



## تأثیر پرتو گاما، هیدروکسید سدیم، اوره و پلی اتیلن گلیکول بر ترکیبات فنولیک، تولید گاز و ساخت پروتئین میکروبی ضایعات پسته پاک کنی در شرایط آزمایشگاهی

سمانه قاسمی<sup>۱</sup>، عباسعلی ناصریان<sup>۲</sup>، رضا ولیزاده<sup>۲</sup>، مهدی بهگر<sup>۳</sup> و

میراحمد موسوی شلمانی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>استادیار بخش کشاورزی، دانشکده فنی و کشاورزی شهریار، دانشگاه فنی و حرفه‌ای استان تهران، ایران

<sup>۲</sup>استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

<sup>۳</sup>استادیار پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۴/۰۹

### چکیده

**سابقه و هدف:** سالیانه مقدار زیادی از ضایعات پسته پاک کنی در ایران تولید می‌شود که دفع نادرست آنها باعث آلودگی زیست محیطی می‌شود. مشکل اصلی مرتبط با استفاده از ضایعات پسته پاک کنی در تغذیه دام، وجود مقادیر بالای تانن و ترکیبات فنولیک است که متابولیسم دام را در زمان مصرف آن بوسیله دام تحت تأثیر قرار می‌دهد. آزمایش‌های برون تنی و درون تنی نشان داده‌اند که تانن موجب کاهش ساخت پروتئین میکروبی به دلیل اثرات ضد میکروبی می‌شود. در این مطالعه تأثیر تیمارهای پرتو گاما در دز ۱۰ کیلوگری، محلول ۴ درصد هیدروکسید سدیم، محلول ۴ درصد اوره و پلی اتیلن گلیکول بر مقدار ترکیبات فنولی، تولید گاز و ساخت پروتئین میکروبی ضایعات پسته پاک کنی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** ضایعات پسته پاک کنی وارسته اوحدی در سایه خشک شدند و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار پرتو گاما (دز ۱۰ کیلوگری)، محلول هیدروکسید (۴ درصد) و اوره (۴ درصد) در ۳ تکرار عمل آوری شدند. ترکیبات فنولیک اندازه گیری شدند. با استفاده از روش تولید گاز در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ پتانسیل تولید گاز، ضرایب تولید گاز، انرژی قابل متابولیسم، ماده آلی قابل هضم و تولید اسیدهای چرب فرار اندازه‌گیری شدند. در آزمون تولید گاز از تیمار پلی اتیلن گلیکول نیز استفاده شد. بر اساس آزمون گاز انجام شده و محاسبه زمانی که نیمی از مقدار کل گاز تولید شد، در آزمون تولید گاز دیگری ساخت و راندمان ساخت پروتئین میکروبی با استفاده از اوره ۲ بار نشاندار شده با نیتروژن-۱۵ (۱۰ اتم درصد) در محلول بافر اندازه‌گیری شد. تخمین ضرایب تولید گاز با استفاده از معادله ارسکوف و مک دونالد و مقایسه میانگین‌ها با نرم افزار آماری SAS گیری شد.

**یافته‌ها:** تیمارهای هیدروکسید سدیم و اوره باعث کاهش ترکیبات فنولیک، تانن کل و تانن متراکم شدند ( $P < 0/01$ ) و پرتو گاما باعث کاهش فنول کل و تانن کل ضایعات پسته پاک کنی شد ( $P < 0/01$ ). در میان تیمارها بیشترین تأثیر متعلق به تیمار هیدروکسید سدیم بود که باعث کاهش ۶۰/۴۳، ۸۰/۲۵ و ۸۸/۸۹ درصدی به ترتیب در فنول کل، تانن کل و تانن متراکم شد. مقدار تولید گاز در طی ۹۶ ساعت بین ۱۸/۷۶ تا ۲۹/۱۳ میلی‌لیتر به ازاء ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک متغیر بود که کمترین مقدار

\*نویسنده مسئول: mbehgar@aeoi.org.ir

تولید گاز به تیمار هیدروکسید سدیم و اوره تعلق داشت ( $P < 0/01$ ). میزان الحاق نیتروژن-۱۵ در تیمارهای هیدروکسید سدیم ( $0/013$  میلی گرم) و اوره ( $0/014$  میلی گرم) در مقایسه با شاهد ( $0/017$  میلی گرم) کمتر بود ( $P < 0/01$ ). راندمان ساخت پروتئین میکروبی در تیمار هیدروکسید سدیم بیشترین ( $0/049$ ) مقدار بود ( $P < 0/01$ ). همچنین، تیمارهای هیدروکسید سدیم و اوره باعث کاهش انرژی قابل متابولیسم، ماده آلی قابل هضم و اسیدهای چرب فرار شدند ( $P < 0/01$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج این آزمایش نشان داد که اگرچه استفاده از هیدروکسید سدیم و اوره مقدار ترکیبات فنولی در ضایعات پسته پاک کنی را کاهش داد، با وجود این تولید گاز و الحاق نیتروژن-۱۵ در این تیمارها کاهش یافت. داده‌های این آزمایش نشان داد که حذف تانن از ضایعات پسته پاک کنی الزاماً به معنی بهبود تمامی خصوصیات تخمیری آن در محیط آزمایشگاه نیست.

**واژه‌های کلیدی:** ضایعات پسته پاک کنی، ترکیبات فنولی، تانن، ستر پروتئین میکروبی، تولید گاز

#### مقدمه

میکروبی ترکیبات فنولی موجود در ضایعات پسته پاک کنی بر اتصال باکتری‌های تجزیه کننده دیواره سلولی به ذرات خوراکی اثبات شده است (۱۳). استفاده از مواد شیمیایی به منظور کاهش مقدار ترکیبات فنولیک و تانن در مواد خوراکی مورد استفاده قرار گرفته است (۲ و ۱۸). در بین مواد شیمیایی مختلف سود و اوره از اهمیت خاصی برخوردار هستند. استفاده از هیدروکسید سدیم در حذف تانن از برگ‌های درختان (۷) و برگ‌های بلوط (۱۸) و همچنین استفاده از اوره در حذف تانن از گیاهان (۳۳)، برگ بلوط (۱۶) و مایلو (۲۶) با موفقیت همراه بوده است.

پرتو گاما نیز به عنوان یکی از روش‌های حذف تانن از گیاهان با موفقیت همراه بوده است (۸ و ۲۹). محققین (۲) گزارش کردند که استفاده از پرتو به میزان ۱۰ کیلوگری در پوست پسته باعث کاهش تانن به میزان ۳۳ درصد می‌شود. در مطالعه‌ای نیز پرتوتابی الکترون به منظور کاهش ترکیبات فنولی ضایعات پسته پاک کنی با موفقیت همراه بوده است (۲۱).

