

## تأثیر سطوح مختلف تفاله زیتون بر فراسنجه‌های تخمیری، مقدار آنزیم‌های سلولازی و تولید پروتئین میکروبی شکمبه بره‌های نر لری

فرانک دوستی<sup>۱</sup> - تقی قورچی<sup>۲\*</sup> - اصغر سپهوند<sup>۳</sup> - بهروز دستار<sup>۲</sup> - آرش آذرفر<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۸

### چکیده

جهت بررسی تأثیر تفاله زیتون جیره غذایی بر فراسنجه‌های شکمبه‌ای، فعالیت آنزیم‌های سلولاز و سنتز پروتئین میکروبی تعداد ۱۵ بره نر لری با میانگین وزن زنده  $3 \pm 27/94$  و میانگین سن سه ماهگی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار و پنج تکرار مورد استفاده قرار گرفتند. هر بره پرواری در قفس انفرادی به مدت ۱۶ روز دوره عادت پذیری و ۸۴ روز دوره پرورش نگهداری شد. تیمارهای آزمایش شامل سطوح صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد تفاله زیتون در جیره غذایی بود. جیره‌های آزمایشی از نظر محتوی پروتئین و انرژی برابر بودند. نتایج نشان دادند، استفاده از تفاله زیتون دارای تأثیر معنی‌داری بر فراسنجه‌های شکمبه‌ای، فعالیت آنزیم‌های سلولاز و سنتز پروتئین میکروبی می‌باشد. استفاده از جیره حاوی ۱۰ و ۲۰ درصد تفاله زیتون باعث کاهش معنی‌داری در مقدار pH، غلظت آمونیاک تولیدی، مشتقات پورینی و تولید پروتئین میکروبی در شکمبه نسبت به جیره شاهد شد. فعالیت کل آنزیم کربوکسی متیل سلولاز در جیره با ۱۰ درصد تفاله زیتون و آنزیم میکروکریستالین سلولاز در جیره با ۲۰ درصد تفاله زیتون افزایش یافت. با توجه به نتایج این آزمایش، به نظر می‌رسد استفاده از تفاله زیتون تا سطح ۲۰ درصد خوراک بره‌های پرواری می‌تواند موجب کاهش pH و غلظت آمونیاک شیرابه شکمبه و از طرفی افزایش فعالیت آنزیم‌های سلولیتیک و پروتئین عبوری از شکمبه شود.

واژه‌های کلیدی: کربوکسی متیل سلولاز، مشتقات پورینی، میکروکریستالین سلولاز.

### مقدمه

بکارگیری روش‌های نوین برای تبدیل و فرآوری مواد غذایی، بسیاری از منابع خوراک دامی قابل رقابت با منابع غذایی انسانی شده است که از جمله آنها می‌توان از دانه ذرت، گندم و جو نام برد (۱). به منظور جبران این کمبود، بهره برداری و استفاده بهینه از پسماندها و تولیدات جانبی کشاورزی به‌عنوان خوراک در تغذیه نشخوارکنندگان برای بهبود تولیدات دامی اجتناب ناپذیر است (۳۱). لذا ضرورت جایگزینی منابع انرژی‌زایی که کمتر مورد استفاده انسان بوده و هزینه تولید آنها کمتر باشد احساس می‌شود.

تفاله خام زیتون محصولی از روغن‌کشی میوه زیتون است، که شامل بخش خمیری، هسته، پوست و پس آب می‌باشد (۳۶). تفاله زیتون بعد از خشک شدن به‌عنوان یکی از محصولات جانبی می‌تواند در تغذیه دام مورد استفاده قرار گیرد (۳۹). تفاله زیتون (خشک شده) حاوی لیگنین بالا (۲۸ درصد تا ۳۲ درصد ماده خشک)، سلولز (۹ درصد تا ۱۳ درصد ماده خشک) و همی سلولز (۱۳ درصد تا ۱۷ درصد ماده خشک) زیادی می‌باشد (۳۵). مشکل دیگر در استفاده از تفاله زیتون، وجود مواد ضدتغذیه‌ای از جمله ترکیبات فنلی (۱/۴۱ تا ۴/۲۹ گرم در صد گرم ماده خشک) و تانن (۰/۵۷۵ تا ۱/۱ گرم در صد گرم ماده خشک) و اثرات منفی احتمالی آنها روی دام است (۲۹)، اما تانن موجود در تفاله زیتون باعث حفاظت از پروتئین خوراک، پروتئین

شرایط اقلیمی خشک و نیمه خشک و کمبود نزولات آسمانی در ایران همراه با کاهش تولیدات زراعی موجب شده است تا تغذیه دام بخش قابل توجهی از هزینه دامپروری را به خود اختصاص دهد و درآمدهای ناشی از تولید فرآورده‌های دامی را متأثر سازد. در ایران تقاضا برای فرآورده‌های دامی در نتیجه رشد جمعیت و پیشرفت‌های اقتصادی، رشد روز افزونی داشته است (۱). کمبود آب و عدم دسترسی به منابع خوراک دام در کشورهای در حال توسعه، موجب افزایش سهم هزینه‌های مربوط به خوراک دام شده و درآمد تولید فرآورده‌های دامی را تحت تأثیر قرار داده است. از طرفی با پیشرفت تکنولوژی و

۱- دانشجوی دکتری گروه تغذیه دام و طیور، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان،

۲- استاد گروه تغذیه دام و طیور، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان،

۳- استادیار گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد،

۴- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد.

(\* نویسنده مسئول: Email: ghoorchi@yahoo.com)

عبوری بالاتر (۲۲)، کاهش مقدار pH و غلظت آمونیاک (۱۷ و ۲۰) می‌شود.

## مواد و روش‌ها

### دام‌ها و جیره‌های آزمایشی

جهت انجام این آزمایش از تعداد ۱۵ رأس بره نژاد لری در دامداری دانشکده کشاورزی لرستان استفاده شد. در ابتدای آزمایش، ۱۵ بره با میانگین وزن زنده  $3 \pm 27/94$  و سن سه ماهگی به طور تصادفی در سه گروه تقسیم شدند. سپس به هر یک از گروه‌ها یک تیمار خوراکی اختصاص یافت.

جیره‌های آزمایشی شامل سطوح صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد تفاله زیتون به صورت جایگزین با جو مطابق جدول‌های استاندارد غذایی (NRC, 1986) تهیه شدند (جدول ۱). جیره‌های کاملاً مخلوط شده (TMR) با نسبت ۲۵ به ۷۵ یونجه خرد شده و کنسانتره تهیه و در اختیار بره‌ها قرار داده شد. تفاله زیتون خشک شده از واحد خوراک دام شرکت تولیدی جهان الکل واقع در استان گیلان شهرک صنعتی جمال آباد لوشان تهیه شد.

قبل از شروع آزمایش، بره‌ها بر ضد بیماری‌های شایع، آنترتوکسمی و بیماری تب برفکی به صورت زیر جلدی در ناحیه کتف دام واکسینه شدند. برای از بین بردن انگل‌های داخلی (گوارشی و ریوی) در دو نوبت به فاصله دو هفته به دام‌ها قرص‌های ضدانگل (آلبندازول و نیکلوزاماید) با استفاده از بولوس خوران خورانیده شد. جیره‌های آزمایشی برای مدت ۱۶ روز به منظور عادت‌پذیری و ۸۴ روز دوره آزمایش در دو نوبت صبح و بعدازظهر (در ساعات، ۸ و ۱۶) به میزان مساوی و آب نیز به طور آزاد در اختیار بره‌ها قرار گرفت.

### فراسنجه‌های تخمیری در شکمبه

#### اندازه‌گیری pH

برای بررسی خصوصیات تخمیری شکمبه، در آخرین روز دوره پرورش سه ساعت بعد از خوراک‌دهی صبح شیرابه شکمبه به روش لوله مری به صورت مجزا از بره‌ها تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی جمع‌آوری گردید. بلافاصله pH با دستگاه pH متر (متروم ۷۴۴، سوئیس) اندازه‌گیری شد.

