نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 9، شماره 3، پاییز 1396، ص. 299-284

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 9, No. 3, Fall 2017, p. 284-299

اجزای ترکیبات فنولی غلاف نخود سبز (*Pisum sativum* L.) و اثرات آنها بر قابلیت هضم شکمبه‌ای و تولید گاز تحت شرایط آزمایشگاهی

جمال سیف دواتی[1*]- زهرا اسلامی[2]- حسین عبدی بنمار[3]- فرزاد میرزائی آقچه قشلاق[3]- رضا سید شریفی[1]

تاریخ دریافت: 1395/06/31
تاریخ پذیرش: 1395/10/18

چکیده

هدف آزمایش حاضر برآورد کمی اثر تانن و ترکیبات فنولی غلاف نخود سبز (*Pisum sativum* L.) بر قابلیت هضم شکمبه‌ای با روش‌های آزمایشگاهی بود. در این بررسی از ترکیب پلی اتیلن گلیکول (PEG) عامل غیر فعال و کمپلکس کننده تانن و ترکیبات فنولی به صورت افزودنی در سطوح توصیه شده استفاده شد. داده‌های حاصل در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه و تحلیل شدند. ترکیبات شیمیایی غلاف نخود سبز شامل ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام، ماده آلی، خاکستر خام، الیاف نا محلول در شوینده خنثی (NDF) و الیاف نا محلول در شوینده اسیدی (ADF) به ترتیب 87/53، 10/03، 2/5، 79/49، 8/046، 40/31 و 23/69 درصد اندازه‌گیری شدند. فنل کل همراه با تانن، فنل کل بدون تانن، تانن کل و تانن متراکم به ترتیب 0/502 ،0/196، 0/306 و 0/044 بر حسب گرم در کیلوگرم ماده خشک به دست آمد. قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، ماده آلی در ماده خشک (درصد) و انرژی قابل متابولیسم (مگاژول بر کیلوگرم) در غلاف نخود سبز به ترتیب 81/06، 80/46، 73/98 و 11/61 بود. پس از انکوباسیون نمونه خشک غلاف نخود سبز مقادیر تولید گاز در زمان‌های 2، 4، 8، 12، 24، 48، 72 و 96 ساعت، میزان گاز بخش نا محلول اما قابل تخمیر گروه کنترل (75/16 میلی‌لیتر) در مقایسه با سایر تیمارها مشابه بوده و بین آنها تفاوت معنی‌دار نبود. همچنین ثابت نرخ تولید گاز در گروه کنترل (0/086) برابر و بدون اختلاف معنی‌دار با تیمار حاوی 200 میلی‌گرم PEG و تیمارهای حاوی 400 میلی‌گرم PEG (0/082) و600 میلی‌گرم PEG (0/079) بود. گاز تولیدی از بخش نا محلول اما قابل تخمیر (b) در غلاف نخود سبز با سطوح افزایشی PEG مشابه با گروه کنترل (73/85 میلی‌لیتر) بود. در اثر عمل‌آوری و مکمل‌سازی این خوراک با پلی اتیلن گلیکول در مقدار گاز حاصل از بخش محلول، بخش نا محلول و مجموع تولید گاز از بخش محلول و نا محلول در غلاف نخود سبز تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ($p>0/05$). با توجه به مقدار پروتئین خام غلاف نخود که حدود 50 درصد پروتئین خام دانه نخود می‌باشد و مقادیر ترکیبات دیواره سلولی و پتانسیل تولید گاز آن در این تحقیق غلاف نخود سبز را می‌توان به‌عنوان منبع فیبر غیر علوفه‌ای و مواد خوراکی ارزان قیمت جایگزین بخشی از مواد خوراکی اصلی در جیره دام‌ها نمود.

واژه‌های کلیدی: تانن، ترکیب شیمیایی، تولید گاز، غلاف نخود سبز، فیبر غیرعلوفه‌ای.

مقدمه

فراهم نمودن شرایط مناسب جهت استفاده حیوانات از مواد غذایی غیر قابل استفاده انسان و ضایعات کشاورزی کم ارزش ولی قابل استفاده در تغذیه دام، در دنیای امروز از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. مواد لیگنوسلولزی (سلولز و همی‌سلولز)، غنی‌ترین منبع انرژی قابل تجدید بر روی زمین است که به‌گونه‌ای خاص برای تغذیه نشخوارکنندگان مفید بوده و مانند پلی انسان را به این منبع عظیم انرژی متصل می‌سازند (45). بنابراین، شناخت مواد خوراکی با ارزش داخلی و جایگزین کردن آنها به جای منابع غذایی وارداتی سهم بسزایی در خودکفایی اقتصادی دارد. در بین حبوبات نخود از نظر سطح زیر کشت در مقام چهارم جهان قرار دارد. سهم تولید نخود در ایران معادل 1/4 درصد تولید جهانی نخود است که حدود 55 درصد آن محدود به استان‌های نواحی غرب کشور است (16). به منظور

1- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی،
2- دانش‌آموخته گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی،
3- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی.
(*- نویسنده مسئول: (Email: jseifdavati@uma.ac.ir
DOI: 10.22067/ijasr.v1i1.59008

استفاده‌ی بهینه از مواد خوراکی، نیاز به اطلاعات کافی در زمینه احتیاجات حیوان، مواد خوراکی مورد استفاده و قابلیت دسترسی به مواد مغذی توسط دام، تأمین اطلاعات لازم در راستای تعیین ارزش غذایی و خوشخوراکی و همچنین عوامل محدود کننده مواد خوراکی نظیر ترکیبات فنلی لازم به نظر می‌رسد (46).

فراورده فرعی بعد برداشت نخود فرنگی (نخود سبز) که به صورت دستی قابل استحصال و تفکیک بوده بخش‌های ساقه برگ‌ها و غلاف عاری از دانه سبز می‌باشد. دانه سبز برای اهداف تغذیه انسانی و تهیه کنسرو و مصرف تازه سبز آن جداسازی می‌شود. در این پژوهش بخش غلاف خالی گیاه نخود سبز یا فرنگی مدنظر بود.

در پژوهش‌های مختلف اثرات استفاده از مواد خوراکی حاوی ترکیبات تانن بر گوارش‌پذیری ماده آلی و تجزیه شکمبه‌ای پروتئین جیره و غلظت اسیدهای چرب فرار در شکمبه و استفاده از ترکیبات مهار کننده تانن و کمپلکس کننده با آن نظیر پلی اتیلن گلیکول به‌عنوان مکمل بستگی به میزان و غلظت تانن در آنها داشته است (6، 8، 17، 19 و 43). 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 24 تا 30 درصدی متان تولیدی توسط نشخوارکنندگان مصرف کننده خوراک تانن‌دار را گزارش کرده‌اند. (55).

بنابراین هدف از انجام این پژوهش بررسی کمی اثر تانن و ترکیبات فنولی غلاف نخود سبز (*Pisum sativum* L.) بر قابلیت هضم شکمبه‌ای با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی و مکمل‌سازی با پلی اتیلن گلیکول (PEG) بود.

مواد و روش‌ها

ترکیبات شیمیایی

پس از تهیه محصول مورد نظر، غلاف آن از دانه جداسازی شده و غلاف‌های جداسازی شده در مجاورت هوا خشک گردید و سپس نمونه‌های خشک شده با آسیاب دارای توری یک میلی‌متر آسیاب شد و جهت انجام تجزیه‌های شیمیایی نظیر ماده خشک، ماده آلی، چربی خام، خاکستر خام پروتئین خام از روش مرسوم آزمایشگاهی (4) و برای سنجش میزان NDF و ADF با روش ون سوست و همکاران (58) از دستگاه ANKOM استفاده شد.

قابلیت هضم آزمایشگاهی

اندازه‌گیری قابلیت هضم آزمایشگاهی غلاف نخود سبز به روش تلی و تری (56) اصلاح شده هولدن (25) انجام گرفت. در این روش از کیسه نایلونی به‌جای فیلتراسیون و انکوباتور $Daisy^{II}$ (شبیه‌ساز شکمبه‌ای) بجای حمام آب گرم استفاده شده است (25). از نمونه مواد خوراکی آسیاب شده به اندازه 2 میلی‌متری و غربال شده با الک 50 میکرون، مقدار 1 گرم به داخل کیسه‌های نایلونی با منافذ50 میکرون و ابعاد 6/5×4/5 سانتی‌متر ریخته و به وسیله دستگاه دوخت پلاست بسته شد. دستگاه $Daisy^{II}$ دارای چهار بطری هضمی 2 لیتری با گنجایش 25 عدد کیسه نایلونی است که به آهستگی در حال چرخش بوده و دمای آن در حدود 39 درجه سلسیوس حفظ شد (25). مخلوط مایع مورد استفاده در این روش از مایع شکمبه صاف شده که از دو رأس گوسفند مغانی فیستوله شکمبه‌ای اخذ شده و محلول بافری A (10 گرم فسفات دی هیدروژن پتاسیم، 5/0 گرم سولفات منیزیم 7 آبه، 5/0 گرم کلرید سدیم، 1/0 گرم کلرید کلسیم 1 آبه و 5/0 گرم اوره در یک لیتر یونیزه) و محلول بافری B (15 گرم کربنات سدیم و 1 گرم سولفید سدیم 9 آبه در 100 میلی‌لیتر آب یونیزه) بودند. بلافاصله قبل از شروع فرایند هضمی، مخلوط بافری از طریق گرم کردن بافری از طریق گرم کردن بافر A و B و افزودن 20 میلی‌لیتر بافر B به یک لیتر بافر A تهیه شد (25). در مرحله اول آزمایش هلدن به‌منظور انجام فرایند هضم شکمبه‌ای، 1440 میلی‌لیتر از مخلوط بافری (بزاق مصنوعی) به همراه 360 میلی‌لیتر مایع شکمبه (درمجموع 1800 میلی‌لیتر) به داخل هر کدام از بطری‌های هضمی 2 لیتری که از قبل در دمای 39 درجه سلسیوس گرم شده بودند، ریخته شده و سپس 25 کیسه حاوی مواد خوراکی داخل آنها قرار داده شدند (25). با استفاده از گاز دی‌اکسید کربن، داخل بطری بی‌هوازی شدند و درب بطری‌ها به طور محکم بسته شدند و به مدت 48 ساعت در دستگاه ضمن چرخش آهسته بطری‌ها انکوبه شدند. در مرحله دوم 36 میلی‌لیتر اسیدکلریدریک 6 نرمال به همراه 2/7 گرم پودر پپسین (مرک آلمان با شماره 1071850100) به هر بطری اضافه شد و درب بطری‌ها به‌طور محکم بسته شدند و به مدت 24 ساعت در دستگاه ضمن چرخش آهسته بطری‌ها انکوبه شدند. در پایان کیسه‌ها از بطری‌ها بیرون آورده شدند و به وسیله ماشین لباس‌شویی به مدت 21 دقیقه (در 3 مرحله 7 دقیقه‌ای) با آب سرد شستشو داده شد. پس از آن کیسه‌ها جهت خشک شدن به مدت 48 ساعت در آون با دمای 65 درجه سلسیوس قرار داده شد نمونه‌ها جهت تعیین خاکستر آن به مدت چهار ساعت در دمای 550-560 درجه سلسیوس در کوره قرار گرفتند. بعدا از کوره در آورده به مدت 20 دقیقه در دسیکاتور قرار داده و توزین شدند. از این روش قابلیت هضم ماده آلی و ماده آلی در ماده خشک طبق رابطه‌های (1 تا 4) محاسبه شدند.

