تحقیقات تولیدات دامی

سال ششم/شماره چهارم/زمستان ۱۳۹۶ (۲۵-۱۳)

اثر افزودن سطوح مختلف ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک بر کینتیک تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی

جواد بیات کوهسار[۱*]، فرشته مقصودلو[۲]، فاطمه فتحی[۲]، فرزاد قنبری[۱]

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گنبد کاووس

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گنبد کاووس

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۳۰)

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر سطوح مختلف (۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد ماده خشک) ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک بر فراسنجه‌های تولید گاز و قابلیت هضم برون‌تنی ماده خشک و ماده آلی با استفاده از روش تولید گاز و کشت ثابت انجام گرفت. نتایج نشان داد که بین تیمارهای آزمایشی از نظر پتانسیل و نرخ تولید گاز اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). تیمار شاهد و تیمارهای دارای ساپونین به ترتیب دارای بالاترین و پایین‌ترین پتانسیل تولید گاز بودند. به هر حال، افزودن سطوح مختلف ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک به جیره پایه سبب کاهش قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر شد. از این نظر، تیمار دارای ۱۰ درصد اسید گالیک پایین‌ترین مقدار قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر را داشت. بالاترین مقدار غلظت نیتروژن آمونیاکی مربوط به تیمار شاهد (۱۰/۷۶ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) و پایین‌ترین مقدار مربوط به تیمار دارای ۱۰ درصد اسید تانیک (۵/۷۹ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) بود. بین تیمارها از نظر بازده تولید گاز، عامل تفکیک و تولید توده میکروبی تفاوت معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از سطوح مختلف ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک مورد استفاده اثر قابل ملاحظه‌ای بر فرآیندهای تخمیر شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی نداشت.

واژه‌های کلیدی: پروتئین میکروبی، تولید گاز، ساپونین، فلاوونوئید

* نویسندهٔ مسئول: javad_bayat@yahoo.com

مقدمه

اهداف اصلی در دستکاری تخمیر شکمبه شامل بهبود هضم الیاف، کاهش اتلاف انرژی حاصل از فرآیند تخمیر و بهبود کمیت و کیفیت مواد مغذی وارد شده به روده کوچک هستند. روش‌های رایج بکار گرفته شده برای دستکاری مستقیم تخمیر شامل تغییر مواد خوراکی با عمل‌آوری شیمیایی و زیستی، تغییر زیستی میکروفلورای شکمبه به واسطه تغذیه یونفرها، مکمل‌سازی با کشت‌های زنده میکروبی و آنزیم‌ها و تغذیه متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند تانن‌ها ساپونین‌ها و اسانس گیاهان داروئی هستند (Lu *et al.*, 1987).

ارزش تغذیه‌ای بسیاری از منابع خوراکی گیاهی نظیر حبوبات و غلات به واسطه حضور انواع مختلفی از مواد ضد-تغذیه‌ای محدود می‌شود. ترکیبات ضد تغذیه‌ای دسته بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که توزیع گسترده‌ای در گیاهان دارند. نقش فیزیولوژیکی برخی ترکیبات ثانویه در گیاه به‌طور کامل مشخص نیست. اما آن‌ها به عنوان بخشی از سیستم دفاعی گیاه شناخته شده‌اند (Lu *et al.*, 1987). از جمله ترکیبات ضد تغذیه‌ای موجود در گیاهان می‌توان به بازدارنده‌های آنزیمی، ساپونین‌ها، لکتین، پلی‌اسید تانیک‌ها، اسید فایتیک، اگزالات و غیره اشاره کرد (Deshpande, 2003). پلی اسید تانیک‌ها و تانن‌ها ترکیباتی هستند که به وفور در بسیاری از اندام‌های گیاه یافت می‌شوند. یکی از مهمترین و شناخته شده‌ترین ویژگی‌های ترکیبات اسید تانیکی، توانایی پیوند آن‌ها با گروه‌های دارای بار مثبت موجود در ساختار پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، کاتیون‌های چند ظرفیتی و مواد معدنی از قبیل آهن، روی و کلسیم است (Jakyeom, 2010). ترکیباتی مانند ساپونین، اسید تانیک و لکتین بازدهی استفاده و قابلیت هضم پروتئین را کاهش می‌دهند (Makkar, 1993). یونجه و سویا از اقلام ضروری در خوراک دام بوده که معمولاً غنی از ساپونین و اسید تانیک هستند. ساپونین از جمله ترکیباتی است که به شدت شرایط شکمبه را تغییر می‌دهد. این اثرات با توجه به ساختار و منشأ ساپونین، ترکیب جیره، عادت‌پذیری جمعیت میکروبی نسبت به ساپونین، بیوشیمی شکمبه، سطح ساپونین مصرف شده و جمعیت میکروبی شکمبه تغییر می‌کند. آزمایش‌های برون‌تنی نشان داده‌اند که استفاده از اسید تانیک موجب کاهش گاز تولیدی می‌شود (Beach *et al.*, 2005). محققین بیان نمودند که ممکن است اسید تانیک اثر منفی بر فعالیت باکتریایی داشته باشد و از فعالیت تخمیری آن‌ها جلوگیری کند (Makkar *et al.*, 2003). ترکیبات اسید تانیک با وزن مولکولی کم که در مراحل اولیه رشد گیاه وجود دارند در دستگاه گوارش جذب شده و از راه افزایش انرژی مورد نیاز برای سم‌زدایی و نیز اثرات منفی بر سیستم فیزیولوژیک باعث کاهش رشد می‌شوند (Waghorn *et al.*, 1994).

با این حال، اطلاعات چندانی در رابطه با ویژگی‌های تغذیه-ای سطوح مختلف مواد ضدتغذیه‌ای و امکان استفاده و راه-کارهای مناسب احتمالی در بهره‌گیری تغذیه دام‌های نشخوارکننده اهلی وجود ندارد. از این رو، هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر سطوح مختلف مواد ضد تغذیه‌ای بر قابلیت هضم و فراسنجه‌های تخمیری جیره پایه محتوی ترکیبات ضدتغذیه‌ای در شرایط برون‌تنی بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه تغذیه دام گروه علوم دامی دانشگاه گنبد کاووس انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) جیره پایه (شاهد)، ۲) جیره پایه + ۱/۲۵ درصد ساپونین خالص (Mumbai. India Loba Chemie PVT. LTD.)، ۳) جیره پایه + ۲/۵ درصد ساپونین، ۴) جیره پایه + ۵ درصد ساپونین، ۵) جیره پایه + ۱/۲۵ درصد اسید گالیک (Sigma-Aldrich)، ۶) جیره پایه + ۲/۵ درصد اسید گالیک، ۷) جیره پایه + ۵ درصد اسید گالیک، ۷) جیره پایه + ۱/۲۵ درصد اسید تانیک (Merck, Germany)، ۸) جیره پایه + ۲/۵ درصد اسید تانیک و ۹) جیره پایه + ۵ درصد اسید تانیک بودند. ترکیب شیمیایی جیره پایه مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

