



Comparison of nutritive value of different protein sources resulting from the reaction of tannins extracted from raisin byproducts with corn-steep liquor in ruminant nutrition

Abolfazl Koolivand¹, Arash Azarfar², Amir Fadayifar³, Ayoub Azizi⁴

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Email: abolfazlkoolivand@gmail.com

2. Corresponding author, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Email: arash.azarfar@gmail.com

3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Email: fadayifar.amir@gmail.com

4. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran. Email: azizi.msc.modares@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	This experiment was designed to determine the nutritive value and estimate the rumen protected-protein level of protonomix and phosphoprotonomix as two new protein sources and compare them with corn-steep liquor as a raw material used for the production of these products. These two powdery products are obtained by separating and drying precipitates produced by reaction of tannins with corn-steep liquor. Tannins and total phenolic compounds contents in raisin-stem extract were 22.37 and 30.07 percent of dry matter, respectively. The insoluble protein in protonomix and phosphoprotonomix were 81.15 and 48.98 percent of crude protein, respectively; while this value was 13.10 percent in corn-steep liquor. Gas production throughout the incubation and potential of gas production were affected by the experimental treatments, so that the highest values were related to the control treatment (corn-steep liquor). All ruminal-fermentation parameters were affected by the experimental treatments, so that the lowest metabolizable energy (ME) and short chain fatty acids (SCFA) and the highest efficiency of microbial protein synthesis (EMPS) and pH belonged to phosphoprotonomix; the lowest amount of in vitro organic matter apparent digestibility (IVOMAD) and microbial protein synthesis (MPS) were related to protonomix; while the highest amount of in vitro truly degraded dry matter (IVTDDM) and ammonia nitrogen (N-NH ₃) and the lowest value of partitioning factor (PF) belonged to the control treatment.
Article history: Received: 21 September 2022 Received: 6 February 2023 Accepted: 8 February 2023 Published online: 23 September 2023	
Keywords: <i>Protonomix,</i> <i>Phosphoprotonomix,</i> <i>By-passed protein,</i> <i>Corn-steep liquor,</i> <i>Raisin by-product tannins.</i>	

Cite this article: Koolivand, A., Azarfar, A., Fadayifar, A., & Azizi, A. (2023). Comparison of nutritive value of different protein sources resulting from the reaction of tannins extracted from raisin byproducts with corn-steep liquor in ruminant nutrition. *Iranian Journal of Animal Science*, 54 (3), 267-287. DOI: <http://doi.org/10.22059/IJAS.2023.348770.653907>



© The Author(s).
DOI: <http://doi.org/10.22059/IJAS.2023.348770.653907>

Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

Nowadays, the price of feed commodities for all animal sectors are raising drastically for several reasons such as drought and international conflicts and disputes. To reduce feed costs and improve profitability, inclusion of agricultural by- or co-products in ruminants' rations has drawn the attention of ruminant nutritionist worldwide. Corn-steep liquor is one of the main by-products of starch production from corn kernel with more the 4000 ton annual production in Iran. Despite its high protein and energy contents, its low pH, liquid form, high viscosity and high soluble protein content hamper its inclusion in ruminants' rations. To avoid such problems, we recently manufactured two products, namely protonomix and phosphoprotonomix, which

are brownish powders produced from precipitation of corn-steep liquor with tannins extracted from raisin by-products. Therefore, the present study aimed to determine the nutritive value and estimate the rumen protected-protein level of *protanomix* and *phosphoprotanomix* as two new protein sources and compare them with corn-steep liquor as a raw material for the production of these products.

Materials and methods

To evaluate the protein sub-fractions of *protanomix* and *phosphoprotanomix*, their protein contents were fractionated according to the Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS). According to CNCPS, protein is partitioned into non-protein nitrogen (A), true protein (B) and bound true protein (C). Based on their rates of degradation in the rumen, fraction PB is further partitioned into three sub-fractions called B1, B2 and B3. Fraction B1 is buffer-soluble protein precipitated by trichloroacetic acid and has a rapid ruminal degradation rate. Fraction B2 is insoluble in buffer but soluble in neutral detergent solution and has an intermediate ruminal degradation rate. Fraction B3 is insoluble in acid detergent but soluble in neutral detergent and has a slow ruminal degradation rate; a large part of it escapes rumen fermentation because of its association with plant cell walls. Acid detergent-insoluble protein (ADICP) is fraction C, which is extremely resistant to degradation by microbial and mammalian enzymes.

In an *in vitro* gas production system samples of corn-steep liquor, *protanomix* and *phosphoprotanomix* were incubated in 100-ml glass vials (7 vials as replicates) with a blend of strained rumen fluid obtained from two ruminally fistulated Lori rams and artificial saliva for 0, 2, 4, 6, 12, 16, 24, 48, 72 and 96 hours under the strict anaerobic condition to determine the kinetics of gas production. To determine rumen fermentation parameters, 16 hours after incubation, 3 vials of 7 vials from each treatment were chosen, their produced gas were recorded. The vials were then placed in the ice to terminate fermentation, and pH was determined immediately using a pH meter. The vials' content were then centrifuged for 20 min at 2000 ×g. The supernatant was used to determine N-NH₃ concentration. The resulting pellet was quantitatively transferred into the three-layer propylene bags, boiled in neutral detergent solution for 2 h, rinsed with distilled water, dried in a forced air oven and weighed to estimate *in vitro* truly degraded dry matter (IVTDDM). Data on IVTDDM and 16 h gas production were then used to estimate partitioning factor (PF), microbial protein synthesis (MPS) and efficiency of microbial protein synthesis (EMPS). Data on gas production after 16 h incubation (ml/200 mg of substrate DM) were used to estimate *in vitro* organic matter apparent digestibility (IVOMAD), metabolizable energy content and short chain fatty acids production.

Results and discussion

The insoluble protein in *protanomix* and *phosphoproteomix* were 81.15 and 48.98 percent of crude protein, respectively; while this value was 13.10 percent in corn-steep liquor. Gas production throughout the incubation and potential of gas production were affected by the experimental treatments, so that the highest values were related to the control treatment (corn-steep liquor). All ruminal-fermentation parameters were affected by the experimental treatments, so that the lowest metabolizable energy (ME) and short chain fatty acids (SCFA) and the highest efficiency of microbial protein synthesis (EMPS) and pH belonged to *phosphoprotanomix*; the lowest amount of *in vitro* organic matter apparent digestibility (IVOMAD) and microbial protein synthesis (MPS) were related to *protanomix*; while the highest amount of *in vitro* truly degraded dry matter (IVTDDM) and ammonia nitrogen (N-NH₃) and the lowest value of partitioning factor (PF) belonged to the control treatment.

Conclusions

The results of current study show that *protanomix* and *phosphoprotanomix* have the potential to be included in ruminant's rations as rumen undegraded protein and phosphorous sources (*phosphoprotanomix*). However, further animal trials are needed to evaluate the feasibility of using these products in practice.

مقایسه‌ی ارزش تغذیه‌ای منابع مختلف پروتئینی حاصل از واکنش تانن‌های استخراج شده از ضایعات کشمش با خیساب ذرت در تغذیه‌ی نشخوارکنندگان

ابوالفضل کولیوند^۱ | آرش آذر فر^۲ | امیر فدایی فر^۳ | ایوب عزیزی^۴

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. رایانامه: abolfazlkoolivand@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. رایانامه: arash.azarfar@gmail.com
۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. رایانامه: fadayifar.amir@gmail.com
۴. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. رایانامه: azizi.msc.modares@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	این آزمایش به منظور تعیین ارزش تغذیه‌ای و تخمین میزان پروتئین عبوری پروتئین‌میکس و فسفوپروتئین‌میکس به عنوان دو منبع جدید پروتئینی و مقایسه‌ی آن‌ها با خیساب ذرت، به عنوان ماده‌ی اولیه‌ی تولید این دو محصول، طراحی شده است. این دو فرآورده‌ی پودری شکل، از جداسازی و خشک کردن رسوبات ناشی از واکنش تانن‌ها با خیساب ذرت حاصل می‌شوند. مقدار تانن و کل ترکیبات فنلی عصاره‌ی تاننی استخراج شده از پوش کشمش به ترتیب ۲۲/۳۷ و ۳۰/۰۷ درصد ماده‌ی خشک بود. پروتئین نامحلول در پروتئین‌میکس و فسفوپروتئین‌میکس به ترتیب ۸۱/۱۵ و ۴۸/۹۸ درصد از پروتئین خام بود، در صورتیکه این عدد در خیساب ذرت ۱۳/۱ درصد است. تولید گاز در طی انکوباسیون و قابلیت تولید گاز آزمایشگاهی، تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت به نحوی که، بیشترین مقادیر، مربوط به تیمار شاهد (خیساب ذرت) بود. همه‌ی پارامترهای تخمیر شکمبه‌ای، از تیمارهای آزمایشی متأثر شدند به طوری که کمترین مقدار انرژی قابل متابولیسم (ME) و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA) و بیشترین مقدار بازده تولید پروتئین میکروبی (EMPS) و pH به فسفوپروتئین‌میکس تعلق گرفتند؛ کمترین مقدار قابلیت هضم ظاهری آزمایشگاهی ماده‌ی آلی (IVOMAD) و تولید پروتئین میکروبی (MPS) به پروتئین‌میکس مربوط شدند؛ و بیشترین مقدار تجزیه‌پذیری واقعی برون تنی ماده‌ی خشک (IVTDDM) و نیتروژن آمونیاکی (N-NH ₃) و کمترین مقدار ضریب تفکیک (PF) هم به تیمار شاهد تعلق گرفتند.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۳۰	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۱/۱۷	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۹	
تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱	
کلیدواژه‌ها: پروتئین‌میکس، فسفوپروتئین‌میکس، پروتئین عبوری، خیساب ذرت، تانن‌های ضایعات کشمش.	

استناد: کولیوند، ابوالفضل؛ آذر فر، آرش؛ فدایی فر، امیر؛ و عزیزی، ایوب (۱۴۰۲). مقایسه‌ی ارزش تغذیه‌ای منابع مختلف پروتئینی حاصل از واکنش تانن‌های استخراج شده از ضایعات کشمش با خیساب ذرت در تغذیه‌ی نشخوارکنندگان. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۴ (۳)، ۲۴۷-۲۸۷.

DOI: <http://doi.org/10.22059/IJAS.2023.348770.653907>



© نویسندگان.

DOI: <http://doi.org/10.22059/IJAS.2023.348770.653907>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

یکی از بخش‌های پرهزینه در جیره‌ی غذایی نشخوارکنندگان، منابع پروتئینی بوده که به دلیل تبدیل بخشی از نیتروژن آن‌ها طی هضم میکروبی به آمونیاک، بازده متابولیسمی مطلوبی ندارند (Abarghuei & Ruzbehan, 2014). لذا یکی از اهداف کنترل تخمیر مواد مغذی در شکمبه، محدود نمودن فعالیت میکروارگانیسم‌ها، صرفاً به تجزیه‌ی ترکیباتی از جیره است که آنزیم‌های گوارشی پس از شکمبه‌ای، قادر به هضم آنها نمی‌باشد (Azarfar *et al.*, 2020b). مخصوصاً اگر سرعت تجزیه‌ی پروتئین‌ها در شکمبه بیشتر از سرعت سنتز آن‌ها باشد، هر چند بخشی از آمونیاک تولیدی به شکل اوره و از طریق بزاق یا دیواره‌ی شکمبه بازیافت می‌شود، اما قسمت بیشتر آن، از طریق ادرار دفع گردیده که منجر به تحمیل هزینه‌ی انرژی و همچنین اثرات منفی بر سلامت، کیفیت پروتئین شیر، عملکرد تولیدی و تولید مثل دام شده و ضمناً بروز مشکلات زیست محیطی را نیز به دنبال خواهد داشت (Olmos Colmenero & Broderick, 2006). بررسی جیره‌های کاربردی گاو‌داری‌ها نشان می‌دهد که در بیشتر جیره‌ها میزان پروتئین عبوری از شکمبه حدوداً ۳۵ درصد پروتئین خام بوده که عملاً از سطح توصیه شده برای این شاخص (۴۵ تا ۵۰ درصد)، فاصله‌ی قابل ملاحظه‌ای دارد؛ از این رو استفاده از منابع خوراکی با پروتئین عبوری بیشتر، از راهبردهای مؤثر تغذیه‌ای برای افزایش تولید و عملکرد دام‌ها می‌باشد (Savari *et al.*, 2017).