#### اندازه‌گیری غلظت آمونیاک

میزان نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه با استفاده از روش فنل-هیپوکلریت<sup>۴</sup> و منحنی استاندارد تعیین گردید (۱۰). ابتدا از هر بره مقدار ۲۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه گرفته شد و با استفاده از چهار لایه پارچه متقال صاف گردید. سپس این شیرابه با اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال به نسبت پنج به یک (پنج شیرابه به یک ۰/۲ HCl نرمال) رقیق گردید و تا روز آزمایش فریز شد.

قسمت عمده خوراک نشخوارکنندگان را دیواره سلول گیاهی تشکیل می‌دهد، در حالی که این حیوانات توانایی تولید آنزیم‌های لازم برای تجزیه سلولز و همی سلولز، که جزء اصلی این خوراک‌های الیافی هستند، را ندارند. به همین دلیل حیوانات نشخوارکننده برای دستیابی و استفاده از ترکیبات دیواره سلولی، متکی به هضم آنزیمی میکروارگانیسم‌های مستقر در شکمبه (باکتری‌ها، پروتوزوا و قارچ‌ها) می‌باشند. این میکروب‌ها از طریق آنزیم‌هایشان نقش مهمی در فرآیند هضم بازی می‌کنند (۱۶).

آنزیم‌های باکتریایی شکمبه دو دسته آنزیم‌های خارجی<sup>۱</sup> و آنزیم‌های داخلی<sup>۲</sup> هستند. آنزیم‌های تجزیه‌کننده فیبر شامل فعالیت کل سلولاز، کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز می‌باشد. اندوگلوکاناز (کربوکسی متیل سلولاز) توسط باکتری‌های سلولیتیک اصلی شکمبه که تجزیه سلولز را آغاز می‌کنند، تولید می‌شود (۱۵).

مواد خوراکی دام محتوی اسید نوکلئیک کمی بوده و عمده اسید نوکلئیک رسیده به روده کوچک منشأ میکروبی دارد، زیرا RNA میکروبی در روده مورد تجزیه و متابولیسم قرار گرفته و به ترکیبات پورینی آلانتوئین، اسید اوریک، گزانتین و هیپوگزانتین تبدیل شده و از طریق ادرار دفع می‌شود. پورین‌های دفعی ادرار شامل ترکیبات پورینی با منشأ میکروبی و داخلی می‌باشد. میزان پورین‌های با منشأ داخلی بسته به گونه حیوان و وزن متابولیکی آنها متفاوت است. مقدار دفع پورین‌های ادرار با جذب آنها ارتباط دارد، بنابراین با اندازه‌گیری دفع پورین از طریق ادرار می‌توان اندازه پروتئین میکروبی تولید شده در شکمبه را تعیین کرد (۱۶). تعیین میزان تولید پروتئین میکروبی شکمبه از طریق شاخص‌های داخلی یا خارجی محاسبه می‌شود. مهم‌ترین شاخص‌های خارجی ایزوتوپ‌های  $^{15}\text{N}$ ،  $^{35}\text{S}$  و  $^{32}\text{P}$  و مهم‌ترین شاخص‌های داخلی، اسید ریبو نوکلئیک (RNA) میکروبی، اسید دی آمینوپیمیلیک (DAPA)، آمینواتیل فسفونیک اسید ( $\text{AEP}^3$ )، دی-آلانین و روش چن و گومز می‌باشند (۱۹۹۵). نسبت آلانتوئین به کراتینین دفعی ادرار هم به عنوان شاخص تولید پروتئین میکروبی استفاده می‌شود (۱۶).

تاکنون پژوهش‌های به منظور بررسی اثر تفاله زیتون بر روی آنزیم‌های سلولیتیک و سنتز پروتئین میکروبی و فراسنجه‌های شکمبه‌ای انجام نشده، لذا این آزمایش به منظور تأثیر تفاله زیتون در جیره بره‌های نر لری بر روی آنزیم‌های سلولاز و سنتز پروتئین میکروبی و فراسنجه‌های شکمبه‌ای طراحی و انجام شد.

1- Exo

2- Endo

3- Amino ethyl phosphonic acid

4- Phenol hypochlorite assay

جدول ۱- اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی مورد استفاده بره‌های پرواری (درصدی از ماده خشک جیره)

ترکیب مواد خوراکی Feedstuff ingredients	جیره‌های آزمایشی (تفاله زیتون) Experimental diets (olive cake)		
	Control	10%	20%
علوفه یونجه Alfalfa hay	25	25	25
دانه جو Barley grain	50	40	30
تفاله زیتون Olive cake	0	10	20
دانه ذرت Corn grain	7.45	5.9	5.6
سبوس گندم Wheat bran	9.05	10.6	10.9
کنجاله سویا Soybean meal	6	6	6
جوش شیرین Sodium bicarbonate	0.5	0.5	0.5
نمک Salt	0.5	0.5	0.5
مکمل ویتامینی و معدنی <sup>۱</sup> Vitamin and mineral premix <sup>1</sup>	0.5	0.5	0.5
کربنات کلسیم CaCo <sub>3</sub>	1	1	1
ترکیب شیمیایی Chemical composition			
ماده خشک Dry matter	89.14	89.30	90.09
مگا کالری در کیلوگرم ماده خشک) انرژی قابل متابولیسم Metabolisable energy (Mcal kg <sup>-1</sup> )	2.6	2.6	2.6
پروتئین خام Crude protein	14	14	14
عصاره اتری Ether extract	2.54	3.33	4.1
خاکستر Ash	5.38	5.57	5.7
فیبر محلول در شوینده خنثی NDF	30.58	35.99	40.88
فیبر محلول در شوینده اسیدی ADF	17.68	22.28	26.74
کربوهیدرات غیر الیافی NFC	47.5	41.11	35.32
کلسیم Calcium	0.76	0.81	0.85
فسفر Phosphorus	0.38	0.37	0.34
کنسانتره Concentrate	75	75	75
علوفه Forage	25	25	25

<sup>۱</sup> در هر کیلوگرم جیره: ۹۹/۲ میلی‌گرم منگنز، ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۸۴/۷ گرم روی، ۱۰ میلی‌گرم مس، ۱ میلی‌گرم ید، ۰/۲ میلی‌گرم سلنیم، ۹۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۹۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D و ۹۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E.

<sup>1</sup> Each kilogram of vitamin–mineral premix contained: Vitamin A (9,000 IU), Vitamin D3 (9,000 IU), Vitamin E (9,000 IU), Iron (50 mg), Copper (10 mg), Manganese (99/2 mg), Zinc (84.7 mg), Iodine (1 mg), Selenium (0.2 mg).

## اندازه‌گیری آنزیم‌های سلولاز

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های سلولیتیک شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز نمونه‌های شیرابه شکمبه توسط لوله مری سه ساعت پس از خوراک‌دهی وعده صبح از دام‌ها در آخرین روز دوره آزمایش جمع‌آوری، و بلافاصله توسط یک فلاسک عایق با دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه تغذیه دانشکده علوم دامی دانشگاه منابع طبیعی و کشاورزی گرگان انتقال داده شدند.

بخش بندی شیرابه شکمبه: به منظور بخش‌بندی آنزیم‌های مورد بررسی در شیرابه شکمبه به سه بخش جامد<sup>۱</sup>، خارج سلولی<sup>۲</sup> و درون سلولی<sup>۳</sup>، ابتدا شیرابه (حدود ۵۳ میلی‌لیتر) توسط دو لایه پارچه صاف گردید و مواد باقی‌مانده روی پارچه به‌عنوان بخش جامد در نظر گرفته شد. برای جداسازی بخش‌های پروتوزوایی و باکتریایی، ابتدا شیرابه با دور ۴۵۰×g به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. پلت به دست آمده به‌عنوان بخش پروتوزوایی در نظر گرفته شد. مایع شفاف رویی (سوپرناتانت) مجدداً با دور ۲۷۰۰×g به مدت ۲۳ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. پلت به دست آمده در این مرحله به‌عنوان بخش باکتریایی مشخص شد. در نهایت، مایع شفاف رویی به‌عنوان منبع آنزیم‌های خارج سلولی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).

