



بررسی اثر روش‌های مختلف خشک کردن برگ بلوط گونه *Q. persica* و افزودن پلی اتیلن گلیکول بر غلظت ترکیبات فنولی، جمعیت پروتوزوایی و تولید گاز متان

زینب غلامی^۱ - فرشید فتاح‌نیا^۲ - حسین جهانی آبادی^{۳*} - گلناز تاسلی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۰۲

چکیده

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر روش‌های مختلف خشک کردن برگ بلوط گونه *Q. persica* و افزودن پلی اتیلن گلیکول بر غلظت ترکیبات فنولی و اثر آن بر جمعیت پروتوزوا، کل گاز تولیدی و تولید گاز متان در شرایط آزمایشگاه بود. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت فاکتوریل دو×چهار با دوازده تکرار برای هر تیمار در دو دوره انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل روش‌های مختلف خشک کردن برگ بلوط (خشک کردن در آفتاب، در سایه، در آون و به روش انجماد) با و بدون پلی اتیلن گلیکول بودند. روش‌های مختلف خشک کردن بر غلظت کل ترکیبات فنولی، تانن متراکم و تانن قابل هیدرولیز اثر معنی‌داری داشت. اما روش خشک کردن بر محتوای کل تانن تاثیر معنی‌داری نداشت. در همه تیمارهای آزمایشی جمعیت پروتوزوا تحت تاثیر پلی اتیلن گلیکول افزایش معنی‌داری را نشان دادند. بیشترین و کمترین جمعیت پروتوزوا به ترتیب در تیمار خشک کردن با انجماد و آون مشاهده شد. با افزودن پلی اتیلن گلیکول تولید گاز افزایش غیر معنی‌داری نشان داد. در همه تیمارها (به جز برگ خشک شده در آفتاب و آون) با افزودن پلی اتیلن گلیکول تولید گاز متان به طور معنی‌داری افزایش یافت (۵۳/۶ درصد). بیشترین و کمترین درصد متان به ترتیب در تیمار خشک کردن با انجماد و آون (به ترتیب ۱۴ و ۸/۷ درصد کل گاز تولیدی) مشاهده شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که خشک کردن با استفاده از آون غلظت کل ترکیبات فنولی و تانن قابل هیدرولیز برگ بلوط و تولید گاز متان ناشی از تخمیر میکروبی برگ را نسبت به سایر روش‌های خشک کردن به میزان بیشتری کاهش داد. بنابراین با توجه به یافته‌های این مطالعه به نظر می‌رسد خشک کردن برگ بلوط با آون روش مناسب‌تری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: برگ بلوط، پروتوزوا، ترکیبات فنولی، روش‌های خشک کردن، گاز متان

مقدمه

پرسیکا^۵ است (۲۳). در مناطقی از کشور که جنگل‌های بلوط سهم عظیمی در پوشش جنگلی آن مناطق دارند، برگ‌های درختان بلوط از منابع ارزان قیمت و قابل دسترس تأمین‌کننده بخش علوفه‌ای جیره دام‌های نشخوارکننده به حساب می‌آیند. در کنار این موضوع، طی دوره‌هایی از سال که کمبود کمی و کیفی علوفه مرغوب حس می‌گردد در حدود نیمی از بخش علوفه‌ای جیره توسط دامداران محلی با برگ بلوط جایگزین می‌شود (۲۳ و ۴۰). مشکل اصلی استفاده از برگ‌ها و میوه درختان بلوط وجود مواد ضد تغذیه‌ای از جمله تانن‌ها و اثر منفی آن بر عملکرد دام می‌باشد (۲۹). اثر تانن‌ها بر حیوان نشخوارکننده به نوع، مقدار تانن، ترکیب جیره و گونه حیوان بستگی دارد (۲۹). اثرات محدودکنندگی تانن‌ها را می‌توان به کاهش استفاده از مواد مغذی، به‌ویژه پروتئین، کاهش رشد و عملکرد، کاهش خوش‌خوراکی و مصرف خوراک و کاهش در فعالیت آنزیم‌های گوارشی ارتباط داد. در کنار اثرات ضد تغذیه‌ای تانن‌ها در غلظت زیاد، اثرات مثبت تانن‌های متراکم در غلظت بهینه شامل بهبود افزایش

شرایط آب و هوایی خشک و نیمه خشک، کاهش میزان بارندگی در سال‌های اخیر همراه با کاهش تولید علوفه به ازای هر رأس واحد دامی در کشور موجب شده تا تغذیه دام بخش قابل توجهی از هزینه‌های درگردش واحدهای دامپروری را به خود اختصاص دهد (۴۰). جنگل‌های زاگرس که تحت عنوان جنگل‌های نیمه خشک طبقه‌بندی می‌شوند، با ۵ میلیون هکتار وسعت، ۴۰ درصد از کل مساحت جنگل‌های ایران را به خود اختصاص می‌دهند. یکی از گونه‌های غالب درختان در این جنگل‌ها، بلوط کوورکوس

