

דו"ח מדעי מסכם לתכנית 14-0353-362

יצור חלב איכותי עתיר נוגדי חמצון לשיפור בריאות הציבור ע"י הזנת פרות במוצרי קליפות
רימונים.

מוגש להנהלת ענף בקר (מועצת החלב)

מגיש: אריאל שבתאי

Abstract

Pomegranate peel is a nutritive-rich byproduct whose amounts are extensively growing due to the exponential increase in the production of pomegranate juice and "ready to eat" arils. Pomegranate peel is a rich source for antioxidants and thus may serve in the prevention of cattle diseases and in the improvement of beef and dairy products, making it an attractive component in cattle diets. Two experiments, in experimental and commercial dairy farm, respectively, were conducted to investigate the effects of dietary supplementation of concentrated pomegranate extract (CPE) on performance of lactating cows. In Experiment 1, we determined effects of dose of CPE on cows' voluntary intake and milk performance whereas, in Experiment 2, we measured effects of 4% CPE addition to total mixed ration (TMR) on dry matter basis fed to lactating cows, on milk antioxidant capacity, fatty acid profile and vitamin E concentration. Furthermore, we tested the effect of pasteurization on milk antioxidant capacity. The main results indicate that: 1. Milk antioxidant capacity can be markedly improved, presumably through the increase of CPE originated phenols. 2. α - and γ -tocopherol isomers of vitamin E were higher in milk CPE-fed cows. However, these concentrations were lower than expected, presumably due to the need to improve the extraction method. 3. Not in line with our initial hypothesis, dietary CPE failed to modulate milk fatty acids profile. 4. Pasteurization did not have deleterious effects on milk antioxidant capacity. These results encourage further research on the use of dietary supplementation of CPE in dairy cows to improve health and production.

תקציר תוכנית המחקר: במערכות ניסוי מדעיות נמצאו קליפות רימונים כמזרזות ריפוי של פצעים, מעוררות מערכת החיסון, בעלות פעילות נגד חיידקים פתוגניים, מונעות טרשת עורקים וכמקור עשיר בנוגדי חמצון. לאחרונה מצאנו כי האבסת קליפות רימונים טריות לעגלים במפטמה הביאה לגידול בתוספת המשקל היומית הממוצעת ולעלייה בריכוזי ויטמין E בפלסמה. במקביל פותחה בארץ, שיטה לסחיטה של קליפות רימונים ע"י מיצוי מימי וריכוז שלהם הנותנת מוצר חדש להלן מק"ר (מיצוי קליפות רימונים). במוצר מסחרי זה השתמשנו לאחרונה ברפת מינהל המחקר החקלאי בבית דגן, כתוסף מזון (2% מהמנה) להאבסת שש פרות חלב במשך שלושה שבועות של ניסוי הקדמי. חושב גידול של 7.3% בתנובה החלב של פרות הרימונים בהשוואה לפרות הביקורת. בנוסף, הפעילות נוגדת החמצון של חלב פרות הניסוי עלתה ב 21% בהשוואה לפרות קבוצת הביקורת, מה שעשוי להעיד על הצטברות נוגדי חמצון בחלב. ממצאים אלו מעודדים המשך בחינה במספר רב יותר של פרות ולאורך תקופת זמן ארוכה יותר של יעילות השימוש במק"ר כתוסף תזונתי (פרוביוטיקה) לפרות, ובחינת ריכוזו המיטבי במנה. מטרת המחקר הייתה לבצע אופטימיזציה של השימוש במק"ר להגדלת ריכוז האנטיאוקסידנטים וויטמין E, ולמודולציה של פרופיל חומצות השומן בחלב פרות, ללא פגיעה בתנובת החלב והרכבו. אופטימיזציה של השימוש במק"ר כתוסף להזנת פרות חלב- נבחנה ברפת הפרטנית (10 פרות לטיפול) בשלושה ריכוזים של מק"ר (1%, 2%, ו 4% מהחומר היבש במנה), ובניסוי משקי (100 פרות – 4% מק"ר), תוך שימוש בפרות חלב גבוהות תנובה בהשוואה לביקורת (0% מק"ר). בעבר דיווחנו על שיפור בתנובת החלב כתוצאה מהזנה במק"ר. התוצאות המובאות בדו"ח זה מצביעות כי ניתן לשפר את הקיבולת נוגדת החמצון של החלב באמצעות הוספת מק"ר לבליל הפרות. שיפור הקיבולת נוגדת החמצון הוא כנראה תולדה של הצטברות של מולקולות פנוליות שמקורן בקליפות הרימונים. בנוסף, גם במקרה של פרות חלב, בדומה למדווח לגבי עגלי פיתום, ניכר כי מק"ר בביל משפר את ספיגת ויטמין E מהמנה אל נוזלי הגוף, ובמקרה הנוכחי להעלאת ריכוז טוקופרול α וטוקופרול γ בחלב. יחד עם זאת, ניכר כי ריכוזי האיזומרים של ויטמין E, המדווחים בדו"ח זה נמוכים מהמצופה, כנראה בשל הצורך לשפר את שיטת המיצוי של הוויטמין מהחלב. בניגוד להיפותזה של המחקר, שימוש במק"ר לא שינה את פרופיל חומצות השומן בחלב. בחינת השפעה של תהליך הפסטור על הקיבולת נוגדת החמצון של החלב מלמדת כי לתהליך הפסטור המעבדתי לא הייתה השפעה שלילית על נוגדי החמצון בחלב.

