Archive of SID

پژوهش‌های علوم دامی
Animal Science Researches

نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۸ شماره ۲/ سال۱۳۹۷/ صفحات ۱ تا ۱۰

فرآوری زیستی مغز میوه‌ی بلوط با باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برای کاهش تانن آن

رقیه بهاءالدینی[۱]، مختار خواجوی[۲*]، رضا نقی‌ها[۲] و سیامک پارسایی[۲]

تاریخ دریافت: ۹٤/٤/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۲٤

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج
[۲] استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج
[*] مسئول مکاتبه: Email: khajavi@yu.ac.ir

چکیده

زمینه‌ی مطالعاتی: مغز میوه‌ی بلوط دارای درصد بالایی نشاسته است که می‌تواند به‌عنوان یک منبع انرژی در جیره‌ی جانوران پرورشی به‌کار رود، ولی دارای درصد بالای تانن است که می‌تواند پیامدهای زیانباری برای جانوران پرورشی داشته باشد. **هدف:** پژوهش کنونی برای بررسی کارایی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برای کاهش تانن مغز میوه‌ی بلوط انجام گرفت. **روش کار:** آزمایش در یک طرح کاملاً تصادفی با ۷ تیمار و ۳ تکرار انجام گرفت. گروه‌های آزمایشی دربرگیرنده‌ی یک گروه بدون فرآوری به عنوان گروه شاهد و تیمارهای با باکتری یا بدون باکتری، شرایط هوازی یا بی‌هوازی ودوره‌ی فرآوری ۵ یا ۱۰ روز بودند. به ازای هر گرم از نمونه‌های آزمایشی، CFU ۱۰^{۷} باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* افزوده شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد در انکوباتور گذاشته شدند. در این آزمایش ترکیبات فنلی و تاننی، pH، قند محلول و اسیدهای چرب فرار (اسید استیک، پروپیونیک و بوتیریک) اندازه‌گیری و محاسبه شدند. **نتایج:** یافته‌های پژوهش نشان می‌دهند که بیشترین کاهش در میزان فنل کل، فنل غیرتاننی، تانن کل، تانن متراکم و تانن هیدرولیزشونده (به ترتیب به میزان ۳۹، ۲۴، ۴۹، ۴۹/۵ و ۵۹ درصد) بعد ازپنج روز فرآوری مشاهده شد و میان روز پنج و ده فرآوری تفاوت معنی‌داری دیده نشده است. پس از فرآوری، درصد اسیدهای چرب استات، پروپیونات و بوتیرات افزایش ولی درصد قند محلول کاهش یافتند $P<۰/۰۱$. **نتیجه‌گیری نهایی:** یافته‌های این پژوهش نشان داده است که باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برای کاهش تانن میوه‌ی بلوط به روش فرآوری زیستی کارایی بالایی دارد.

واژگان کلیدی: اسید چرب فرار، بلوط، تانن، فرآوری زیستی، فنل، قند محلول، *لاکتوباسیلوس پلانتارروم*

مقدمه

درختان بلوط نزدیک به ۵ میلیون هکتار از پوشش جنگلی کشور ایران به‌ویژه رشته کوه‌های زاگرس را دربرمی‌گیرند (طالبی و همکاران ۱۳۸۵). یکی از فرآورده‌های درخت بلوط میوه‌ی آن است که مغز آن در تغذیه‌ی دام و طیور و نیز به صورت آرد برای تهیه‌ی نان بلوط در میان مردم زاگرس نشین کاربرد دارد. ارزش خوراکی مغز میوه‌ی بلوط در جیره‌ی دام و طیور بیشتر به دلیل درصد بالای نشاسته و چربی آن است. مغز میوه‌ی بلوط نزدیک به ۶۰ درصد نشاسته و ۸ درصد چربی دارد، ولی میزان پروتئین آن کم بوده و حدود ۴ تا ۶ درصد است (وینو و فوربز ۱۹۴۱، صفرزاده و همکاران ۱۹۹۹ و ابراهیمی حسینی ۱۳۹۱). از ویژگی‌های ناپسند این میوه‌ی با ارزش، داشتن میزان بالای تانن است که می‌تواند پیامدهای زیانباری بر انسان و دام داشته باشد. تانن‌ها ترکیبات فنلی با ساختار متنوع و تلخ‌مزه‌ای هستند که به دو گروه متراکم و هیدرولیزشونده تقسیم می‌شوند. تانن‌های متراکم پلی‌مرهای فلاونوئیدی از دسته‌ی

