Archive of SID

پژوهش‌های علوم دامی
Animal Science Researches

مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۹ شماره ۱/ سال۱۳۹۸/ صفحات ۸۹ تا ۱۰۵

بررسی اثر فرآورده‌های فرعی انار (روغن و پوست انار) بر تولید گاز متان در شرایط برون تنی

فاطمه خسروی[۱]، محمد حسن فتحی نسری[۲*]، سید علیرضا وکیلی[۳] و همایون فرهنگ فر[۲]

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۸

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم دامی دانشگاه بیرجند
[۲] استاد گروه علوم دامی دانشگاه بیرجند
[۳] دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد
[*] مسئول مکاتبه: Email: hfathi@birjand.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: افزودن برخی ترکیبات به جیره نشخوارکنندگان می‌تواند تولید متان را در شکمبه کاهش دهد. **هدف:** هدف از انجام این آزمایش بررسی اثر فرآورده‌های انار (روغن خالص انار و پودر پوست انار) بر تولید گاز متان شکمبه‌ای تحت شرایط برون‌تنی بود. **روش کار:** سوبسترای خوراکی پایه حاوی مخلوطی از یونجه خشک و کنسانتره بود که با نسبت ٦٠ به ٤٠ با هم مخلوط شدند. در آزمایش اول روغن انار به میزان ۲، ٤ و ٦ درصد ماده خشک سوبسترا و در آزمایش دوم پودر پوست انار به میزان ۲/۵، ۵ و ۷ درصد ماده خشک سوبسترا به محیط کشت اضافه شد. تخمیر آزمایشگاهی با استفاده از مایع شکمبه و محیط کشت بی‌هوازی (منک و استینگاس ۱۹۸۸) در بطری‌های با حجم ۱۲۰ میلی لیتر انجام گردید. محیط کشت بی‌هوازی (۳۰ میلی لیتر) و ماده تلقیحی (۱۰ میلی لیتر) درون هر بطری ۱۲۰ میلی لیتری حاوی ۲۰۰ میلی گرم سوبسترای خوراکی پایه ریخته شد. میزان تولید گاز در ساعت‌های ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۲، ١٦، ٢٤، ٤٨، ۷۲ و ٩٦ و میزان گاز دی اکسید کربن و متان پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون تعیین گردید و داده‌ها با نرم افزار آماری SAS و با رویه GLM در قالب طرح کامل تصادفی آنالیز شد. **نتایج:** نتایج آزمایش اول نشان داد استفاده از روغن انار میزان تولید گاز شکمبه‌ای را در ساعت‌های مختلف تحت تاثیر قرار نداد و فراسنجه‌های هضم، انرژی قابل متابولیسم و قابلیت هضم ماده آلی نیز تحت تاثیر تیمارهای مختلف قرار نگرفت. استفاده از ٦ درصد روغن انار میزان تولید متان را بطور معنی‌داری کاهش داد ($P<0/05$) در حالی که مقادیر کمتر آن تاثیر معنی‌داری بر تولید گاز متان نداشت. در آزمایش دوم استفاده از پودر پوست انار به میزان ۵ و ۷/۵ درصد ماده خشک مقدار گاز تولیدی شکمبه را در ساعت‌های ٤٨، ۷۲ و ٩٦ انکوباسیون بطور معنی‌داری کاهش داد. همچنین درصد گاز متان تیمارهای حاوی پوست انار در مقایسه با تیمار شاهد بطور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0/05$) اما تولید متان بین تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف پوست انار تفاوتی نداشت. **نتیجه‌گیری نهایی:** با توجه به نتایج حاصله افزودن فرآورده‌های فرعی انار می‌تواند تولید گاز متان و اتلاف انرژی را تا حد زیادی در شکمبه کاهش دهد.

واژگان کلیدی: روغن انار، پودر پوست انار، گازهای شکمبه‌ای، تولید گاز متان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اکوسیستم شکمبه اختصاصی بوده و در یک دامنه محدودی از pH فعال است بنابراین میکروب‌های شکمبه باید قادر باشند ضمن تولید اسیدهای چرب فرار، با حفظ این دامنه‌ی pH به حیوان کمک کنند تا بتواند یک اکوسیستم پایدار را در شکمبه حفظ کند. یکی از راه‌های حفظ این حالت پایدار در شکمبه مصرف هیدروژن تولید شده از تخمیر کربوهیدرات‌ها است. به طور کلی ۵ مسیر برای مصرف هیدروژن در شکمبه وجود دارد که عبارتند از: تولید متان یا متانوژناسیون[1] اشباع شدن اسیدهای چرب غیر اشباع یا بیوهیدروژناسیون[2] تولید پروپیونات، تبدیل نیترات به نیتریت و تبدیل سولفات به سولفید هیدروژن. که ۳ مورد اول بیشترین سهم را به خود اختصاص می‌دهند (راسل ۲۰۰۲).

نرخ تولید متان در شکمبه دام تحت تأثیر چندین عامل است که مهمترین آنها شامل سطح خوراک مصرفی، نوع کربوهیدرات‌های جیره، عمل آوری خوراک، اضافه کردن لیپیدها یا یونوفرها به جیره و تغییر در فلور میکروبی شکمبه است (NRC ۲۰۰۱ و جانسون و جانسون ۱۹۹۵). باکتری‌ها، پروتوزوآها و قارچ‌های بی-هوازی شکمبه، متان تولید نمی‌کنند. آرشیا متانوژن‌ها[3] تنها گروه میکروارگانیسم‌های شناخته شده تولید کننده متان هستند، که متان محصول نهایی کاتابولیسم آنهاست. تولید متان تنها راهی است که متانوژن‌ها می-توانند انرژی لازم را برای رشد به دست آورند (تایور ۱۹۹۸). متانوژناسیون در شکمبه ۲ تا ۱۲ درصد انرژی خام مصرفی را هدر می‌دهد. این نه تنها ضریب تبدیل انرژی خوراک را کاهش می‌دهد بلکه منجر به تجمع گاز متان در کره زمین به عنوان یک گاز گلخانه‌ای قوی می-شود (جانسون و جانسون ۱۹۹۵). گرمای هوا به عنوان یکی از پیامدهای تجمع گازهای گلخانه‌ای از مهمترین چالش‌های محیطی در جهان و به ویژه خاورمیانه است. پیامدهای گرمای هوا و تغییر اقلیم در کشورهای این منطقه، خصوصاً ایران با توجه به کمبود منابع آب بسیار نگران کننده است.

متان فراوانترین گاز ارگانیکی تولید حرارت در اتمسفر می‌باشد. از دهه ۱۷۰۰ رشد سریع فعالیت‌های انسانی، به خصوص در نواحی کشاورزی، استفاده از سوخت-های فسیلی و مصرف پسماندها، انتشار متان را بیش از دو برابر کرده است. این افزایش توانست یکی از اولین نشانه‌ها برای تغییر اقلیم به خصوص گرمایش جهانی باشد. این افزایش غلظت، به واسطه پتانسیل تأثیر انسان بر روی ترکیب شیمیایی اتمسفر و اقلیم، نگرانی‌های دانشمندان و حامیان محیط زیست را برانگیخته است. با توجه به رشد بالای جمعیت و افزایش نیاز به محصولات کشاورزی و همچنین توسعه دامداری‌ها تجمع متان یکی از مهمترین معضلات جامعه جهانی است (IPCC ۲۰۰۱).

بنابراین در تحقیقات مختلف، روش‌های ممکن برای کاهش تولید متان مورد بررسی قرار گرفته‌اند. هر چند در این تحقیقات هدف از دستکاری جیره کاهش تولید متان در دستگاه گوارش بوده است اما تخمیر شکمبه‌ای و باروری نیز به طور منفی تحت تأثیر قرار گرفته است. با این وجود برخی از دانشمندان نشان دادند با دستکاری اندکی در جیره تولید متان در شکمبه کاهش یافت در حالی که باروری در نشخوارکنندگان حفظ و حتی بهبود نیز پیدا کرد (پاترا ۲۰۱۲).

