביום דומה. אוכלוסיות חיידקים רבות ומגוון משפחות נכחו במעכל של החלק הקדמי של המעי, כגון: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Lactobacillales, Bifidobacteriacea, Methanobacteria, Ruminococcaceae, Clostridium, Anaerolinacea, Lachnospiraceae, Oxalobacteraceae, Faecalibacterium, Enterobacteriaceae, Gammaproteobacteria, Staphylococcaceae, Ruminococcaceae, Turicibacteraceae, Actinobacteria ועוד.

בשונה מתוצאות עבודתנו, מחקרים קודמים בדקו השפעות תוסף הטעם Sucram במנה ומצאו שינויים בהרכב המיקרוביום. במחקר שנעשה על חזירים נמצא שתוספת Sucram למנה הכולית, הגדילה את אוכלוסיית לקטובצילוס שונים בלומן המעי, בנוסף לעלייה משמעותית במקביל בריכוז חומצה לקטית, דבר שגרם להפחתת שכיחות מחלות אנטריות בקרב חזירים (Daly et al., 2016). במחקר אחר, נמצא שתוספת Sucram בחזירים בתקופת הגמילה, שינתה את הרכב המיקרוביום לאורך המעי, והקטינה את הפרעות העיכול המתרחשות בשלבי הגמילה כגון שלשולים והפרעות בתפקוד המעי. תוצאותיהם הראו כי הייתה ירידה משמעותית במיני החיידק Campylobacter, ומיני Helicobacteraceae. בהתאם לכך הציעו המחברים כי לתוסף Sucram קיים פוטנציאל להפחתת זיהומי בשר ותרומה לבטיחות המזון (Kelly et al., 2017). ההשפעות של ממתיקים מלאכותיים על הרכב המיקרוביום במעיים נחקרו בעבר בדגימות צואה בבני אדם. Bik וחבריו הוכיחו במחקרים קודמים כי הוספת הממתיק המלאכותי maltitol, שיפרה באופן משמעותי את הרכב המיקרוביום במעי הגס מאחר והגבירה אוכלוסיית זני Bifidobacteria ו- Lactobacillus הידועים כבעלי השפעה פרוביוטית חיובית

על בריאות המעיים, ושמירה על חסינות והתבגרות במעי (Bik et al., 2006). מחקרים קודמים דווחו על תכונות אנטי-בקטריאליות שיש ב- Capsicum נגד חיידקים מזיקים הנמצאים לאורך מערכת העיכול, ותרומתו בשמירה על שלמות אפיתל המעי ע"י הגברת עובי הרירית והווילי של המעי הדק, והגדלת שטח פני המעי לשיפור הספיגה (AFRC, 1993).

יש לציין כי תוצאות מחקרנו שלא מצאו הבדלים מובהקים בהרכב המיקרוביום בעקבות הוספת תוספי הטעם Sucram ו- Capsicum תלויות במידה רבה מאוד בשונות הגנטית, וההתנהגותית הקיימת בין הכבשים. יתכן, שמשך החשיפה הקצר יחסית (שלושה שבועות) לא אפשר ביטוי להשפעות על הרכב המיקרוביום. מכאן עולה הצורך בביצוע ניסוי לתקופה ארוכה יותר, וחשיפה ממושכת יותר לתוספי הטעם.

גורמים סביבתיים עשויים להשפיע על הרכב המיקרוביום במעי בניסוי הנוכחי. למשל תנאי הניסוי כלומר החזקת הכבשים בכלובים מטבוליים והעקה הכרוכה בכך. סיבה נוספת עשויה להיות מתודולוגית ואנליזת הרכב המיקרוביום. ראוי לציין כי התוצאות האחרונות מבוססות בעיקר על רצף חומצות גרעין, אשר עשוי להיות מוגבל ע"י מיקום לקיחת הדגימה, סוג הדגימה שנאספה, שיטות ביצוע הדגימה, עומק הרצף, ואת שיטת ניתוח התוצאות. בנוסף לכך, זיהוי טקסונומי ופונקציונלי של המיקרוביום בדגימות לומן המעי, תלוי במאגרי נתונים ומדע קיימים, ובאורגניזמים ופונקציות מזוהים בלתי מסווגים ברמות טקסונומיות וברמת גנים המקודדים לחלבונים שונים (Malmuthuge et al., 2015).