استخراج آنزیم‌ها از بخش‌های مختلف و تخمین فعالیت آنزیمی: آنزیم‌های شکمبه‌ای مورد آزمایش در بخش‌های مختلف شیرابه شکمبه طبق روش هریستو و همکاران (۱۹۹۹) استخراج گردید (۱۸). محاسبه فعالیت آنزیمی: فعالیت آنزیم‌های سلولیتیک در هر حیوان در هر یک از سه بخش شیرابه شکمبه محاسبه (۳) گردید. گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت هر یک از آنزیم‌های مورد آزمون بر اساس روش میلر (۱۹۵۹) تخمین زده شد (۲۵). فعالیت آنزیمی نمونه‌ها بر حسب نانومول در دقیقه در میلی‌لیتر قندهای آزاد شده (گلوکز) و به کمک منحنی استاندارد تعیین گردید.

## اندازه‌گیری پروتئین میکروبی سننژ شده در شکمبه

اندازه‌گیری پروتئین میکروبی تولید شده در شکمبه با استفاده از روش تخمین مشتقات پورینی دفع شده در ادرار چن و گومز (۱۹۹۵) انجام شد (۱۱). این روش نیازمند انجام واکنش‌ها در زمان دقیق و بدون وقفه می‌باشد. نمونه‌های ادراری که قبل از ذخیره‌سازی رقیق شده بودند دوباره بر روی آنها رقیق‌سازی انجام گرفت. رقیق‌سازی مجدد به این دلیل بود که غلظت نمونه‌های نهایی باید در دامنه

استانداردها قابل اندازه‌گیری باشد. به طور معمول برای این که غلظت تک تک مشتقات پورینی نمونه‌ها در دامنه استاندارد (۴۰-۱۰ میلی‌گرم در لیتر) قابل اندازه‌گیری باشد، نمونه‌های ادرار برای اندازه‌گیری آلانتوئین به طور معمول ۶۸-۱۷ بار (متوسط ۵۵ بار) و برای اسید اوریک ۱۲-۳ بار (متوسط ۵ بار) با آب مقطر رقیق می‌شوند.

اندازه‌گیری آلانتوئین به وسیله روش رنگ سنجی<sup>۴</sup>: در این روش ابتدا آلانتوئین تحت شرایط بازی ضعیف در دمای بالا هیدرولیز شده و اسید آلانتوئین تولید می‌گردد. این اسید در محیط اسیدی ضعیف به اوره و اسید گلای اگزالیک تبدیل می‌شود. اسید گلای اگزالیک با فنیل هیدرازین هیدروکلرید واکنش داده و فنیل هیدرازون تولید می‌گردد. این واکنش به واکنش ریمینی-اسکریور معروف است.

مواد مورد نیاز اندازه‌گیری آلانتوئین: سود ۰/۵ مولار، سود ۰/۰۱ مولار، اسید کلریدریک ۰/۵ مولار و فنیل هیدرازین.

محاسبات آلانتوئین: با انتقال داده‌ها بر روی نرم افزار Excel و رسم منحنی استاندارد و جذب نوری خوانده شده برای هر نمونه، مقدار آلانتوئین هریک از نمونه‌ها تعیین می‌شود.

-تعیین گزانتین به علاوه هیپوگزانتین به روش آنزیمی

مواد شیمیایی مورد نیاز: بافر دی هیدروژن پتاسیم فسفات ۰/۲ مولار با pH= ۷/۳۵، ال-هیستیدین ۴/۳ میلی‌مولار، زانتین اکسیداز تعیین اسید اوریک به وسیله روش آنزیمی اوریکاز مواد شیمیایی مورد نیاز: بافر دی هیدروژن پتاسیم فسفات ۰/۶۷ مولار و با pH= ۹/۴ (تنظیم pH فقط با KOH صورت گیرد)، آنزیم اوریکاز (شرکت سیگما، شماره U-9375).

محاسبات اسید اوریک: با استفاده از نرم افزار Excel منحنی استاندارد رسم و با توجه به آن مقدار اسید اوریک هر یک از نمونه‌ها تعیین شد.

## محاسبه پروتئین میکروبی

تمام مراحل ذیل با استفاده از یک سری معادلات لجستیک با نرم افزار اکسل انجام شد.

۱- محاسبه کل مشتقات پورینی (TPD) دفع شده در ادرار به صورت میلی‌مول در روز از جمع مقادیر آلانتوئین، اسید اوریک، گزانتین و هیپوگزانتین به دست آمد.

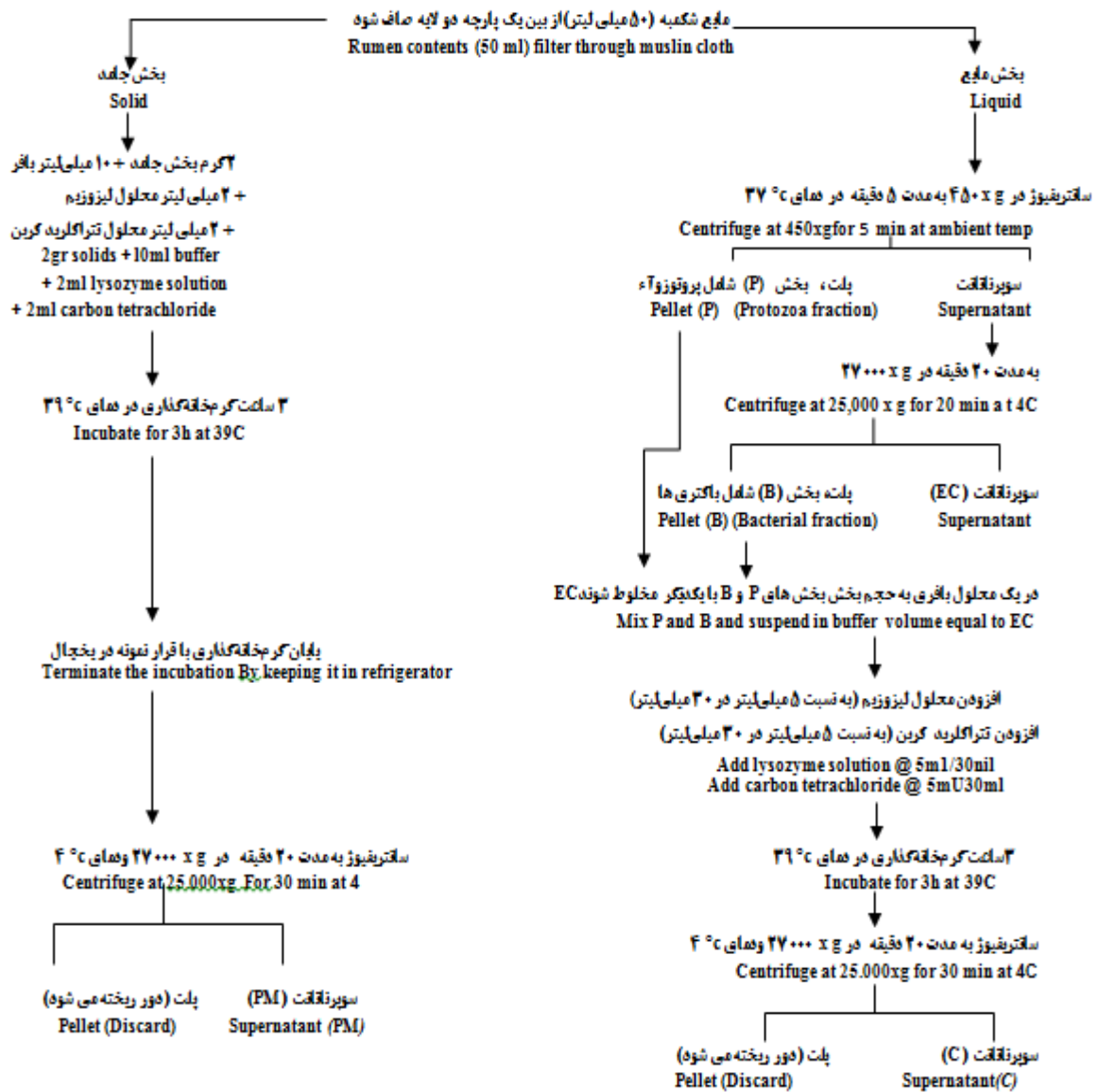
۲- محاسبه TPD جذب شده و TPD دفع شده: با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید.

$$Y = 0.84X + (0.150W^{0.75}e^{-0.25x}) \quad (1)$$

در این معادله، Y: TPD دفع شده از طریق ادرار (mmol d<sup>-1</sup>)، X: TPD جذب شده توسط دام (mmol d<sup>-1</sup>)، W<sup>0.75</sup>: وزن

- 1- Particulate material
- 2- Extracellular
- 3- Cellular

متابولیکی و E: عدد نپری می‌باشد.