مشخص شده است که تانن‌ها می‌توانند مانع از تجزیه‌ی میکروبی پروتئین‌ها در شکمبه شوند (Patra, 2012). این ترکیبات به دو شکل قابل هیدرولیز و متراکم در عصاره‌ی برخی گیاهان یافت شده و به واسطه‌ی گروه‌های هیدروکسیل فنلی خود، به شدت قادر به ایجاد کمپلکس و تشکیل رسوب با پروتئین‌ها و به میزان کمتری با پلی‌ساکاریدها، اسیدهای نوکلئیک و یون‌های فلزی می‌باشند (Vermeris & Nicholson, 2008). تانن‌های قابل هیدرولیز می‌توانند تحت تأثیر آنزیم‌های محیط شکمبه تجزیه شده و پس از جذب، به آسیب‌های سلولی منجر شوند؛ در مقابل، تانن‌های متراکم از استحکام مولکولی قوی برخوردار بوده و قابلیت هیدرولیز و جذب در دستگاه گوارش را ندارند (Combs, 2016).

انگور یکی از محصولات کشاورزی غنی از تانن بوده که محتوای تاننی آن عمدتاً از نوع متراکم می‌باشد (Alipour *et al.*, 2010)؛ از این رو، شهر جهانی انگور، ملایر، با تولید سالانه‌ی حدود ۲۵۰۰۰۰ تن انگور، بستر بسیار مناسبی برای تحقیقات مربوط به تانن و انگور است. اکثر باغ‌داران شهرستان ملایر به منظور تولید کشمش، انگور را در هوای آزاد و مجاورت آفتاب خشک نموده و معمولاً ساقه‌ی اصلی خوشه‌های انگور را، قبل از تحویل کشمش به کارخانه، جدا کرده و دور می‌ریزند. به این ترتیب ضایعات کشمش تولید شده در این کارخانه‌ها به مقدار تقریبی ۷۰۰۰ تن در سال، شامل پوش یا همان ساقه‌چه‌های خوشه‌ی انگور، کشمش‌های پوک و واژه، دم کشمش و شکرک بوده (Tabatabaei *et al.*, 1991) که به نظر می‌رسد از ارزش بسیار بالایی، جهت استخراج تانن برخوردار هستند.

از طرف دیگر، به منظور کاهش هزینه‌ی تغذیه و بهبود سودآوری، استفاده و بهره‌برداری از پسماندها و تولیدات جانبی محصولات کشاورزی در تغذیه‌ی نشخوارکنندگان از اهمیت بالایی برخوردارند (Azarfar *et al.*, 2020b). خیساب ذرت (Corn-Steep Liquor) یکی از مهم‌ترین محصولات فرعی کارخانه‌های تولید کننده‌ی نشاسته از دانه‌های ذرت بوده و مقدار تولید آن در ایران، بیش از ۴۰۰۰ تن در سال می‌باشد. این پسماند صنعتی طی مرحله‌ی خیساندن ذرت، جهت استحصال نشاسته، تولید گلوکز مایع و استخراج روغن، ایجاد شده و معمولاً از طریق حرارت و تبخیر آب، تغلیظ می‌گردد و به شیرابه‌ای چسبناک به رنگ قهوه‌ای تیره و با محتوای پروتئین خام بالا، که اسیدیته‌ی آن در حدود ۴ است تبدیل می‌شود. مقدار کربوهیدرات‌های غیر فیبری و پروتئین خام در این پسماند صنعتی به ترتیب حدود ۴۰ و ۴۲ درصد ماده‌ی خشک بوده که تقریباً ۹۰ درصد از محتوای پروتئینی آن به شکل محلول (Soluble protein) و باقیمانده‌ی آن به صورت نامحلول (Insoluble protein) است (Azizi *et al.*, 2016). اسیدیته‌ی پائین، حالت فیزیکی مایع، چسبناکی و مقدار پروتئین محلول بالا، از جمله معایب این محصول

۱. شکرک شامل بخش‌های ریزی از گوشت و پوست کشمش است که در کارخانه‌های کشمش، همزمان با جدا کردن ضایعات و درجه‌بندی کشمش‌ها، حاصل می‌گردد.

جانبی ارزشمند بوده که استفاده‌ی مستقیم از آن، در ترکیب جیره‌ی نشخوارکنندگان را با محدودیت‌های زیادی مواجه نموده است. علاوه بر این، خیساب ذرت به خاطر حضور ترکیبات جاذب رطوبت، با روش‌های مرسوم یعنی حرارت دادن و یا قرار دادن در مجاورت آفتاب، به طور کامل خشک نمی‌شود و حتی خشک کردن آن با دستگاه خشک کن پاششی (Spray dryer) موقتی بوده، یعنی پودر تولید شده جاذب رطوبت هوا بوده، به طوری که بعد از گذشت چند ساعت به یک ترکیب نیمه جامد غلیظ و چسبنده تبدیل می‌شود (Azarfar *et al.*, 2020b).

جهت رفع مشکلات مربوط به استفاده‌ی مستقیم خیساب ذرت در تغذیه‌ی دام و همچنین به منظور تولید منابع پروتئینی با سطح بالای پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه، اخیراً منبع پروتئینی جدیدی به نام پروتانومیکس با استفاده از دو محصول جانبی خیساب ذرت و ضایعات کشمش تولید شده است. فسفوپروتانومیکس نیز محصول پروتئینی دیگری در این راستا بوده که در تحقیق حاضر مورد مطالعه قرار گرفته است. پروتانومیکس پودری قهوه‌ای رنگ بوده و از واکنش بین مایع خیساب ذرت و تانن‌های استخراج شده از ضایعات کشمش، جداسازی رسوب ناشی از باند شدن ترکیبات واکنش‌پذیر با تانن‌ها، از جمله پروتئین‌های محلول، کربوهیدرات‌ها و مواد معدنی؛ آگیری و در نهایت خشک کردن رسوب تشکیل شده، حاصل می‌شود (Azarfar *et al.*, 2020b). در این مطالعه، با دخالت در pH واکنش بین تانن و خیساب ذرت با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم، میزان رسوب تشکیل شده به مقدار چشمگیری افزایش یافته و محصول دیگری با ترکیب شیمیایی متفاوت به نام فسفوپروتانومیکس تولید شده است. بنابراین هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی آزمایشگاهی و تعیین ارزش غذایی پروتانومیکس و فسفوپروتانومیکس، تخمین میزان پروتئین عبوری این دو منبع جدید پروتئینی و مقایسه‌ی آن‌ها با یکدیگر می‌باشد.

روش‌شناسی پژوهش

تولید خیساب ذرت رسوب داده شده با تانن

خیساب ذرت مورد نیاز در این مطالعه از کارخانه‌ی گلکوزان واقع در شهرستان قزوین تهیه گردید. پسماند مذکور یکی از محصولات جانبی فرآیند آسیاب مرطوب دانه‌های ذرت می‌باشد. طی این فرآیند دانه‌ی ذرت به مدت ۴۸ ساعت در دیگ‌های بزرگ محتوی آب با دمای ۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و مقادیر اندک دی‌اکسید گوگرد به منظور تجزیه‌ی پیوندهای دی‌سولفید و تخریب ماتریکس درون‌دانه‌ی ذرت (endosperm)، جهت تسهیل در جداسازی نشاسته از پروتئین محلول، صورت می‌گیرد. در پایان مرحله‌ی خیساندن، ماتریکس پروتئین ضعیف می‌شود و پروتئین محلول درون‌دانه و برخی دیگر از ترکیبات مغذی محلول در آب، وارد این مایع شده به طوری که این محصول فرعی، غنی از آمینواسیدها، مواد معدنی، ویتامین‌ها، کربوهیدرات‌ها و سایر عناصر مغذی دیگر می‌شود. در ادامه، مایع خیساب ذرت از طریق صفحات مشبک جدا شده و از طریق حرارت و تبخیر آب، تا رسیدن به ماده‌ی خشک تقریبی ۵۰ درصد، تغلیظ می‌گردد که ترکیب شیمیایی آن بر اساس ماده‌ی خشک عبارت است از: پروتئین خام، ۴۲ درصد؛ پروتئین محلول، ۳۶/۵ درصد؛ پروتئین نامحلول، ۵/۵ درصد؛ الیاف نامحلول در شوینده‌ی خنثی، ۰ درصد؛ الیاف نامحلول در شوینده‌ی اسیدی، ۰ درصد؛ چربی خام، ۱/۳ درصد و خاکستر خام، ۱۱/۱ درصد (Azizi *et al.*, 2016).

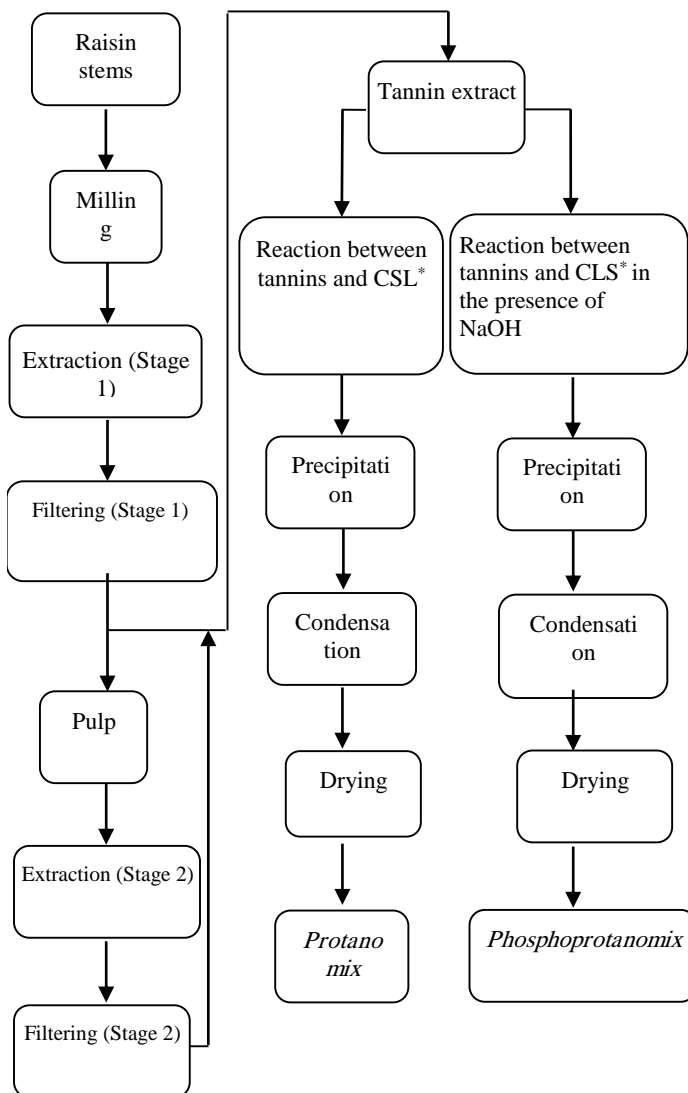
استخراج تانن

برای تهیه‌ی عصاره‌ی تاننی مورد نیاز، فقط از پوش کشمش، یعنی ساقه‌های خشک شده‌ی خوشه‌ی انگور موجود در ضایعات کارخانه‌های کشمش، استفاده شد. پوش کشمش توسط آسیاب چکشی در ۳ مرحله، به ترتیب با استفاده از الک‌های با منافذ ۶، ۴ و ۲ میلی‌متر، آسیاب گردید. استخراج عصاره‌ی تاننی با استفاده از آب به عنوان حلال استخراج کننده، به مقدار ۱۵ برابر وزن پوش کشمش، در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و مخلوط نمودن به مدت ۲۴ ساعت در یک دستگاه میکسر مجهز به هیتر و

ترموستات انجام شد. در مرحله ی صاف کردن که به منظور جداسازی عصاره از تفاله انجام می شود، از الکی با قطر منافذ ۰/۵ میلی متر استفاده شد. در ادامه، مرحله ی استخراج تانن برای بار دوم ولی به مدت ۸ ساعت، روی تفاله ی باقی مانده تکرار شد و در نهایت عصاره ی مرحله ی اول و دوم با یکدیگر مخلوط گردید (Azarfar *et al.*, 2020a).