DMD (%)= (وزن نمونه اولیه - (وزن خشک بقایای نمونه) / وزن نمونه اولیه ×100 (1)

ME= 0.0157× DOMD (2)

$$DOMD= (OM\times ODM) \quad (3)$$

$$ODM\ (\%)= \text{وزن اولیه نمونه} \times \text{قابلیت هضم} \quad (4)$$

در این معادلات ME انرژی قابل متابولیسم برحسب مگاژول بر کیلوگرم، DOMD قابلیت هضم ماده آلی در ماده خشک با استفاده از روش تلی و تری (56) اصلاح شده هولدن (25)، OMD قابلیت هضم ماده آلی و OM ماده آلی می‌باشد.

تعیین ترکیبات فنولی و تانن

از روش ماکار (33) برای اندازه‌گیری تانن و ترکیبات فنولی استفاده شد. به یک حلال مناسب مثل استون 70 درصد (روش تهیه) جهت استخراج تانن‌ها نیاز است. نمونه آسیاب و خشک شده (200 میلی‌گرم) داخل فلاسک ارلن مایر ریخته شد و 10 میلی‌لیتر استون 70 درصد به آن اضافه گردید و سپس داخل حمام آب، به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس مواد به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل شد و به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سلیسیوس و g 3000 سانتریفیوژ شدند. مواد شناور جمع‌آوری و داخل یخ نگهداری شدند. از این عصاره برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی و تانن استفاده شد. لوله‌های حاوی عصاره در یخ نگهداری شدند تا آنالیز تمام گردید.

اندازه‌گیری کل تانن‌ها و فنول‌ها با استفاده از معرف فولین شیکالتو

این روش به منظور اطلاع از راندمان استخراج فنول‌ها در حلال، برای اندازه‌گیری کل فنول مناسب است. با استفاده از یک ماده نامحلول (PVPP[1]) در این روش می‌توان تانن‌ها را اندازه‌گیری کرد. نتایج به صورت اکی والان‌های اسید تانیک بیان شد. اسید تانیک مورد استفاده باید از بهترین نوع خالص باشد (33). معرف فولین شیکالتو موجود (2 نرمال) با حجم مساوی آب مقطر رقیق و به یک بطری قهوه‌ای منتقل و در دمای 4 درجه سلیسیوس در یخچال نگهداری شد تا به رنگ طلایی درآید، چنانچه سبز زیتونی شود از آن استفاده نمی‌شود. 40 گرم کربنات سدیم در 150 میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و با آب مقطر حجم آن به 200 میلی‌لیتر رسانده شد. برای تهیه محلول استاندارد اسید تانیک (0/1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) 25 میلی‌گرم اسید تانیک در 2 میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و سپس به نسبت 1:10 در آب مقطر رقیق گردید (همیشه از محلول تازه استفاده شد).

اندازه‌گیری فنول کل

مقادیر مناسب از عصاره حاوی تانن برداشته شد (0/02، 0/05 و 0/1 میلی‌لیتر)، حجم آن با آب مقطر به 0/5 میلی‌لیتر رسانده شد، 0/25 میلی‌لیتر معرف فولین شیکالتو و سپس 1/25 میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم به آن اضافه و ورتکس شد. جذب نوری پس از گذشت 40 دقیقه در 725 نانومتر ثبت گردید. با استفاده از منحنی استاندارد بالا، مقدار کل فنول‌ها به صورت اکی والان‌های اسید تانیک به دست آمد و مقدار کل فنول به صورت درصد در ماده خشک بیان شد.

حذف تانن از عصاره حاوی تانن

100 میلی‌گرم PVPP داخل لوله ریخته شد، 1 میلی‌لیتر آب مقطر و 1 میلی‌لیتر عصاره حاوی تانن به آن اضافه شد، ورتکس و به مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه سلیسیوس نگهداری گردید و مجددا ورتکس شد، سپس 10 دقیقه در g3000 سانتریفیوژ شد و مواد شناور جمع‌آوری گردید. این مواد شناور تنها فنول‌های ساده است (تانن‌ها همراه با PVPP رسوب کرده‌اند). مقدار فنول مواد شناور همان‌طور که در بالا ذکر شد اندازه‌گیری گردید. مقدار فنول‌های غیر تانننی بر اساس ماده خشک بیان شد. درصد تانن‌ها از تفاضل مقدار فنول‌های غیر تانننی از کل فنول به دست آمد.

اندازه‌گیری تانن متراکم

تانن متراکم بر اساس روش پاترا و همکاران (48) اندازه‌گیری شد. برای تهیه معرف بوتانول- اسیدکلریدریک (بوتانول- اسیدکلریدریک 95:5) 950 میلی‌لیتر n-بوتانول با 50 میلی‌لیتر اسیدکلریدریک غلیظ (37 درصد) مخلوط شد. در تهیه معرف فریک (2 درصد سولفات آمونیوم فریک در اسیدکلریدریک 2 نرمال) ابتدا با به حجم رساندن 16/7 میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ به وسیله آب مقطر اسید کلریدریک 2 نرمال تهیه شد. 2 گرم سولفات آمونیوم فریک در این در این حجم از اسید کلریدریک 2 نرمال حل شد. این محلول در بطری تیره نگهداری شد. در یک لوله شیشه‌ای 0/5 میلی‌لیتر عصاره تانننی که با استون 70 درصد رقیق شده بود، ریخته شد (مقدار استون باید به اندازه‌ای باشد که از جذب (550 نانومتر) بیش از 0/6 جلوگیری کند، که این بستگی به مقدار تانن متراکم موجود در نمونه دارد و باید از طریق آزمون و خطا تعیین شود). به لوله‌ها معرف بوتانول– اسیدکلریدریک و 0/1 میلی‌لیتر معرف فریک اضافه شد و سپس ورتکس گردید، دهانه لوله‌ها با درپوش شیشه‌ای بسته و به مدت 60 دقیقه در حمام آب 97 تا 100 درجه سلیسیوس قرار داده شد. پس از سرد شدن لوله‌ها میزان جذب در 550 نانومتر ثبت گردید. مقدار جذب لوله بلنک که مخلوط حرارت ندیده است از مقادیر جذب قرائت شده، کسر شد. اگر عصاره حاوی فلاون-4-ال باشد، بدون حرارت رنگ صورتی ایجاد می‌شود. اگر این اتفاق افتاد، برای هر نمونه از یک بلنک حرارت دیده استفاده می‌شود که شامل 0/5 میلی‌لیتر عصاره، 3

1- Polyvinyl poly pyrrolidone

میلی‌لیتر بوتانول و 0/1 میلی‌لیتر معرف فریک است. مقدار تانن متراکم (درصد در ماده خشک) به صورت اکی والان‌های لوکوسیانیدین به وسیله معادله (5) محاسبه شد.

مقدار تانن متراکم (درصد در ماده خشک)= (درصد در ماده خشک) / (فاکتور رقت × 78/26 × جذب در 550 نانومتر) (5)

در این معادله جذب نوری Effective E1%, 1cm, 550nm لوکوسیانیدین، 460 است. اگر استون اضافه نشود و عصاره از 200 میلی‌گرم نمونه در 10 میلی‌لیتر حلال تهیه شود، فاکتور رقت، یک است. وقتی استون 70 درصد اضافه می‌شود (برای جلوگیری از جذب بیش از 0/6)، فاکتور رقت از تقسیم حجم عصاره برداشته شده بر 0/5 میلی‌لیتر حاصل می‌شود.

اندازه‌گیری تولید گاز

انکوباسیون نمونه خشک غلاف نخود سبز برای اندازه‌گیری مقادیر تولید گاز در زمان‌های 2، 4، 8، 12، 24، 48، 72 و 96 ساعت در داخل سرنگ‌های 100 میلی‌لیتری انجام گرفت (38). ماده خوراکی مورد آزمایش به دلیل مواد تانینی و مطالعه اثر آن بر تخمیر و تولید گاز با سطوح 200 (یک برابر وزن نمونه‌های آزمایشی)، 400 (دو برابر وزن نمونه‌های آزمایشی) و 600 (سه برابر وزن نمونه‌های آزمایشی) میلی‌گرم پودر پلی اتیلن گلیکول (MW=6000,Merck) عمل‌آوری و آغشته گردید. از داده‌های تولید گاز برآورد ضریب هضمی ماده آلی و پیش‌بینی انرژی قابل متابولیسم، قابلیت و ویژگی‌های تولید گاز، توسط معادلات منک و همکاران (39) و منک و استنگس (38) از رابطه‌های (6 تا10) محاسبه و انجام گرفت.

$$ME\ (MJ\ kg\ DM^{-1}) = 1.06 + 0.1570GP + 0.0084CP + 0.0220EE - 0.0081CA \quad (6)$$

$$NEL\ (MJ\ kg\ DM^{-1}) = -0.36 + 0.115GP + 0.0054CP + 0.0139CF - 0.0054CA \quad (7)$$

$$DOM\ (\%\ DM) = 9 + 0.99GP + 0.0595CP + 0.018CA \quad (8)$$

$$SCFA\ (mmol\ 200\ mg\ DM^{-1}) = 0.0222GP - 0.004 \quad (9)$$

$$MP\ (g\ kg\ OMD^{-1}) = [19.3 \times DOM\ (Kg)] \times 6.25 \quad (10)$$

در معادلات فوق، ME انرژی قابل متابولیسم (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)، NEL انرژی ویژه شیردهی (مگاژول بر کیلو گرم ماده خشک)، DOM ماده آلی قابل هضم (بر حسب درصد)، SCFA اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول بر 200 میلی‌گرم ماده خشک)، MP پروتئین میکروبی گرم به ازای هر کیلوگرم ماده آلی قابل هضم، GP تولید گاز میلی‌لیتر در 200 میلی‌گرم ماده خشک، CP پروتئین خام (درصد در ماده خشک)، EE چربی خام و CA خاکستر (درصد در ماده خشک) است.

