Iranian Journal of Animal Science
Vol 49, No 4, Winter 2019 (517-525)
DOI: 10.22059/ijas.2019.262053.653650

علوم دامی ایران
دورۀ ۴۹، شمارۀ ۴، زمستان ۱۳۹۷ (ص ۵۲۵-۵۱۷)

بررسی تأثیر استفاده از مکمل حاوی تانن‌های متراکم شاه بلوط (Silvafeed) در جیره گاوهای شیری بر تخمیر، گوارش‌پذیری مواد مغذی و فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه در شرایط آزمایشگاهی

علی حیدری مجد[۱]، آرش آذرفر[۲*]، ایوب عزیزی[۳] و حسین امیدی میرزایی[٤]
۱، ۲، ۳ و ٤. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار و دانشجوی سابق دکتری، دانشکدۀ کشاورزی، گروه علوم دامی، دانشگاه لرستان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/٤/۲٤ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲)

چکیده

هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثرات مکمل کردن جیره گاوهای شیری با سطوح مختلف مکمل تجاری حاوی تانن‌های متراکم شاه بلوط (Silvafeed) بر فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیر، گوارش‌پذیری مواد مغذی جیره و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک میکروبی شکمبه با استفاده از شیرابه‌ی شکمبه گاو در شرایط آزمایشگاهی بود. تیمارهای آزمایشی شامل جیره شاهد (بدون افزودن تانن متراکم) و مکمل نمودن جیره شاهد به ترتیب با سطوح ۰/٤٥، ۰/۹۰ و ۱/۳۵ گرم مکمل تجاری تانن‌های متراکم به ازای هر کیلوگرم ماده خشک جیره غذایی بر اساس توصیه شرکت سازنده بود. نتایج نشان داد که جیره‌های آزمایشی تأثیری بر حجم گاز تولیدی در کل زمان‌های انکوباسیون، پتانسیل (b) و نیز نرخ (c) تولید گاز نداشت (P>۰/۰۵). به استثنای غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه و سنتز پروتئین میکروبی که با افزایش سطح تانن متراکم در جیره به ترتیب به طور خطی کاهش و افزایش یافتند (P<۰/۰۵)، سایر فراسنجه‌های تخمیر تحت تأثیر سطح تانن در جیره قرار نگرفت (P>۰/۰۵). فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز و فعالیت تجزیه کاغذ صافی تحت تأثیر مکمل سازی جیره با مکمل تانن قرار نگرفت (P>۰/۰۵). هرچند، فعالیت پروتئازی شکمبه با افزایش سطح تانن در جیره به طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵). در کل، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزودن مکمل تانن‌های متراکم به جیره گاوهای شیری تا سطح ۰/۹ گرم در کیلوگرم ماده خشک در شرایط برون‌تنی سبب بهبود سوخت و ساز نیتروژن در شکمبه شد.

واژه‌های کلیدی: آزمون تولید گاز، تانن متراکم، تخمیر، گوارش‌پذیری، فعالیت آنزیمی شکمبه.

Investigating the effects of supplementing dairy cows diet with condensed tannin of chestnut supplement (Silvafeed) on rumen fermentation, nutrient digestibility and microbial enzyme activity *in vitro*

Ali Heidari-Majd, Arash Azarfar[2*], Ayoub Azizi[3] and Hossein Omidi-Mirzaei[4]
1, 2, 3, 4. M.Sc. Student, Associate Professor, Assistant Professor and Former Ph.D. Student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
(Received: Jul. 15, 2018 - Accepted: Jan. 22, 2019)

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects of supplementing dairy cows diet with various levels of commercial chestnut condensed tannins (CT) supplement (Silvafeed), on *in vitro* gas production (GP) and fermentation parameters, nutrients digestibility and activity of rumen microbial enzymes *in vitro* using rumen liquor of cow. Dietary treatments were control diet (without CT) and supplementing control diet with CT at the levels of 0.45, 0.90 and 1.35 g per kg dietary dry matter (DM). Inclusion levels of dietary tannins were based on recommendation of manufacturer. Results showed that GP at all of incubation times, potential (b) and rate (c) of GP were not affected by experimental treatments (P>0.05). Except for ammonia nitrogen concentration and microbial protein production which were decreased and increased with increasing rate of CT in the diet respectively (P<0.05), while the other fermentation parameters were unchanged by incubation of experimental diets (P>0.05). Activity of fibrolytic enzymes such a carboxymethyl cellulase, microcrystalline cellulase and filter paper-degrading activity were not affected by supplementing diet with CT (P>0.05), while rumen protease activity was decreased linearly with enhancing level of CT in the diet (P<0.05). In conclusion, the results of present study revealed that adding condensed tannins to dairy cows diet up to 1.35 g/kg dietary DM improved nitrogen metabolism in the rumen, and this could reduce the requirements for dietary rumen undegradable protein.

Keywords: Condensed tannin, gas production, fermentation parameters, digestibility, rumen enzyme activity.