לסיכום בניסוי הנוכחי הראנו שיש השפעה מובהקת לתוספי טעם על ביצועי כבשים. באופן כללי, תוסף הקפסיקום העלה נעכלות המזון, שפר מאזן אנרגיה ויעילות נצולת המזון דבר שהתבטא ביותר אנרגיה מטבולית וקצב גדילה. כמו כן, תוצאות שנה א' מראות בברור שתוספי טעם וריח עשויות לעודד אכילה וחלקם לדחות צרית מזון. למיטב ידיעתנו, הניסוי הנוכחי מספק בפעם הראשונה נתונים על השפעת תוספי טעם על יעילות המזון לגדילה בכבשים. אחת המסקנות מהניסוי הנה שסוקראם לא גורם לעליה בצריכת המזון ואיננו משפיע על ביטוי גנים שקשורים במערך הטעם המתוק וספיגת סוכרים בתחילת המעי הדק במנות עטירות עמילן. שילוב של שני התוספים הביא לעליה בביטוי הגנים הנ"ל מחד, ותוסף הצ'ילי לא הביא לשינוי מאידך. תוצאות הניסוי הנוכחי מראות שיש סינרגיזם בפעולת שני התוספים ביחד במנות הנ"ל על ביטוי הגנים של קולטני הטעם המתוק וטרנספורטר הגלוקוז במעי הקדמי של כבשים שנזונו במנה עטירת אנרגיה.

במחקר הנוכחי לא נצפו הבדלים בהרכב המיקרוביום אצל הכבשים בקבוצות הטיפול השונות, עם זאת, אפיון קהילת המיקרוביום הנו אינפורמטיבי מאוד להבנת האינטראקציות בין המיקרוביום לבין מצבים פיזיולוגיים שונים כמו בריאות, גדילה, מחלות וכו'... נדרשים מחקרים עתידיים נוספים כדי לבחון את המסלולים המטבוליים בהם תוסף הטעם Capsicum משפע על צריכת המזון, יעילות ההזנה, והרכב המיקרוביום.

מקורות ספרות:

Abecia, L., N. Rodríguez-Romero, D. Yañez-Ruiz, and M. Fondevila. 2012. Biodiversity and fermentative activity of caecal microbial communities in wild and farm rabbits from Spain. Anaerobe 18(3):344-349.

Abou-Donia, M. B., E. M. El-Masry, A. A. Abdel-Rahman, R. E. McLendon, and S. S. Schiffman. 2008. Splenda alters gut microflora and increases intestinal p-glycoprotein and cytochrome p-450 in male rats. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 71(21):1415-1429.

AFRC. 1993. Protein Requirements of Ruminants. An advisory manual prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients. Wallingford, UK: CAB International.

Ahmed, S., G. T. Macfarlane, A. Fite, A. J. McBain, P. Gilbert, and S. Macfarlane. 2007. Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. Applied and environmental microbiology 73(22):7435-7442.

Alford, J., J. Castro, E. Oosthuysen, S. Rosasco, R. Richins, E. Scholljegerdes, D. Hallford, and C. Loest. 2016. 1645 WS Effects of capsaicin source on blood capsaicin, glucose and insulin concentrations, rumen fermentation and nitrogen balance of sheep. Journal of Animal Science 94(suppl_5):801-802.

Ali, W., A. Ahmed, and H. E. El-Gabry. 2016. Effects of capsaicin supplementation on productive and physiological performance of pekin ducks during summer season. Egyptian Journal of Nutrition and Feeds 19(3):549-561.

Arnold, G., E. Boer, and C. Boundy. 1980. The influence of odour and taste on the food preferences and food intake of sheep. Australian Journal of Agricultural Research 31(3):571-587.

Balen, D., M. Ljubojevic, D. Breljak, H. Brzica, V. Zlender, H. Koepsell, and I. Sabolic. 2008. Revised immunolocalization of the Na+-D-glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody. American Journal of Physiology-Cell Physiology 295(2):C475-C489.