شکل ۱- بخش‌بندی شیرابه شکمبه و استخراج آنزیم‌های هیدرولیتیک، آگاروال (۲۰۰۰)

PM: میکروب‌های چسبیده به مواد خوراکی در شکمبه، EC: بخش خارج سلولی (شیرابه شکمبه)، C: بخش درون سلولی (میکروب‌های معلق در مایع شکمبه)

Figure 1- Fractionation of rumen contents and extraction of hydrolytic enzymes, Agarwal (2000)

PM = Particulate material, EC= Extracellular, C= Cellular

محاسبه جذب پورین روزانه: با توجه به معادله بالا و جایگزین کردن مقدار Y (TPD) دفع شده از طریق ادرار) مقدار X برآورد گردید.

۴- محاسبه جریان روده‌ای نیتروژن میکروبی:

$$\text{Microbial N (gN/d)} = \frac{X \text{ (mmol/d)} \times 70}{0.116 \times 0.83 \times 1000} = 0.727X \quad (5)$$

سپس برای محاسبه X مشتق رابطه بالا را گرفته و در رابطه زیر جایگزین کرده و مقدار X برآورد گردید.

$$f(x) = 0.84X + (0.150W^{0.75}e^{-0.25x}) - Y \quad (2)$$

$$f'(x) = (0.84 - 0.038W^{0.75}e^{-0.25x}) \quad (3)$$

$$X(n+1) = Xn - \frac{f(Xn)}{f'(Xn)} \quad (4)$$

(۴۱) که می‌تواند در کاهش pH شکمبه موثر باشد (۱۳)، پس می‌توان گفت که احتمالاً کاهش pH شکمبه در این آزمایش، به علت وجود تانن در تفاله زیتون و یا کاهش جمعیت پروتوزوایی در شکمبه بوده است اگرچه برخی پژوهشگران گزارش کردند که خوراک‌های حاوی تانن اثری بر pH شکمبه نداشته است (۹ و ۴۲).

#### غلظت آمونیاک شکمبه

غلظت آمونیاک شکمبه بره‌های مورد آزمایش در جدول ۲ نشان داده شده است منبع اصلی تأمین نیتروژن برای تولید پروتئین باکتریایی در شکمبه، آمونیاک حاصل از تجزیه پروتئین خوراک است (۲۲) و حداقل غلظت مناسب آمونیاک برای رشد میکروبی شکمبه پنج میلی‌گرم در دسی لیتر شیرابه شکمبه می‌باشد (۹).

در این آزمایش، غلظت آمونیاک شکمبه بره‌ها با افزایش سطح تفاله زیتون در جیره‌های آزمایشی نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). کاهش غلظت آمونیاک شکمبه در اثر تانن توسط دیگر پژوهشگران نیز گزارش گردیده است (۹ و ۲۴) و همچنین با مصرف جیره حاوی تفاله زیتون تولید آمونیاک در شیرابه شکمبه نسبت به تیمار شاهد کمتر می‌باشد (۲۹) به هر حال برخی محققین اظهار داشتند، مصرف خوراک حاوی تانن تأثیر معنی‌داری بر غلظت آمونیاک در شکمبه نداشته، هر چند با افزایش سطح تانن در خوراک، غلظت آمونیاک شکمبه تمایل به کاهش داشته است (۴۲).

دلایل کاهش غلظت آمونیاک در شکمبه با مصرف تفاله زیتون احتمالاً تشکیل تانن-پروتئین، مهار فعالیت دی‌آمینازی میکروبی توسط تانن قابل هیدرولیز و در نتیجه کاهش نرخ تجزیه و تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین در شکمبه (۳۸) همچنین کاهش رشد باکتری‌های پروتئولایتیک (۲۷) بوده است.

در این معادله،  $0.83/0$ : قابلیت هضم پورین‌های میکروبی،  $0.70$ : مقدار نیتروژن میکروبی ( $70 \text{ mgN mmol}^{-1}$ )،  $0.116/0$ : نسبت نیتروژن پورینی به کل نیتروژن در مخلوط میکروبی شکمبه ( $0.100 \div 0.116$ )

#### تجزیه و تحلیل آماری: این آزمایش در قالب طرح کاملاً

تصادفی با سه تیمار سطوح صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد تفاله زیتون و پنج تکرار در هر تیمار، انجام پذیرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از رویه GLM و نرم افزار آماری SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای LSD انجام شد.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (6)$$

در این معادله،  $Y_{ij}$ : مقدار هر مشاهده،  $T_i$ : اثر تیمار آزمایشی و  $e_{ij}$ : خطای آزمایش می‌باشد.

#### نتایج و بحث

##### فراسنجه‌های شکمبه

##### pH شکمبه

مقادیر pH شکمبه در جدول ۲ نشان داده شده است. مقدار pH شکمبه بره‌ها با استفاده از جیره حاوی تفاله زیتون در جیره کاهش معنی‌داری یافت ( $P < 0.05$ ). البته این کاهش مقادیر pH از لحاظ بیولوژیکی در دامنه طبیعی pH شکمبه (۶/۱ تا ۶/۹) قرار داشت (۲۳).

نتایج آزمایشات متعدد نشان داده‌اند که تانن، pH شکمبه را کاهش خواهد داد (۱۷، ۲۶ و ۴۱). در آزمایش مومن و همکاران (۳۰) نیز pH شکمبه با مصرف تفاله زیتون کاهش یافت، از طرفی کاهش تعداد پروتوزوآها در جیره‌های حاوی تانن نیز اثبات شده است (۲۶) و

جدول ۲ - پارامترهای مایع شکمبه در گروه‌های آزمایشی<sup>۱</sup>

Table 2- Rumen parameters of experimental groups<sup>1</sup>

فاکتورها Parameters	جیره‌های آزمایشی <sup>۲</sup> Experimental diets <sup>2</sup>			SEM	P-value
	1	2	3		
	pH	6.59 <sup>a</sup>	6.27 <sup>b</sup>		
نیتروژن آمونیاکی (لیتر دسی در میلی‌گرم) Ammonia nitrogen (mg dl <sup>-1</sup> )	13.95 <sup>a</sup>	10.82 <sup>b</sup>	8.00 <sup>c</sup>	0.78	0.0010

<sup>۱</sup> میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ( $P < 0.05$ ).

<sup>۲</sup> جیره شاهد (تفاله زیتون صفر درصد)، ۲ (تفاله زیتون ۱۰٪)، ۳ (تفاله زیتون ۲۰٪).

<sup>1</sup> Means within same row with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>2</sup> 1) control (olive cake 0 %), 2) olive cake 10 %, 3) olive cake 20%.