* Corresponding author E-mail: arash.azarfar@gmail.com

مقدمه

تانن‌ها (قابل هیدرولیز[1] و متراکم[2]) پلیمرهای پلی‌فنولی با وزن مولکولی نسبتاً زیادی هستند که به دلیل وجود تعداد زیادی گروه‌های هیدروکسی فنول، قادر به تشکیل کمپلکس مواد مغذی به ویژه با پروتئینها هستند و در بسیاری از مواد خوراکی شامل علوفه‌ها، بوته‌ها، لگوم‌ها و غلات یافت می‌شوند. مصرف مواد خوراکی حاوی غلظت زیاد تانن‌ها در حیوانات ممکن است اثرات سوئی بر مصرف خوراک، بازده استفاده از مواد مغذی و عملکرد آن‌ها داشته باشد. با این حال، تانن‌ها با کاهش تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه، پیشگیری از نفخ، مهار تولید متان و افزایش غلظت اسید لینولئیک کونژوگه در محصولات نشخوارکنندگان، ممکن است تخمیر شکمبه را به طور مطلوبی تعدیل نمایند (Bhatta *et al.*, 2001; Aerts *et al.*, 1999; McSweeney *et al.*, 2001). تمامی پاسخ‌های سودمند تانن‌ها از طریق تعدیل جمعیت میکروبی شکمبه رخ می‌دهد. علاوه بر این، تانن‌ها در روده نیز ممکن است اثرات ضد میکروبی نشان دهند. تانن‌ها در ابتدا به دلیل اثرات سوء بر مصرف خوراک و بازده استفاده از مواد مغذی، به‌عنوان مواد ضدتغذیه‌ای در نظر گرفته می‌شدند (Kumar & Vaithiyanathan, 1990). با این حال، در سال‌های اخیر، اثرات مفید آن‌ها در تعدیل مطلوب تخمیر میکروبی شکمبه نشان داده شده است. اخیراً در برخی مطالعات از تانن به عنوان افزودنی خوراکی در جیره غذایی نشخوارکنندگان استفاده شده و اثرات مطلوبی را به دنبال داشته است. به عنوان مثال، Sharifi (2017) (با مکمل نمودن جیره بره‌های پرواری با تانن‌های استخراج شده از پوست انار بهبود عملکرد دام را گزارش نمود. در مطالعه دیگری (Jolazadeh *et al.*, 2015)، با فراوری کنجاله سویا با تانن استخراج شده از پوست پسته تا سطح ۱۵ درصد، افزایش وزن روزانه و بازدهی خوراک به طور قابل توجهی بهبود یافت. اخیراً، Abarghuei *et al.* (2014) با مکمل نمودن جیره گاوهای شیری با تانن استخراج شده از پوست انار بهبود در سوخت و ساز نیتروژن را گزارش کردند. تانن‌ها بیشترین تأثیر را بر پروتئین جیره غذایی دارند. در مطالعاتی نشان داده شده است که این ترکیبات با تشکیل کمپلکس تانن- پروتئین در شکمبه، سبب کاهش یا کند شدن تجزیه پروتئین جیره‌ای شده، که با حداکثر نمودن ساخت پروتئین میکروبی در شکمبه، سوخت و ساز نیتروژن در بدن حیوان را افزایش می‌دهند (Dentinho *et al.*, 2007; Frutos *et al.*, 2000). باید اذعان نمود که اکوسیستم شکمبه با همه کارآمدی خود در هضم مواد فیبری، از نظر تجزیه پروتئین ناکارآمد است، زیرا سبب تجزیه بخش زیادی از پروتئین جیره غذایی و تبدیل آن به آمونیاک می‌شود (Abarghuei *et al.*, 2013). به‌نظر می‌رسد که با کاهش میزان تجزیه‌پذیری پروتئین جیره‌ای در شکمبه و با حفظ سنتز مطلوب پروتئین میکروبی، می‌توان نیاز حیوان نشخوارکننده را به پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه کاهش داده و از این طریق قیمت جیره غذایی را متعادل نمود. لذا، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی مکمل نمودن جیره غذایی گاوهای شیری با سطوح مختلف مکمل تانن‌های متراکم شاه بلوط (Silvafeed) بر فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیر، گوارش‌پذیری مواد مغذی جیره و فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک و پروتئاز شکمبه با استفاده از شیرابه شکمبه گاو در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

دام‌ها، تیمارهای آزمایشی و مکمل تجاری سیلوافید مورد استفاده

آزمایش‌ها با استفاده از ۲ رأس گاو ماده‌ی خشک دورگ هلشتاین مجهز به فیستولای شکمبه‌ای به عنوان دهنده مایع شکمبه صورت گرفت. مطالعات آزمایشگاهی با استفاده از یک جیره گاو شیری که به عنوان جیره پایه (جدول ۱) سطوح مختلف مکمل تجاری تانن‌های متراکم شاه بلوط (Silvafeed, Silva Team, Italy) به آن افزوده شده بود، انجام پذیرفت. جیره‌های آزمایشی مورد آزمون به منظور انکوباسیون آزمایشگاهی شامل جیره شاهد (فاقد مکمل تاننی، جدول ۱)، و مکمل نمودن جیره شاهد به ترتیب با

1. Hydrolysable Tannin
2. Condensed Tannin

سطوح ۰/۴۵، ۰/۹۰ و ۱/۳۵ گرم تانن متراکم در کیلوگرم ماده خشک جیره بود. مقادیر مورد نظر تانن متراکم استفاده شده محدوده توصیه شده توسط کارخانه سازنده در تغذیه گاوهای شیری بود (Silva Team, Italy). ترکیب شیمیایی محصول تجاری حاوی تانن شامل ۲۳/۵ درصد تانن و ۶۲ درصد ترکیبات فنلی بود.