تولید پروتائومیکس و فسفو پروتائومیکس

به منظور به دست آوردن پروتائومیکس و فسفو پروتائومیکس از روش (Azarfar *et al.*, 2020b) استفاده شد. جهت تولید پروتائومیکس، عصاره ی تاننی پوش کشمش به همان شکل رقیق استخراج شده (ماده ی خشک تقریبی ۲/۵ درصد)، به نسبت وزنی ۴ به ۱، به خیساب ذرت اضافه گردید. پس از انجام واکنش بین تانن و ترکیبات واکنش پذیر با آن، مخلوط حاصل به دو فاز جداگانه، یعنی ترکیبات باند شده با تانن، به شکل غیر محلول یعنی رسوب شده در قسمت زیرین، و ترکیبات باند نشده با تانن، به صورت محلول و روشناور تبدیل گردید. در ادامه، محلول روشناور جدا شده و سپس بخش رسوب کرده یا همان فاز زیرین، در کیسه های تترونی به مدت ۱۲ ساعت آبیگری شدند و در مجاورت هوا خشک و در نهایت آسیاب گردیدند. برای تولید فسفو پروتائومیکس، پس از مخلوط کردن تانن و خیساب ذرت به نسبت مذکور، با افزودن ۲۵۰-۳۰۰ سی سی هیدروکسید سدیم ۵ مولار، به ازای هر کیلوگرم خیساب ذرت، pH سوسپانسیون موجود، به ۹/۵ افزایش داده شد (Azarfar *et al.*, 2020b).



شکل ۲. واکنش رسوب دهی بین تانن‌ها و خیساب ذرت

Figure 2-precipitation reaction between tannins and corn steep liquor

شکل ۱. شمای عملیاتی استخراج تانن، تولید پروتائومیکس و فسفو پروتائومیکس

Figure 1- Flowchart of tannin extraction, production of protanomix and phosphoprotanomix
* Corn steep liquor

ارزشیابی پروتئین با استفاده از سیستم گریهیدرات و پروتئین خالص گرنل (CNCPS):

برای اندازه‌گیری بخش‌های مختلف پروتئین، ابتدا نمونه‌ی مورد نظر با استفاده از آسیاب چکشی، با الک دارای منافذ ۰/۵ میلی‌متری، آسیاب شده و برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد. برای تعیین نیتروژن غیرپروتئینی (Non Protein Nitrogen) یا همان بخش A و رسوب دهی آن، از تانگستیک اسید استفاده گردید. از آنجایی که نیتروژن غیرپروتئینی توسط محلول اسید تانگستیک شسته شده و در فاز مایع وارد می‌شود، این بخش، از اختلاف کل نیتروژن به صورت پروتئین خام و میزان نیتروژن رسوب کرده به صورت پروتئین حقیقی، محاسبه شد. تعیین مقدار پروتئین محلول (بخش‌های A و B₁) با استفاده از بافر بورات فسفات انجام گرفت. پروتئین محلول با کسر کردن میزان پروتئین نامحلول در بافر، از کل پروتئین خام محاسبه شد و پروتئین حقیقی محلول (بخش B₁) نیز از کم کردن بخش نیتروژن غیر پروتئینی، از نیتروژن محلول در بافر (Buffer Soluble Nitrogen) برآورد گردید. برای تخمین مقادیر بخش B₃ و C از تعیین نیتروژن نامحلول در شوینده‌ی خنثی (Neutral Detergent Insoluble Nitrogen)، و نیتروژن نامحلول در شوینده‌ی اسیدی (Acid Detergent Insoluble Nitrogen) استفاده شد. نیتروژن نامحلول در شوینده‌ی اسیدی، به عنوان بخش C و تفاوت بین نیتروژن نامحلول در شوینده‌ی خنثی و نیتروژن نامحلول در شوینده‌ی اسیدی هم به عنوان بخش B₃ در نظر گرفته شد. بخش B₂ پروتئین خام، به روش تفاوت محاسبه گردید (Licitra et al., 1996) (رابطه‌های ۱ تا ۵).

$$\text{رابطه‌ی (۱)} \quad A = \text{NPN}$$

$$\text{رابطه‌ی (۲)} \quad B_1 = \text{BSN} - \text{NPN}$$

$$\text{رابطه‌ی (۳)} \quad B_2 = \text{CP} - (A + B_1 + B_3 + C)$$

$$\text{رابطه‌ی (۴)} \quad B_3 = \text{NDIN} - \text{ADIN}$$

$$\text{رابطه‌ی (۵)} \quad C = \text{ADIN}$$

در روابط بالا بخش A، نیتروژن غیر پروتئینی؛ B₁، پروتئین حقیقی با تجزیه پذیری سریع؛ B₂، پروتئین حقیقی با تجزیه پذیری متوسط؛ B₃، پروتئین حقیقی با تجزیه پذیری کند؛ C، پروتئین حقیقی غیر قابل تجزیه؛ BSN، نیتروژن محلول در بافر؛ CP، پروتئین خام؛ NDIN، نیتروژن نامحلول در شوینده‌ی خنثی و ADIN، نیتروژن نامحلول در شوینده‌ی اسیدی است.

دام‌ها و تیمارهای آزمایشی

به منظور انجام آزمون تولید گاز، از دو رأس گوسفند نر نژاد لری مجهز به فیستولای شکمبه‌ای، به عنوان دهنده‌ی مایع شکمبه استفاده شد. ترکیب جیره‌ی غذایی استفاده شده برای این دام‌ها شامل ۱۲ درصد یونجه، ۵۴ درصد کاه گندم، ۷ درصد سبوس گندم، ۸ درصد دانه‌ی جو، ۱۷ درصد تفاله‌ی چغندر به همراه ملاس، ۱ درصد مکمل معدنی و ویتامینی، ۰/۵ درصد نمک و ۰/۵ درصد آنزیمیت بود که طبق جداول احتیاجات غذایی نشخوارکنندگان کوچک (NRC, 2007) تنظیم شده و در دو وعده‌ی صبح و عصر، در سطح نگهداری در اختیار دام‌ها قرار می‌گرفت. در این مطالعه تیمارهای آزمایشی شامل تیمار شاهد یعنی خیساب ذرت، و دو تیمار دیگر شامل پروتئینومیکس و فسفوپروتئینومیکس می‌باشند.

آزمون تولید گاز برون تنی و تعیین فراسنجه‌های تولید گاز آزمایشگاهی

در این پژوهش، آزمون تولید گاز در سه دوره‌ی جداگانه انجام شد و در هر دوره کارهای زیر انجام گرفت: شیرابه‌ی شکمبه‌ی گرفته شده، در یک فلاسک عایق در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد و سپس توسط چهار لایه پارچه‌ی متقال صاف گردید. به ازای هر تیمار آزمایشی تعداد ۷ تکرار (ویال یا شیشه) در نظر گرفته شد. از نمونه‌های مورد آزمایش با اندازه‌ی ذرات ۱ میلی‌متر، مقدار ۲۵۰ میلی‌گرم بر حسب ماده‌ی خشک به شیشه‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده

شد، سپس هر ویال با مقدار ۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه و ۲۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی تلقیح گردید. پس از بی‌هوازی کردن فضای داخل ویال‌ها توسط دمیدن گاز دی‌اکسیدکربن از طریق کپسول، درب آن‌ها پرس شده و در دستگاه بن‌ماری با دمای ۳۹ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند (Marten & Barnes, 1980). گاز تولیدی هر شیشه توسط فشارسنج دیجیتال در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از شروع انکوباسیون اندازه‌گیری شد. تعداد ۳ ویال که تنها حاوی مایع شکمبه و بزاق مصنوعی بودند به عنوان بلانک در نظر گرفته شدند. داده‌های حاصل از فشار گاز هر شیشه با استفاده از قانون گاز بویل، به حجم تبدیل شدند. حجم خالص تولید گاز هر تکرار در هر زمان از تفاضل گاز تولید شده‌ی هر ویال، از میانگین گاز تولیدی ویال‌های بلانک محاسبه گردید. برای تعیین فراسنجه‌های تولید گاز از رابطه‌ی (۶) استفاده شد (Orskov & McDonald, 1979).

$$p = b(1 - e^{-ct}) \quad \text{رابطه‌ی (۶)}$$

در معادله مذکور P ، میزان گاز تولیدی در زمان مورد نظر (بر حسب میلی‌لیتر)؛ b ، گاز تولیدی از بخش تخمیرپذیر (بر حسب میلی‌لیتر)؛ l ، فاز تأخیر (بر حسب ساعت)؛ e ، ثابت نپر (۲/۷۲)؛ c ، نرخ تولید گاز (بر حسب میلی‌لیتر در ساعت)؛ و t ، زمان انکوباسیون (بر حسب ساعت) می‌باشد.

تعیین فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای

به منظور تعیین فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای، ۱۶ ساعت پس از شروع انکوباسیون، تعداد ۳ ویال از ۷ ویال هر تیمار آزمایشی از روند انکوباسیون خارج گردید. اسیدیته‌ی محتویات این ویال‌ها توسط دستگاه pH متر (مدل ۷۴۴، شرکت Metrohm سوئیس) ثبت شد. سپس محتویات هر ویال به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و به منظور تعیین تجزیه‌پذیری واقعی برون‌تنی ماده‌ی خشک (*In vitro truly degraded dry matter*)، بخش زیرین محتویات هر ویال، جداسازی و خشک گردید. مقدار ۵ میلی‌لیتر از نمونه‌های محلول روشناور، بلافاصله با یک میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط شد و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید تا نیتروژن آمونیاکی نمونه‌ها با استفاده از روش فنول هیپوکلریت اندازه‌گیری شوند (Broderick & kang, 1980).

به منظور تعیین تجزیه‌پذیری واقعی برون‌تنی ماده‌ی خشک، ابتدا بخش زیرین محتویات هر ویال در کیسه‌های پلی‌پروپیلنی سه لایه‌ی Spunbond که قبلاً توزین شده بودند، پلمپ شد. سپس به منظور حذف بقایای میکروبی باقیمانده در روی سطوح ذرات غذایی، این کیسه‌ها به مدت ۲ ساعت در محلول شوینده‌ی خنثی جوشانده شدند و پس از شستشو با آب مقطر و خشک نمودن در آون، وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری و ثبت گردید. تجزیه‌پذیری واقعی برون‌تنی ماده‌ی خشک، ضریب تفکیک (*Partitioning factor*)، تولید پروتئین میکروبی (*Microbial protein synthesis*) و بازده تولید پروتئین میکروبی (*Efficiency of microbial protein synthesis*) با استفاده از رابطه‌های (۷) تا (۱۰) محاسبه شدند (Blümmel *et al.*, 1977).

$$\text{IVTDDM (\%)} = \frac{A(\text{mg}) - B(\text{mg})}{A(\text{mg})} \times 100 \quad \text{رابطه‌ی (۷)}$$

$$\text{PF (mg/ml)} = \frac{\text{IVTDDM (mg)}}{\text{GP (ml)}} \quad \text{رابطه‌ی (۸)}$$

$$\text{MPS (mg)} = \text{IVTDDM (mg)} - [\text{GP (ml)} \times 2.2 \text{ (mg/ml)}] \quad \text{رابطه‌ی (۹)}$$

$$\text{EMPS (\%)} = \frac{\text{MPS (mg)}}{\text{IVTDDM (mg)}} \times 100 \quad \text{رابطه‌ی (۱۰)}$$

در این معادله‌ها IVTDDM، تجزیه‌پذیری واقعی برون‌تنی ماده‌ی خشک؛ A ، مقدار ماده‌ی خشک انکوبه شده؛ B ، مقدار ماده‌ی خشک باقی مانده پس از جوشاندن در محلول شوینده‌ی خنثی؛ PF، ضریب تفکیک؛ GP، حجم گاز تولید شده پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون؛ MPS، تولید پروتئین میکروبی و EMPS بازده تولید پروتئین میکروبی است.