מבוא

הרימון הפך ל"להיט בריאותי" בשנים האחרונות. כתוצאה מכך גדלה התצרוכת העולמית ופותחו מכונות הפרטה המאפשרות צריכת רימונים גם לאנשים המתקשים בפריטת גרגרי הפרי. התפתחויות אלו הביאו להגדלת נטיעת מטעי רימונים בארץ בהיקף מתוכנן לשנת 2010 של 28,000 דונם. הולכת ונוצרת לפיכך בארץ פסולת תעשייתית חדשה- קליפות

רימונים. זו פסולת לחה שקשה להיפטר ממנה והיא מהווה מטרד סביבתי. מאידך הפרות גבוהות התנובה בארץ סובלות מבעיות בריאות רבות ומפוריות נמוכה עקב העומס המטבולי הגדול המוטל עליהן, ובמרבית המקרים הן מוגבלות בצריכת המזון הוולונטרית לסיפוק ההוצאה האנרגטית לייצור. מטרת הצעת המחקר הנוכחית היא לשלב מוצרי קליפות רימונים במנת הבקר לחלב תוך הפיכת הצרות לאוצרות.

במערכות ניסוי מדעיות נמצא שהזנת קליפות רימונים או מיץ רימונים מונעת טרשת עורקים (Aviram et al. 2008) מזרזת ריפוי של פצעים (Chidambara et al. 2004), ומעוררת את מערכת החיסון (Gracious et al. 2001). נמצא שיש לקליפות הרימונים פעילות נגד חיידקים פתוגניים (Navaro et al. 1996), והן מקור עשיר בנוגדי חמצון (Tzulker et al. 2007), וכנראה יש להן יכולת למנוע סרטן בחיות ניסוי (Whitley et al. 2003; Adams et al. 2006). הפעילות האנטיאוקסידנטית של מיצוי מקליפות רימונים גבוהה מזו של מיץ רימונים המשמש למאכל אדם (Li et al. 2006) וגבוהה אף מזו של יין אדום הנחשב כמקור לאנטיאוקסידנטים המונעים טרשת עורקים, מחלות לב, ולחץ דם גבוה בבני אדם (Gil et al. 2006). הפעילות האנטיאוקסידנטית הגבוהה של מיצוי קליפות הרימונים מקורה בתכולה גבוהה של תרכובות פוליפנוליות ובעיקר טנינים מסיסים, אנתוציאנינים, ופלבנאואידים בחומר (Tzulker et al. 2007; Gil et al. 2006). לאחרונה מצאה קבוצת המחקר שלנו, כי האבסת קליפות רימונים טריות לעגלים במפטמה הביאה לגידול בתוספת המשקל היומית הממוצעת של העגלים שהוזנו בקליפות רימונים בהשוואה לקבוצת ביקורת של עגלים לא מטופלים (Shabtay et al., 2008). כמו כן נמצאה עלייה בריכוזי ויטמין E ובפעילות האנטיאוקסידטיבית בסרום של העגלים שהואבסו בקליפות הרימונים.

לאחרונה פותחה בארץ ע"י חברת גן-מור, שיטה לסחיטה של קליפות רימונים ע"י מיצוי מימי וריכוז שלהם הנותנת מוצר חדש להלן מק"ר (מיצוי קליפות רימונים). מוצר זה עשיר בפוליפנולים ובעיקר hydrolysable tannins ויש לו לפיכך פוטנציאל לשמש כתוסף מזון לשיפור הבריאות של פרות החלב ולהגברת יצור חלב עתיר באנטיאוקסידנטים שישמש כמזון איכותי טבעי לשיפור בריאות בני האדם.