www.SID.ir

Archive of SID

پلی‌آنتوسیانیدین‌ها هستند. تانن‌های هیدرولیزشونده پلی‌مرهایی از گروه گالیک اسید یا الاجیک اسید هستند که به یک هسته‌ی مولکولی مانند گلوکز یا پلی‌فنلی مانند کاتچین پیوند می‌یابند (ریید ۱۹۹۵). تانن‌ها تمایل بالایی برای پیوند یافتن با پروتئین‌هایی مانند آنزیم‌ها دارند (اساوا و همکاران ۲۰۰۰). از پیامدهای زیانبار بالا بودن درصد تانن در جیره‌ی نشخوار کنندگان می‌توان به کاهش مصرف خوراک، تاثیر منفی بر فعالیت باکتری‌های شکمبه، کاهش کارایی آنزیم‌های گوارشی دام و نیز کاهش قابلیت دسترسی به موادمغذی اشاره کرد که در نهایت باعث کاهش رشد و تولید این جانوران می‌شوند (سلینگر و همکاران ۱۹۹۶). همچنین، بالا بودن ترکیبات تاننی در جیره‌ی طیور می‌تواند کاهش مصرف خوراک، میزان رشد، گوارش پذیری پروتئین و اسیدآمینه، فعالیت آنزیم‌های روده‌ای و پانکراس و بازدهی خوراک را درپی داشته باشد (آرم‌استرانگ و همکاران ۱۹۷۴، براند و همکاران ۱۹۸۹، محمود و همکاران ۱۹۹۷ و محمود و همکاران ۲۰۰۸).

روش‌های شیمیایی و فیزیکی گوناگونی مانند استفاده از بی‌کربنات سدیم، پلی‌اتیلن‌گلیکول، خیساندن در آب، پختن یا بخاردهی برای کاهش میزان تانن و پیامدهای زیانبار آن گزارش شده است (فروتوس و همکاران ۲۰۰۴). در همین راستا، امروزه فرآوری زیستی با استفاده از توانمندی‌های میکروارگانیسم‌ها کاربردهای گسترده‌ای در خوراک‌های دام و طیور دارد. در همین پیوند، باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* میکروارگانیسم صنعتی سودمندی است که توانایی آنزیمی بالایی برای شکستن و ازمیان بردن ترکیبات تاننی دارد (کوریل و همکاران ۲۰۰۹). این باکتری کاربردهای گسترده‌ای برای فرآوری تخمیری خوراکی‌های ترشیجات در صنایع غذایی دارد (سیزن و همکاران ۲۰۱۱).

تاکنون هیچ گزارشی برای نشان دادن کارایی این باکتری در کاهش ترکیبات تاننی خوراکی‌ها یافت نشده است. این پژوهش برای بررسی میزان کارایی فرآوری زیستی میوه‌ی بلوط با باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برای کاهش تانن این میوه انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

پژوهش کنونی برپایه‌ی طرح کاملاً تصادفی با ۷ تیمار و ۳ تکرار در شرایط کاملا استریل انجام گرفت. مواد و ابزار با اتوکلاو استریل گردیدند. گروه‌های آزمایشی دربرگیرنده‌ی تیمارهای با باکتری یا بدون باکتری، شرایط فرآوری هوازی یا بی هوازی و سه زمان صفر، پنج یا ده روز فرآوری بودند. روز صفر به عنوان روز بدون فرآوری برای مقایسه‌ی اثرات تیمارها تعیین گردید. تیمارهای ۵ و ۱۰ روزه برای ارزیابی و سنجش بازه‌ی زمان احتمالی تاثیرگذاری فرآوری برای کاهش تانن به‌کار رفتند (حمدی و آید ۲۰۰۲، اسمیتانکوا و همکاران ۲۰۱۲). آرد مغز میوه‌ی بلوط از یک آسیاب بومی در شهرستان یاسوج تهیه و به میزان ۲۰۰ گرم به صورت استریل شده برای هر نمونه آزمایشی استفاده گردید. به ازای هر گرم از نمونه‌های تیمارهای باکتری‌دار به تعداد 10^7 واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی (CFU) باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (کلکسیون باکتری و قارچ صنعتی ایران در شهر کرج) افزوده شد. رطوبت همه‌ی نمونه‌های آزمایشی با آب استریل به ۵۰ درصد رسانده شد. این باکتری توانایی رشد در دامنه‌ی رطوبتی گسترده‌ای را دارد (سیزن و همکاران ۲۰۱۱). در پژوهش کنونی، تلاش گردید کمترین میزان رطوبت برای آزمایش به‌کار رود، تا در صورت موفقیت آزمایش، شرایط بهتری برای به‌کارگیری در جیره‌ی دام و طیور داشته باشد. بنابراین، میزان رطوبت بهینه برای رشد باکتری با انجام پیش آزمایش ۵۰ درصد تعیین گردید. شرایط بی‌هوازی با استفاده از گازپک (مرک آلمان) فراهم گردید. نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد در انکوباتور برای دوره‌های زمانی ۵ یا ده روز (برابر تیمارها) گرمخانه‌گذاری شدند. پس از پایان هر تیمار، نمونه‌ها برای انجام آنالیزهای شیمیایی در دمای ۲۰- نگهداری شدند. سپس برای اندازه‌گیری هر ویژگی، برابر روش کار ارایه شده در منابع به میزان مورد نیاز از نمونه‌ها برداشت گردید. میزان pH (AOAC ۲۰۰۲)، درصد فنل کل، فنل غیرتاننی، تانن کل، تانن متراکم هیدرولیزشونده (مکار ۲۰۰۰)، قند محلول به روش اسپکتوفتومتری با محلول استاندارد رافینوز (دابیوس