فراسنجه‌های تولید گاز با استفاده از نرم افزار Neway و با معادله ارسکوف و مک دونالد (47) طبق رابطه (11) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

$$P = a + b\ (1 - e^{-c(t - Lt)}) \quad (11)$$

در این معادله، P تجزیه‌پذیری (گاز تولیدی در زمان t)، a گاز تولیدی از بخش محلول در زمان صفر (میلی‌لیتر)، b گاز تولیدی از بخش نامحلول اما قابل تخمیر (میلی‌لیتر)، C ثابت نرخ تولید گاز از بخش نامحلول در طول زمان (میلی‌لیتر بر ساعت) و L برابر فاز تأخیر (ساعت) می‌باشد.

اندازه‌گیری pH و گاز متان

بلافاصله پس از پایان دوره انکوباسیون در 24 ساعت محتویات سرنگ‌ها از میان 4 لایه گاز استریل صاف شده و pH آن با استفاده از دستگاه pH متر دیجیتالی مدل (Metrohm) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری گاز متان پس از انکوباسیون در 24 ساعت با استفاده از تزریق 4 میلی‌لیتر NaOH 10مولار به داخل سرنگ‌ها انجام شد. بی‌درنگ پس از تزریق CO_2 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 غلظت آن ثبت شد (12).

شمارش پروتوزوئرها

برای شمارش پروتوزوئرها، مایع شکمبه صاف شده و تعداد پروتوزوئرها در زیر میکروسکوپ شمارش شد (11). در این روش، 1 میلی‌لیتر از مایع شکمبه صاف شده به 9 میلی‌لیتر فرمالدئید 4 درصد افزوده و به خوبی همزده شد تا یک محلول شکمبه با غلظت یک دهم حاصل گردد. برای شمارش پروتوزوئرها از لام مخصوص شمارش پروتوزوئرها (لام هموسیتومتر) استفاده شد. پس از گذاشتن لامل بر روی محوطه شمارش لام، 100 میکرولیتر از محلول تهیه شده با دقت در میان دو بخش محوطه شمارش گذاشته شد تا محلول هر دو حجره شمارش مشبک بالایی و پایینی آن را پر کند. در این صورت حجم 100 میلی‌لیتر کاملا فضای بین سلول‌های این حجره‌ها را اشغال و در عین حال از جوانب آن بیرون نخواهد رفت. باید دقت نمود که از ایجاد حباب‌های هوا در زیر لامل جلوگیری شود، زیرا در این صورت بخشی از حجم حجره‌ها با هوا اشغال شده و به همان میزان محلول از حجره شمارش به بیرون نشط خواهد کرد. لام حاوی نمونه در زیر یک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 40 مشاهده شد و تعداد پروتوزوئرها تصادفی در 5 خانه از 16 مربع بزرگ (80 مربع کوچک) هر یک از حجره‌های بالایی و پایینی شمارش شده و تعداد پروتوزوئرها در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه با استفاده از رابطه (12) محاسبه شد.

(12) تعداد سلول در هر میلی‌لیتر= {(n1+n2)/2}×1000×d

در این معادله، n1 تعداد سلول‌های شمارش شده در حجره شمارش بالایی (مجموع 5 خانه) و n2 تعداد سلول‌های شمارش شده در حجره پایینی و D فراسنجه رقت می‌باشد که در این آزمایش برابر با 10 می‌باشد.

روش آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

طرح استفاده شده در آزمایش‌های ترکیبات شیمیایی و فنلی، قابلیت هضم و ضرایب a, b, c و پارامترهای تغذیه‌ای حاصل از نتایج تولید گاز خوراک مورد آزمایش، طرح کاملاً تصادفی می‌باشد. مدل استفاده شده عبارت است از:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (13)$$

در این مدل Y_{ij} مقشدار مشاهده در هر صفت، μ میانگین هر صفت در جمعیت کل، Ti اثر تیمار و e_{ij} اثر خطای آزمایش می‌باشد. ثبت و پردازش داده‌ها توسط برنامه Excel و تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن توسط نرم‌افزار SAS (9.1) رویه GLM صورت پذیرفته است (49).

نتایج

ترکیب شیمیایی غلاف نخود سبز

نتایج حاصل از آنالیز شیمیایی غلاف نخود سبز درجدول یک ارائه شده است. به طوری که ماده‌ی خشک، پروتئین خام، محتوی فیبر نامحلول در شوینده خنثی، فیبر نامحلول در شوینده‌ی اسیدی، خاکستر، ماده‌ی آلی و چربی خام به ترتیب 87/53، 10/03، 40/31، 23/69، 8/04، 79/49 و 2/5 درصد برحسب ماده خشک به دست آمده است.

جدول 1- ترکیب شیمیایی غلاف نخود سبز (درصد در ماده خشک)

Table 1- The chemical composition of green pea pod (as % dry matter)

ماده خشک Dry matter (DM)	پروتئین خام Crude protein	دیواره سلولی Neutral detergent fiber	دیواره سلولی بدون همی‌سلولز Acid detergent fiber	خاکستر ASH	ماده آلی Organic matter	عصاره اتری Ether extract	انرژی خام (مگاژول بر کیلوگرم) Gross energy (MJ kg DM^{-1})
15.36	10.03	40.31	23.69	8.05	79.49	2.5	87.53

قابلیت هضم و ارزش انرژی‌زایی

مقایسه میانگین قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، ماده آلی در ماده خشک و انرژی قابل متابولیسم غلاف نخود سبز به روش تلی و تری اصلاح شده (25) در جدول 2 نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، ماده آلی در ماده خشک (بر حسب درصد) و انرژی قابل متابولیسم (بر حسب مگاژول بر کیلوگرم) در غلاف نخود سبز به ترتیب 81/06، 80/46، 73/98 و11/61 بود.

جدول 2- میانگین قابلیت هضم و میزان برآوردی انرژی قابل متابولیسم غلاف نخود سبز

Table2- The means of digestible and estimated values of metabolisable energy of green pea pod

ماده خوراکی Feed	قابلیت هضم ماده خشک (درصد) Dry matter digestibility (%)	قابلیت هضم ماده آلی (درصد) Organic matter digestibility (%)	قابلیت هضم ماده آلی در ماده خشک (درصد) Digestible organic matter in dry matter (%)	انرژی قابل متابولیسم (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک) Metabolisable energy (MJ kg DM^{-1})
غلاف نخود سبز Green pea pods	81.06	80.46	73.98	11.61

ترکیبات فنلی، تانن کل، تانن متراکم

نتایج این بخش آزمایش در ارتباط با مقادیر ترکیبات فنلی، تانن کل، تانن متراکم غلاف نخود سبز در جدول 3 نشان داده شده است. به طوری که فنل کل همراه با تانن، فنل کل بدون تانن، تانن کل و تانن متراکم به ترتیب 0/502، 0/196، 0/306 و 0/044 بر حسب گرم در کیلوگرم ماده خشک به دست آمد.

جدول 3- ترکیبات فنلی، تانن کل، تانن متراکم غلاف نخود سبز (بر حسب گرم در کیلوگرم ماده خشک)

Table 3- The composition of total phenols, tannins and condensed tannins (g kg DM^{-1}) of green pea pods

	فنل کل Total phenol	فنل کل بدون تانن Total phenol non tannin	کل تانن Tannins	تانن متراکم Condensed tannin
غلاف نخود سبز Green pea pods	0.502	0.196	0.306	0.044

میزان و فراسنجه‌های تولید گاز غلاف نخود سبز

ماده خوراکی مورد آزمایش به دلیل مواد تانن و مطالعه‌ی اثر آن بر تخمیر و تولید گاز با سطوح مختلف پودر پلی اتیلن گلیکول (PEG) عمل‌آوری و آغشته گردید. همان‌طور که مشاهده می‌شود در تمام زمان‌های پس از انکوباسیون میانگین گاز تولیدی تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشت. بنابراین گاز تولیدی از فرآوری و مکمل‌سازی غلاف نخود سبز با سطوح افزایشی PEG متأثر نشده است. جدول 4 میزان گاز تولیدی غلاف نخود سبز را در زمان‌های مختلف پس از انکوباسیون در شکمبه را نشان می‌دهد. طبق جدول الگوی تخمیر و میزان گاز تولیدی در تیمارهای مورد مقایسه مشابه است. مقایسه الگوی گاز تولید شده (میلی‌لیتر) به ازای 200 میلی‌گرم ماده خشک این ماده خوراکی همراه با مکمل PEG نشان دهنده تمایل تولید گاز بیشتر در تیمار حاوی 400 میلی‌گرم پلی اتیلن گلایکول در پایان ساعت 24 پس از انکوباسیون در مقایسه با گروه کنترل و تیمارهای حاوی 200 و 600 میلی‌گرم پلی‌اتیلن گلایکول می‌باشد. به طور کلی با افزایش زمان انکوباسیون میزان گاز تولیدی در هر سه تیمار و همچنین گروه کنترل افزایش یافته است (جدول4).