Baumont, R., S. Prache, M. Meuret, and P. Morand-Fehr. 2000. How forage characteristics influence behaviour and intake in small ruminants: a review. Livestock Production Science 64(1):15-28.

Beauchamp, G. K. and J. A. Mennella. 2009. Early Flavor Learning and Its Impact on Later Feeding Behavior. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 48:S25-S30.

Bell, F. R. and R. L. Kitchell. 1966. Taste reception in the goat, sheep and calf. The Journal of Physiology 183(1):145-151.

Bergen, W. G. 2015. Small-intestinal or colonic microbiota as a potential amino acid source in animals. Amino Acids 47(2):251-258.

Bik, E. M., P. B. Eckburg, S. R. Gill, K. E. Nelson, E. A .Purdom, F. Francois, G. Perez-Perez, M. J. Blaser, and D. A. Relman. 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(3):732-737.

Burant, C., J. Takeda, E. Brot-Laroche, G. Bell ,and N. Davidson. 1992. Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. Journal of Biological Chemistry 267(21):14523-14526.

Calsamiglia, S., M. Busquet, P. Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. Journal of dairy science 90(6):2580-2595.

Cardozo, P., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 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(10):2801-2808.

Caron, J., D. Domenger, P. Dhulster, R. Ravallec, and B. Cudennec. 2017. Protein digestion-derived peptides and the peripheral regulation of food intake. Frontiers in Endocrinology 8:85.

Cheeseman, C. 1997. Upregulation of SGLT-1 transport activity in rat jejunum induced by GLP-2 infusion in vivo. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 273:(6)R1965-R1971.

Cichewicz, R. H. and P. A. Thorpe. 1996. The antimicrobial properties of chile peppers (Capsicum species) and their uses in Mayan medicine. Journal of ethnopharmacology 52(2):61-70.

Clausen, M. V., F. Hilbers, and H. Poulsen. 2017. The structure and function of the Na, K-ATPase isoforms in health and disease. Frontiers in physiology 8:371.

Cottrell, J., B. Stoll, R. Buddington, J. Stephens, L. Cui, X. Chang, and D. Burrin. 2006. Glucagon-like peptide-2 protects against TPN-induced intestinal hexose malabsorption in enterally refed piglets. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 290(2):G293-G300.

Daly, K., A. C. Darby, N. Hall, M. C. Wilkinson, P. Pongchaikul, D. Bravo, and S. P. Shirazi-Beechey. 2016. Bacterial sensing underlies artificial sweetener-induced growth of gut L actobacillus. Environmental Microbiology 18(7):2159-2171.