www.SID.ir

Archive of SID

۱۹۵۶) و اسیدهای چرب فرار (استیک، پروپیونیک و بوتیریک اسید) به روش کروماتوگرافی گازی با دستگاه کروم‌پک (مدل CP ۲۰۰۹ ، هلند) اندازه گیری شدند. قند محلول در چهار تیمار (روز صفر، و ده روز بدون باکتری، ده روز با باکتری در شرایط هوازی و بی هوازی) و اسیدهای چرب فرار در سه تیمار (ده روز بدون باکتری و ده روز با باکتری در شرایط هوازی و بی هوازی) اندازه‌گیری شدند. این تیمارها به گونه‌ای گزینش شدند که بتوان رخدادهای اصلی فرآیندهای تخمیری را تفسیر و توجیه کرد. داده‌ها با رویه‌ی ANOVA و نرم‌افزار SAS (۲۰۱۱) آنالیز آماری شدند. مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن درسطح ۱ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

برون‌داد سنجش‌های آماری میان تیمارهای آزمایشی برای درصد فنل کل و غیرتانینی در جدول ۱ ارایه شده-است.

جدول ۱- برونداد سنجش‌های آماری میان تیمارهای آزمایشی برای درصد فنل کل و فنل غیرتانینی

Table 1- The results of statistical analysis of experimental treatments for total phenol and non-tannin phenol percent

تیمارها Treatments	فنل کل Total phenol	فنل غیرتانینی Non tannin phenol
روز صفر Zero day	12.75±0.070 [a]	4.87±0.024 [a]
بدون باکتری، بی‌هوازی، ده روز Without bacteria, anaerobic, 10 days	12.59±0.070 [a]	4.80±0.075 [a]
با باکتری، بی‌هوازی، پنج روز With bacteria, anaerobic, 5 days	7.83±0.056 [b]	3.77±0.023 [b]
با باکتری، بی‌هوازی، ده روز With bacteria, anaerobic, 10 days	7.70±0.021 [b]	3.67±0.013 [b]
بدون باکتری، هوازی، ده روز Without bacteria, aerobic, 10 days	12.51±0.147 [a]	4.73±0.037 [a]
با باکتری هوازی پنج روز With bacteria, aerobic, 5 days	7.80±0.021 [b]	3.71±0.047 [b]
با باکتری هوازی ده روز With bacteria, aerobic, 10 days	7.72±0.037 [b]	3.71±0.026 [b]

اعداد درون هر ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند (P <۰/۰۱).

Means within the same column with different superscript letters differ significantly P<0.01

این داده‌ها نشان‌گر کاهش بسیار معنی‌دار میزان فنل کل و غیرتانینی در تیمارهای پنج و ده روز فرآوری با باکتری در سنجش با روز صفر و تیمارهای بدون باکتری هستند. گمان می‌رود که کاهش بسیار معنی‌دار فنل کل و غیرتانینی پیامد افزودن باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بوده است. در پژوهشی که باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برای تخمیر آب انار به کار رفت، میزان ترکیبات فنولی نسبت به گروه پایش (شاهد) کاهش معنی‌داری یافت که نشانگر فعالیت باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بوده است (موسوی و همکاران ۲۰۱۳). میان فنل کل و فنل غیرتانینی تیمارهای با باکتری پنج روز و ده روز (هوازی و بی‌هوازی) تفاوت معنی‌دار نشده است. توقف روند کاهش آمیخته‌های فنلی پس از روز پنجم نشان می‌دهد که اثر فرآوری زیستی با باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* کند یا متوقف شده است. بازایستادن و ادامه نیافتن فعالیت زیستی باکتری می‌تواند پیامد پایین آمدن pH به زیر ۴ و کاهش میزان و فعالیت باکتری (هانگت ۱۹۵۷) یا کاهش کارایی آنزیم تاناز (تانن آسیل‌هیدرولاز) باشد. همچنین

www.SID.ir

Archive of SID

نبود تفاوت معنی‌دار آماری میان درصد فنل کل و فنل غیرتاننی تیمارهای با باکتری بی‌هوازی و هوازی نشان می‌دهد که فرآیندهای زیستی کاهش ترکیبات فنلی در شرایط هوازی یا بی‌هوازی کارایی یکسانی داشته‌اند.

