



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان

جلد چهارم، شماره دوم، ۱۳۹۵

<http://ejrr.gau.ac.ir>

تأثیر ارقام مختلف پوست انار بر قابلیت هضم ماده خشک، جمعیت پروتوزا و تولید گاز متان به روش آزمایشگاهی

وحیده رزم آذر^۱، نورمحمد تربتی نژاد^۲، جمال سیف دواتی^۳ و سعید زره‌داران^۴

^۱دانشجوی دکتری و ^۲استاد گروه تغذیه دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۳استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی، ^۴استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۲۸

چکیده

سابقه و هدف: ایران علاوه بر مرکز پیدایش انار و رویشگاه طبیعی آن، مرکز تنوع ارقام و نیز بزرگترین تولیدکننده انار در جهان می‌باشد. پوست انار تقریباً ۲۶-۳۰ درصد وزن کل میوه را تشکیل می‌دهد، در سال‌های اخیر فعالیت‌های بیولوژیکی پلی‌فنلی‌های پوست انار توجه بسیاری از پژوهشگران و مصرف‌کنندگان را به خود جلب کرده است. اثرات تانن بر میکروارگانیسم‌های تولیدکننده متان در شکمبه و پروتوزا به اثبات رسیده است، همچنین تأثیر آن بر کینتیک تولید گاز و تخمیر شکمبه‌ای با توجه به نوع گیاه بسیار متفاوت گزارش شده است. لذا این تحقیق به منظور بررسی ترکیب شیمیایی، مواد پلی‌فنولی، پویایی تولید گاز، قابلیت هضم ظاهری و حقیقی ماده خشک، میزان تولید گاز، متان و تعداد پروتوزوا شکمبه‌ای سه رقم مختلف پوست انار (ترش جنگلی گرگان، ملس بهشهر و شیرین کلباد) به روش آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها: پوست ارقام مورد نظر در زمان برداشت (فصل پاییز) از نقاط مختلف استان گلستان جمع‌آوری و خشک گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار و چهار تکرار اجرا شد. بعد از آزمون گاز ابتدایی برای ارزیابی الگوی تولید گاز طی ۹۶ ساعت انکوباسیون، زمان نصف حداکثر گاز تولیدی ($t_{1/2}$) محاسبه شد و سپس طی دو مرحله دیگر آزمون گاز برای زمان ۲۴ ساعت و $t_{1/2}$ برای هر سوبسترا اجرا شد. قابلیت هضم حقیقی ماده خشک با استفاده از باقیمانده مواد انکوباسیون شده اندازه‌گیری شد و ضریب تفکیک (PF)، توده میکروبی، تولید گاز متان، pH و تعداد پروتوزوا نیز اندازه‌گیری و محاسبه شدند.

*نویسنده مسئول: n_torbatinejad@yahoo.com

یافته‌ها: بیشترین مقدار پروتئین خام در رقم شیرین کلباد (۴/۰۱٪) و بیشترین مقدار چربی خام (۱/۸۷٪) و ADF (۱۹/۶۲٪) در رقم ترش جنگلی گرگان مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). ترکیبات فنولی کل در رقم ترش جنگلی با مقدار ۸/۹۱٪ و تانن کل با مقدار ۸/۰۶٪ در رقم ملس بهشهر بالاتر از بقیه ارقام بود. میزان تجزیه‌پذیری ظاهری و حقیقی ماده خشک، پروتئین میکروبی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر برآورد شده، در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون در پوست انار شیرین کلباد (به ترتیب ۰/۳۴۷، ۰/۵۹۰ (میلی‌گرم) و ۵۰۰/۷۹ (گرم بر کیلوگرم ماده خشک)، و ۰/۹ (میلی‌مول) بود که این روند در زمان ۱/۲ نیز مشاهده شد. با این حال در هر دو زمان اندازه‌گیری، مقدار گاز متان کمتری از رقم شیرین کلباد تولید شده بود. تعداد پروتوزوا شمارش شده در زمان ۱/۲ در رقم ترش جنگلی گرگان به طور معنی‌داری بالاتر از بقیه رقم‌ها بود ($P < ۰/۰۵$). این افزایش می‌تواند به دلیل بیشتر بودن فیبر این رقم باشد که پروتوزواها به آن می‌چسبند ولی با گذشت زمان (زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون) از مقدار آنها کاسته شد.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی نتایج این پژوهش نشان دادند که پوست انار (ترش جنگلی گرگان، ملس بهشهر و شیرین کلباد) به عنوان یکی از ضایعات مهم کشاورزی در ایران به دلیل داشتن ترکیبات فنولی و تانن دارای فعالیت بازدارنده علیه تعدادی از میکروارگانیسم‌های دخیل در تولید متان و همچنین پروتوزواها می‌باشد. بنابراین، می‌توان مخلوطی از رقم‌ها را برای دستکاری تخمیر شکمبه و کاهش تولید گاز متان استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پوست انار، تانن، تخمیر شکمبه‌ای، متان، پروتوزوا

مقدمه

تغییرات اقلیمی و گرم شدن زمین ناشی از افزایش گازهای گلخانه‌ای در جو از چالش‌های اصلی بشر در قرن حاضر است. سازمان ناسا سرعت افزایش دمای زمین را طی ۵۰ سال اخیر دو برابر بیان کرده است (۳۳). گاز متان یکی از این گازهای گلخانه‌ای است که تاثیر آن در گرمایش زمین حدود ۲۰ برابر بیشتر از دی‌اکسید کربن است. انتشار گاز متان حاصل از تخمیر مواد خوراکی در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان حدود ۳۰-۴۰٪ از کل متان تولیدی ناشی از منابع کشاورزی را تشکیل می‌دهد که سهم بزرگی در این چالش زیست محیطی دارد (۳۲). نشخوارکنندگان در هر روز می‌توانند ۲۵۰ تا ۵۰۰ لیتر گاز متان تولید کنند که به تبع آن حدود ۲ تا ۱۲ درصد از انرژی خام مصرفی را بدین صورت از دست می‌دهند (۲۲). اتلاف بخشی از انرژی به صورت متان توسط نشخوارکنندگان و سهم قابل توجه آن در تولید گازهای گلخانه‌ای ضرورت کاهش دفع متان احشایی را بدون تغییر تولیدات هم به عنوان استراتژی جهانی کاهش گازهای گلخانه‌ای و هم بهبود ضریب تبدیل غذایی ایجاب می‌نماید.

اخیراً مواد فیتوشیمیایی یا ترکیبات فعال گیاهی مختلفی از محدوده وسیعی از گونه‌های گیاهی، جداسازی و از نظر اثر بر تخمیر شکمبه و بهبود قابلیت تولیدی حیوان مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱)، (۳۹). ترکیبات فعال گیاهی، ترکیبات آلی مشتق شده از متابولیسم ثانویه گیاه هستند که به چهار گروه پلی فنول‌ها و تانن‌ها، ساپونین‌ها، ارگانوسولفورها و روغن‌های ضروری تقسیم می‌شوند و فعالیت ضد میکروبی آنها بر علیه تعدادی از مخمرها، باکتری‌ها و کپک‌ها به اثبات رسیده است (۸). پتانسیل این ترکیبات و به خصوص پلی فنول‌ها (تانن‌ها) و ساپونین‌ها در کاهش متان تولیدی توسط تخمیر در نشخوارکنندگان طی تحقیقات زیادی به اثبات رسیده است. فعالیت ضد میکروبی و تاثیر بر فعالیت تخمیری شکمبه توسط این ترکیبات بستگی به ماهیت، فعالیت و مقدار آنها دارد (۲۰).