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشگاه ایلام

۲- عضو هیئت علمی گروه علوم دامی، دانشگاه ایلام

۳- عضو هیئت علمی گروه علوم دامی، دانشگاه کردستان

۴- عضو هیئت علمی گروه علوم دامی، دانشگاه ایلام

(Email: ho.jahani@uok.ac.ir)

*- نویسنده مسئول:

حاوی ترکیبات فنولی باعث کاهش اثرات منفی تانن می‌شود، اما روش‌های سنتی در این زمینه خیلی کارآمد نبوده‌اند (۲۹ و ۳۳). با توجه به ویژگی‌های شیمیایی انواع ترکیبات فنولی و همچنین رفتار بیولوژیکی متغیر تانن‌ها پس از خشک شدن (۲)، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر روش‌های مختلف خشک کردن برگ درخت بلوط به‌عنوان منبع غنی از ترکیبات فنولی بر محتوای ترکیبات تاننی و تاثیر آن بر تخمیر شکمبه‌ای برگ بلوط، تولید گاز متان و جمعیت پروتوزوایی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

برگ درختان بلوط از منطقه جنگلی اطراف دانشگاه ایلام با مشخصات جغرافیایی (عرض جغرافیایی: ۳۳ درجه و ۶۶ دقیقه شرقی، طول جغرافیایی: ۴۶ درجه و ۳۸ درجه شمالی و ارتفاع: ۱۵۴۸ متر از سطح دریا) جمع‌آوری گردید. به‌طور تصادفی از ۱۰ اصله درخت بلوط گونه *Q. persic* و از تمام سرشاخه‌ها نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌های برداشت شده از همه درختان با هم مخلوط و با روش‌های اشاره شده در جدول ۱ خشک شدند. در بین روش‌های به‌کار رفته خشک کردن در آفتاب به‌عنوان روش معمول در نظر گرفته شده است.

وزن زنده، جلوگیری از نفخ، افزایش تولید شیر، افزایش نرخ تخمک‌ریزی و درصد بره‌زایی، کاهش نماتودهای رودهای و کاهش تولید نیتروژن-آمونیاکی و متان در شکمبه می‌باشد (۲۹). به‌طور کلی افزودن پلی‌اتیلن گلیکول در جیره‌های حاوی سطوح زیاد تانن در نشخوارکنندگان، سودمند می‌باشد. امروزه گاز متان تولیدی بر حسب نوع جیره دام سبب هدر رفتن ۱۲-۲ درصد انرژی خام جیره مصرفی می‌شود (۱۷). در یک مقیاس جهانی، متان تولید شده توسط نشخوارکنندگان اهلی ۱۸ درصد از سهم کل تولید گازهای گلخانه‌ای را تشکیل می‌دهد (۳۹). کاهش متان منجر به افزایش تولید شیر و گوشت در نشخوارکنندگان می‌گردد (۲۹ و ۷). روش‌های مختلفی به منظور کاهش اثرات ضد تغذیه‌ای ترکیبات فنولی به‌کار گرفته شده است. از جمله می‌توان به استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول (۲۷) اشاره کرد. افزودن پلی‌اتیلن گلیکول در جیره‌های حاوی ۱۵-۵ درصد تانن متراکم سودمند به نظر می‌رسد اما در خوراک‌های با محتوای کم تانن (۴-۲ درصد) سبب کاهش رشد پشم، وزن، تولید شیر و تولیدمثل می‌شود که می‌تواند با کاهش جذب پروتئین در روده، تجزیه بیش‌تر پروتئین در شکمبه و یا کاهش بازدهی سنتز پروتئین میکروبی همراه باشد (۲۷). از طرفی افزودن پلی‌اتیلن گلیکول به‌عنوان روشی کارآمد در کاهش اثرات منفی ترکیبات فنولی، برخی از اثرات سودمند ترکیبات فنولی مانند کاهش تولید متان را نیز از بین می‌برد (۴۴). از طرفی گزارشات بسیاری نشان داده‌اند روش خشک کردن گیاهان

جدول ۱- دما، مدت زمان و روش‌های خشک کردن نمونه‌های برگ بلوط

Table 1- Time, temperature and methods of drying of oak leave

روش خشک کردن Method of drying	میانگین دما Temperature average	مدت خشک کردن Time of drying
آفتاب Sun-drying	39°C	3 day
سایه Dry-shade	27°C	5 day
آون Oven-drying	55°C	2 day
انجماد Freeze-drying	-89°C	24 hour