מטרת המחקר

אופטימיזציה של השימוש במק"ר להגדלת הצטברות אנטיאוקסידנטים וויטמין E, ולמודולציה של חומצות שומן בחלב פרות.

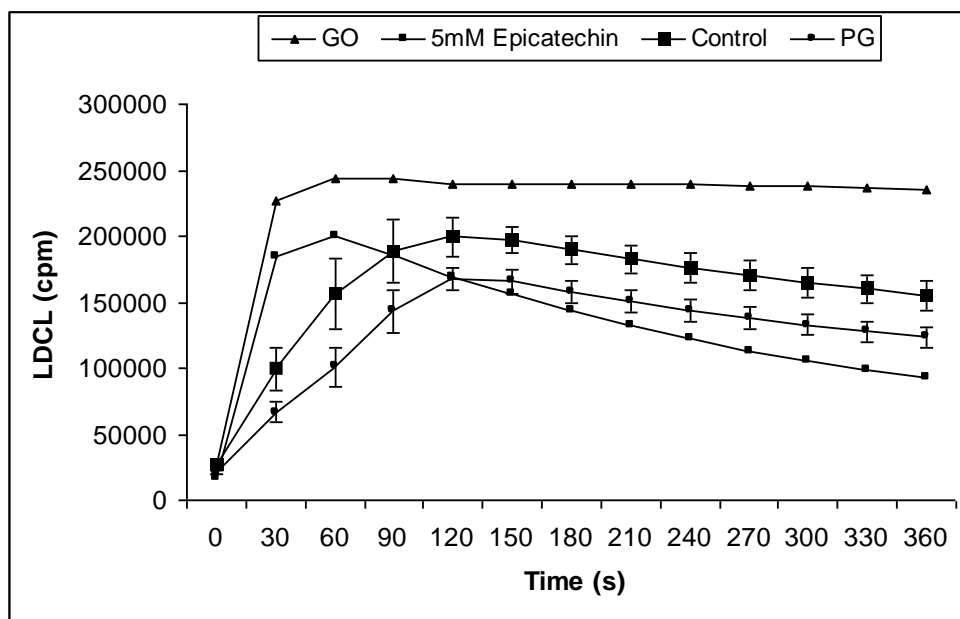
תוצאות ודין

בניסוי הקדמי שנערך לאחרונה ברפת הפרטנית של מינהל המחקר החקלאי בבית דגן, השתמשנו במק"ר שהוכלל בשיעור של 2% ממנת פרות חלב כתוסף מזון להאבסת עשר פרות חלב במשך ארבעה שבועות. במקביל הואבסה באותה מנה ללא תוספת מק"ר קבוצת ביקורת של 10 פרות, דומות בתנובה ההתחלתית ובמרחק מהמלטה לפרות הניסוי.

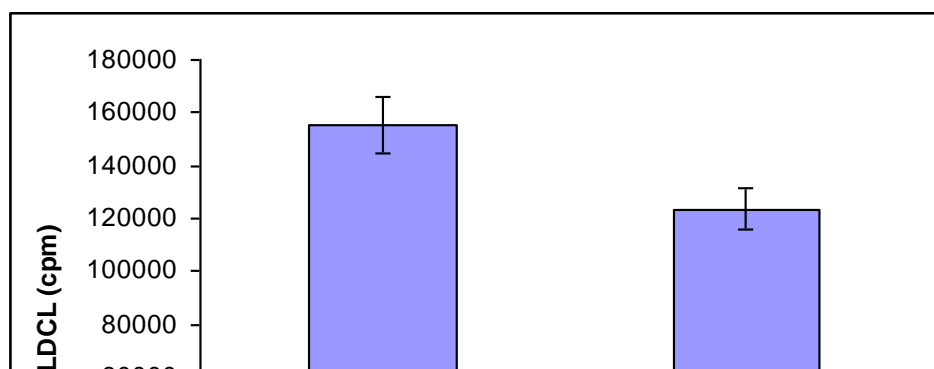
תוצאות הניסוי ההקדמי הראו כי תנובת החלב הממוצעת של פרות הניסוי הייתה גבוהה באופן מובהק מזו של פרות הביקורת (43.2 ליטר חלביוס לעומת 41.5 ליטר חלביוס), ונוצר בין שתי קבוצות הפרות פער ריאלי מובהק של 1.6 ק"ג חמ"מפרהיוס. כיוון שצריכת המזון של פרות הניסוי הייתה נמוכה ב 0.9 ק"ג ח"ליוס מזו של פרות הביקורת, נמצא שחל גידול של 8.2% ביעילות יצור חמ"מ לק"ג מזון נאכל. בנוסף, נמצא שהפעילות נוגדת החמצון של החלב מהפרות שהואבסו ב 2% מק"ר עלתה ב 21% בהשוואה לפרות קבוצת הביקורת, וזה מעיד על הצטברות אנטיאוקסידנטים משפרי בריאות האדם בחלב (איור 1).