برونداد سنجش‌های آماری میان تیمارها برای درصد تانن کل، تانن متراکم و تانن هیدرولیزشونده در جدول ۲ ارایه شده است. تانن کل، تانن متراکم و تانن هیدرولیزشونده در تیمارهای با باکتری هم در شرایط هوازی و هم در شرایط بی‌هوازی، در روز ۵ فرآوری نسبت به تیمارهای روز صفر و بدون باکتری کاهش بسیار معنی‌داری یافته است. کاهش بسیار معنی‌دار ترکیبات تاننی در تیمارهای باکتری‌دار نشانگر توانایی آنزیمی باکتری برای فعالیت تانازی و پیامد آن در تجزیه‌ی ترکیب‌های تاننی می‌باشد (پینتادو و همکاران ۱۹۹۹).

جدول ۲- برونداد سنجش‌های آماری میان تیمارهای آزمایشی برای درصد تانن کل، تانن متراکم و تانن هیدرولیزشونده

Table 2- The results of statistical analysis of experimental treatments for total, condensed and hydrolysable tannin percent

تیمارها Treatments	تانن کل Total tannin	تانن متراکم condensed tannin	تانن هیدرولیزشونده hydrolysable tannin
روز صفر Zero day	7.88±0.046 [a]	6.68±0.069 [a]	1.20±0.035 [a]
بدون باکتری، بی‌هوازی، ده روز Without bacteria, anaerobic, 10 days	7.80±0.005 [a]	6.55±0.094 [a]	1.25±0.090 [a]
با باکتری، بی‌هوازی، پنج روز With bacteria, anaerobic, 5 days	4.06±0.067 [b]	3.37±0.090 [b]	0.69±0.073 [b]
با باکتری، بی‌هوازی، ده روز With bacteria, anaerobic, 10 days	4.03±0.019 [b]	3.57±0.138 [b]	0.46±0.147 [b]
بدون باکتری، هوازی، ده روز Without bacteria, aerobic, 10 days	7.79±0.111 [a]	6.65±0.120 [a]	1.13±0.034 [a]
با باکتری هوازی پنج روز With bacteria, aerobic, 5 days	4.10±0.068 [b]	3.60±0.163 [b]	0.50±0.134 [b]
با باکتری هوازی ده روز With bacteria, aerobic, 10 days	4.01±0.019 [b]	3.43±0.094 [b]	0.60±0.116 [b]

در هر ستون، اعداد دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند (P <۰/۰۱).

Means within the same column with different superscript letters differ significantly P<0.01).

بررسی پیامد زمان فرآوری نشان می‌دهد که هم در شرایط هوازی و هم در شرایط بی‌هوازی میزان تانن کل، تانن متراکم و تانن هیدرولیزشونده‌ی تیمارهای با باکتری در پنج روز فرآوری تفاوت معنی‌داری با ده روز فرآوری نداشته است. گمان می‌رود که این رخداد پیامد کاهش pH در روز پنجم و کاهش فعالیت زیستی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و آنزیم تاناز باشد. در فرآیند تخمیر، کاهش pH تا نزدیک به ۴ و کمتر از آن سبب مرگ بیشتر میکروارگانیسم‌ها و جلوگیری از رشد آن‌ها در فرآورده‌ی تخمیری می‌شود. برای همین است که از تخمیر لاکتیکی به‌عنوان روشی برای نگهداری و انباشت خوراکی‌های پرآبی مانند سیلوی ذرت برای بلند مدت بهره‌گیری می‌شود، بدون اینکه چنین فرآورده‌های تخمیری دچار آلودگی باکتریایی و قارچی شوند (فاگبنرو و جانسی ۱۹۹۴). همان‌گونه که داده‌های جدول ۲ نشان می‌دهند، میان تانن کل، تانن متراکم و تانن هیدرولیزشونده ی تیمارهای با باکتری در شرایط هوازی و بی‌هوازی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد که نشان می‌دهد هوازی و بی‌هوازی بودن شرایط پیامد همسانی بر کارآیی آنزیمی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* داشته است. گزارش شده است که فرآیندهای آنزیمی شکستن آمیخته‌های تاننی به‌وسیله‌ی باکتری در شرایط هوازی با شرایط بی‌هوازی

www.SID.ir

Archive of SID

اندکی تفاوت دارند و در نتیجه فرآورده های پایانی متفاوتی پدید می‌آورند (بات و همکاران ۱۹۹۸). این پژوهش برای نخستین بار نشان داده است که در هر دوی این شرایط آمیخته‌های تاننی به نسبت همسانی شکسته شده و کاهش می‌یابند.