فنول‌های قابل استخراج و ترکیبات فنولی باقی‌مانده پس از جذب تانن توسط پلی‌وینیل پیرولیدین به‌دست آمد. در نتیجه کل تانن‌های قابل استخراج از تفاوت ترکیبات فنولی، قبل و بعد از افزودن پلی‌وینیل پیرولیدین ارزیابی گردید. از اسید تانیک (Sigma alderich, 1401-55-4) به‌عنوان استاندارد برای تعیین مقدار کل ترکیبات فنولی و کل تانن‌های قابل استخراج استفاده

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی

کل ترکیبات فنولی نمونه‌های آزمایشی با استفاده از معرف فولین سیوکالتو^۱ تعیین شد. برای استخراج ترکیبات فنولی از محلول استون استفاده گردید. کل تانن‌های قابل استخراج از تفاوت بین کل

1- Folin Ciocalteu

تکرار هر دوره را ۲۴ ساعت پس از شروع کشت برداشته و ۵ میلی‌لیتر از مایع کشت به ۵ میلی‌لیتر از فرمالین ۵۰ درصد (فرمالدئید ۱۸/۵) مخلوط و تا زمان رنگ آمیزی و شمارش در یخچال نگهداری شد. در ادامه یک میلی‌لیتر از این مخلوط در یک لوله آزمایش ۱۶×۱۵۰ میلی‌متری ریخته شد سپس ۲ قطره رنگ سبز بریلینت به لوله اضافه گردید و به خوبی تکان داده شدند و به مدت یک شب در شرایط دمایی آزمایشگاه نگهداری شدند (ایوان و همکاران، ۲۰۰۱). سپس ۹ میلی‌لیتر گلیسرول ۳۰٪ به یک میلی‌لیتر مایع شکمبه رنگ‌آمیزی شده اضافه شد. بدین ترتیب نمونه حاصل نسبت به مایع شکمبه اصلی ۲۰ برابر رقیق گردید. شمارش با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰ و برای تعیین جنس‌های مختلف طبق روش اگیموتو و ایما (۳۵) از بزرگ‌نمایی ۴۰ با استفاده از لام نئوبار انجام شد. نتایج شمارش به صورت غلظت (تعداد در هر میلی‌لیتر از مایع شکمبه) گزارش شدند.

آنالیز آماری

تجزیه واریانس ترکیبات فنولی با استفاده از طرح کاملاً تصادفی و مدل آماری زیر انجام شد.

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

در این مدل، Y_{ij} = متغیر وابسته، μ = میانگین کل جامعه برای صفت مورد نظر، T_i = اثر تیمار (روش‌های خشک کردن)، e_{ij} = اثر خطای آزمایشی می‌باشند.

تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده از آزمون تولید گاز برای تولید کل گاز و گاز متان بر پایه طرح کاملاً تصادفی و در قالب آزمایش فاکتوریل ۲×۴ و با استفاده از مدل آماری زیر انجام گرفت.

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ij}$$

در این مدل، A_i = اثر فاکتور A (روش‌های خشک کردن)، B_j = اثر فاکتور B (پلی‌اتیلن گلیکول)، $(AB)_{ij}$ = اثر متقابل فاکتور A و B و e_{ij} = خطای آزمایشی بودند.

از داده‌های خام شمارش پروتوزوا لگاریتم گرفته شد و پس از آن مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ (۲۰۰۱) و رویه مدل‌های خطی عمومی و مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی با استفاده از روش چند دامنه‌ای دانکن و در سطح آماری ۵ درصد تجزیه آماری شدند.

نتایج و بحث

تاثیر روش خشک کردن بر غلظت ترکیبات فنولی

نتایج حاصل از اثر روش‌های خشک کردن بر ترکیبات فنولی در جدول ۲ آورده شده است. اثر روش‌های خشک کردن بر کل ترکیبات فنولی معنی‌دار بود ($P < 0.01$)، که در آن بیش‌ترین مقدار مربوط به

گردید. میزان جذب نور هر یک از استانداردها و نمونه‌های حاصل از عصاره‌ی حاوی پلی‌وینیل‌پیرولیدین و یا فاقد پلی‌وینیل‌پیرولیدین در طول موج ۲۲۵ نانومتر اندازه‌گیری (۳ تکرار برای هر نمونه) و ثبت گردید (۲۸). میزان تانن متراکم طبق روش بوتانول-HCL و میزان تانن قابل هیدرولیز با استفاده از معرف رودانین و طبق روش ماکار (۲۸) به‌دست آمد.