افزودن چربی به جیره به عنوان یک راهکار برای کاهش تولید متان در نشخوارکنندگان به تأیید رسیده است (بوچمین و همکاران ۲۰۰۸). علاوه بر این، افزودن چربی افزایش غلظت انرژی جیره و بهبود وضعیت انرژی گاوهای شیری پرتولید، افزایش غلظت اسیدهای چرب امگا-۳ و اسید لینولئیک کونژوگه را در شیر و گوشت (بسته به منبع چربی) باعث می‌شود که این

[1] Methanogenation or methanogenesis
[2] Biohydrogenation
[3] Methanogenic archaea

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدهای چرب بر سلامتی انسان اثر مفیدی دارند. تأثیر روغن‌ها بر متانوژناسیون در مطالعات مختلف به طور چشمگیری متفاوت بوده است که به غلظت، نوع و ترکیب اسیدهای چرب در چربی مورد استفاده و همچنین به ترکیب مواد مغذی جیره بستگی داشته است. برای مثال در چند مطالعه در اثر افزودن چربی خصوصاً روغن‌های غنی از اسیدهای چرب متوسط زنجیر (با تعداد کربن کمتر از ١٤) و اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر (با بیش از ١٤ کربن) کاهش قابل توجهی در تولید متان گزارش شده است (جوردن و همکاران ٢٠٠٦ و مچمولر ٢٠٠٦)؛ در تناقض با این یافته‌ها، محققین دیگری گزارش کردند که اینفیوژن بیش از ٥ درصد روغن (شامل مخلوطی از روغن بذرک و آفتابگردان به نسبت ٣ به ١) در هر روز به درون محتویات شکمبه گوسفند تولید متان را تحت تأثیر قرار نداد (کوزگروو و همکاران ٢٠٠٨). مطالعات مختلف نشان دادند که وقتی اسیدهای چرب متوسط زنجیر مثل اسید کاپریک (C10:0)، اسید لوریک (C12:0) و اسید میریستیک (C14:0) (سولیوا و همکاران a,b ٢٠٠٤) به شکل خالص یا توسط ترکیباتی که غنی از این اسیدهای چرب هستند به محیط کشت (دوهم و همکاران ٢٠٠١) افزوده شده و یا در شرایط درون تنی (مچمولر و همکاران ٢٠٠٠) استفاده شده‌اند احتمالاً به دلیل اتصال این اسیدهای چرب به دیواره سلولی باکتری‌های شکمبه باعث کاهش متانوژنزها و فعالیت سلولولایتیک‌ها شده‌اند. علاوه بر این افزودن اسیدهای چرب بلند زنجیر غیر اشباع مانند روغن ماهی و اسید دکوزاهگزاانوئیک به جیره نیز باعث کاهش تولید متان و کاهش بیوهیدروژناسیون شکمبه‌ای شده‌اند (چوو و همکاران ٢٠٠٤و فیوز و همکاران ٢٠٠٧).

روغن انار حاوی اسیدهای چرب اسید ایکوزانوئیک، اسید لینولئیک، اسید لینولنیک، اسید اولئیک، اسید پونیسیک، اسید پالمیتیک و اسید استئاریک است که از این بین حدود ٨٠ درصد سهم اسید پونیسیک[1](سیس-٩، ترانس-١١، سیس-١٣ اکتادکاتری انوئیک اسید، یک اسید چرب کونژوگه ١٨ کربنه با سه پیوند دوگانه) است. مقدار کمی اسید چرب اشباع نیز در روغن دانه انار موجود است. مهم ترین اسید چرب اشباع موجود در روغن انار پالمیتیک اسید است که حدود ٦ درصد کل روغن دانه انار را شامل می‌شود. همچنین مقادیر ناچیزی استئاریک اسید نیز در این روغن وجود دارد. نسبت اسیدهای چرب اشباع به غیر اشباع بسیار کم و در حدود ٠/٠٥ می‌باشد (کیرالان و همکاران ٢٠٠٩). روغن انار تنها منبع گیاهی حاوی اسیدهای چرب کونژوگه است. تاکنون در هیچ یک از تحقیقات انجام شده اثر اسیدهای چرب کونژوگه بر متانوژنز شکمبه‌ای بررسی نشده است و از آن جایی که روغن انار غنی از این اسیدهای چرب کونژوگه می‌باشد (لانسکی و نیومن ٢٠٠٧) به نظر می‌رسد افزودن روغن انار به محیط کشت تأثیر به سزایی بر کاهش متانوژنز شکمبه‌ای داشته باشد.

راهکار تغذیه‌ای دیگری که برای کاهش تولید متان مورد استفاده قرار گرفته است افزودن عصاره‌های گیاهی حاوی تانن یا ساپونین به جیره نشخوارکنندگان بوده است (پاترا و همکاران ٢٠١٠). در تحقیقات اخیر این راهکار به عنوان یک روش ایمن و کم هزینه مورد توجه قرار گرفته است. اثرات بازدارندگی تانن‌ها بر متانوژناسیون شکمبه مربوط به تأثیر مستقیم آنها بر متانوژنزها و پروتوزوآها است. افزودن عصاره‌های حاوی تانن علاوه بر کاهش تولید متان، قابلیت هضم و تولید اسیدهای چرب فرار شکمبه را نیز کاهش داده است، که این نشان‌دهنده تأثیر گسترده تانن‌ها بر جمعیت میکروبی شکمبه است (ویشر و همکاران ٢٠١٣). پوست انار علاوه بر تانن، حاوی اسیدهای پلی فنولی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها می‌باشد، که قادرند فعالیت

[1] Punicic acid

www.SID.ir

Archive of SID

متانوژنزها را در شکمبه متوقف کنند و تولید متان را کاهش دهند (جایانگرا و همکاران ۲۰۱۲). لذا انتظار می‌رود که وجود ترکیبات فنلی (از جمله تانن) موجود در پوست انار کاهش جمعیت متانوژنزها را در پی داشته باشد. در چندین مطالعه انجام شده روی عصاره‌های حاوی تانن از جمله شاه بلوط[1] اقاقیا[2]و بلوط[3]کاهش تولید متان با کاهش قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی و کاهش مقدار اسیدهای چرب فرار در شکمبه همراه بوده است (اسلیوینزکی و همکاران ۲۰۰۲و بوچمین و همکاران ۲۰۰۷).

طبق بررسی منابع علمی به نظر می‌رسد در خصوص اثر روغن انار (غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع و به ویژه از نوع کونژوگه) و پوست انار (حاوی غلظت بالایی از تانن‌ها) بر تولید متان تاکنون آزمایشی انجام نشده است. لذا هدف از این آزمایش بررسی اثر روغن خالص انار و پوست انار بر میزان تولید کل گازها و میزان گاز دی اکسیدکربن و متان تولیدی در شکمبه در شرایط برون‌تنی بود.

مواد و روش‌ها

برای تهیه روغن انار از دانه انار حاصل از بقایای کارخانه کنسانتره انار شرکت انارین فردوس استفاده شد. در این کارخانه ابتدا انار پوست گیری شده و سپس آبگیری می‌شود و بقایای حاصله پس از آبگیری که شامل دانه و مقداری پوسته داخلی است به صورت تازه به فروش می‌رسد. انار آبگیری شده مخلوطی از ارقام انار یزد بود که در اواخر پاییز۱۳۸۹ برداشت شده بود. دانه‌ها و پوست انار تازه به مدت ٤٨ ساعت در آون با دمای ٦٠ درجه سانتی گراد قرار داده شد و دانه‌ها پس از خشک شدن با روش پرس سرد روغن‌گیری شده و از روغن آن در آزمایش استفاده شد. و پوست انار نیز با آسیاب چکشی به ذرات ۱ میلی لیتری پودر شد.

این مطالعه در دو آزمایش جداگانه با استفاده از سطوح مختلف روغن و پوست انار انجام شد. هر دو آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ٥ تیمار و ٨ تکرار انجام شد. در آزمایش اول تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از:

T١ : محیط کشت انکوباسیون بدون افزودنی

T٢ : محیط کشت انکوباسیون حاوی ٢ درصد روغن دانه انار در ماده خشک سوبسترا

T٣ : محیط کشت انکوباسیون حاوی ٤ درصد روغن دانه انار در ماده خشک سوبسترا

T٤ : محیط کشت انکوباسیون حاوی ٦ درصد روغن دانه انار در ماده خشک سوبسترا

ترکیبات شیمیایی پوست و روغن انار و سوبسترای پایه در جدول ۱ گزارش شده است.