جدول ۱. اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره گاوهای شیری انکوبه شده در شرایط آزمایشگاهی (درصد ماده خشک)

Table 1. Ingredients and chemical composition of dairy cow diets incubated *in vitro* (% of dry matter)

Items	% of diet
Alfalfa hay (dried)	11
Wheat straw	1.0
Beet pulp	10
Corn silage	22
Barley grain, ground	17
Corn grain, ground	17
Wheat bran	1.25
Soybean meal	11.9
Full fat soybean	2.30
Cotton seed meal	1.15
Corn gluten meal	0.85
Calcium salts fat	0.85
Vitamin-mineral premix[1]	0.85
Monocalcium phosphate	0.25
Sodium bicarbonate	0.95
Calcium carbonate	0.75
Magnesium oxide	0.25
Sodium bentonite	0.65
Chemical composition	
Dry matter (fresh weight)	65.8
Organic matter	91.2
Crude protein	16.9
Neutral Detergent Fiber (NDF)	31.6
Acid Detergent Fiber (ADF)	17.7
Calcium	0.44
Phosphorous	0.34
Net Energy of Lactation (NEL, Mcal/kg DM)	1.75

۱. یک کیلوگرم مکمل مواد معدنی-ویتامینی حاوی ۹۹/۲ میلی‌گرم منگنز، ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۸۴/۷ میلی‌گرم روی، ۱۰ میلی‌گرم مس، ۰/۲ میلی‌گرم سلنیوم، ۹۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D و ۱۸ واحد بین‌المللی ویتامین E بود (رشد دانه، کرج، ایران).

1. Contained (per kg): 99.2 mg Mn, 50 mg Fe, 84.7 mg Zn, 1 mg Cu, 1 mg I, 0.2 mg Se2, 9000 IU vitamin A, 2000 IU vitamin D and 18 IU vitamin E (Roshd-Daneh, Karaj, Iran).

آزمون تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیر

به‌منظور انجام انجام آزمون تولید گاز، محتویات شکمبه از دام‌های مذکور که حداقل به مدت سه هفته با جیره غذایی حاوی ۶۰ درصد علوفه و ۴۰ درصد کنسانتره تغذیه شده بودند، قبل از خوراک‌دهی وعده صبح با قرار دادن دست در داخل شکمبه جمع‌آوری گردید. محتویات شکمبه هر دو رأس گاو در هر مرحله در یک فلاسک عایق که از قبل توسط گاز دی اکسید کربن بی‌هوازی شده بود، در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد کاملاً مخلوط گردید و سریعاً (در کمتر از ۲۰ دقیقه) به آزمایشگاه منتقل گردید. قبل از تزریق به داخل ویال‌های آزمایشی، محتویات شکمبه توسط چهار لایه پارچه متقال صاف گردید. دو سری آزمون تولید گاز به طور همزمان و در سه دوره[1] مجزا انجام شد. در سری اول، ابتدا میزان ۲۵۰ میلی‌گرم نمونه جیره کاملاً خشک آسیاب شده با اندازه ذرات ۱ میلی‌متر به داخل هر ویال برای تعیین پارامترهای آزمون تولید گاز قرار داده شد (۵ تکرار به ازای هر تیمار). سپس، هر ویال که از قبل دمای آن با قرار دادن در بن‌ماری به ۳۹ درجه‌سانتی‌گراد رسیده بود، با ۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه صاف شده و ۲۵ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی تلقیح گردید (Marten & Barnes, 1980). جهت حصول اطمینان از شرایط بی‌هوازی، گاز دی اکسید کربن به شیرابه شکمبه صاف شده و بزاق مصنوعی قبل و پس از تزریق به داخل ویال‌ها نیز تزریق گردید. میزان ۳ ویال نیز به‌عنوان بلانک (حاوی فقط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی) در نظر گرفته شد. سپس درب ویال‌ها بسته شد و در بن‌ماری با دمای حدود ۳۹ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. میزان گاز تولیدی در ویال‌ها توسط دستگاه فشارسنج در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون اندازه‌گیری شد. برای تعیین پارامترهای‌های تولید گاز از معادله زیر استفاده گردید (Blümmel *et al.*, 2003):

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

در معادله بالا: b گاز تولیدی از بخش تخمیرپذیر (میلی‌لیتر)، c سرعت تولید گاز در ساعت، t زمان انکوباسیون برحسب ساعت و P میزان گاز تولیدی (میلی‌لیتر) در زمان مورد نظر می‌باشد.