اطلاعات اندکی در مورد تأثیر پرتوهای یونیزه کننده و تیمارهای شیمیایی بر مقدار تانن و ترکیبات فنولیک ضایعات پسته پاک کنی و همچنین اثرات این

استفاده از محصولات فرعی کشاورزی در تغذیه دام از اهمیت خاصی برخوردار است. براساس آمار (۹) ایران با تولید ۵۵۰ هزار تن پسته بزرگترین تولید کننده پسته در جهان می‌باشد و تقریباً همین مقدار یعنی حدود ۵۰۰ هزار تن نیز سالیانه محصولات فرعی از فعالیت کارخانجات پسته پاک کنی تولید می‌شود (۲۸). از این مقدار تنها بخش اندکی در تغذیه دام مورد استفاده قرار می‌گیرد. مشکل اصلی مرتبط با استفاده از ضایعات پسته پاک کنی در تغذیه دام وجود سطوح بالای تانن و ترکیبات فنولیک در آن است که استفاده از آن در تغذیه دام را محدود می‌کند (۲، ۲۵ و ۳۱). پوسته پسته حاوی ۷/۵-۹/۵ درصد ترکیبات فنولیک و ۴/۵-۳/۵ درصد تانن است (۶).

تحقیقات در آزمایشات برون تنی نشان داده است که تانن موجب کاهش ساخت پروتئین میکروبی به دلیل اثرات ضد میکروبی آن می‌شود (۴). همچنین در آزمایشات درون تنی انجام شده بر روی بره‌ها نشان داده شده است که استفاده از جیره‌های حاوی ضایعات پسته پاک کنی تولید اسید استیک در شکمبه و همچنین ساخت پروتئین میکروبی و راندمان آن را کاهش می‌دهد (۱۲). در مطالعه دیگر اثرات ضد

آزمایش تولید گاز: میزان تولید گاز در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شد (۱۹). بطور خلاصه مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از تیمارهای آزمایشی تهیه شده در سرنگ‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد (۴ تکرار) و به آن محلول بافر، نمک و مایع شکمبه به میزان ۳۰ میلی‌لیتر اضافه شد و در حمام آب گرم آنکوباسیون شدند. به منظور ارزیابی اثر بخشی تیمارهای آزمایشی بر حذف تانن از پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) نیز جهت مقایسه اثرات آن با سایر تیمارها استفاده شد (۲۰۰ میلی‌گرم به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه). ترکیب نهایی بزاق مصنوعی (۵۰۰ میلی‌لیتر) به صورت زیر بود (۱۰): آب مقطر ۲۳۷ میلی‌لیتر، نمک‌های پر نیاز ۱۱۸/۵ میلی‌لیتر، محلول بافر ۱۱۸/۵ میلی‌لیتر، نمک‌های کم نیاز ۰/۰۶ میلی‌لیتر، رزوزارین ۰/۶۱، محلول احیاء کننده ۲۵ میلی‌لیتر (شامل ۲۳/۸ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱ نرمال و ۱۴۲/۵ میلی‌گرم سولفید سدیم).

مایع شکمبه از ۳ رأس گوسفند بلوچی (با وزن  $40.1 \pm 1.77$  کیلوگرم) مجهز به کانونلای شکمبه‌ای که در حد نگهداری تغذیه می‌شدند (ترکیب جیره: ۵۰۰ گرم علف یونجه، ۲۵۰۰ گرم کاه گندم و ۲۵۰ گرم کنسانتره بر پایه جو)، تهیه شد و بعد از صاف کردن با پارچه متقال چهارلا مورد استفاده قرار گرفت. نسبت مخلوط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی ۲ به ۱ بود.

مقدار تولید گاز در طی ساعات صفر، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ اندازه‌گیری شد. همچنین از چهار بلانک (محیط کشت بدون ضایعات پسته پاک کنی) نیز استفاده شد. مقدار تولید گاز هر تیمار از طریق کم کردن مقدار گاز تولیدی از مقدار گاز تولید شده در بلانک، محاسبه شد.

تیمارها بر ساخت پروتئین میکروبی به خصوص با استفاده از نیتروژن-۱۵ وجود دارد. هدف از این آزمایش بررسی اثر پرتوتابی گاما، هیدروکسید سدیم، اوره و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) بر مقدار ترکیبات فنولیک، تولید گاز و ساخت پروتئین میکروبی ضایعات پسته پاک کنی در شرایط آزمایشگاهی بود.

## مواد و روش‌ها

**تیمارهای آزمایشی:** این آزمایش در دانشگاه فردوسی مشهد و پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای انجام شد. ضایعات پسته پاک کنی واریته اوحدی از کارخانه فرآوری پسته در نزدیکی بردسکن تهیه شد. نمونه‌ها قبل از استفاده در سایه خشک شدند. نمونه‌های ضایعات پسته پاک کنی در شش کیسه پلاستیکی بسته بندی شدند. دو عدد از کیسه‌ها با محلول هیدروکسید سدیم ۴ درصد و دو عدد دیگر با محلول اوره ۴ درصد فرآوری شدند. یک لیتر از محلول هیدروکسید سدیم و اوره به یک کیلوگرم پوست پسته اضافه شد و سپس به مدت ۳ روز در کیسه‌ها در دمای اتاق نگهداری شدند. دو کیسه آخر نیز در معرض پرتو گاما با دز ۱۰ کیلوگری قرار گرفتند. پرتوتابی پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای با استفاده از دستگاه گاما سل (IssledoVatel Gama Cell Facility, model PX-30) با نرخ ۰/۸ کیلوگری در ساعت تحت شرایط یکسان از نظر رطوبت و درجه حرارت، به میزان ۱۰ کیلوگری به مدت ۱۲/۵ ساعت انجام شد. سپس نمونه‌های ضایعات پسته پاک کنی با صفحات آسیاب ۱ میلی‌متری آسیاب شدند و مقدار پروتئین خام، چربی و خاکستر مطابق روش AOAC (۱) اندازه‌گیری شد. مقدار الیاف نامحلول در شوینده خنثی<sup>۲</sup> و اسیدی<sup>۳</sup> مطابق روش ون سوست و همکاران (۳۲) اندازه‌گیری شد.

3 - Acid Detergent Fiber (ADF)

2 - Neutral Detergent Fiber (NDF)

منتقل و دوباره عمل سانتریفوژ انجام شد. پلت‌های حاصله با لوله‌ها به آون منتقل و خشک شد و وزن محتویاتی که ظاهراً هضم نشده بود، محاسبه شد (با توجه به بلانک). سپس با استفاده از تفاضل وزن نمونه‌های هضم نشده ظاهری از وزن اولیه نمونه و تقسیم آن بر وزن اولیه نمونه قابلیت هضم ظاهری ماده خشک بدست آمد. در پلت‌های به‌دست آمده تعیین نیتروژن (روش کلدال) و سپس اندازه‌گیری نیتروژن-۱۵ توسط دستگاه طیف سنجی گسیلی (مدل NOI7) در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای انجام شد. میزان نیتروژن-۱۵ به میزان بیشتر از ۰/۳۶۶ اتم درصد به عنوان الحاق در نظر گرفته شد. به منظور استاندارد نمودن دستگاه از محلول کلرید آمونیوم حاوی نیتروژن-۱۵ به میزان ۰/۳۶۶ اتم درصد استفاده شد.