[1] Chestnut (Castanea sativa)
[2] Acacia (Acacia mearnsii)
[3] Quebracho (Schinopsis quebracho-colorado)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی فرآورده‌های فرعی انار و سوبسترای پایه (درصد ماده خشک)

Table 1- Chemical compositions of pomegranate by product

Pomegranate by product	Chemical compositions									
	DM	CP	EE	ash	NDF	ADF	TP	TT	CT	HT
Pomegranate peel	93.24	2.89	1.56	2.86	23.62	14.38	27.56	23.61	15.24	8.37
Pomegranate oil	98.15	1.23	95.74	0.03	-	-	3.20	1.05	0.13	0.92
Basic substrate	89.27	16.40	4.39	6.19	43.72	26.51	-	-	-	-

برای تهیه مایع شکمبه از ۳ راس تلیسه هلشتاین فیستولاگذاری شده با میانگین وزن ۳۰±۵۵۰ کیلوگرم استفاده شد. تلیسه‌ها به مدت یک هفته با جیره نگهداری که همان سوبسترای پایه بود، به صورت جیره کاملاً مخلوط در ۲ نوبت صبح و عصر تغذیه شدند. مایع شکمبه تازه حدود ۱۰ ساعت بعد از تغذیه هر حیوان از طریق فیستولای شکمبه‌ای جمع‌آوری و از مخلوط مایع شکمبه جمع آوری شده به عنوان مایع تلقیحی استفاده گردید. تخمیر آزمایشگاهی در بطری‌های با حجم ۱۲۰ میلی لیتر انجام گردید. از مایع شکمبه و محیط کشت بی‌هوازی (شامل محلول ماکرومینرال، محلول میکرومینرال، بزاق مصنوعی و رزوزارین) برای تخمیر آزمایشگاهی (بر اساس روش منکی و استینگاس ۱۹۸۸) استفاده شد. محیط کشت بی‌هوازی (۳۰ میلی لیتر) و ماده تلقیحی (۱۰ میلی لیتر) درون هر بطری ۱۲۰ میلی لیتری حاوی ۲۰۰ میلی گرم سوبسترای خوراکی پایه ریخته شد. سوبسترای خوراکی پایه حاوی مخلوطی از یونجه خشک و کنسانتره متشکل از ۳۵ درصد دانه جو، ۱۸ درصد دانه ذرت، ۱۰ درصد کنجاله سویا، ۱۵ درصد کنجاله کلزا، ۱۱/۵ درصد سبوس گندم، ۷ درصد ملاس، ۱ درصد مکمل معدنی- ویتامینی، ۲ درصد پودر صدف و ۰/۵ درصد نمک (برحسب ماده خشک) (که با نسبت ۶۰ درصد علوفه و ۴۰ درصد کنسانتره با هم مخلوط شدند) بود. بطری‌ها از دی اکسید کربن پر شده و درب آنها با چوب پنبه لاستیکی محکم بسته شد و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در بن‌ماری شیکردار قرار داده شد. به منظور کاهش خطا، انکوباسیون در ۳ نوبت انجام شد که بین هر نوبت ۵ روز فاصله بود و برای هر اجرا یک نمونه شاهد فقط حاوی بافر و مایع شکمبه در نظر گرفته شد. تولید گاز در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ توسط دستگاه تست گاز بر اساس میزان فشار اندازه-گیری شد و در ساعت ۲۴ مقدار ۳ میلی لیتر گاز از بطری‌ها برداشت و مقدار گاز متان نیز توسط سنسور دیجیتال بر اساس میزان فشار (تئودورو و همکاران ۱۹۹۴)، گاز دی اکسید کربن با استفاده از جذب آن در pH قلیایی (محلول هیدروکسید پتاسیم ۳ مولار) در ستون ترقیق (فیوز و همکاران ۲۰۰۵) و گاز هیدروژن از طریق کسر مقدار گاز متان و دی اکسید کربن از کل گاز تولیدی اندازه‌گیری شد (پاترا و یو ۲۰۱۲). مقدار گاز تولیدی بر حسب میلی لیتر به ازاء ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک و بر اساس مدل اورسکوف و مکدونالد (۱۹۷۹) بیان شد. برای تعیین فراسنجه‌های تجزیه پذیری ماده خشک در نمونه‌های مورد بررسی از معادله اصلاح شده ارسکوف و مکدونالد (۱۹۷۹) استفاده شد و برازش داده‌ها با مدل زیر و با استفاده از رویه NLIN و نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۱) انجام شد:

$$P = b\,(1 - e^{-ct})$$

که در این معادله: P= حجم تولید گاز در زمان t، b= بخش دارای پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر در ۲۰۰ میلی-گرم ماده خشک)، c= نرخ تولید گاز (درصد در ساعت)، t= زمان انکوباسیون (ساعت). قابلیت هضم ماده آلی و

www.SID.ir

Archive of SID

انرژی قابل متابولیسم پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون به روش منک و استینگاس (۱۹۸۸) تعیین گردید مقدار انرژی قابل متابولیسم (ME، مگا ژول در کیلوگرم ماده خشک) موجود در نمونه‌ها با استفاده از معادله ارائه شده توسط منک و همکاران (۱۹۸۸) و قابلیت هضم ماده آلی (درصد ماده خشک) بر اساس معادله منک و همکاران (۱۹۷۹) و به شرح ذیل برآورد گردید:

ME (MJ/kg DM) = 2.20 + (0.136 × GP) + (0.0057 × CP)

OMD (% DM) = 14.88 + (0.889 × GP) + (0.0448 × CP) + (0.0651 × CA)

در این معادله: GP میلی لیتر گاز تولید شده حاصل از انکوباسیون ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک نمونه پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون، CP گرم پروتئین خام در ۱۰۰ گرم ماده خشک نمونه و CA گرم خاکستر موجود در ۱۰۰ گرم ماده خشک نمونه می‌باشد.

در آزمایش دوم تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از:

T۱ : محیط کشت انکوباسیون بدون افزودنی

T۲ : محیط کشت انکوباسیون حاوی ۲/۵ درصد پوست انار در ماده خشک سوبسترا

T ۳: محیط کشت انکوباسیون حاوی ۵ درصد پوست انار در ماده خشک سوبسترا

T٤ : محیط کشت انکوباسیون حاوی ۷/۵ درصد پوست انار در ماده خشک سوبسترا

و کلیه مراحل آزمایش و فراسنجه‌های مورد اندازه‌گیری دقیقاً مانند آزمایش اول بود.

آنالیز آماری

داده‌های هر دو آزمایش بوسیله نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۱) در قالب طرح کامل تصادفی با مدل زیر تجزیه و تحلیل شد.

$Y_{ijk} = \mu + Ti + e_{ijK}$

Yijk : صفت مورد نظر

μ : میانگین کل

Ti: اثر تیمار

eijK: اثر خطای آزمایشی

نتایج و بحث

تاثیر افزودن روغن انار بر تولید گاز، فراسنجه‌های قابلیت هضم و تولید متان

اثر افزودن روغن خالص انار بر میزان تولید گاز در زمان‌های مختلف انکوباسیون در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که افزودن روغن انار در مقایسه با تیمار شاهد بطور معنی‌داری تولید گاز را در زمان-های مختلف تحت تاثیر قرار نداد.

نتایج صفری و همکاران (۱۳۹۱) نشان داد کل گاز تولیدی و تولید گاز در ۲٤ ساعت اول انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی در اثر افزودن روغن ماهی محافظت نشده به جیره کاهش معنی‌داری یافت. تأثیر نامطلوب روغن ماهی محافظت نشده بر تخمیر شکمبه ای ماده آلی به صورت معنی دار نمایان شد. محققین مختلف تاثیرات منفی بر هضم ماده خشک را در نتیجه افزودن روغن گزارش کردند (جردن و همکاران ۲۰۰٦). مچمولر و همکاران (۲۰۰۰) با افزودن روغن نارگیل به جیره بره‌ها تولید متان را تا ۲٦ درصد کاهش دادند بدون اینکه بر قابلیت هضم تاثیری داشته باشد. مچمولر و همکاران (۲۰۰۳) نیز گزارش کردند که استفاده از روغن نارگیل در جیره نشخوارکنندگان بدون هیچ تاثیری بر جذب تمامی مواد مغذی در دستگاه گوارش، فعالیت متانوژنز شکمبه‌ای را کاهش داد. این موضوع پذیرفته شده است که کل چربی جیره نباید از ٦-۷ درصد ماده خشک تجاوز کند زیرا تاثیرات منفی بر هضم و جذب مواد مغذی دارد (بوچمین و همکاران ۲۰۰۸). جردن و همکاران (۲۰۰٦) گزارش کردند که افزودن سطوح بالای (۲٤ درصد ماده خشک) روغن نارگیل به جیره گاوهای پرواری تغذیه شده با ۵۰ درصد علوفه و ۵۰ درصد کنسانتره مصرف و قابلیت هضم جیره را کاهش داد اما سطوح پایین تر روغن (بین ۲۸-۱۰ درصد ماده خشک) بر این شاخص‌ها تاثیری نداشت که با نتایج تحقیق حاضر موافق بود. ون سلووا

www.SID.ir

Archive of SID

و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند افزودن ۳/۵ درصد روغن آفتابگردان به سوبسترای پایه تولید گاز در شرایط برون تنی را افزایش داد اما تولید متان را تحت تاثیر قرار نداد. تفاوت‌ها در نتایج آزمایشات مختلف ناشی از تفاوت در منبع چربی مورد استفاده، درصد چربی استفاده شده، گونه نشخوارکننده، شرایط آزمایشی، جیره مورد استفاده برای دام فیستولاگذاری شده و سوبسترای پایه می‌باشد.