سری دوم آزمون تولید گاز با ۸ تکرار به ازای هر تیمار و سه دوره به‌منظور تعیین گوارش‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک و ماده آلی و تخمین انرژی قابل متابولیسم جیره‌های آزمایشی و نیز فراسنجه‌های تخمیر شامل pH، نیتروژن آمونیاکی، سنتز پروتئین میکروبی، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و فعالیت

1. Run

آنزیمی شکمبه طراحی شد. پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون (Vercoe *et al.*, 2010)، ابتدا میزان گاز تولیدی هر ویال ثبت گردید. سپس درب ویال‌ها باز گردیده و pH آن‌ها به وسیله دستگاه pH متر (مدل 744؛ شرکت Metrohm سوئیس) ثبت گردید. محتوای هر ویال با ۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بقایای هر ویال جمع‌آوری و خشک گردید. میزان گوارش‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک از اختلاف وزن سوبسترای اولیه و وزن بقایا پس از انکوباسیون محاسبه گردید. جهت تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی، نمونه‌های سوپرناتانت (۵ میلی‌لیتر) سریعاً با یک میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میزان گوارش‌پذیری شکمبه‌ای ماده آلی (Menke & Steingass, 1988) و انرژی قابل متابولیسم (AFRC, 1992) جیره‌های آزمایشی به ترتیب بر اساس معادلات زیر تخمین زده شد:

$$\text{IVOMD (g/kg OM)} = 148.8 + 8.89\ \text{GAS} + 4.50\ \text{CP} + 6.51\ \text{XA}$$

$$\text{ME (MJ/kg DM)} = \text{DOMD} \times 0.0157$$

که در این معادله‌ها IVOMD[1] میزان قابلیت هضم ماده آلی؛ GAS میزان گاز خالص تولیدی برای ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون (Menke & Steingass, 1988)؛ CP میزان پروتئین خام به صورت گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک؛ XA خاکستر به صورت گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک؛ ME انرژی قابل متابولیسم و DOMD ماده آلی قابل هضم در ماده خشک می‌باشد.

تولید پروتئین میکروبی (MPS) به صورت زیر محاسبه گردید (Blümmel *et al.*, 1997):

$$\text{MP (mg/g DM)} = \text{mg ADS} - (\text{ml gas} \times 2.2\ \text{mg/ml})$$

که ADS[2] سوبسترای هضم شده ظاهری پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون، ml gas حجم گاز تولیدی پس از انکوباسیون ۱۶ ساعته و ۲/۲ عامل استوکیومتری بر حسب میلی‌گرم کربن، هیدروژن و اکسیژن مورد نیاز برای سنتز اسیدهای چرب کوتاه زنجیر است.

1. *In vitro* Organic Matter Disappearance
2. Apparently Digested Substrate

اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از معادله Getachew *et al.* (2002) به صورت زیر محاسبه شد:

$$\text{SCFA (mmol/200 mg DM)} = 0.0222\text{GP} - 0.0042$$

که در این معادله SCFA[3] اسیدهای چرب فرار تولیدی و GP حجم گاز تولیدی در زمان ۱۶ ساعت انکوباسیون می‌باشد.

فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیه کاغذ صافی و پروتئاز موجود در بخش میکروبی چسبیده به ذرات خوراکی (پلت‌های جمع‌آوری شده) بر اساس روش Agarwal (2000) تخمین زده شد. روش کار به این صورت بود که پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون، ابتدا محتوای هر ویال (چهار ویال به ازای هر تیمار) به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۵۰۰۰g سانتریفیوژ گردیده و بقایا جمع‌آوری گردید. سپس بقایا با تتراکلرید کربن و آنزیم لیزوزیم فرآیند شدند و مخلوط آنزیمهای مایع شکمبه در بافر فسفات در سانتریفیوژ با دور ۲۷۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه به‌دست آمد. برای تخمین فعالیت کربوکسی متیل سلولاز، مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۵ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه و ۰/۵ میلی‌لیتر کربوکسی متیل سلولز ۱ درصد (به عنوان سوبسترا) بود که در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. مخلوط واکنش برای آنزیم میکروکریستالین سلولاز که شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۱ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه و ۱ میلی‌لیتر میکروکریستالین سلولز ۱ درصد (به عنوان سوبسترا) بود در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفت. به منظور محاسبه فعالیت کاغذ صافی، مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۱ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه و ۰/۵ گرم کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (به عنوان سوبسترا)، در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. در همه آزمون‌های مذکور، واکنش با افزودن ۳ میلی‌لیتر محلول دی‌نیتروسالیسیلیک اسید متوقف گردید. گلوکز آزاد شده

3. Short Chain Fatty Acid

در اثر فعالیت هر یک از آنزیم‌های مورد آزمون بر اساس روش Miller (1959) تخمین زده شد. فعالیت‌های آنزیمی بر اساس این فرض که یک واحد آنزیمی توانایی تولید ۱ میکرومول گلوکز در هر ساعت در هر میلی‌لیتر را تحت شرایط مخلوط واکنش دارد محاسبه گردید. برای تعیین فعالیت پروتئاز شکمبه مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات، ۰/۲۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه سانتریفیوژ شده و ۰/۲۵ میلی‌لیتر کازئین (۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود که به مدت که در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. پس از متوقف نمودن واکنش توسط افزودن ۱میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید، میزان پروتئین نمونه‌ها تعیین گردید (Lowry *et al.*, 1951).