برای اندازه‌گیری مقدار تولید گاز، مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم جیره پایه به همراه ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه مخلوط و بزاق مصنوعی (به نسبت ۲:۱؛ مایع شکمبه: بافر) به ویال‌های شیشه‌ای ۱۲۵ میلی‌لیتری (چهار تکرار برای هر تیمار) اضافه شد (Menke and Staingass, 1988). مایع شکمبه از سه راس گوسفند نر نژاد دالاق (۲/۵±۴۵ کیلوگرم) دارای فیستولای

جدول ۱- اجزاء تشکیل‌دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره پایه (درصد ماده خشک)

Table 1. Components and nutrient composition of basal diet (percent of dry matter)

Components of the diet	
Corn silage	30
Corn	37
Soybean meal	13
Wheat Bran	17.5
Calcium carbonate	1
Salt	0.5
A vitamin-mineral supplement	1
chemical composition (percent)	
Crude Protein	12.5
Neutral detergent fiber	34.2
Non-fiber carbohydrates	42.6
Ether Extract	3.7
Metabolizable energy (Mcal/kg DM).	2.53

The combination of vitamin and mineral supplements (per kg): Calcium 196 g, phosphorus 96 g, magnesium 19 g, iron 3 g, sodium 71 g, copper 0.3 g, manganese 0.2 g, zinc 0.3 g, cobalt 0.1 g, iodine 0.1 g, selenium0.1 g, vitamin A 500000 IU, vitamin D 100000 IU, vitamin E 100 IU.

شکمبه‌ای و قبل از خوراک‌دهی وعده صبح به‌دست آمد. حیوانات در سطح نگهداری با جیره حاوی ۷۰ درصد علوفه (یونجه و سیلاژ ذرت به نسبت مساوی) و ۳۰ درصد کنسانتره (جو، کنجاله تخم پنبه، سبوس و مکمل) تغذیه شدند و به آب آزادانه دسترسی داشتند. به منظور تصحیح گاز تولید شده ناشی از ذرات باقی‌مانده در مایع شکمبه، چهار تکرار به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. آزمایش تولید گاز سه بار تکرار شد. سر بطری‌های شیشه‌ای به کمک درپوش لاستیکی و پوشش آلومینیومی به‌طور کامل بسته شده و در بن‌ماری با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. فشار گاز تولید شده در فاصله زمانی ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون قرائت حجم گاز تولید شده در هر زمان محاسبه شد (Theodorou *et al*., 1994). تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک معادله Ørskov and McDonald (1979) به شکل زیر انجام شد:

$$P=b(1-^{e-ct})$$

که در آن، P پتانسیل تولید گاز، b بخش دارای پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر گاز تولیدی به ازای گرم ماده خشک)، c ثابت نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت) و t مدت زمان انکوباسیون است. اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از معادله Makkar (2004)، قابلیت هضم ماده آلی بر اساس روش Menke *et al.* (1997) و انرژی قابل متابولیسم بر اساس روش Menke and Staingass (1988) تخمین زده شد:

$$OMD (\%) = 14.88 + 0.899GP + 0.45CP + 0.065 Ash$$

$$ME, (MJ/kg DM) = 1.06 + 0.157GP + 0.0084CP + 0.022 CF- (0.0081 Ash)$$

$$SCFA, (mmoL) = -0.00425 + 0.0222GP$$

در این روابط، OMD: قابلیت هضم ماده آلی (درصد)، ME: انرژی قابل متابولیسم (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)، GP: تولید خالص گاز در ۲۴ ساعت (میلی لیتر به ازاء ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)، CP_1: پروتئین خام (بر حسب درصد)، CF: چربی خام (درصد) Ash: خاکستر خام (درصد) و SCFA: اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول) است. به منظور اندازه‌گیری قابلیت هضم، نیتروژن آمونیاکی و pH، مایع شکمبه مطابق آنچه در آزمون تولید گاز شرح داده شد، از راه فیستولا از شکمبه گوسفندان جمع‌آوری شد. ۵۰۰ میلی‌گرم جیره پایه تهیه شده به همراه ۵۰ میلی‌لیتر مخلوط بزاق مصنوعی و مایع شکمبه با نسبت ۲:۱ بر اساس روش کشت بسته (Theodore *et al*., 1994) در بطری‌های شیشه‌ای ریخته و پس از درپوش‌گذاری، در بن‌ماری با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به منظور عدم انباشتگی گاز، در زمان‌های مختلف گازهای تولیدی از شیشه‌ها خارج شدند. پس از پایان انکوباسیون (ساعت ۲۴ انکوباسیون) درب

شیشه‌ها باز و pH آنها به وسیله دستگاه pH متر الکترونیکی (مدل ۶۹۱، شرکت Metrohm) اندازه‌گیری شد. سپس محتویات هر شیشه صاف شد و به منظور اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی، مقدار ۴ میلی‌لیتر از مایع صاف شده گرفته و معادل هم حجم آن با اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شد. جهت تعیین نیتروژن آمونیاکی از روش فنل- هیپوکلریت استفاده شد (Broderick and Kang, 1980). محتویات هضم نشده هر ویال جمع‌آوری شده و درون کروزه‌های با وزن مشخص انتقال یافت. کروزه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون با درجه حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس قابلیت هضم ظاهری محاسبه شد. کروزه‌های حاوی محتویات هضم نشده به مدت ۶ ساعت در کوره با دمای۵۴۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. این کار به منظور تعیین مقدار خاکستر خام مواد هضم نشده موجود در کروزه‌ها انجام شد. بازده تولید گاز (GP_{24}) به صورت حجم گاز تولید شده پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون تقسیم بر مقدار ماده تجزیه شده واقعی (گرم) محاسبه شد (Getachew *et al*., 2002). جهت محاسبه توده میکروبی تولید شده از رابطه زیر استفاده شد (Blummel *et al*., 1997):

$$MCP = GP \times (PF - 2.2)$$

در این رابطه، MCP: تولید توده میکروبی (میلی‌گرم به ازاء گرم ماده خشک)، GP: میلی‌لیتر گاز تولید شده به ازای گرم ماده خشک در زمان ۲۴ ساعت و PF: عامل تفکیک است. عامل تفکیک بنا به تعریف، نسبت میلی‌گرم ماده آلی حقیقی هضم شده بر میلی‌لیتر حجم گاز خالص تولیدی است. بازده مقدار توده میکروبی با تقسیم توده میکروب تولید شده بر مقدار ماده آلی حقیقی قابل تخمیر در پایان زمان انکوباسیون (۲۴ ساعت) محاسبه شد.