جدول ۲- اثر افزودن روغن انار بر میزان تولید گاز در زمان‌های مختلف انکوباسیون (میلی لیتر به ازای ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)

Table 2- Effect of pomegranate oil on gas production in different times

Time incubation[2]	Treatment[1]				P-value
	1	2	3	4	
2	11.38±1.14	13.00±1.14	10.33±1.14	10.63±1.14	0.44
4	21.88±0.78	21.36±0.78	20.29±0.78	20.87±0.78	0.56
6	29.01±1.92	30.67±1.92	25.71±1.92	27.13±1.92	0.37
8	34.25±2.60	40.08±2.60	33.55±2.60	33.15±2.60	0.29
12	40.37±3.53	48.33±3.53	40.72±3.53	39.85±3.53	0.36
16	50.87±3.99	59.66±3.99	52.00±3.99	50.75±3.99	0.41
24	59.25±4.62	69.00±4.62	59.04±4.62	57.25±4.62	0.35
48	62.77±7.39	78.39±7.39	59.63±7.39	61.00±7.39	0.34
72	66.75±7.46	83.30±7.46	64.28±7.46	65.25±7.46	0.32
96	69.51±7.48	87.32±7.48	67.23±7.48	67.12±7.48	0.26

[1] Treatment 1: basic substrate without additional, treatment 2: basic substrate with 2% pomegranate oil, treatment 3: basic substrate with 4% pomegranate oil, treatment 4: basic substrate with 6% pomegranate oil.

[2] Data are included means±standard error. Means within the same line with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

تاثیر روغن انار بر فراسنجه‌های قابلیت هضم سوبسترای پایه در جدول ۳ گزارش شده است. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که در اثر افزودن روغن انار مقدار گاز تولید شده از بخش نامحلول و قابل تخمیر و ثابت نرخ تولید گاز، قابلیت هضم ماده آلی و انرژی قابل متابولیسم تحت تاثیر قرار نگرفت. صفری و همکاران (۱۳۹۱) گزارش کردند تجزیه پذیری ماده درصد چربی به جیره غذایی، تجزیه‌پذیری کربوهیدرات-های ساختمانی در شکمبه حدود ۵۰ درصد یا حتی بیشتر کاهش می‌یابد و این کاهش در تجزیه‌پذیری همراه با کاهش در تولید اسیدهای چرب فرار، گازهای متان و هیدروژن است (جنکینز و پالمکوئیست ۱۹۸٤).

جردن و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که افزودن ٤۲ درصد روغن نارگیل به جیره گاوهای پرواری قابلیت هضم ماده خشک خوراک را کاهش داد اما افزودن ۱۸ و ۲٤ درصد روغن، کاهش قابلیت هضم را در پی نداشت. پاترا و یو (۲۰۱۳) گزارش کردند استفاده از ۳/۱ و ٦/۲ خشک در تیمارهای حاوی روغن ماهی محافظت نشده به صورت معنی داری کاهش یافت که با نتایج تحقیق حاضر مغایرت داشت. این مغایرت می‌تواند به دلیل نوع چربی استفاده شده باشد. تحقیقات مختلفی در رابطه با تأثیر روغن‌های غیر اشباع بر تخمیر شکمبه ای به خصوص بخش فیبری جیره و جمعیت باکتریایی شکمبه انجام شده است. به طور کلی با افزودن کمتر از ۱۰ میلی لیتر روغن ماهی و روغن نارگیل در هر لیتر محیط کشت تولید کل گاز و قابلیت هضم خوراک را تحت تاثیر قرار نداد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۳- اثر افزودن روغن انار بر فراسنجه‌های قابلیت هضم سوبسترای پایه در شرایط برون تنی

Table 3- Effect of pomegranate oil on digestibility parameters basic substrate in *in vitro*

Parameter[2]	Treatment [1]				P-value
	1	2	3	4	
(%DM) [3]b	66.73±7.61	84.11±7.61	64.70±7.61	64.92±7.61	0.31
(ml/h) [4]c	0.09±0.004	0.08±0.004	0.09±0.004	0.09±0.004	0.24
Metabolizable energy (MJ/kg DM)	10.35±0.64	11.67±0.64	10.32±0.64	10.08±0.64	0.36
OM digestibility (%DM)	60.08±4.11	76.22±4.11	67.33±4.11	59.99±4.11	0.35

[1] treatment 1: basic substrate without additional, treatment 2: basic substrate with 2% pomegranate oil, treatment 3: basic substrate with 4% pomegranate oil, treatment 4: basic substrate with 6% pomegranate oil.

[2] Data are included means±standard error. Means within the same line with different superscripts differ significantly (P<0.05).

[3] b =gas production of the potentially degradable (insoluble) fraction after 24h incubation (ml/200mg DM)

[4] c = the gas production rate within incubation (ml/h).

درصد گاز متان پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون نیز بطور معنی‌داری در اثر افزودن روغن انار کاهش یافت (جدول ٤). باسکوئیت و همکاران (٢٠٠٦) از ٣، ٣٠، ٣٠٠ و ٣٠٠٠ میلی گرم روغن رازیانه، شوید، سیر، دارچین، فلفل، پونه، زنجبیل و میخک برای هر لیتر محیط کشت به منظور کاهش تولید متان استفاده کردند به طوری که هر محیط کشت حاوی ٥٠ میلی لیتر مایع شکمبه و ٥٠٠ ٣٥، ٥٠ و ٧٠ گرم روغن نارگیل در هر کیلوگرم ماده خشک جیره گوسفند تولید متان را بطور معنی‌داری کاهش داد (جردن و همکاران ٢٠٠٦ و مچمولر و همکاران ٢٠٠٣). استفاده از ٢/٥ و ١٤ درصد روغن نارگیل در کنسانتره تغذیه شده به گوسفند تولید متان را به ترتیب ١٠ و ٣٥ درصد کاهش داد (دلگادو و همکاران ٢٠١٣). لیلیز و همکاران (٢٠١١) گزارش کردند افزودن ٦ درصد روغن سویا به جیره گاوها تولید متان و جمعیت متانوژنزهای شکمبه را کاهش داد.

پنج احتمال برای کاهش تولید متان در اثر افزودن چربی به جیره بیان شده است: کاهش هضم فیبر (خصوصا اسیدهای چرب بلند زنجیر)، کاهش مصرف خوراک (در صورتی که چربی کل جیره از ٦-٧ درصد تجاوز کند)، کاهش متانوژنزها، کاهش جمعیت پروتوزوآهای شکمبه و افزایش فرآیند بیوهیدروژناسیون(مچمولر ٢٠٠٦).

عمده روغن انار خالص را اسیدهای چرب غیراشباع تشکیل داده و ٧٥ درصد اسیدهای چرب آن را اسید میلی گرم سوبسترای پایه بود و نتایج قابل توجهی در کاهش میزان تولید این گاز ارائه کردند. همچنین موافق با نتایج تحقیق حاضر، مچمولر و همکاران (٢٠٠٣) از ٣,٥ و ٧ درصد روغن نارگیل در هر کیلوگرم ماده خشک جیره گوسفند برای کاهش تولید متان استفاده کردند و کاهش تولید گاز متان را گزارش کردند. همچنین در تحقیقات دیگر مشخص شد استفاده از ٢٥، پونیسیک[1] (اسید لینولنیک مزدوج ٩- سیس، ١١- ترانس، ١٣- سیس) تشکیل می‌دهد که یک اسیدچرب غیراشباع با سه پیوند دوگانه مزدوج است و خواص ضدسرطانی آن به اثبات رسیده است (عباسی و همکاران ٢٠٠٨). اسیدهای چرب غیراشباع دارای چند پیوند دوگانه، بیشتر از اسیدهای چرب غیر اشباع حاوی یک پیوند دوگانه برای میکروب‌های شکمبه سمی هستند و تاثیر کاهشی چربی بر میزان تولید متان با افزایش درجه غیر اشباعیت اسیدهای چرب افزایش می‌یابد (گیگر-روردین و همکاران ٢٠٠٣). چربی‌های غیر اشباع نسبت به چربی‌های اشباع در کاهش تولید متان بسیار قوی‌تر هستند (براسک و همکاران ٢٠١٣). دوهم و همکاران (٢٠٠٠) تاثیر اسیدهای چرب مختلف را بر میزان تولید متان مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که افزودن اسیدهای چرب C١٦:٠ و C١٨:٠ تاثیر معنی-