ממצאים הקדמיים אלו מעודדים המשך בחינה במספר רב יותר של פרות ולאורך תקופת זמן ארוכה יותר, של יעילות השימוש במק"ר כתוסף תזונתי (פרוביוטיקה) לפרות. נדרשת גם בחינה של רמת המק"ר המיטבית להאבסת פרות חלב, שכן השיעור של 2% מהמנה שבו השתמשנו בניסוי ההקדמי היה שרירותי. שימוש ברמה אפקטיבית נמוכה יותר (1%) עשויה להקטין הוצאות, ושימוש ברמה גבוהה יותר (4%) עשוי להשפיע באופן מובהק על בריאות העטין בפרה.

א.

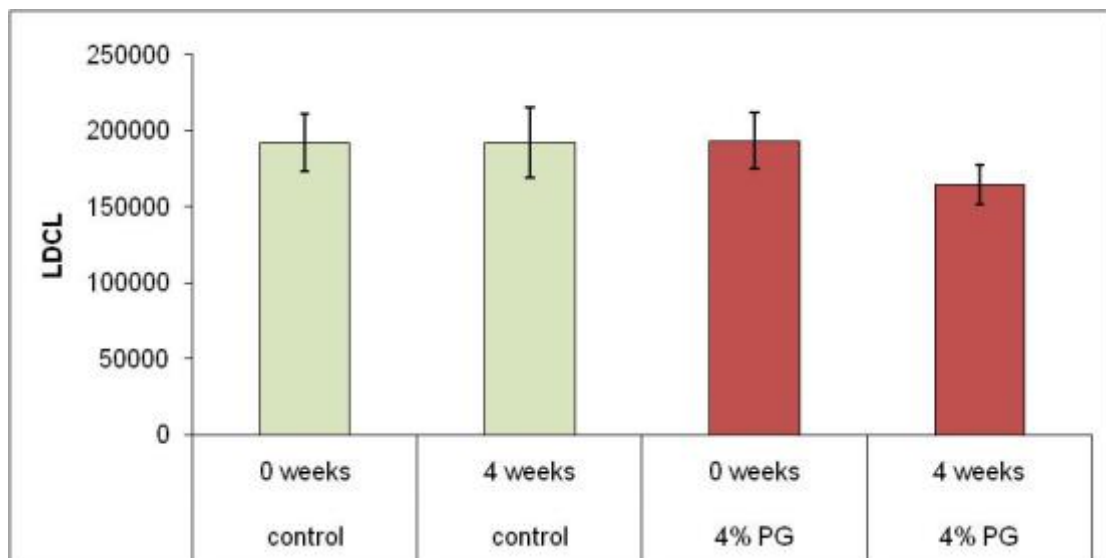


ב.



איור 1: הפעילות נוגדת החמצון בחלב של הפרות שהואבסו ב 2% מק"ר (PG) הראתה עליה של 21% בהשוואה לפרות קבוצת הביקורת. א. תיאור שיטת המדידה – כמילומינסנציה: ככל שהערך נמוך יותר הפוטנציאל האנטיאוקסידטיבי גבוה יותר. ב. כימות הערכים. הפוטנציאל נוגד החמצון של פרות הניסוי השתפר ב 21% בעקבות הזנה ב 2% מק"ר.