داده‌های جمع‌آوری شده در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم افزار SAS (2003) نسخه ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و میانگین تیمارها با آزمون دانکن در سطح پنج درصد مقایسه شد.

نتایج و بحث

اثر سطوح مختلف ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک بر تولید گاز و فراسنجه‌های تخمینی جیره در شرایط برون‌تنی: اثر سطوح مختلف ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک بر پتانسیل و نرخ تولید گاز و نیز فراسنجه‌های تولید گاز جیره در جدول ۲ گزارش شده است. نتایج نشان داد که بین تیمارهای آزمایشی از نظر پتانسیل و نرخ تولید گاز اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای حاوی ساپونین از پتانسیل تولید گاز، درصد قابلیت هضم ماده آلی، غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و انرژی قابل متابولیسم بالاتری برخوردار بود. در بین تیمارهای دارای سطوح مختلف مواد ضد تغذیه‌ای، ساپونین بیشترین تاثیر را بر کاهش پتانسیل تولید گاز داشت (P<۰/۰۵). با این حال، از نظر پتانسیل تولید گاز بین تیمار شاهد و تیمارهای دارای سطوح مختلف اسید گالیک و اسید تانیک اختلاف معنی-داری وجود نداشت. به طور کلی، افزودن سطوح مختلف ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک به جیره پایه، سبب کاهش قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر نسبت به شاهد شد. از این نظر، تیمار دارای ۱۰ درصد اسید گالیک پایین‌ترین مقدار قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر را داشت. به نظر می‌رسد که در مقایسه با ساپونین، افزودن سطوح مختلف اسید گالیک و اسید تانیک بیشتر سبب کاهش نرخ تولید گاز و فراسنجه-های تخمینی شده است.

تانن و ساپونین گروه‌هایی از ترکیبات هتروژنوس هستند که منبع، روش استخراج و سوبسترایی که در آن به‌کار گرفته می‌شوند، می‌توانند تولید متان را تحت تاثیر قرار دهند. تانن‌ها با تشکیل کمپلکس‌های پروتئینی با آنزیم‌های موجود در دیواره سلولی باکتریایی مانع فعالیت آنزیم‌های میکروبی شده و لذا از این راه سبب کاهش قابلیت هضم کربوهیدرات-ها به ویژه کربوهیدرات‌های ساختمانی به وسیله میکروب-های سلولوتیک می‌شوند. بنابراین از راه این مکانیسم اثر خود را بر هضم کل مواد غذایی می‌گذارند (Pen *et al*., 2006). در این مطالعه، افزودن سطوح مختلف ساپونین سبب کاهش پتانسیل تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی شد. با این حال، سطوح مختلف اسید گالیک و اسید تانیک بر

پتانسیل تولید گاز در مقایسه با تیمار شاهد اثر معنی‌داری بر کاهش پتانسیل تولید گاز نداشت. همسو با نتایج این مطالعه، Wang *et al.* (1997) و William *et al.* (2005) و Castro-Montoya *et al.* (2011) کاهش تولید گاز را در نتیجه استفاده از ساپونین گزارش کرده‌اند. با این حال، در بسیاری از مطالعات، کاهش گاز تولیدی در نتیجه استفاده از اسید تانیک (Alipour *et al.*, 2010; Mcsweeny *et al.*, 2001) گزارش شده است که در تضاد با نتایج این مطالعه بود.

گاز، اسیدهای چرب فرار و توده میکروبی، همگی محصولات نهایی هضم شکمبه‌ای هستند. مقدار هر یک از محصولات نهایی اندازه‌گیری شده در پایان تخمیر با توده مواد هضم شده ارتباط مستقیمی دارد (Menke and Staingass, 1988). تولید گاز شاخصی از هضم سوبسترا بوده که عمدتاً شامل دی اکسید کربن و متان است (Blummel and Ørskov, 1993). از طرفی، تولید گاز در شکمبه مستقیم از متابولیسم میکروبی و غیرمستقیم از واکنش بین اسیدهای چرب فرار با بیکربنات حاصل می‌شود (Makkar, 2003). لذا، می‌توان این طور بیان کرد که هر گونه تغییری در تعداد، گونه یا فعالیت میکروارگانیسم‌های موجود در شکمبه و نیز تغییر در نسبت اسیدهای چرب فرار می‌تواند حجم تولید گاز را تحت تاثیر قرار دهد. تولید بوتیرات و پروپیونات بیشتر و استات کمتر، منجر به کاهش تولید متان خواهد شد (Umara, 2004). از این رو می‌توان باز تاثیر ساپونین در کاهش گاز تولیدی را به تاثیر آن بر جمعیت میکروبی مرتبط دانست. در مطالعه‌ای با استفاده از دوزهای بالای ساپونین (۱۲ میلی‌گرم/گرم ماده خشک ساپونین)، ۵۴ درصد کاهش تعداد پروتوزوآ و ۲۰ درصد کاهش انتشار متان (بدون تاثیر بر متانوژن‌ها) در شرایط برون‌تنی بدست آمد که علت آن کاهش تولید هیدروژن و کاهش فعالیت متانوژن‌ها بیان شد (Hu *et al.*, 2005; Hess *et al.*, 2003). متان به وسیله گروه ویژه‌ای از آرکیاها که متانوژنز نامیده می‌شوند، تولید می‌شود (Hu *et al.*, 2005). هیچ یک از باکتری‌های تخمیر کننده کربوهیدرات و پروتوزوآها متان تولید نمی‌کنند، اما نقش مهمی در تولید متان از راه تولید فورمات، CO_2 و هیدروژن بازی می‌کنند (Moss *et al.*, 2000). متانوژنزها، هیدروژن، CO_2 و فورمات، فرآورده‌های نهایی تخمیری سایر میکروارگانیسم‌ها را برای تولید انرژی جهت رشدشان مصرف می‌کنند. از طرفی، یک رابطه مستقیمی بین تعداد پروتوزواهای شکمبه و متانوژنزها وجود دارد و دفونه کردن به‌طور معنی‌داری تولید متان را در حیوانات نشخوارکننده کاهش می‌دهد (Tamminga, 1992). پروتوزوای شکمبه ماوایی برای بیش از ۲۰ درصد متانوژنزهای شکمبه فراهم کرده که مسئول حدود ۳۷ درصد انتشار متان در حیوانات هستند (Klieve *et al.*, 1996). پروتوزوای شکمبه‌ای در تولید متان نیز مشارکت دارند. همانطوری که به عنوان مخزن هیدروژن عمل کرده و محیطی برای گروه زیادی از متانوژنزها فراهم می‌کنند (Klieve *et al.*, 1996). میکروارگانیسم‌های شکمبه بخصوص پروتوزوآها به تغییرات ناشی از افزودن ساپونین در خواص غشای سلولی حساس هستند(Moss *et al.*, 2000). بخشی از کاهش تولید گاز را می‌توان به دلیل تغییر در غلظت و نوع اسیدهای چرب فرار نسبت داد. به این معنی که کاهش تولید اسید استیک و نسبت استات به پروپیونات منجر به کاهش در هیدروژن قابل دسترس برای باکتری‌های متانوژنزها می‌شود (Mcsweeny *et al.*, 2001). در مطالعه William *et al.* (2005) دلیل کاهش گاز تولیدی در نتیجه استفاده از دوز بالای (۸ میلی‌گرم) ساپونین چای را به تاثیر ممانعت‌کنندگی ساپونین بر رشد باکتری‌های سلولایتیک و قارچها نسبت دادند. ساپونین‌ها ممکن است رشد باکتری‌های خاص مربوط به تولید پروپیونات (*سوکسینوموناس آمیلولیتیکا*، *سلنوموناس رومینتیوم*) را تحریک کنند (Pen *et al.*, 2006). در این مطالعه، افزودن سطوح مختلف ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک بر نرخ تولید گاز و فراسنجه‌های تخمینی (انرژی قابل متابولیسم، غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و قابلیت هضم ماده آلی) تاثیر کاهشی داشتند. کاهش نرخ تولید گاز ممکن است به خاطر افزایش فاز تاخیر باشد که می‌تواند به خاطر تاثیر بازدارندگی قوی این ترکیبات بر جمعیت باکتریایی به صورت مستقیم و یا از راه ممانعت از تولید سوبستراهای مورد نظر آن‌ها باشد. در یک پژوهش مشاهده شد که اسید تانیک فاز تاخیر را در سیستم تخمیر تولید گاز، احتمالاً به خاطر ممانعت از فعالیت آنزیم-