جهت محاسبه‌ی انرژی قابل متابولیسم (*Metabolizable energy*)، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (*Short chain fatty acids*) و قابلیت هضم ظاهری آزمایشگاهی ماده‌ی آلی (*In vitro organic matter apparent digestibility*) از رابطه‌های (۱۱)، (۱۲)

و (۱۳) استفاده شد که در این معادله‌ها میزان تولید گاز، برای ۲۰۰ میلی گرم سوبسترا پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون تصحیح گردید (Menke & Steingass, 1988).

$$\text{ME (Mj/KgDM)} = 2.2 + (0.136 \times \text{GP}) + (0.057 \times \text{CP}) + (0.0029 \times \text{CP} \times \text{CP}) \quad (۱۱)$$

$$\text{SCFA (mmol/200mgDM)} = (0.0222 \times \text{GP}) - 0.00425 \quad (۱۲)$$

$$\text{IVOMAD (\%)} = 14.88 + (0.8893 \times \text{GP}) + (0.448 \times \text{CP}) + (0.651 \times \text{Ash}) \quad (۱۳)$$

در معادله‌های مذکور ME، انرژی قابل متابولیسم بر حسب مگاژول در کیلوگرم ماده‌ی خشک؛ GP، گاز خالص تولیدی برای ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون؛ CP، پروتئین خام بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم ماده‌ی خشک؛ EE، چربی خام بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم ماده‌ی خشک؛ Ash، خاکستر خام بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم ماده‌ی خشک؛ SCFA، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر بر حسب میلی مول بر ۲۰۰ گرم ماده‌ی خشک؛ IVOMAD، قابلیت هضم ظاهری آزمایشگاهی ماده‌ی آلی بر حسب درصد می‌باشد.

اندازه‌گیری تانن و آنالیز شیمیایی نمونه‌ها

کل ترکیبات فنلی با استفاده از معرف فولین شیکالتو اندازه‌گیری شد. ترکیبات فنلی، پس از جذب تانن‌ها توسط پلی‌وینیل-پلی‌پیرولیدون نامحلول، تعیین شد و تانن کل، از کسر ترکیبات فنلی غیرتاننی، از کل ترکیبات فنلی محاسبه گردید (Makkar, 2000).

محتوای ماده‌ی خشک نمونه‌ها با خشک نمودن در آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۳ درجه‌ی سانتی‌گراد، خاکستر خام با سوزاندن در کوره‌ی الکتریکی به مدت سه ساعت در دمای ۵۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، پروتئین خام با روش کج‌لدال و عصاره‌ی اتری توسط دستگاه سوکسله تعیین شد. کربوهیدرات‌های غیر فیبری (Non Fibre Carbohydrates) با استفاده از رابطه‌ی (۱۴) محاسبه شد (AOAC, 1990).

$$\text{NFC} = 100 - (\text{NDF} + \text{CP} + \text{Ash} + \text{EE}) \quad (۱۴)$$

در رابطه‌ی بالا NDF، فیبر نامحلول در شوینده‌ی خنثی؛ CP، پروتئین خام؛ Ash، خاکستر و EE، عصاره‌ی اتری است. الیاف نامحلول در شوینده‌ی خنثی (NDF) و الیاف نامحلول در شوینده‌ی اسیدی (ADF) به روش ون سوست (Van Soest, 1991) تعیین گردید. میزان فسفر موجود در نمونه‌های آزمایشی به روش اسپکتروفتومتری مشخص شد و برای اندازه‌گیری مقدار کلسیم نمونه‌ها، از روش تیتراسیون استفاده گردید (AOAC, 1990).

آنالیز آماری داده‌ها

داده‌های به دست آمده از این آزمایش با استفاده از رویه‌ی GLM نرم افزار SAS، نسخه‌ی 9.2 و مدل آماری طرح کاملاً تصادفی متعادل، به شرح زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

در این معادله Y_{ij} : مقدار عددی هر مشاهده، μ : میانگین کل، T_i : اثر تیمار I ام، و e_{ij} : اثر خطای آزمایش می‌باشد.

یافته‌های پژوهش و بحث

مشخصات عصاره‌ی تاننی استخراج شده

عصاره‌ی استخراج شده از پوش کشمش، پودری قهوه‌ای رنگ بوده که مقدار کل ترکیبات فنلی و تانن آن به ترتیب برابر با ۳۰/۰۷ و ۲۲/۳۷ درصد ماده‌ی خشک است. مقدار ماده‌ی خشک این محصول ۹۴/۵۲ درصد بوده و میزان خاکستر آن هم برابر با ۱۷/۵۰ درصد ماده‌ی خشک می‌باشد.

جدول ۱. ویژگی‌های عصاره‌ی تاننی پوش کشمش

رنگ	حالت فیزیکی	ماده خشک (%)	خاکستر (% ماده خشک)	کل ترکیبات فنولی (% ماده خشک)	تانن (% ماده خشک)
قهوه‌ای	پودر	۹۴/۵۲	۱۷/۵۰	۳۰/۰۷	۲۲/۳۷

اعمال دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد طی فرآیند استخراج، باعث می‌شود که تانن‌های موجود در عصاره‌ی تهیه شده، دستخوش کمترین میزان هیدرولیز گردند که نهایتاً در تولید یک محصول فعال از لحاظ قابلیت واکنش با پروتئین‌ها و سایر ترکیبات واکنش‌پذیر با تانن و در نتیجه تولید رسوب، بسیار تأثیر گذار است؛ زیرا عصاره‌ی تاننی استخراج شده از پوش کشمش در دمای حدود ۱۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و در مدت ۲۴ ساعت، قادر به ایجاد واکنش با پروتئین‌های محلول آب پنیر نبوده و به تولید رسوب نیز منجر نمی‌شود (Azarfar et al., 2020b).

استفاده از دستگاه میکسر به منظور حفظ کامل یکنواختی دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و تکرار فرآیند عصاره‌گیری، منتهی به استخراج حداکثری عصاره‌ی تاننی شده که قابلیت تبدیل شدن به یک پودر غیرجاذب رطوبت را دارا می‌باشد. عصاره‌ی تاننی تهیه شده در شرایط مذکور، به شدت قادر به ایجاد واکنش با مایعات حاوی پروتئین محلول همچون آب پنیر و خیساب ذرت بوده که در نهایت می‌تواند به تشکیل رسوب منجر شود (Azarfar et al., 2020a). طبق آنالیز آزمایشگاهی صورت گرفته، مقدار تانن موجود در پوش کشمش ۸/۶۹ درصد ماده‌ی خشک بوده که این مقدار طی دو بار عصاره‌گیری متوالی به ترتیب به ۴/۲۷ و ۱/۲۱ درصد خواهد رسید. به عبارت دیگر، عصاره‌گیری اول منجر به استخراج حدود ۵۱ درصد از محتوای تاننی پوش کشمش می‌شود در حالی که عصاره‌گیری دوم، این عدد را به ۸۶ درصد خواهد رسانید.

ترکیب شیمیایی پروتانومیکس و فسفوپروتانومیکس

جدول (۲) نتایج آنالیز تقریبی و همچنین محتوای کلسیم و فسفر دو منبع پروتئینی پروتانومیکس و فسفوپروتانومیکس را نشان می‌دهد. ارائه‌ی راهکار حاضر جهت تولید خوراک‌های پروتئینی با سطوح بالای پروتئین عبوری از شکمبه، با ایجاد واکنش بین تانن‌ها و پروتئین‌های محلول و در نهایت جداسازی ترکیبات باند شده با تانن، فرآیندی منحصر به فرد بوده و تا کنون مطالعه‌ی مشابهی به منظور مقایسه با داده‌های جدول (۲) گزارش نشده است. طبق نتایج این جدول، صرفنظر از کربوهیدرات‌های غیر فیبری، تفاوت قابل توجهی در سایر ترکیبات شیمیایی پروتانومیکس و فسفوپروتانومیکس دیده می‌شود که به خوبی اثر شرایط متفاوت فرآیند، بر ترکیب شیمیایی محصولات ناشی از واکنش تانن و خیساب ذرت را نشان می‌دهد ($p < 0.001$).

جدول ۲. ترکیب شیمیایی پروتانومیکس و فسفوپروتانومیکس (درصد ماده خشک)

تیمارها	ماده خشک (درصد)	پروتئین خام	فیبر نامحلول در شوینده خشتی	فیبر نامحلول در شوینده اسیدی	لیگنین نامحلول در شوینده اسیدی	عصاره اتری	خاکستر	کربوهیدرات‌های غیر فیبری	کلسیم	فسفر
پروتانومیکس	۹۷/۳۸	۴۵/۶۱	۶/۰۵	۲/۶۳	۱/۴۱	۵/۸۵	۷/۸۲	۳۴/۶۷	۰/۸۸	۰/۴۷
فسفوپروتانومیکس	۹۱/۴۱	۲۶/۵۶	۱/۶۴	۰/۴۲	۰/۲۱	۰/۸۷	۳۵/۳۴	۳۵/۵۹	۰/۲۹	۷/۵۰

پروتانومیکس به عنوان یک منبع پروتئینی در تغذیه‌ی نشخوارکنندگان، از ایجاد واکنش بین تانن‌های استخراج شده از ضایعات کشمش با ترکیبات واکنش‌پذیر مایع خیساب ذرت و جداسازی آنها، بدون دخالت در اسیدیته‌ی واکنش حاصل می‌گردد. ترکیبات غیر واکنش‌پذیر با تانن که سهم بیشتری از خیساب ذرت شرکت کننده در واکنش را شامل می‌شود، دور ریختنی نبوده و مشکلات زیست محیطی را هم به دنبال نخواهد داشت که پس از تغلیظ با حرارت در تغذیه‌ی دام کاربرد دارد. راندمان فرآیند تولید پروتانومیکس در حدود ۲۰ درصد است؛ یعنی تقریباً ۲۰ درصد ماده‌ی خشک خیساب ذرت شرکت کننده در واکنش رسوب می‌کند. طبق اطلاعات موجود، مقدار رسوب ناشی از واکنش تانن با پروتئین‌های محلول تحت تأثیرات شدید pH قرار دارد (Danesh Mesgaran *et al.*, 2009).