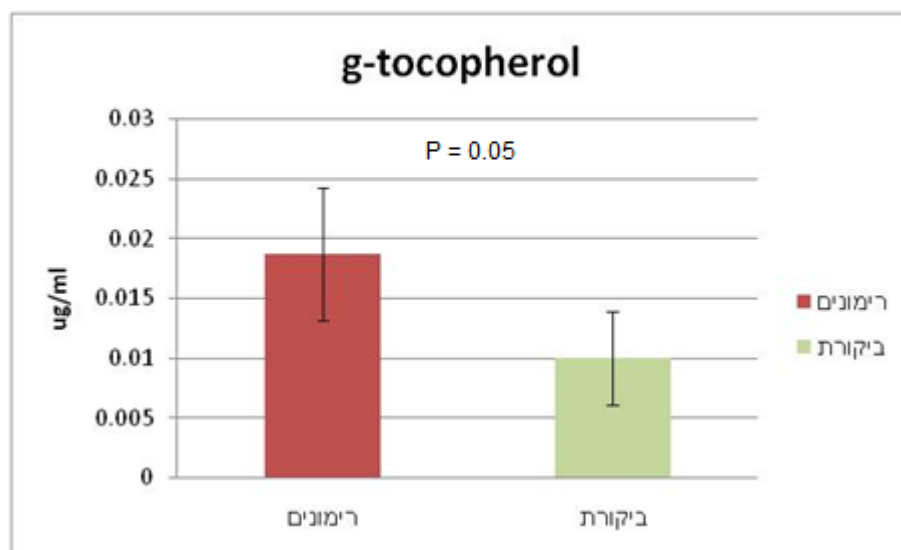
בשלב הבא נבחנה, בניסוי משקי עם 200 פרות (100 פרות בכל קבוצה), השפעת הוספה של 4% מק"ר לבלייל על הפוטנציאל נוגד החמצון של החלב, לאחר 45 יום. גם כאן, ניתן לראות כי חל שיפור בשיעור דומה למתואר באיור 1. שיפור הקיבולת נוגדת החמצון של החלב (איור 2) הלך במקביל לשיפור בתנובת החלב ולא השפיע לרעה על המוצקים בחלב (תוצאות דווחו בעבר ולא מוצגות כאן).



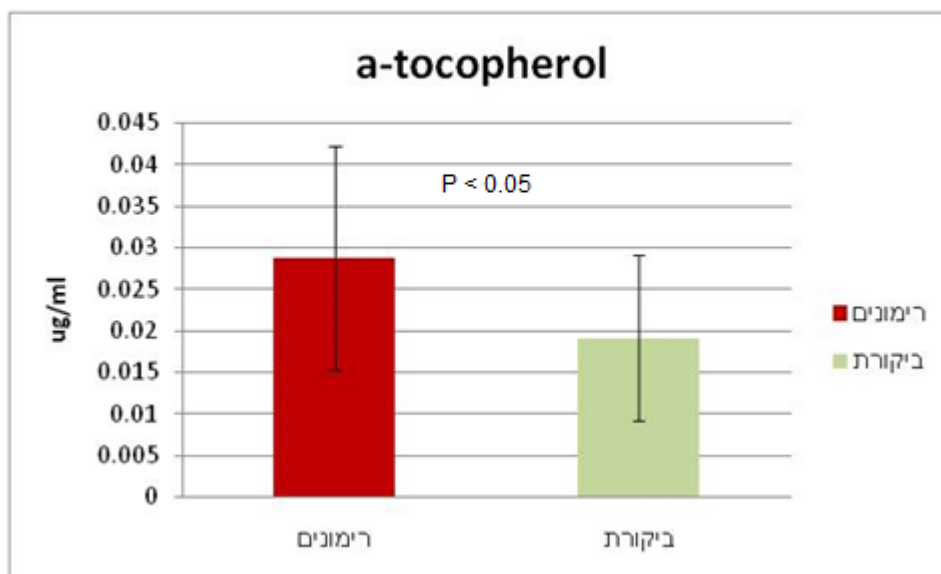
איור 2: שיפור בפוטנציאל נוגד החמצון של החלב של פרות – ניסוי משקי, לאחר 45 ימים של הוספת 4% מק"ר לבלייל.

בעבר הראנו, בשתי מערכות ניסוי שונות כי בעת הוספת קליפות רימונים לבליל של עגלי פיטום, מתקבלת עליה בריכוז ויטמין E בפלסמה, זאת למרות העובדה שקליפות רימונים אינן עשירות בוויטמין E. המנגנון שהצענו כדי להסביר את התופעה הנ"ל היה כי נוכחות פוליפנולים במנה, שמקורם בקליפות הרימונים מגנה על חמצון הויטמינים בסביבה החומצית של הקיבה ובכך מאפשרת ליותר ויטמינים ויטליים להיספג אל הדם. כך או אחרת, ויטמין E מהווה נוגד חמצון חשוב ועיקרי במדיום השומני של הגוף, ונוכחותו מקטינה נזק חמצוני פוטנציאלי לממברנות ביולוגיות. באותו ניסוי משקי המתואר לעיל, בחנו את השינוי ברמת שני איזומרים של ויטמין E, טוקופרול α וטוקופרול γ , בחלב של פרות שהוזנו במשך 45 יום ב 4% מק"ר בביל. מהתוצאות המוצגות באיור 3 ניתן לראות כי רמות שני האיזומרים של ויטמין E בחלב הפרות שקבלו מק"ר היה גבוה באופן מובהק משל הפרות הביקורת. יחד עם זאת, הרמות בשני המקרים היו נמוכות מהצפוי מה שמצביע על צורך לשפר את המיצוי. בשלב זה, למרות ניסיונות למצות את האיזומרים של ויטמין E בשיטות שונות, כמו גם הפרדת השומן תחילה, לא ניכר שיפור בריכוזיו בחלב (תוצאות לא מוצגות).