سنجش آماری میان تیمارهای آزمایشی برای میزان pH در جدول ۳ ارایه شده است. یافته‌های پژوهش کنونی نشان می‌دهند که در هر دو شرایط هوازی و بی‌هوازی، pH تیمارهای با باکتری نسبت به تیمارهای بدون باکتری (و همچنین تیمار روز صفر) کاهش بسیار معنی‌داری یافته است که پیامد فرآوری میکروبی بوده است. گمان می‌رود این کاهش pH پیامد تولید اسیدهای آلی باشد. بلوریان و همکاران (۱۳۸۷) برای تخمیر خمیر نان به آن *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* افزودند و گزارش کردند که باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با تولید اسیدهای آلی باعث کاهش pH شده است. بر پایه‌ی داده‌های جدول۳، میان pH تیمارهای با باکتری بی‌هوازی پنج روز و ده روز تفاوت معنی‌داری بروز نکرده است، ولی میان تیمار با باکتری هوازی پنج روز و ده روز تفاوت معنی‌داری هست. یافته‌های پژوهش کنونی نشان می‌دهند که در میان تیمارهای فرآوری ۵ یا۱۰ روزه، اسیدیته‌ی نمونه‌های آزمایشی در تیمارهای باکتری‌دار هوازی بیشتر از نمونه های باکتری‌دار بی‌هوازی شده است ($P<0/01$). اسمیتانکوا و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شرایط هوازی سریعتر رشد کرده و بنابراین pH در زمان کمتری کاهش می‌یابد.

جدول۳- برونداد سنجش آماری میان تیمارهای آزمایشی برای میزان pH

Table 3- The results of statistical analysis of experimental treatments for pH

تیمارها Treatments	pH
روز صفر Zero day	5.60±0.000 [a]
بدون باکتری، بی‌هوازی، ده روز Without bacteria, anaerobic, 10 days	4.91±0.009 [b]
با باکتری، بی‌هوازی، پنج روز With bacteria, anaerobic, 5 days	4.00±0.042 [c]
با باکتری، بی‌هوازی، ده روز With bacteria, anaerobic, 10 days	3.93±0.007 [cd]
بدون باکتری، هوازی، ده روز Without bacteria, aerobic, 10 days	4.93±0.007[b]
با باکتری هوازی پنج روز With bacteria, aerobic, 5 days	3.89±0.000[d]
با باکتری هوازی ده روز With bacteria, aerobic, 10 days	3.77±0.027[e]

در هر ستون، اعداد دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P <0/01$).

Means within the same column with different superscript letters differ significantly P<0.01).

جدول ۴ دربرگیرنده‌ی برونداد سنجش آماری میان تیمارها برای درصد قند محلول است. یافته های جدول نشان می‌دهند قند محلول تیمارهای با باکتری (هوازی و بی‌هوازی) با تیمار روز صفر و نیز تیمار بدون باکتری تفاوت بسیار معنی‌دار دارند و میزان قند محلول از حدود ۴/۵ درصد به حدود ۲/۵ درصد در روز دهم فرآوری کاهش یافته است. گمان می‌رود که کاهش قندهای محلول به دلیل استفاده‌ی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از آن‌ها باشد. همانگونه که گفته شد، pH تیمارهای باکتری دار پس از فرآوری کاهش بسیار معنی‌دار و چشمگیری یافته است که می‌تواند پیامد بهره‌گیری از قندهای محلول و تولید اسیدهای چرب فرار باشد. *لاکتوباسیلوس*

www.SID.ir

Archive of SID

پلانتاروم می‌تواند از کربوهیدرات‌ها برای کوشندگی متابولیسمی خود استفاده و آن‌ها را به اسید لاکتیک و اسیدهای چرب فرار تبدیل کند (بلوریان و همکاران ۱۳۸۷). داده‌های پژوهش کنونی نشان می‌دهند که آرد مغز میوه‌ی بلوط میزان بالایی از قندهای محلول دارد (در روز صفر) که برای رشد و فعالیت تخمیری باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* لازم هستند.

در جدول ۵ برونداد سنجش آماری میان تیمارها برای درصد اسیدهای چرب فرار ارایه شده است. یافته‌ها نشان میدهند که درصد اسید استیک، اسید پروپیونیک و اسید بوتیریک پس از ده روز فرآوری هوازی یا بی‌هوازی نسبت به تیمار بدون باکتری افزایش معنی‌داری یافته است، ولی میان تیمارهای با باکتری هوازی و بی‌هوازی تفاوت معنی‌داری بروز نکرده است که نشان می‌دهد فعالیت باکتری برای تولید اسیدهای چرب فرار اندازه‌گیری شده در این پژوهش در هر دو شرایط هوازی و بی‌هوازی پس از ده روز تفاوت معنی‌داری نداشته است. اسمیتانکوا و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهشی میزان تولید اسید لاکتیک و اسید استیک را بوسیله‌ی سه زیرگونه‌ی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در دو محیط هوازی و بی هوازی و دماهای ۳۰، ۳۷ و ۴۵ درجه‌ی سانتی گراد بررسی کردند و تفاوت معنی‌داری در میزان تولید اسید لاکتیک در هر سه زیرگونه و اسید استیک در دو زیرگونه در محیط‌های هوازی و بی هوازی و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد مشاهده نکردند. این پژوهشگران دلیل معنی‌دارشدن میزان اسید استیک در سومین گونه را نوع مسیر متابولیکی آن گونه در شرایط هوازی و بی‌هوازی بیان کردند.