محتوای نیتروژن-۱۵ هر سرنگ بر اساس میزان الحاق در نمونه بلانک تصحیح شد. میزان الحاق نیتروژن-۱۵ در پروتئین میکروبی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (۵).

(رابطه ۴)

$$(100 \div \text{درصد } N) \times (15N \div 100) \times \text{میلی}$$

$$\text{گرم پلت} = \text{میلی گرم } 15N$$

در ادامه راندمان سنتز پروتئین میکروبی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (۳):

(رابطه ۵)

$$\frac{\text{میلی گرم نیتروژن-۱۵ در مواد هضم شده ظاهری}}{\text{میلی لیتر گاز تولیدی خالص}}$$

میلی لیتر گاز تولیدی خالص

اندازه‌گیری فنول کل، تانن و تانن متراکم: فنول کل، تانن و تانن متراکم با عصاره‌گیری نمونه‌های ضایعات پسته پاک کنی در مخلوط استن و آب مقطر به نسبت (۳۰:۷۰) اندازه‌گیری شدند (۱۷). برای اندازه‌گیری فنول کل ۱۰ میکرولیتر عصاره حاوی تانن را برداشته و حجم آن را با آب مقطر به ۰/۵ میلی‌لیتر رسانده، ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین شیکالتو و سپس ۱/۲۵

مقدار ماده آلی قابل هضم، انرژی متابولیسمی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از روش گتاجیو و همکاران (۱۱) و براساس معادله زیر محاسبه شد.

(رابطه ۱)

$$\text{پروتئین خام } 0/0815 + \text{تولید گاز } 0/72222 + 24/91$$

$$= (\text{درصد}) \text{ ماده آلی قابل هضم}$$

(رابطه ۲)

$$^2 (\text{پروتئین خام}) 0/0029 + \text{پروتئین خام } 0/0057 +$$

$$\text{تولید گاز } 0/1357 + 2/20 = \text{انرژی (MJ/kg DM)}$$

متابولیسمی

(رابطه ۳)

$$0/00425 - \text{گاز تولیدی } 0/0222 = (\text{میلی مول به ازای}$$

$$200 \text{ میلی گرم ماده خشک}) \text{ اسیدهای چرب فرار}$$

ساخت پروتئین میکروبی: پتانسیل تولید و راندمان سنتز پروتئین میکروبی در تیمارهای مختلف با استفاده از روش تولید گاز انجام گرفت. برای این منظور تیمارهای مختلف به مدت ۱۲ ساعت یعنی زمانی که نیمی از کل گاز تولید شود ( $t = 1/2$ ) محاسبه شده بر اساس آزمون گاز اول) آنکوباسیون شدند، با این تفاوت که برای تخمین پتانسیل سنتز پروتئین میکروبی از اوره ۲ بار نشاندار شده با نیتروژن-۱۵ (۱۰ اتم درصد) به میزان ۷۶۰ میلی‌گرم در لیتر و کربنات هیدروژن آمونیوم به میزان ۲ گرم در لیتر در محلول بافر به همراه کربنات هیدروژن سدیم (۳۵ گرم در لیتر) در آزمایش تولید گاز استفاده شد.

پس از اتمام آنکوباسیون محتوای سرنگ‌ها سانتریفوژ شد ( $10000 \times g$  به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد). در ادامه سرنگ‌ها ۳ بار متوالی با ۶۰ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم (۴ گرم در لیتر) شسته شدند و محتویات به درون لوله‌های سانتریفوژ

به ازاء ۰/۲ گرم ماده خشک) به منظور محاسبه ضرایب با استفاده از رویه NLIN در نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ (۲۷) براساس مدل اورسکو و مک دونالد (۲۳) آنالیز شدند.

$$GP=b(1-e^{-c(t)})$$

که در این معادله GP=حجم گاز تولیدی در زمان t، b=پتانسیل تولید گاز (میلی لیتر)، c=نرخ تولید گاز (میلی لیتر در ساعت) از بخش b

داده‌های تولید گاز، الحاق نیتروژن-۱۵ و راندمان سنتز پروتئین میکروبی با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۱) و مدل طرح کاملاً تصادفی به صورت زیر مورد تجزیه آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

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

که:

$Y_{ij}$  = مشاهده i در تیمار j،  $\mu$  = میانگین کل مشاهدات،  $T_i$  = اثر تیمار i و  $e_{ij}$  = خطای تصادفی.

### نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی ضایعات پسته پاک کنی: ترکیب شیمیایی ضایعات پسته پاک کنی در جدول ۱ نشان داده شده است. مقدار پروتئین خام، دیواره سلولی نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی به ترتیب ۱۵/۳۱، ۲۵/۹۴ و ۲۰/۵۵ درصد ماده خشک بود که در محدوده گزارش شده بود (۲۸). مقدار چربی خام، خاکستر و کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی به ترتیب ۵/۸۰، ۹/۱۰ و ۵۶/۱۶ درصد ماده خشک و مشابه با نتایج گزارش شده در دیگر مطالعات بود (۲۲). همانطور که ملاحظه می‌شود ضایعات پسته پاک کنی به‌طور جالب توجهی دارای دیواره سلولی اندک و کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی بالا بود.

میلی لیتر محلول کربنات سدیم به آن اضافه و ورتکس شد. جذب بعد از ۴۰ دقیقه در ۷۲۵ نانومتر (UNICO 2100) ثبت شد.

برای اندازه‌گیری تانن، ۱۰۰ میلی گرم پلی ونیل پیرولیدون (pvpp) داخل لوله ریخته شد، ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر عصاره حاوی تانن به آن اضافه و ورتکس شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و مجدداً ورتکس شد. سپس ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ xg سانتریفیوژ و مایع بالایی جمع‌آوری شد که تنها حاوی فنول‌های ساده بود (تانن‌ها همراه با pvpp رسوب کرده‌اند). مقدار فنول همانند روش قبلی، اندازه‌گیری شد با این تفاوت که از ۲۰ میکرولیتر عصاره استفاده شد. مقدار فنول‌های غیر تاننی براساس ماده خشک بیان شد. درصد تانن‌ها از تفاضل مقدار فنول‌ها از فنول کل بدست آمد.