Danielsen, E., G. Cowell, H. Sjöström, and O. Norén. 1986. Translational control of an intestinal microvillar enzyme. Biochemical Journal 235(2):447-451.
Demirbilek, S., M. O. Ersoy, S. Demirbilek, A. Karaman, N. Gürbüz, N. Bayraktar, and M. Bayraktar. 2004. Small-dose capsaicin reduces systemic inflammatory responses in septic rats. Anesthesia & Analgesia 99(5):1501-1507.
Dyer, J. 1997 .Hosie KB, Shirazi-Beechey SP. Nutrient regulation of human intestinal sugar transporter (SGLT1) expression. Gut 41:56-95.
Dyer, J., K. Daly, K. S. H. Salmon, D. K. Arora, Z. Kokrashvili, R. F. Margolskee, and S. P. Shirazi-Beechey. 2007. Intestinal glucose sensing and regulation of intestinal glucose absorption. Biochemical Society Transactions 35(5):1191-1194.
Dyer, J., S. Vayro, and S. Shirazi-Beechey. 2003. Mechanism of glucose sensing in the small intestine. Portland Press Ltd.
Egan, J. M. and R. F .Margolskee. 2008. Taste cells of the gut and gastrointestinal chemosensation. Molecular interventions 8(2):78.
Ferraris, R. P. and J. Diamond. 1997. Regulation of intestinal sugar transport. Physiological reviews 77(1):257-302.
Gal-Garber, O. and Z. Uni .2000 .Chicken intestinal aminopeptidase: partial sequence of the gene, expression and activity. Poultry science 79(1):41-45.
Gerrish, C. J. and J. A. Mennella. 2001. Flavor variety enhances food acceptance in formula-fed infants. The American Journal of Clinical Nutrition 73(6):1080-1085.
Gonzalez, R., R. Dunkel, B. Koletzko, V. Schusdziarra, and H. Allescher. 1998. Effect of capsaicin-containing red pepper sauce suspension on upper gastrointestinal motility in healthy volunteers. Digestive diseases and sciences 43(6):1165-1171.
Harper, M. T., O. Joonpyo, F. Giallongo, J. C. Lopes, A. N. Hristov, and J. Faugeron. 2015. Preference of flavored concentrate premixes by dairy cows. . J Dairy Sci 98, Suppl. 2:621.
Hsu, C.-L. and G.-C. Yen. 2007. Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. Journal of agricultural and food chemistry 55(5):1730-1736.
Huntington, G. B., D. L. Harmon, N. B. Kristensen, K. C. Hanson, and J. W. Spears. 2006. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. Animal Feed Science and Technology 130(3–4):225-241.
Isolauri, E., S. Salminen, and A. Ouwehand. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol 18:299-313.
Kelly, J., K. Daly, A. W. Moran, S. Ryan, D. Bravo, and S. P. Shirazi-Beechey. 2017. Composition and diversity of mucosa-associated microbiota along the entire length of the pig gastrointestinal tract; dietary influences. Environmental microbiology 19(4):1425-1438.
Kenny, A. J. and S. Maroux. 1982. Topology of microvillar membrance hydrolases of kidney and intestine. Physiological Reviews 62(1):91-128.
Ketelaars, J. and B. Tolkamp. 1991. "Toward a new theory of feed intake regulation in ruminants. Agricultural University Wageningen, Wageningen, the Netherlands:254.
Kyriazakis, I., D. H. Anderson, and A. J. Duncan. 1998. Conditioned flavour aversions in sheep: the relationship between the dose rate of a secondary plant compound and the acquisition and persistence of aversions. The British journal of nutrition 79(1):55-62.
Larsen, M., P. Lund, M. Weisbjerg, and T. Hvelplund. 2009. Digestion site of starch from cereals and legumes in lactating dairy cows. Animal Feed Science and Technology 153(3-4):236-248.
Lee, K. J., R. Vos, and J. Tack. 2004. Effects of capsaicin on the sensorimotor function of the proximal stomach in humans. Alimentary pharmacology & therapeutics 19(4):415-425.
Lescale-Matys, L., J. Dyer, D. Scott, T. Freeman, E. Wright, and S. Shirazi-Beechey. 1993. Regulation of the ovine intestinal Na+/glucose co-transporter (SGLT1) is dissociated from mRNA abundance. Biochemical Journal 291(2):435-440.
Liem, D. G. and J. A. Mennella. 2002. Sweet and Sour Preferences During Childhood: Role of Early Experiences. Developmental psychobiology 41(4):388-395.
Mace, O. J., J. Affleck, N. Patel, and G. L. Kellett. 2007. Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. The Journal of physiology 582(1):379-392.
Malmuthuge, N., P. J. Griebel, and L. L. Guan. 2015. The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. Frontiers in veterinary science 2:36.
Mann, E., S .Schmitz-Esser, Q. Zebeli, M. Wagner, M. Ritzmann, and B. U. Metzler-Zebeli. 2014. Mucosa-associated bacterial microbiome of the gastrointestinal tract of weaned pigs and dynamics linked to dietary calcium-phosphorus. PloS one 9(1):e86950.
Margolskee, R .F., J. Dyer, Z. Kokrashvili, K. S. Salmon, E. Ilegems, K. Daly, E. L. Maillet, Y. Ninomiya, B. Mosinger, and S. P. Shirazi-Beechey. 2007. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na+-glucose cotransporter 1. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(38):15075-15080.