انار یکی از قدیمی‌ترین میوه‌هایی است که به طور وسیع در بسیاری از کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری کشت می‌شود (۱۸، ۳۷). ایران با تولید سالانه بیش از ۶۵۰ هزار تن، حدود ۴۷ درصد تولید جهانی انار را در اختیار دارد (۱۴). مقدار قابل توجهی پوست انار در نتیجه تولید صنعتی فراورده‌های انار شامل کنسانتره، آب و رب انار به صورت ضایعات باقی می‌ماند که در ایران به بیش از ۱۲۰۰۰۰ تن در سال می‌رسد (۳۱). پوست انار دارای میزان قابل توجهی ترکیبات فنولی با وزن مولکولی بالا شامل فلاونوئیدها، پروآنتوسیانیدین، پلی ساکاریدهای پیچیده و الازی تانن‌هایی مانند الازیک اسید،

گالیک اسید، پونیکالازین و پونیکالین و مقداری میکروالمنت‌ها می‌باشد که عامل خواص آنتی-اکسیدانی، ضد میکروبی، ضدسرطانی آن بیان شده است (۱۸ و ۲۳).

الاژی‌تانن‌ها یا تانن‌های قابل هیدرولیز پوست انار ترکیباتی با وزن مولکولی بالا و قابل حل در آب هستند که اغلب عامل آنتی اکسیدانی آن به شمار می‌آیند (۱۸، ۴۴). تانن‌ها گروهی از مواد با قابلیت باند شدن به پروتئین‌ها در محیط آبی هستند. گروه‌های هیدروکسیلی فنلی تانن‌ها قادر به ایجاد پیوند هیدروژنی قوی با پروتئین‌ها، و مقدار کمتر با یون‌ها، اسیدهای آمینه و پلی‌ساکاریدها هستند (۲۵). در نتیجه ساختار فنولیکی به پاره شدن غشاء سلول، غیرفعال شدن آنزیم‌ها، و کاهش سوپسترا و یون‌های فلزی لازم برای متابولیسم سلولی می‌انجامد (۱، ۸). میزان ترکیبات فنولی پوست انار در تحقیقات مختلف متفاوت بیان شده است. تهرانی فر و همکاران (۲۰۱۰) در پوست انار رقم‌های ایرانی میزان فنول کل را ۲۹۸/۷۹ تا ۹۸۵/۵ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ گرم و تانن متراکم را ۱/۱ تا ۶۳/۳ (میلی‌گرم سیانیدین/۱۰۰گرم) گزارش کرده‌اند (۴۲). مازندرانی و همکاران (۲۰۱۱) نیز میزان فنول کل را در رویشگاه‌های مختلف بین ۲۸۴ تا ۳۷۲ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در ۱۰۰ گرم بیان کرده‌اند (۲۸).

میرزایی آغساقالی و همکاران (۲۰۱۱) بیان کرده‌اند که میزان تولید گاز حاصل از تخمیر به روش آزمون گاز پوست انار نسبت به دانه آن به‌طور معنی‌داری بیشتر است (۳۱). طاهر مداح و همکاران (۲۰۱۲) نیز با ارزیابی ارزش غذایی پوست انار سیلو شده و خشک شده با روش تولید گاز، گزارش کردند که اگرچه میزان گاز تولیدی از پوست انار خشک شده در ۲۴ ساعت بالاتر بود اما میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، قابلیت هضم ماده آلی و انرژی قابل متابولیسم برای هر دو گروه مشابه بود (۴۰). گزارش شده است که سطوح مختلف تانن اثرات مفیدی بر متابولیسم پروتئین در نشخوارکنندگان دارد، از جمله باعث کاهش تجزیه شکمبه‌ای پروتئین جیره و افزایش جذب اسیدهای آمینه از روده می‌شود (۱۵). همچنین تانن‌ها اثرات منفی بر غلظت اسیدهای چرب فرار در شکمبه دارند (۵). به‌علاوه تانن‌ها دارای خاصیت ضد میکروبی بر روی باکتری‌های تجزیه‌کننده سلولز و پروتئین هستند (۱۶). از سوی دیگر اثرات ضد متانوژنیک گیاهان حاوی تانن به خوبی اثبات شده است. تانن‌ها با تأثیر مستقیم بر تولید متان و اثر غیر مستقیم بر تولید هیدروژن با کاهش تجزیه‌پذیری خوراک باعث کاهش اتلاف انرژی از طریق متان تولیدی می‌شوند. تحقیقات مختلف کاهش ۲۴ تا ۳۰ درصدی متان تولیدی توسط نشخوارکنندگان مصرف‌کننده خوراک تانن‌دار را گزارش کرده‌اند (۱۰ و ۴۳). تاکنون

بیشتر تحقیقات انجام شده بر روی پوست انار بر روی گونه‌های مختلف باکتری‌ها و بیماری‌ها و خواص آنتی‌اکسیدانی آن بوده اما تاثیر آن بر روی پروتوزوهای شکمبه و پویایی تخمیر و تولید گاز کمتر کار شده است. بنابراین، این تحقیق به منظور تعیین ترکیبات شیمیایی رقم‌های مختلف پوست انار (ترش جنگلی گرگان، ملس بهشهر و شیرین کلباد) و ارزیابی اثرات آنها بر تولید گاز آزمایشگاهی و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه مانند تولید پروتئین میکروبی، تعداد پروتوزا و تولید گاز متان انجام شد.

مواد و روش‌ها

حیوان و محل آزمایش: این آزمایش در محل گوسفندداری آموزشی - تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و نیز آزمایشگاه تغذیه دام دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. از انارهای کشت شده در استان گلستان، سه رقم ترش جنگلی گرگان، شیرین کلباد و ملس بهشهر به عنوان نمونه‌های مورد آزمایش انتخاب و در فصل برداشت (پاییز) به مقدار کافی تهیه شد. سپس پوست از بقیه قسمت‌های میوه به صورت دستی جدا شد. نمونه‌ها در دمای ۶۰ درجه سلسیوس با آون خشک و سپس با آسیاب دارای الک یک میلی-متری آسیاب گردید.

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی: نمونه‌ها از نظر ترکیبات شیمیایی شامل، ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام، خاکستر بر طبق روش‌های پیشنهادی AOAC (۱۹۹۰) و دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی سلولز با استفاده از روش ون سوست و همکاران (۱۹۹۱) اندازه‌گیری شدند (۳، ۴۶).