خام همراه باشد، همچنین مطالعات نشان می‌دهد که کاهش نرخ تجزیه پروتئین در شکمبه حیوانات تغذیه شده با تانن منجر به کاهش

افزایش تانن در جیره می‌تواند با کاهش جمعیت میکروارگانیسم‌های شکمبه (۴۱) و کاهش قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و پروتئین

محققین نشان دادند که تعداد بیشتر میکروب‌های وابسته به بخش جامد عمدتاً در هضم فیبر دخیل بوده و سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک می‌شوند (۳۴ و ۵). همان‌گونه که ملاحظه شد، میزان فعالیت آنزیم‌های میکروبی در بخش جامد شیرابه شکمبه همه آنزیم‌های بررسی شده به مراتب بیشتر از دو بخش دیگر یعنی بخش خارج سلولی و بخش درون سلولی بود (جدول ۳). از طرفی، کمترین میزان فعالیت آنزیمی مربوط به بخش خارج سلولی شیرابه شکمبه بود. وجود حداکثر فعالیت آنزیمی در بخش جامد شیرابه شکمبه نشان‌دهنده کلونیزه شدن ذرات خوراک توسط میکروب‌ها است. میزان فعالیت آنزیمی کمتر در بخش سلولی شیرابه به این سبب است که میکروب‌های سلولیتیک به ذرات خوراکی متصل شده‌اند و جمعیت میکروب‌های آزاد در بخش مایع بسیار کمتر است (۴ و ۳۴). حداقل غلظت آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیاف در بخش خارج سلولی شیرابه شکمبه قابل انتظار بود، زیرا این آنزیم‌ها به پوشش سلولی متصلند و تنها مقدار کمی از آنها به دلیل تخریب یا تجزیه مکانیکی میکروب‌های تجزیه‌کننده لیاف به بخش مایع سلولی آزاد می‌شود (۴).

میزان فعالیت کربوکسی متیل سلولاز در بخش جامد، خارج سلولی، درون سلولی و کل شیرابه شکمبه نسبت به بخش‌های مربوطه در آنزیم میکروکریستالین سلولاز بیشتر بود. آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز بر روی بخش میانی زنجیر سلولز اثر نموده و از طریق هیدرولیز آن را پاره می‌نماید و تولید دو زنجیر کوتاه‌تر می‌کند. اما میکروکریستالین سلولاز به قسمت انتهایی آزاد زنجیره حمله نموده و طی مراحل متوالی سلوبیوز را تولید می‌نماید (۱۲). افزایش فعالیت کربوکسی متیل سلولاز نسبت به میکروکریستالین سلولاز در این آزمایش، احتمالاً به خاطر وجود سوپسترای بیشتر برای آن باشد که مطابق با یافته‌های سایر محققین است (۲۸ و ۳۴). همچنین دامنه فعالیت آنزیم‌های این تحقیق نسبت به سایر پژوهش‌ها بیشتر بود، تغییرات فعالیت آنزیمی به علت نوع منبع انرژی‌زای مصرفی احتمالاً به دلیل تغییرات رخ داده در جمعیت میکروبی شکمبه بوده است. به عبارت دیگر نوع جیره تغذیه شده به حیوانات باعث تغییر جمعیت میکروبی و متعاقب آن تغییر در الگوی آنزیمی شده است (۱۹). با توجه به اینکه تفاله زیتون دارای فیبر، NDF، ADF و تانن بالا می‌باشد (۲۹ و ۳۹) و بر طبق بعضی گزارشات، جیره حاوی فیبر بالا باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های سلولازی (کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز) می‌شود (۳۷) و در مقابل تانن‌ها می‌توانند هضم لیاف را از طریق تشکیل کمپلکس با لیگنوسولوز و کاهش اتصال آنها با میکروارگانیسم‌ها و یا مهار مستقیم میکروارگانیسم‌ها کاهش دهند (۲۴). با توجه به نتایج به دست آمده وجود فیبر در تفاله

غلظت آمونیاک و همچنین کاهش دفع نیتروژن از طریق ادرار می‌شود (۱۴) و تانن‌ها سبب جابجایی متابولیسم نیتروژن از شکمبه به سمت بخش‌های پایین‌تر دستگاه گوارش شده و این مسئله به لحاظ حفظ آلودگی محیط زیست بسیار حائز اهمیت است (۳۳).

### فعالیت آنزیم‌های سلولیتیک شیرابه شکمبه

فعالیت آنزیم‌های سلولیتیک (کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز) بخش‌های مختلف شکمبه بره‌های مورد آزمایش در جدول ۳ نشان داده شده است. در آنزیم‌های مورد بررسی، کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در بخش جامد و کمترین در بخش خارج سلولی شیرابه شکمبه مشاهده گردید (جدول ۳).

فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز در بخش جامد، خارج سلولی و درون سلولی و کل (مجموع هر سه بخش) شیرابه در بره‌های تغذیه شده با جیره ۱۰ درصد تفاله زیتون در مقایسه با سایر تیمارها بیشتر بود ( $P < 0.05$ ).

فعالیت میکروکریستالین سلولاز در بخش داخل سلولی بره‌های تغذیه شده با جیره ۱۰ درصد تفاله زیتون و در بخش خارج سلولی و کل (مجموع هر سه بخش) شیرابه در بره‌های تغذیه شده با جیره ۲۰ درصد در مقایسه با سایر تیمارها بیشتر بود. بخش جامد بره‌های تغذیه شده با دو سطح تفاله زیتون نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود ( $P < 0.05$ ).

قورچی و دوستی (۱۵) گزارش کردند میزان کل فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز (به ترتیب) در دام کشتار شده با فیستولایی در گستره ۱۸۵ تا ۴۴۰، ۳۱۱ تا ۵۳۷، وابسته به ذرات ۱۷ تا ۶۰، ۵۵ تا ۲۶۸، خارج سلولی ۵۶ تا ۱۳۸، ۸۴ تا ۱۷۳، داخل سلولی ۴۸ تا ۲۴۵، ۱۶۴ تا ۲۴۹ (نانومول در دقیقه) بوده است. همچنین عزیزی و همکاران (۵) میزان محدوده فعالیت آنزیمی متفاوتی را (میزان کل فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز با منابع مختلف کربوهیدراته به ترتیب در دامنه ۵۵۰ تا ۷۰۰، ۲۰۰ تا ۲۲۰، وابسته به ذرات ۴۰۰ تا ۵۵۰، ۱۵۰ تا ۱۷۰، ۴۰ تا ۷۰، ۵۰ تا ۱۲، ۱۶ تا ۱۶ داخل سلولی ۷۰ تا ۸۵، ۳۰ تا ۳۶ (نانومول در دقیقه) گزارش کردند. گستره میزان فعالیت سه بخش آنزیم‌های به دست آمده از آنزیم‌های مورد بررسی در این آزمایش بیشتر و متفاوت با میزان فعالیت آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز گزارش شده توسط قورچی و دوستی، عزیزی و همکاران می‌باشد. این تفاوت و گستره به علت خوراک، محل نگهداری و مدیریت متفاوت می‌باشد. به عبارت دیگر نوع جیره تغذیه شده به حیوانات، باعث تغییر جمعیت میکروبی و متعاقب آن تغییر در الگوی آنزیمی شده است (۱۹).

از جمله عوامل احتمالی افزایش‌دهنده آنزیم‌های سلولتیک می‌باشد و تانن موجود در تفاله بر روی فعالیت آنزیم‌ها بی‌تأثیر یا تأثیر کمی داشته است. به هر حال، پژوهشگران بیان کردند که در صورت عادت کردن دام به مصرف این نوع مواد خوراکی، مکانیسم‌هایی در آنها شکل می‌گیرد که باعث کاهش آثار منفی ترکیبات ضد تغذیه‌ای آنها خواهد شد (۲).

جدول ۳- تأثیر تفاله زیتون جیره‌های آزمایشی روی فعالیت آنزیم‌های مایع شکمبه‌ای<sup>۱</sup>  
Table 3- Effect of olive cake diets on changes in enzyme activities of rumen liquor<sup>1</sup>

Enzymes آنزیم‌ها	جیره‌های آزمایشی <sup>۲</sup> Experimental diets <sup>2</sup>			SEM	P-value
	1	2	3		
کربوکسی متیل سلولاز <sup>۳</sup> Carboxy methyl cellulase					
داخل سلولی Cellular fraction	133.60 <sup>c</sup>	530.09 <sup>a</sup>	414.42 <sup>b</sup>	56.49	0.0001
خارج سلولی Extra-cellular fraction	107.35 <sup>c</sup>	516.77 <sup>a</sup>	227.69 <sup>b</sup>	44.90	0.0001
وابسته به ذرات Particulate material	231.62 <sup>b</sup>	537.72 <sup>a</sup>	510.27 <sup>a</sup>	54.22	0.0001
کل فعالیت Total	472.58 <sup>c</sup>	1584.58 <sup>a</sup>	1152.37 <sup>b</sup>	142.77	0.0001
میکرو کریستالین سلولاز <sup>۳</sup> Microcrystalline cellulose <sup>3</sup>					
داخل سلولی Cellular fraction	103.56 <sup>c</sup>	296.31 <sup>a</sup>	267.09 <sup>b</sup>	38.42	0.0001
خارج سلولی Extra-cellular fraction	65.96 <sup>c</sup>	126.73 <sup>b</sup>	246.26 <sup>a</sup>	25.36	0.0001
وابسته به ذرات Particulate material	129.02 <sup>b</sup>	361.06 <sup>a</sup>	348.53 <sup>a</sup>	31.86	0.0001
کل فعالیت Total	298.54 <sup>c</sup>	784.11 <sup>b</sup>	861.89 <sup>a</sup>	81.34	0.0001

<sup>۱</sup> میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ( $P < 0.05$ ).