برای اندازه‌گیری تانن متراکم در یک لوله شیشه‌ای ۰/۵ میلی لیتر عصاره تاننی ریخته شد. به لوله‌ها ۳ میلی لیتر معرف بوتانول-اسیدکلریدریک و ۰/۱ میلی لیتر معرف فریک اضافه شد و سپس ورتکس گردید، دهانه لوله‌ها با درپوش شیشه‌ای بسته و به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب ۹۷ تا ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از سرد شدن لوله‌ها میزان جذب در ۵۵۰ نانومتر (UNICO 2100) ثبت شد. مقدار جذب لوله‌های بدون نمونه که مخلوط حرارت ندیده است از مقادیر جذب قرائت شده، کم شد. مقدار تانن متراکم (درصد ماده خشک) به صورت اکسی والان‌های لوکوسیانیدین بوسیله فرمول زیر محاسبه شد:

(درصد ماده خشک) / (فاکتور رقت  $\times 78/26$ )  $\times$  جذب در ۵۵۰ نانومتر) = مقدار تانن متراکم

تجزیه آماری: داده‌های حاصل از تولید گاز (میلی لیتر

جدول ۱: ترکیب شیمیایی پوست پسته (درصد ماده خشک)

Table 1. Chemical composition of pistachio by-product (% of DM)

Ash	NFC	ADF	NDF	EE	CP	Pistachio by-product
خاکستر	کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی	الیاف نامحلول در شوینده اسیدی	الیاف نامحلول در شوینده خنثی	عصاره اتری	پروتئین خام	ضایعات پسته پاک کنی
9.10±0.15	56.16±1.40	20.55±0.47	25.94±0.74	5.80±0.00	15.31±0.21	

بی‌هوای به آمونیاک تبدیل می‌شود و در این محیط قلیایی علاوه بر بهبود قابلیت هضم دیواره سلولی به دلیل شکستن اتصالات لیگنین با کربوهیدرات‌ها، اکسید شدن فنل‌ها و در نتیجه کاهش تانن‌ها اتفاق می‌افتد (۳). محققان (۳) نشان دادند که سطوح پایین تیمار اوره (۲۰ گرم در کیلوگرم) بعد از ۷ روز برای غیرفعال‌سازی فنول کل، تانن و تانن متراکم برگ‌های آکاسیا کافی است. استفاده از اوره ۴ درصد در مایلو بعد از ۳ روز باعث کاهش ۹۲/۳ درصد از تانن شد (۲۶).

تأثیر تیمارها بر ترکیبات فنولی ضایعات پسته پاک کنی: تأثیر تیمارها بر فنول کل، تانن و تانن متراکم در جدول ۲ نشان داده شده است. هیدروکسید سدیم و اوره باعث کاهش فنول کل، تانن و تانن متراکم شدند ( $P < 0.01$ ) و پرتو گاما باعث کاهش فنول کل و تانن شد ( $P < 0.01$ ). تأثیر پرتو گاما بر فنول کل مشابه اثر اوره بود اما باعث کاهش بیشتر تانن در مقایسه با اوره شد. در این آزمایش تمام تیمارها در غیرفعال کردن تانن تاثیرگذار بودند. در خصوص تأثیر اوره بر ترکیبات فنولی عنوان می‌شود که اوره در شرایط

جدول ۲- اثر تیمارهای مختلف بر میزان ترکیبات فنولیک و تانن پوست پسته (درصد ماده خشک)

Table 2. Effect of treatments on total phenol, total tannin and condensed tannin content of pistachio-by-product

SEM	P value	Treatments				Control	شاهد
		GR-10 kGy	4% NaOH	4% Urea			
		پرتو گاما ۱۰ کیلوگری	هیدروکسید سدیم ۴ درصد	اوره ۴ درصد			
0.53	<0.01	6.90 <sup>b</sup>	3.15 <sup>c</sup>	6.25 <sup>b</sup>	7.96 <sup>a</sup>		فنول کل
0.69	<0.01	1.96 <sup>c</sup>	0.64 <sup>d</sup>	2.89 <sup>b</sup>	3.24 <sup>a</sup>		تانن کل
0.06	<0.01	0.77 <sup>a</sup>	0.09 <sup>c</sup>	0.48 <sup>b</sup>	0.81 <sup>a</sup>		تانن متراکم
							Condensed tannin

abcd میانگین‌ها با حروف مشابه معنی دار نیستند ( $p < 0.05$ ).

abcd Means with the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

افزودن ترکیبات قلیایی همانند هیدروکسید سدیم به مواد خوراکی منجر به افزایش pH و کاهش تانن به علت اکسیداسیون ترکیبات فنولیک بوسیله اکسیژن موجود در هوا می‌شود (۳۳) کاهش تانن بوسیله

در آزمایش حاضر بیشترین مقدار حذف فنول کل، تانن و تانن متراکم متعلق به تیمار هیدروکسید سدیم ۴ درصد بود (به ترتیب ۶۰/۴۳ درصد، ۸۰/۲۵ درصد و ۸۸/۸۹ درصد کاهش بطور جداگانه). به طور کلی

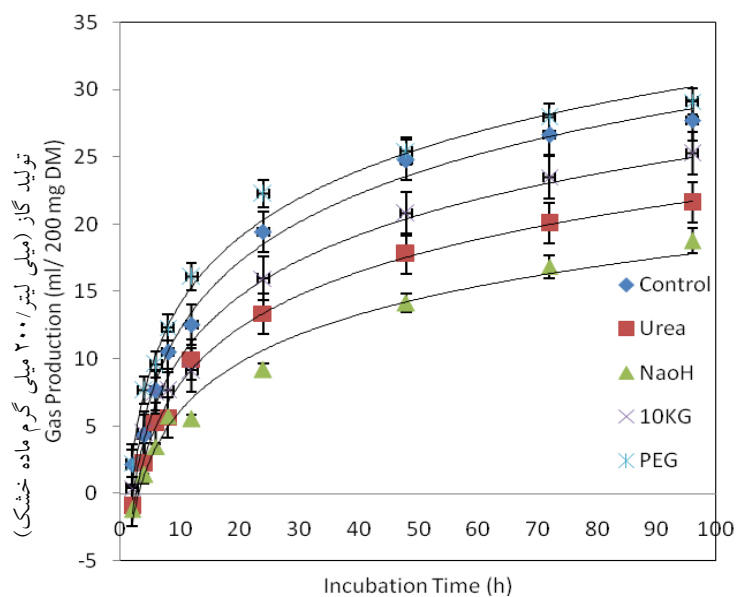
کاهش تانن در اثر پرتوتابی می‌تواند به دلیل ایجاد ایجاد الکترون‌های آزاد و در نتیجه تاثیر آنها بر اکسیداسیون گروه‌های فنلی باشد (۲۴).

**تاثیر تیمارها بر تولید گاز تجمعی در ساعات مختلف انکوباسیون و فراسنجه‌های تولید گاز تجمعی تیمارها در ساعات مختلف انکوباسیون** در شکل ۱ نشان داده شده است. در زمان‌های ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از انکوباسیون بیشترین گاز تولیدی به ترتیب در تیمار PEG، شاهد، پرتوتابی، اوره و هیدروکسید سدیم مشاهده شد ( $P < 0/01$ ). در این ساعات تفاوت معنی‌داری بین تیمار اوره و هیدروکسید سدیم وجود نداشت. در ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت نیز روند مشابهی مشاهده شد ( $P < 0/01$ ). با این تفاوت بین اوره و پرتوتابی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در زمان ۴۸ ساعت تیمار PEG و گروه شاهد بیشترین گاز تولیدی را داشتند و سپس تیمار پرتوتابی، اوره و سود قرار داشتند ( $P < 0/01$ ). روند تولید گاز در زمان ۷۲ و ۹۶ ساعت مشابه ۴۸ ساعت بود بطوری‌که با این تفاوت که اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمار پرتوتابی مشاهده نشد.