هـای میکروبـی، افـزایش داد (Beach *et al*., 2005). رابطـه مثبتی بین اسـید تانیـک متـراکم و فـاز تـاخیر در سیسـتم تخمیـر تولیـد گـاز گـزارش شـده اسـت (Del Pino *et al*., 2005). از نظر روند تولید گاز بین تیمارهای مختلف (شـکل ۱) در زمان‌های مختلف پس از انکوباسیون اخـتلاف معنـی-داری وجود داشت (*P*<۰/۰۵). روند تولید گاز در ۲۴ ساعت اول انکوباسیون برای همه تیمارها از سرعت بالاتری برخوردار بود. در بین تیمارهای آزمایشی، تیمار شاهد از رونـد تولیـد گاز بالاتری برخوردار بود.

جدول ۲- اثر سطوح مختلف ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک بر فراسنجه‌های تولید گاز جیره

Table 2. Effect of different levels of saponins, gallic acid and tannic acid on gas production parameters of diet

Treatments	(b)[1] (ml/g DM)	c[2] (ml/h)	SCFA[3] (mmol)	ME[4] (MJ/Kg)	OMD[5] (%DM)
Control	255.6±8.397	0.0322±0.0025	0.669[a]	13.72[a]	41.90[a]
Basal diet × 2.5% saponin	232.6±9.813	0.0282±0.0026	0.547[c]	12.98[c]	37.01[c]
Basal diet × 5% saponins	237.3±9.344	0.0287±0.0025	0.58b[c]	13.18b[c]	38.35[bc]
Basal diet × 10% saponins	239.6±10.792	0.0288±0.0029	0.572[bc]	13.14[bc]	38.05[bc]
Basal diet × 2.5% gallic acid	263.3±11.739	0.0276±0.0027	0.621[ab]	13.43[ab]	39.98[ab]
Basal diet × 5% gallic acid	245.3±12.688	0.0261±0.0028	0.572[bc]	13.14[bc]	38.05[bc]
Basal diet × 10% gallic acid	256.3±14.456	0.0241±0.0028	0.532[c]	12.89[c]	36.42[c]
Basal diet × 2.5% tannin	246.3±11.316	0.0257±0.0025	0.547[c]	12.98[c]	37.01[c]
Basal diet × 5% tannin	243.4±12.279	0.0257±0.0027	0.543[c]	12.95[c]	36.87[c]
Basal diet × 10% tannin	254.2±12.118	0.0249±0.0024	0.547[c]	12.98[c]	37.01[c]
SEM	-	-	0.0175	0.1074	0.7020
P value	-	-	0.0005	0.0005	0.0005

Different superscript letters in the same column represent a significant difference (*P*<0.05)

[1]Gas production potential, [2]Gas production rate, [3]Short chain fatty acid, [4]Metabolizable energy, [5]Organic matter digestibility

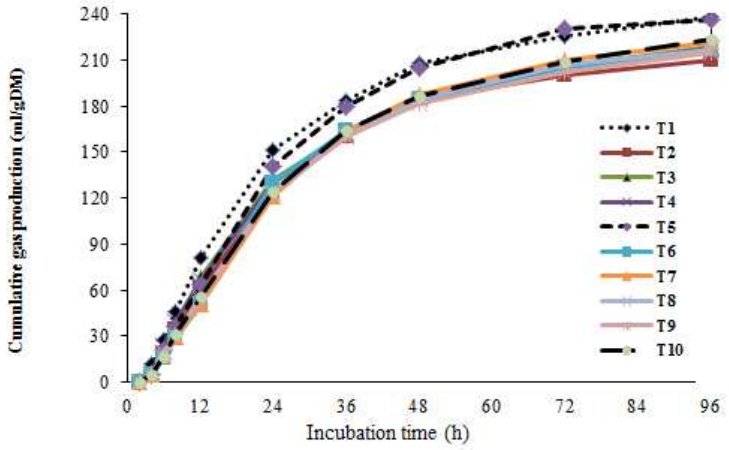

Fig. 1. Cumulative gas production curves of studied treatments at different times after incubation

شکل ۱- منحنی تولید گاز تجمعی تیمارهای مورد مطالعه در زمان‌های مختلف انکوباسیون

Treatments: T1:control, T2: Basal diet + 2.5% saponin, T3: Basal diet + 5% saponins, T4: Basal diet + 10% saponins, T5:Basal diet + 2.5% gallic acid, T6:Basal diet + 5% gallic acid, T7:Basal diet + 10% gallic acid, T8: Basal diet + 2.5% tannic acid, T9: Basal diet + 5% tannic acid, T10: Basal diet + 10% tannic acid.

