مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۱ شماره ۱/ سال۱۴۰۰/ صفحات ۳۷ تا ۵۱

DOI: 10.22034/as.2021.37905.1546

اثر استفاده ازسطوح مختلف تانیک اسید در شرایط آزمایشگاهی بر فراسنجه‌های تخمیر و الگوی اسیدهای چرب مایع شکمبه

فرشید فتاح‌نیا[۱*]، علی خطیب جو[۱]، حمیدرضا میرزایی الموتی[۲]، لادن رشیدی[۳]، نسیم رحیمی[۴] و صفورا یوسفی‌نژاد[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/٤/۲

[۱] دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه ایلام

[۲] دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه زنجان

[۳] استادیار اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

[٤] به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و دکتری گروه علوم دامی دانشگاه ایلام

* مسئول مکاتبه: Email: f.fatahnia@ilam.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: تانیک اسید (یک نوع تانن قابل هیدرولیز) قابلیت تغییر فرایندهای تخمیری شکمبه و مسیر بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع را دارد. **هدف**: این آزمایش به منظور بررسی اثر سطوح مختلف تانیک اسید بر پارامترهای تخمیری شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاه و حدواسط‌های بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع انجام گرفت. **روش کار**: جیره پایه حاوی نسبت کنسانتره به علوفه ۵۸/۲ به ٤۱/۸ و دانه سویای اکسترود شده به عنوان منبع اسیدهای چرب غیر اشباع بود. تیمارهای آزمایشی شامل کنترل (بدون افزودنی)، ۰/۱ میلی‌گرم مونسین در لیتر محیط کشت، ۲۵۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر محیط کشت، ۵۰۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر محیط کشت و ۷۵۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر محیط کشت بودند. تولید گاز، غلظت آمونیاک و اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه و الگوی اسیدهای چرب مایع شکمبه اندازه‌گیری شد. **نتایج**: تولید گاز، pH و غلظت نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه تحت تاثیر افزودنی قرار نگرفت ($P>0/05$). تانیک اسید غلظت اسیدهای چرب ۱۰:۰ تا ۱٤:۰ در مایع کشت را کاهش و غلظت ۱٦:۰ را افزایش داد ($P<0/05$). افزودن مونسین و ۲۵۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر محیط کشت مقدار ۱۸:۰ را کاهش داد ($P<0/05$). مونسین مقدار ۱۸:۱ ترانس-۱۱ (ترانس واکسنیک اسید) و ۱۸:۲ سیس-۹، ترانس-۱۱ (اسید لینولئیک کونژوگه) را در مقایسه با سایر تیمارها افزایش داد ($P<0/05$). افزودن ۵۰۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر محیط کشت غلظت اسیدهای چرب غیراشباع و اسیدهای چرب بلند زنجیر را افزایش داد ($P<0/05$). **نتیجه‌گیری نهایی**: در کل، استفاده از اسید تانیک در زمان تغذیه جیره حاوی دانه سویای اکسترود شده با تغییر بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع باعث افزایش اسیدهای چرب غیراشباع و اسیدهای چرب مفید برای سلامت انسان شد.

واژگان کلیدی: تانیک اسید، تخمیر شکمبه، دانه سویای اکسترود شده، بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع

مقدمه

یکی از راه‌های افزایش غلظت اسیدهای چرب غیر اشباع و اسید لینولئیک کونژوگه شیر، اضافه کردن مکمل‌های

چربی به ویژه چربی‌های غنی از لینولئیک اسید به جیره گاوهای شیری می‌باشد (شینگفیلد و همکاران ۲۰۱۳). در جیره گاوهای شیری چربی عمدتا توسط دانه‌های روغنی حرارت داده شده از قبیل دانه‌های برشته شده و اکسترود شده تامین می‌شود. حرارت دادن دانه‌های روغنی اغلب بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیر اشباع را کاهش می‌دهد (کالم و همکاران ۲۰۱۳ و توگلرمینادیر و همکاران ۲۰۰٦ و ۲۰۱٤ و گانسیر و همکاران ۲۰۰۵). اگرچه این محافظت جزئی اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه در مقابل بیوهیدروژناسیون در بعضی مطالعات دیده نشده است (نیوس و همکاران ۲۰۰۷ و عبدی و همکاران ۲۰۱۳). ترکیبات اکسیداتیو لیپیدی به‌طور جزئی باعث تغییر بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه می‌شوند (پریو و همکاران ۲۰۱۰ و کالم و همکاران ۲۰۱۳). مطالعات گذشته (توگلرمینادیر و همکاران ۲۰۰٦ و ۲۰۱٤) نشان داد افزایش حدواسط‌های بیوهیدروژناسیون در دانه سویای اکسترود شده در مقایسه با دانه سویای برشته شده بیشتر است که این می‌تواند ناشی از قابلیت دسترسی بهتر چربی به دلیل پارگی دیواره سلولی طی فراوری اکسترود کردن باشد (ردی و همکاران ۱۹۹٤). یکی از روش‌های تغییر فرآیندهای تخمیری شکمبه و دستکاری بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیر اشباع در شکمبه گاوهای شیری استفاده از افزودنی‌های خوراکی مانند مونسین است (خدامرادی و همکاران ۲۰۱۳ و عبدی و همکاران ۲۰۱۳). مونسین معمولا با مهار باکتری‌های گرم مثبت باعث کاهش نسبت استات به پروپیونات می‌شوند (آیفارجر و کلارک ۲۰۰۳). اگرچه استفاده از مونسین به عنوان یک آنتی‌بیوتیک یونوفری در خوراک در سال‌های اخیر به علت احتمال باقی ماندن آن در فرآورده‌های نشخوارکنندگان و ایجاد مقاوت در بعضی باکتری‌ها با محدودیت‌هایی مواجه شده است (ایشلک و همکاران ۲۰۱۵). بنابراین متخصصین تغذیه دام به دنبال یافتن جایگزین‌های کم خطر و طبیعی از قبیل ترکیبات ثانویه گیاهی (مانند تانن و روغن‌های ضروری) برای آن هستند. تانن‌ها ترکیبات فنولی هستند که از لحاظ شیمیایی به تانن قابل هیدرولیز و تانن متراکم تقسیم می‌شوند. تانن استخراج شده از شاه‌بلوط و بلوط، قابل هیدرولیز و تانن استخراج شده از درخت کوبراکو نمونه‌ای از تانن متراکم می‌باشد (واگوم ۲۰۰۸). تانیک اسید یک نوع تانن قابل هیدرولیز تجاری است. گزارش شده است که تانن متراکم با مهار تولید آمونیاک و متان باعث تغییر تخمیر شکمبه می‌شود (کارولا و همکاران ۲۰۰۵). بخشی از این توانایی به دلیل اتصال تانن به پروتئین و الیاف می‌باشد (واگوم ۲۰۰۸). تانن‌ها به‌طور گسترده و شناخته شده‌ای قادر به اتصال به پروتئین‌های خوراک و مهار رشد باکتری‌های شکمبه می‌شوند (مین و همکاران ۲۰۰۳). باتوجه به متابولیسم لیپید، تانن‌ها نشان داده‌ند که باعث ممانعت از رشد باکتری بوتیروویبریوفیبروسولوز می‌شوند (جانز و همکاران ۱۹۹٤) که یکی از گونه‌های باکتریایی شناخته شده دخیل در بیوهیدروژناسیون شکمبه‌ای اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد (جنکینز و همکاران ۲۰۰۸). چندین مطالعه انجام شده در شرایط آزمایشگاهی (واستا و همکاران ۲۰۰۹، خیااوسا ارد و همکاران ۲۰۰۹، بوسینی و همکاران ۲۰۱۱، جایانگارا و همکاران۲۰۱۲، مینیری و همکاران ۲۰۱٤ و کارنو و همکاران ۲۰۱۵) و روی دام زنده (بوسیونی و همکاران ۲۰۱۵) نشان می‌دهند که تانن‌ها خواص ضدباکتریایی و تغییردهنده تخمیر شکمبه را دارند که می‌تواند باعث اختلال در بیوهیدروژناسیون کامل اسیدهای چرب غیراشباع شوند. بوسیونی و همکاران (۲۰۱۵) با افزودن عصاره تانن درخت کوبراکو و شاه‌بلوط در سطح ۵۳ گرم در کیلوگرم ماده خشک جیره میش‌های شیرده، افزایش اندکی در غلظت لینولئیک اسید، واکسینیک اسید و اسید لینولئیک کونژوگه و کاهش در استئاریک اسید و اسیدهای چرب اشباع شیر مشاهده کردند. علی پناهی و همکاران (۲۰۱۹) با افزودن میوه بلوط (حاوی تانن قابل هیدرولیز) به جیره بزهای شیرده در مقایسه با گروه