تعیین ترکیبات فنلی و تانن: ترکیبات فنلی کل (TP) قابل استخراج با استفاده فولین شیکالتیو اندازه‌گیری شد (مککار، ۲۰۰۳). برای استخراج ترکیبات فنولی از محلول استون ۷۰ درصد استفاده گردید. کل تانن‌های قابل استخراج (TT) از تفاوت بین فنول‌های کل قابل استخراج و ترکیبات فنلی باقیمانده پس از جذب تانن توسط پلی‌وینیل‌پیرولیدین (PVP) بدست آمد. از اسید تانیک به عنوان استاندارد برای تعیین مقدار TP و TT استفاده گردید. هر یک از استانداردها و نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت شد. میزان تانن متراکم بر اساس روش پورتر و همکاران (۱۹۸۶) با استفاده از دی پلیمریزاسیون اکسیداتیو بوتانل - اسید کلریدریک در مجاورت آهن در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳۶). میزان تانن متراکم (درصد در ماده خشک) به صورت اکی‌والان‌های لوکوآنتوسیانیدین محاسبه گردید. میزان تانن‌های قابل هیدرولیز نیز از تفاوت بین تانن کل و تانن متراکم به دست آمد (۴). (برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد).

اندازه‌گیری میزان گاز تولید: جهت اندازه‌گیری تولید گاز از ابزار و دستگاه‌های مربوط به این تکنیک واقع در آزمایشگاه تغذیه دام دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی استفاده شد. در این روش از شیرابه شکمه ۲ راس گوسفند مغانی فیستوله‌گذاری شده استفاده گردید. شیرابه شکمه در اول صبح قبل از توزیع خوراک گرفته شد. میانگین وزن گوسفندان ۴۰ کیلوگرم بود، که در شرایط مزرعه تحقیقاتی با جیره یونجه خشک، جو به نسبت ۶۰ به ۴۰ در در سطح احتیاجات نگهداری دو بار در روز، ساعات ۸ و ۱۷ تغذیه می‌شدند.

ابتدا نمونه خوراک مورد آزمایش با آسیاب دارای الک یک میلی‌متری آسیاب شد. از نمونه آسیاب شده مقدار (± 5) ۲۰۰ میلی‌گرم از ماده خشک نمونه در داخل سرنگ مخصوص قرار داده شد. پیستون سرنگ با واژلین چرب شد تا حرکت آن در درون سیلندر به راحتی صورت گیرد. سرنگ‌ها در دستگاه بن‌ماری با دمای ۳۹ درجه سلسیوس قرار داده شد. شیرابه شکمه هر گوسفند قبل از خوراک دادن صبح در فلاسک جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. شیرابه با استفاده از پارچه پنبه‌سازی و تحت گاز CO_2 و دمای ۳۹ درجه سلسیوس صاف گردید. محلول‌های مورد نیاز برای تهیه بزاق مصنوعی بر اساس روش منک و استینگس (۱۹۸۸) تهیه شد (۲۹). ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط مایع شکمه و بزاق به نسبت ۲ به ۱ برداشته و به سرنگ حاوی نمونه انتقال داده شد برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. برای تصحیح گاز تولیدی ناشی از مایع شکمه، در هر آزمایش ۳ سرنگ به عنوان شاهد و فاقد نمونه و حاوی شیرابه شکمه و محیط کشت در نظر گرفته شد. سپس میزان گاز تولیدی در زمان‌های ۳، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از انکوباسیون ثبت گردید. آزمایش تولید گاز یک بار برای زمان $t_{1/2}$ و یکبار برای زمان ۲۴ ساعت نیز انجام شد.

بلافاصله پس از پایان دوره انکوباسیون در $t_{1/2}$ ، ۲۴ و ۹۶ ساعت محتویات سرنگ‌ها از میان ۴ لایه گاز استریل صاف شده و pH آن با استفاده از دستگاه pH متر (827 pH lab metrohm, Swiss made) اندازه‌گیری شد. بعد از سانتریفیوژ محتوی سرنگ‌ها، باقی‌مانده تخمیر با آون و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. اتلاف وزن سوبسترا بعد از آون به عنوان ماده خشک تجزیه شده به صورت میلی‌گرم/گرم ماده خشک تعیین شد (۲۷).

برای تخمین تولید گاز از معادله اورسکوف و مکدونالد (۱۹۷۹) طبق رابطه (۱) استفاده شد (۳۴).

$$GP = B \times (1 - e^{-c(t-L)}) \quad \text{رابطه (۱):}$$

که در این رابطه: GP حجم گاز تولیدی در زمان t ، B پتانسیل تولید گاز (میلی لیتر به ازای ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)، c: نرخ تولید گاز (میلی لیتر در ساعت) و L زمان تاخیر تولید گاز به ساعت هستند. انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) و قابلیت هضم ماده آلی (درصد) با استفاده از معادله منک و همکاران (۱۹۷۹) محاسبه گردید (۳۰):

$$ME (MJ/Kg DM) = 2/20 + 0/136GP + 0/057 CP \quad (\text{رابطه ۲})$$

$$IVOMD \% = 14/88 + 0/889 GP + 0/45 CP + 0/0651 X \quad (\text{رابطه ۳})$$

DM = ماده خشک، CP = درصد پروتئین خام، IVOMD = قابلیت هضم ماده آلی به روش آزمایشگاهی، XA = درصد خاکستر و GP = میلی لیتر گاز خالص تولیدی از ۲۰۰ میلی گرم نمونه خشک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون.

تعیین نیمه عمر تولید گاز ($t_{1/2}$): پس از به پایان رسیدن کامل انکوباسیون در طی ۹۶ ساعت، نیمه عمر تولید گاز یعنی زمانی که نیمی از حداکثر گاز تولید شده بود با استفاده از رابطه ۴ محاسبه گردید و سپس دور دوم انکوباسیون با هدف متوقف کردن آن در زمان ($t_{1/2}$) و ۲۴ ساعت انجام شد.

$$t_{1/2} = (\ln 2/c) + L \quad (\text{رابطه ۴})$$

$t_{1/2}$ = نیمه عمر تولید گاز (ساعت)، c = نرخ تولید گاز از بخش نامحلول در زمان (میلی لیتر بر ساعت)، L = فاز تأخیر (ساعت)

تعیین تجزیه پذیری حقیقی ماده خشک (ivTDDM): بعد از پایان دوره اول انکوباسیون به مدت ۹۶ ساعت و محاسبه

$t_{1/2}$ ، یک دوره انکوباسیون برای به دست آوردن میزان تجزیه پذیری حقیقی سوپسترا انجام شد (۲). پس از طی زمان $t_{1/2}$ و ۲۴ ساعت، انکوباسیون متوقف و میزان گاز تولیدی ثبت شد. جهت تعیین تجزیه پذیری حقیقی ماده خشک (ivTDDM)، با فرض حذف کامل بقایای میکروبی به وسیله شوینده (۴۵)، مواد باقیمانده هضم با استفاده از محلول شوینده خنثی به مدت یک ساعت جوشانده شد. مواد

1. *In vitro* organic matter digestability
2. *In vitro* truly degraded dry matter

باقیمانده کاملاً شسته شده و پس از انتقال به کروزه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت ابتدا خشک شده و سپس توزین گردید.