جدول 4- میزان گاز تولیدی (میلی‌لیتر به ازای 200 میلی‌گرم خوراک) غلاف نخود سبز آغشته شده با سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول

Table 4- Gas production trend (ml 200 mg DM^{-1}) of treated green pea pod with different levels Polyethylene glycol (PEG)

تیمارها Treatments	زمان (ساعت) Time (hour)							
	2	4	8	12	24	48	72	96
غلاف نخود سبز Green pea pods	15.33	21.66	41.16	49.25	69	75	76.33	78.33
غلاف نخود سبز با 200 میلی‌گرم پلی اتیلن گلیکول Green pea pods with 200 mg PEG	13.66	18	39.16	47.58	65.33	72.33	73.33	74.66
غلاف نخود سبز با 400 میلی‌گرم پلی اتیلن گلیکول Green pea pods with 400 mg PEG	12.33	19.66	39.83	49.25	69.33	78	79.33	80
غلاف نخود سبز با 600 میلی‌گرم پلی اتیلن گلیکول Green pea pods with 600 mg PEG	13.33	23	37.16	48.58	62.33	69	72.66	74.66
P-value	0.43	0.29	0.78	0.97	0.52	0.63	0.79	0.83
SEM	1.23	1.81	1.8	3.15	3.67	4.9	5.27	5.09

گاز تولیدی از بخش نا محلول اما قابل تخمیر (b) در غلاف نخود سبز با سطوح افزایشی PEG مشابه با گروه کنترل (73/85) بود که این امر می‌تواند به دلیل بیشتر بودن میزان پروتئین خام (10/033 درصد) در این ماده خوراکی باشد و همچنین اثر جزئی تانن در روند تخمیر و تولید گاز بوده است. با توجه به جدول 5 مقایسه مقادیر میانگین فراسنجه‌های تولید گاز، مقدار گاز تولیدی از بخش محلول در زمان صفر در تمامی گروه‌ها مشابه گروه کنترل (2/08 میلی‌لیتر) به دست آمده است.

میزان گاز بخش نا محلول اما قابل تخمیر گروه کنترل (75/16 میلی‌لیتر) در مقایسه با سایر تیمارها مشابه بوده و بین آنها تفاوت معنی‌دار نبود. همچنین ثابت نرخ تولید گاز در گروه کنترل (0/086) برابر و بدون اختلاف معنی‌دار با تیمار حاوی 200 میلی‌گرم PEG و تیمارهای حاوی 400 میلی‌گرم PEG (0/082) و600 میلی‌گرم PEG (0/079) بود.

برآورد انرژی قابل متابولیسم، انرژی ویژه شیردهی، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و قابلیت هضم ماده آلی با استفاده از داده‌های آزمون گاز غلاف نخود سبز بر اساس جدول 6 مقادیر قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم، انرژی ویژه شیرده و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

جدول 5- فراسنجه‌های تولید گاز ماده خشک غلاف نخود سبز آغشته شده با سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول

Table 5- Gas production parameters of dry matter of treated green pea pod with different levels Polyethylene glycol (PEG)[1]

تیمارها Treatments	فراسنجه‌های تولید گاز Gas production parameters				
	a (ml 200 mg^{-1})	b (ml 200 mg^{-1})	c (ml h^{-1})	A(a+b) (ml 200 mg^{-1})	100-(a+b) (ml 200 mg^{-1})
غلاف نخود سبز Green pea pods	2.08	75.16	0.086	77.25	22.75
غلاف نخود سبز با 200 میلی‌گرم پلی اتیلن گلیکول Green pea pods with 200 mg PEG	-0.34	74.34	0.087	73.99	26.01
غلاف نخود سبز با 400 میلی‌گرم پلی اتیلن گلیکول Green pea pods with 400 mg PEG	-1.28	81.04	0.084	79.75	20.25
غلاف نخود سبز با 600 میلی‌گرم پلی اتیلن گلیکول Green pea pods with 600 mg PEG	3.50	70.58	0.081	74.08	25.92
P-value	0.14	0.49	0.89	0.79	0.79
SEM	1.42	4.59	0.006	4.72	4.73

همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود، میزان قابلیت هضم ماده آلی بر حسب درصد، انرژی قابل متابولیسم برحسب مگاژول در کیلوگرم ماده خشک، انرژی شیردهی برحسب مگاژول در کیلوگرم ماده خشک، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول) و همچنین پروتئین میکروبی گرم به ازای هر کیلوگرم ماده آلی قابل هضم درگروه کنترل به ترتیب 81/26، 12/15، 7/62، 1/52و 98/01 بودند. اما بیشترین مقدار برای قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم، انرژی شیردهی، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و پروتئین میکروبی در تیمار حاوی 400 میلی‌گرم PEG مشاهده شده است که به ترتیب 81/55، 12/2، 7/65، 1/53 و 98/37 بود.

جدول 6 - برآورد فراسنجه‌های تغذیه‌ای تولید گاز ماده خشک غلاف نخود سبز آغشته شده با سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول

Table 6- Gas production nutritional of dry matter of treated green pea pod with different levels Polyethylene glycol (PEG)

تیمارها Treatments	فراسنجه‌های تغذیه‌ای تولید گاز Gas production nutritional parameters				
	قابلیت هضم ماده آلی (درصد ماده خشک) OMD (% DM)	انرژی قابل متابولیسم (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک) ME (MJ kg DM^{-1})	انرژی ویژه شیردهی (مگاژول بر کیلو گرم ماده خشک) NE_L (MJ kg DM^{-1})	اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول بر 200 میلی‌گرم ماده خشک) SCFA (mmol 200 mg DM^{-1})	پروتئین میکروبی (گرم بر کیلوگرم ماده آلی قابل هضم) MP (g kg OMD^{-1})
غلاف نخود سبز Green pea pods	81.26	12.15	7.62	1.52	98.01
غلاف نخود سبز با 200 میلی‌گرم پلی اتیلن گلیکول Green pea pods with 200 mg PEG	78	11.65	7.19	1.44	94.08
غلاف نخود سبز با 400 میلی‌گرم پلی اتیلن گلیکول Green pea pods with 400 mg PEG	81.55	12.2	7.65	1.53	98.37
غلاف نخود سبز با 600 میلی‌گرم پلی اتیلن گلیکول Green pea pods with 600 mg PEG	75.33	11.24	6.85	1.37	90.87
P-value	0.52	0.53	0.51	0.50	0.52
SEM	3.27	0.49	0.42	0.081	3.94

اثر سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول بر روی مقدار pH، متان تولیدی و جمعیت پروتوزوئری

طبق جدول 7 گزارش شده در این آزمایش اختلاف pH پس از 24 ساعت انکوباسیون، در بین تیمارهای مختلف معنی‌دار نشد. میانگین پروتوزوئرهای شمارش شده در تیمارهای مورد آزمایش در زمان 24 ساعت پس از انکوباسیون در جدول 7 ارائه شده است. تعداد

کل پروتوزوئرهای شمارش شده در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری (P<0/05) نشان داد. به طوری که بیشترین تعداد پروتوزوئرهای شمارش شده (29500) مربوط به تیمار حاوی 600 میلی‌گرم PEG می‌باشد.

جدول 7- اثر سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول بر روی مقدار pH، متان (میلی‌لیتر به ازای 200 میلی‌گرم خوراک)، و تعداد پروتوزوئرها در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه در زمان 24 ساعت انکوباسیون غلاف نخود سبز

Table 7- Effect of polyethylene glycol on the pH, methane (ml per 200 mg feed), and the number of protozoa in the rumen fluid per milliliter at 24 h of incubation green pea pods

تیمار Treatments	pH	متان Methane	پروتوزوئرها Protozoa
غلاف نخود سبز Green pea pods	6.89	43.33	185000
غلاف نخود سبز با 200 میلی‌گرم پلی اتیلن گلیکول Green pea pods with 200 mg PEG	7	40.33	213333
غلاف نخود سبز با 400 میلی‌گرم پلی اتیلن گلیکول Green pea pods with 400 mg PEG	6.9	42.67	213334
غلاف نخود سبز با 600 میلی‌گرم پلی اتیلن گلیکول Green pea pods with 600 mg PEG	6.98	45.0	295000
P-value	0.34	0.031	0.0054
SEM	0.049	0.87	15523

افزایش جمعیت پروتوزوئرها در نمونه آزمایشی با استفاده از پلی اتیلن گلیکول می‌تواند نشان دهنده اثرات منفی تانن روی تعداد پروتوزوئرها باشد، چرا که تانن‌ها با اثر مسقیم روی پروتوزوئرها و محدود کردن فرایند تخمیر شکمبه می‌توانند جمعیت پروتوزوئرها را کاهش دهند. پلی اتیلن گلیکول به دلیل تمایل بالا برای باند شدن با تانن می‌تواند اثرات منفی تانن را روی پروتوزوئرها و تخمیر میکروبی، برطرف کرده و در نهایت منجر به افزایش تعداد پروتوزوئرها و بهبود تخمیر میکروبی شکمبه شود.

بحث

ترکیب شیمیایی

در تغذیه نشخوارکنندگان تأمین مواد مغذی مورد نیاز حیوان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. در حال حاضر در تغذیه نشخوارکنندگان از واژه‌هایی مثل پروتئین خام، کربوهیدرات‌های غیر فیبری، چربی خام، و الیاف خام در شوینده اسیدی به طور گسترده‌ای در تأمین نیازها، سلامت، بهداشت، تغذیه و همچنین تولید استفاده می‌شود. مقدار املاح در داخل گیاه نیز که تابعی از گونه گیاه و خاکی است که گیاه درآن رشد کرده است مجموعا به‌عنوان مواد مغذی در قالب ترکیبات شیمیایی بحث می‌شود (9). در پژوهش ماتیوس آپاریسیو و همکاران (36) مقادیر پروتئین خام، چربی خام و خاکستر غلاف نخود را به ترتیب 10/8، 1/3 و 6/6 درصد گزارش شده است. به طوری که نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد مقدار پروتئین خام حاصله مشابه آن بوده در حالی که مقدار خاکستر کمی بیشتر از نتایج گزارش شده می‌باشد که احتمالا این تفاوت می‌تواند به نوع و رقم گیاه و شرایط پرورش آنها، زمان برداشت و ترکیب مواد معدنی بستر کشت شده ارتباط داشته باشد. تفاوت در ترکیبات شیمیایی خوراک مورد آزمایش با نتایج سایر محققان ممکن است به دلیل تفاوت در شرایط محیطی، نوع خاک، واریته و عملیات کشاورزی انجام شده باشد. به طور کلی تفاوت‌های بین ترکیبات شیمیایی مواد خوراکی مشابه، به‌خصوص در میزان ماده خشک و پروتئین خام ممکن است به دلیل عوامل زراعی مانند کاربرد سطوح مختلف کودهای نیتروژنی، شرایط آب و هوایی، زمان برداشت، شرایط انبار داری، وجود شرایط خشکی در مزرعه، فرایندهای پس از برداشت باشد (29 و 33). فاگ و استوارت (15) و بهنداری و همکاران (5) گزارش نمودند که غلاف بعضی از کهورها[1] (*Prosopis Juliflora*) بسیار خوشخوراک بوده و یکی از اجزای اصلی جیره غذائی نشخوارکنندگان در مناطق خشک و نیمه خشک آمریکای جنوبی می‌باشد و حاوی 14- 9 درصد پروتئین خام است که با یافته‌های این تحقیق مطابقت دارد.