تجزیه شیمیایی نمونه‌ها

میزان ماده خشک نمونه‌ها در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ساعت تعیین گردید (AOAC, 1990). میزان خاکستر خام در کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد و میزان ماده آلی از اختلاف بین وزن ماده خشک نمونه اولیه با وزن خاکستر محاسبه گردید (AOAC, 1990). میزان ADF و NDF به ترتیب بر اساس روش‌های AOAC (1990) و Van Soest *et al.* (1991) محاسبه گردید. میزان نیتروژن آمونیاکی با استفاده از معرف‌های فنول و هیپوکلریت و طبق روش Broderick & Kang (1980) اندازه‌گیری شد.

تجزیه آماری

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تولید گاز، گوارش‌پذیری مواد مغذی، فراسنجه‌های تخمیر و فعالیت آنزیمی با استفاده از رویه MIXED و توسط نرم‌افزار SAS (2001) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. مدل آماری طرح آزمایشی به صورت مدل زیر بود:

$$Y_{ijk}= \mu + T_i + Run_j + e_{ijk}$$

در این مدل Y_{ijk}، μ، T_i، Run_j و e_{ijk} به ترتیب رکورد مشاهده شده، میانگین کل، اثر ثابت تیمار آزمایشی iام، اثر تصادفی دوره jام و اثر خطای آزمایشی بود. میانگین‌های صفات به‌دست‌آمده با استفاده از مقاسیات متعامد (خطی و غیر خطی) و در سطح معنی‌داری ۵ درصد با هم مقایسه شدند.

نتایج و بحث

فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیر

نتایج مربوط به اثر سطوح مختلف مکمل تانني بر فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیر جیره‌های آزمایشی به ترتیب در جدول ۲ و ۳ ارائه شده است. بنا بر نتایج جدول ۲، جیره‌های آزمایشی تأثیری بر گاز تولیدی در زمان‌های ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ (کل حجم گاز تولیدی) پس از انکوباسیون نداشتند (P>۰/۰۵). هرچند از نظر عددی، با افزایش سطح تانن در جیره غذایی روندی کاهشی در گاز تولیدی در همه زمان‌های مورد بررسی مشاهده گردید. همچنین، پتانسیل (ضریب b) و سرعت (ضریب c) تولید گاز نیز تحت تأثیر سطح تانن مکمل شده در جیره قرار نگرفتند (P>۰/۰۵).

همان‌طوری‌که در جدول ۳ نشان داده شده است افزودن مکمل سیلوافید تأثیری بر میزان اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر، گوارش‌پذیری ماده خشک و ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم تخمینی و pH نداشت (P>۰/۰۵). اما، با افزایش سطح تانن متراکم در جیره، غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه به طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵)، در حالی که سنتز پروتئین میکروبی تا سطح ۰/۹ گرم در کیلوگرم ماده خشک به طور خطی افزایش نشان داد (P<۰/۰۵).

مطابق با نتایج پژوهش حاضر، در مطالعه‌ای افزودن اسید تانیک به یونجه تأثیری بر گاز تولید و غلظت اسیدهای چرب فرار نداشت (Getachew *et al.*, 2008). همچنین، در آزمایشی افزودن عصاره تانني استخراج شده از پوست انار تا سطح ۲۰ درصد ماده خشک به کود مرغی فرآوری‌شده، تأثیری بر حجم گاز تولیدی در شرایط آزمایشگاهی نداشت (Sharifi, 2017). بر خلاف نتایج تحقیق حاضر که فراسنجه‌های تولید گاز، عمده فراسنجه‌های تخمیر و گوارش‌پذیری مواد مغذی تحت تأثیر سطح تانن در جیره غذایی قرار نگرفت، در مطالعه‌ای نشان داده شد که تانن‌ها با تشکیل کمپلکس با مواد مغذی از قبیل کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، غشای سلولی باکتری و

آنزیم‌های هاضم پروتئین، احتمالاً دسترسی به سوبسترا را برای میکروارگانیسم‌های شکمبه کاهش داده، و لذا سبب کاهش هضم‌پذیری و تولید گاز ناشی از تجزیه‌ی آن‌ها می‌شوند (Sharifi, 2017).