اثر سطوح مختلف ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک بر قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و فراسنجه‌های تخمیری شکمبه‌ای جیره در شرایط برون‌تنی: نتایج مربوط به اثر افزودن سطوح مختلف ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک بر قابلیت هضم، فراسنجه‌های تخمیری، عامل تفکیک و تولید پروتئین میکروبی جیره در شرایط برون‌تنی در جدول ۳ نشان داده شده است. بین تیمارهای آزمایشی از نظر قابلیت هضم ماده خشک (به‌جز تیمارهای دارای ۵ و ۱۰ درصد ساپونین که قابلیت هضم ماده خشک پایین‌تری نسبت به شاهد داشتند) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). در مقایسه با تیمار شاهد، افزودن سطوح ۲/۵ و ۵ درصد اسید گالیک و اسید تانیک اثری بر قابلیت هضم ماده آلی نداشتند. از نظر غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH محیط کشت بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$). بالاترین مقدار غلظت نیتروژن آمونیاکی مربوط به تیمار شاهد (۱۰/۷۶ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) و پایین‌ترین مقدار آن مربوط به تیمار دارای ۱۰ درصد اسید تانیک (۵/۷۹ میلی-گرم در دسی‌لیتر) بود ($P<۰/۰۵$). به طور کلی، افزودن ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک باعث کاهش در غلظت نیتروژن آمونیاکی شد. بین تیمارها از نظر بازده تولید گاز، عامل تفکیک و توده میکروبی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$). در بین تیمارهای آزمایشی، تیمار دارای ۱۰ درصد اسید تانیک دارای بالاترین بازده تولید پروتئین میکروبی و عامل تفکیک و پایین‌ترین بازده تولید گاز بود. به طور کلی، افزودن سطوح مختلف ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک (به‌جز تیمار دارای سطح ۱۰ درصد اسید گالیک) باعث افزایش بازده تولید توده میکروبی در مقایسه با تیمار شاهد شد.

از نظر قابلیت هضم ماده خشک، پایین‌ترین درصد قابلیت هضم ماده آلی در تیمارهای دارای سطوح ۵ و ۱۰ درصد ساپونین و ۱۰ درصد اسید تانیک مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). به طور کلی، استفاده از سطح ۱۰ درصد ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک منجر به کاهش معنی‌داری در قابلیت هضم ماده آلی شد که در توافق با نتایج (2011) Castro-Montoya *et al.* بود. نشان داده شده است که افزودن میموزین و اسید تانیک سبب کاهش قابلیت هضم می‌شود (Bhatta *et al.*, 2009). در برخی از مطالعات (Hess *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 1998) افزودن ساپونین هیچ تاثیری بر قابلیت هضم ماده خشک نداشت. در این مطالعه، مقادیر محاسبه شده برای قابلیت هضم از راه تخمین با استفاده از داده‌های تولید گاز بسیار پایین‌تر از مقادیر اندازه‌گیری شده به روش کشت بسته (هر چند روند تغییرات بین تیمارها تا حدودی مشابه است) بود که ممکن است به خاطر در نظر گرفتن ترکیب شیمیایی نمونه‌ها باشد.

همسو با نتایج مطالعه حاضر، کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در نتیجه افزودن افزودن اسید تانیک (El-Waziry, 2005; *et al.*, Mcsweeny *et al.*, 2001) و ساپونین (Hu *et al.*, 2005) در شرایط برون‌تنی نشان داده شده است. هر چند در برخی مطالعات دیگر وجود اسید تانیک در جیره، غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه را تحت تاثیر قرار نداد (Animut *et al.*, 2008; Baah *et al.*, 2007). کاهش غلظت آمونیاک ممکن است به دلیل تاثیر این مواد در کاهش پروتئولیز، کاهش تجزیه‌پذیری پپتیدها، دی‌آمیناسیون اسیدهای آمینه، کاهش فعالیت اوره‌آز (Makkar, 1993; Reed *et al.*, 1990)، مهار فعالیت دآمیناز میکروبی و یا اثر ضد پروتوزوایی باشد. استفاده از سطوح کم یا متوسط ساپونین و اسید تانیک می‌تواند باعث بهبود تخمیر شکمبه-ای از جمله کاهش تجزیه‌پذیری پروتئین شکمبه، ابقای نیتروژن آمونیاکی تولیدی در شکمبه، کاهش تولید گاز متان و افزایش جریان نیتروژن غیر آمونیاکی و اسیدهای آمینه ضروری به ویژه متیونین از شکمبه به روده باریک شود (Tabacco *et al.*, 2006). همچنین ساپونین می‌تواند با آمونیاک باند شود و از افزایش بیش از حد غلظت آن درون شکمبه جلوگیری کند. ضمن اینکه هنگام کاهش غلظت آمونیاک شکمبه‌ای آن را آزاد کرده و به ساخت پروتئین میکروبی کمک می‌کند. البته ساپونین در شرایطی می‌تواند نقش میانجی را ایفا کند که آمونیاک به اندازه کافی و دائم در دسترس باشد (Hussain and Cheeke, 1995).

در این مطالعه، افزایش عامل تفکیک همسو با نتایج (2008) Goel *et al.* بود. هر چند در برخی از مطالعات عامل تفکیک تحت تاثیر اسید تانیک و ساپونین قرار نگرفت (Castro-Montoya *et al.*, 2011). در سیستم بسته مانند روش تولید