طبق نتایج حاصل از این آزمایش، با افزایش pH محیط واکنش تانن و خیساب ذرت، شاهد افزایش چشمگیری در تولید رسوب تشکیل شده خواهیم بود که اساس تولید فسفوپروتانومیکس می‌باشد. ایجاد واکنش بین عصاره‌ی تاننی پوش کشمش و خیساب ذرت با حضور محلول هیدروکسید سدیم جهت افزایش pH محیط واکنش به ۹/۵، منجر به افزایش حدود ۱۰۰ درصدی محصول نهایی در مقایسه با پروتانومیکس خواهد شد یا به عبارت دیگر در فرآیند تولید فسفوپروتانومیکس، تقریباً ۴۰ درصد از ماده‌ی خشک خیساب ذرت رسوب می‌کند. وجود تفاوت‌ها در مقدار پروتئین خام، خاکستر و میزان فسفر دو منبع پروتئینی پروتانومیکس و فسفوپروتانومیکس، از جنبه‌های تغذیه‌ی دام اهمیت بالاتری نسبت به سایر موارد ذکر شده در جدول (۲) دارد.

همانطور که در این جدول ذکر شده است مقدار پروتئین خام، خاکستر و فسفر موجود در پروتانومیکس به ترتیب برابر با ۴۵/۶۱، ۷/۸۲ و ۰/۴۷ درصد ماده‌ی خشک می‌باشد؛ در حالی که این اعداد برای فسفوپروتانومیکس به ترتیب برابر با ۲۶/۵۶، ۳۵/۳۴ و ۷/۵ درصد می‌باشد. به نظر می‌رسد حضور هیدروکسید سدیم در فرآیند تولید فسفوپروتانومیکس منجر به تشکیل انواعی از نمک‌ها، از جمله نمک‌های فسفر، همچون فیتات سدیم و در نتیجه رسوب آن‌ها در محصول نهایی شده، که افزایش چشمگیر میزان خاکستر و همچنین رقیق شدن محتوای پروتئینی محصول نهایی را در پی خواهد داشت؛ به نحوی که می‌توان فسفوپروتانومیکس را علاوه بر یک منبع پروتئینی، در رده‌ی مکمل‌های تأمین‌کننده‌ی فسفر نیز دسته بندی نمود.

آنالیز پروتئین پروتانومیکس و فسفوپروتانومیکس به روش CNCPS

جدول (۳) بخش‌های تشکیل دهنده‌ی پروتئین خام را در دو منبع پروتئینی پروتانومیکس و فسفوپروتانومیکس، به روش CNCPS (سیستم کربوهیدرات و پروتئین خالص گرنل) نشان می‌دهد. طبق جدول مذکور، مقدار پروتئین محلول و نامحلول پروتانومیکس به ترتیب ۱۸/۸۵ درصد و ۸۱/۱۵ درصد از پروتئین خام است، در صورتی که این اعداد برای فسفوپروتانومیکس به ترتیب ۵۱/۰۲ و ۴۸/۹۸ درصد می‌باشد.

جدول ۳. بخش‌های مختلف پروتئین در پروتانومیکس و فسفوپروتانومیکس به روش سیستم کربوهیدرات و پروتئین خالص گرنل (درصد پروتئین خام)

منبع پروتئین	پروتئین خام	A ^۱	B ^{۱۲}	B ^{۲۳}	B ^{۳۴}	C ^۵	پروتئین محلول	پروتئین نامحلول
پروتانومیکس	۴۵/۶۱	۱۳/۱۲	۵/۷۳	۶۱/۹۹	۵/۱۸	۱۳/۹۸	۱۸/۸۵	۸۱/۱۵
فسفوپروتانومیکس	۲۷/۵۱	۴۹/۲۸	۱/۷۴	۲۱/۹۸	۱۰/۹۷	۱۶/۰۳	۵۱/۰۲	۴۸/۹۸

۱- نیتروژن غیر پروتئینی ۲- پروتئین حقیقی با تجزیه پذیری سریع ۳- پروتئین حقیقی با تجزیه پذیری متوسط ۴- پروتئین حقیقی با تجزیه پذیری کند ۵-

پروتئین حقیقی غیر قابل تجزیه

طبق آزمایشات انجام شده مشخص شد که با قرار دادن پروتانومیکس و فسفوپروتانومیکس در کیسه‌های داکرونی با منافذ متوسط و تکان دادن کیسه‌ها در داخل آب، تقریباً همه‌ی محتویات آنها خارج شده و منجر به تغییر رنگ آب می‌گردید به طوری که تقریباً هیچ مقداری از نمونه‌ی اولیه در کیسه‌ها باقی نمی‌ماند، از این رو ارزیابی محصولات حاضر با روش‌های مبتنی بر

کیسه‌های داکرونی نمی‌توانست به پاسخ صحیح منجر شود؛ لذا در این مطالعه برای تخمین قابلیت هضم روده‌ای منابع پروتئینی مذکور، به استفاده از روش CNCPS بسنده گردید. سیستم CNCPS مدلی است که با استفاده از آن می‌توان میزان تخمیر پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌های مواد خوراکی را محاسبه نمود و میزان عبور پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها را به قسمت‌های پائینی دستگاه گوارش اندازه گرفت (Licitra *et al.*, 1996). طبق اطلاعات موجود، قابلیت هضم روده‌ای آمینواسیدها برای بخش‌های B₁ و B₂، ۱۰۰ درصد و برای بخش B₃، ۸۰ درصد می‌باشد (Sniffen *et al.*, 1992).

طبق نتایج به دست آمده، بیش از ۸۰ درصد پروتئین خام پروتئینومیکس و در حدود ۴۹ درصد از پروتئین خام فسفوپروتئینومیکس، به شکل نامحلول وجود دارد، و این در حالی است که قسمت اعظم این نوع از پروتئین، قابلیت عبور از شکمبه را خواهد داشت. سهم پروتئین نامحلول از کل پروتئین خام خیساب ذرت به عنوان ماده‌ی اولیه‌ی تولید پروتئینومیکس و فسفوپروتئینومیکس، کمتر از ۱۵ درصد پروتئین خام این محصول بوده که این موضوع در مقالات متعدد گزارش شده است (Azizi *et al.*, 2016; Jiriaei *et al.*, 2017; Nisa *et al.*, 2006). در پژوهش حاضر، به داده‌های گزارش شده توسط عزیز و همکاران استناد شده و مقدار پروتئین نامحلول ۱۳/۱ درصد از کل پروتئین خام خیساب ذرت، ملاک محاسبات لازم بوده است (Azizi *et al.*, 2016). در مقابل، افزایشی به ترتیب حدود ۶۸ و ۳۶ درصد در پروتئین نامحلول پروتئینومیکس و فسفوپروتئینومیکس نشان می‌دهد که فرآیند تولید این دو محصول، به منظور عبوری نمودن پروتئین خام خیساب ذرت، در نتیجه‌ی واکنش با تانن‌های استخراج شده از ضایعات کشمش، مخصوصاً در مورد پروتئینومیکس تا حد زیادی موفقیت آمیز بوده است.

مطابق با نتایج این مطالعه، فرآوری کنجاله‌ها با استفاده از ترکیبات تانن‌دار، می‌تواند موجب افزایش بخش عبوری قابل هضم پروتئین آنها در روده شود (Vahdani *et al.*, 2016)، یا گزارش شده که قابلیت هضم پس از شکمبه‌ای کنجاله‌ی سویا با افزودن تانن‌های تفاله‌ی انگور، می‌تواند افزایش یابد (Alipour & Rouzbehan, 2007). به نظر می‌رسد علت اصلی افزایش سهم پروتئین نامحلول از پروتئین خام، در پروتئینومیکس و فسفوپروتئینومیکس، در مقایسه با خیساب ذرت، واکنش تانن‌های موجود در عصاره‌ی تاننی ضایعات کشمش با پروتئین‌های محلول خیساب ذرت و تشکیل سطوح بالای از پروتئین نامحلول در این دو محصول، بخصوص پروتئینومیکس است. طبق اطلاعات جدول (۳)، اختلاف معناداری ($p < 0.001$) در میزان پروتئین نامحلول دو منبع پروتئینی مورد مقایسه، مشاهده می‌گردد. در این مطالعه در مقایسه با پروتئینومیکس، هر چند استفاده از NaOH، افزایش حدود ۱۰۰ درصدی رسوب منجر به تولید فسفوپروتئینومیکس را به دنبال دارد، اما در میزان باند شدن تانن با پروتئین‌های محلول خیساب ذرت، نقش منفی داشته و در نتیجه منجر به کاهش معنادار میزان پروتئین نامحلول فسفوپروتئینومیکس گردیده است. در تأیید این نتایج، اطلاعات نشان می‌دهد که بیشترین میزان رسوب پروتئین توسط تانن‌ها، در pH نزدیک به نقطه‌ی ایزوالکتریک پروتئین، و نه در pH‌های بالا، رخ می‌دهد (Danesh Mesgaran *et al.*, 2009).

فراسنجه‌های تولید گاز

جدول (۴) اثرات پروتئینومیکس، فسفوپروتئینومیکس و خیساب ذرت (تیمار شاهد) را بر فراسنجه‌های تولید گاز آزمایشگاهی نشان می‌دهد. همان طور که در این جدول مشاهده می‌شود تمامی پارامترهای تولید گاز، به استثنای نرخ تولید گاز آزمایشگاهی ($p > 0.05$)، تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفته به نحوی که حجم گاز تولیدی در تمامی زمان‌های انکوباسیون و همچنین قابلیت تولید گاز، در خیساب ذرت (تیمار شاهد) بیشتر از دو تیمار دیگر است ($p < 0.001$).

جدول ۴. فراسنجه‌های تولید گاز ناشی از خیساب ذرت (تیمار شاهد)، پروتانومیکس و فسفوپروتانومیکس

تیمارها	Gp16 ^۱	Gp24 ^۲	Gp48 ^۳	Gp72 ^۴	Gp96 ^۵	b ^۶	c ^۷
	(میلی لیتر)	(میلی لیتر)	(میلی لیتر)	(میلی لیتر)	(میلی لیتر)	(میلی لیتر)	(میلی لیتر در هر ساعت)
خیساب ذرت	۲۸/۶۴ ^a	۳۳/۵۷ ^a	۳۷/۲۱ ^a	۴۰/۰۴ ^a	۴۰/۸۷ ^a	۳۹/۴۴ ^a	۰/۰۹
پروتانومیکس	۲۰/۸۵ ^b	۲۴/۵۲ ^b	۲۷/۵۳ ^b	۲۸/۶۶ ^b	۳۰/۶۸ ^b	۲۸/۷۴ ^b	۰/۱۱
فسفوپروتانومیکس	۱۶/۸۸ ^c	۲۰/۱۸ ^c	۲۲/۹۳ ^c	۲۶/۱۲ ^c	۲۷/۲۸ ^c	۲۵/۳۸ ^c	۰/۰۹
خطای استاندارد		۱/۰۳۲	۱/۰۶۲	۰/۸۲۶	۱/۱۰۶	۰/۷۷۰	۰/۰۱۲
میانگین‌ها	۰/۹۱۲						
سطح معنی داری	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۳۱۸۸

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- حجم گاز آزمایشگاهی تولیدی به ترتیب برای ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون (میلی لیتر) ۶- قابلیت تولید گاز (میلی لیتر) ۷- نرخ تولید گاز (میلی لیتر بر ساعت)

* میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون، دارای اختلاف معنی داری نمی‌باشند ($p > 0.05$).

ارزش تغذیه‌ای مواد خوراکی عمدتاً به واسطه‌ی قابلیت هضم آنها، که مصرف ماده‌ی خشک را تحت تأثیر قرار می‌دهد، تعیین می‌گردد. به دلیل محدودیت‌های موجود، برای انجام مطالعات روی موجودات زنده (in vivo)، قابلیت هضم مواد خوراکی می‌تواند با استفاده از روش‌های بیولوژیکی همچون تکنیک اندازه‌گیری گاز، که در واقع شبیه‌سازی مراحل هضمی هستند، تخمین زده شود. روش تولید گاز به دلیل مزایای آن در تعیین کنتیک تخمیر، به میزان زیادی جهت ارزیابی ارزش غذایی خوراک‌ها استفاده می‌شود. این روش، در مقایسه با روش استفاده از کیسه‌های نایلونی (in sacco)، در ارزیابی اثرات تانن، کارآمدتر می‌باشد. در روش کیسه‌های نایلونی، ترکیباتی همچون تانن، آزاد شده و از کیسه خارج می‌گردد و در نتیجه تأثیری بر ماده‌ی خوراکی موجود در کیسه نخواهد داشت (Danesh Mesgaran *et al.*, 2009).