جدول۴- برونداد سنجش آماری میان تیمارهای آزمایشی برای درصد قند محلول

Table 4- The results of statistical analysis of experimental treatments for soluble carbohydrate percent

تیمارها Treatments	قند محلول Soluble carbohydrate
روز صفر Zero day	4.48±0.007 [a]
بدون باکتری ده روز Without bacteria 10 days	4.47±0.021[a]
با باکتری، بی‌هوازی، ده روز With bacteria, anaerobic, 10 days	2.56±0.010 [b]
با باکتری، هوازی، ده روز With bacteria, aerobic, 10 days	2.56±0.010 [b]

در هر ستون، اعداد دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند (P <۰/۰۱).

Means within the same column with different superscript letters differ significantly P<0.01).

جدول ۵- برونداد سنجش‌های آماری میان تیمارهای آزمایشی برای درصد اسید استیک، اسید پروپیونیک و اسید بوتیریک

Table 5- The results of statistical analysis of experimental treatments for Acetic, Propionic and Butyric acids

تیمارها Treatments	اسید استیک Acetic acid	اسید پروپیونیک Propionic acid	اسید بوتیریک Butyric acid
بدون باکتری ده روز Without bacteria 10 days	1.16±0.035 [b]	0.12±0.005 [b]	0.04±0.016 [b]
با باکتری، بی‌هوازی، ده روز With bacteria, anaerobic, 10 days	2.52±0.203 [a]	0.34±0.024 [a]	0.12±0.025 [a]
با باکتری، هوازی، ده روز With bacteria, aerobic, 10 days	2.70±0.241 [a]	0.35±0.020 [a]	0.11±0.015 [a]

در هر ستون، اعداد دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند (P <۰/۰۱).

Means within the same column with different superscript letters differ significantly P<0.01).

در پایان می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که بکارگیری فرآوری زیستی روشی کارآمد برای کاهش آمیخته‌های تاننی آرد بلوط است و در این روش نزدیک به نیمی از تانن کاهش یافته است. این میزان کاهش می‌تواند ارزش خوراکی بلوط را برای به‌کارگیری در جیره‌ی دام و طیور افزایش دهد. همچنین پژوهش کنونی نشان داده است که

www.SID.ir

Archive of SID

کارایی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برای کاهش آمیخته‌های تاننی در شرایط هوازی و بی‌هوازی همسان است که می‌توان در عمل برای به‌کارگیری این نوع فرآوری شرایط ارزانتر و آسان‌تر را برگزید.

منابع مورد استفاده

AOAC International, 2002. Official methods of analysis of AOAC international. 17th edition. 1st revision. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities.

Armstrong WD, Rogler JC and Featherston WR,1974. Effect of tannin extraction on the performance of chicks fed bird resistant sorghum grain diets. Poultry Science 53: 714-720.

Bhat Tk, Singh B and Sharma OP, 1998. Microbial degradation of tannins – A current perspective. Biodegradation 9 (5): 343–357.

Bolourian, Sh, Haddad Khodaparast, MH, Goli Movahhed, Gh, and Afshary, M, 2008. Effect of lactic fermentation (*Lactobacillus plantarum*) on physicochemical, flavor, staling and crust properties of semi volume bread (bagget). 18th Congress on Food Science and Technology, Khorasan Razavi Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad (In Persian).

Brand TS, Erasmus JS and Siebrits FK ,1989. Effect of thermal ammoniation and heat treatment of high-tannin grain sorghum on the TME value for roosters and relative nutritive value for rats. South African Journal of Animal Science 19(3): 125-129.

Curiel JA, Rodriguez H, Acebron I, Mancheno JM, Rivas BDL and Munoz R, 2009. Production and physicochemical properties of recombinant *Lactobacillus Plantarum* tannase. Journal of Agricultural Food Chemistry 57: 6224–6230.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-356.

Ebrahimi Hossaini, M, 2012. Using *Aspergillus oryzae* fungi genus for decreasing tannin in oak (*Quercus persica*) acorn. MSc thesis, University of Yasouj (In Persian).

Fagbenro OA and Jaunacey K, 1994. Chemical and nutitional quality of dried fermented fish silage and their nutritive value for tilapia (*Oreochromis niloticus*). Animal Feed Science and Technology 45:167-176.