ترکیبات شیمیایی دانه‌های لگوم در تعدادی از مقالات مرور شده است، به طوری که دیگسون و هاگکینگ (13) در گزارش مروری میانگین مقادیر ماده خشک، پروتئین خام و خاکستر خام دانه‌های بقولات را به ترتیب 90/7، 26 و 3/3 درصد گزارش نمودند. به طور کلی گیاهانی که در خاک‌های مختلف رشد می‌کنند، چون مقادیر متفاوتی از مواد معدنی را جذب می‌نمایند دارای ترکیبات شیمیایی متغییری می‌باشند (28). مرحله برداشت، نوع خاکی که در آن علوفه کشت می‌شود، شرایط آب وهوایی، دیگر عوامل محیطی و حتی شرایط آزمایشگاهی که ارزش غذایی مواد خوراکی در آن تعیین

1- کهور از خانواده لگومینوز می‌باشد و به ارتفاع 3- 5 متر می‌رسد.

می‌شود می‌تواند دلیل تفاوت ترکیبات شیمیایی مواد خوراکی مشابه در مناطق مختلف شود (33). تفاوت در ترکیبات شیمیایی به تفاوت در آب و هوا و بارندگی‌ها مربوط باشد، که می‌تواند در مواد مغذی خاک نیز اثر بگذارد (52). با توجه به مقدار پروتئین خام غلاف نخود، که حدود 50 درصد پروتئین خام دانه نخود می‌باشد و مقادیر ترکیبات دیواره سلولی آن در این تحقیق، غلاف نخود سبز را می‌توان به‌عنوان منبع فیبر غیر علوفه‌ای و مواد خوراکی ارزان قیمت جایگزین بخشی از مواد خوراکی اصلی در جیره دام‌ها نمود.

ارزش غذایی مواد خوراکی نشخوارکنندگان با میزان ترکیبات شیمیایی و نیز قابلیت هضم آنها تعیین می‌شود. تعیین قابلیت هضم با استفاده از حیوان زنده پر زحمت و گران بوده و به مواد خوراکی بیشتری نیاز دارد و اغلب برای یک ماده خوراکی به تنهایی نامناسب می‌باشد. بنابراین، ارزیابی معمولی اغلب مواد خوراکی با این روش تقریبا غیر عملی است. وجود خطا ناشی از تعیین نرخ جریان شیرابه هضمی توسط مارکرها و مشارکت منابع متابولیکی در مدفوع (در روش *in vivo*) و نیز وجود تنوع در داخل (اثر زمان) و بین حیوانات (در روش، *in situ*) منجر به گسترش تکنیک‌های جایگزین مانند روش‌های*in vitro* شده است. این روش‌ها ساده، ارزان، دارای تکرار پذیری و قابلیت اعتماد بالا می‌باشند (10 و 57). روش تلی و تری که به طور وسیعی جهت ارزیابی مواد خوراکی استفاده می‌شود یکی از دقیق‌ترین و عملی‌ترین روش‌های آزمایشگاهی موجود جهت پیش‌بینی قابلیت هضم در نشخوارکنندگان می‌باشد (32). قابلیت هضم به‌عنوان بخشی از خوراک که مورد استفاده دام قرار می‌گیرد تعریف می‌گردد. تفاوت در میزان تجزیه‌پذیری یا قابلیت هضم بین گونه‌های مختلف گیاهی می‌تواند از تفاوت درترکیبات شیمیایی آنها ناشی شود. تجزیه‌پذیری علوفه در درجه اول توسط میزان محتویات سلولی (مواد محلول و قابل تجزیه) و در درجه دوم توسط ساختار و میزان دیواره سلولی(NDF) تعیین می‌شود. همان‌طور که در این تحقیق نیز مشاهده شد، با افزایش میزان دیواره‌ی سلولی قابلیت هضم آنها کاهش پیدا کرد. سلولز موجود در دیواره سلولی تا 60 درصد می‌تواند هضم شود، با این شرط که در شکمبه باقی بماند، بنابراین تنها عامل تأثیرگذار بر هضم سلولز ماندگاری آن در شکمبه است (9). برای اینکه میزان عبور از شکمبه بیشتر باشد باید میزان کاهش دیواره سلولی قابل تجزیه زیاد باشد اما بخشی از دیواره سلولی در برابر تجزیه میکروبی نیز مقاوم است و با افزایش سن گیاه این مقاومت بیشتر می‌شود. از طرفی میکروارگانیسم‌های شکمبه بافت علوفه را از حفره داخلی سلول‌های گیاهی شروع به تجزیه می‌کنند. بنابراین، ترکیبات محلول قبل از دیواره سلولی تجزیه می‌شوند (23). دراغلب گونه‌ها بین میزان لیگنین و تجزیه‌پذیری دیواره سلولی همبستگی بالایی گزارش شده است. اسمیت و همکاران (50) طی تحقیقی با استفاده از گونه‌های مختلف علوفه‌ای گزارش کردند که لگومی مانند شبدر قرمز در مقایسه با دیگر علوفه‌ها به خصوص گراس‌ها بین لیگنینی شدن و قابلیت هضم آزمایشگاهی کمترین همبستگی را دارد که این به دلیل تفاوت بین ساختار دیواره سلولی لگوم‌ها با گراس‌ها است دیواره سلولی اولیه گراس‌ها نسبت به لگوم‌ها ساختار متراکم‌تری دارد. از طرفی دیواره سلولی لگوم‌ها در مقایسه با ساختار متناظر گراس‌ها به راحتی در معرض تجزیه میکروبی قرار می‌گیرد (23). در مقایسه میزان تجزیه‌پذیری شبدر قرمز با تیموتی گزارش کرد که تجزیه‌پذیری دیواره‌ی سلولی در لگوم‌هایی مثل شبدر قرمز نسبت به تیموتی کمتر است که این می‌تواند اثر مثبتی بر روی مصرف آن داشته باشد. در پژوهش والیس (61) نشان داده شده که گاوهای تغذیه شده با سیلوی شبدر قرمز درمقایسه با گاوهای تغذیه شده با سیلوی ری گراس به میزان و دفعات بیشتری می‌خورند، یعنی مصرف اختیاری آنها بالاست. یک دلیل برای این تفاوت می‌تواند این باشد که گاوهای تغذیه شده با گراس در مقایسه با لگوم زمان بیشتری را برای نشخوار صرف می‌کنند که این مصرف اختیاری و دریافت انرژی را در آنها محدود می‌کند. این مسئله با این توضیح و مقایسه گاو با حشرات گیاهخوار بیشتر روشن می‌شود که گاو هنگام تغذیه با لگومی مثل شبدر قرمز مانند شته تنبلی می‌شود که از شیره گیاه تغذیه می‌کند. اما وقتی از گراسی مثل تیموتی استفاده می‌کند مانند موریانه کوشایی است که سعی در هضم سلولز دارد.

ترکیبات فنلی، کل تانن و تانن متراکم

موادی که زیست فراهمی تانن‌ها را محدود می‌کند، می‌توانند بر شرایط تغذیه‌ای حیوانی که خوراک تانن‌دار را مصرف می‌کند، اثر بگذارند (59). اثر تانن در سرکوب تولید متان قبلا توسط هیس و همکاران (22) گزارش شده بود، کسی که در شرایط آزمایشگاهی مشاهده کرد که گنجاندن لگوم‌های گرمسیری در جیره‌هایی بر پایه علوفه تولید متان را در ارتباط با ماده خشک تجزیه شده بالای 30 درصد، کاهش داد که این احتمالا به دلیل حضور تانن در لگوم‌هاست. در تحقیق ماکار (33) منشأ تانن‌های متراکم را صرف نظر از میزان آنها عامل مهمی در تعیین اثرات تغذیه‌ای تانن‌های متراکم عنوان شده است. در گزارش تریل و همکاران (54) آمده است که استخراج تانن متراکم از محتوی مواد خوراکی حاوی مقادیر کم و اندک آن به سختی صورت گرفته و تنها یک سوم آن استحصال می‌شود. برخی از مطالعات وجود غلظت‌های متوسط تانن‌های متراکم (45- 20 گرم بر کیلوگرم ماده خشک) را عاملی مؤثر در جهت افزایش کارایی استفاده از پروتئین غذا می‌دانند (40). وجود تانن‌های متراکم می‌تواند مقدار ماده آلی تجزیه شده در شکمبه و همچنین اتلاف انرژی به صورت متان را کاهش دهد (27) و اثر آنها به صورت غیر مستقیم با کاهش تولید هیدروژن و به صورت مستقیم با مهار عمل متانوژن‌ها رخ

می‌دهد (53). در کاهش جمعیت پروتوزوئرهائی شکمبه، تانن‌ها بسیار موثرند (41 و 60). و با تأثیر بر جمعیت پروتوزوئرهایی فعالیت متانوژن‌ها را کاهش می‌دهد (26). در برخی پژوهش‌ها، حضور تانن‌ها موجب کاهش میزان اسید چرب فرار در شکمبه شده است (14). در مطالعات دیگر علت آن را به تأثیر منفی تانن برجمعیت پروتوزوئرهایی و تجزیه سریع نشاسته و نهایتا کاهش pH شکمبه مربوط می‌دانند (42). البته اثرات مثبتی همانند محافظت پروتئین‌ها در مقابل تخمیر شکمبه‌ای، ضد نفخ و ضد انگلی نیز به تانن‌ها نسبت داده می‌شود (33). محققین نیتروژن متصل به تانن را جزو نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی و غیر قابل دسترس برای هضم دانسته‌اند. چنانچه محققین گزارش کرده‌اند که افزایش میزان نیتروژن قابل دسترس در اثر استفاده از ترکیبات و روش‌های غیر فعال کننده تانن‌های متراکم و کاهش میزان نیتروژن نامحلول در شوینده اسیدی و خنثی را می‌توان به دلیل کاهش اتصالات تانن- پروتئین دانست (51).