[1] Punicic acid

www.SID.ir

Archive of SID

داری بر تولید گاز متان در شکمبه نداشت. مقدار متان آزاد شده در تیمارهای حاوی اسیدهای چرب C۱۶:۰ و C۱۸:۰ حدود ۲۵ درصد بیشتر از تیمار حاوی اسید چرب C۱۸:۲ بود و در تیمارهای حاوی اسیدهای چرب C۱٤:۰ و C۱۲:۰ تولید متان ۱۸ درصد بیشتر از تیمارهای حاوی اسیدهای چرب C۱٦:۰ و C۱۸:۰ بود. بلکسر و سزرکاوسکی (۱۹۹۹) نیز نشان دادند که استفاده از اسیدهای چرب در جیره موجب مهار تولید متان می‌گردد. موافق با نتایج تحقیق حاضر، گلاسر و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند کاهش در متان تولیدی با افزودن اسیدهای چرب غیراشباع می‌تواند به دلیل پذیرش الکترون این اسیدهای چرب در حین عمل بیوهیدروژناسیون باشد.

اخیرا متانوژن‌هایی از رسته ترموپلاسماتال‌ها در شکمبه شناسایی شده‌اند که بجای هیدروژن از گروه متیل استفاده می‌کنند (پولسن و همکاران ۲۰۱۳). این گروه و سایر میکروارگانیسم‌های شناخته نشده به توضیح غیر قابل پیش بینی بودن نتایج دستکاری‌های مختلف شکمبه‌ای که قبلاً مشاهده شده است، کمک می‌کند. در نتیجه متابولیسم پیچیده هیدروژن و گروه متیل در شکمبه، تغییرات در مسیرهای تولید اسیدهای چرب فرار، بیوهیدروژناسیون، متابولیسم نیتروژن میکروبی و رشد میکروبی، مقدار تولید متان را تغییر خواهد داد. این تغییرات تابع وظایف جمعیت‌های میکروبی (گونه، فراوانی و فعالیت میکروب‌ها) و مسیرهایی است که از آن استفاده می‌کنند، که این موجب پیچیدگی و دشواری پیش بینی میزان تولید متان و توسعه استراتژی‌های کاهش آن می‌گردد.

تجزیه پروتئین در شکمبه و مصرف آن برای تولید پروتئین میکروبی، می‌تواند منجر به تولید یا مصرف هیدروژن خالص شود (سزرکاوسکی ۱۹۸٦). بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب نیز موجب مصرف هیدروژن خالص می‌گردد. بنابراین تغییرات در متابولیسم نیتروژن شکمبه‌ای و بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب، تولید متان را تغییر می‌دهد و چون سوبستراهای کربوهیدراتی و پروتئینی برای نگهداری و رشد میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرند، پیش بینی-های تئوری برای الگوهای اسیدهای چرب و تولید متان همیشه در مشاهدات برون تنی و درون تنی همخوانی ندارد (هیروناکا و همکاران ۱۹۹٦).

دی اکسید کربن در نتیجه تخمیر شکمبه‌ای تولید و میزان تولید دی اکسید کربن در شکمبه بیشتر بسته به فعالیت‌های متابولیکی (مانند میزان تولید دام) می‌باشد و تغییرات در میزان تولید گازهای شکمبه‌ای (نسبت دی اکسید کربن به متان) به حالت‌های متفاوت تخمیر در شکمبه مرتبط می‌باشد (آرندت و همکاران ۲۰۱۵). بنابراین انتظار می‌رود تولید گاز دی اکسید کربن تابعی از تخمیر و تولید کل گازها باشد که با نتایج تحقیق حاضر موافق است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- اثر افزودن روغن انار بر میزان تولید کل گاز و درصد گاز متان، دی اکسیدکربن و هیدروژن پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون

Table 4- Effect of pomegranate oil on total gas, methane, carbon dioxide and hydrogen production after 24h incubation

Traits[2]	treatments[1]				P-value
	1	2	3	4	
Total gas (ml)	59.25±4.62	69.00±4.62	59.04±4.62	57.25±4.62	0.35
CH4 %	24.53±0.66 [a]	23.32±0.66[ab]	21.91±0.66 [ab]	20.41±0.66 [b]	0.01
CO2 %	31.96±3.11	32.14±3.11	31.84±3.11	33.09±3.11	0.15
H2 %	43.51±3.24	44.54±3.24	46.25±3.24	46.50±3.24	0.21

[1] Treatment 1: basic substrate without additional, treatment 2: basic substrate with 2% pomegranate oil, treatment 3: basic substrate with 4% pomegranate oil, treatment 4: basic substrate with 6% pomegranate oil.
[2] Data are included means±standard error. Means within the same line with different superscripts differ significantly (P<0.05).

تاثیر افزودن پوست انار بر تولید گاز، فراسنجه‌های قابلیت هضم و تولید متان

اثر افزودن پودر پوست انار بر تولید گاز در زمان‌های مختلف انکوباسیون در جدول ٥ گزارش شده است. نتایج نشان داد تولید گاز در ساعت‌های ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ تحت تاثیر تیمارهای مختلف آزمایشی قرار گرفت، بطوری که بیشترین تولید گاز مربوط به تیمار شاهد بود و با افزایش درصد پودر پوست انار، تولید گاز کاهش یافت. پوست انار حاوی میزان قابل توجهی تانن می‌باشد و استفاده از آن در مقادیر اندک در جیره نشخوارکنندگان مفید است. از جمله باعث کاهش تجزیه شکمبه‌ای پروتئین جیره و افزایش جذب اسیدهای آمینه از روده می‌شود. همچنین تانن‌ها اثرات منفی بر غلظت اسیدهای چرب فرار در شکمبه دارند. تانن‌ها ترکیبات فنولی با وزن مولکولی بالا هستند که قادرند به مولکول-های بزرگ مثل پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌های ساختمانی و نشاسته متصل شده و آنها را از دسترس فلور میکروبی شکمبه خارج نمایند و تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای را کاهش دهند (مک اسونی ۲۰۰۱). علاوه بر این، تانن‌ها با اتصال به دیواره باکتری‌های شکمبه مانع ترشح آنزیم‌های خارج سلولی شده و از انتقال مواد مغذی به سلول باکتریایی ممانعت می‌نمایند بنابراین می‌توانند مانع رشد میکروارگانیسم‌های شکمبه و حتی موجب مرگ آنها گردند و تولید گاز را کاهش دهند (مک اسونی و همکاران ۲۰۰۱).

هان و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که با افزایش سطح تانن‌های متراکم، تولید گاز کاهش یافت اما تولید گاز متان کاهش چشمگیری یافت. بوچمین و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که تانن استخراج شده از کوئبراکو به میزان ۲۰ گرم به ازای هر کیلوگرم ماده خشک جیره، تولید متان را در گاوهای در حال رشد بطور معنی‌داری کاهش داد. الیویرا و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که غلظت بالای تانن‌های قابل هیدرولیز میزان مصرف خوراک و قابلیت هضم مواد مغذی را در گوساله‌ها کاهش می‌دهد هر چند غلظت‌های پایین و متعادل آن بهره‌وری هضم را بهبود می‌بخشد و به طور مؤثری موجب کاهش تجزیه پروتئین در شکمبه و افزایش جریان اسیدهای آمینه به روده باریک می‌شود. جایانگرا و همکاران (۲۰۱۰) نیز بیان کردند که تانن‌های متراکم تولید گاز و قابلیت هضم ماده آلی را بیشتر از تانن‌های قابل هیدرولیز کاهش می‌دهند. نتایج این محققین با نتایج تحقیق حاضر موافق بود هر چند در تحقیق حاضر کاهش تولید گاز و قابلیت هضم ماده آلی اندک بود که احتمالاً به دلیل وجود تانن‌های قابل هیدرولیز در پوست انار می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- اثر افزودن پوست انار بر میزان تولید گاز در زمان‌های مختلف انکوباسیون (میلی لیتر به ازای ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)