در مطالعه دیگری با فرآوری کنجاله سویا با سطوح ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ گرم در کیلوگرم تانن استخراج شده از تفاله‌ی انگور مشخص شد که فرآوری مذکور سبب کاهش ۱۱-۴/۵ درصدی تولید گاز به روش آزمایشگاهی شد (Alipour & Rouzbehan, 2010). دلیل اختلاف بین نتایج پژوهش حاضر با سایر تحقیقات احتمالاً ناشی از نوع جیره غذایی، نوع و نیز سطح تانن استفاده شده در جیره باشد. در پژوهش حاضر، افزودن تانن به جیره غذایی بازدهی مورد استفاده قرار گرفتن نیتروژن جیره را افزایش داد، زیرا سبب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی و افزایش توده میکروبی شد. کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه احتمالاً می‌تواند ناشی از باند شدن و محافظت پروتیئن‌های جیره‌ای از پروتئولیز شکمبه‌ای و عبور آن به بخش‌های پایین‌تر دستگاه گوارش باشد (Sharifi, 2017). این امر از دو جنبه در تغذیه نشخوارکنندگان حائز اهمیت است. اول این که کند نمودن یا کاهش روند تجزیه‌پذیری پروتئین سبب استفاده بهینه از آمونیاک شکمبه جهت حداکثر تولید پروتئین میکروبی می‌شود که در مطالعه حاضر این اتفاق رخ داد (جدول ۳).

جدول ۲. اثر سطوح مختلف تانن‌های متراکم (Silvafeed) بر فراسنجه‌های تولید گاز جیره‌های آزمایشی توسط مخلوط میکروارگانیسم‌های شکمبه گاوهای شیری خشک

Table 2. Effect of different levels of condensed tannins (Silvafeed) on *in vitro* gas production parameters of experimental diets using mixed ruminal microorganisms of dried dairy cows

	Level of Silvafeed in the diet (g/kg DM)				SEM[8]	Contrast	
	0	0.45	0.90	1.35		Linear	Quadratic
GP_{16}[1]	45.4	44.4	44.6	43.6	1.10	0.32	0.91
GP_{24}[2]	56.3	56.5	56.9	54.6	0.94	0.29	0.21
GP_{48}[3]	65.1	64.5	64.9	62.4	1.11	0.17	0.41
GP_{72}[4]	72.7	71.8	72.1	70.5	1.29	0.31	0.76
TGP[5]	77.2	76.2	76.1	75.5	1.15	0.31	0.87
b[6]	80.6	78.6	78.9	77.5	1.44	0.12	0.71
c[7]	0.063	0.057	0.059	0.056	0.003	0.21	0.61

۱. حجم گاز تولیدی پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون (میلی‌لیتر به ازای ۲۵۰ میلی‌گرم ماده خشک)، ۲. حجم گاز تولیدی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (میلی‌لیتر به ازای ۲۵۰ میلی‌گرم ماده خشک)، ۳. حجم گاز تولیدی پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون (میلی‌لیتر به ازای ۲۵۰ میلی‌گرم ماده خشک)، ۴. حجم گاز تولیدی پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون (میلی‌لیتر به ازای ۲۵۰ میلی‌گرم ماده خشک)، ۵. کل حجم گاز تولیدی پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون (میلی‌لیتر به ازای ۲۵۰ میلی‌گرم ماده خشک)، ۶. پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر به ازای ۲۵۰ میلی‌گرم ماده خشک)، ۷. نرخ تولید گاز (درصد در ساعت)، ۸. خطای استاندارد میانگین‌ها.

1. *In vitro* gas production (IVGP) for 16 h (ml/250 mg DM); 2. IVGP for 24 h (ml/20 mg DM); 3. IVGP for 48 h (ml/250 mgDM); 4. IVGP for 72 h (ml/250 mg DM); 5. Total gas production for 96 h (ml/ 250 mg DM); 6. Gas production from the insoluble but fermentable fractions for 96 h (ml/250 mg DM); 7. Rate constant of gas production during incubation (/h); 8. Standard error of the means.

جدول ۳. اثر سطوح مختلف تانن‌های متراکم (Silvafeed) بر فراسنجه‌های تخمیر جیره‌های آزمایشگاهی توسط مخلوط میکروارگانیسم‌های شکمبه گاوهای شیری خشک

Table 3. Effect of different levels of condensed tannins (Silvafeed) on fermentation parameters of experimental diets using mixed ruminal microorganisms of dried dairy cows

	Level of Silvafeed in the diet (g/kg DM)				SEM[7]	Contrast	
	0	0.45	0.90	1.35		Linear	Quadratic
SCFA[1]	4.01	3.92	3.94	3.85	0.098	0.33	0.97
IVDMD[2]	66.1	65.3	65.5	65.1	0.54	0.30	0.67
IVOMD[3]	66.8	65.9	66.2	66.1	0.53	0.48	0.43
ME[4]	7.34	7.25	7.28	7.32	0.073	0.92	0.41
pH	6.21	6.29	6.30	6.29	0.038	0.16	0.26
NH_3-N[5]	17.7	17.2	16.6	15.1	0.74	0.02	0.49
MPS[6]	65.3	67.1	82.3	76.3	2.06	0.01	0.11

۱. اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول به ازای گرم ماده خشک)، ۲. ناپدید شدن ماده خشک (درصد)، ۳. ناپدید شدن ماده آلی (درصد)، ۴. برآورد انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)، ۵. نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)، ۶. سنتز پروتئین میکروبی (میلی‌گرم در ۲۵۰ میلی‌گرم ماده خشک)، ۷. خطای استاندارد میانگین‌ها.