<sup>۲</sup> ۱) جیره شاهد (تفاله زیتون صفر درصد)، ۲) تفاله زیتون ۱۰٪، ۳) تفاله زیتون ۲۰٪.

<sup>۳</sup> فعالیت همه آنزیم‌ها بر حسب نانو مول گلوکز آزاد شده در هر دقیقه می‌باشد.

<sup>1</sup> Means within same row with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>2</sup> 1) control (olive cake 0 %), 2) olive cake 10 %, 3) olive cake 20%.

<sup>3</sup> Activity of all enzymes is the by the nmol glucose released per minute.

### سنتر پروتئین میکروبی

اندازه‌گیری پروتئین میکروبی و نیتروژن آمونیاکی در شکمبه می‌تواند وضعیت نیتروژن در شکمبه را به هنگام مصرف تفاله زیتون نشان دهد. نتایج مربوط به اندازه‌گیری میزان دفع مشتقات پورینی و میزان پروتئین میکروبی سنتر شده در جدول ۴ نشان داده شده است. با توجه به این جدول، میزان دفع هر یک از مشتقات پورینی (آلانتوئین، اسید اوریک، گزانتین + هیپوگزانتین) و کل دفع و جذب مشتقات پورینی از ادرار و میزان پروتئین میکروبی سنتر شده در شکمبه تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار گرفت و تفاوت مشاهده شده معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) و در بره‌های دریافت‌کننده تفاله زیتون کمتر از تیمار شاهد بود ( $P < 0.05$ ).

نشخوارکنندگان از بازهای پورینی جذب شده با منشأ خارجی جهت سنتر اسیدهای نوکلئیک استفاده نمی‌کنند. بنابراین بازهای پورینی جذب شده مورد سوخت و ساز قرار گرفته و دفع می‌گردند (۱۲). پروتئین میکروبی در تامین نیاز نیتروژن نشخوارکنندگان نقش مهمی دارد و اکثر اسیدهای آمینه مورد نیاز برای رشد، نگهداری و تولید حیوان میزبان را فراهم می‌کند (۴۰). مشتقات پورینی ادرار برای تخمین پروتئین میکروبی در شکمبه حیوانات نشخوارکننده استفاده می‌شود، زیرا یک همبستگی میان جریان دودنئومی اسیدهای نوکلئیک و مشتقات پورینی گزارش شده است (۱۱). در گوسفند آلانتوئین بیشترین سهم را در تخمین پروتئین میکروبی داشته و حدود ۸۰-۶۰ درصد کل مشتقات پورینی دفعی ادرار را شامل می‌شود. اسید



کلیدی در تجزیه و ساخت پروتئین میکروبی دارد (۲۳). آزمایشات مختلف اثرات متفاوتی را در مورد تأثیر تفاله زیتون بر مشتقات پورینی دفعی و سنتز پروتئین میکروبی گزارش شده است. به طوری که برخی محققین پیشنهاد کردند که استفاده از تفاله زیتون باعث تحریک رشد و فعالیت فلور شکمبه می‌شود و در نهایت باعث بهبود سنتز پروتئین میکروبی و افزایش دفع مشتقات پورینی از جمله آلانتوین می‌شود علت آن را همزمانی منبع انرژی و پروتئین برای رشد میکروارگانیسم‌ها دانسته‌اند (۷ و ۸).

اوریک و گزانتین + هیپوگزانتین نیز به ترتیب ۳۰-۱۰ و ۱۰-۵ درصد از کل مشتقات پورینی را در بر می‌گیرند. در این آزمایش احتمالاً عامل تانن بطور معنی‌داری موجب کاهش در دفع آلانتوئین شده است. در مورد این کاهش می‌توان چنین توضیح داد که برای تولید پروتئین میکروبی در شکمبه وجود دو منبع اصلی در شکمبه لازم است. یکی منبع نیتروژن و دیگری انرژی لازم برای باکتری‌های شکمبه، مساله دیگر همزمانی در دسترس بودن این دو منبع می‌باشد (۲۲). در مایع شکمبه آمونیاک به عنوان یک ترکیب نیتروژنی نقش

جدول ۴- تأثیر سطوح مختلف تفاله زیتون روی مشتقات پورینی ادراری و تولید پروتئین میکروبی در بره‌ها<sup>۱</sup>

Table 4- Effect of feeding of olive cake levels on urinary purine derivatives and microbial protein supply in lambs<sup>1</sup>

شاخص‌ها Parameters	جیره‌های آزمایشی <sup>۲</sup> Experimental diets <sup>2</sup>			SEM	P-value
	1	2	3		
مشتقات پورینی ادرار (میلی مول در روز) Purine derivatives in urine (mmol day <sup>-1</sup> )					
آلانتوئین Allantoin	9.93 <sup>a</sup>	4.43 <sup>b</sup>	4.31 <sup>b</sup>	0.684	0.0001
اسید اوریک Uric acid	1.78 <sup>a</sup>	0.77 <sup>b</sup>	0.81 <sup>b</sup>	0.148	0.0003
گزانتین + هیپوگزانتین Xan and hypoxanth	1.30 <sup>a</sup>	0.57 <sup>b</sup>	0.57 <sup>b</sup>	0.090	0.0001
دفع کل مشتقات پورینی Urine derivatives excreted (mmol day <sup>-1</sup> )	13.01 <sup>a</sup>	5.79 <sup>b</sup>	5.70 <sup>b</sup>	0.90	0.0001
جذب کل مشتقات پورینی Purine derivatives absorbed (mmol day <sup>-1</sup> )	14.85 <sup>a</sup>	6.32 <sup>b</sup>	6.19 <sup>b</sup>	1.06	0.0001
نیتروژن میکروبی (گرم در روز) Microbial N supply (g d <sup>-1</sup> )	10.80 <sup>a</sup>	4.59 <sup>b</sup>	4.50 <sup>b</sup>	0.776	0.0001
پروتئین میکروبی (گرم در روز) Microbial protein supply (g d <sup>-1</sup> )	67.50 <sup>a</sup>	28.72 <sup>b</sup>	28.16 <sup>b</sup>	4.85	0.0001

<sup>۱</sup> میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ( $P < 0.05$ ).

<sup>۲</sup> ۱) جیره شاهد (تفاله زیتون صفر درصد)، ۲) تفاله زیتون ۱۰٪، ۳) تفاله زیتون ۲۰٪.

<sup>1</sup> Means within same row with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>2</sup> 1) control (olive cake 0 %), 2) olive cake 10 %, 3) olive cake 20%.