تعیین ضریب تفکیک (PF)، پروتئین میکروبی (MP) و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA): ضریب تفکیک (PF) پس از زمان‌های مختلف انکوباسیون (مقیاسی از بازده تخمیر) به صورت نسبت ماده خشک تجزیه شده واقعی (ivTDDM) به حجم گاز (میلی لیتر) تولید شده پس از انکوباسیون (یعنی ماده آلی تجزیه شده واقعی/کل تولید گاز (GP) طبق رابطه ۵ محاسبه شد (۶)).

$$\text{PF} = \text{ivTDDM (mg)} / \text{GP (ml)} \quad \text{(رابطه ۵):}$$

تولید پروتئین میکروبی (MP) با استفاده از روش بلومل و همکاران (۱۹۹۷) با استفاده از رابطه ۶ محاسبه گردید:

$$\text{پروتئین میکروبی (mg)} = \text{ivTDDM (mg)} - (\text{GP (ml)} \times 2.2) \quad \text{(رابطه ۶):}$$

که ۲/۲ عامل استوکیومتری بر حسب میلی گرم کربن، هیدروژن و اکسیژن مورد نیاز برای ساخت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA) همراه با تولید یک میلی لیتر گاز می باشد (۶). اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از معادله مکار و همکاران (۲۰۰۵) طبق رابطه ۷ محاسبه شد (۲۶).

$$\text{SCFA (mmol/200 mg DM)} = 0.0222 \times \text{GP} - 0.00425 \quad \text{(رابطه ۷):}$$

در این معادله GP گاز خالص تولیدی پس از انکوباسیون (میلی لیتر به ازای ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک) است.

اندازه گیری گاز متان: گاز متان در دو مرحله، زمان ۱/۲ و پس از انکوباسیون در ۲۴ ساعت با استفاده از NaOH ۱۰ مولار اندازه گیری شد. پس از ثبت حجم گاز تولیدی، کلیپس سر سرنگ به آرامی باز و از طریق انتهای شیلنگ ۴ میلی لیتر NaOH ۱۰ مولار به داخل سرنگ‌ها تزریق شد. بلافاصله پس از تزریق، CO₂ با NaOH ترکیب و از فاز گازی خارج شد و پیستون به سرعت به سمت پایین حرکت کرد. گاز باقیمانده در سرنگ همان گاز متان بود که مقدار آن یادداشت شد (۱۳).

شمارش پروتوزوا: برای شمارش پروتوزواها ۱ میلی لیتر از مایع شکمبه صاف شده به ۹ میلی لیتر فرمالدئید ۴ درصد افزوده و به خوبی هم زده شد تا یک محلول شکمبه با غلظت یک دهم حاصل گردد. جهت نگهداری نمونه‌ها از گلیسرین استفاده شد. شمارش پروتوزوا با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ و لام نئوبار انجام شد (۱۱).

تجزیه و تحلیل آماری

به وسیله سه آزمون تولید گاز مجزا و چهار تکرار برای هر نمونه انکوباسیون انجام شد. داده‌های تخمیر شکمبه‌ای برای هر سه آزمون میانگین‌گیری شد. با استفاده از نرم‌افزار SAS (۲۰۰۱) و طبق رابطه ۸ تجزیه واریانس داده‌ها صورت گرفت و میانگین‌های به دست آمده با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه آماری شد (۳۸). مدل آماری به صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{رابطه (۸)}$$

که در آن: μ : میانگین کل، T_i : اثر تیمار، ε_{ij} : خطای آزمایشی

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی: ترکیبات شیمیایی سه نوع رقم مختلف پوست انار، ترش جنگلی گرگان، ملس بهشهر و شیرین کلباد، شامل ماده خشک، خاکستر، پروتئین خام، چربی خام، ADF، NDF و لیگنین در جدول ۱ ارائه شده است. بیشترین مقدار پروتئین خام در رقم شیرین کلباد (۴/۰۱٪) و بیشترین مقدار چربی خام (۱/۸۷٪) و ADF (۱۹/۶۲٪) در رقم ترش جنگلی گرگان مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). سایر ترکیبات شیمیایی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P > ۰/۰۵$). اولاده و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی رقم‌های مختلف پوست انار کشور ترکیه مقدار چربی خام، پروتئین خام، خاکستر را به ترتیب ۹/۴، ۸/۷۲ و ۵ درصد گزارش کرده‌اند. که تمام موارد از نتایج این تحقیق بالاتر است (۴۴). در حالی که میرزایی آغساقالی و همکاران (۲۰۱۱) مقدار چربی خام، پروتئین خام، خاکستر، ADF و NDF به ترتیب ۰/۶۱، ۳/۶، ۵/۴، ۱۵/۱۰ و ۲۰/۸۰ درصد و طاهر مداح و همکاران (۲۰۱۲) به ترتیب ۰/۷۰، ۳/۳۷، ۰/۴۰، ۱۲/۶ و ۱۸/۲۰ درصد بیان نموده‌اند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (۳۱، ۴۰). دلاور و همکاران (۲۰۱۴) نیز مقادیر ۰/۶۳، ۴/۸۰، ۶۰/۴۰، ۲۱/۲ و ۳۱/۶ درصد را گزارش کرده‌اند. این تفاوت در ترکیبات شیمیایی را می‌توان احتمالاً به تفاوت در نحوه کشت، شرایط آب و هوایی، نوع رقم، و روش پوست‌گیری، مربوط دانست (۱۲ و ۴۴). مطابق با جدول ۱، اگرچه بیشترین مقدار ترکیبات فنلی کل و تانن متراکم مربوط به رقم ترش جنگلی گرگان و بیشترین مقدار تانن کل و تانن قابل هیدرولیز مربوط به رقم ملس بهشهر بود اما از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$). تحقیقات زیادی مقادیر مختلف مواد فنولی را برای رقم‌های مختلف پوست انار گزارش کرده‌اند. تهرانی فر و همکاران (۲۰۱۰) مقدار فنول کل رقم‌های مختلف پوست انار ایران را ۹۸۵/۵-

وحیده رزم آذر و همکاران

۲۹۵/۷۹ (میلی گرم گالیک اسید/۱۰۰گرم) و مقدار تانن متراکم را ۳۰/۱۱-۵/۵۶ (میلی گرم سیانیدین/۱۰۰ گرم) گزارش کردند (۴۲). مازندرانی و همکاران (۱۳۸۹) نیز مقدار فنول کل پوست انار رقم‌های اکوتیپ‌های مختلف ایران را ۳۷۲-۲۸۴ میلی گرم گالیک اسید/۱۰۰گرم بیان کردند (۲۸).

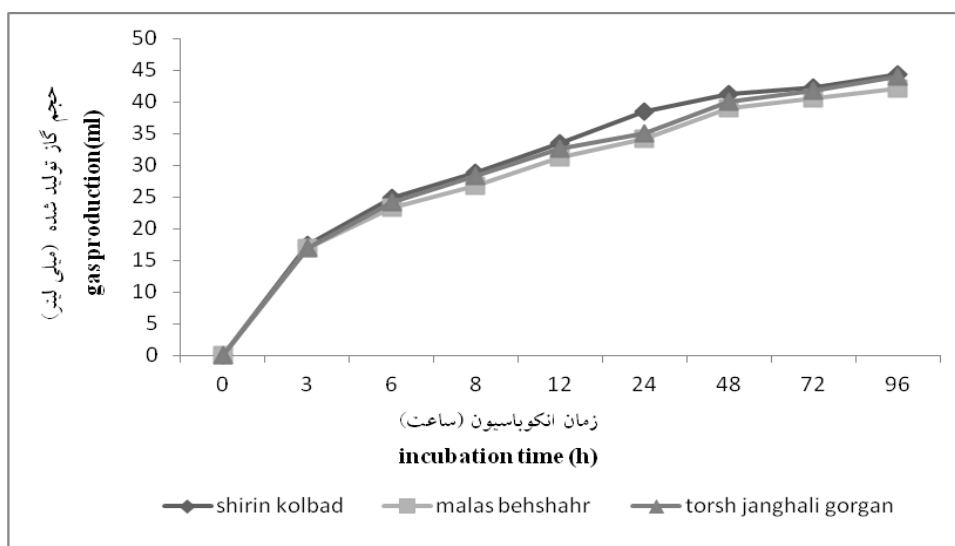
جدول ۱- ترکیبات شیمیایی و پلی فنلی (درصد) پوست انار رقم‌های ترش جنگلی گرگان، ملس بهشهر و شیرین کلباد
Table 1. Chemical composition and poly phenols of pomegranate peel of Torsh janghali Gorgan, Malas behshahr and Shirin kolbad varieties