Frutos P, Hervas G, Giraldez FJ and Mantecon AR, 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. Spanish Journal of Agricultural Research 2:191-202.

Hamdi M and Ayed L, 2002. Culture conditions of tannase production by *Lactobacillus plantarum*. Biotechnology Letters 24 (21): 1763-1765

Hunget RE, 1957. Microoganisms in the rumen of cattle feed a constant ration. Canadian Journal of Microbiolog 3:289-311.

Mahmood S, Ajmal Khan M, Sarwar M and Nisa M, 2008. Use of chemical treatments to reduce antinutritional effects of tannins in Salseed meal: effect on performance and digestive enzymes of broilers. Livestock Science 116: 162–170.

Mahmood S, Smithard R and Sarwar M, 1997. Effects of Salseed (*Shorea robusta*) tannins, restricted feed intake and age on relative pancreas weight and activity of digestive enzymes in male broilers. Animal Feed Science and Technology 65: 215-230.

Makkar HPS, 2000. Quantification of tannins in tree foliage. FAO/IAEAWorking Document IAEA, VIENNA.

Mousavi Z, Mousavi SM, Razavi SH, Hadinejad M, Emam-Djomeh Z and Mirzapour M, 2013. Effect of fermentation of pomegranate juice by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* on the antioxidant activity and metabolism of sugars, organic acids and phenolic compounds. Food Biotechnology 27: 1- 13.

Osawa R, Kuroiso K, Goto S and Shimizu A, 2000. Isolation of tannin- degrading Lactobacilli from humans and fermented foods. Applied and Environmental Microbiology 66: 3093- 3097.

Pintado J, Guyot JP and Raimbault M, 1999. Lactic acid production from mussel processing wastes with an amylolytic bacterial strain. Enzyme and Microbial Technology 24: 590-598.

www.SID.ir

Archive of SID

Reed JD, 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. Journal of Animal Science 73(5):1516-1528.

Saffarzadeh A, Vincze L and Csapo J, 1999. Determination of the chemical composition of acorn (*Quercus branti*), *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk* seeds as nonconventional feedstuffs. Acta Agraria Kaposváriensis 3: 59-69.

SAS Institute Inc, 2011. SAS/STAT 9.3 User's Guide, SAS Institute Inc., Cary, NC.

Selinger LB, Forsberg CW and Cheng KJ, 1996. The Rumen: A unique source of enzymes for enhancing livestock production. Anaerobe 2: 263–284.

Siezen RJ and Van Hylckama Vlieg JE, 2011. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. Microbial Cell Factories 10(Suppl. 1), S3.

Smetankova J, Hladikova Z, Valach F, Zimanova M, Kohajdova Z, Greif G and Greifova M, 2012. Influence of aerobic and anaerobic conditions on the growth and metabolism of selected strains of *Lactobacillus plantarum*. Acta Chimica Slovaca 5: 204-210.

Talebi, M, Sagheb-Talebi Kh, and Jahanbazi H, 2006. Site demands and some quantitative and qualitative characteristics of Persian Oak (*Quercus brantii* Lindl.) in Chaharmahal & Bakhtiari Province (western Iran). Iranian journal of Forests and Poplar Research, 14 (1): 67-79 (In Persian).

Wainio, WW and Forbes, EB, 1941. The chemical composition of forest fruits and nuts from Pennsylvania. Journal of Agricultural Research 62: 727-635.

www.SID.ir

Archive of SID

Bioprocessing of acorn kernel with *Lactobacillus plantarum* to reduce its tannin

R Bahaeddini[1], M Khajavi[1*], R Naghiha[2] and S Parsaei[2]

Received: July 2, 2015 Accepted: August 14, 2016

[1]MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Yasouj, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Yasouj, Iran
[*]Corresponding author: E mail: khajavi@yu.ac.ir

Introduction: Acorn kernel contains a high percentage of starch that can be used as a source of energy in animal's diet, but it has a high percentage of tannin, which can have deleterious effects on the animals. Tannins are bitter phenolic compounds with a diverse structure that are divided into two groups of condensed and hydrolyzable. Condensed tannins are flavonoid polymers of the proanthocyanidins compounds. Hydrolyzable tannins have a polyhydric alcohol at their core, the hydroxyl groups of which are esterifies with gallic acid. They may have long chains of gallic acid coming from the central glucose core (Reed 1995). Tannins have a high tendency to bind to proteins such as enzymes (Osawa et al. 2000). The harmful consequences of the high percentage of tannin in the diet of ruminants can reduce feed intake, have a negative effect on the activity of rumen bacteria, reduce the efficiency of digestive enzymes in the livestock and also reduce the availability of nutrients, which ultimately reduce growth and production of these animals (Salinger et al. 1996). Also, the high levels of tannin compounds in the poultry diet can reduce feed intake, growth rate, digestion of protein and amino acids, intestinal and pancreatic activity (Armstrong et al. 1974; Brand et al. 1989; Mahmood et al. 1997,2008). Various chemical and physical methods such as sodium bicarbonate, polyethylene glycol, soaking in water, cooking or steaming, have been reported to reduce the amount of tannin and its harmful side effects (Frutos et al. 2004). Now a day, bioprocessing has vast applies in livestock and poultry feed, using the enzymatic capabilities of microorganisms. Furthermore, *Lactobacillus plantarum* is a safe microorganism that has the potential for high enzymes to break down and eliminate tannin compounds (Curiel et al. 2009). This bacterium has vast applications for food processing in the industries (Siezen et al. 2011).