شاهد کاهش معنی‌دار غلظت آمونیاک مایع شکمبه را گزارش کردند اما الگوی اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه تحت تاثیر قرار نگرفت. همچنین جیره حاوی میوه بلوط باعث افزایش معنی‌دار غلظت ترانس واکسینیک اسید و اسیدهای چرب غیراشباع و کاهش غلظت اسیدهای چرب اشباع در چربی شیر بزها شد. با توجه به اطلاعات موجود، مطالعه‌ای در ارتباط با اثر تانن بر بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب در جیره‌های حاوی دانه‌های سویا اکسترود شده در شرایط آزمایشگاهی وجود ندارد. بنابراین، هدف اصلی از مطالعه حاضر بررسی مقایسه اثر مونتسن و سطوح مختلف تانیک اسید (به عنوان یک تانن قابل هیدرولیز تجاری) بر تخمیر شکمبه و بیوهیدروژناسیون شکمبه‌ای اسیدهای چرب غیراشباع در جیره‌های حاوی دانه سویای اکسترود شده در شرایط آزمایشگاهی بود و این‌که آیا اثر تانیک اسید به میزان مصرف تانیک اسید بستگی دارد یا نه؟

مواد و روش‌ها

دانه سویای اکسترود شده و تیمارهای آزمایشی

دانه سویای اکسترود شده در جیره پایه از یک شرکت تجاری (تهران دانه) تهیه شد. فرایند اکسترود کردن دانه سویا شامل فشار در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و به دنبال آن اکسترود کردن در دمای ۱٤٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦٠ ثانیه بود. سپس دانه‌های اکسترود شده با الک یک میلی‌متری برای انکوباسیون به روش آزمایشگاهی آسیاب شدند. جیره پایه برای گاوهای شیرده پرتولید (گاوهای شکم سوم با وزن زنده ٦٣٠ کیلوگرم،٦٠ روز تولید و تولید روزانه ٤٠ کیلوگرم) براساس توصیه‌های انجمن تحقیقات ملی (۲۰۰۱) متعادل شد و ترکیب آن بر اساس گرم در کیلوگرم ماده خشک شامل علوفه یونجه (١٨٦ گرم در کیلوگرم) ذرت سیلوی (۲۳۲ گرم در کیلوگرم) دانه جو (۱۰۲ گرم در کیلوگرم) دانه ذرت (١٨٦ گرم در کیلوگرم) سبوس گندم (٥٠ گرم در کیلوگرم) کنجاله کلزا (۷۰ گرم در کیلوگرم) دانه سویای اکسترود شده (۱۲۳ گرم در کیلوگرم) نمک (٤/٥ گرم در کیلوگرم) بیکربنات سدیم (۹/۲ گرم در کیلوگرم) مکمل ویتامین و مواد معدنی (۲۸ گرم در کیلوگرم) و کربنات کلسیم (۹/۳ گرم در کیلوگرم) بود. تیمارهای آزمایشی شامل کنترل (بدون افزودنی)، ۰/۱ میلی‌گرم مونتسین در لیتر محیط کشت به همراه سطوح متفاوت اسید تانیک شامل تیمار اول) سطح ۲۵۰ میلی‌گرم، تیمار دوم) سطح ٥٠٠ میلی‌گرم و تیمار ۳) سطح ۷٥٠ میلی‌گرم اسید تانیک در لیتر محیط کشت بودند. اسید تانیک و مونتسین در آب مقطر حل و پس از تهیه محلول نهایی به بطری‌های مربوطه اضافه شدند.

آزمون تولید گاز

مایع شکمبه از دو راس گاو هلشتاین غیر شیرده دارای فیستولای دائم شکمبه جمع‌آوری شد که روزانه با مخلوط علوفه یونجه و کاه گندم (براساس ماده خشک به ترتیب با نسبت ۷۰۰ به ۳۰۰ گرم در کیلوگرم) به صورت آزاد و ۳ کیلوگرم کنسانتره تغذیه شدند. گاوها به آب و سنگ نمک به طور آزاد دسترسی داشتند. بعد از ۳ هفته دوره عادت پذیری، مایع شکمبه از هر گاو در صبح و قبل از خوراک نوبت صبح جمع‌آوری شد. سپس مایع شکمبه گاوها با هم مخلوط، با یک پارچه چهار لایه صاف و در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به سرعت به آزمایشگاه منتقل شد. برای اطمینان از شرایط بی‌هوازی به طور مداوم گاز دی اکسید کربن به مایع شکمبه اضافه شد و تا زمان انکوباسیون در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گرد در حمام آب گرم نگه‌داری شد. محلول بافر براساس روش ماکار و همکاران (۱۹۹٥) تهیه و با نسبت ۳ به ۱ با مایع شکمبه مخلوط شد. انکوباسیون در بطری‌های ۱٥٠ میلی‌لیتری حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم جیره پایه و ٤٠ میلی‌لیتر مایع شکمبه انجام شد. این آزمایش دو بار در دو هفته جداگانه انجام شد و در هر هفته برای هر جیره آزمایشی ۳ بطری (تکرار) در نظر گرفته شد.

فراسنجه‌های تخمیر

برای بررسی اثر افزودنی‌ها بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه و حد واسط‌های بیوهیدوژناسیون اسیدهای چرب، تولید گاز پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون ثبت شد و محتوای بطری‌ها به لوله‌ها منتقل و در دمای ٤ درجه‌سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس pH آنها با استفاده از دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد. مایع رویی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای آنالیز آمونیاک، اسیدهای چرب فرار و حد واسط‌های بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب ذخیره شد. غلظت آمونیاک با روش رنگ سنجی براساس روش برودریک و کانگ (۱۹۸۰) اندازه‌گیری شد. اندازه گیری غلظت اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه با روش اوتنستین و بارلی (۱۹۷۱) و با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی انجام شد. همچنین برای اندازه‌گیری اسیدهای چرب بلندزنجیر و حدواسط‌های بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع در شکمبه از دستگاه گاز کروماتوگرافی دارای ستون مویرگی به طول ۱۰۰ متر استفاده شد. در این دستگاه از هلیوم به عنوان گاز ناقل استفاده شد. دمای ستون در ابتدا برای مدت یک دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد حفظ شد سپس با سرعت ٤ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. دمای تزریق کننده و تشخیص دهنده به ترتیب ۲۸۰ و ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود.

آنالیز آماری

داده‌های حاصل بر اساس طرح کاملا تصادفی و رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS آنالیز شدند. مدل آماری طرح به صورت ذیل بود:

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

این مدل شامل میانگین کل مشاهدات (μ)، اثر سطح تانیک اسید (Ti) و اثر اشتباه آزمایشی (e_{ij}) بود. مقایسه میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ و با آزمون توکی انجام شد. مقایسه‌های مستقل بین جیره‌های آزمایشی مختلف نیز انجام شد.