הצטבחת של γ -tocopherol בחלב של קב' הרימונים



הצטבחות של α -tocopherol בחלב של קב' הרימונים



איור 3: ריכוז האיזומרים טוקופרול α וטוקופרול γ של ויטמין E בחלב פרות שלביל של הן הוסף 4% מק"ר למשך 45 יום.

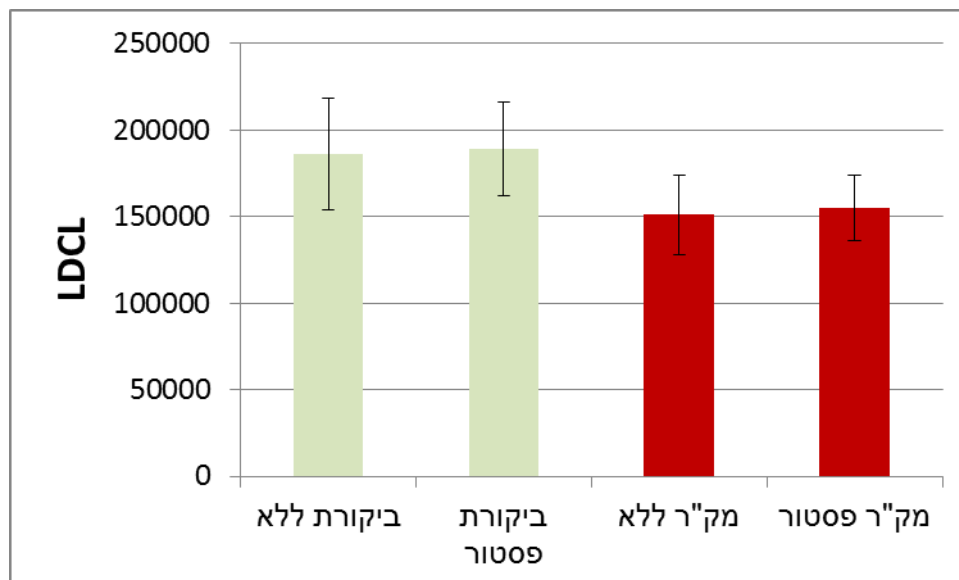
להרכב חומצות השומן השפעה ישירה על ה"אינדקס הבריאותי" של החלב. הגדלת ריכוז חומצות השומן הרב אל-רוויות (PUFA) בחלב יכול אם כן לשפר את ערכו הבריאותי ותדמיתו. מחקרים שונים הראו כי ניתן, בעזרת מניפולציה תזונתית, להטות, באופן חלקי לפחות, את פרופיל חומצות השומן לכיוון הרצוי של העלאת ריכוז ה – PUFA. מאחר וחומצות שומן לא-רוויות רגישות לחמצון בשל נוכחות קשרים כפולים, היפותזת המחקר הייתה כי הוספה של מק"ר, העשיר בנוגדי חמצון, לבלייל, תקטין את חמצון חומצות השומן הלא רוויות בחלב, ובכך תגדיל את ריכוזן. התוצאות המובאות בטבלה 1 מראות כי אפקט זה לא הושג – לא נמצאו הבדלים סטטיסטיים באף אחת מקטגוריות חומצות השומן, קצרות (shortFA), רוויות (SFA), חד אל-רוויות (MUFA), רב אל-רוויות (PUFA) או trans. נטייה למובהקות התקבלה עבור חומצות השומן C14:1 ו C16:0. בשני המקרים הריכוז בחלב של קבוצת הביקורת היה גבוה יותר ($P=0.07$; תוצאות אינן מוצגות). מספר אפשרויות יכולות להסביר את חוסר ההצלחה בהשפעה על פרופיל חומצות השומן: 1. יתכן כי פרק זמן של 45 יום של הזנה במק"ר אינו מספיק כדי להשפיע על פרופיל חומצות השומן. 2. קיים חלון זמן סמהלך התחלובה בו לתוספת המק"ר בהזנה אפשרות להשפיע על פרופיל חומצות השומן.