Table 5- Effect of pomegranate peel on gas production in different times

Time incubation[2]	Treatment[1]				P-value
	1	2	3	4	
2	11.38±0.36	11.50±0.36	10.88±0.36	11.00±0.36	0.57
4	21.88±0.71	21.34±0.71	22.75±0.71	21.32±0.71	0.46
6	29.01±0.95	28.33±0.95	31.25±0.95	28.56±0.95	0.15
8	34.25±0.85 ^{b}	35.61±0.85 ^{b}	38.63±0.85 ^{a}	35.04±0.85 ^{b}	0.04
12	40.37±1.13	42.05±1.13	45.00±1.13	42.17±1.13	0.24
16	50.87±0.80	49.01±0.80	51.12±0.80	48.32±0.80	0.09
24	59.25±1.23 ^{a}	53.67±1.23 ^{b}	55.24±1.23 ^{b}	54.00±1.23 ^{b}	0.03
48	62.77±1.38 ^{a}	57.16±1.38 ^{b}	57.52±1.38 ^{b}	57.83±1.38 ^{b}	0.05
72	66.75±1.60 ^{a}	59.64±1.60 ^{b}	60.82±1.60 ^{b}	59.83±1.60 ^{b}	0.03
96	69.51±1.77 ^{a}	61.00±1.77 ^{b}	62.88±1.77 ^{b}	60.50±1.77 ^{b}	0.01

[1] Treatment 1: basic substrate without additional, treatment 2: basic substrate with 2.5% pomegranate peel, treatment 3: basic substrate with 5% pomegranate peel, treatment 4: basic substrate with 7.5% pomegranate peel.
[2] Data are included means±standard error. Means within the same line with different superscripts differ significantly (P<0.05).

مقدار گاز تولید شده از بخش نامحلول و قابل تخمیر، انرژی قابل متابولیسم و قابلیت هضم ماده آلی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت اما ثابت نرخ تولید گاز تحت تاثیر قرار نگرفت (جدول ٦). از آنجا که فراسنجه‌های قابلیت هضم، انرژی قابل متابولیسم و قابلیت هضم ماده آلی تابعی از میزان گاز تولیدشده طی انکوباسیون هستند و چون تولید گاز در ساعت ٢٤ معنی‌دار بود لذا این شاخص‌ها نیز تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند. الیویرا و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که غلظت بالای تانن‌های قابل هیدرولیز میزان مصرف خوراک و قابلیت هضم مواد مغذی را در گوساله‌ها کاهش می‌دهد هر چند غلظت‌های پایین و متعادل آن بهره‌وری هضم را بهبود می‌بخشد و به طور مؤثری موجب کاهش تجزیه پروتئین در شکمبه و افزایش جریان اسیدهای آمینه به روده باریک می‌شود. فروتوز و همکاران (٢٠٠٤) هیچ کاهشی در میزان مصرف اختیاری خوراک در گوسفندان تغذیه شده با کنجاله سویای فرآوری شده که حاوی ۸ و ۲۰ گرم تانن قابل هیدرولیز در هر کیلوگرم ماده خشک بود، گزارش نکردند. ولی در آزمایشی دیگر (هرواس و همکاران ۲۰۰۰) که روی گوسفندان تغذیه شده با ۸ گرم اسید تانیک به ازای هر کیلوگرم وزن زنده به مدت ٢٤ ساعت انجام شد، میزان مصرف اختیاری خوراک از ۱۸ گرم ماده خشک به ۲/۵ گرم ماده خشک به ازای هر کیلوگرم وزن زنده کاهش یافت. تانن‌های متراکم قابلیت هضم خوراک را کاهش داده و دفع نیتروژن از طریق مدفوع را افزایش می‌دهند. در گوسفندان تغذیه شده با برگ‌های خرنوب[1] حاوی ۵۰ گرم تانن متراکم در هر کیلوگرم ماده خشک، وزن زنده کاهش و دفع پروتئین در مدفوع افزایش یافت. الیویرا و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند تغذیه عصاره انار روی قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و نشاسته تأثیری نداشت.

[1] Carob (*Ceratonia siliqua*)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۶- اثر افزودن پوست انار بر مقدار فراسنجه‌های قابلیت هضم سوبسترای پایه در شرایط برون تنی

Table 6- Effect of pomegranate peel on digestibility parameters basic substrate in *in vitro*

Parameter[2]	Treatment[1]				P-value
	1	2	3	4	
(%DM) b [3]	66.73±1.53 [b]	59.12±1.53 [a]	60.45±1.53 [a]	59.26 ±1.53 [a]	0.01
(ml/h) c [4]	0.09±0.002	0.11±0.002	0.12±0.002	0.11±0.002	0.0001>
Metabolizable energy (MJ/kg DM)	10.35±0.16 [a]	9.59±0.16 [b]	9.80±0.16 [b]	9.63±0.16 [b]	0.03
OM digestibility (%DM)	67.53±1.08 [a]	62.59±1.08 [b]	63.99±1.08 [b]	62.91±1.08 [b]	0.03

[1] Treatment 1: basic substrate without additional, treatment 2: basic substrate with 2.5% pomegranate peel, treatment 3: basic substrate with 5% pomegranate peel, treatment 4: basic substrate with 7.5% pomegranate peel.
[2] Data are included means±standard error. Means within the same line with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).
[3] b =gas production of the potentially degradable (insoluble) fraction after 24h incubation (ml/200mg DM)
[4] c = the gas production rate within incubation (ml/h).

درصد گازهای مختلف شکمبه‌ای در تیمارهای حاوی پودر پوست انار نیز در جدول ۷ گزارش شده است. نتایج نشان داد درصد گاز متان و دی اکسید کربن تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت.

تانن‌ها و ترکیبات فنلی موجود در گیاهان با پروتئین-های خوراک و باکتری‌های شکمبه کمپلکس تشکیل می-دهند. این ترکیبات پتانسیل کاهش تولید متان را با و بدون تاثیرات منفی بر تجزیه‌پذیری و تولید میکروبی دارند. موافق با نتایج تحقیق حاضر، باسکوئیت و همکاران (۲۰۰۶) از ۳، ۳۰، ۳۰۰ و ۳۰۰۰ میلی گرم عصاره یاک حاوی تانن برای هر لیتر محیط کشت به منظور کاهش تولید متان استفاده کردند و بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری را مشاهده نمودند. در تحقیقی دیگر ویسچر و همکاران (۲۰۱۳) در هر سرنگ ۱۲۰ میلی گرم سوبسترای پایه و ٦ و ۱۲ میلی گرم عصاره‌های حاوی تانن (دارای ۳۳ تا ۹۸ درصد تانن در ماده خشک) استفاده کردند و کاهش تولید متان و جمعیت متانوژنزها را گزارش کردند. استفاده از ٥ درصد کوئبراکو در ماده خشک سوبسترای پایه، تولید گاز متان را به طور معنی‌داری کاهش داد (ویئیرا و بوربا ۲۰۱۱). بوچمین و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که استفاده از ۲ درصد ماده خشک کوئبراکو در جیره گاوها بر تولید متان آنها تاثیری نداشت. گارسیاگونزالز و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند استفاده از ۷۰ میلی گرم گیاهان دارویی به ازای ٤٥٠ میلی گرم ماده خشک سوبسترای پایه تولید متان را در شرایط برون تنی کاهش داد. افزودن ۱ درصد عصاره گیاهی حاوی تانن به سوبسترای پایه موجب کاهش مقدار متان تولیدی گردید (کیم و همکاران، ۲۰۱۲).

تانن‌های متراکم هم به شکل مستقیم و هم غیر مستقیم موجب کاهش متان می‌شوند؛ بطور مستقیم متانوژن‌ها را مهار کرده و بطور غیر مستقیم با کاهش قابلیت دسترسی هیدروژن، فرآیند متانوژنسیس را محدود می-کنند (تاوندال و همکاران ۲۰۰۵). سیروهی و همکاران (۲۰۰۹) و افشارحمیدی و همکاران (۱۳۹۳) نشان دادند که متابولیت‌های ثانویه گیاهان در غلظت‌های اندک برای تغییر تخمیر شکمبه بطور مطلوب استفاده شدند. تانن‌ها خصوصاً تانن‌های متراکم تولید متان را کاهش و راندمان سنتز پروتئین میکروبی را افزایش دادند. عصاره‌های حاوی تانن متراکم و ساپونین که بصورت تجاری وجود دارند قیمت آنها برای استفاده رایج در سیستم‌های مزرعه‌ای پرورش نشخوارکنندگان بالاست. بنابراین استفاده از فرآورده‌های فرعی حاوی تانن مانند پوست انار ضمن کاهش هزینه‌های تولید، میتوان متانوژنسیس را نیز کاهش می‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

متانوژن‌ها با حذف هیدروژن از محیط شکمبه (به عنوان آخرین مرحله تخمیر کربوهیدارت‌ها) به سایر میکروارگانیسم‌ها اجازه می‌دهند که به بهترین شکل تخمیر را انجام دهند و از اکسیداسیون کامل سوبستراها حمایت می‌کنند (شارپ و همکاران ۱۹۹۸). تخمیر کربوهیدات‌ها باعث تولید هیدروژن شده و اگر این محصول نهایی از محیط شکمبه حذف نگردد، می‌تواند متابولیسم میکروارگانیسم‌ها را مختل کند. تولید متان، بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب و تولید پروپیونات مسیرهای عمده مصرف هیدروژن در شکمبه هستند.