میزان و فراسنجه‌های تولید گاز غلاف نخود سبز

منک و استنگس (38) گزارش نمودند که وقتی که از روش تولید گاز برای تعیین خصوصیات هضمی مواد خوراکی استفاده می‌شود فرض بر این است که گاز تولیدی تحت تأثیر هیچ عامل دیگری جز ترکیبات شیمیایی و خصوصیات فیزیکی خوراک قرار نمی‌گیرد اما تغییر در فعالیت میکروبی مایع شکمبه ممکن است روی نرخ تخمیر و استوکیومتری تخمیر اثر بگذارد. به طور کلی عواملی مانند منشأ میکروبی مایع شکمبه، گونه دامی که مایع شکمبه از آن جمع‌آوری می‌گردد، زمان جمع‌آوری مایع شکمبه، جیره غذایی دام دهنده مایع شکمبه و حتی مدت نگهداری و نوع مواد نگهدارنده مایع شکمبه می‌توانند روی ماهیت مایع شکمبه و فعالیت میکروبی آن تأثیر بگذارند (8، 21، 35 و 44). تخمین میزان تجزیه پذیری علاوه بر ترکیبات شیمیایی خوراک بستگی به روش کاربردی و همچنین مایع شکمبه دارد. والیس (61) گزارش کرد که تجزیه دیواره سلولی بیشتر توسط فعالیت آنزیمی مایع شکمبه محدود می‌شود تا خواص معین دیواره سلولی. به طور کلی هنگامی که یک ماده خوراکی با مایع شکمبه دارای بافر در شرایط آزمایشگاهی انکوباسیون می‌شود، کربوهیدرات‌ها به اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و گاز (عمدتا دی اکسید کربن و متان) تخمیر می‌گردند. تولید گاز حاصل از پروتئین در مقایسه با کربوهیدرات‌ها نسبتا اندک است. همچنین سهم چربی نیز در تولید گاز قابل صرف نظر می‌باشد. مقدار گاز تولید شده می‌تواند بیانگر گوارش پذیری مواد خوراکی مورد استفاده نیز باشد (38). شاید وجود تانن‌ها در حجم کل گاز تولیدی مؤثر بوده است. گزارش شده است که تانن‌های قابل هیدرولیز در مقادیر زیاد برای نشخوارکنندگان و جمعیت میکروبی شکمبه سمی است. اثر محدود کننده تانن‌های متراکم در کاربرد مواد مغذی و کاهش در فعالیت‌های آنزیمی نیز گزارش شده است (33).

در این پژوهش کلیه منحنی‌های تولید گاز از الگوی استاندارد S شکل سه مرحله‌ای تبعیت می‌کرد. به جز این که در اواخر زمان نهایی انکوباسیون هم قدری تولید گاز وجود داشت که دلیل آن این است که با گذشت زمان انکوباسیون میکروب‌ها می‌میرند و خود به سوبسترایی اضافی برای بقیه میکرب‌ها تبدیل می‌شوند، این توجیهی برای آن مقدار جزئی گاز تولیدی در زمان‌های نهایی انکوباسیون است (30 و 46).

فراسنجه‌های تولید گاز خوراک‌های مختلف نشان دهنده تفاوت در ترکیبات شیمیایی، به‌خصوص کربوهیدرات‌های قابل تخمیر، پروتئین خام، دیواره سلولی و غیره می‌باشد (20 و 29). به هر حال نرخ گاز تولیدی نسبت به مواد آلی تخمیر شده با طول زمان تخمیر متفاوت است. در زمان‌های طولانی‌تر انکوباسیون ماده آلی کمتری برای تولید حجم مساوی گاز نسبت به زمان‌های کوتاهتر انکوباسیون لازم است. کل گاز تولیدی صرف نظر از مدت انکوباسیون به وسیله اندازه گیری مقادیر اسیدهای چرب آزاد تولید شده قابل پیش‌بینی است (7). از کل گاز تولیدی50 درصد، دی اکسید کربن و متان ناشی از تخمیر مستقیم است که با روش‌های استوکیومتری قابل محاسبه است و مابقی آن ناشی از آزاد شدن گاز دی اکسید کربن از بافر است (33). در روش آزمون گاز با انجام یک دوره انکوباسیون هم قابلیت هضم حقیقی و هم قابلیت هضم ظاهری قابل برآورد می‌باشد. این روش ممکن است قابلیت هضم ظاهری را بیش از مقدار واقعی برآورد نماید که این ایراد ناشی از تخمیر ثانویه جسد میکروارگانیسم‌های شکمبه است. بنابراین بهتر است که برای برآورد قابلیت هضم از زمان‌های کوتاه انکوباسیون استفاده شود که در این مورد کمترین خطا درساعت 24 انکوباسیون وجود دارد. در سیستم تولید گاز فرض بر این است که نرخ و میزان تولید گاز به وسیله خصوصیات خوراک‌ها محدود می‌گردد که البته باید توجه داشت زمانی که تفاوت در فعالیت میکروارگانیسم‌ها مطرح باشد این فرض رد می‌شود چرا که در این حالت کربوهیدرات‌های تجزیه شده بایستی به جای تولید گاز صرف رشد باکتری‌ها شوند. آزمایش‌های متعددی نشان داده است که افزایش غلظت مایع شکمبه روی تخمیر بخش محلول اثر زیادی دارد. چنانچه بخواهیم تخمیر بخش نا محلول را در آب افزایش دهیم، غلظت‌های بالاتری از مایع شکمبه در انکوباسیون مورد نیاز است. چرا که افزایش غلظت مایع شکمبه باعث افزایش غلظت میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌های آنها گردیده و همچنین این اثر غلظت باعث آسان‌تر چسبیدن میکروارگانیسم‌ها به ذرات مواد خوراکی می‌شود.

برآورد انرژی قابل متابولیسم، انرژی ویژه شیرده، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و قابلیت هضم ماده آلی داده‌های آزمون گاز غلاف نخود سبز

اسیدهای چرب فرار تولید شده در شکمبه- نگاری چیزی حدود 57 درصد انرژی قابل متابولیسم و یا حدود 70 درصد انرژی قابل هضم مورد نیاز حیوان (با فرض این نکته که انرژی قابل متابولیسم 82 درصد انرژی قابل هضم باشد) را تأمین می‌نماید. به طور کلی تجزیه کربوهیدرات‌ها در داخل شکمبه، هگزوزهای قابل استفاده برای میکروارگانیسم‌ها را به وجود می‌آورد. در میکروب‌ها، هگزوزها جهت نگهداری و یا رشد مورد استفاده قرار گرفته و عمدتا پسمانده حاصل از این فرایند که می‌تواند مورد استفاده‌ی حیوان نیز واقع شود، اسیدهای چرب فرار می‌باشد که این اسیدهای چرب فرار به‌عنوان منبع انرژی در حیوان میزبان مورد استفاده قرار می‌گیرد (9). اختلاف بین میزان گاز تولیدی تیمارهای مورد نظر به دلیل تفاوت در تولید میزان اسیدهای چرب فرار است. محققین زیادی همبستگی بالای بین گاز تولید شده از سوبسترا و اسید چرب کوتاه زنجیرتولید شده را گزارش کرده‌اند. کربوهیدرات‌های سریع‌الهضم هنگام تخمیر در مقایسه با استات نسبتا پروپیونات بیشتری را تولید می‌کنند و زمانی که کربوهیدرات‌های کند هضم تخمیر می‌شوند برعکس آن رخ می‌دهد (3، 18 و 20).

میزان گاز تولیدی در تمام زمان‌های انکوباسیون و پارامترهای تخمینی گاز تولیدی و همچنین اسیدهای چرب کوتاه زنجیر همبستگی منفی با میزان NDF و ADF که کربوهیدرات‌های دیر هضم هستند داشت، این مطلب توسط دیگران نیز گزارش شده است (20). هیلمن و همکاران (24) گزارش کردند که تولید گاز با سنتز پروتئین میکروبی ارتباط مثبت دارد. اگر چه تولید گاز یک محصول غذایی بی‌فایده است (37). اما پایه‌های مفیدی که از آن انرژی قابل متابولیسم، قابلیت هضم ماده آلی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر ممکن است پیش‌بینی شوند را فراهم می‌کند. با توجه به کاربرد روش تولید گاز در ارائه اطلاعات اضافی از فراسنجه‌های تغذیه‌ای (مثل انرژی قابل متابولیسم، انرژی شیردهی، قابلیت هضم ماده آلی و پروتئین میکروبی)، می‌توان از این روش در برآورد میزان تخمیر و مهار شدگی تخمیر و انتقال آن به بخش‌های پایین‌تر دستگاه گوارش و تخمین ارزش غذایی خوراک‌ها برای تنظیم جیره غذایی نشخوارکنندگان استفاده کرد.