گاز، تفکیک مواد مغذی می‌تواند با عامل تفکیک ارزیابی شود که نشان‌دهنده نسبتی از ماده آلی سوبسترا که به سمت تولید گازها، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و توده میکروبی می‌رود، است (Makkar, 2004). Blummel *et al.* (1997) مقدار عامل تفکیک[1] را در خوراک‌های متعارف بین ۲/۷۵ تا ۴/۴۱ میلی‌گرم/میلی‌لیترگزارش نمودند. عامل تفکیک بیان‌کننده نسبت تجزیه واقعی سوبسترا به حجم گاز تولید شده در دوره‌های زمانی انکوباسیون (معمولاً ۲۴ یا ۴۸ ساعت) بوده (Olivera, 1998) و شاخصی از راندمان سنتز توده میکروبی در شرایط آزمایشگاهی است (Blummel *et al.*, 1997). این نتایج نشان می‌دهد که مقدار ماده آلی حقیقی تخمیر شده به ازای هر میلی‌لیتر گاز تولید شده بستگی به نوع ماده تخمیر شده متفاوت است. عامل تفکیک بالاتر از ۹/۹۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در برخی از گیاهان غنی از تانن گزارش شده است و دلایل احتمالی مختلفی برای توجیه بالا بودن عامل تفکیک بیان شده است، از جمله اینکه تانن‌ها در طول تخمیر از نمونه غذایی شستشو داده شده و جزء بخش ناپدید شده ماده خشک محسوب شده بدون اینکه در تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری مشارکت داشته باشند و اینکه تانن‌ها احتمالاً از حلالیت سلول‌ها جلوگیری نموده و یا به خاطر هر دو دلیل ذکر شده باشد (Blummel *et al.*, 1997). ساخت پروتئین میکروبی در شکمبه مهمترین منبع اسیدهای آمینه در دوازدهه است (Boghum *et al.*, 2006). گزارش شده است که تانن‌ها منجر به همزمانی بهتر آزاد شدن مواد مغذی در طول تخمیر می‌شوند (Makkar, 2003). این خصوصیت به همراه ظرفیت آنها برای کاهش باکتریوفاژها (Klieve *et al.*, 1996) و پروتوزوآها (Makkar *et al.*, 1995b) به آن‌ها توانایی افزایش بازدهی ساخت پروتئین میکروبی را می‌بخشد. اگر چه تانن‌ها باعث کاهش قابلیت دسترسی مواد مغذی می‌شوند، ولی هر دو نوع اسید تانیک متراکم و قابل هیدرولیز نقش تعدیل‌کننده بر بازدهی ساختن پروتئین میکروبی داشته و پروتئین‌ها را از تجزیه شکمبه‌ای حفظ می‌کنند (Makkar *et al.*, 1995c). بدین ترتیب این مولکول‌ها باعث تغییر جهت مسیر استفاده از مواد مغذی می‌شوند، به طوری که نسبت بیشتری از مواد مغذی صرف تولید توده میکروبی شده و مقدار کمتری در جهت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر مورد استفاده قرار می‌گیرد. محققان بیان نمودند همبستگی مثبتی بین تولید گاز و تولید اسید چرب فرار و همبستگی منفی بین تولید گاز و تولید توده میکروبی وجود دارد (Blummel *et al.*, 1997). در نتیجه جیره‌های دیگر نسبت به سلمکی ساقه سفید به علت گاز تولیدی بیشتر (جدول ۲)، دارای عامل تفکیک و به دنبال آن توده میکروبی کمتر هستند. تحقیقات نشان داده‌اند که هنگام مصرف علوفه‌های حاوی اسید تانیک، میزان نیتروژن غیر آمونیاکی وارد شده به روده باریک بیشتر از نیتروژن مصرفی بوده است که بخشی از آن را به افزایش تولید پروتئین میکروبی نسبت می‌دهند. در یک مطالعه، با افزایش سطح ساپونین چای تعداد پروتوزوآها کاهش و تولید پروتئین میکروبی به طور معنی‌داری افزایش یافت (Hu *et al.*, 2005). برخی پژوهشگران معتقدند که پروتوزوآی مژک‌دار کمک قابل توجهی در بازچرخش نیتروژن میکروبی به داخل شکمبه و راندمان ساخت پروتئین میکروبی دارد. در نتیجه کاهش جمعیت پروتوزوآ می‌تواند استفاده نیتروژن غذایی را بهبود داده و جریان تولید پروتئین میکروبی به روده را افزایش دهد (Waghom *et al.*, 1994). در مطالعات گذشته، افزودن اسید تانیک در سیستم تخمیری منجر به بهبود بازدهی ساخت پروتئین میکروبی شد (Makkar *et al.*, 1995a; Bento *et al.*, 2005). گزارش شده است که افزودن ساپونین یوکا، کوایلاجا و آکاسیا بازدهی ساخت پروتئین میکروبی را افزایش داد (Makkar *et al.*, 1998). این احتمال نیز وجود دارد که اسید تانیک و ساپونین قادر به اصلاح ترکیب شیمیایی خود میکروب‌ها بوده و از این راه کل بخش‌های میکروبی را تغییر دهند (Goel *et al.*, 2008).

1. Partitioning factor

جدول ۳- اثر سطوح مختلف ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک بر قابلیت هضم، فراسنجه‌های تخمیری، عامل تفکیک و تولید پروتئین میکروبی

Table 3. Effect of different levels of saponin, gallic acid and tannin on digestibility, fermentation parameters and microbial protein diet

Treatments	IVDMD (%DM)[1]	IVOMD (%DM)[2]	pH	NH_3-N (mg/dl)	Gas yield ($mlGP_{24h}$/500 mg DM)	PF (mg/ml)[3]	MCP (mg/500 mg DM)[4]	EMCP[5]
Control	79.5[a]	85.15[a]	6.80[bc]	10.76[a]	118.87[a]	8.53[de]	297.97[ab]	0.73[e]
Basal diet × 2.5% saponin	78.5[a]	80.38[c]	6.85[a]	7.96[b]	108.04[dc]	8.95[bc]	285.17[b]	0.75[bc]
Basal diet × 5% saponins	72.5[b]	76.14[d]	6.80[bc]	7.12[bc]	115.35[ab]	8.60[e]	267.17[c]	0.74[dc]
Basal diet × 10%saponins	73.5[b]	75.08[d]	6.83[ab]	7.00[bc]	106.85[cde]	9.02[bc]	267.8[c]	0.75[bc]
Basal diet × 2.5% gallic acid	80.0[a]	84.09[ab]	6.77[c]	6.42[bc]	104.45[de]	9.50[a]	304.8[a]	0.76[ab]
Basal diet × 5% gallic acid	80.5[a]	84.09[ab]	6.78[c]	7.16[bc]	111.54[bc]	8.84[dc]	297.92[ab]	0.75[bc]
Basal diet × 10% gallic acid	79.6[a]	81.97[bc]	6.80[bc]	7.55[bc]	116.08[ab]	8.38[e]	285.17[b]	0.73[e]
Basal diet × 2.5% tannic acid	81.5[a]	84.09[ab]	6.80[bc]	7.51[bc]	108.05[dc]	9.02[bc]	299.85[a]	0.75[bc]
Basal diet × 5% tannic acid	81.5[a]	84.62[ab]	6.80[bc]	6.17[bc]	104.94[cde]	9.33[b]	305.10[a]	0.76[ab]
Basal diet × 10% tannic acid	78.5[a]	80.91[c]	6.85[a]	5.79[c]	101.01[e]	9.63[a]	294.47[ab]	0.77[a]
SEM	0.0122	0.0092	0.0165	0.5568	2.1862	0.1437	4.5914	0.0041
P value	<0.0001	<0.0001	0.0058	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Different superscript letters in the same column represent a significant difference ($P<0.05$)