با توجه به شکل ۱ مشخص می‌شود که تیمار هیدروکسید سدیم و اوره در ساعت ۲ انکوباسیون باعث تولید گاز منفی در مقایسه با سایر تیمارها شدند. دلیل این موضوع به اثرات ضد میکروبی این دو تیمار به خصوص در ساعات ابتدایی مرتبط می‌باشد که باعث توقف فعالیت میکروبی در این زمان شده‌اند. چنین اثری در دیگر تیمارها و دیگر ساعات انکوباسیون مشاهده نشد. همچنین کمترین تولید گاز تا زمان ۶ ساعت از انکوباسیون مربوط به تیمار هیدروکسید سدیم و اوره بود ( $P < 0/01$ ) و پس از این زمان تا پایان زمان انکوباسیون (۹۶ ساعت) کمترین گاز تولیدی به تیمار هیدروکسید سدیم تعلق داشت ( $P < 0/01$ ).

هیدروکسید سدیم و اوره در این آزمایش مشابه آزمایشات قبلی است (۷). در مطالعه‌ای استفاده از هیدروکسید سدیم و اوره ۴ درصد در عمل‌آوری ضایعات پسته پاک کنی به ترتیب باعث کاهش تانن به مقدار ۸۶/۲۰ و ۳۰/۵۰ درصد در مقایسه با مقدار ابتدایی شد (۲۱). آزمایشی تهیه سیلاژ از ضایعات پسته پاک کنی و افزودن اوره (۰/۱۵ درصد ماده خشک) به ترتیب باعث کاهش ۱۹ و ۳۰ درصدی از فنول کل و تانن شد (۳۰).

کاهش تانن بوسیله پرتو گاما در این آزمایش مشابه آزمایشات قبلی است (۲ و ۸)، اما دیگران (۳۰) مشاهده کردند که پرتوی گاما (۱ کیلوگری) باعث افزایش تانن دانه سویا می‌شود. آزمایش حاضر نشان می‌دهد که پرتو باعث کاهش تانن به مقدار ۳۹/۵۰ درصد در مقایسه با گروه شاهد می‌شود که مشابه نتایج بدست آمده توسط سایرین است (۲) که گزارش کردند پرتوی گاما (۱۰ کیلوگری) باعث کاهش تانن ضایعات پسته پاک کنی به میزان ۳۳ درصد می‌شود. بطور کلی تاثیر پرتوتابی بر گروه‌های فنولی مختلف به دز پرتوتابی، گروه فنولی مورد نظر و حتی ماده پرتوتابی شده بستگی دارد. در مطالعه‌ای تاثیر دزهای پرتوتابی گاما در دزهای ۱، ۵ و ۱۰ کیلوگری بر گروه‌های فنولی مختلف استخراج شده از برگ‌های یک گیاه مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که موثرترین دز در کاهش گروه‌های فنولی ۱۰ کیلوگری بود (۲۴). در این مطالعه افزایش برخی گروه‌های فنولی با افزایش دز پرتوتابی نیز مشاهده شد. افزایش مقدار فنول کل در ضایعات پسته پرتوتابی شده با پرتو الکترون در دزها ۴۰-۱۰ کیلوگری توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (۲۱). که این محققین دلیل این موضوع را افزایش راندمان عصاره‌گیری با پرتوتابی به دلیل آزاد شده تانن متصل با اجزای دیگر گیاهی همانند دیواره سلولی ارتباط داده‌اند. مکانیسم



شکل ۱: گاز تجمعی تولیدی توسط تیمارها در ساعات مختلف انکوباسیون. همپوشانی میله‌های خط عدم تفاوت معنی دار را نشان می‌دهد.

Figure 1. Cumulative gas volume of treatment at different incubation times.

همچنین تیمارهای هیدروکسید سدیم، اوره و پرتو گاما باعث کاهش نرخ تولید گاز (c) در مقایسه با گروه شاهد شدند ( $P < 0.01$ ).

تأثیر تیمارها بر گاز تولیدی، پتانسیل تولید گاز و فراسنجه‌های آن در جدول ۳ نشان داده شده است. هیدروکسید سدیم و اوره باعث کاهش پتانسیل تولید گاز (b) در مقایسه با گروه شاهد شدند ( $P < 0.01$ ).

جدول ۳: تولید گاز و پارامترهای تولید گاز در طی ۹۶ ساعت انکوباسیون

Table 3- Gas volume and gas production parameters at 96 h of incubation of treatments

SEM	P value	Treatments					Control
		PEG	GR-10 kGy	4% NaOH	4% Urea	Control	
		پلی اتیلن گلیکول	پرتو گاما ۱۰ کیلوگری	هیدروکسید سدیم ۴ درصد	اوره ۴ درصد	شاهد	
0.99	<0.01	29.13 <sup>a</sup>	25.26 <sup>b</sup>	18.76 <sup>c</sup>	21.61 <sup>c</sup>	27.72 <sup>ab</sup>	تولید گاز Gas volume (ml/200 mg DM)
0.80	<0.01	28.26 <sup>a</sup>	25.58 <sup>ab</sup>	20.85 <sup>c</sup>	23.57 <sup>b</sup>	27.63 <sup>a</sup>	پارامترهای تولید گاز b (ml)
<0.01	<0.01	0.09 <sup>a</sup>	0.04 <sup>cd</sup>	0.02 <sup>e</sup>	0.03 <sup>d</sup>	0.06 <sup>b</sup>	c (ml/h)

<sup>abcde</sup> Means with the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ). b: asymptotic gas production. c: rate of gas production.

<sup>abcde</sup> میانگین‌ها با حروف مشابه معنی دار نیستند ( $p < 0.05$ ). b: پتانسیل تولید گاز. c: نرخ تولید گاز.



انرژی قابل متابولیسم و ماده آلی قابل هضم در جدول ۴ نشان داده شده است. کلیه تیمارها باعث کاهش گاز تولیدی در طی ۱۲ ساعت در مقایسه با گروه شاهد شدند ( $P < 0/01$ ). نتایج مشابهی توسط مرادی و همکاران (۲۱) با عمل‌آوری ضایعات پسته پاک کنی با هیدروکسید سدیم و اوره (۴ درصد) نیز گزارش شد. در این مطالعه پرتوتابی الکترون باعث افزایش تولید گاز در زمان ۱۲ شده بود (۲۱) اثر کاهشی هیدروکسید سدیم بر تجزیه پذیری شکمبه‌ای ماده خشک و ماده آلی ضایعات پسته پاک کنی گزارش شده است در حالی که در همان مطالعه هنگامی که این تیمار به تغذیه بره‌ها رسید قابلیت هضم ظاهری ماده خشک، ماده آلی و دیواره سلولی در کل دستگاه گوارش مشابه گروه شاهد بود (۲۲).