Material and methods: The Experiment was done in a completely randomized design with 7 treatments and 3 replicates. Experimental groups were treatments with or without bacteria, aerobic or anaerobic condition and 5 or 10 days processing periods. The moisture content of all samples was adjusted to 50% by sterile water. For each gram of experimental sample, 10^7 CFU of *Lactobacillus plantarum* bacteria were added and then, placed into the incubator at 37 ° C. In this experiment, phenolic and tannin compounds, pH, soluble carbohydrate and volatile fatty acids (acetic acid, propionic acid and butyric acid) were measured. Phenolic and tannin compounds were measured based on Makkar (2000) method. Soluble carbohydrate was measured by spectrophotometric method with standard raffinose solution (Dubois 1956) and volatile fatty acids (acetic, propionic and butyric acid) were measured by gas chromatography. Soluble carbohydrate in four treatments (zero day and ten days without bacteria, ten days with bacteria in aerobic and anaerobic conditions) and volatile fatty acids in three treatments (10 days without bacteria and 10 days with bacteria in aerobic and anaerobic conditions) measured. These treatments were selected to interpret and justify the main events of fermentation processes. Data were analyzed by SAS software (2011). The comparison of the means was done using Duncan's multiple range test at $P<0.01$.

Results and discussion: The findings of the experiment indicate that the highest reductions in the content of total phenol, non-tannin phenol, total tannin, condensed tannin and hydrolyzable tannin (39, 24, 49, 49.5 and 59 %, respectively, see table 1 and 2) were observed after 5 days of processing and there was no significant difference between 5 and 10 days of processing. It is assumed that significant reduction in phenol and tannin compounds was the consequence of *Lactobacillus*

www.SID.ir

Archive of SID

plantarum enzymatic activity. A research showed that *Lactobacillus plantarum* were reduced phenolic compounds of pomegranate juice (Mousavi et al., 2013). Stopping the decline in phenolic compounds after the 5 days could result in lowering the pH to below 4 (Table 3) and cessation the biological activity of the *Lactobacillus plantarum* (Hunget 1957), or decreasing the efficiency of the enzyme tanase (tannin aceyl hydrolase). Also, there was no significant difference between the total phenol, non-tannin phenol (Table 1), total tannin, condensed tannin and hydrolyzable tannin percentage (Table 2) of aerobic and anaerobic treatments, which showed that the biological processes reduced phenolic compounds in aerobic or anaerobic conditions with the same efficiency. It has been reported that the enzymatic processes of breaking tannins compounds by bacteria in aerobic conditions are slightly different from the anaerobic conditions, resulting in different end products (Bhat et al.1998). Our research findings show that the acidity of experimental samples in aerobic treatments was more than anaerobic in the 5 or 10 days of bioprocessing period ($P<0.01$). Smetankova et al. (2012) showed that *Lactobacillus plantarum* grows faster in aerobic conditions and therefore, the pH decreases more quickly.

After the processing, the amount of fatty acids (acetate, propionate and butyrate) increased, but the percentage of soluble carbohydrate decreased ($P<0.01$). Table 4 shows that acorn kernel contains high percentage of soluble carbohydrate (on day zero), which is required for the growth and biological activity of *Lactobacillus plantarum* bacteria. Table 5 presents the results of statistical analysis of the treatments for the percentage of volatile fatty acids. The results showed that the percentage of acetic acid, propionic acid and butyric acid after 10 days of aerobic or anaerobic bacterial processing increased significantly, in comparison with non-bacterial treatment, but no significant difference was observed between aerobic and aerobic conditions, which indicates that in this study the activity of bacteria for the production of volatile fatty acids was not different in both aerobic and anaerobic conditions after ten days.

Conclusion: For the first time, this study has shown that in both aerobic and anaerobic conditions, the tannins compounds were broken down and reduced in equal proportion. The results of the experiment have shown that *Lactobacillus plantarum* bacteria can be used for bioprocessing of acorn kernel to reduce its tannins.

Keywords: Acorn, Bioprocessing, *Lactobacillus plantarum*, Phenol, Soluble carbohydrate, Tannin, Volatile fatty acids

www.SID.ir