نتایج و بحث

تولید گاز، pH و نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه

اثر سطوح مختلف تانیک اسید برتولید گاز ٢٤ ساعت پس از انکوباسیون، pH و غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه در جدول ۱ آمده است. استفاده از مونسین یا سطوح مختلف تانیک اسید بر تولید گاز پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون، pH و غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه تاثیری نداشت (P >۰/۰۵). مقایسه‌های مستقل بین تیمارهای آزمایشی نیز تفاوت معنی‌داری نداشت.

Table 1- Effects of different tannic acid levels on gas production (GP), rumen fluid pH and ammonia concentration after 24 h of incubation

	Treatment[1]							Orthogonal comparisons [2]			
Item[3]	C	M	TA_1	TA_2	TA_3	SEM[4]	*P-value*	1	2	3	4
GP	70.95	69.68	69.01	67.60	70.15	1.68	0.69	0.33	0.60	0.31	0.70
$N\text{-}NH_3$	15.39	15.18	15.01	14.13	12.92	0.82	0.24	0.26	0.86	0.17	0.24
pH	6.65	6.64	6.67	6.69	6.66	0.02	0.23	0.30	0.62	0.20	0.07

[1] Treatment: C = Control (without additive), M = 0.1 mg/L of monensin, TA_1 = 250 mg/L of tannic acid, TA_2 = 500 mg/L of tannic acid and TA_3 = 750 mg/L of tannic acid.
[2] Orthogonal comparisons: 1 = Comparison between C diet against M, TA_{10} = TA_{20} and TA_{30} diets, 2 = Comparison between C diet against M diet, 3 = Comparison between C against TA_1, TA_2 and TA_3 and 4 = Comparison between M against TA_1, TA_2 and TA_3.
[3]GP: amount of gas production after 24 h incubation (ml/g organic matter), ammonia nitrogen (mg/dl).
[4]Standard error of means.

مین و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی اثر غلظت‌های مختلف تانن متراکم (صفر، یک و ۲درصد) بر تولید گاز در شرایط آزمایشگاه نتیجه گرفتند با افزایش تانن متراکم تولید گاز پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون کاهش یافت. در آزمایش بنچار و همکاران (۲۰۰۸) ترکیبات فنولیک باعث کاهش تولید گاز شدند که می‌تواند به دلیل وجود گروه هیدروکسیل در ساختار شیمیایی و در نتیجه خاصیت ضدمیکروبی بالای این ترکیبات باشد. محمد آبادی و

همکاران (۲۰۰۹) با بررسی اثر تانن (دو سطح ۲۵ و ٤٥ گرم) بر پارامترهای تولید گاز در شرایط ازمایشگاهی نشان دادند که تولید گاز پس از ۹٦ ساعت انکوباسیون در تیمارهای دارای تانن در مقایسه با گروه کنترل پایین‌تر بود. پونسی و همکاران (۲۰۱۲) اثرات نوع یونوفر بر تولید گاز پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی را بررسی کردند نتایج نشان داد که تولید گاز تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. کاهش تولید گاز در اثر تانن‌ها به دلایلی چون کاهش اتصال میکروارگانیسم‌ها به ذرات خوراک (مک آلیستر و همکاران ۱۹۹٤) و مهار رشد میکروارگانیسم‌ها و مهار فعالیت آنزیم‌های میکروبی رخ می‌دهد (مک اسوینی و همکاران ۲۰۰۱). تولید اسید استیک در مقایسه با اسید پروپیونیک با تولید گاز بیشتری همراه است. در انکوباسیون مواد خوراکی با مایع شکمبه بافری شده، کربوهیدرات‌ها تخمیر می‌شوند و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، گازها و سلول‌های میکروبی را تولید می‌کنند. در اثر تخمیر کربوهیدرات‌ها استات، پروپیونات و بوتیرات تولید می‌شود. تولید گاز ناشی از تخمیر پروتئین‌ها در مقایسه با کربوهیدرات‌ها نسبتا کم است. نقش چربی‌ها در تولید گاز ناچیز است. گاز تولید شده در روش تولید گاز یا به طور مستقیم از تخمیر ماده خوراکی و یا به طور غیرمستقیم از بافری شدن اسیدهای چرب کوتاه زنجیر می‌باشد (ماکار ۲۰۱۰). با توجه به این که ترکیب جیره پایه برای همه تیمارها در آزمایش حاضر یکسان بود یعنی در واقع از لحاظ میزان کربوهیدرات، پروتئین و چربی یکسان بودند انتظار می‌رفت که از لحاظ تولید گاز هم تفاوت معنی‌داری بین آنها مشاهده نشود. تفاوت در نتایج آزمایش‌های مختلف در زمان استفاده از تانن را می‌توان به نوع و منبع تانن، فعالیت تانن‌ها، طریقه و میزان مصرف و هم‌چنین شرایط آزمایش ارتباط داد. در ارتباط با pH، برخی پژوهشگران گزارش کرده‌اند که خوراک‌های حاوی تانن اثری بر سطح pH شکمبه ندارند (بهاتا و همکاران ۲۰۰۵). مشابه با نتایج آزمایش حاضر، علی پناهی و همکاران (۲۰۱۹) عدم تاثیر جیره حاوی میوه بلوط (منبع تانن قابل هیدرولیز) بر pH مایع شکمبه بزهای شیرده را گزارش کردند. مقدار pH طبیعی شکمبه در دامنه ٦/١ تا ٦/٩ قرار دارد (مکدونالد و همکاران ۱۹۹۵). در این آزمایش مقدار pH محیط تخمیر برای تمام تیمارهای آزمایشی در محدوده طبیعی قرار داشت و اختلافی بین آنها مشاهده نشد. هم‌چنین در مقایسه‌های مستقل نیز تفاوت‌ها معنی‌دار نبود که نشان دهنده عدم تاثیر تانن و مونسین بر pH مایع شکمبه بود. عدم تاثیر تیمارهای آزمایشی بر pH مایع شکمبه را می‌توان تا حدودی به عدم تفاوت در مقدار تولید کل اسیدهای چرب فرار (جدول ۲) ارتباط داد. زیرا مقدار تولید کل اسیدهای چرب فرار یکی از مهم‌ترین عوامل موثر بر pH مایع شکمبه می‌باشد (ماکار ۲۰۱۰). در آزمایش ال وزیری و همکاران (۲۰۰۷) افزودن تانن متراکم (سطح یک، دو و سه درصد ماده خشک) به کنجاله سویا و در آزمایش علی پناهی و همکاران (۲۰۱۹) افزودن میوه بلوط (حاوی تانن قابل هیدرولیز) به جیره بزهای شیرده غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه را کاهش داد. آمونیاک مایع شکمبه از دآمیناسیون پروتئین‌ها و ترکیبات نیتروژن‌دار غیرپروتئینی جیره منشاء می‌گیرد (هریستو و روپ ۲۰۰۳). کاهش غلظت آمونیاک مایع شکمبه در زمان استفاده از برخی خوراک‌های حاوی تانن می‌تواند به دلیل تشکیل کمپلکس پروتئین- تانن، مهار فعالیت د-آمیناز میکروبی توسط تانن قابل هیدرولیز (اسلیونسکی و همکاران ۲۰۰۲) و کاهش رشد باکتری‌های پروتئولایتیک باشد (مین و همکاران ۲۰۰۵). که این می-تواند مثبت باشد زیرا باکتری‌های تولید کننده مقدار بالای آمونیاک تنها یک درصد از جمعیت باکتری‌های شکمبه را تشکیل می‌دهند اما فعالیت دآمیناسیون بالایی دارند و مهار این باکتری‌ها به وسیله تانن‌ها با افزایش بازده استفاده از پروتئین و کاهش تولید آمونیاک در شکمبه از نظر تغذیه‌ای سودمند می‌باشد (پاترا ۲۰۱۱). البته توانایی و تمایل تانن‌ها برای اتصال به پروتئین‌ها برای تانن منابع