مطالعات زیادی، کاهش میزان تولید گاز آزمایشگاهی را در نتیجه‌ی استفاده از مواد خوراکی حاوی تانن گزارش نموده‌اند. نشان داده شده است که اسپرس فرآوری شده با محلول اوره به منظور کاهش اثرات تانن، در مقایسه با اسپرس فرآوری نشده، دارای قابلیت تولید گاز بالاتری بوده است (Chaji *et al.*, 2015). در پژوهش دیگری، افزودن پلی‌اتیلن‌گلیکول به ضایعات کشمش جهت تقلیل اثرات تانن، منجر به افزایش تولید گاز و پارامترهای وابسته به آن گردیده است که به اثر مثبت پلی‌اتیلن-گلیکول در کاهش مهار فعالیت میکروبی شکمبه برمی‌گردد (Alipour & Rouzbeha., 2007). در واقع، توانایی کاستن میزان گاز تولیدی، در نتیجه‌ی استفاده از مواد حاوی تانن، بخصوص تانن‌های متراکم، به باند شدن آن‌ها با مواد مغذی خوراک از جمله پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و مواد معدنی و همچنین مهار فعالیت میکروبی شکمبه مربوط می‌شود. لذا به نظر می‌رسد مقدار گاز تولیدی پائین‌تر پروتانومیکس و فسفوپروتانومیکس، در مقایسه با خیساب ذرت به توانایی باند شدن تانن‌ها با مواد مغذی و مهار فعالیت میکروبی شکمبه برمی‌گردد. همان‌طور که در جدول (۴) مشاهده می‌شود، تیمار فسفوپروتانومیکس نسبت به پروتانومیکس، در قابلیت تولید گاز آزمایشگاهی و همه‌ی زمان‌های مختلف انکوباسیون مقادیر کمتری را به خود اختصاص داده است ($p < 0.001$). از آنجا که نوع و میزان مواد مغذی خوراک‌ها، مهم‌ترین فاکتور تأثیرگذار در مقدار گاز تولید شده و پارامترهای محاسباتی وابسته به تولید گاز است (Bakhshizadeh *et al.*, 2013)، بنابراین، به نظر می‌رسد این موضوع با اختلافات قابل توجه در ترکیب شیمیایی این دو منبع پروتئینی از جمله پروتئین (۴۵/۶۱ درصد در پروتانومیکس و ۲۶/۵۶ درصد در فسفوپروتانومیکس) و خاکستر (۷/۸۲ درصد در پروتانومیکس و ۳۵/۳۴ درصد در فسفوپروتانومیکس) مربوط باشد.

فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای

جدول (۵) اثرات پروتئینومیکس، فسفوپروتئینومیکس و خیساب ذرت (تیمار شاهد) را بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای نشان می‌دهد. همان طور که در این جدول مشاهده می‌شود تمامی پارامترهای تخمیر شکمبه‌ای تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفته و تفاوت‌های معناداری را نشان داده‌اند.

جدول ۵. فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای ناشی از خیساب ذرت (تیمار شاهد)، پروتئینومیکس و فسفوپروتئینومیکس

تیمارها	^۱ ME	^۲ SCFA	^۳ IVOMAD	^۴ IVTDDM	^۵ PF	^۶ MPS	^۷ EMPS	N- ^۸ NH ₃	pH
خیساب ذرت	۱۲/۹۸ ^a	۰/۵۰ ^a	۶۰/۸۷ ^a	۱۰۰/۰ ^a	۸/۸۴ ^c	۱۸۶/۹۳ ^a	۷۴/۷۷ ^C	۲۴/۷۲ ^a	۶/۸۶ ^b
پروتئینومیکس	۱۳/۱۰ ^a	۰/۳۷ ^b	۵۵/۲۴ ^b	۸۷/۷۵ ^c	۱۰/۵۴ ^b	۱۶۸/۸۲ ^b	۷۸/۶۸ ^B	۱۶/۶۲ ^c	۶/۸۷ ^b
فسفوپروتئینومیکس	۷/۶۰ ^b	۰/۳۰ ^c	۶۱/۷۹ ^a	۹۱/۱۱ ^b	۱۳/۸۵ ^a	۱۹۰/۷۶ ^a	۸۳/۷۶ ^A	۲۱/۶۶ ^b	۷/۱۰ ^a
خطای استاندارد	۰/۰۹۹	۰/۰۱۶	۰/۶۴۹	۱/۲۱۰	۰/۵۵۹	۳/۴۶۷	۱/۰۱۱	۰/۰۸۱	۰/۰۴۸
میانگین‌ها									
سطح معنی داری	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱

۱- انرژی قابل متابولیسم (مگاژول بر کیلوگرم) ۲- اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول بر ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) ۳- قابلیت هضم ظاهری آزمایشگاهی ماده‌ی آلی (درصد) ۴- تجزیه‌پذیری واقعی برون‌تنی ماده‌ی خشک (درصد) ۵- ضریب تفکیک (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۶- تولید پروتئین میکروبی (میلی‌گرم) ۷- بازده تولید پروتئین میکروبی (درصد) ۸- نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) * میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون، دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند (p>۰/۰۵).

طبق جدول (۵)، اختلاف معناداری در میزان انرژی قابل متابولیسم محاسبه شده، بین تیمار شاهد و پروتئینومیکس مشاهده نمی‌شود؛ با این حال، مقدار انرژی قابل متابولیسم محاسبه شده برای فسفوپروتئینومیکس، به طور معناداری کمتر از دو تیمار دیگر است (p<۰/۰۰۱). مقدار انرژی قابل متابولیسم هر تیمار با استفاده از رابطه‌ی (۱۱) محاسبه شده است. در این رابطه، مقدار انرژی قابل متابولیسم هر ماده‌ی خوراکی تابع میزان گاز تولید شده و مقدار پروتئین خام آن می‌باشد؛ به نحوی که بین مقدار انرژی قابل متابولیسم هر ماده‌ی خوراکی با حجم گاز تولیدی و همچنین مقدار پروتئین خام آن، رابطه‌ی مستقیم و مثبت وجود دارد؛ از این رو به نظر می‌رسد که کاهش معنی‌دار انرژی قابل متابولیسم محاسبه شده برای فسفوپروتئینومیکس، به پائین بودن معنادار تولید گاز آزمایشگاهی، پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون در این محصول (جدول ۵) و همچنین میزان پروتئین خام کمتر آن، در مقایسه با دو تیمار دیگر مربوط می‌شود. همانطور که در جدول (۲) مشاهده می‌شود محتوای پروتئین خام پروتئینومیکس و فسفوپروتئینومیکس به ترتیب ۴۵/۶۱ و ۲۲/۵۶ درصد می‌باشد که برای خیساب ذرت در حدود ۴۲ درصد گزارش شده است (Azizi et al., 2016). با اینکه حضور تانن در منابع خوراکی به علت اثرات آن در مهار گازهای تخمیری، یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش انرژی قابل متابولیسم محاسبه شده با معادلات تست گاز بیان شده است (Yarahmadi et al., 2017)، اما در این مطالعه علیرغم کاهش معنادار گاز تولیدی پروتئینومیکس نسبت به شاهد، به دلیل تراکم بالای پروتئین خام در این محصول و اثر مستقیم و مثبت آن در محاسبه‌ی انرژی قابل متابولیسم طبق رابطه‌ی (۱۱)، تفاوت معنی‌داری از این لحاظ بین پروتئینومیکس و تیمار شاهد مشاهده نمی‌شود.

طبق جدول (۵) بین مقدار اسیدهای چرب فرار تولید شده توسط سه منبع پروتئینی خیساب ذرت، پروتئینومیکس و فسفوپروتئینومیکس، اختلاف وجود داشته (p<۰/۰۰۱) به طوری که این پارامتر در خیساب ذرت، بیشترین مقدار و در فسفوپروتئینومیکس، کمترین مقدار را به خود اختصاص داده است. میزان تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر برای هر تیمار با استفاده از رابطه‌ی (۱۲) محاسبه شده است. این رابطه بیان می‌کند که مقدار اسیدهای چرب فرار تولید شده توسط یک ماده‌ی خوراکی، ارتباط مستقیم و مثبتی با مقدار گاز تولید شده توسط هر سوپسترا پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون دارد. طبق جدول (۴)

مقدار تولید گاز بالاتر، توسط خیساب ذرت پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون ($p < 0.001$) منجر به تولید اسیدهای چرب فرار محاسبه شده‌ی بالاتری در این منبع پروتئینی نسبت به پروتئین میکس و فسفوپروتئین میکس شده است. تفاوت تیمارهای آزمایشی از لحاظ تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر احتمالاً به دلیل باند شدن قابل توجه کربوهیدرات‌ها (علاوه بر پروتئین‌ها) توسط تانن در دو محصول تولید شده و در نتیجه کاهش دسترسی و تجزیه پذیری آن‌ها در محیط شکمبه است. در راستای مطالعه‌ی حاضر، مشخص شده که جیره‌های حاوی خرنوب به عنوان یک منبع حاوی تانن، به کاهش اسیدهای چرب فرار در شکمبه منجر شده است (Priolo *et al.*, 2000). همچنین در تأیید نتایج این مطالعه، نشان داده شده است که افزودن پلی‌اتیلن گلیکول به پوست انار به منظور کاهش اثرات تانن، منجر به افزایش تولید اسیدهای چرب فرار خواهد شد (Abarghuei *et al.*, 2014). در مورد فسفوپروتئین میکس علاوه بر تأثیرات تانن، به نظر می‌رسد که علت کاهش قابل توجه گاز تولید شده و در نتیجه اسیدهای چرب فرار محاسبه شده طبق رابطه‌ی (۱۲)، به ترکیب شیمیایی این محصول، مخصوصاً پائین بودن مقدار پروتئین خام و بالا بودن سطح خاکستر هم مربوط می‌شود.

بر اساس گزارش موجود در جدول (۵)، قابلیت هضم ظاهری آزمایشگاهی ماده‌ی آلی، تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفته، به نحوی که مقدار این فراسنجه در پروتئین میکس به طور معنی‌داری از تیمارهای دیگر کم‌تر است ($p < 0.001$). قابلیت هضم ظاهری آزمایشگاهی ماده‌ی آلی با حجم تولید گاز، مقدار پروتئین و همچنین خاکستر هر نمونه، همبستگی مستقیم و مثبت دارد (رابطه‌ی ۱۳). پروتئین میکس از جداسازی رسوب ناشی از واکنش تانن‌های ضایعات کشمش با مایع خیساب ذرت شکل می‌گیرد، بنابراین کمپلکس‌های تشکیل شده منجر به کاهش قابلیت دسترسی مواد مغذی باند شده، بخصوص پروتئین‌ها، برای میکروارگانیسم‌های شکمبه و تأثیر منفی روی فعالیت میکروبی و در نتیجه کاهش تولید گاز نسبت به خیساب ذرت می‌گردد، که این خود عاملی مؤثر در کاهش قابلیت هضم ظاهری آزمایشگاهی ماده‌ی آلی است (Ndemanisho *et al.*, 2006). به دلیل محتوای بالای خاکستر در ترکیب شیمیایی فسفوپروتئین میکس (۳۵/۳۴ درصد) و اثر مستقیم و مثبت آن در محاسبه‌ی قابلیت هضم ظاهری آزمایشگاهی ماده‌ی آلی طبق رابطه‌ی (۱۳)، علیرغم اینکه در تولید این محصول نیز همانند پروتئین میکس از تانن استفاده شده است؛ با این حال تفاوتی بین این منبع پروتئینی و تیمار شاهد از لحاظ فراسنجه‌ی مذکور مشاهده نمی‌شود ($p > 0.05$).