McCann, M. 1988. Verbalis JG, Stricker EM. Capsaicin pretreatment attenuates multiple responses to cholecystokinin in rats. J Auton Nerv Syst 23:265-272.
McLaughlin, C. L., C. A. Baile, L. L. Buckholtz, and S .K. Freeman. 1983. Preferred flavors and performance of weanling pigs. Journal of Animal Science 56(6):1287-1293.
McMeniman, J., J. Rivera, P. Schlegel, W. Rounds, and M. Galyean. 2006. Effects of an artificial sweetener on health, performance, and dietary preference of feedlot cattle. Journal of animal science 84(9):2491-2500.
Mills, J., J. France, and J. Dijkstra. 1999. A review of starch digestion in the lactating dairy cow and proposals for a mechanistic model: 2. Postruminal starch digestion and small intestinal glucose absorption. J. Anim. Feed Sci 8(4):451-481.
Moran, A., M. Al-Rammahi, C. Zhang, D. Bravo, S. Calsamiglia, and S. Shirazi-Beechey. 2014a. Sweet taste receptor expression in ruminant intestine and its activation by artificial sweeteners to regulate glucose absorption. Journal of dairy science 97(8):4955-4972.
Moran, A. W., M. Al-Rammahi, C. Zhang, D. Bravo, S. Calsamiglia, and S. P. Shirazi-Beechey. 2014b. Sweet taste receptor expression in ruminant intestine and its activation by artificial sweeteners to regulate glucose absorption. Journal of Dairy Science 97(8):4955-4972.
Mózsik, G., A. Debreceni, O. M. Abdel-Salam, I. Szabó, M. Figler, A. Ludány, I. Juricskay, and J. Szolcsányi. 1999. Small doses of capsaicin given intragastrically inhibit gastric basal acid secretion in healthy human subjects. Journal of Physiology-Paris 93(5):433-436.
Munro, P., A. Lirette, D. Anderson, and H. Ju. 2000. Effects of a new sweetener, Stevia, on performance of newly weaned pigs. Canadian Journal of Animal Science 80(3):529-531.
O'Neill, J., C. Brock, A. E. Olesen, T. Andresen, M. Nilsson, and A. H. Dickenson. 2012. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. Pharmacological reviews 64(4):939-971.
Oh, J., F. Giallongo, T .Frederick, J. Pate, S. Walusimbi, R. Elias, E. Wall, D. Bravo, and A. Hristov. 2015. Effects of dietary Capsicum oleoresin on productivity and immune responses in lactating dairy cows. Journal of dairy science 98(9):6327-6339.
Oh, J., M. Harper, F. Giallongo, D. Bravo, E. Wall, and A. N. Hristov. 2017. Effects of rumen-protected Capsicum oleoresin on productivity and responses to a glucose tolerance test in lactating dairy cows. Journal of dairy science 100(3):1888-1901.
Oh, J., M. Harper, F. Giallongo ,E. Wall, D. Bravo, and A. Hristov. 2016. Effect of rumen-protected Capsicum oleoresin on immune responses in lactating dairy cows experimentally challenged with lipopolysaccharide. Journal of Animal Science 94:757-758.
Oh, J., A. Hristov, C. Lee, T. Cassidy, K. Heyler, G. Varga, J. Pate, S. Walusimbi, E. Brzezicka, and K. Toyokawa. 2013. Immune and production responses of dairy cows to postruminal supplementation with phytonutrients. Journal of dairy science 96(12):7830-7843.
Palmnäs, M. S., T. E. Cowan ,M. R. Bomhof, J. Su, R. A. Reimer, H. J. Vogel, D. S. Hittel, and J. Shearer. 2014. Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. PloS one 9(10):e109841.
Platel, K. and K .Srinivasan. 1996. Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. International journal of food sciences and nutrition 47(1):55-59.
Platel, K. and K. Srinivasan. 2000. Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats. Food/Nahrung 44(1):42-46.
Ponce, C., M. Brown, J. Silva, P. Schlegel, W. Rounds, and D. Hallford. 2014. Effects of a dietary sweetener on growth performance and health of stressed beef calves and on diet digestibility and plasma and urinary metabolite concentrations of healthy calves. Journal of animal science 92(4):1630-1638.
Prawitt, D., M. K. Monteilh-Zoller, L. Brixel, C. Spangenberg, B. Zabel, A. Fleig, and R. Penner. 20 .03TRPM5 is a transient Ca2+-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca2+] i. Proceedings of the national academy of sciences 100(25):15166-15171.
Provenza, F. D., C. B. Scott, T. S. Phy, and J. J. Lynch. 1996. Preference of sheep for foods varying in flavors and nutrients. J Anim Sci 74(10):2355-2361.
Ramsanahie, A. P., U. V. Berger, M. J. Zinner, E. E. Whang, D. B. Rhoads, and S. W. Ashley. 2004. Effect of glucagon-like peptide-2 (GLP-2) on diurnal SGLT1 expression. Digestive diseases and sciences 49(11-12):1731-1737.
Ran, T., H. Li, Y. Liu, S. Tang, X. Han, M. Wang, Z. He, J. Kang, Q. Yan, and Z. Tan. 2016. Expression of genes related to sweet taste receptors and monosaccharides transporters along the gastrointestinal tracts at different development stages in goats. Livestock Science 188:111-119.
Rolland, F., J. Winderickx, and J. M. Thevelein. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. Trends in biochemical sciences 26(5):310-317.
Sclafani, A. 2007. Sweet taste signaling in the gut. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(38):14887-14888.
Shirazi-Beechey, S. P., S. M. Gribble, I. S. Wood, P. S. Tarpey, R. B. Beechey, J. Dyer, D. Scott, and P. J. Barker. 1994. Dietary regulation of the intestinal sodium-dependent glucose cotransporter (SGLTI). Portland Press Ltd.