مختلف متفاوت است و همچنین وابسته به نوع پروتئین است (گونزالز و همکاران ۲۰۰۲). در آزمایش ما با وجود این که انتظار می‌رفت اثر سطوح مختلف تانن روی غلظت آمونیاک شکمبه متفاوت باشد اما برخلاف انتظار ما اثر تانن معنی‌دار نبود که ممکن است به نوع منبع پروتئینی و روش فرآوری آن ارتباط داشته باشد. همان گونه که در بخش مواد و روش‌ها بیان شد، دانه سویای اکسترود شده منبع اصلی پروتئین در جیره‌های آزمایشی را تشکیل داد و فرآوری حرارتی دانه سویا باعث تغییر در ساختمان طبیعی پروتئین می‌شود. بنابراین ممکن است تانیک اسید مشابه با پروتئین‌های طبیعی فرآوری نشده به پروتئین موجود در دانه سویای اکسترود شده متصل نشده باشد و از تجزیه پروتئین به وسیله باکتری‌ها جلوگیری نکرده باشد. با توجه به اثر مکمل مونسین بر کاهش تجزیه پروتئین و مهار باکتری‌های تجزیه‌کننده اسیدهای آمینه در شکمبه (مک گافی و همکاران ۲۰۰۱). انتظار بر این بود که غلظت آمونیاک در محیط کشت دارای جیره حاوی مونسین در مقایسه با سایر جیره‌ها پایین‌تر باشد. اما در آزمایش حاضر اثر مونسین بر غلظت آمونیاک معنی‌دار نبود. در کل همان طور که برای تولید گاز و pH توضیح داده شد دلیل عدم تاثیر مونسین و تانیک اسید بر غلظت نیتروژن آمونیاکی بین تیمارهای مختلف می‌تواند به نوع تانن و سطوح آن، مقدار مونسین و طریقه استفاده این دو و هم‌چنین شرایط آزمایش نسبت داده شود.

اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه

اثر تیمارهای مختلف بر تولید کل و اسیدهای چرب فرار جزء به جزء در مایع شکمبه در جدول ۲ آمده است. غلظت کل و جزء به جزء اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه تحت تاثیر سطوح مختلف تانیک اسید قرار نگرفت ($P>0/05$). این نتیجه در مقایسه‌های مستقل هم مشاهده شد. در آزمایش محمد آبادی و همکاران (۲۰۰۹) غلظت اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه تحت تاثیر تانن (سطوح ۲۵ و ٤٥ گرم) کاهش یافت. در آزمایش اولکر و همکاران (۲۰۰۹) مکمل مونسین بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار و جزء به جزء آنها در مایع شکمبه اثر معنی‌داری نداشت. واستا و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی اثر تانن گونه‌های مختلف گیاهی بر تخمیر شکمبه در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که غلظت اسیدهای چرب فرار توسط تانن کاهش یافت. افزودن میوه بلوط (حاوی تانن قابل هیدرولیز) به جیره بزهای شیرده بر غلظت کل و تک تک اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه آنها اثر نداشت (علی پناهی و همکاران ۲۰۱۹). افزایش مقدار مخلوط تانن متراکم و تانن قابل هدرولیز از صفر به ۱/۸ درصد ماده خشک در جیره گاوهای شیرده بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار و غلظت اسید استیک، اسید بوتیریک و اسید پروپیونیک مایع شکمبه تاثیری نداشت (آگووری و همکاران ۲۰۱٦). در صورتی که افزودن تانن متراکم به مقدار ۳ درصد ماده خشک به جیره گاوهای شیرده باعث کاهش غلظت کل اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه شد اما بر غلظت جزء به جزء اسیدهای چرب فرار اثری نداشت (دسچاک و همکاران ۲۰۱۱). در آزمایش حاضر، سطوح مختلف تاننیک اسید تاثیر معنی‌داری بر غلظت اسیدهای چرب فرار نداشت که می‌تواند به منبع تانن، نوع تانن، سطح تانن، طریقه مصرف و شرایط آزمایش نسبت داده شود. با توجه به نتایج جدول ۱ و عدم تفاوت در تولید گاز بین تیمارهای مختلف انتظار می‌رفت که تیمارها از لحاظ تولید اسیدهای چرب فرار نیز با هم تفاوتی نداشته باشند زیرا تولید گاز عمدتا در اثر تخمیر کربوهیدرات‌ها به استات، پروپیونات و بوتیرات می‌باشد. اما از طرف دیگر تیمارها صرفا از لحاظ نوع افزودنی (مونسین و تانن) با هم تفاوت داشتند که با توجه به نتایج محققان دیگر انتظار بر این بود که تفاوتی بین تیمارها مشاهده می‌شد.

Table 2- Effect of different tannic acid levels on total (mmol) and individual volatile fatty acids (VFA, % of total VFA) concentration in the rumen fluid after 24 h of incubation

	Treatment[1]							Orthogonal comparison [2]			
	C	M	TA_1	TA_2	TA_3	SEM[3]	*P-value*	1	2	3	4
Total VFA	82.98	74.30	81.78	74.96	79.30	4.68	0.60	0.32	0.21	0.44	0.43
Acetic acid	61.66	60.85	61.67	61.45	62.04	1.10	0.48	0.75	0.61	0.54	0.22
Propionic acid	22.77	23.21	23.80	23.30	22.75	0.39	0.35	0.28	0.45	0.28	0.18
Isobutyric acid	1.99	2.07	1.65	1.79	1.92	0.17	0.49	0.52	0.74	0.34	0.18
Butyric acid	9.58	9.87	9.33	9.73	9.43	0.16	0.16	0.92	0.21	0.69	0.06
Isovaleric acid	1.91	1.85	1.62	1.70	1.75	0.08	0.15	0.07	0.61	0.03	0.11
Valeric acid	2.09	2.15	1.93	2.03	2.11	0.16	0.89	0.83	0.81	0.71	0.51

[1] Treatment: C = Control (without additive), M = 0.1 mg/L of monensin, TA_1 = 250 mg/L of tannic acid, TA_2 = 500 mg/L of tannic acid and TA_3 = 750 mg/L of tannic acid.
[2] Orthogonal comparisons: 1 = Comparison between C diet against M, TA_{10} = TA_{20} and TA_{30} diets, 2 = Comparison between C diet against M diet, 3 = Comparison between C against TA_1, TA_2 and TA_3 and 4 = Comparison between M against TA_1, TA_2 and TA_3.
[3]Standard error of means.

الگوی اسیدهای چرب مایع شکمبه پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون

اثر تیمارهای آزمایشی بر الگوی اسیدهای چرب مایع شکمبه پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون در جدول ۳ آمده است. اثر سطوح مختلف تانیک اسید بر الگوی اسیدهای چرب مایع شکمبه معنی‌دار بود (P <۰/۰۵). در تیمار کنترل و تیمار مونسین در مقایسه با تیمارهای دارای سطوح مختلف تانیک اسید (تیمارهای ۳، ٤ و ٥)، غلظت اسیدهای چرب ۱۰:۰، ۱۱:۰ و ۱۲:۰ در مایع شکمبه به طور معنی‌داری بیشتر بود (P <۰/۰۵). بیشترین کاهش در غلظت این اسیدهای چرب از میان تیمارهای حاوی تانیک اسید در تیمار ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر (بالاترین سطح تانیک اسید) مشاهده شد. بیشترین و کمترین غلظت اسیدچرب ۱۳:۰ به ترتیب در تیمار کنترل و تیمار ۷۵۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر مشاهده شد (P <۰/۰۵). تیمار کنترل دارای بالاترین غلظت اسیدچرب ١٤:۰ و تیمارهای دارای سطوح مختلف تانیک اسید دارای کمترین غلظت این اسیدچرب بودند (P <۰/۰۵). تیمار مونسین غلظت اسید چرب ۱۵:۰ را به طور معنی‌داری افزایش داد (P <۰/۰۵). سطوح مختلف تانیک اسید غلظت اسید چرب ١٦:۰ را به طور معنی‌داری افزایش دادند (P <۰/۰۵). تیمار مونسین و تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر بیشترین غلظت اسید چرب ١٦:١ سیس-۹ را به خود اختصاص دادند (P <۰/۰۵). بیشترین غلظت اسید چرب ۱۷:۰ در تیمارهای کنترل، مونسین و ۵۰۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر مشاهده شد (P <۰/۰۵). غلظت اسید استئاریک (۱۸:۰) در تیمارهای کنترل و ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی-گرم تانیک اسید در لیتر در مقایسه با سایر تیمارهای بیشتر بود (P <۰/۰۵). تیمار مونسین باعث کاهش معنی-دار غلظت اسید چرب ۱۸:۱ ترانس-۱۱ شد (P <۰/۰۵). بیشترین و کمترین غلظت اسید چرب ۱۸:۱ سیس-۹ به ترتیب در تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر و تیمار کنترل مشاهده شد (P <۰/۰۵). غلظت اسید چرب ۱۸:۲ سیس-۹، سیس- ۱۲ در تیمارهای کنترل و ۵۰۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر نسبت به بقیه تیمارها بیشتر بود (P <۰/۰۵). مونسین باعث افزایش معنی‌دار غلظت اسید چرب ۱۸:۲ سیس-۹، ترانس-۱۱ شد (P <۰/۰۵). اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت اسید چرب ۱۸:۳ سیس-۹، سیس-۱۲، سیس-۱۵ معنی‌دار بود و کمترین مقدار آن در تیمار کنترل و ۵۰۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر مشاهده شد (P <۰/۰۵). سطوح ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر به طور معنی‌داری باعث کاهش غلظت اسیدهای چرب اشباع شدند (P <۰/۰۵). تیمار مونسین و ۵۰۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر باعث کاهش معنی‌دار غلظت اسیدهای چرب غیر اشباع شدند (P <۰/۰۵). اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت اسیدهای چرب کوتاه، متوسط و بلند زنجیر معنی‌دار بود (P <۰/۰۵) به گونه‌ای که سطوح مختلف تانیک اسید دارای کمترین غلظت

اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و بیشترین غلظت اسیدهای چرب متوسط زنجیر بودند (P <۰/۰۵). تیمار مونسین و سطوح ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر دارای بیشترین غلظت اسیدهای چرب بلند زنجیر بودند (P <۰/۰۵). دوفیلد و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی آزمایش‌های مختلف نتیجه گرفتند که مکمل مونسین، غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در چربی شیر را حدود ۱ تا ۱۲ درصد کاهش می‌دهد. همچنین اودونگ و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان دادند که استفاده از ۲٤ میلی‌گرم مونسین در کیلوگرم ماده خشک جیره بر غلظت اسیدهای چرب ۱٤:۰ و ۱٦:۱ در چربی شیر اثری نداشت، اما غلظت اسیدهای چرب ۱۸:۰، ۱۸:۲ (سیس-۹، سیس-۱۲) و ۱۸:۳ (سیس-۹، سیس-۱۲، سیس-۱۵) را به طور معنی‌داری افزایش داد. استفاده از مکمل مونسین در آزمایش الزحل و همکاران (۲۰۰۸) غلظت ۱۸:۱ (ترانس-۹) در چربی شیر را به طور معنی‌داری افزایش داد. واستا و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی اثر منابع مختلف تانن بر بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع جیره‌های حاوی علوفه خشک یا علوفه خشک و کنسانتره در شرایط آزمایشگاه نشان دادند تانن در غلظت‌های صفر، ۰/٦ و یک میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت غلظت ترانس واکسینیک اسید و اسید استئاریک را به ترتیب افزایش و کاهش داد. غلظت کل ایزومرهای اسید لینولئیک کونژوگه تحت تاثیر تانن قرار نگرفت. بوسیونی و همکاران (۲۰۱۱) اثر تانن منابع مختلف بر الگوی اسیدهای چرب باکتری‌های بخش مایع و جامد محتویات شکمبه در شرایط آزمایشگاه را بررسی کردند. تانن باعث افزایش ترانس واکسینیک اسید در باکتری‌های متصل به بخش جامد محتویات شکمبه شد. غلظت ایزومر سیس-۹، ترانس-۱۱ اسید لینولئیک کونژوگه در باکتری-های متصل به بخش جامد محتویات شکمبه در مقایسه با باکتری‌های بخش مایع بیشتر بود. اگر جیره‌ای غلظت اسید میریستیک (۱٤:۰) و اسید پالمیتیک (۱٦:۰) را در چربی فرآورده‌های نشخوارکنندگان کاهش دهد بر سلامت انسان اثر مفید خواهد داشت. بنابراین اثر مونسین در آزمایش حاضر از لحاظ این دو اسید چرب مثبت تلقی شد چون غلظت این دو اسید چرب را کاهش داد در واقع کاهش معنی‌دار غلظت ۱٦:۰ به وسیله تیمار مونسین در آزمایش کنونی را می‌توان به مهار باکتری-های دخیل در بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیر اشباع به وسیله مکمل مونسین ارتباط داد. اما سطوح مختلف تاننیک اسید در حالی که غلظت اسید میریستیک را کاهش دادند در مقابل باعث افزایش غلظت اسید پالمیتیک شدند. اسید استئاریک (۱۸:۰)، فرآورده نهایی بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب ۱۸ کربنه غیر اشباع می‌باشد. با توجه به این که مونسین مرحله آخر بیوهیدروژناسیون (تبدیل ۱۸:۱ ترانس-۱۱ به استئاریک اسید) را مهار می‌کند، بنابراین مونسین غلظت اسید استئاریک را کاهش و غلظت اسیدهای چرب غیر اشباع را افزایش می‌دهد. هم‌چنین مکمل مونسین افزون بر مهار بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیر اشباع از هیدرولیز تری آسیل گلیسرول‌ها نیز ممانعت می‌کند که می‌تواند عامل دیگری برای کاهش غلظت اسید استئاریک و افزایش غلظت اسیدهای چرب غیر اشباع باشد. زیرا پیش نیاز بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیر اشباع، هیدرولیز تری آسیل گلیسرول‌ها و آزاد شدن اسیدهای چرب با گروه کربوکسیل آزاد است (کریستنسن و همکاران ۱۹۹٤). از بین سطوح مختلف تانن قابل هیدرولیز در آزمایش حاضر سطح ۷۵۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر کمترین غلظت واکسینیک اسید و سطوح ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین مقدار استئاریک اسید را به خود اختصاص دادند. در واقع سطح ۷۵۰ میلی‌گرم تاننیک اسید در لیتر با وجود کمترین غلظت واکسینیک اسید بیشترین غلظت استئاریک اسید را به خود اختصاص داد که می‌تواند به این دلیل باشد که تانن نتوانسته مرحله آخر بیوهیدروژناسیون را مهار کند. از آنجا که اسید ترانس واکسینیک (۱۸:۱ ترانس-۱۱) در سلول‌های پستان به وسیله آنزیم دلتا-۹ دساچوراز به