مقدار الحاق نیتروژن-۱۵ در تیمار هیدروکسید سدیم کمترین مقدار (۰/۰۱۳ میلی‌گرم) و در گروه حاوی PEG بیشترین مقدار (۰/۰۲۳ میلی‌گرم) بود ( $P < 0/01$ ). مقدار الحاق نیتروژن-۱۵ در تیمارهای اوره و پرتوتابی به یک مقدار (۰/۰۱۴ میلی‌گرم) و کمتر از مقدار الحاق در گروه شاهد (۰/۰۱۷ میلی‌گرم) بود ( $P < 0/01$ ). میزان الحاق نیتروژن-۱۵ به عنوان شاخصی است که میزان مصرف نیتروژن-۱۵ از محیط کشت و الحاق آن در میکروارگانیسم را نشان می‌دهد. این شاخص به طور غیر مستقیم نشان دهنده تاثیر تیمارها بر ساخت پروتئین میکروبی می‌باشد. همانطور که مورد انتظار بود احتمالاً با افزودن PEG در محیط و در نتیجه غیر فعال شدن تانن رشد میکروارگانیسم‌ها در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته است. اثرات منفی تانن ضایعات پسته پاک کنی بر جمعیت باکتری‌های شکمبه‌ای و به خصوص باکتری‌های تجزیه کننده دیواره سلولی گزارش شده است (۱۴).

پلی اتیلن گلایکول از طریق اتصال به تانن باعث افزایش قابلیت هضم و تولید گاز در گیاهان حاوی تانن می‌شود (۱۰ و ۱۵). بطور مشابهی افزایش قابلیت هضم ماده خشک و پروتئین خام در بره‌های تغذیه شده با جیره حاوی ضایعات پسته پاک کنی تیمار شده با پلی اتیلن گلایکول گزارش شده است (۲۲). محققین (۷) همبستگی بین پارامترهای تولید گاز و ترکیب شیمیایی و مقدار تانن موجود در گیاهان را مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که همبستگی منفی بین بخش پتانسیل تولید گاز (b) و الیاف نامحلول در شوینده خنثی، اسیدی و تانن وجود دارد. با این وجود حذف تانن بوسیله هیدروکسید سدیم و اوره در این آزمایش منجر به کاهش مقدار گاز تولیدی و پارامترهای تولید گاز شد. کاهش پتانسیل تولید گاز (b) در تیمار هیدروکسید سدیم در مقایسه با اوره بیشتر بود. نتایج مشابهی توسط دیگران (۷) مشاهده شد. آنها دریافتند که استفاده از هیدروکسید سدیم باعث کاهش پتانسیل تولید گاز (b) و نرخ تولید گاز (c) می‌شود. پرتو گاما باعث کاهش نرخ تولید گاز در مقایسه با گروه شاهد شد. دلیل مشخصی در مورد اثر تیمار پرتو گاما بر نرخ تولید گاز در این آزمایش وجود ندارد. در مطالعه دیگری (۲) گزارش شد که پرتو باعث کاهش پتانسیل تولید گاز (b) و نرخ تولید گاز در ضایعات پسته پاک کنی می‌شود. کاهش حجم گاز تولیدی و ضرایب بخش پتانسیل تولید گاز (b) و نرخ تولید گاز (c) در کنجاله آفتابگردان تیمار شده با اسید تانیک نیز گزارش شد (۲۰).

تأثیر تیمارها بر ساخت پروتئین میکروبی، تولید اسیدهای چرب فرار، انرژی قابل متابولیسم و ماده آلی قابل هضم: تأثیر تیمارهای مختلف بر تولید گاز در طی ۱۲ ساعت، میزان الحاق نیتروژن-۱۵، راندمان ساخت پروتئین میکروبی، مقدار اسیدهای چرب فرار،

جدول ۴: تأثیر تیمارهای مختلف بر تولید گاز، اسیدهای چرب فرار، میزان و راندمان ساخت پروتئین میکروبی

**Table 4. The effect of treatments on gas volume, undegraded residue, efficiency of microbial protein synthesis (EMPS) and <sup>15</sup>N enrichment**

		تیمارهای آزمایشی Treatments					
SEM	P value	PEG پلی اتیلن گلیکول	GR-10 kGy پرتو گاما ۱۰ کیلوگری	4% NaOH هیدروکسید سدیم ۴ درصد	4% Urea اوره ۴ درصد	Control شاهد	
0.43	<0.01	17.25 <sup>a</sup>	15.10 <sup>b</sup>	12.55 <sup>c</sup>	13.60 <sup>c</sup>	16.90 <sup>a</sup>	حجم گاز تولیدی Gas volume (ml/12h)
<0.01	<0.01	0.023 <sup>a</sup>	0.014 <sup>c</sup>	0.013 <sup>d</sup>	0.014 <sup>c</sup>	0.017 <sup>b</sup>	الحاق نیتروژن- ۱۵ <sup>15</sup> N enrichment (mg) راندمان سنتز پروتئین میکروبی
<0.01	<0.01	0.0020 <sup>c</sup>	0.0022 <sup>bc</sup>	0.0049 <sup>a</sup>	0.0024 <sup>bc</sup>	0.0025 <sup>b</sup>	EMPS(mg <sup>15</sup> N enrichment /ml gas volume)
0.02	<0.01	0.64 <sup>a</sup>	0.56 <sup>b</sup>	0.41 <sup>c</sup>	0.48 <sup>c</sup>	0.61 <sup>ab</sup>	اسیدهای چرب فرار SCFA (mmol/g DM)
1.87	<0.01	78.75 <sup>a</sup>	71.77 <sup>b</sup>	60.03 <sup>c</sup>	65.20 <sup>c</sup>	76.21 <sup>ab</sup>	ماده آلی قابل هضم Digestible organic matter (% of DM)
0.35	<0.01	13.07 <sup>a</sup>	11.76 <sup>b</sup>	9.55 <sup>c</sup>	10.52 <sup>c</sup>	12.60 <sup>ab</sup>	انرژی متابولیسمی Metabolisable energy (MJ/kgDM)

<sup>abcd</sup> Means with the same letter are not significantly different (p<0.05).

<sup>abcd</sup> میانگین‌ها با حروف مشابه معنی دار نیستند (p<۰/۰۵).

بوسیله تیمارهای هیدروکسید سدیم، اوره و پرتو گاما مطابق کاهش حجم گاز تولیدی است. کاهش راندمان ساخت پروتئین میکروبی (میلی گرم نیتروژن-۱۵ الحاق شده در بخش باکتریایی به ازاء گاز خالص تولیدی) در تیمار پرتو ممکن است به علت نسبت بیشتری از مواد مغذی باشد که به سمت تولید گاز می‌روند. در تایید نتایج این آزمایشی (۴) نشان داده شد که راندمان ساخت پروتئین میکروبی با تولید گاز ارتباط منفی دارد ( $R^2=0/82$ ). بنابراین با کاهش راندمان ساخت پروتئین میکروبی، مواد مغذی به سمت تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر منتقل می‌شوند (۵). در بین تیمارها هیدروکسید سدیم ۴ درصد باعث کاهش راندمان ساخت پروتئین میکروبی در مقایسه با تیمار شاهد شد که نشان دهنده کاهش تولید گاز در این تیمار است. در این آزمایش اوره و هیدروکسید سدیم باعث کاهش اسیدهای چرب فرار