به عقیده بنچار و همکاران (۲۰۰۸) مواد موثر موجود در گیاهان می‌توانند از طریق اختلال در مکانیسم‌های انتقال الکترون، تغییر در غلظت یون‌های سلولی، انتقال پروتئین، فسفریلاسیون و دیگر واکنش‌های آنزیمی سبب تخریب سلول‌های متانوژن و همچنین تخریب سلول پروتوزآ و به دنبال آن کاهش هیدروژن تولیدی شوند.

جدول ۷- اثر افزودن پوست انار بر میزان تولید کل گازها و درصد گاز متان، دی اکسیدکربن و هیدروژن پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون

Table 7- Effect of pomegranate oil on total gas, methane, carbon dioxide and hydrogen production after 24h incubation

Traits[2]	Treatment[1]				P-value
	1	2	3	4	
Total gas (ml)	59.25±1.23 [a]	53.67±1.23 [b]	55.24±1.23 [b]	54.00±1.23 [b]	0.03
CH4 %	24.53±1.28 [a]	13.75±1.28 [b]	13.95±1.28 [b]	15.92±1.28 [b]	0.001
CO2 %	56.67±4.52 [a]	50.00±4.52 [ab]	47.70±4.52 [b]	51.96±4.52 [ab]	0.03
H2 %	18.80±4.61	36.25±4.61	38.35±4.61	32.12±4.61	0.08

[1] Treatment 1: basic substrate without additional, treatment 2: basic substrate with 2.5% pomegranate peel, treatment 3: basic substrate with 5% pomegranate peel, treatment 4: basic substrate with 7.5% pomegranate peel.

[2] Data are included means±standard error. Means within the same line with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد افزودن روغن خالص انار و پودر پوست انار به سوبسترای پایه در شرایط برون تنی بر تولید گاز و فراسنجه‌های قابلیت هضم تاثیر معنی‌داری نداشت اما تولید گاز متان به عنوان یک گاز گلخانه‌ای مضر در اتمسفر، که بخش قابل توجهی از انرژی خوراک را هدر می‌دهد را بطور معنی‌داری کاهش داد. لذا استفاده از روغن انار و پوست انار در درصدهای استفاده شده در آزمایش حاضر به عنوان ترکیبات ارزان قیمت خوراکی، نه تنها تاثیرات منفی در تغذیه نشخوارکنندگان ندارند بلکه جایگزینی مناسبی برای یونوفرها و سایر ترکیبات ضدمتانوژن‌ها می‌باشند.

منابع مورد استفاده

Abbasi H, Rezaei K and Rashidi L, 2008. Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO2. Journal of American Oil Chemistry Society 85: 83–89.

Afshar Hamidi B, Pirmohammadi R and Mansouri H, 2014. The effects of thymus plant on digestibility parameters and fermentable methane and CO2 production of some feed by in vitro method. Journal of Animal Sciences Researches (Agricultural Science) 24: 163-175 (in Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

Arndt C, Powell JM, Aguerre MJ, Wattiaux MA, 2015. Performance, digestion, nitrogen balance, and emission of manure ammonia, enteric methane, and carbon dioxide in lactating cows fed diets with varying alfalfa silage-to-corn silage ratios. Journal of Dairy Science 98:418–430.

Beauchemin KA, Kreuzer M, Mara FO and McAllister TA, 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. Australian Journal of Experimental Agriculture 48:21–27.

Beauchemin KA, McGinn SM, Martinez TF and McAllister TA, 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. Journal of Animal Science 85:1990–1996.

Benchaar C, Petit HV, Berthiaume R, Ouellet DR, Chiquette J and Chouinard PY, 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. Journal ofDairy Science 90:886–897.

Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A and Kamel C, 2006. Plant extracts affects in vitro rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science 89:761–771.

Chow TT., Fievez V, Moloney AP, Raes K, Demeyer D and De Smet S, 2004, Effect of fish oil on in vitro rumen lipolysis, apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediates. Animal Feed Science and Technology 117:1–12.

Czerkawski JW (1986) An Introduction to Rumen Studies. Pergamon Press, Oxford (UK)/New York (NY, USA.

Delgado DC, González R, Galindo J, Dihigo LE, Cairo J and Almeida M, 2013. Effect of the coconut oil on the consumption, digestion of nutrients and methane production in sheep fed with forage and concentrate. Cuban Journal of Agricultural Science 47:381-384.

Dohme F, Machmuller A, Wasserfallen A and Kreuzer M, 2001. Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. Letters in Applied Microbiology 32(1):47–51.

Fievez V, Babayemi OJ and Demeyer D, 2005. Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. Animal Feed Science and Technology 123-124: 197-210.

Fievez V, Boeckaert C, Vlaeminck B, Mestdagh J and Demeyer D, 2007. In vitro examination of DHA-edible micro algae: 2. Effect on rumen methane production and apparent degradability of hay. Animal Feed Science and Technology 136(1-2):80–95.

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

Garcia-Gonzalez R, Lopez S, Fernandez M, Bodas R and Gonzalez JS, 2008. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production in vitro. Animal Feed Science and Technology 147: 36–52.

Hironaka R, Mathison GW, Kerrigan BK and Vlach I, 1996. The effect of pelleting of alfalfa hay on methane production and digestibility by steers. Science of the Total Environment 180: 221–227.

Jayanegara A, Leiber F and Kreuzer M, 2012. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 96:365–375.

Jenkins TC and Palmquist DL, 1984. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. Journal of Dairy Science 67: 978-986.

Johnson KA and Johnson DE, 1995. Methane emissions from cattle. J Anim Sci 73: 2483–2492.

Jordan E, Kenny D, Hawkins M, Malone R, Lovett DK and OMara FP, 2006. Effect of refined soy oil or whole soybeans on intake, methane output, and performance of young bulls. Journal of Animal Science 84: 2418-2425.

Kim ET, Kim CH, Min KS and Lee SS, 2012. Effects of plant extracts on microbial population, methane emission and ruminal fermentation characteristics in in vitro. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 25: 806-811.

Kyralan M, Golukcu M and Tokgoz H, 2009. Oil and Conjugated linolenic acid contents of seeds from important pomegranate cultivars (Punica granatum L.) grown in Turkey. Journal of the American Oil Chemists' Society 86:985–990.

Lansky EP and Newman RA, 2007. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of Ethnopharmacology 109:177-206.

Lillis L, Boots B, Kenny DA, Petrie K, Boland TM, Clipson N and Doyle EM, 2011. The effect of dietary concentrate and soya oil inclusion on microbial diversity in the rumen of cattle. Journal of Applied Microbiology 111(6):1426–1435.

Machmuller A, 2006. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. Agriculture, Ecosystems & Environment 112:107–114.

Machmuller A, Ossowski DA and Kreuzer M, 2000. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. Animal Feed Science and Technology 85:41–60.

www.SID.ir

Archive of SID

Machmuller A, Soliva CR and Kreuzer M, 2003. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. Reproduction Nutrition Development. 43:41–55.

Mc Sweeney CS, Palmer B, McNeill DM and Krause DO, 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. Animal Feed Science and Technology 91: 83–93.

Menke KH and Steingass H, 1988 Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. Animal Research and Development 28: 7–55.

Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D and Schneider W, 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. Journal of Agricultural Science 93: 217-222.

NRC, 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Oliveira A, Narciso CD, Bisinotto RS, Perdomo MC, Ballou MA, Dreher M and Santos JEP, 2010. Effects of feeding polyphenols from pomegranate extract on health, growth, nutrient digestion, and immunocompetence of calves. Journal of Dairy Science 93: 4280–4291.

Ørskov ER and McDonald I, 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to the passage rate. Journal of Agricultural Science 92: 499-503.

Patra AK, 2012. Enteric methan emitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of currentres earch and future directions.Environmental Monitoring and Assessment 184: 1929–1952.

Patra AK and Yu Z, 2012. Effects of essential oils on methane production, fermentation, abundance and diversity of rumen microbial populations. Applied and Environmental Microbiology. 78: 4271–4280.