اسید لینولئیک کونژوگه (سیس-۹، ترانس-۱۱) تبدیل می‌شود (بومن و همکاران ۲۰۰۳). در آزمایش حاضر، مونسین باعث افزایش غلظت اسید لینولئیک کونژوگه (سیس-۹، ترانس-۱۱) شد ولی سطوح مختلف تانیک اسید با تیمار کنترل تفاوتی نداشتند. البته سطح ۲۵۰ میلی‌گرم تانیک اسید در لیتر در مقایسه با دو سطح دیگر (۵۰۰ و ۷۵۰) کمترین غلظت عددی اسید لینولئیک کونژوگه (سیس-۹، ترانس-۱۱) را به خود اختصاص داد. اسید لینولئیک کونژوگه (ترانس-۱۰، سیس-۱۲)، مهم‌ترین اسید چرب ترانس است که با مهار آنزیم‌های دخیل در سنتز اسیدهای چرب کوتاه و متوسط زنجیر، غلظت آنها در چربی شیر را کاهش می‌دهد (برنارد ۱۹۹۰). محققان گزارش کردند که مرحله آخر بیوهیدروژناسیون (تبدیل واکسینیک اسید به استئاریک اسید) نسبت به مراحل قبلی (که شامل تشکیل اسید لینولئیک کونژوگه می‌باشد) به میزان بیشتری توسط تانن تحت تاثیر قرار می‌گیرد (واستا و همکاران ۲۰۰۹). مقدار اسیدهای چرب غیر اشباع هم توسط تانن افزایش یافت البته تفاوت بین نتایج ما و دیگران می‌تواند به منبع، فعالیت و مقدار تانن و همچنین شرایط آزمایش نسبت داده شود. همچنین شکل فیزیکی جیره نیز بر الگوی اسیدهای چرب اثر قابل توجهی دارد. اسیدهای چرب غیراشباع در مواد کنسانتره‌ای از بیوهیدروژناسیون شکمبه‌ای فرار می‌کنند، بنابراین نسبت اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در شیر گاوهای تغذیه شده با مواد کنسانتره‌ای افزایش می‌یابد (جنکینز و همکاران ۲۰۰۸). همان طور که در جدول ۳ نشان داده شده است از لحاظ عددی مقدار اسیدهای چرب کوتاه زنجیر نسبت به بلند زنجیر کمتر بوده که می‌تواند به وجود کنسانتره بالا در جیره‌های آزمایشی نسبت داده شود.

Table 3- Effects of different tannic acid levels on the concentrations of fatty acids in the rumen fluid after 24 h of incubation

	Treatment[1]							Orthogonal comparisons [2]			
Fatty acid	C	M	TA_1	TA_2	TA_3	SEM[3]	P-value	1	2	3	4
10:0	6.10[a]	5.42[a]	3.62[b]	2.97[b]	2.60[b]	0.43	< 0.01	0.28	< 0.01	< 0.01	< 0.01
11:0	2.46[a]	3.17[a]	1.40[b]	1.15[b]	1.13[b]	0.20	< 0.01	< 0.01	0.20	< 0.01	< 0.01
12:0	7.40[a]	6.53[a]	1.15[b]	2.15[b]	1.05[b]	0.27	< 0.01	< 0.01	0.04	< 0.01	< 0.01
13:0	1.50[a]	1.20[b]	1.10[b]	0.97[b]	0.20[c]	0.06	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
14:0	6.67[a]	4.97[b]	1.90[c]	2.67[c]	3.17[c]	0.32	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
15:0	1.35[c]	2.05[a]	1.50[bc]	1.70[b]	1.40[c]	0.06	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.02	< 0.01
16:0	17.35[b]	20.22[b]	29.12[a]	27.37[a]	28.02[a]	0.84	< 0.01	< 0.01	0.05	< 0.01	< 0.01
16:1 n-7	0.87[b]	2.20[a]	0.60[b]	2.62[a]	1.10[b]	0.15	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
17:0	1.40[a]	0.77[a]	1.57[b]	1.00[a]	0.80[b]	0.06	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
18:0	10.40[a]	7.00[b]	7.00[b]	10.30[a]	9.80[ab]	0.68	< 0.01	0.02	< 0.01	0.10	< 0.01
18:1 *trans*-11	0.20[d]	3.20[a]	1.64[b]	1.90[b]	1.05[c]	0.06	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
18:1 n-9	10.65[d]	14.52[c]	20.65[a]	17.20[bc]	17.25[bc]	0.79	< 0.01	0.04	< 0.01	< 0.01	< 0.01
18:2 n-6	22.20[ab]	24.47[a]	17.97[c]	25.47[a]	20.40[bc]	1.11	< 0.01	0.03	0.17	0.02	0.48
18:2 *cis*-9 *trans*-11	0.57[b]	1.95[a]	0.45[b]	0.60[b]	0.88[b]	0.07	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.40	< 0.01
18:3 n-3	0.45[c]	1.10[b]	0.67[c]	0.59[c]	1.90[a]	0.08	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.65
SFA[4]	54.64[a]	51.34[ab]	48.37[b]	50.30[ab]	48.18[b]	1.24	< 0.01	< 0.01	0.08	< 0.01	0.11
USFA[5]	34.94[d]	47.45[ab]	41.98[c]	48.39[a]	42.58[bc]	1.20	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.04
SCFA[6]	15.96[a]	15.12[a]	6.27[b]	6.27[b]	4.78[b]	0.46	< 0.01	< 0.01	0.37	< 0.01	< 0.01
MCFA[7]	27.65[c]	30.22[bc]	35.37[a]	35.37[a]	34.50[a]	1.04	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
LCFA[8]	44.47[c]	52.25[ab]	56.07[a]	56.07[a]	51.28[a]	1.28	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.82

[1] Treatment: C = Control (without additive), M = 0.1 mg/L of monensin, TA_1 = 250 mg/L of tannic acid, TA_2 = 500 mg/L of tannic acid and TA_3 = 750 mg/L of tannic acid.

[2] Orthogonal comparisons: 1 = Comparison between C diet against M, TA_{10} = TA_{20} and TA_{30} diets, 2 = Comparison between C diet against M diet, 3 = Comparison between C against TA_1, TA_2 and TA_3 and 4 = Comparison between M against TA_1, TA_2 and TA_3.

[3] Standard error of means.

[4] Saturated fatty acids.

[5] Unsaturated fatty acids.

[6] Short chain fatty acids.

[7] Medium chain fatty acids.

[8] Long chain fatty acids.

نتیجه‌گیری کلی

سطوح مختلف تانیک اسید بر تولید گاز، فراسنجه‌های تخمیر شکمبه و غلظت اسیدهای چرب فرار در شرایط آزمایشگاه اثری نداشتند. اما تانیک اسید در سطوح مختلف باعث افزایش ۱۸:۱ (ترانس واکسینیک اسید) و غلظت کل اسیدهای چرب غیراشباع و کاهش غلظت کل اسیدهای چرب اشباع در محیط کشت شد. اگرچه اثر آن بر افزایش غلظت اسید لینولئیک کونژوگه (ترانس-۱۱، سیس-۱۲) و ۱۸:۱ (ترانس-۱۱) در مایع شکمبه در مقایسه با مونسین کمتر بود. بنابراین قابلیت استفاده از تانیک اسید به عنوان یک نوع تانن قابل هیدرولیز برای تغییر بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع در شکمبه نشخوارکنندگان وجود دارد.

منابع مورد استفاده

Abdi E, Fatahnia F, Dehghan Banadaki M, Azarfar A and Khatibjoo A, 2013. Effects of soybeans roasting and monensin on milk production and composition and milk fatty acid profile of lactating dairy cows. Livestock Science 153: 73-80.

Aguerre MJ, Capozzolo MC, Lencioni P, Cabral C and Wattiaux MA, 2016. Effect of quebracho-chestnut tannin extracts at 2 dietary crude protein levels on performance, rumen fermentation, and nitrogen partitioning in dairy cows. Journal of Dairy Science 99: 4476-4486.

Alipanahi Z, Fatahnia F, Jafari H, Taasoli G, Mirzaei-Alamouti H, Barrett D and Pormalekshahi A, 2019. Effect of oak acorn with or without polyethylene glycol in diets containing extruded soybean on milk fatty acid profile, ruminal fermentation and plasma metabolites of lactating goats. Livestock Science 221: 57-62.

Alzahal ONE, Odongo T, Mustvangwa MM, Or-Rashid TF, Duffield R, Bagg P, Dick G, Vessie and McBride BW, 2008. Effect of monensin and dietary soybean oil on milk fat percentage and milk fatty acid profile in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 91: 1166-1174.

Bauman DE, Perfiled JW, Veth MJ and Lock AL, 2003. New perspective on lipid digestion and metabolism in ruminants. Proceeding Cornell Nutrition Conference, pp. 175-189.

Bernard JK, 1990. Effect of raw or roasted whole soybeans on digestibility of dietary nutrients and milk production of lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 73: 3231-3236.

Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, Fraser GR, Colombatto D, McAllister TA and Beauchemin KA, 2008. Areview of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Animal Feed Science and Technology 145: 209-228.

Bhatta R, Vaithiyanathan S, Singh NP, Shinde AK and Verma DL, 2005. Effect of feeding tree leaves as supplements on the nutrient digestion and rumen fermentation pattern in sheep grazing semi-arid range of India. Small Ruminant Research 60: 273–280.

Broderick GA and Kang JH, 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. Journal of Dairy Science 63: 64-75.

Buccioni A, Mineiri S, Rapaccini S, Antongiovanni M and Mele M, 2011. Effect of chestnut and quebracho tannins on fatty acid profile in rumen liqud- and solid-associated bacteria: an *in vitro* study. Journal of Animal Science 5: 1521-1530.

Buccioni A, Pauselli M, Viti C, Minieri S, Pallara G, Roscini V, Rapaccini S, Trabalza Marinucci MT, Lupi, P, Conte G, Mele M, 2015. Milk fatty acid composition, rumen microbial population, and animal performances in response to diets rich in linoleic acid supplemented with chestnut or quebracho tannins in dairy ewes. Journal of Dairy Science 98: 1145-1156.

Carreño D, Hervás G, Toral PG, Belenguer A and Frutos P, 2015. Ability of different types and doses of tannin extracts to modulate in vitro ruminal biohydrogenation in sheep. Animal Feed Science and Technology 202: 42-51.

Carulla JE, Kreuzer M, Machmuller A and Hess HD, 2005. Supplementation of Acacia mearnsii tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. Australian Journal of Agricultural Research 56: 961-970.

Christensen RA, Drackley JK, La Count DW and Clark JH, 1994. Infusion of four long-chain fatty acid mixtures into the abomasum of lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 77: 1052–1069.

Duffield TF, Rabiee AR and Lean IJ, 2008. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. Journal of Dairy Science 91: 1334-1346.

Dschaak CM, Williams CM, Holt MS, Eun JS, Young AJ and Min BR, 2011. Effects of supplementing condensed tannin extract on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production of lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 94: 2508-2519.

El-Waziry AM, Nasser MEA, Sallam SMA, Abdallah AL and Bueno ICS, 2007. Processing method of soyabean meal: Effect of autovlaving and Qucbraho tannin treated soybean meal on gas production and rumen fermentation *in vitro*. Journal Applied Science 3: 17-24.

Gonthier C, Mustafa, AF, Ouellet DR, Chouinard PY, Berthiaume R and Petit HV, 2005. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: Effects on blood parameters and milk fatty acid composition. Journal of Dairy Science 88: 748-756.

Gonzalez S, Pabon ML and Carulla J, 2002. Effect of tannins on *in vitro* ammonia release and dry matter degradation of soybean meal. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 10: 97-101.

Hristov AN and Ropp JK, 2003. Effect of dietary carbohydrate composition and availability on utilization of ruminal ammonia nitrogen for milk protein synthesis in dairy cows. Journal of Dairy Science 86: 2416–2427.

Ipharraguerre IR and Clark JH, 2003. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: A review Animal Feed Science and Technology 106: 39-57.

Ishlak A, Günal M and AbuGhazaleh AA, 2015.The effects of cinnamaldehyde, monensin and quebrachocondensed tannin on rumen fermentation, biohydrogenationand bacteria in continuous culture system. Animal Feed Science and Technology 207: 31-40.

Jayanegara A, Kreuzer M and Leiber F, 2012. Ruminal disappearance of polyunsaturated fatty acids and appearance of biohydrogenation products when incubating linseed oil with alpine forage plant apecies *in vitro*. Livestock Science 147: 104-112.

Jenkins TC, Wallace RJ, Moate PJ and Mosley EE, 2008. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. Journal of Animal Science 86: 397-412.

Jones, GA, McAllister TA, Cheng K.J and Muir AD, 1994. Effect of sainfon condensed tannins on growth and proteolysis by 4 strains of rumen bacteria. Applied Environmental Microbiology 60: 1374-1378.

Kaleem A, Enjalberta F, Farizon Y and Troegeler-Meynadier A, 2013. Effect of chemical form, heating, and oxidation products of linoleic acid on rumen bacterial population and activities of biohydrogenating enzymes. Journal of Dairy Science 96: 7167-7180.

Khiaosa-Ard R, Bryner SF, Scheeder MRL, Wettstein HR, Leiber F, Kreuzer M and Soliva CR, 2009. Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal α- linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. Journal of Dairy Science 92: 177-188.

Khodamoradi SH, Fatahnia F, Taherpour K, Pirani V, Rashidi L and Azarfar A, 2013. Effect of monensin and vitamin E on milk production and composition of lactating dairy cows. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 97: 666-674.

Makkar HPS, 2010. *In vitro* Screening of Feed Resources for Efficiency of Microbial Protein Synthesis. In: Vercoe PE, Makkar HPS and Schlink AC. (Eds.). *In vitro* Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies. IAEA, Dordrecht, the Netherlands, pp. 107–144.

Makkar HPS, Blummel M and Becker K., 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidone and polyethylene glycol with tannins and their implications in gas production and true digestibility in vitro techniques. British Journal of Nutrition 73: 897-913.

McAllister TA, Bae HD, Yanke LJ, Cheng KJ and Muir A, 1994. Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on the endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. Canadian Journal of Microbiology 40: 298–305.

McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD and Morgan CA, 1995. Animal Nutrition. 5th Edition. Oliver and Boyd Publishers (UK). pp. 607.

McGuffey RK, Richardson LF and Wilkinson JID, 2001. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. Journal of Dairy Science 84 (E. Suppl.): E194-E203.

McSweeney CS, Palmer BD, McNeill M and Krause DO, 2001. Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants. Animal Feed Science and Technology 91: 83-93.

Min BR, Barry TN, Attwood GT and McNabb WC, 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. Animal Feed Science and Technology 106: 3–19.

Min BR, Pinchak WE, Fulford JD and Puchala R, 2005. Effect of feed additives on in vitro and in vivo rumen characteristics and frothy bloat dynamics in steers grazing wheat pasture. Animal Feed Science and Technology 123: 615–629.

Minieri S, Buccioni A, Rapaccini S, Pezzati A, Benvenuti D, Serra A and Mele M, 2014. Effect of quebracho tannin extract on soybean and linseed oil biohydrogenation by solid associated bacteria: an *in vitro* study. Italian Journal of Animal Science 13: 604-608.

Mohammadabadi T, Chaji M, Eslami M and Bojarpour M, 2009. The evaluation of the effect of oak leave on *in vitro* rumen fermentation of soybean meal. Research Journal Biological Sciences 11: 1190-1192.

National Research Council, 2001. Nutrient Requirements of Dairy cattle, 7th Rev. ed, National Academy press, Washington DC, USA, 2001.

Neves CA, Santos GT, Matsushita M, Alves EM, Oliveira RL, Branco AF, Silva DC, Furlan AC and Petit HV, 2007. Intake, whole tract digestibility, milk production and milk composition of Holstein cows fed extruded soybeans treated with or without lignosulfate. Animal Feed Science and Technology 134: 32-44.

Oelker ER, Reveneau C and Firkins JL, 2009. Interaction of molasses and monensin in alfalfa hay- or corn silage-based diets on rumen fermentation, total tract digestibility, and milk production by Holstein cows Journal of Dairy Science 92: 270–285.

Odongo NE, Or-Rashid MM, Bagg R, Vessie G, Dick P, Kebreab E, France J and McBride BW, 2007. Long-term effect of feeding monensin on milk fatty acid composition in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 90: 5126-5133.

Ottensin DM and Batlar DA, 1971. Improved gas chromatography separation of feed acids C2- c5 in solution. Analytical Chemistry 43: 952- 955.

Patra AK, 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. Asian Journal Animal Veterinary Advances 6: 416-428.