با توجه به جدول (۵) مشاهده می‌شود که تجزیه‌پذیری واقعی برون‌تنی ماده‌ی خشک تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار دارد ($p < 0.001$) به طوری که مقدار این فراسنجه در تیمار شاهد ۱۰۰ درصد، در فسفوپروتئین میکس ۹۱/۱۱ درصد و در پروتئین میکس ۸۵/۷۸ درصد است. گوارش‌پذیری خوراک‌ها تابعی از ساختار فیزیکی و ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده‌ی آنها است (Bakhshizadeh *et al.*, 2013). در این مطالعه، تجزیه‌پذیری واقعی برون‌تنی ماده‌ی خشک خیساب ذرت معادل ۱۰۰ درصد بوده که با شکل فیزیکی این پسماند صنعتی که بیشتر شبیه یک محلول غلیظ است و مقادیر ADF، NDF و ADL آن که صفر بوده (Azizi *et al.*, 2016)، قابل توجیه است. در واقع فاز زیرین یا بخش رسوب هر ویال که پس از سانتریفیوژ تشکیل می‌شود بسیار ناچیز بوده که آن هم پس از جوشاندن در محلول شوینده‌ی خنثی به مدت ۲ ساعت، به طور کامل شسته می‌شود. طبق جدول (۵)، مقدار تجزیه‌پذیری واقعی برون‌تنی ماده‌ی خشک در پروتئین میکس کمتر از فسفوپروتئین میکس است که به نظر می‌رسد بیشتر به اختلاف میزان ADF، NDF و ADL در این دو منبع پروتئینی مربوط می‌شود؛ چرا که با توجه به جدول (۲) مقادیر اندازه گیری شده برای پروتئین میکس در هر سه مورد به طور معناداری ($p < 0.001$) بالاتر است.

طبق گزارش جدول (۵)، ضریب تفکیک محاسبه شده برای تیمار شاهد (خیسب ذرت) به طور معناداری پائین‌تر از دو تیمار دیگر است ($p < 0.001$). بر اساس رابطه‌ی (۸)، مقدار ضریب تفکیک با تجزیه‌پذیری واقعی برون‌تنی ماده‌ی خشک، رابطه‌ی مستقیم، ولی با حجم گاز تولید شده، رابطه‌ی معکوس دارد. در مطالعه‌ی حاضر، میزان گاز تولیدی حاصل از سه دوره آزمایش برون‌تنی با انکوباسیون پروتئین میکس و فسفوپروتئین میکس به طور معناداری ($p < 0.001$) از تیمار شاهد کمتر است (جدول ۴) که می‌تواند دلیل مناسبی برای شاخص ضریب تفکیک بالاتر آنها نسبت به شاهد باشد. در خوراک‌های معمولی مقدار ضریب

تفکیک در محدوده‌ی ۲/۷ تا ۴/۴ قرار دارد در حالی که در منابع حاوی تانن شاخص ضریب تفکیک بالاتر از محدوده‌ی معمول است (Danesh Mesgaran *et al.*, 2009). در مطالعه‌ی حاضر میزان ضریب تفکیک از محدوده‌ی مذکور بیشتر بوده که به اثرات تانن در پروتئینومیکس و فسفوپروتئینومیکس برمی‌گردد. مطالعات متعددی افزایش شاخص ضریب تفکیک را در نتیجه‌ی استفاده از خوراک‌های حاوی تانن گزارش نموده‌اند که با مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد. برای مثال ضریب تفکیک گیاه سوبابل به عنوان یک منبع غنی از پروتئین و تانن معادل ۱۱/۳۹ و ۱۰/۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (Ebadi *et al.*, 2016). بالا بودن این ضریب نشان می‌دهد که بخش قابل توجهی از ماده‌ی آلی تحت تخمیر شکمبه، به توده‌ی میکروبی تبدیل شده اما تولید اسیدهای چرب فرار و متعاقباً حجم تولید گاز، کاهش یافته است (Khoramzadeh *et al.*, 2016).

طبق جدول (۵)، تنها فرآیند تولید پروتئینومیکس باعث کاهش معنی‌داری ($p < 0.001$) در تولید پروتئین میکروبی شده و فرآیند تولید فسفوپروتئینومیکس اختلاف معنی‌داری را نسبت به شاهد در این مورد خاص نشان نمی‌دهد. طبق معادله‌ی (۹)، مقدار تولید پروتئین میکروبی با تجزیه‌پذیری واقعی برون‌تنی ماده‌ی خشک، رابطه‌ی مستقیم و مثبت، و با مقدار گاز تولید شده، رابطه‌ی مستقیم و منفی دارد. در این مطالعه مقدار بالای تولید پروتئین میکروبی تیمار شاهد (خیساب ذرت) در راستای مقدار ۱۰۰ درصدی تجزیه‌پذیری واقعی برون‌تنی ماده‌ی خشک این تیمار است. تجزیه‌پذیری واقعی برون‌تنی ماده‌ی خشک بالاتر و گاز تولیدی کمتر فسفوپروتئینومیکس نسبت به پروتئینومیکس ($p < 0.001$) باعث شده تا این منبع پروتئینی نسبت به پروتئینومیکس افزایش بهتری در تولید پروتئین میکروبی ($p < 0.001$) داشته باشد که با تولید پروتئین میکروبی شاهد هم قابل مقایسه است. در این مطالعه، روند تغییرات تولید پروتئین میکروبی تقریباً در راستای تغییرات ضریب تفکیک قرار دارد. مقادیر بالای ضریب تفکیک نشان می‌دهد که بخش زیادی از ماده‌ی خشک تجزیه شده‌ی واقعی، صرف تولید پروتئین میکروبی شده است (Yarahmadi *et al.*, 2017).

همان‌طور که در جدول (۵) مشاهده می‌شود، بازده تولید پروتئین میکروبی تیمار پروتئینومیکس و فسفوپروتئینومیکس، افزایش معنی‌داری ($p < 0.001$) را نسبت به تیمار شاهد نشان می‌دهد. در این مطالعه، روند تغییرات تولید پروتئین میکروبی در راستای تغییرات ضریب تفکیک قرار دارد. مطابق نتایج این مطالعه، بازده تولید پروتئین میکروبی در جیره‌ی حاوی برگ توت سیاه ۷۴/۸۳ درصد (Chaji *et al.*, 2015)، و در جیره‌ی حاوی برگ پسته‌ی وحشی ۷۳/۵۰ درصد گزارش شده است (Aminifard *et al.*, 2016). با این حال، تحقیقات نشان می‌دهد که تخفیف اثر تانن‌های گیاه کالیاندرا با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول منجر به افزایش مشتقات پورینی موجود در ادرار خواهد شد که نشان دهنده‌ی افزایش سنتز پروتئین میکروبی بوده و مغایر با نتایج مطالعه حاضر است (McSweeney *et al.*, 2001). گزارش شده که سطوح مناسب تانن‌ها در جیره، سبب بهبود شرایط تخمیر در شکمبه و افزایش ساخت پروتئین میکروبی می‌شود (Sharifi *et al.*, 2017). در واقع، استفاده از خوراک‌های حاوی تانن، باعث افزایش ترشح بزاق و ورود بیشتر اوره از بزاق به شکمبه شده که نتیجه‌ی آن، چرخش بیشتر بخش مایع شکمبه خواهد بود که نهایتاً به افزایش سنتز پروتئین میکروبی منجر خواهد شد (Danesh Mesgaran *et al.*, 2009)؛ که مثال آن، غلظت بیشتر نیتروژن آمونیاکی وارد شده به روده‌ی باریک نسبت به نیتروژن مصرفی در جیره‌ی حاوی تانن است (Aminifard *et al.*, 2016).

طبق اطلاعات جدول (۵)، تیمارهای حاوی تانن نسبت به تیمار شاهد، غلظت نیتروژن آمونیاکی را به طور معنی‌داری ($p < 0.001$) کاهش داده‌اند. آمونیاک مهم‌ترین محصول تخمیر ترکیبات نیتروژن‌دار در شکمبه بوده و منبع اصلی آن، تخمیر میکروبی پروتئین‌ها است (Yarahmadi *et al.*, 2017). چون خوراک‌های حاوی تانن توانایی ایجاد پیوندهای آب‌گریز با پروتئین‌ها را دارند و همچنین می‌تواند با ایجاد پوشش بر سطح پروتئین‌ها (Shakeri *et al.*, 2014)، آن‌ها را از اثرات دامیناز و اوره‌آز میکروبی خارج نمایند (Yarahmadi *et al.*, 2017)؛ لذا به نظر می‌رسد که این روند توجیه‌کننده‌ی کاهش معنی‌دار غلظت نیتروژن آمونیاکی محصولات تولید شده نسبت به شاهد باشد. کاهش نیتروژن آمونیاکی شکمبه در نتیجه‌ی استفاده از خوراک‌های حاوی تانن در مطالعات دیگری هم گزارش شده است (Yarahmadi *et al.*, 2017; Dousti *et al.*, 2017; Sharifi *et al.*, 2017).

بیشتر از پروتئانومیکس است. محتوای پروتئین خام فسفوپروتئانومیکس و پروتئانومیکس در این تحقیق به ترتیب ۲۷/۵۱ و ۴۵/۶۱ درصد است. نتایج حاصل از آنالیز پروتئین به روش CNCPS این مطالعه نشان می‌دهد که سهم پروتئین محلول از پروتئین خام، در فسفوپروتئانومیکس به طور معناداری بالاتر از پروتئانومیکس است (۵۱/۰۲ در مقابل ۱۸/۸۵ درصد) (جدول ۳). به عبارت بهتر، مقدار پروتئین خام محلول فسفوپروتئانومیکس، ۱۴/۰۴ درصد ماده‌ی خشک و این عدد برای پروتئانومیکس ۸/۶ است که توجه‌کننده‌ی افزایش معنی‌دار نیتروژن آمونیاکی فسفوپروتئانومیکس نسبت به پروتئانومیکس است. بر خلاف مطالعاتی که اثر تانن‌ها را در کاهش نیتروژن آمونیاکی شکمبه مثبت گزارش می‌کنند، مطالعات دیگری نیز وجود دارند که بیان می‌کنند تانن‌ها بر این فراسنجه هیچ گونه اثری ندارند (Yildiz et al., 2005).