P value	میانگین خطای استاندارد SEM	Treatment تیمار			ترکیبات شیمیایی Chemical composition
		شیرین کلباد Shirin kolbad	ملس بهشهر Malas behshahr	ترش جنگلی گرگان Torsh janghali Gorgan	
0.512	0.15	35.04	34.98	35.34	ماده خشک DM
0.313	0.22	4.35	4.67	3.81	خاکستر Ash
0.001	0.05	4.01 ^a	3.68 ^c	3.85 ^b	پروتئین خام CP
0.054	0.11	2.30 ^b	2.33 ^b	2.87 ^a	چربی خام EE
0.0002	0.44	16.17 ^b	14.05 ^c	17.35 ^a	فیبر نامحلول در شوینده اسیدی ADF
0.595	0.07	19.54	19.45	19.62	فیبر نامحلول در شوینده خستگی NDF
0.117	0.12	4.55	4.97	5.12	لیگنین Lignin
0.613	1.01	6.51	6.80	8.91	ترکیبات فنلی کل Total phenol
0.433	0.14	7.59	8.06	7.82	تانن کل Total tannin
0.139	0.01	0.97	1.00	1.02	تانن متراکم Condensed tannin
0.455	0.13	6.63	7.06	6.80	تانن قابل هیدرولیز Hydrolysable tannin

حروف غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم معنی دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵).

Values with different superscript in each row letters differ significantly (P < 0.05)

الگوی تولید گاز سه رقم پوست انار در شکل ۱ مشاهده می‌شود. نمودار الگوی گاز تولید شده نشان‌دهنده تولید گاز بیشتر پوست انار شیرین کلباد در زمان‌های مختلف انکوباسیون (طبق جدول ۲) در مقایسه با ترش جنگلی گرگان و ملس بهشهر است. منحنی تولید گاز شامل سه بخش است؛ بخش اول مرحله بطئی خیس خوردن و چسبیدن میکروب‌ها، بخش دوم مرحله نمایی که بیانگر هضم آنزیمی است و بخش سوم که مرحله کاهش تولید گاز است که همزمان با کاهش سوبسترا صورت می‌گیرد (۳۴). در این پژوهش نیز منحنی تولید گاز از الگوی فوق تبعیت می‌کند.



شکل ۱- نمودار الگوی تولید گاز رقم‌های مختلف پوست انار در زمان‌های مختلف انکوباسیون (به ازای ۲۰۰ میلی گرم نمونه)

Figure 1. Gas production profile for pomegranate peel varieties during different incubation times (200 mg sample)

در جدول ۲ فراسنجه‌های تولید گاز و همچنین میزان گاز تولیدی در زمان‌های $t_{1/2}$ و ۲۴ و ۹۶ ساعت انکوباسیون آورده شده است. اگرچه تفاوت معنی‌داری در میزان پتانسیل تولید گاز (B) و نرخ تخمیر بخش قابل تخمیر (C) و همچنین تولید گاز در زمان‌های مختلف مشاهده نشد اما در رقم شیرین کلباد (مقدار بخش (B) ۴۲/۵۷ میلی‌لیتر در گرم ماده خشک و با نرخ تولید ۰/۱۱۱۳ میلی‌لیتر بر ساعت) بیشتر بود. این نتایج نزدیک به نتایج تحقیق میرزایی آقساقالی و همکاران (۲۰۱۰) است که

میزان تولید گاز ۲۴ ساعت و پتانسیل تولید گاز برای پوست انار به ترتیب ۴۰/۴۷ میلی لیتر در ۲۰۰ میلی گرم نمونه و ۵۴/۱۲ میلی لیتر بر ساعت گزارش کردند (۳۱). ترکیبات شیمیایی مهمترین عامل تعیین کننده فراسنجه‌ها و میزان گاز تولیدی هر ماده خوراکی است. بالا بودن میزان پتانسیل تولید گاز (B) و نرخ تخمیر بخش قابل تخمیر (C) و به تبع آن مجموع گاز تولیدی در زمان‌های مورد اندازه‌گیری پوست انار شیرین کلباد را می‌توان به بیشتر بودن پروتئین خام و کمتر بودن میزان ADF آن نسبت به سایر رقم‌ها ارتباط داد، احتمالاً سرعت بالای تولید گاز تحت تاثیر کربوهیدرات‌هایی قرار می‌گیرد که به سهولت در دسترس جمعیت میکروبی هستند، که نتایج تحقیقات مختلف نیز موید این مطلب است (۲ و ۳۱).

جدول ۲- فراسنجه‌های برآورد شده در تولید گاز و مجموع گاز تولیدی (میلی لیتر در ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک) رقم‌های مختلف پوست انار

Table 2. Gas production parameters and cumulative gas production (ml/200 mg DM) of pomegranate peel varieties

مجموع گاز تولیدی (میلی لیتر / ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک) Cumulative gas production (ml/200mg DM)			فراسنجه‌های تولید گاز Gas production parameters		تیمار Treatment
96	24	t _{1/2}	c	B	
44.05	37.47	26.23	0.0933	30.98	ترش جنگلی گرگان Torsh Janghali Gorgan
42.03	37.88	24.92	0.0933	40.5	ملس بهشهر Malas behshahr
44.38	40.70	26.23	0.1113	42.57	شیرین کلباد Shirin kolbad
0.57	0.68	1.46	0.0084	0.52	میانگین خطای استاندارد SEM
0.817	0.449	0.235	0.675	0.725	P value

حروف غیرمشابه در هر ستون به مفهوم معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد (P < 0.05).

Values with different superscript in each column letters differ significantly (P < 0.05)

B: پتانسیل تولید گاز (میلی لیتر/۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)، c: نرخ تخمیر، t_{1/2}: زمان نصف حداکثر گاز تولیدی (ساعت)

B: The gas production from the fermentable fraction (ml/200mg DM), C= Rate constant of gas production during incubation (ml/h), t_{1/2}: Half time of maximum gas production

با توجه به جدول ۳ و ۴ میزان قابلیت هضم ظاهری و حقیقی ماده خشک و همچنین میزان پروتئین میکروبی در زمان ۲۴ ساعت و $t_{1/2}$ در پوست انار شیرین کلباد (به ترتیب ۰/۳۴۷، ۰/۵۹۰ و ۵۰۰/۷۹) به طور معنی داری ($P < ۰/۰۵$) بالاتر از بقیه رقم‌ها بود. این می‌تواند به دلیل تفاوت در ترکیباتی که پتانسیل تجزیه پذیری دارند، باشد. لیگنین، ADF و NDF بیشتر مشاهده شده در رقم ترش جنگلی گرگان می‌تواند عامل موثر در کاهش تجزیه پذیری ماده خشک با محدود کردن سطح منطقه مورد هجوم میکروب‌ها باشد (۲). میزان گاز تولیدی بالاتر این رقم نیز موید قابلیت هضم بالاتر آن بود. نتایج این بخش مطابق با نتایج تحقیقات آنیل و همکاران (۲۰۱۳)، ابرقویی و همکاران (۱۳۹۲) می‌باشد (۱ و ۲).