1. Short chain fatty acids (mmol/g DM); 2. *In vitro* dry matter disappearance (%); 3. *In vitro* organic matter disappearance (%); 4. Estimated metabolizable energy (MJ/kg DM); 5. Ammonia nitrogen (mg/dl); 6. Microbial protein synthesis (mg/250mg DM); 7. Standard error of means.

کاهش فعالیت پروتئازی شکمبه و افزایش سنتز پروتئین میکروبی نتایج فوق را تأیید می‌کند (جدول۳). نکته دوم این که با انتقال بخشی از پروتئین قابل تجزیه در شکمبه به صورت کمپلکس تانن-پروتئین به روده باریک، ممکن است بخشی از احتیاجات پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه نیز تأمین شده و این نیاز به پروتئین غیر قابل تجزیه جیره را در گاوهای شیری کاهش دهد. مطابق با نتایج مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای که اثرات کنجاله سویا تیمار شده با تانن استخراج شده از پوست پسته روی روی عملکرد رشد و فراسنجه‌های شکمبه‌ای گاوهای نر پروار هلشتاین انجام شده بود (Jolazadeh *et al.*, 2015)، با مصرف کنجاله سویا مکمل شده با تانن تا سطح ۱۵ درصد ماده خشک میزان نیتروژن آمونیاکی شکمبه و کل جمعیت پروتوزوای شکمبه در مقایسه با تیمار شاهد به صورت خطی کاهش یافت، اما آن تأثیری روی غلظت اسیدهای چرب فرار نداشت. در کل، اثرات سودمند تغذیه تانن‌ها به‌ویژه در کاهش نرخ تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه و افزایش میزان تأمین اسیدهای آمینه پس از شکمبه‌ای در حیوان میزبان توسط محققان بسیاری گزارش شده است (Abarghuei *et al.*, 2014).

فعالیت آنزیمی

با توجه به نتایج جدول ۴، فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز و فعالیت تجزیه کاغذ صافی تحت تأثیر مکمل سازی جیره با مکمل تاننی قرار نگرفت (P>۰/۰۵). اما فعالیت پروتئازی شکمبه با افزایش سطح تانن در جیره به طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵).

فعالیت آنزیم‌های میکروبی انعکاس کیفی از میکروب‌های دخیل در هضم خوراک بوده و این کمپلکس میکروبی شکمبه شامل آنزیم‌هایی است که به صورت همکوش عمل می‌کنند (Russel, 2002). به منظور بررسی فعالیت میکروبی شکمبه، تعیین وضعیت آنزیم‌های هیدرولیتیک در این اکوسیستم یکی از فراسنجه‌های با اهمیت به‌شمار می‌رود، زیرا این آنزیم‌ها نشان‌دهنده میزان حضور میکروب‌های تجزیه‌کننده الیاف هستند (Silva *et al.*, 1987). تجزیه مؤثر خوراک در شکمبه نیازمند وجود کمپلکس کاملی از آنزیم‌های مختلف است و این امر اهمیت شناخت فعالیت آنزیمی در شکمبه دام را نشان می‌دهد (Selinger *et al.*, 1996).

در مطالعه حاضر، همانند گوارش‌پذیری مواد مغذی، افزودن مکمل سیلوافید به جیره تأثیری بر فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک شکمبه نداشت (جدول۳). با توجه به کاهش میزان آمونیاک تولیدی و فعالیت پروتئازی شکمبه به عنوان شاخص میزان تجزیه‌پذیری پروتئین جیره در شکمبه و افزایش همزمان تولید پروتئین میکروبی در نتیجه افزودن مکمل حاوی تانن‌های شاه بلوط می‌توان انتظار داشت که با افزودن این مکمل به جیره‌ی گاوهای شیری می‌توان میزان پروتئین غیرقابل تجزیه جیره را کاهش داد. این امر می‌تواند هزینه تولید جیره را کاهش داده و بازدهی مورد استفاده قرار گرفتن پروتنین جیره را در گاوهای شیری افزایش دهد.

جدول ۴. اثر سطوح مختلف تانن‌های متراکم (Silvafeed) بر فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک (واحد در دقیقه در میلی‌لیتر مایع شکمبه) و پروتئاز شکمبه (میکروگرم در پروتئین هیدرولیز شده در ساعت) جیره‌های آزمایشی توسط مخلوط میکروارگانیسم‌های شکمبه گاوهای شیری خشک

Table 6. Effect of different levels of condensed tannins (Silvafeed) on the activity of fibrolytic enzymes (units/ min/rumen fluid) and rumen protease (µg hydrolyzed protein/h) of experimental diets using mixed ruminal microorganisms of dried dairy cows

	Level of Silvafeed in the diet (g/kg DM)				SEM[4]	Contrast	
	0	0.45	0.90	1.35		Linear	Quadratic
CMCase[1]	6.79	5.61	5.76	5.69	0.56	0.24	0.34
MCCase[2]	3.95	3.48	3.70	3.44	0.53	0.59	0.84
FPD[3] activity	15.2	13.9	15.8	15.5	0.77	0.37	0.61
Protease	74.7	70.8	52.2	50.3	5.19	<0.01	0.86

۱. کربوکسی متیل سلولاز، ۲. میکروکریستالین سلولاز، ۳. فعالیت تجزیه کاغذ صافی، ۴. خطای استاندارد میانگین‌ها.