[1]*In vitro* Dry matter digestibility, [2]*In vitro* Organic matter digestibility, [3]partitioning factor, [4]Micobial crude protein, [5]efficiency microbial crude protein.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که افزودن سطوح مختلف ساپونین، اسید گالیک و اسید تانیک (به جز سطوح ۱/۲۵ و ۵ درصد ساپونین) اثر معنی‌داری بر پتانسیل تولید گاز نداشت. با این حال، در مقایسه با تیمار شاهد، نرخ تولید گاز در تیمارهای حاوی اسید گالیک و اسید تانیک به طور معنی‌داری کمتر بود. در مقایسه با تیمار شاهد، تمامی تیمارها (به استثنای تیمار داری سطح ۱/۲۵ اسید گالیک) به طور معنی‌داری از انرژی قابل متابولیسم و غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر پایین‌تری برخوردار بودند. از نظر فراسنجه‌های تخمیری شکمبه‌ای، استفاده از سطوح مختلف مواد ضد تغذیه‌ای ساپونین، اسید تانیک و اسید تانیک در شرایط آزمایشگاهی، به طور معنی‌داری غلظت نیتروژن آمونیاکی را کاهش و بازده تولید پروتئین میکروبی را بهبود دادند. به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر عدم تاثیر استفاده از این سطوح ترکیبات بر فراسنجه‌های تخمیری و تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی بود.

فهرست منابع

Abarghoei M., Rouzbehan Y. and Alipour D. 2010. Nutritive value and silage characteristics of whole and partly stoned olive cakes treated with molasses. Journal of Agricultural Science and Technology, 13: 709-716.

El-Waziry A. M., Nasser M. E. A. and Sallam S. M. A. 2005. Processing methods of soybean meal. 1- Effect of roasting and tannic acid treated-soybean meal on gas production and rumen fermentation *in vitro*. Journal of Appllied Science Research, 1: 313.

Animut G. R., Puchala A. L., Goetsch A. K., Patra T., Sahlu V. H. and Wells J. 2008. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. Animal Feed Science and Technology, 144: 212–227.

Baah J., Ivan M., Hristov A. N., Koenig K. M., Rode L. M. and McAllister T. A. 2007. Effects of potential dietary antiprotozoal supplements on rumen fermentation and digestibility in heifers. Animal Feed Science and Technology, 137: 126–137.

Bae H. D., McAllister T. A., Muir A. D., Yanke L. J., Bassendowski K. A. and Cheng K. J. 1993. Selection of a method of condensed tannin analysis for studies with rumen bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41: 1256-1260.

Beach M. C., Cooper L. A. and Robison K. A. 2005. Strategies for improving minority healthcare quality.Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality. Evidence Report/Technology Assessment No. 90. AHRQ Publication No. 04-E008-02.

Bhatta R., Vaithiyanathan S., Singh N. P. and Verma D. L. 2009. Effect of feeding complete diets containing graded levels of prosopis cineraria leaves on feed intake, nutrient utilization and rumen fermentation in lambs and kids. Small Ruminant Research, 67: 75–83.

Blummel M., Makkar H. P. S. and Becker K. 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 77: 34-24.

Blummel M. and Ørskov E. R. 1993. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. Animal Feed Science and Technology, 40:109-119.

Boghum J., Kluth H. and Rodehutscord M. 2006. Effect of total mixed ration composition on amino acid profiles of different fractions of ruminal microbes *in vitro*. Journal of Dairy Science, 89: 1592-1603.

Broderick G. A. and Kang J. H. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. Journal of Dairy Science, 63: 64–75.

Castro-Montoya J. M., Makkar H. P. S. and Becker K. 2011. Chemical composition of rumen microbial fraction and fermentation parameters as affected by tannins and saponins using an *in vitro* rumen fermentation system. Journal of Animal Science, 91: 433-448.

Del Pino M., Felmer P. and Musso M. 2005. Two-bubble solutions in the super-critical Bahri-Coron's problem. Calculus Variations, 16: 113-145.

Deshpande S. S. 2002. Handbook of food toxicology. Toxicants and antinutrient in plant foods. Marcel Dekkel, New York.

Getachew G., Depiters E. J. and Robinson P. H. 2002. *In vitro* gas production provides effective method for assessing ruminant feeds. California Agriculture, 58: 54-58.

Goel E. and Yanez-Ruiz D. R. 2008. Potential use of olive by-products in ruminant feeding: A review. Animal Feed Science and Technology, 147: 247–264.

Hess H. D., Beuret R. A., Lotscher M., Hindrichsen I. K., Machmuller A., Carulla J. E., Lascano C. E. and Kreuzer M. 2004. Rumen fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grasshayconcentrate diets offered with Sapindus saponaria fruits and Cratylia argentea foliage. Journal of Animal Science, 79: 177-189.

Hess H. D., Kreuzer M., Dıˇıaz T. E. Lascano C. E., Carulla J. E., Soliva C. R. and Machmuller A. 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluids. Animal Feed Science and Technology, 109: 79–94.

Hu W.-L. and Liu J.-X. 2005. Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. Food Research International, 43: 526-530.

Hussain I. and Cheeke P. R. 1995. Effect of dietary Yucca schidigeraextract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate or roughage-based diets. Animal Feed Science and Technology, 51: 231-242.

JaKyeom S., Jiyoung Y., Hyun J. K., Santi Devi U., Chol W. M. and Jong K. 2010. Effects of synchronization of carbohydrate and protein supply on ruminal fermentation, nitrogen metabolism and microbial protein synthesis in Holstein steers. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 23: 1455-1461.

Klieve A. V., Swain R. A. and Nolan J. V. 1996. Bacteriophages in the rumen, types present population size and implications for the efficiency of feed utilisation. Australian Society of Animal Production, 21: 92-94.

Lu C. D. and Jorgensen N. A.. 1987. Alfalfa saponins affect site and extent of nutrient digestion in ruminants. Journal of Nutrition, 117: 919–927.

Makkar H. P. S. 2005. *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. Animal Feed Science and Technology, 123-124: 291-302.

Makkar H. P. S. 1993. Antinutritional factors in foods for livestock. In: Animal Production in Developing Countries, No. 16. Occasional Publications, British Society of Animal Production, 69–85.

Makkar H. P. S. 2004. Recent advances in the *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources in Assessing quality and safety of animal feeds. FAO Animal Production and Health Papers-160. ISBN 92-5_105-46-5. 66 pp. [Online] Available: http://www.fao.org/docrep/007/ y5159e/y5159e05.htm.