Shirazi-Beechey, S. P., A. W. Moran, D. J. Batchelor, K. Daly, and M. Al-Rammahi. 2011. Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport. Proceedings of the Nutrition Society 7.185-193:(02)0
Song, J.-X., H. Ren, Y.-F. Gao, C.-Y. Lee, S.-F. Li, F. Zhang, L. Li, and H. Chen. 2017. Dietary capsaicin improves glucose homeostasis and alters the gut microbiota in obese diabetic ob/ob mice. Frontiers in physiology 8:602.
Stefanović, V ,.P. Vlahović, and M. Mitić-Zlatković. 1998. Receptor-mediated induction of human dermal fibroblast ectoaminopeptidase N by glucocorticoids. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 54(6):614-617.
Sterk, A., P. Schlegel, A. J. Mul, M. Ubbink-Blanksma, and E. M. Bruininx. 2008. Effects of sweeteners on individual feed intake characteristics and performance in group-housed weanling pigs. J Anim Sci 86(11):2990-2997.
Tager, L. and K. Krause. 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. Journal of dairy science 94(5):2455-2464.
Thacker, P. A. and I. Haq. 2009. Effect of enzymes, flavor and organic acids on nutrient digestibility, performance and carcass traits of growing–finishing pigs fed diets containing dehydrated lucerne meal. Journal of the Science of Food and Agriculture 89(1):101-108.
Tolan, I., D. Ragoobirsingh, and E. S. A. Morrison. 2001. The effect of capsaicin on blood glucose, plasma insulin levels and insulin binding in dog models. Phytotherapy research 15(5):391-394.
Van den Berg, M., V. Giagos, C. Lee, W. Brown, A. Cawdell-Smith, and G. Hinch. 2016. The influence of odour, taste and nutrients on feeding behaviour and food preferences in horses. Applied Animal Behaviour Science 184:41-50.
Wang, J. and F. D. Provenza. 1996. Food preference and acceptance of novel foods by lambs depend on the composition of the basal diet. J Anim Sci 74(10):2349-2354.
Yamaguchi, N. 1992. Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose; mechanisms involved in the liver, pancreas, and adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. Canadian journal of physiology and pharmacology 70(2):167-206.
Zoetendal, E. G., J. Raes, B. Van Den Bogert, M. Arumugam, C. C. Booijink, F .J. Troost, P. Bork, M. Wels, W. M. De Vos, and M. Kleerebezem. 2012. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. The ISME journal 6(7):1415-1426.