در مطالعه حاضر تیمارهای مورد استفاده در مقایسه با گروه شاهد راندمان سنتز پروتئین میکروبی را کاهش دادند که این کاهش در تیمار پلی اتیلن گلیکول معنی دار بود ( $P<0/01$ ). اگرچه که حجم گاز تولیدی و الحاق نیتروژن-۱۵ در تیمار هیدروکسید سدیم در کمترین سطح قرار داشت اما بیشترین راندمان ساخت پروتئین میکروبی در این تیمار مشاهده شد ( $P<0/01$ ). گزارش شده است که وجود تانن میتواند سنتز پروتئین میکروبی را افزایش دهد. دلیل این موضوع می‌تواند به دلیل اثرات ضد میکروبی و هم زمانی بهتر مواد مغذی آزاد دشته در خلال تخمیر در حضور تانن باشد (۱۰). تیمارهای هیدروکسید سدیم و اوره باعث کاهش مقدار اسیدهای چرب فرار شدند ( $P<0/01$ ). تأثیر تیمارها بر حجم گاز تولیدی در ۱۲ ساعت مشابه حجم گاز تولیدی در ۹۶ ساعت بود. کاهش الحاق نیتروژن-۱۵

داده‌های این آزمایش نشان داد که حذف تانن از ضایعات پسته پاک کنی الزاماً به معنی بهبود تمامی خصوصیات تخمیری آن در محیط آزمایشگاه نیست. بررسی ساخت پروتئین میکروبی با استفاده از تکنیک نسبت ایزوتوپی در شرایط آزمایشگاهی بطور کامل تقلیدی از شرایط واقعی در بدن دام نمی‌باشد و پیشنهاد می‌شود به منظور ارزیابی اثر تیمارهای آزمایشی بر ارزش غذایی ضایعات پسته پاک کنی مطالعات عملکردی و هضمی بر موجود زنده انجام گیرد.

#### منابع

1. AOAC. 1999. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
2. Behgar, M., Ghasemi, S., Naserian, A., Borzoie, A., and Fatollahi, H. 2011. Gamma radiation effects on phenolics, antioxidants activity and in vitro digestion of pistachio (*Pistachiavera*) hull. *Radiation Physic and Chemistry*. 80: 963-967.
3. Ben Salem, H., Saghrouni, L., and Nefzaoui, A. 2005. Attempts to deactivate tannins in fodder shrubs with physical and chemical treatments. *Journal of Animal Feed Science and Technology*. 122: 109-121.
4. Bento, M.H.L., Acamovic, T., and Makkar, H. P. S. 2005. The influence of tannin, pectin and polyethylene glycol on attachment of  $^{15}\text{N}$ -labelled rumen microorganisms to cellulose. *Journal of Animal Feed Science and Technology*. 122: 41-57.
5. Blummel, M., Steingas, H., and Becker, K. 1997. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and  $^{15}\text{N}$  incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*. 77: 911-921.

در مقایسه با تیمار شاهد شدند. این یافته با کاهش تولید گاز در این تیمارها در ارتباط است. تاثیر تیمارها بر قابلیت هضم ماده آلی و انرژی قابل متابولیسم تخمینی مشابه تأثیر آنها بر سیدهای چرب کوتاه زنجیر بود و رفتار مشابه‌ای را نشان داد.

#### نتیجه گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از هیدروکسید سدیم و اوره اگرچه مقدار ترکیبات فنولی در ضایعات پسته پاک کنی را کاهش داد، با وجود این تولید گاز و الحاق نیتروژن-۱۵ در این تیمارها کاهش یافت.

6. Bohluli, A., Naserian, A., Valizadeh, R., and Eftekarshahroodi, F. 2008. The chemical composition and in vitro digestibility of pistachio by-product. In: *Proceeding of British Society of Animal Science*. Uk. 223Pp.
7. Canbolat, O., Ozkan, C.O., and Kamalak, A. 2007. Effects of NaOH treatment on condensed tannin contents and gas production kinetics of tree leaves. *Journal of Animal Feed Science and Technology*. 138: 189-194.
8. El-Niely, H.F.G. 2007. Effect of radiation processing on antinutrients, in vitro protein digestibility and protein efficiency ratio bioassay of legume seeds. *Radiation Physic and Chemistry*. 76: 1050-1057.
9. FAO. 2017. Pistachio production in 2017, Crops/Regions/World list/Production Quantity (pick lists)". UN Food and Agriculture Organization, Corporate Statistical Database (FAOSTAT). Retrieved 25 September 2018.
10. Getachew, G., Makkar, H.P.S., and Becker, K. 2000. Effect of polyethylene glycol on in vitro degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *British Journal of Nutrition*. 84: 73-83.
11. Getachew, G., Makkar, H.P.S., and Becker, K. 2002. Tropical browses:

- contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *Journal of Agricultural Science*. 139: 341-352.
12. Ghasemi, S., Naserian, A.A., Valizadeh, R., Tahmasebi, A.M., Vakili, A.R., and Behgar, M. 2012. Effects of pistachio by-product in replacement of lucerne hay on microbial protein synthesis and fermentative parameters in the rumen of sheep. *Animal Production Science*. 5: 1052-1057.
13. Ghasemi, S., Naserian, A.A., Valizadeh, R., Vakili, A.R., and Behgar, M. Tahmasebi, A.M., Ghovvati, S. 2012. Partial and total substitution of alfalfa hay by pistachio byproduct modulated the counts of selected cellulolytic ruminal bacteria attached to alfalfa hay in sheep. *Livestock Science*. 150: 342-348.
14. Ghasemi, S., Naserian, A.A., Valizadeh, R., Vakili, A.R., and Behgar, M. Tahmasebi, A.M., Ghovvati, S. 2012. Inclusion of pistachio hulls as a replacement for alfalfa hay in the diet of sheep causes a shift in the rumen cellulolytic bacterial population. *Small Ruminant Research*. 104: 94- 98.
15. Kamalak, A., Canbolat, O., Sahin, M., Gurbuz, Y., Ozkose, E., and Ozkan, C.O. 2005. The effect of polyethylene glycol (PEG 8000) supplementation on in vitro gas production kinetics of leaves from tannin containing trees. *African Journal of Animal Science*. 35: 229-237.
16. Makkar, H.P.S., and Singh, B. 1993. Effect of storage and urea addition on detannification and in sacco dry matter digestibility of mature oak (*Quercusincana*) leaves. *Journal of Animal Feed Science and Technology*. 41: 247-259.
17. Makkar, H.P.S., and Singh, B. 1992. Detannification of oak (*Quercus incana*) leaves: treatments and their optimization. *Journal of Animal Feed Science and Technology*. 36: 113-127.
18. Makkar, H.P.S. 2003. Quantification of tannins in tree and shrub foliage. p. 102. In: Makkar, H. P. S. (ed.) *A Laboratory Manual*. Kluwer Academic Publishers.
19. Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., and Schneider, W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal of Agricultural Science*. 93: 217-222.
20. Mohmmadabadi, T., Chaji, M., and Tabatabaei, S. 2010. The effect of tannic acid on in vitro gas production and rumen fermentation of sunflower meal. *Journal of Animal Veterinary Advances*. 9: 277-280.
21. Moradi, M., Afzalzadeh, A., Behgar, M., and Norouzian, M.A. 2015. Effects of electron beam, NaOH and urea on chemical composition, phenolic compounds, in situ ruminal degradability and in vitro gas production kinetics of pistachio by-products. *Veterinary Research Forum*. 6: 111-117.
22. Moradi, M., Behgar, M., Afzalzadeh, A., and Norouzian, M.A. 2015. Effects of electron irradiation, sodium hydroxide and polyethylene glycol on the utilization of pistachio by-products by Zandi male lambs. *Small Ruminant Research*. 127: 1-7.
23. Ørskov, E.R., and McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*. 92: 499-503.
24. Pereira, E., Barros, L., Antonio A. L., Verde S.C., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., and Rodrigues, P. 2017. Is Gamma Radiation Suitable to Preserve Phenolic Compounds and to Decontaminate Mycotoxins in Aromatic Plants? A Case-Study with *Aloysia citrodora Paláu*. *Molecules*. 22: 347-360.
25. Rezaeena, A., Naserian, A.A., Valizadeh, R. and Tahmasbi, A. M. 2012. Effect of using different levels of pistachio by-products silage on composition and blood parameters of Holstein dairy cows. *African Journal of Biotechnology*. 11: 6192-6196.
26. Russell, R.W., and Lolley, J.R. 1989. Deactivation of Tannin in High Tannin