اثر سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول بر روی مقدار pH، متان تولیدی و جمعیت پروتوزوئری

دفع متان توسط نشخوارکنندگان بخشی از فرایند طبیعی هضم در دستگاه گوارش آنها می‌باشد (48) که نتیجه تخمیر مواد گیاهی توسط جمعیت میکروبی شکمبه است تولید متان به‌عنوان یک روند نا کارآمد در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان است (12). علاوه بر اثر منفی گاز متان که در کاهش راندمان انرژی مصرفی دام‌ها دارد. این گاز 10 برابر دی اکسید کربن در بروز پدیده گازهای گلخانه‌ای نقش دارد و پیش‌بینی می‌شود که این گاز مسبب 15 -17 درصد از پدیده گرم شدن زمین باشد. در حال حاضر وجود متان در شکمبه در گرم شدن کره زمین شناخته شده می‌باشد و تلاش برای دستکاری تخمیر میکروبی شکمبه به سمت کاهش تولید متان از طریق استفاده از مواد افزودنی خوراک، یک اولویت اصلی محسوب می‌شود (48). از این رو، مهار فعالیت متانوژن‌ها همواره به‌عنوان یکی از راهکارهای بهبود انرژی قابل متابولیسم مطرح بوده است. با این حال، در بسیاری از مطالعات مهار مستقیم متانوژن‌ها اثری در بهبود راندمان استفاده از انرژی نداشته است (6). پروتوزوئرهای مژکدار به صورت طبیعی در مایع شکمبه اغلب نشخوارکنندگان دیده می‌شوند. هرچند توزیع جنسی و گونه‌ای آن در حیوانات مختلف بسته به غذای مصرفی و موقعیت جغرافیایی می‌تواند متغییر باشد (11). پروتوزوئرها خاصیت صیادی نسبت به باکتری‌ها داشته و فعالیت پروتئولایتیکی شدیدی دارند. اگر چه پروتوزوئرها در تخمیر شکمبه‌ای نقش ضروری ندارند، اما غالبا در هضم فیبر مؤثر بوده و از افت شدید pH شکمبه جلوگیری می‌کنند. اگرچه ارزش بیولوژیکی پروتئین پروتوزوئرای و باکتریایی یکسان می‌باشد، قابلیت هضم پروتئین پروتوزوئرای به طور معنی‌داری بالاتر می‌باشد (11). تأثیر پروتوزوئرها بر هضم شکمبه بستگی به تراکم جمعیتی و توزیع جنسیتی جمعیت آنها دارد. تفاوت‌های موجود بین جنس‌های مختلف پروتوزوئرها در مصرف ذرات غذایی و باکتری‌ها می‌تواند تنوع موجود در اثرات پروتوزوئرها بر هضم را توجیه کند (11). نتایج این آزمایش نشان داد که افزایش جمعیت پروتوزوئرها به دنبال افزایش سطح پلی اتیلن گلیکول و نقش مهارکنندگی آن روی تانن باعث عدم کاهش متان و جلوگیری از افت pH شکمبه شده است.

نتیجه گیری کلی

میزان ترکیبات فنلی و تانن در غلاف نخود سبز نیم گرم در کیلوگرم ماده خشک و کمتر از آن بود و موجب اثر جزئی تانن در روند تخمیر و تولید گاز بوده است. این امر با مکمل سازی آن با استفاده از پلی اتیلن گلیکول به‌عنوان عامل غیر فعال و کمپلکس کننده تانن نیز تأیید شد به طوری که در اثر مکمل‌سازی غلاف نخود سبز با پلی اتیلن گلیکول در میزان گاز حاصل از بخش محلول، بخش نا محلول و مجموع تولید گاز از بخش محلول و نا محلول در غلاف نخود سبز تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد (غلاف نخود سبز بدون مکمل‌سازی شده با پلی اتیلن گلیکول) مشاهده نشد. با توجه به مقدار پروتئین خام

غلاف نخود که حدود 50 درصد پروتئین خام دانه نخود می‌باشد و مقادیر ترکیبات دیواره سلولی و پتانسیل تولید گاز آن در این تحقیق غلاف نخود سبز را می‌توان به‌عنوان منبع فیبر غیر علوفه‌ای و مواد خوراکی ارزان قیمت جایگزین بخشی از مواد خوراکی اصلی در جیره دام‌ها نمود. میزان هضم و خصوصیات تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای NDF غلاف نخود سبز نشان می‌دهد که می‌تواند به‌عنوان خوراک با قابلیت تجزیه‌پذیری بالا برای نشخوارکنندگان و به تبع آن یک منبع انرژی با ارزشی مطرح باشد. غلاف نخود سبز به‌عنوان یک ماده خوراکی با انرژی قابل متابولیسم مطلوب، پروتئین خام متوسط و قابلیت هضم خوب، خوراکی با ارزش غذایی مناسب بوده که می‌تواند جایگزین بخشی از مکمل‌های پروتئینی گیاهی در جیره نشخوارکنندگان شود.

منابع

1- Alipoor, F., H. Arabi., O. Zamani., D. Alipoor., M. Maleki., M. Irajifar, and A. Atomi. 2011. Effect on organic matter digestibility and metabolizable energy PEG Pakistani prosopis fruit. The first National Congress on Science and New Technologies in Agriculture. Zanjan University, Zanjan, Iran. (In Persian).
2- Alipoor, D., M. M. Tabatabai., P. Zamani., H. Ali Arabi., A. A. Saki, and Z. Zamani. 2010. Determination chemical composition and gas production parameters in waste raisins. Iranian Journal of Animal Science, 1(2): 109-118. (In Persian).
3- Annexstad, R. J., M. D. Stern., D. E. Otterby., J. G. Linn, and W. P. Hansen. 1987. Extruded soybeans and corn gluten meal as supplemental protein sources for lactating dairy cattle. Journal of Dairy Science, 70(4): 814- 822.
4- AOAC .2005. Official Methods of Analysis, AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, Maryland 20877-2417, USA.
5- Bhandari, D.S., H. N. Cavil, and A. Hussein. 1979. Chemical composition and nutritive value of Khejri (prosopis cineraria) tree leaves. Annals of Arid Zone, 18 (3): 170 -173.
6- Bhatta, R., Y. Uyeno., K. Tajima., A. Takenaka., Y. Yabumoto., I. Nonaka., O. Enishi, and M. Kurihara. 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.
7- Blummel, M., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 1997. In vitro gas production: atechnique revisited. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 77(1-5): 24–34.
8- Calsamiglia, S, and M. D. Stern. 1995. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. Journal of Animal Science, 73(5): 1459- 1465.
9- Daesh Mesgaran, M, and A. Vakili. 2007. Digestion and Metabolism in Ruminants. Ferdowsi University of Mashhad publication. Mashhad, Iran. (In Persian).
10- Daesh Mesgaran, M. 2008. Modern Methods of in vitro Studies Animal Science with Special Attention to Agriculture by-products. Ferdowsi University of Mashhad publication. Mashhad, Iran. (In Persian).
11- Dehority, B. A. 1984. Evaluation of sub sampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa, Applied and Environmental Microbiology, 48(1): 182-185.
12- Demeyer, D., M. De Meulemeester., K. De Graeve, and B.W. Gupta. 1988. Effect of fungal treatment on nutritive value of straw. Medicine Faculty Landbouww. Rijksuniversity. Gent, 53(4a): 1811–1819.
13- Dixon, R. M, and B. J. Hosking. 1992. Nutritional value of grain legumes for ruminants. Nutrition Research Reviews, 5(1): 19-43.
14- Dorman, H. J. D., P. Surai, and S. G. Deans. 2000. In vitro antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. Journal of Essential Oil Research, 12(2): 241–248.
15- Fagg, C. W, and J. L. Stewart. 1994. The value of acacia and prosopis in arid and semi-arid environments. Journal of Arid Environments, 27(1): 3-25.
16- FAO Statistical. 1995. Available at http://www.fao.org/corp/statistics/en.
17- Frutos, P., G. Hervas., F. J. Giraldez, and A. R. Mantecon. 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. Spanish Journal of Agricultural Research, 2(2): 191–202.
18- Getachew, G., P. H. Robinson., E. J. DePeters, and S. J. Taylor. 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 111(1-4): 57–71.
19- Ghasemi, S., A. A. Naserian., R. Valizadeh., A. M. Tahmasebi., A. R. Vakili., M. Behgar, and S. Ghovvati. 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. Small Ruminant Research, 104(1-3): 94– 98.
20- Gurbuz, Y. 2007. Determination of nutritive value of leaves of several Vitis vinifera varieties as a source of alternative feedstuff for sheep using in vitro and in situ measurements. Small Ruminant Research, 71(1-3): 59-66.
21- Hervas, G., P. Frutusos., F. J. Giraldez., M. J. Mora., B. Fernandez, and A. R. Mantecon. 2005. Effect of preservation on fermentative activity of rumen fluid inoculum for in vitro gas production techniques. Animal Feed Science and Technology, 123-124(1): 107-118.