Patra AK, Kamra DN and Agarwal N, 2010. Effects of extracts of spices on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds in vitro. Journal of the Science of Food and Agriculture 90(3):511- 520.

Poulsen M, Schwab C, Jensen BB, Engberg RM, Spang A, Canibe N, Hojberg O, Milinovich G, Fragner L, Schleper C, Weckwerth W, Lund P, Schramm A and Urich T, 2013. Methylotrophic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. Nature Comm. 4:1428. http://dx.doi.org/10.1038/ncomms2432.

Safari R, Valizadeh R, Kadkhodayi R, Alamolhada H, Tahmasbi A and Naserian A, 1391. Investigation of the resistance of fish oil microcapsules in ruminal conditions and their effect on gas production and digestibility in invitro. Iranian Journal of Animal Science Research 4: 265-273 (in Persian).

SAS Institute, 2001. Statistical Analysis Systems Institute. Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Sharp R, Ziemer CJ, Stern MD and Stahl DA, 1998. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. FEMS Microbiology Ecology 26: 71–78.

Śliwiński BJ, Soliva CR, Machmüller A and Kreuzer M, 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology 101:101-114.

Soliva CR, Meile L, Adam Cieslak A, Kreuzer M and Machmuller A, 2004. Rumen simulation technique study on the interactions of dietary lauric and myristic acid supplementation in suppressing ruminal methanogenesis. British Journal of Nutrition 92: 689–700.

Tavendale MH, Meagher LP,Pacheco D, Walker N, Attwood GT and Sivakumaran S, 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with Lotus pedunculatus and Medicago sativa, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. Animal Feed Science and Technology 123: 403–419.

Theodorou MK. Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB and France J, 1994. simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technolgy 74: 3583–3597.

Wischer G, Boguhn J, Steinga H, Schollenberger M and Rodehutscord M, 2013. Effects of different tannin-rich extracts and rapeseed tannin monomers on methane formation and microbial protein synthesis in vitro. Animal 7: 1796–1805.

www.SID.ir

Archive of SID

In vitro study of pomegranate by-products on methane production

F khosravi[1], MH Fathi [2*], AR Vakili[3] and H Farhangfar[2]

Received: October 27, 2018 Accepted: January 28, 2019
[1]PhD Student, Department of Animal Science, University of Birjand, Birjand, Iran
[2]Associate Professor, Department of Animal Science, University of Birjand, Birjand, Iran
[3]Associate Professor, Department of Animal Science, University of Ferdowsi, Mashhad, Iran
[*]Corresponding author: Email: hfathi@birjand.ac.ir

Introduction: Methane eructated from ruminants is considered to be one of the most important contributors to global warming, imposing an environmental burden that cannot be ignored. Meanwhile, it represents a loss of 2% to 15% of the gross energy intake (Johnson and Johnson 1995). Animal nutritionists have been studying manipulation of the rumen microbial ecosystem to reduce methane emission without the adverse effects on rumen function. There is a need to identify feed additives to modify ruminal fermentation characteristics and increase the efficiency of feed utilization, thereby inhibiting the ruminal methanogenesis. In recent years, essential oils (Benchaar 2007), plant secondary metabolites such as condensed tannins and saponins (Pen et al., 2006; Bhatta etal, 2009) and dietary lipids (Dohme et al., 2001) have arisen as attractive rumen modifiers to improve rumen microbial metabolism as well as inhibit methane production in ruminants. Particularly, Woodward et al. (2006) showed a positive effect of fish oil (FO) on reducing CH4 emissions in a short-term study, whereas no reduction was observed for a longer-term study. The positive effects of tannin-rich plant extracts on methane emission and methanogens population *in vitro* as well as *in vivo* have been examined (Patra et al., 2006; Patra and Saxena, 2010; Becker et al., 2014). The objective of this study was to evaluate the effect of pomegranate by-products (pomegranate oil and peel) on the in vitro rumen fermentation with respect to methane emissions.
Materials and methods: Basic substrate was contained of 600 g/kg forage and 400 g/kg concentrate. Pomegranate oil was administered in doses of 2, 4, and 6% of substrate DM in the first trial and in the second trial powder peel pomegranate was added in doses of 2.5, 5, and 7.5% of substrate DM. Syringes were inoculated with 40 ml of a rumen fluid–buffer mix (10 ml rumen fluid and 30 ml buffer) and were incubated at 39°C. The gas production was measured at different incubation times and total gas production, CO2, hydrogen, and methane production were determined after 24h of incubation. Data were analyzed by GLM procedure of SAS (2001) software.
Results and discussion: The results of the first experiment showed that the addition of pomegranate oil to substrate did not affect total gas production, digestibility parameters (b and c), metabolizable energy (ME) and organic materails dry (OMD). Methane production was decreased by addition of 6% of pomegranate oil ($P< 0.05$), but not by lower levels of oil. Lipids significantly decreased CH4 emission in the short-term study (-27%), but this effect was not observed after 11 wk of lipid supplementation. On the other hand, several in vitro trials have shown that FO reduced CH4 methanogenesis (Fievez et al. 2003; Patra and Yu 2013). Saturated medium chain fatty acids, C10-C14, also lead to methane reduction. At ruminal temperature, an increasing chain length of medium chain fatty acids seems to reduce their efficiency in inhibiting methanogens and methane formation due to lower solubility (Bucher et al. 2008; Patra 2012). Beauchemin et al. (2008) reviewed the practical application of lipids to reduce methanogenesis. Oil supplementation to diet decreased methane emission by 80% *in vitro* (Fievez et al. 2003) and about 25% *in vivo* (Machmu¨ller et al. 2000). The toxic effects of certain oils on rumen protozoa contributed to reduce methane production (Machmu¨ller et al., 1998). The addition of canola oil at 0%, 3.5% or 7% to the diets of sheep reduced the number of rumen protozoa by 88–97% (Machmu¨ller et al. 1998). The

www.SID.ir

Archive of SID

detrimental impact of unsaturated fatty acids has also been reported (Henderson1973). Machmulleur et al. (1998) observed coconut oil as more effective inhibitor followed by rapeseed, sunflower seed, and linseed oil. Coconut oil comprises medium chain fatty acids. Dong et al. (1997) compared canola oil to coconut oil and demonstrated coconut oil as more effective methane inhibitor. Coconut oil controlled rumen methanogens by changing the metabolic activity and composition (Machmu¨ller et al., 2003). The inclusion of sunflower oil to the diet of cattle resulted in 22% decrease of methane emissions (McGinn et al., 2004).

In the second experiment, adding of 5 and 7.5% of pomegranate peel to substrate DM reduced ($P < 0.05$) total gas production after 24, 72, and 96 h of incubation. Metabolizable energy, b fraction, and OMD digestibility reduced by pomegranate peel powder. Because these parameters dependent the total gas production. Methane production was reduced by adding pomegranate peel to diet, but no difference was observed between methane produced by diet contained different doses of pomegranate peel. However, a direct effect of condensed tannins on rumen methanogens cannot totally be excluded (Field et al. 1989). Furthermore, tannins decrease the degradation of nutrients in the rumen, which then may be degraded in the hindgut. This could have contributed to a lower methane emission, because hindgut fermentation differs from ruminal fermentation by resulting in a lower methane production per unit of fermented nutrients (Fievez, et al. 1999). A meta-analysis of in vivo experiments with tannins by Jayanegara et al. (2012) reported a relatively close relationship between dietary tannin concentration and CH4 production per unit of digestible OM. According to Goel and Makkar (2012), the antimethanogenic effect of tannins depends on the dietary concentration and is positively related to the number of hydroxyl groups in their structure. These authors concluded that hydrolyzable tannins tend to act by directly inhibiting rumen methanogens, whereas the effect of condensed tannins on CH4 production is more through inhibition of fiber digestion. They also pointed out that more animal research is needed with these compounds to establish their antimethanogenic effect. Hydrolysable tannins are hydrolyzed in the rumen and some could be toxic (Lowry et al., 1996; McSweeney et al. 2003).

Concluson: Addition of pomegranate oil and pomegranate peel powder to base substrate did not have a significant effect on digestibility in *in vitro* conditions, but reduce the production of methane gas as a harmful greenhouse gas in the atmosphere, that would loss significant portion of the energy of the feed. Therefore, the use of pomegranate oil and pomegranate peel in the present experiment as inexpensive edible compounds not only have no negative effects on feeding ruminants, but also a good alternative to ionophors and other antigens.

Keywords: Methane production, Pomegranate oil, Pomegranate peel powder, Ruminal gas

www.SID.ir