طبق داده‌های جدول (۵)، pH محتویات ویال‌های تحت تیمار فسفوپروتئانومیکس به طور معنی‌داری از شاهد بیشتر بوده ($p < 0.01$)، اما تیمار پروتئانومیکس با شاهد تفاوت معنی‌داری از این لحاظ ندارد. در واقع افزایش pH محتویات ویال‌ها در تیمار فسفوپروتئانومیکس، به استفاده از هیدروکسید سدیم در فرآیند تولید این محصول برمی‌گردد، در حالی که تحت شرایط عادی، که در pH محیط واکنش تانن و خیساب ذرت دخالتی نمی‌شود و پروتئانومیکس تولید می‌شود، pH محتویات ویال‌ها تغییر معنی‌داری در مقایسه با شاهد نشان نمی‌دهد. مشابه مطالعه‌ی حاضر، استفاده از سطوح مختلف تانن متراکم در جیره‌ی گوسفندان پرواری (Bhatta et al., 2009)، و یا استفاده از پوست پسته به عنوان منبع تانن در جیره‌ی گوسفندان بلوچی (Rahimi et al., 2013) تغییر معنی‌داری در pH مایع شکمبه ایجاد نکرده است. با این حال در مطالعات دیگر، استفاده از تانن‌ها به علت کاهش جمعیت پروتوزوایی، pH شکمبه کاهش یافته که به نقش پروتوزوئرها در تعدیل pH با ذخیره و هضم سریع نشاسته در آنها برمی‌گردد (Min et al., 2005)، یا گزارش شده که تانن‌ها با کاهش غلظت اسیدهای چرب شکمبه باعث افزایش pH مایع شکمبه می‌شوند (Silanokive et al., 2006).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

از آنجا که دو محصول پروتئانومیکس و فسفوپروتئانومیکس از جداسازی و خشک کردن رسوبات ناشی از واکنش تانن و خیساب ذرت شکل می‌گیرند، لذا تراکم بالایی از پروتئین‌ها و سایر ترکیبات باند شده با تانن در این دو محصول، از جمله پروتئانومیکس، وجود دارد. با توجه به اطلاعات موجود، انتظار می‌رود بخش قابل توجهی از ترکیبات باند شده با تانن‌ها به ویژه تانن‌های متراکم، بدون تأثیرات هضم میکروبی، از شکمبه عبور نموده و در روده هضم شوند. کاهش معنادار حجم تولید گاز در زمان‌های مختلف انکوباسیون و در نتیجه کاهش قابلیت تولید گاز آزمایشگاهی در دو محصول آزمایش شده در مقایسه با خیساب ذرت، به عنوان ماده‌ی اولیه‌ی تولید این دو محصول، و همچنین نتایج آنالیز پروتئین به روش CNCPS، تأیید کننده‌ی فرضیه‌ی این آزمایش مبنی بر تولید منابع پروتئینی مقاوم به هضم میکروبی است. در نهایت نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که پروتئانومیکس و فسفوپروتئانومیکس به عنوان دو فرآورده‌ی خشک حاصل از خیساب ذرت، که خود با روش‌های معمول قابل خشک شدن نیست، به عنوان منابع پروتئینی و حتی فسفر (در مورد فسفوپروتئانومیکس)، قابلیت استفاده در تغذیه‌ی نشخوارکنندگان را دارند؛ اما با این حال، برای بررسی نتایج استفاده از این منابع، نیاز به آزمایش‌های *in vivo* هم می‌باشد و به منظور عرضه این محصولات به چرخه صنعت، طبیعتاً آزمایشات متعدد دیگر حتی توسط سایر محققین، می‌تواند این محصول را به چرخه صنعت معرفی، یا از این گردونه خارج نماید.

سپاسگزاری

از دانشگاه لرستان، جهت تأمین مالی این مطالعه و از هنرستان کشاورزی طالقانی ملایر، بابت در اختیار گذاشتن تجهیزات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

- A.O.A.C. (1990). *Official Methods of Analysis*. 15th Edition, Association of Official Analytical Chemist, Washington DC.
- Abarghuei, M.J., Rouzbehan, Y. & Zamiri, M.J. (2014). Effect of non-extracted and extracted pomegranate-peel on *in vitro* gas production parameters of inoculum of Ghezel sheep. *Journal of Ruminant Research*, 2 (2), 37-59. (In Persian)
- Alipour, D. & Rouzbehan, Y. (2007). Effect on ensiling grape pomace and addition of polyethylene glycol on *in vitro* gas production and microbial biomass yield. *Animal Feed Science Technology*, 137 (1-2), 138-149.
- Alipour, D., Tabatabaei, M.M., Zamani, P., Aliarabi, H., Saki, A.A. & Zamani, Z. (2010). Determination of chemical composition and gas production parameters of raisin by-product. *Animal Science Research (Agricultural Science)*, 20 (1), 109-118. (In Persian)
- Aminifard, Z., Chaji, M. & Mohammadabadi, T. (2016). Determination the nutritional value of wild pistachio leaf and its use in sheep feeding. *Iranian Journal of Animal Science*, 47 (1), 135-144. (In Persian)
- Azarfar, A., Fadaeifar, A., Azizi, A & Koolivand, A. (2020a). *Process of tannin extraction from raisin by-products*. Retrieved November, 7, 2020, Iran Patent Office, from <https://ipm.ssaa.ir/Search-Result?page=1&DecNo=139950140003003421&RN=102791>.
- Azarfar, A., Fadaeifar, A., Azizi, A & Koolivand, A. (2020b). *Process of production of feedstuff with high bypass protein for ruminants*. Retrieved November, 29, 2020, Iran Patent Office, from <https://ipm.ssaa.ir/Search-Result?page=1&DecNo=139950140003005153&RN=103004>.
- Azizi, A., Papi, N., Sharifi, A., Azarfar, A. & Kiani, A. (2016). Effect of different levels of corn steep liquor on the activity of hydrolytic enzymes in different fractions of rumen liquor and nitrogen metabolism in moghani- male lambs. *Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 30 (115), 255-270. (In Persian)
- Bakhshizadeh, S., Taghizadeh, A., Janmohammadi, H. & Alijani, S. (2013). The effect of polyethylene glycol (PEG 6000) supplementation on *in vitro* kinetics of pistachio epicarp. *Journal of Livestock Research*, 2 (1), 11-20. (In Persian)
- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O. & Kurihara, M. (2009). Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, 92 (11), 5512-5522.
- 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.
- 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.
- Chaji, M., Aminifard, Z. & Heydari, M. (2015). Investigation of digestion and fermentation parameters of diets contain of Black mulberry leaves. *Animal Production*, 18 (4), 719-728. (In Persian)
- Combs, C.A. (2016). *Tannins, Biochemistry, Food Sources and Nutritional Properties*. Nova Science Publishers, Inc.
- Danesh mesgaran, M (2009). *Advanced In Vitro Methods for Animal Science Researches (Special view on agriculture by-products in animal nutrition)*. Ferdowsi University of Mashhad Publication.
- Dousti, F., Ghoorchi, T., Sepahvand, A., Dastar, B. & Azarfar, A. (2017). The effect of different levels olive cake in fermentation parameters, enzyme cellulytic and the rumen microbial protein production Lory male lambs. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 9 (4), 424-436. (In Persian)
- Ebadi, M., Mohammadabadi, T., Tabatabaei Vakili, S., Chaji, M. Mirzadeh, Kh. (2016). The study of the effect of diets containing Subabul plant on digestibility and rumen fermentation and some

- blood parameters of Arabia sheep. *Iranian Veterinary Journal*, 12 (3), 58-68. (In Persian)
- Jiriaei, F., Kazemi-Bonchenari, M., Moradi, M.A., and Mirmohammadi, D. (2017). Effect of starch source in diets contained corn steep liquor on performance, blood metabolites, and ruminal enzymes activities of fattening lambs. *Journal of Ruminant Research*, 5 (1), 151-167.
- Khoramzadeh, L., Mohammadabadi, T., Mamouei, M., Chaji, M. & Sari, M. (2016). The comparison of degradability, digestion and microbial fermentation of siris leaves or silk tree instead of the alfalfa in cow and buffalo of Khuzestan. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 8 (4), 602-615. (In Persian)
- Licitra, G., Hernandez, T.M. & Van Soest, P.G. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science Technology*, 57, 347-358.
- Makkar, H.P.S. (2000). *Quantification of tannins in tree and shrub foliage, a laboratory manual*. Kluwer Academic Publishers.
- 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.
- McSweeney, C.S., Palmar, B., McNeill, D.M. & Krause, D.O. (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science Technology*, 91(1-2), 83-93.
- Menke K. H. & Steingass H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
- Min, B.R., Attwood, G.T., McNabb, W.C., Molan, A.L. & Barry, T.N. (2005). The effect of condensed tannins from *Lotus corniculatus* on the proteolytic activities and growth of rumen bacteria. *Animal Feed Science Technology*, 121 (1-2), 45-58.
- Mojadam, A., Chaji, M., Mohammadabadi, T. & Tabatabaei Vakili, S. (2015). Feeding Value of silybum marianum for sheep and its effect on fiber and protein digestion. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 7 (3), 267-277. (In Persian)
- National Research Council, (2007). *Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids*. National Academy of Sciences.
- Ndemanisho, E.E., Kimoro, B.N., Mtengeti, E.J., Muhikambebe, V.R.M. (2006). The potential of *Albizia lebbek* as a supplementary feed for goats in Tanzania. *Agroforestry Systems*, 67(1), 85-91.
- Nisa, M., Khan, M.A., Sarwar, M., Lee, W.S., Lee, H.J., KI, K.S., Ahn, B.S. and Kim, H.S. (2006). Influence of corn steep liquor on feeding value of urea treated wheat straw in buffaloes fed at restricted diets. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 19 (11), 1610-1616.
- Olmos Colmenero, J. J. & Broderick, G. A. (2006). Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(5), 704-1712.
- Ørskov, E. and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92(2):499-503.
- Patra, A.K. (2012). *Dietary Phytochemicals and Microbes*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London.
- Priolo, A., Waghorn, G.C., Lanza, M., Biondi, L. & Pennisi, P. (2000). Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: effects on lamb growth performance and meat quality. *Journal of Animal Science*, 78, 810-816.
- Rahimi, A., Naserian, A.A., Valizadeh, R., Tahmasbi, A. & Shahdadi, A. (2013). Effect of replacing different levels of alfalfa hay with pistachio hull on feed intake, digestibility of nutrients, rumen fermentative parameters, blood metabolites and nitrogen balance in Balochi male lambs. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 5 (3), 190-200. (In Persian)

- Savari, M., Khorvash, M., Amanlou, H., Ghorbani, G.R., Ghasemi, E., Mirzaei, M., & Mohammadi, F. (2017). Effects of the source and level of rumen undegradable protein and corn processing on production performance of dairy cows. *Journal of Ruminant Research*, 5 (3), 41-56. (In Persian)
- Shakeri, P., Aghashahi, A.R., Mostafavi, H. & Mirzaee, M. (2014). Effect of ensiling pistachio by-products on ruminal fermentation and methane emission mitigation using in vitro batch fermentation. *Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 28 (106), 43-54. (In Persian)
- Sharifi, A., Chaji, M. & Vakili, S.A. (2017). Effect of treatment recycled poultry bedding with pomegranate peel tannin extract on in vitro digestion and fermentation activity of cow rumen microorganisms. *Journal of Animal Production*, 19 (2), 321- 336. (In Persian)
- Silanikove, N., Landau, S., Or, D., Kababya, D., Bruckental, I. & Nitsan, Z. (2006). Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (*Ceratonia siliqua*) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids. *Livestock Science*, 99 (1), 29-38.
- Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Van Soest, P.G., Fox, D.G. & Russel, J.B. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, 70(11), 3562-3577.
- Tabatabaei, M.M., Souri, M. & Nik-Khah, A. (1991). Determination of nutritive value of grape residues in growing lamb ration (Mehraban sheep). *Iranian Journal of Agriculture Science*. 23 (2), 43-52. (In Persian)
- Vahdani, N., Dehghan Banadaky, M., Rezayazdi, K. & Khalighi-Sigaroodi, F. (2016). Effects of semi-pure tannin usage, on crude protein fractions of soy bean meal and canola meal by CNCPS. *Iranian Journal of Animal Science*, 47 (2), 261-270. (In Persian)
- 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.
- Vermeris, W. & Nicholson, R. (2008). *Phenolic Compounds Biochemistry*. Springer Science + Business Media.
- Yarahmadi, B., Chaji, M., Boujarpour, M., Mirzadeh, Kh. & Rezaei, M. (2017). Effects of sainfoin tannin treated by water or urea on microbial population, gas production parameters, digestibility and in vitro fermentation. *Iranian Veterinary Journal*, 13 (3), 97-115. (In Persian)
- Yildiz, S., Kaya, I., Unal, Y., Aksu, D., Kaya, S., Cenesiz, M. Kaya, M. & Oncuer, A. (2005). Digestion and body weight change in Tuj lambs receiving oak (*Quercus hartwissiana*) leaves with and without PEG. *Animal Feed Science Technology*, 122 (1-2), 159-172.