مقدار گاز متان و تعداد پروتوزوا در ۲۴ ساعت انکوباسیون اگرچه در رقم ملس به شهر کاهش نشان داد اما این اختلاف معنی دار نبود ($P > ۰/۰۵$). تعداد پروتوزوا در زمان $t_{1/2}$ در رقم ترش جنگلی به طور معنی داری بالاتر بود. این افزایش می‌تواند به دلیل بیشتر بودن فیبر این رقم باشد که پروتوزواها به آن می‌چسبند ولی احتمالاً با گذشت زمان و تاثیر مسمویت تانن و سایر ترکیبات فنلی بر آنها از مقدار آنها کاسته می‌شود. تحقیقات زیادی تاثیر ترکیبات فنلی و تانن را بر کاهش میزان تولید گاز متان (۲ تا ۵۸ درصد) را گزارش کرده‌اند این اختلاف بیشتر مربوط به نوع تانن و منبع گیاهی مورد استفاده ذکر شده است (۹).

تاوندال و همکاران (۲۰۰۵) مهار رشد باکتری‌های متانوژن را به خاصیت باکتریواستاتیکی و باکتریوسیدی تانن‌های متراکم مربوط می‌دانند (۴۱). در حالی که گوول و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که تانن‌های قابل هیدرولیز نسبت به تانن متراکم منجر به کاهش جمعیت باکتری‌های متانوژن و یا میکروارگانیسم‌هایی که تولید بیشتر یون هیدروژن می‌کنند، می‌شوند (۱۷).

جایانگرا و همکاران (۲۰۱۰) نیز بیان کردند که تانن‌های متراکم تولید گاز و قابلیت هضم ماده آلی را بیشتر از تانن‌های قابل هیدرولیز کاهش می‌دهند. آنها نشان دادند که تانن‌های قابل هیدرولیز در کاهش گاز متان تولیدی بیش از تانن‌های متراکم موثر هستند، در حالی که در همان زمان تانن‌های قابل هیدرولیز تاثیر معنی داری بر کاهش قابلیت هضم ماده آلی نداشتند. به نظر می‌رسد تانن‌های قابل هیدرولیز گاز متان را بیشتر از طریق کاهش هضم فیبر کاهش می‌دهد (اثر غیر مستقیم)، در حالی که تانن‌های قابل هیدرولیز بیشتر از طریق مهار رشد و یا فعالیت متانوژن‌ها و یا میکروب‌های تولید کننده هیدروژن عمل می‌کنند (اثر مستقیم) (۱۲).

جدول ۳- فراسنجه‌های تخمیر و قابلیت هضم رقم‌های مختلف پوست انار در ۲۴ ساعت انکوباسیون

Table 3. Fermentation parameters and degradability of pomegranate peel varieties in 24 h incubation

P value	میانگین خطای استاندارد SEM	تیمار Treatment			فراسنجه‌های تخمیر Fermentation parameters
		شیرین کلباد Shirin kolbad	ملس بهشهر Malas behshahr	ترش جنگلی گرگان Torsh janghali Gorgan	
0.017	0.006	0.347 ^a	0.313 ^b	0.320 ^b	<i>iv</i> ADDM(mg)
0.001	0.010	0.590 ^a	0.528 ^b	0.534 ^b	<i>iv</i> TDDM(mg)
0.002	9.49	500.79 ^a	445.56 ^b	449.91 ^b	پروتئین میکروبی Microbial mass (g/kg DM)
0.556	0.018	1.45	1.39	1.42	PF(mg/ml)
0.247	0.250	33.45	32.73	33.76	متان Methane (g/kg DM)
0.302	0.14	2.66×10 ⁵	2.4×10 ⁵	2.5×10 ⁵	تعداد پروتوزوا Protozoa population
0.350	0.03	7.12	7.11	7.01	pH
0.092	0.015	0.90 ^a	0.836 ^{ab}	0.826 ^b	اسیدهای چرب کوتاه زنجیر SCFA(mmol)
0.135	0.105	7.66	7.05	7.19	انرژی قابل متابولیسم ME(MJ/Kg DM)
0.134	0.83	51.18	47.02	48.06	قابلیت هضم ماده آلی OMD(%)

حروف غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم معنی دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵).

Values with different superscript in each row letters differ significantly (P < 0.05).

*iv*ADDM: in vitro apparently degraded dry matter, *iv*TDDM: in vitro truly degraded dry matter. PF: portioning factor, SCFA: short chain fatty acids ME: metabolizable energy, OMD: organic matter digestibility

جدول ۴- فراسنجه‌های تخمیر و قابلیت هضم رقم‌های مختلف پوست انار در زمان $t_{1/2}$

Table 4. Fermentation parameters and degradability of pomegranate peel varieties in $t_{1/2}$ (half time)

P value	میانگین خطای استاندارد SEM	Treatments تیمار			فراسنجه‌های تخمیری Fermentation parameters
		شیرین کلباد Shirin kolba	ملس بهشهر Malas behshahr	ترش جنگلی گرگان Torsh janghali Gorgan	
0.0002	0.011	0.275 ^a	0.235 ^b	0.243 ^b	<i>iv</i> ADDM(mg)
0.046	0.47	0.494 ^a	0.435 ^b	0.445 ^b	<i>iv</i> TDDM(mg)
0.001	9.49	436.62 ^a	380.84 ^b	397.88 ^b	پروتئین میکروبی Microbial mass (g/kg DM)
0.446	0.078	1.91	1.80	2.06	PF(mg/ml)
0.537	0.002	15.33	17.62	16.12	متان Methane(g/kg DM)
0.010	0.30	5.0×10^5 ^b	7.5×10^5 ^a	7.87×10^5 ^a	تعداد پروتوزوا Protozoa population
0.737	0.047	7.35	7.38	7.42	pH
0.511	0.059	0.568	0.549	0.474	اسیدهای چرب کوتاه زنجیر SCFA(mmol)
0.451	0.20	5.99	5.86	5.36	انرژی قابل متابولیسم ME(MJ/Kg DM)
0.464	1.30	40.22	38.99	36.06	قابلیت هضم ماده آلی OMD(%)

حروف غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).