Ponce CH, Smith DR, Branine ME, Hubbert ME and Galyean ML, 2012. Effects of type of ionophore and carrier on *in vitro* ruminal dry matter disappearance, gas production, and fermentation end products of a concentrate substrate. Animal Feed Science and Technology 171: 223- 229.

Prive F, Combes S, Cauquli L, Farizon Y, Enjalberta F and Troegeler-Meynadier A, 2010. Temperature and duration of heating of sunflower oil affect ruminal biohydrogenation of linoleic acid in vitro. Journal of Dairy Science 93: 711-722.

Reddy PV, Morrill JL and Nagaraja TG, 1994. Release of free fatty acids from raw or processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibility. Journal of Dairy Science 77: 3410-3416.

SAS Institute, 2000. SAS User's Guide: Statistics. Version 8.01 ed. SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina.

Shingfield, K. J, Bonnet M and Scollan ND, 2013. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. Journal of Animal Science 7: 132-162.

Sliwiniski BJ, Soliva CR, Machmuller A and Kreuzer M, 2002. Effects of plant rich in secondary constituents modify rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology 101: 101-114.

Troegeler-Meynadier A, Nicot MC and Enjalbert F, 2006. Effects of heating process of soybeans on ruminal production of conjugated linoleic acids and trans-octadecenoic acids in situ. Revue de Médecine Vétérinaire (Toulouse) 157: 509–514.

Troegeler-Meynadier A, Puaut S, Farizon Y and Enjalberta F, 2014. Effect of the heating process of soybean oil and seeds on fatty acid biohydrogenation *in vitro*. Journal of Dairy Science 97: 5657-5667.

Vasta V, Makkar HPS, Mele M and Priolo A, 2009. Ruminal biohydrogenation as affected by tannins *in vitro*. British Journal of Nutrition 102: 82-92.

Waghorn G, 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. Animal Feed Science and Technology 147: 116-139.

Effect of tannic acid on *in- vitro* ruminal fermentation parameters and fatty acid profile

F Fatahnia[1*], A Khatibjoo[1], HR Mirzaei Alamouti[2], L Rashidi[3], N Rahimi[4] and S Yousefinezhad[4]

Received: January 15, 2020 Accepted: June 22, 2020
[1]Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
[2] Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran
[3]Assistant Professor, Institute of Standard and Industrial Research of Iran, Karaj, Iran
[4]Graduated MSc PhD Students respectivly, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
*Corresponding author: Email: f.fatahnia@yahoo.com

Journal of Animal Science/vol.31 No.1/ 2021/pp 37-51
https://animalscience.tabrizu.ac.ir

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)
DOI: 10.22034/as.2021.37905.1546

Introduction: Meat and dairy products from ruminants are the main source of vaccenic acid (VA) and conjugated linoleic acid (CLA) in human nutrition. In particular, the isomer of *cis*-9, *trans*-11 CLA is active in the prevention of cancer and atherosclerosis in human (Belury 2002). Conjugated linoleic acid is partially synthesized in the rumen by cellulolytic bacteria, and mainly by *Butyrivibrio* spp. during the biohydrogenation (BH) of linoleic acid (*cis*-9, *cis*-12 C18:2, LA). However, the largest proportion of milk CLA is endogenously produced in the mammary gland by the action of Δ^9-desaturase on vaccenic acid (*trans*-11 C18:1, VA), which is another product of the ruminal BH (Jenkins et al. 2008; Shingfield et al. 2013). In the last decade several efforts have been made in order to develop efficient enrichment strategies of VA and CLA in ruminant products (Shingfield et al. 2013). The main strategy to enhance these beneficial fatty acids (FAs) content in food is manipulating ruminant feeding and modulating rumen BH. Tannins are phenolic compounds that are chemically classified as hydrolysable (HT) or condensed (CT). Tannins extracted from chestnut and oak are HT and those extracted from quebracho are an example of CT (Waghorn 2008). Tannic acid (TA) is a commercial HT. Tannins have been reported to modify ruminal fermentation by inhibiting ammonia and methane production (Carulla et al. 2005) partially by forming complexes with dietary protein and fiber (Waghorn 2008). It is widely known that tannins can bind to proteins and inhibit the growth of ruminal bacteria (Min et al. 2003). Concerning lipid metabolism, tannins were shown to inhibit *Butyrivibrio fibrisolvens* (Jones et al. 1994), one of the bacterial species known to be a major microbial species involved in ruminal BH (Jenkins et al. 2008). *In-vitro* and *in vivo* studies have suggested that feeding tannins to ruminants can favorably alter the ruminal BH of dietary linoleic acid, enhancing accumulation of VA in the rumen and thereby the content of some human health promoting FAs, such as VA and CLA in dairy or meat products. However, reports on impacts of these phenolic compounds are very limited and inconsistent. The main objective of the present study was to verify the *in-vitro* inhibitory effect of TA on ruminal BH of extruded soybean seeds containing diet.

Material and methods: Basal diet was formulated to contain high concentrate to forage ratio (58.2:41.8) and extruded soybeans as unsaturated FA source. Experimental treatments consisted of control (C; without additive), 0.1 mg/L of monensin (M), 250 mg/L of tannic acid (TA_1), 500 mg/L of tannic acid (TA_2) and 750 mg/L of tannic acid (TA_3). Sample of basal diet was oven dried at 60°C

in a forced air oven for 48 h, ground to pass through a 1-mm screen using a Wiley mill. The rumen fluid was collected from two Holstein cows fed alfalfa a mixture of hay and wheat straw (700:300 g/kg on a DM basis) *ad libitum*. Ruminal fluid was filtered through four layers of cheese cloth and transferred quickly to the laboratory in anaerobic condition at 39° C and was continuously purged with oxygen free CO_2 to maintain anaerobic conditions. The buffer solution was prepared according to the method of Makkar et al. (1995) and mixed with rumen fluid in the 3:1 (v/v) ratio. Incubation was carried out in 150 mL bottles containing 200 mg of the basal diet and 40 mL of buffered rumen fluid. Gas production (GP) after 24 h incubation, ruminal volatile FA (VFA), ammonia-N and pH and FA profile were measured.

Results and discussion: The results showed that gas production (GP) and ruminal fluid concentration of ammonia-N and volatile fatty acid (VFA) were not affected by the additives ($P > 0.05$). Alipanahi el al. (2019) reported no effect of oak acorn (HT source) on ruminal pH and VFA concentration in lactating does. The capacity and trend of tannins to bind to specific proteins may be dependent on the type of protein (Gonzalez et al. 2002). In our experiment, TA was expected to reduce ruminal ammonia-N concentrations. The lack of effect of TA on ruminal ammonia-N may be related to the type of protein source as well as the processing method. In the current experiment, we used extruded soybeans, which may have lost its integrity and the ability to bind to TA. Ruminal fluid C10:0 to C14:0 concentrations decreased and C16:0 increased by TA ($P<0.05$). The M and TA_1 treatments had lower ruminal fluid C18:0 concentration compared with the other treatments ($P<0.05$). The highest *trans*-11 C18:1 (VA) and *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid (CLA) were observed in M treatment ($P<0.05$). Ruminal fluid unsaturated (USFA) and long-chain (LCFA) fatty acid concentrations were increased in TA_2 compared with the other treatments ($P<0.05$). Vasta et al. (2009) reported higher VA and lower stearic acid concentrations by different sources of tannin in an *in-vitro* study, but concentrations of CLA isomers were not affected. They concluded that tannins prevented BH of USFA by inhibiting the growth of microorganisms. Similar to our results, feeding diet containing oak acorn (as a source of HT) increased and decreased USFA and SFA concentrations in does milk fat, respectively (Alipanahi et al. 2019).

Conclusion: Our results confirmed that addition of TA to a diet containing extruded soybean seeds can modify BH pathways without any negative effect on ruminal fermentation. Consequently, TA can potentially stimulate beneficial FA in ruminant products, although more researches need to confirm these results.

Keywords: Extruded soybeans, Fatty acid biohydrogenation, Gas production, Ruminal fermentation, Tannic acid