3. מניעת חמצון לבדה (ע"י תוספת של נוגדי חמצון במנה) אינה מספיקה להשפיע על פרופיל חומצות השומן; דרושה, כנראה, מניפולציה תזונתית המעודדת ייצור חומצות שומן מסוימות.

טבלה 1. השפעת הוספת 4% מק"ר לבלייל חולבות על פרופיל חומצות השומן בחלב.

	ShortFA	SFA	MUFA	PUFA	trans
Avg-מק"ר	12.75	68.66	25.84	4.79	3.57
STD	1.94	3.88	3.18	0.68	0.81
Avg-ביקורת	12.81	69.10	25.11	4.92	3.88
STD	2.98	5.92	5.44	0.71	1.60
P-value	0.97	0.88	0.78	0.75	0.68

למרות השיפור המשמעותי בקיבולת נוגדת החמצון של החלב, עלתה הסברה כי במהלך תהליך הפסטור עשוי להיות פירוק של החומרים התורמים לקיבולת זאת. כדי לבחון זאת הצענו תהליך פסטור מעבדתי אשר כלל שלושה מחזורים שבכל אחד חומם החלב ל 72°C וקורר מיידית על מי קרח. כפי שניתן לראות באיור 4, תהליך הפסטור המעבדתי לא פגע בקיבולת נוגדת החמצון של החלב, והותיר את ההבדל בין חלב הניסוי לחלב הביקורת על כנו.



איור 4: השפעת פסטור מעבדתי על הקיבולת נוגדת החמצון של החלב.

במערכות ניסוי מדעיות נמצאו קליפות רימונים כבעלות השפעות מיטיבות על בריאות האדם, ובניהן זירוז ריפוי של פצעים, ערור מערכת החיסון, פעילות נגד חיידקים פתוגניים, מניעת טרשת עורקים ומקור עשיר בנוגדי חמצון. קבוצת המחקר שלנו מצאה כי האבסת קליפות רימונים טריות לעגלים במפטמה הביאה לגידול בתוספת המשקל היומית הממוצעת ולעלייה בריכוזי ויטמין E בפלסמה. הפרות גבוהות התנובה בארץ סובלות מבעיות בריאות רבות ומפוריות נמוכה עקב העומס המטבולי הגדול המוטל עליהן, ובמרבית המקרים הן מוגבלות בצריכת המזון הוולונטרית לסיפוק ההוצאה האנרגטית לייצור. לאחרונה פותחה בארץ ע"י חברת גן-מור, שיטה לסחיטה של קליפות רימונים ע"י מיצוי מימי וריכוז שלהן הנותנת מוצר חדש להלן מק"ר (מיצוי קליפות רימונים). מוצר זה עשיר בפוליפנולים ובעיקר hydrolysable tannins ויש לו לפיכך פוטנציאל לשמש כתוסף מזון לשיפור הבריאות של פרות החלב ולהגברת יצור חלב עתיר באנטיאוקסידנטים שישמש כמזון איכותי טבעי לשיפור בריאות בני האדם. מטרת הצעת המחקר הנוכחית הייתה לשלב מוצרי קליפות רימונים במנת הבקר לחלב תוך הפיכת הצרות לאוצרות. באופן ספציפי, בקשנו לבצע אופטימיזציה של השימוש במק"ר להגדלת ריכוז האנטיאוקסידנטים וויטמין E, ולמודולציה של פרופיל חומצות השומן בחלב פרות, ללא פגיעה בתנובת החלב והרכבו. אופטימיזציה של השימוש במק"ר כתוסף להזנת פרות חלב - נבחנה ברפת הפרטנית (10 פרות לטיפול) בשלושה ריכוזים של מק"ר (1%, 2%, ו 4% מהחומר היבש במנה), ובניסוי משקי (100 פרות – 4% מק"ר), תוך שימוש בפרות חלב גבוהות תנובה בהשוואה לביקורת (0% מק"ר). מצאנו, כי ניתן לשפר את הקיבולת נוגדת החמצון של החלב באמצעות הוספת מק"ר לבליל הפרות. שיפור הקיבולת נוגדת החמצון הוא כנראה תולדה של הצטברות של מולקולות פנוליות שמקורן בקליפות הרימונים. בנוסף, הגם שריכוזי טוקופרול α וטוקופרול γ בחלב נמוכים מהמצופה, הם היו גבוהים יותר בפרות הניסוי בהשוואה לפרות הביקורת. בניגוד להיפותזה של המחקר, שימוש במק"ר לא שינה את פרופיל חומצות השומן בחלב. בחינת ההשפעה של תהליך הפסטור על הקיבולת נוגדת החמצון של החלב מלמדת כי לתהליך הפסטור המעבדתי לא הייתה השפעה שלילית על נוגדי החמצון בחלב. לסיכום, להוספת מק"ר לבליל חולבות השפעות חיוביות על הצטברות חומרים מועילים בחלב. יש להמשיך ולשפר את יכולת המיצוי לצורך אנליזה ולהמשיך ולאפיין חומרים אלה.