Makkar H. P. S., Becker K., Abel H. J. and Szegleti T. 1995. Degradation of condensed tannins by rumen microbes exposed to quebracho tannins (QT) in rumen simulation technique (RUSITEC) and effects of QT on fermentative processes in the RUSITEC. Journal of the Science of Food and Agriculture, 69: 495–500.

Makkar H. P. S. Blümmel M. and Becker K. 1995. *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. Journal of the Science of Food and Agriculture, 69: 481–493.

Makkar H. P. S. and Becker K. 1998. Do tannins in leaves of trees and shrubs from Africa and Himalayan regions differ in level and activity. Agroforestry Systems, 40: 59-68.

Makkar H. P. S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small Ruminant Research, 49: 241-256.

McAllister T. A., Reniuk R., Mir Z., Mir P., Selinger S. B. and Cheng K. J. 1996. Inoculants for alfalfa silage: effects on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers. Livestock Production Science, 53: 171-181.

Mcsweeny C. S. Palmer B., McNeill D. M. and Krause D. O. 2001. Microbial interaction with tannin: nutritional consequences for ruminants. Animal Feed Science and Technology, 91: 83-93.

Menk K. H. and Raad L. 1998. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. Journal of Agricultural Science, 93: 271-222.

Menke K. H. and Staingass H. 1988. Estimation of energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research and Development, 28: 7-55.

Moss A. R. 2000. Methane global warming and production by animals. Chalcombe Publications, Canterbury, UK, 2000.

O'Hara M., Hozumi S. and Ohki K. 1973. Studies on the mode of gas production in artificial rumen and its application to the evaluation of feedstuffs. IV. On the rule of bicarbonate buffer for the gas production. Japanese Journal of Zootechnical Science, 45: 1-7.

Olivera M. P. 1998. Use of *in vitro* gas production technique to assess the contribution of both soluble and insoluble fraction on the nutritive value of forage. A thesis submitted to the University of Aberdeen, Scotland, in partial fulfillment of the degree of Master of science in Animal Nutrition.

Ørskov E. R. and McDonald I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements Weighted according to the rate of passage. Journal of Agriculture and Science, 92: 499-503.

Pen B., Sar C., Mwenya B., Kuwaki K., Morikawa R. and Takahashi J. 2006. Effects of Yucca schidigera and Quillaja saponaria extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. Animal Feed Science and Technology, 129: 175–186.

Reed J. D., Soller H. and Woodward A. 1990. Fodder tree and straw diets for sheep: Intake, growth, digestibility and the effects of phenolics on nitrogen utilization. Animal Feed Science and Technology, 30: 39-50.

SAS. 2003. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. SAS Institute, Cary, NC, USA.

Tabacco E., Borreani G., Crovetto G. M., Galassi G., Colombo D. and Cavallarm L. 2006. Effect of chestnut tannin on fermentation quality, proteolysis and protein rumen degradability alfalfa silage. Journal of Dairy Science, 89: 4736-4746.

Tamminga S. 1992. Gaseous pollutants produced by farm animal enterprises. In Farm Animals and the Environment (eds Phillips, C. and Piggins, D.), CAB International, Wallingford, UK.pp. 345–357.

Tavendale M. H., Meagher L. P., Pacheco D., Walker N., Attwood G. T. and Sivakumaram S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with lotus pedunculatus and medicago sativa, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. Animal Feed Science and Technology, 123-124: 403-419.

Theodore M. K., Williams B. A., Dhanoa M. S., McAllan A. B. and France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Scince and Technology, 48: 185–197.

Umara M. 2004. A comparison of purine derivatives excretion with conventional methods as indices of microbial yield in dairy cows. Journal of Dairy Science, 87: 2211-2221.

Waghorn G. C., Shelton I. D., McNabb W. C. and McCutcheon S. N. 1994. Effects of condensed tannin in Lotus pedunculatus on nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. Journal of Agricultural Science, 123: 109–119.

Wang Y., McAllister T. A., Yanke L. J., Xu Z. J., Cheeke P. R. and Cheng K. J. 1998. *In vitro* effects of steroidal saponins from Yucca schidigera extract on rumen microbial protein synthesis and ruminal fermentation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80: 2114–2122.

Wang Y., McAllister T. A., Newbold C. J., Cheeke P. R. and Cheng K. J. 1997. Effects of Yucca extract on fermentation and degradation of saponins in the Rusitec. Journal of Animal Science, 48: 149–152.

Weimer P. J., Hatfield R. D. and Buxton D. R. 1998 Inhibition of ruminal cellulose fermentation by extracts of the perennial legume cicer milkvetch (*Astragalus cicer*). Applied and Environmental Microbiology, 59: 405-409.
Widdicombe W. D. and Kurt Thelen D. 2005. Row width and plant density effect on corn forage hybrids. Agronomy Journal, 94: 326-330.

Animal Production Research

Vol. 6, No. 4, 2017 (13-25)

University of Guilan

Effect of different levels of saponins, gallic acid and tannic acid on *in vitro* ruminally fermentation kinetic

J. Bayat kouhsar[1*], F. Maghsoudloo[2], F. Fathei[2], F. Ghanbari[1]

1. Assistant Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture Science and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Iran
2. Former MSc. Student of Animal Science Department, Fculty of Agriculture Science and Natural Resources, Ganbad Kavous Universty, Iran

(Received: 07-02-2017 – Accepted: 21-12-2017)

Abstract

This study was conducted in order to evaluate effect of different levels (2.5, 5 and 10 % of DM) of saponin, gallic acid and tannic acid on gas production parameters and *in vitro* digestibility of dry matter and organic matter, using gas production technique and batch culture. Results showed that there were significant differences among treatments on gas production and rate of gas production (P<0.05). Gas production and rate of gas production were higher for control treatment than other groups. The control treatment and treatments with different levels of saponin had the highest and lowest cumulative gas production. However, addition of different levels of saponin, gallic acid and tannic acid caused to decrease organic matter digestibility (OMD), metabolizable energy (ME) and short chain fatty acids (SCFAs), and treatment contained 10% of gallic acid had the lowest OMD, ME and SCFAs. Nitrogen-ammonia concentration was the highest (10.76 mg/dl) and lowest (5.79 mg/dl) in control treatment and treatment contained 10% of tannic acid, respectively. There were significant differences among treatments on gas production, partitioning factor and microbial crude protein (P<0.05). In general, obtained results of this study showed that using different levels of saponin, gallic acid and tannic acid had no significant effect on *in vitro* ruminally fermentation parameters.

Keywords: Microbial protein, Gas production, Saponin, Flavonoid

[*]Corresponding author: javad_bayat@yahoo.com