- Milo by Treatment with Urea. *Journal of Dairy Science*.72: 2427-2730.
- 27.SAS. 2001. *Statistical Analysis Systems, Version 8.2*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- 28.Shakeri, P., Ghaffari, M.H., and Fazeli. H. 2016. Pistachio by-product as a forage source for ruminant nutrition: A review. (Part A: Reservation, chemical composition, feed intake, performance, and digestibility). *Animal Science Journal (Pajuhesh & Sazandegi)*. 112: 129-144 (In Persian).
- 29.Shawrang, P., Sadeghi, A.A., Behgar, M., Zareshahi, H., and Shahhoseini, G. 2011. Study of chemical compositions, anti-nutritional contents and digestibility of electron beam irradiated sorghum grains. *Food Chemistry*. 125: 376-379.
- 30.Stajner, D., Milosevic, M., and Popovic, B.M. 2007. Irradiation effects on phenolic content, lipid and protein oxidation and scavenger ability of soybean seeds. *International Journal of Molecular Science*. 8: 618-627.
- 31.Valizadeh, R., Norouzian, M. A., Salemi, M., Ghiasi, E., and Yari, M. 2010. Effects of Feeding Pistachio By-Products on Hematology and Performance of Balouchi Lambs. *Journal of Animal Veterinary Advances*. 9: 1115-1119.
- 32.Van soest, P.J., Robertson, J., and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in ration to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*.74: 3583-4359.
- 33.Vitti, D.M.S.S., Nozella, E.F., Abdalla, A.L., Bueno, I.C.S., Silva Filho, J.C., Costa, C., Bueno, M. S., Longo, C., Vieira, M. E.Q., Cabral Filho, S.L.S., Godoy, P.B., and Mueller-Harvey, I. 2005. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional component browses collected during wet and dry seasons. *Journah of Animal Feed Science Technology*. 122: 123-133.



## The effects gamma irradiation, sodium hydroxide, urea and polyethylene glycol on phenolic compounds, *in vitro* gas production kinetics and microbial protein synthesis of pistachio by-products

S. Ghasemi<sup>1</sup>, A.A. Naserian<sup>2</sup>, R. Valizadeh<sup>2</sup>, \*M. Behgar<sup>3</sup>, M.A. Mosavi Shalmai<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Assistant Prof., Shahriar Faculty of Agriculture and Technical, Technical and Professional University of Tehran, <sup>2</sup>Professor, Dept. of Animal science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, <sup>3</sup>Assistant Prof., Institute of Nuclear Agriculture, Institute for Nuclear Science and Technology, Karaj, Iran

Received: 30/04/2019; Accepted: 30/06/2019

### Abstract

**Background and objectives:** High amount of pistachio by-product (PB) are produced annually in Iran that most of them are considered as agricultural waste. Main problem regarding feeding PB to livestock is the presence of phenolics and tannins which can affect their utilization by ruminants. *In vitro* studies have shown that tannin reduced microbial protein synthesis due to its antimicrobial effects. The main objectives of the current study were to evaluate the effects gamma irradiation (10 kGy), sodium hydroxide (NaOH), urea and polyethylene glycol (PEG) on the tannins and phenolic compounds, gas production (GP) and microbial protein synthesis (MPS) of PB.

**Material and methods:** Pistachio by-product was obtained from a pistachio processing factory and was air dried before it was used in this study. Samples were treated with 4% NaOH, 4% urea solution and gamma radiation (10 kGy) and assigned in a completely randomized design. Phenolic compounds were analyzed according to standard methods. Gas production (GP) test was performed and produced gas were recorded at 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 and 96 h. PEG were used in line with treatments. Metabolisable energy (ME), digestible organic matter (DOM) and volatile fatty acids (SCFA) were estimated via available equations. In another run of gas test (using 10.0 atom % <sup>15</sup>N-double labeled urea in buffer solution), at the 12 h of incubation gas volume was recorded and the contents of the syringe were transferred quantitatively to tubes for determination of apparently undegraded residue, <sup>15</sup>N incorporation and efficiency of microbial mass production. To estimation gas production coefficients were done by Orskov and McDonald equation and data were analyzed using the GLM procedure of SAS.

**Results:** NaOH and urea treatments decreased ( $P < 0.01$ ) total phenolic (TP), total tannin (TT), condensed tannin (CT) of PB and GR decreased ( $P < 0.01$ ) TP, T of PB. Among treatments NaOH decreased TP, TT and CT more than other treatments (60.43%, 80.25% and 88.89%, respectively). Cumulative GP at 96 h varied between 18.76 and 29.13 ml/200 mg DM. The lowest ( $P < 0.01$ ) GP at 96 h observed with NaOH and urea treated PB. Incorporation of <sup>15</sup>N into the microbial mass was lowest ( $P < 0.01$ ) in NaOH (0.013 mg) and urea (0.014 mg) in comparison with the control (0.017 mg). Efficiency of microbial protein synthesis (EMPS) expressed as <sup>15</sup>N enrichment in microbial mass (<sup>15</sup>N) per ml of produced gas (G) after 12 h of incubation was highest ( $P < 0.01$ ) for NaOH treated PB (0.049 mg <sup>15</sup>N/ml G) followed by control, urea and GR treated PB. NaOH and urea treatments decreased ( $P < 0.01$ ) ME, DOM and SCFA production.

\*Corresponding author; mbehgar@aeoi.org.ir

**Conclusion:** Findings of the present study suggest that although supplementation of PB with NaOH, urea and GR would decrease T, but they decreased gas production and <sup>15</sup>N enrichment in microbial mass. Data of the present study showed that the elimination of tannin from PB does not necessarily mean improving its fermentation properties in *in vitro*.

**Keywords:** Pistachio by-product, Phenolic compounds, Tannin, Microbial protein synthesis, Gas production