ספרות מצוטטת

1. Adams, L. S.; Seeram, N. P.; Aggarwal, B. B.; Takada, Y.; Sand, D.; Heber, D. (2006). Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 54, 980–985.

2. Adin, G., R. Solomon, M. Nikbachat, A. Zenou, E. Yosef, A. Brosh, A. Shabtay, S. J. Mabjeesh, I. Halachmi, and J. Miron. (2009). Effect of feeding cows in early lactation with diets differing in roughage-neutral detergent fiber content on intake behavior, rumination, and milk production. *J. Dairy Sci.* 92: 3364-3373.
3. Aviram, M.; Volkova, N.; Coleman, R.; Dreher, M.; Reddy, M. K.; Ferreira, D.; Rosenblat, M. (2008). Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: Studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient (E0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1148–1157.
4. Beauchemin, K.A. McGinn, S.M., Martinez, T.F., McAllister, T.A. (2007). Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emission from cattle. *J. Anim. Sci.* 85: 1990-1996.
5. Carulla, J.E., Kreuzer, M., Machmuller, a., Hess, H.D. (2005). Supplementation of Acacia mearnsii tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage fed sheep. *J. agric. Res.* 56: 961-970.
6. Chidambara, M. K.; Reddy, V. K.; Veigas, J. M.; Murthy, U. D. (2004). Study on wound healing activity of Punica granatum peel. *J. Med. Food* 7, 256–259.
7. Gil, M. I.; Tomas-Barberan, F. A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D. M.; Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4581–4589.
8. Gracious, R.R., Selvasubramania, S., Jayasundar, s. (2001). Immunomodulatory activity of Punica granatum in rabbits – A preliminary study. *J. Ethnopharmacol.* 78: 85-87.
9. Johnson, K.A. and Johnson, D.E. (1995). Methane emissions from cattle. *J Anim Sci* 73, 2483-92.
10. Li, Y.; Guo, C.; Yang, J.; Wei, J.; Xu, J.; Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem.* 96, 254– 260.
11. Miron, J. G., Adin, R. Solomon, M. Nikbachat, A. Zenou, E. Yosef, A. Brosh, A. Shabtay, A. Asher, H. Gacitua, M. Kaim, S. Yaacobi, Y. Portnik, S.J. Mabjeesh. (2010). Effects of feeding cows in early lactation with soy hulls as

partial forage replacement on heat production, retained energy and performance. *Anim. Feed Sci. Technol.* 155: 9-17.

12. Navarro, V.; Villarreal, M. L.; Rojas, G.; Lozoya, X. (1996). Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J. Ethnopharmacol.* 53, 143–147.
13. Oliveira, R. A., C. D. Narciso, R. S. Bisinotto, M. C. Perdomo, M. A. Ballou, M. Dreher, and J. E. P. Santos. 2010. Effects of feeding polyphenols from pomegranate extract on health, growth, nutrient digestion, and immunocompetence of calves. *J. Dairy Sci.* 93:4280–4291.
14. Shabtay A., Harel E., Tadmor Y., Orlov A., Meir Ayala., Weinberg P., Weinberg Z. G., Chen Y., Brosh A., Izhaki I., and Kerem Z. (2008). Nutritive and Antioxidative Potential of Fresh and Stored Pomegranate Industrial Byproduct as a Novel Beef Cattle Feed . *J. Agric. Food Chem.*, 56 (21), 10063-10070.
15. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152–178.
16. Tzulker, R.; Glazer, I.; Bar-Ilan, I.; Holland, D.; Aviram, M.; Amir, R. (2007). Aantioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9559–9570.
17. Whitley, A. C.; Stoner, G. D.; Darby, M. V.; Walle, T. (2003). Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acidsExtensive binding to protein and DNA. *Biochem. Pharmacol.* 66, 907–915.
18. Wright, A.D., Kennedy, P., O'Neill, C.J., Toovey, A.F., Popovski, S., Rea, S.M., Pimm, C.L. and Klein, L. (2004). Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine* 22, 3976-85.
19. Wright, A.D., Toovey, A.F. and Pimm, C.L. (2006). Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe* 12, 134-9.

Wuebbles H.K. (2002). Atmospheric methane and global change. *Earth-Sci Rev* 57,
117-210