در شیردان و روده‌ها پروتئین از این کمپلکس جدا می‌شود تجزیه می‌شود و وقتی در جیره می‌شود از ۶۰ گرم تانن متراکم در هر کیلوگرم ماده خشک استفاده شود می‌توان شاهد کاهش در جمعیت میکروارگانیسم‌های پروتئولیتیک شد (۲۴). به خوبی مشخص شده است که تانن نرخ تجزیه پروتئین را در شکمبه کاهش می‌دهد (۲۲). هرواس و همکاران (۱۷) تأثیر سطوح مختلف اسید تانیک کنجاله سویا مورد مطالعه قرار دادند و گزارش کردند که تمام سطوح استفاده شده اسید تانیک، تجزیه شکمبه‌ای نیتروژن را به طور معنی‌داری کاهش داد و هضم روده‌ای پروتئین نیز در دو سطح بالای اسید

اما در مقابل، در مایع شکمبه دام‌های تغذیه شده از جیره تفاله زیتون غلظت آمونیاک کمتر از تیمار شاهد بود و همچنین به نظر می‌رسد تانن موجود در تفاله زیتون منجر به کاهش غلظت آمونیاک و یا عدم تأمین انرژی لازم برای باکتری‌های شکمبه شده باشد، ممکن است این مسئله منجر به کمتر شدن تولید پروتئین میکروبی در شکمبه و در نهایت دفع کمتر آلانتوئین شده باشد و همچنین این نتایج با برخی گزارشات مطابقت دارد که معتقدند تانن‌ها با پروتئین جیره تشکیل کمپلکس داده و آن را در برابر تجزیه میکروبی محافظت می‌کنند (۲۱ و ۴۰). اما بعضی از محققین بر این باورند که کمپلکس یاد شده در pH اسیدی شیردان پایدار نبوده و پس از عبور از شکمبه،

در جیره غذایی بره‌ها، احتمالاً سبب بهبود فعالیت آنزیم‌های سلولیتیک شکمبه و پروتئین عبوری شکمبه را افزایش می‌دهد و باعث کاهش تجزیه پروتئین در شکمبه و آمونیاک تولیدی شد.

### سپاسگزاری

در پایان از شرکت تولیدی جهان الکل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان که به ما در انجام این پژوهش یاری رسانده‌اند قدردانی به عمل می‌آوریم.

تانیق افزایش داد. همچنین باچمین و همکاران (۶) تغذیه جیره حاوی تانن در گوساله را عامل کاهش قابلیت هضم شکمبه‌ای پروتئین دانستند. بنابراین به نظر می‌رسد اثر منفی تانن بر قابلیت هضم پروتئین در شکمبه بسیار بیشتر از اثر آن بر قابلیت هضم ماده خشک و فیبر جیره باشد. از این رو در این مطالعه می‌توان کاهش تولید پروتئین میکروبی و مشتقات پورینی را به وجود تانن در تفاله زیتون نسبت داد.

### نتیجه گیری کلی

نتایج یافته‌های آزمایش حاضر نشان داد که استفاده از تفاله زیتون

### منابع

- 1- Abarghani, A. 2007. Survey of replacement in beet pulp by barley in performance and characteristics carcass Mali lambs Moghani. MSc thesis. Ramin University, Iran. (In Persian).
- 2- Acamovic, T, and C. S. Stewart. 2000. Plant phenolic compounds and gastrointestinal micro-organism. In: Brooker, J. D. (Ed.). Tannins in Livestock and Human Nutrition. Pages 127-129 in Proc. International workshop held in Adelaide, Australia, 31 May–2 June 1999. Australia Center for International Agricultural Research (ACIAR), Canberra, Australia.
- 3- Agarwal, N. 2000. Estimation of fibre degrading enzyme. Pages 283–290 in Feed Microbiology. L. C. Chaudhary., N. Agarwal., D. N. Kamra, and D. K. Agarwal, ed. Izatnagar, India: CAS Animal Nutrition, IVRI.
- 4- Agarwal, N., I. Agarwal., D. N. Kamra, and L. C. Chaudhary. 2000. Diurnal variations in the activities of hydrolytic enzymes in different fractions of rumen contents of murrah buffalo. Journal of Applied Animal Research, 18: 73-80 .
- 5- Azizi-Shotorkhoft, A., A. Sharifi., D. Mirmohammadi., J. Rezaei., A. Kiani, and H. Fazaeli. 2014. Effect of energy source on some hydrolytic enzymes activities in different fractions of rumen liquor and N retention in sheep fed diet containing heat-processed broiler litter. Journal of Ruminant Research, 2:16-1. (In Persian).
- 6- Beauchemin, K. A., S. M. McGinn., T. F. Martinez, and T. A. McAllister. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. Journal of Animal Science, 85: 1990-1996.
- 7- Ben Salem, H, and A. Nefzaoui. 2003. Feed blocks as alternative supplements for sheep and goats . Small Ruminant. Research, 49: 275-288.
- 8- Ben Salem, H, and I. A. Znaidi. 2008. Partial replacement of concentrate with tomato pulp and olive cake-based feed blocks as supplements for lambs fed wheat straw. Animal Feed Science and Technology, 147:206–222.
- 9- Bhatta, R., S. Vaithyanathan., N. P. Singh., A. K. Shinde, and D. L. Verma. 2005. Effect of feeding tree leaves as supplements on the nutrient digestion and rumen fermentation pattern in sheep grazing semi-arid range of India. I. Small Ruminant Research, 60: 273–280.
- 10- Broderick, G. A., and J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. Journal of Dairy Science, 63: 64–75.
- 11- Chen, X. B, and J. M. Gomes. 1995. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of the technical details. International feed resources unit, Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen AB<sub>2</sub> 9SB, UK.
- 12- Danesh Mesdaran, M., A. M Tahmasbi, and A. R. Vakili. 2011. Digestion and Metabolism in Ruminants. Ferdowsi University of Mashhad Press, Mashhad, Iran. (In Persian).
- 13- Eryavuz, A, and B. A. Dehority. 2004. Effect of Yucca schidigera extract on the concentration of rumen microorganisms in sheep. Animal Feed Science and Technology, 117: 215–222.
- 14- Grainger, C., T. Clarke., M. J. Auldist., K. A. Beauchemin., S. M. McGinn, and G. C. Waghorn. 2009. Potential use of Acacia mearnsii condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. Canadian Journal of Animal Science, 89: 241–251.
- 15- Ghoorchi, T, and F. Dousti. 2015. Study of cellulose enymes activities in rumen fluid of slaughtered fattenin lambs. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. (In Persian).
- 16- Ghoorchi, T., and B. Ghorbani. 2011. Rumen Microbiology. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. (In Persian).
- 17- Hervás. G., F. PilarFrutos., R. JavierGiráldez Ángel., C. Mantecón. Maria, and P. ÁlvarezDel. 2003. Effect of