1. Carboxymethyl cellulase; 2. Microcrystalline cellulase; 3. Filter paper-degrading activity; 4. Standard error of means.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مکمل نمودن جیره بره پرواری در شرایط برون‌تنی با تانن‌های متراکم شاه بلوط (Silvafeed) تا سطح ۰/۹ گرم در کیلوگرم ماده خشک، بدون اثر منفی بر تولید گاز و گوارش‌پذیری مواد مغذی سبب کاهش فعالیت پروتئازی شکمبه و افزایش تولید پروتئین میکروبی شد. هرچند، انجام مطالعات بیشتر به خصوص با استفاده از دام زنده جهت تأیید یافته‌های حاضر ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه لرستان به‌خاطر تأمین مالی این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abarghuei, M. J., Rouzbehan, Y., Salem, A. Z. M. & Zamiri, M. J. (2014). Nutrient digestion, ruminal fermentation and performance of dairy cows fed pomegranate peel extract. *Livestock Science*, 157, 452-461.
2. Aerts, R. J., Barry, T. N. & McNabb, W. C. (1999). Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. Agriculture, Ecosystems and Environment, 75, 1-12.
3. Agarwal, N., Agarwal, I., Kamra, D. N. & Chaudhary, L. C. (2000). Diurnal variations in the activities of hydrolytic enzymes in different fractions of rumen contents of Murrah buffalo. *Journal of Applied Animal Research*, 18, 73-80.
4. Agricultural and Food Research Council, (1992). *Technical committee on responses of nutrients*, Report No 9. *Nutritive requirements of ruminant animal: Protein. Nutrition Abstract and Review. Series b*, 62(12), 787-835, CAB International, Wallingford, Oxon.
5. Alipour, D. & Rouzbehan, Y. (2010). Effects of several levels of extracted tannin from grape pomace on intestinal digestibility of soybean meal. *Livestock Science*, 128, 87-91.
6. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
7. Bhatta, R., Krishnamoorthy, U. & Mohammed, F. (2001). Effect of tamarind (*Tamarindus indica*) seed husk tannins on *in vitro* rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 90, 143-152.
8. Blümmel, M., Karsli, A. & Russell J. R. (2003). Influence of diet on growth yields of rumen micro-organisms *in vitro* and *in vivo*: Influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. *British Journal of Nutrition*, 90, 625-634.
9. Blümmel, M., Steingss, H. & Becker, K. (1997). The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, 77, 911-921.
10. Broderick, G. & Kang, J.H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, 63, 64-75.
11. Dentinho, M., Moreira, O., Pereira, M. & Bessa, R. (2007). The use of tannin crude extract from *Cistus ladanifer* L. to protect soya-bean protein from degradationin the rumen. *Animal*, 1, 645-650.
12. Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J., Fernández Gutiérrez, M. & Mantecón, Á. R. (2000). Digestive utilization of quebracho-treated soya bean meals in sheep. *Journal of Agricultural Science*, 134, 101-108.
13. Getachew, G., Pittrof, W., Putnama, D. H., Dandekar, A., Goyal, S. & DePeters, E. J. (2008). The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on *in vitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Animal Feed Science and Technology*, 140, 444-461.
14. Getachew, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (2002). Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *Journal of Agricultural Science*, 139, 341-352.
15. Jolazadeh, A. R., Dehghan-banadaky, M. & Rezayazdi, K. (2015). Effects of soybean meal treated with tannins extracted from pistachio hulls on performance, ruminal fermentation, blood metabolites and nutrient digestion of Holstein bulls. *Animal Feed Science and Technology*, 203, 33-40.
16. Kumar, R. & Vaithiyanathan, S. (1990). Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 30, 21-38.
17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 262-275.
18. Marten, G. C. & Barnes, R. F. (1980). *Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzymes systems*. In: Pidgen, W. J., Balch, C. C. & Graham, M. (Eds), *Standardization of analytical methodology for feeds*. (pp 61-71.) International Development Research Center, Ottawa.

19. McSweeney, C. S., Palmer, B., McNeill, D. M. & Krause, D. O. (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 83-93.
20. Menke, K. H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
21. Miller, J. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31, 426-429.
22. Russel, J. B. (2002). *Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition*. Russell J.B., Publ. Co., Ithaca, NY.
23. Selinger, L. B., Forsberg, C. W. & Cheng, K. J. (1996). The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe*, 2, 263-284.
24. Sharifi, A. (2017). *Investigation the nutritive value of broiler litter processed with phenolic compounds extracted from pomegranate peel in feeding ruminants*. Ph.D. thesis, Khuzestan Ramin Agriculture and Natural Resources University, Ahvaz, Iran. (in Farsi)
25. Silva, A. T., Wallace, R. J. & Orskov, E. R. (1987). Use of particle-bound microbial activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. *British Journal of Nutrition*, 57, 407-415.
26. Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
27. Vercoe, P. E., Makkar, H. P. S. & Schlink, A. C. (2010). *In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies*. (2nd ed.). Springer Verlag Gmbh.