22- Hess, H. D., F. L. Valencia., L. M. Monsalva., C. E. Lascano, and M. Kreuzer. 2004. Effects of tannins in calliandra calothyrsus and supplemental molasses on ruminal fermentation in vitro. Journal of Animal Feed Science, 13: 95-98.
23- Hetta, M. 2004. Timothy and red clover as forage for dairy production (In vitro Degradation Characteristics and Chemical Composition). PhD Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Swedish.
24- Hillman, H. K., C. J. Newbold, and C. S. Steward. 1993. The contribution of bacteria and protozoa to ruminal forage fermentation in vitro as determined by microbial gas production. Animal Feed Science and Technology, 36(3-4): 193-208.
25- Holden, L. A. 1999. Comparison of method of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. Journal of Dairy Science, 82(8): 1791- 1794.
26- Iason, G. 2005. The role of plant secondary metabolites in mammalian herbivory: ecological perspectives, in symposium on .plants as animal foods: a case of catch. Proceedings of the Nutrition Society, 64: 123-131.
27- Jayanegara, A., Leiber, F., Kreuzer, M. 2012. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 96(3): 365-375.
28- Khalil, J. K., W. N. Sawaya, and S. Z. Hyder. 1986. Nutrient composition of Atriplex leaves grown in Saudi Arabia Journal Range Management, 39(2): 104–107.
29- Khanum, S. A., T. Yaqoob., S. Sadaf., M. Hussain., M. A. Jabbar., H. N. Hussain., R. Kausar, and S. Rehman. 2007. Nutritional evalution of varius feedstuffs for livestock production using in vitro gas method. Pakistan Veterinary Journal, 27(3): 129-133.
30- Lopez, S., M. S. Dhanoa., J. Dijkstra., A. Bannink., E. Kebreab, and J. France. 2007. Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. Journal Animal Feed Science and Technology, 135(1-2): 139-156.
31- Lotfi Nuqany, R, and Y, Roozbahan. 2011. Estimation of organic matter digestibility of pistachio shells using Taleshi sheep rumen fluid. Iranian Journal of Animal Science, 3: 231-237. (In Persian).
32- Mabjeesh, S. J., M. Cohen, and A. Arieli. 2000. In vitro methods for measuring the dry matter digestibility of rumen feedstuffs: comparition of methods and inoculum source. Journal of Dairy Science, 83: 2289-2249.
33- Makkar, H. P. S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small Ruminant Research, 49(3): 241–256.
34- Makkar, H. P. S. 2004. Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. Assessing quality and safety of animal feeds. Fao. 160: 55-86.
35- Mansouri, H., A. Nick Khairkh., M. Rezaiean., M. Moradi, and S. A. Mirhadi. 2003. Determination of degradability and gas production of forage using the nylon bag technique. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 34(2): 495- 507. (In Persian).
36- Mateos-aparicio, I., A. Redondo-Cuenca., M. J. Villanueva-Suárez., M. A. Zapatarevilla, and M. D. Tenorio-Sanz. 2010. Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. Food Science and Technology, 43(9): 1467-1470.
37- Mauricio, R. M., E. Owen., F. L. Mould., I. Givens., M. K.Theodorou., J. France., D. R. Davies, and M. S. Dhanoa. 2001. Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an in vitro gas production technique for evaluating forages. Animal Feed Science and Technology, 89(1-2): 33-48.
38- Menke, K, and H. Steinggass. 1988. Estimation of the energetic feed value from chemical analyses and in vitro gas production using rumen fluid. Animal Research and Development, 28: 7-55.
39- Menke, K. H., L. Raab., A. Salewski., H. Steingass., D. Fritz, and W. Schneider. 1979. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuff from the gas production when they incubated with rumen liquor in vitro. Journal of Agricultural Science–Cambridge, 93(1): 183-189.
40- Min B. R., T. N. Barry., G. T. Attwood, and W. C. Mc Nabb. 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(1-4): 3–19.
41- Min, B. R., G. T. Attwood., K. Reilly., W. Sun., J. S. Peters., T. N. Barry, and W. C. Mcnabb. 2002. Lotus corniculatus condensed tannins decrease in vivo populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. Canadian Journal of Microbiology, 48(10): 911.921.
42- Min, B. R., W. E. Pinchak., J. D. Fulford, and R. Puchala. 2005. Effect of feed additives on in vitro and in vivo rumen characteristic and frothy bloat dynamics in steers grazing weat pasture. Animal Feed Science and Technology, 123-124(2): 615-629.
43- Mirzaei-Aghsaghali, A., N. Maheri-Sis., H. Mansouri., M. Ebrahim Razegh., A. Mirza-Aghazadeh., H. Cheraghi, and A. Aghajanzadeh-Golshani. 2011. Evaluating potential nutritive value of pomegranate processing by-products for ruminants using in vitro gas production technique. Journal of Agricultural and Biological Science, 6(6): 45-51.
44- Mould, F. L., K. E. Kliem., R. Morgan, and R. M. Mauricio. 2005. In vitro microbial inoculum: a review of its function and properties. Animal Feed Science and Technology, 123–124(1): 31–50.

45- Navid Shad, B., A. R, Jafari Saiyadi. 2006. Animal Nutrition. Haghshenas Press, Rasht, Iran. (In Persian).
46- Nick Khairkh, A, and A. Mahdavi. 2006. Compare nylon bag technique (in situ) and gas test method for determining the nutritional value of feed. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 37(2): 292-281. (In Persian).
47- Ørskov, E. R, and I. Mcdonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. Journal of Agricultural Science–Cambridge, 92(2): 499-503.
48- Patra, A. K, and J. Saxena. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochemistry, 71(11-12): 1198–1222.
49- SAS Institute. 2000. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. Cary, NC, USA.
50- Smith, L.W., H. K. Goering, and C. H. Gordon. 1972. Relationships of forage compositions with rates of cell wall digestion and indigestibility of cell walls. Journal of Dairy Science, 55(8): 1140-1147.
51- Sniffen, C. J., J. D. O'connor., P. J. Van Soest., D. G. Fox, and J. B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating diets: ii.carbohydrate and protein availability. Journal of Animal Science, 70(11): 3562-3577.
52- Tabatabai, S. M. 2003. Aspects of the physiology of ruminants. Buali Sina University press, Iran. (In Persian).
53- Tavendale, M. H., L. P. Meagher., D. Pacheco., N. Walker., G. T. Attwood, and S. Sivakumaram. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with lotus pedunculatus and medicago sativa, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. Animal Feed Science and Technology, 123 (1): 403-419.
54- Terrill, T. H., A. M.rowan., G. B. Douglas, and T. N. Barry. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrates meals and cereal grains. Journal of the Science of Food and Agriculture, 58(3): 321-329.
55- Tiemann, T. T., C. E. Lascano., H. R. Wettstein., A. C. Mayer., M. Kreuzer, and H. D .Hess. 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. Animal, 2(5): 790–799.
56- Tilley, J. M. A, and R. A Terry. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. Grass and Forage Science, 18(2): 104-111.
57- Torbatinejad, N., S.Galeshi, and T. Ghoorchi. 2009. Evaluation by chemical and in vitro gas production techniques of Foxtail Millet grow in northern Iran. Journal of Animal and Veterinary Advances, 8(12): 2662-2669.
58- Van Soest, P. J., J. B. Roberson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science, 74(10): 3583-3597.
59- Villalba, J. J., F. D. Provenza, and R. E Banner. 2002. Influence of macronutrients and polyethylene glycol on intake of a quebracho tannin diet by sheep and goats. Journal of Animal Science, 80(12): 3154-3164.
60- Wallace, R. J., L. C. Arthaud, and J. Newbold. 1994. Influence of yucca schidigera extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 60(6): 762-767.
61- Wallace, R. J., S. J. A. Wallace., N. McKain., V. L. Nsereko, and G. F. Hartnell. 2001. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages mixed ruminal microorganisms in vitro. Journal of Animal Science, 79(7): 1905-1916.
62- Zamani, O., Hey, Hejabri, and F. KafilZadeh. 2010. Effect of PEG on fermentation pattern of acorn (Quercus persica) in vitro. The first National Congress on Science and New Technologies in Agriculture. Zanjan University, Zanjan, Iran. (In Persian).

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 9, No. 3, Fall 2017, p. 284-299

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 9، شماره 3، پاییز 1396، ص. 299-284

Green Pea (*Pisum sativum* L.) Pods Phenolic Components and Their Effects on *in Vitro* Ruminal Digestibility and i*n Vitro* Gas Production

J. Seifdavati [1]*- Z. Islami [2]– H. Abdi Benemar [3]– F. Mirzaei Aghje Gheshlagh[3]- R. Seyed Sharifi [1]

Received: 21-09-2016
Accepted: 07-01-2017

Introduction Agricultural by-products are the main feed sources for feeding livestock under conditions of feed restriction. However, phenolic compounds and tannins may limit use of some of them. Optimum utilization of agricultural by-products, needs adequate information about the animals needs, and access to nutritious feed used by livestockin order to determine the nutritional value and palatability, as well as limiting factors in feed such as phenolic compounds. Byproduct after harvesting peas (green peas) that have been manually extracted and separated parts of the stems, leaves and seed pods devoid of green. The green beans for the purposes of human nutrition and food preparation and consumption of the fresh green can be separated. In this study, the empty pods of green pea plants were considered. The purpose of the study was to estimate the effects of green pea (*Pisum sativum* L.) pods tannins and phenolic compounds on in vitro ruminal, post-ruminal digestibility using laboratory methods.

Materials and Methods In order to to determine the chemical composition and in vitro ruminal degradability of green pea pod cell wall, nylon bag and test gas technique were applied. After preparation of green peas and isolating pods and drying, chemical composition analysis for dry matter, crude protein, ether extract, organic matter, ash, neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) were done as AOAC. The total phenolic content was estimated by Folin Ciocalteu method. Feed tested due to tannins substance and study its effect on the fermentation and gas production were processed and stained with levels 200 (one the weight of a sample), 400 (twice the weight of the sample) and 600 (three times the weight of sample) mg polyethylene powder glycol (Merck, MW = 6000). Effect of polyethylene glycol on the pH, methane (ml per 200 mg feed), and the number of protozoa in the rumen fluid per milliliter at 24 h of incubation green pea pods were studied. The obtained data were analyzed in a completely randomized design.

Results and Discussion The results of chemical composition analysis for dry matter, crude protein, ether extract, organic matter, ash, neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) were 87.53, 10.03, 2.5, 79.49, 8.04, 40.31 and 23.69 percent, respectively. Determination of rumen digestibility done by Holden method in digestion bottle and digestibility of dry matter, organic matter, dry organic matter digestibility (DOMD) and metabolizable energy were 81.06, 80.46,73,98 and 11.61, respectively. Amount of gas production recorded for 2,4,8.12,24,48,72 and 96 times after incubation and fermentation parameters with gas production (ml/200mgDM), in vitro organic matter digestibility(%DM), metabolizable energy (MJ/kg DM), NEL(MJ/kg DM) and short chain fatty acids (mmol/200mgDM) calculated. By treating and supplementation of this feed by PEG significant difference was not observed for gas amount of soluble fraction, insoluble fraction, and the total gas production from soluble and insoluble fractions of green pea pods. In this study after 24 h of incubation pH differences among different treatments was not significant. Total protozoa counted in significant differences between treatments ($P < 0.05$) showed. So that the greatest number of protozoa counts (29500) is related to treatment with 600 mg of PEG. The results showed that seeks to increase the level of polyethylene glycol and protozoa population growth inhibitory effect of the tannins indues reducing methane and avoid a drop in rumen pH.

Conclusion The phenolic compounds and tannin in green pea pods was less than half a gperkg of dry matter, and caused minor effect of tannins in the process of fermentation and *in vitro* gas production. This coincides with the supplementation with the use of polyethylene glycol as an inactive complex of tannins was also confirmed.

So that the effect of supplementation of green pea pods with polyethylene glycol in amount gas from the

1- Assistant Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran,

2- Former Student of Animal Science Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran,

3- Associates Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran.

(*- Corresponding Author Email: jseifdavati@uma.ac.ir)

solution, the insoluble fractions and the total gas production of soluble and insoluble fractions of the green pea pods significant difference from the control group (green pea pods without supplementation with polyethylene glycol) was observed. Results of this research showed that green pea pod have high nutritive value for ruminants showed that it could be used as feed with high degradability and suitable energy source for ruminants.

Keywords: Chemical composition, Digestibility, Gas production, Green pea pod, Tannin, Non-forage fiber.