- different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 109: 65–78.
- 18- Hristov, A. N., T. A. McAllister, and K. J. Cheng. 1999. Effect of diet, digesta processing, freezing and extraction procedure on some polysaccharide degrading activities of ruminal contents. *Canadian Journal of Animal Science*, 79: 73-81.
  - 19- Kamra, D. N., N. Agarwal, and T. A. McAllister. 2010. Screening for compounds enhancing fiber degradation. In: Vercoe, P. E., Makkar, H. P. S., Schlink, A. C. (Eds.), *In vitro* Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies. IAEA, Dordrecht, Netherlands.
  - 20- Krueger, W. K., H. Gutierrez-Banuelos., G. E. Carstens., B. R. Min., W. E. Pinchak., R. P. Gomez., R. C. Anderson., N. A. Krueger, and T. D. A. Forbes. 2010. Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. *Animal Feed Science and Technology*, 159(1-2): 1-9.
  - 21- Kumar, R, and S. Vaithyanathan. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 30: 21-38.
  - 22- Makkar, H. P. S. 2003. Effects and fate of tannin in ruminant animal's adaptation to tannin and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49: 241- 256.
  - 23- McDonald, P., R. A. Edwards., J. F. D. Greenhalgh., C. A. Morgan., L. A. Sinclair, and R. G. Wilkinson. 2011. *Animal Nutrition*. 7th ed., Longman Group UK, Harlow, UK.
  - 24- McSweeney, C. S., B. Palmer., D. M. McNeill, and D. O. Krause. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91:83–93.
  - 25- Miller, J. L. 1959. Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31: 426–429.
  - 26- 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: 911–921.
  - 27- Min, B. R., W. E. Pinchak., J. D. Fulford, and R. Puchala. 2005. Effect of feed additives on *in vitro* and *in vivo* rumen characteristics and frothy bloat dynamics in steers grazing wheat pasture. *Animal Feed Science and Technology*, 123: 615–629.
  - 28- Mirmohammadi, D. 2013. Effect of physical form in diets with and without broiler litter on the performance of fattening lambs. MSc thesis. Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. (In Persian).
  - 29- Molina-Alcaide, E., D. R. Yañez Ruiz., A. Moumen, and I. Martín García. 2003. Chemical composition and nitrogen availability for goats and sheep of some olive by-products. *Small Ruminant Research*, 49: 329–336.
  - 30- Moumen, A., D. R. Yanez Ruiz., I. Martín-Garcia, and E. Molina-Alcaide. 2007. Fermentation characteristics and microbial growth promoted by diets including two-phase olive cake in continuous fermenters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92: 9–17.
  - 31- Negesse, T., A. K. Patra., L. J. Dawson., A. Tolera., R. C. Merkel., T. Sahl, and A. L. Goetsch. 2007. Performance of Spanish and Boer × Spanish doelings consuming diets with different levels of broiler litter. *Small Ruminant Research*, 69: 187-197.
  - 32- NRC. 1986. *Nutrient Requirements of Small Ruminants*. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
  - 33- Patra, A. K. 2010. Aspects of nitrogen utilization in sheep fed mixed diets containing foliage from trees and browses. *British Journal of Nutrition*, 103: 1319–1330.
  - 34- Raghuvansi, S. K. S., R. Prasad., M. K. Tripathi., A. S. Mishra., O. H. Chaturvedi., A. K. Mishra., B. L. Saraswat, and R. C. Jakhmola. 2007. Effect of complete feed blocks or grazing and supplementation of lambs on performance, nutrient utilisation, rumen fermentation and rumen microbial enzymes. *Animal*, 1: 221–226.
  - 35- Sadeghi, H., A. Teimouri Ynsari, and Z. Ansari-pirsarai. 2009. Effects of different olive cake by products on dry matter intake, nutrient digestibility and performance of Zel sheep. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11: 39–43.
  - 36- Sansoucy, R., X. Alibes., P. Berge., F. Martilotti., A. Nefzaoui, and P. Zoiopoulos. 1984. Use of olive by-products for animal feed in the Mediterranean Basin. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome.
  - 37- Sirohi, S. k., P. K. Choudhury., S. S. Dagar., A. K. Puniya, and D. Singh. 2013. Isolation, characterization and fibre degradation potential of anaerobic rumen fungi from cattle. *Annals of Microbiology*, 63: 1187-1194.
  - 38- Sliwinski, B. J., C. R. Soliva., A. Machmüller, and M. Kreuzer. 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 101: 101–114.
  - 39- Teimouri Yansari, A., H. Sadeghi., Z. Ansari-Pirsarai, and H. Mohammad-Zadeh. 2007. Ruminal dry matter and nutrient degradability of different olive cake by-products after incubation in the rumen using Nylon bag technique. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9: 439-442.
  - 40- Vaithyanathan, S., R. Bhatta., A. S. Mishr., R. Prasad., D. L. Verma, and N. P. Singh. 2007. Effect of feeding graded levels of *Prosopis cineraria* leaves on rumen ciliate protozoa, nitrogen balance and microbial protein supply in lambs and kids. *Animal Feed Science and Technology*, 133: 177–191.
  - 41- Yanez Ruiz, D. R., A. Moumen., A. I. Martin Garcia, and E. Molina Alaide. 2004. Ruminal fermentation and

degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two stage olive cake: effect of PEG supply. *Journal of Animal Science*, 82: 2023–2032.

- 42- Yildiz, S., I. Kaya., Y. Unal., D. Aksu Elmali., S. Kaya., M. Censiz., M. Kaya, and A. Oncuer,. 2005. Digestion and body weight change in Tuj lambs receiving Oak (*Quercus hartwissiana*) leaves with and without PEG. *Animal Feed Science and Technology*, 122: 159-172.

## The Effect of Different Levels Olive cake in Fermentation Parameters, Enzyme Cellulytic and the Rumen Microbial Protein Production Lory Male Lambs

F. Dousti<sup>1</sup>- T. Ghoorchi<sup>2\*</sup>- A. Sepahvand<sup>3</sup>- B. Dastar<sup>2</sup>- A. Azarfar<sup>4</sup>

Received: 04-06-2016

Accepted: 07-01-2017

**Introduction** Feed represents a major proportion of the overall production cost for livestock industry in worldwide. On the other hand, availability of good quality and unadulterated conventional feed all year round is a major constraint in livestock production. Thus, proper use of inexpensive agricultural by-products is important Goal in livestock production. Applying a new system in olive oil extraction generates large amounts of a new by product, called two-stage olive cake, which includes the remainders of pulp, stones, skin and vegetable waters. Olive cake has high lignin, cellulose and hemicellulose contents. The results of previous experiment showed a high variation on the nutritive value of olive cakes. The chemical composition of by-products is shown olive cake are rich in tannins which can decrease the efficiency of microbial protein synthesis from truly degradable substrate and reducing the amount of ruminal pH and ammonia concentration. The hydrolytic enzymes like carboxymethyl Cellulase, microcrystalline cellulase and degrading activities were estimated in various fractions of rumen contents of Ruminants. Urinary purine derivatives such as allantoin, xanthine and hypoxanthine were estimated to determine the microbial protein supply from rumen. The objective of this trial was to study the effect of replacement Barley grain with olive cake to evaluate the effect of the consuming olive cake on ruminal fermentation characteristics, cellulase enzymes and microbial protein synthesis of lory fattening lambs.

**Materials and Methods** Fifteen Iranian lory male lambs (27.9 ±3 kg of BW) With the age of 90±10 days were assigned In to a completely ranomized design with 3 treatments and 5 replicates for 84 days 3 dietary treatments and five replications in a completely randomized design. Lambs were grouped based on their age and weight. Weight and experimental trail lasted for 84 days. All lambs were givenfed adlibitum twice daily at 0500 and 1700 h with a Total Mixed Ration (TMR) with 25 to 75% of forage (alfalfa) to concentrate ratio. A TMR composed of 25% forage (Alfalfa) and 75% concentrate. The Dietary treatments were 1) control (without olive cake), 2) 10% olive cake, and 3) 20% olive cake was prepared from animal feed production unite of Jahan Alcohol Co (industrial town of Jamalabad, Gilan, Iran). Approximately all diets were isocaloric and isonitrogenos. Fresh water was also available for lambs at all times during the trail. The NH<sub>3</sub>-N concentration was determined following the Broderick and Kang (1980) technique. The assay procedure of cellulase enzymes activity was done according to the method of Hristov, et. al (1999). Purine derivatives and was measured by the method of Chen and Gomes (1995).

**Results and Discussion** The results showed, olive cake caused a significant decrease in the value of ruminal pH the amount of ammonia, concentration of urinary purine derivatives and microbial protein synthesis in the rumen. These results was in accordance with the results have beenreported elsewhere by other workers Overall activity carboxymethyl cellulase enzymes at a level of 10% microcrystalline cellulase enzymes in the diet increase 20% olive cake. It was reported that high fiber diets could increase cellulytic enzymes activity compared to the control diet. Feeding ruminants with olive cake requieres further investigation about its anti nutritional factors. In our study, it would be resulted that feeding of 20% olive cake to lambs diet is possible without any negative effects and it is a good solution for this agricultural by-product usage.

**Conclusion** This study indicates that lori lambs can be fed with a diet based on olive up to of DMI in tropical areas. According to our findings, using olive cake (up to 20% of DMI) to feed the lambs was decreased pH, ammonia levels and increased the activity of cellulytic enzymes of ruminal.

**Keywords:** Carboxymethyl Cellulase, Microcrystalline Cellulase, Purine derivatives.

1- PhD Student of Animal and Poultry Nutrition Department, Gorgan University of Agricultural and Natural Resources, Gorgan, Iran,

2- Professor of Animal and Poultry Nutrition Department, Gorgan University of Agricultural and Natural Resources, Gorgan, Iran,

3- Assistant Professor of Medical Mycology Department, Faculty of Medicine and Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran,

4- Associate Professor of Animal Science Department, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

(\*- Corresponding Author Email: ghoorchit@yahoo.com)