Values with different superscript in each row letters differ significantly ($P < 0.05$)

*iv*ADDM: in vitro apparently degraded dry matter, *iv*TDDM: in vitro truly degraded dry matter. PF: portioning factor, SCFA: short chain fatty acids ME: metabolizable energy, OMD: organic matter digestibility

پاترا و ساکسنا (۲۰۰۹) کاهش گاز متان تولیدی را علاوه بر اثر مستقیم تانن‌های متراکم بر باکتری‌های متانوژن، بر تاثیر مستقیم آنها بر پروتوزواها بیان کردند (۳۵). این مطلب توسط سیسلاک و همکاران (۲۰۱۲) نیز تایید شده است؛ آنها از تانن متراکم گیاه *Vaccinium vitis idaea* به میزان ۲ گرم/کیلوگرم ماده خشک در جیره گاوهای شیری استفاده کرده و بیان کردند که کاهش تولید گاز متان در

نتیجه کاهش تولید پروتوزوا بوده بدون اینکه تاثیر منفی بر قابلیت هضم ماده آلی و تولید VFA داشته باشد. بین پروتوزوئرها شکمبه با متانوژن‌ها رابطه همزیستی مفیدی وجود دارد، لذا مهار پروتوزوا منجر به مهار متانوژن‌ها و کاهش تولید گاز متان می‌گردد (۱۰). جهانی- عزیز آبادی و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی اثرات گیاهان دارویی مختلف بیان کردند که کاهش گاز متان تولیدی تاثیر منفی بر ناپدید شدن سوبسترا دارد (۱۹). در تحقیق ما نیز کاهش گاز متان تولیدی با کاهش در قابلیت هضم ظاهری و حقیقی ماده خشک در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون همراه بود (جدول ۳). ضریب تفکیک (PF) نشان دهنده بخشی از سوبسترای تخمیر شده (در شرایط آزمایشگاهی) است که به جای استفاده در تولید گاز، در تولید توده‌ی میکروبی استفاده شده است (۷). شاخص PF که نشان دهنده بازده تخمیر می‌باشد اختلاف معنی‌داری در ۲۴ ساعت و زمان $t_{1/2}$ نشان نداد. در حالی که رابطه خطی و منفی بین شاخص PF و گاز متان وجود دارد (۴۷). افزایش شاخص PF در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون در رقم شیرین کلباد نشان دهنده بهبود بازده تخمیر و تولید پروتئین میکروبی است که با کاهش گاز متان همراه بوده است. میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر به دست آمده برای رقم شیرین کلباد بیشتر و حدود ۰/۹ میلی‌مول به دست آمد که برای زمان $t_{1/2}$ نیز این روند ادامه داشت. انرژی قابل متابولیسم و قابلیت هضم ماده آلی برآورد شده تیمارها هم در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون و هم در زمان $t_{1/2}$ تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>0/05$)، اما در رقم شیرین کلباد بیشتر بود، که مقدار گاز تولیدی بیشتر در زمان‌های مختلف انکوباسیون و نیز قابلیت هضم ظاهری و حقیقی بالاتر مشاهده شده این رقم نیز موید همین رابطه است.

نتیجه گیری کلی

به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده از تولید گاز و کینتیک تولید گاز می‌توان دریافت که سه رقم مختلف پوست انار (ترش جنگلی گرگان، ملس بهشهر و شیرین کلباد) به دلیل داشتن ترکیبات فنلی و تانن دارای فعالیت بازدارنده علیه تعدادی از میکروارگانیسم‌های دخیل در تولید گاز متان و همچنین پروتوزوئرها هستند. که مخلوطی از سه رقم را می‌توان برای دستکاری تخمیر شکمبه و کاهش تولید گاز متان استفاده کرد.

منابع

1. Abarghuei, M.J., and Ruzbehan, Y. 2013. The influence of the grape pomace on gas production parameters and protozoa population of rumen inoculum of sheep. J. Iranian. Anim. Sci. (Tehran, Islamic Repub. Iran). 44 (4): 375-384. (In Persian)
2. Anele, U.Y., Südekum, K.H., Hummel, J., Arigbede, O.M., Oni, A.O., Olanite, J.A., Böttgera, C., Ojob, V.O., and Jolaoshob, A.O. 2011. Chemical characterization, *in vitro* dry matter and ruminal crude protein degradability and microbial protein synthesis of some cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp*) haulm varieties. J. Anim. feed Sci. Technol. 163 (2): 161-169.
3. AOAC. 1990. International Official Methods of Analysis, XXIth ed. Gaithersburg, M. D. Association of Official Analytical Chemists, USA.
4. Barman, K., Deepak, K., Tandon, D.M., Thirumeignanam, D., and Rai, S.N. 2008. Tannins estimation. Dairy Cattle Nutrition Division N.D.R.I., Karnal, India.
5. Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O., and 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. J. Dairy Sci. 9: 5512-5522.
6. Blümmel, M., Makkar, H.P.S., and Becker, K. 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. J. Anim. Physiol and Nutr. 77: 24-34.
7. Blümmel, M., Schröder, A., Südekum, K.H., and Becker, K. 1999. Estimating ruminal microbial efficiencies in silage-fed cattle: comparison of an *in vitro* method with a combination of *in situ* and *in vivo* measurements. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 81, 57-67.
8. Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., and Ferret, A. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 90: 2580-2595.
9. Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochemal, A., and Oleszek, W. 2013. Plant components with specific activities against rumen Methanogens. J. Anim. Sci. 7:2: 253-265.
10. Cieslak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., and Szumacher-Strabel, M. 2012. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea L.*) on rumen microbial fermentation *in vivo*. J. Anim. Feed Sci. and Technol. 176: 102-106.
11. Dehority, B.A. 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. J. Appl. Environ. Microbiol. 48: 182-185.
12. Delavar, M.H., Tahmasbi, A.M. Danesh Mesgaran, M., and Valizadeh, R. 2014. *In vitro* Rumen Fermentation and Gas Production: Influence of different by-product feedstuffs. Annual Research and Review in Biology. 4(7): 1121-1128.

13. Demeyer, D., De Meulemeester, M., De Graeve, K., and Gupta, B.W. 1988. Effect of fungal treatment on nutritive value of straw. *J. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.* 53: 1811–1819.
14. FAO, 2010. FAOSTAT Database. <http://apps.fao.org>. FAO, United Nations, Rome, Italy.
15. Frutos, P., Hervas, G., Giraldez, F.J., and Mantecon, A.R. 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Span. J. Agric. Res.* 2 (2): 191–202.
16. Ghasemi, S., Naserian, A.A., Valizadeh, R., Tahmasebi, A.M., Vakili, A.R., Behgar, M., and Ghovvati, S. 2012. Inclusion of pistachio hulls as a replacement for alfalfa hay in the diet of sheep causes a shift in the rumen cellulolytic bacterial population. *J. Small Rum. Res.* 104: 94– 98.
17. Goel, G., and Makkar, H.P.S. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *J. Tropical Anim. Health Prod.* 44: 729–739.
18. Ismail, T., Sestili, P., and Akhtar, S. 2012. Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti- infective effects. *J. Ethnopharmacol.* 143: 397-405.
19. Jahani-Azizabadi, H., Danesh Mesgaran, Vakili, A.R., Rezayazdi, K., and Hashemi, M. 2011. Effect of various medicinal plant essential oils obtained from semi-arid climate on rumen fermentation characteristics of a high forage diet using *in vitro* batch culture. *African J. Microbiol. Res.* 5(27): 4812-4819.
20. Jayanegara, A., Goel G., Makkar, H.P.S., and Becker, K. 2010. Reduction in methane emissions from ruminants by plant secondary metabolites: Effects of polyphenols and saponins. In: N.E. Odongo, M. Garcia & G.J. Viljoen (eds), *Sustainable Improvement of Animal Production and Health. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2010: 151–157.*
21. Jayanegara, A., Togtokhbayar, N., Makkar, H.P.S., and Becker, K. 2009. Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an *in vitro* rumen fermentation system. *J. Anim. Feed Sci. and Technol.* 150: 230–237.
22. Johnson, K.A., and Johnson, D.E. 1995. Methane emission from cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 2483-2492.
23. Lansky, E.P., and Newman. R.A. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J. Ethnopharmacol.* 109: 177–206.
24. Lassey, K.R. 2007. Livestock methane emission and its perspective in the global methane cycle. *Australian J. of Experim. Agri.* 48(2): 114–118.
25. Makkar, H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *J. Small Ruminant Res.* 49: 241–256.
26. Makkar, H.P.S. 2005. *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 123: 291-302.

27. Makkar, H.P.S. 2010. *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In: Vercoe, P. E., Makkar, H. P. S., and Schlink, A. C. (eds.), *In vitro* Screening of plant resources for extra nutritional attributes in ruminants: Nuclear and Related Methodologies. IAEA, Dordrecht, the Netherlands. Pp. 107-144.
28. Mazandarani, M., Khojamli, Z., Bayat, H., and Daneshvar, A. 2011. Introduce and , comparison of the main of secondary metabolits of *punica granatum* L. in different habitats of Golestan province. J. Agric. Sci. Res. (Tehran, Islamic Repub. Iran). 5 (18) 2: 63-67. (In Persian).
29. Menke, K.H., and 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.
30. Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., and Schneider, W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J. Agri. Sci. 92: 217-222.
31. Mirzaei-Aghsaghali, A., Maheri-Sis, N., Mansouri, H., Ebrahim Razegh, M., Mirza-Aghazadeh, A., Cheraghi, H., and Aghajanzadeh-Golshani, A. 2011. Evaluating potential nutritive value of pomegranate processing by-products for ruminants using *in vitro* gas production technique. J. ARPNJ Agric. Bio. Sci. 6 (6): 45-51.
32. Moss, A.R., Jouany, J.P., and Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. J. Ann. Zootech. 49: 231-253.
33. NASA. <http://earthobservatory.nasa.gov/Features/GlobalWarming/page2.php>
34. Ørskov, E.R., and McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci. Camb. 92, 499-503.
35. Patra, A.K., and Saxena, J. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. Antonie van Leeuwenhoek. 96: 363-375.
36. Porter, L.J, Hrstich, L.N., and Chan, B.G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. Phytochemistry. 25: 223-230.
37. Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., and Ranjbar, H. 2009. Evaluation of genetic diversity among Iranian soft-seed pomegranate accessions by fruit characteristics and RAPD markers. J. Sci. Hort. 121: 313-319.
38. SAS Institute. 2002. SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary, N.C. USA. 956 p.
39. Steiner, T. 2009. Phytogenics in animal nutrition (natural concepts to optimize gut health and performance. Nottingham university press. 181p.
40. Taher-Maddah, M., Maheri-Sis, N., Salamatdoustnobar, R., and Ahmadzadeh, A. 2012. Comparing nutritive value of ensiled and dried pomegranate peels for

- ruminants using *in vitro* gas production technique. J. Annals. Bio. Res. 3 (4):1942-1946.
41. Tavendale, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.T., and Sivakumaran, S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. J. Anim. Feed Sci. Technol. 123–124, 403–419.
 42. Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B., and Vazifeshenas, M.R. 2010. Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. Sci. Horti. 126: 180–185.
 43. Tiemann, T.T., Lascano C.E., Wettstein, H.R., Mayer, A.C., Kreuzer, M., and Hess, H.D. 2008. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs. J. Anim. 2: 790–799.
 44. Ullah, N., Ali, J., Ali khan, F., Khurram, M., Hussain, A., Rahman, I., Rahman, Z., and Shafaghatullah. 2012. Proximate Composition, Minerals Content, Antibacterial and antifungal Activity Evaluation of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels Powder. Middle-East J. Sci. Res. 11 (3): 396-401.
 45. Van Soest, P.J., 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant, 2nd ed. Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
 46. Van Soest, P.J., Robertson, J.B., and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583–3597.
 47. Vercoe, E.P., Makkar, H.P.S., and Schlink, A.C. 2010. *In Vitro* Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies (edi.), *In Vitro* Screening of Feed Resources for Efficiency of Microbial Protein Synthesis (pp. 106-144). New York: Springer.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Ruminant Research, Vol. 4(2), 2016
<http://ejrr.gau.ac.ir>

Effect of different varieties of pomegranate peels (Torsh Jangali Gorgan, malas Behshahr and Shirin kolbad) on dry matter digestibility, number of protozoa and methane production *in vitro*.

V. Razmaza¹, *N.M. Torbatinejad², J. Seifdavati³ and S. Zerehdaran⁴

¹Ph.D. Student and ²Professor, Dept. of Animal and poultry Nutrition, Faculty of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

³Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Mohaghegh Ardebili University, ⁴Professor, Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Received: 01/31/2016; Accepted: 05/17/2016

Abstract

Background and objectives: Iran in addition to the emergence of pomegranate and its natural habitat, the number of varieties and is the largest producer of pomegranate in the world. Pomegranate peels comprising almost 26–30% of total fruit weight; in recent years the biological activity of pomegranate peel polyphenols has become a subject of interest among many researchers and consumers. Tannins effects on rumen methanogens and protozoa was proven, as well as the effect of that on gas production kinetic and rumen fermentation according to the type of vegetation is varies. Thus the objective of this study was to determine the chemical composition, polyphenolic components, *in vitro* apparently and truly degraded dry matter, methane production, the number of protozoa of three pomegranate peels (Torsh Jangali Gorgan, malas Behshahr and Shirin kolbad) varieties.

Materials and methods: Varieties collected during harvested season (autumn) from different region of Golestan province and dried. The study was carried out in a completely randomized design with tree treatment and four replicates. After an initial gas test to evaluate 96 h gas production profiles of pomegranate peels, the time to half maximal gas production was calculated and a second incubation conducted with fermentation stopped at substrate specific half time ($t_{1/2}$) and 24 h for each substrate. True DM degradability was measured from incubated residues and combined with gas volume to estimate the partitioning factor (PF).

Results: Highest CP in Shirin Kolbad and highest EE and ADF in Torsh Jangali Gorgan varieties were observed. Total Phenol composition in Torsh Jangali Gorgan variety with 8.91% and total tannin in malas Behshahr variety with 8.06% were high than Other varieties. Shirin kolbad pomegranate peel had greater *in vitro* apparently and truly degraded dry matter, microbial protein, and short chain fatty acids (respectively 0.347, 0.590 (mg), 500.79 (g/kg DM), and 0.9 (mmol) in 24 h incubation ($P<0.05$), this order was also observed at specific $t_{1/2}$ h, however produced less methane than other pomegranate peels. The number of protozoa had greater at specific $t_{1/2}$ ($P<0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that pomegranate peel is an important agro-based by-product that is produced in Iran and because of having phenolic components and tannins has antimicrobial activity against microorganisms that produced methane as well as protozoa, that, three varieties of this pomegranate peel can be used for modulating rumen fermentation and methane reduction.

Keywords: Pomegranate peels, Tannin, Rumen fermentation, Methane, Protozoa