آزمون تولید گاز

بافر مورد استفاده در این آزمایش بر اساس روش پیشنهاد شده توسط منک و استینگاس (۳۰) تهیه شد و روش کار براساس روش تئودور و همکاران (۵۱) انجام شد. برای تعیین فراسنجه‌های تولید گاز، مایع شکمبه از ۲ رأس قوچ کردی دارای فیستولای شکمبه‌ای و با متوسط وزن زنده 3 ± 60 کیلوگرم قبل از خوراک صبحگاهی جمع‌آوری و بلافاصله با پارچه متقال چهار لایه صاف و تا زمان استفاده در دمایی ۳۸ درجه و در شرایط بی‌هوایی نگهداری شد. حیوانات در جایگاه‌های انفرادی با ابعاد ۱×۱ متر و دارای آخور و آب‌خوری مجزا نگهداری می‌شدند. دام‌های آزمایشی با جیره حاوی ۵۰ درصد علوفه و ۵۰ درصد کنسانتره به صورت جیره کامل و مخلوط شده در سطح نگهداری تغذیه می‌شدند. در این روش برای اندازه‌گیری تخمیر از بطری‌های شیشه‌ای ۱۲۰ میلی‌لیتری (۱۲ بطری برای هر تیمار و در دو دوره) استفاده گردید. برای تعیین پارامترهای تولید گاز، ابتدا نمونه‌های خشک شده برگ بلوط با استفاده از آسیاب با غربال یک میلی‌متری آسیاب شدند. تیمارهای آزمایشی شامل روش‌های مختلف خشک کردن برگ بلوط (خشک کردن در آفتاب، در سایه، در آون و به روش انجماد) با و بدون پلی‌اتیلن گلیکول بودند. در هر شیشه مقدار ۳۷۵ میلی‌گرم ماده خشک از نمونه‌های آزمایشی با و یا بدون پلی‌اتیلن گلیکول (دو برابر وزن نمونه‌های آزمایشی)، ۲۵ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی و ۱۲/۵ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه‌ی ریخته شد. برای تعیین روند تولید گاز، گاز تولیدی در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از شروع کشت اندازه‌گیری و با فشارسنج فشار گاز تولیدی ثبت شد. برای تعیین میزان گاز متان تولیدی بر اساس روش پیشنهادی فوز و همکاران (۱۹) ۲۴ ساعت پس از شروع انکوباسیون و ثبت گاز تولیدی ۳ تکرار از ۱۲ تکرار هر تیمار را برداشته و به هر بطری مقدار ۴ میلی‌لیتر سود ۱۰ مولار اضافه شد و بعد از گذشت ۱۰ دقیقه، مقدار گاز بطری‌های شیشه‌ای دوباره قرائت و حذف شدند. اختلاف حجم به‌دست آمده بیان‌گر میزان انتشار گاز متان بود (۱۹).

شمارش پروتوزوا

جهت بررسی جمعیت پروتوزوا، برای هر تیمار ۳ تکرار از ۱۲

پروستوما و بوشلیا پاروا معنی‌دار بود ($P < 0/05$). افزایش تعداد پروتوزوا در زمان استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول می‌تواند نشان‌دهنده کاهش اثرات منفی تانن‌ها بر جمعیت پروتوزوا باشد. پلی‌اتیلن گلیکول به دلیل تمایل بالا برای اتصال به تانن‌ها می‌تواند اثرات منفی تانن‌ها را بر جمعیت و فعالیت پروتوزوا و تخمیر میکروبی برطرف کرده و در نهایت منجر به افزایش تعداد پروتوزوا و بهبود تخمیر میکروبی شود (۴۶). یافته‌های بوکمین و همکاران (۷) و بهاتا و همکاران (۹) نیز نشان داد که افزودن پلی‌اتیلن گلیکول به محیط کشت حاوی برگ درختان آکاسیا و کالوتیروس و یا گیاهان حاوی تانن تعداد و ماندگاری پروتوزوا را در مقایسه با تیمار شاهد (بدون پلی‌اتیلن گلیکول) افزایش می‌دهد که یافته‌های این مطالعه را تأیید می‌کند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بدون توجه به اثر روش‌های خشک کردن و پلی‌اتیلن گلیکول، تعداد هولوتریش‌ها کم‌تر از انتودینومورف‌ها بود. همچنین یانز رویز و همکاران (۵۴) نیز گزارش دادند استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول در جیره دام‌های تغذیه شده با تفاله زیتون به دلیل برطرف کردن اثرات منفی تانن متراکم، موجب افزایش جمعیت پروتوزوا شد. بهاتا و همکاران (۹) گزارش کردند که افزودن پلی‌اتیلن گلیکول به محیط کشت حاوی ترکیبات تانن دار سبب افزایش جمعیت پروتوزوای خصوصاً گونه انتودینومورف‌ها شد. اما در مقابل ابرقویی و همکاران (۱) گزارش کردند افزودن پلی‌اتیلن گلیکول (۹۰ گرم در کیلوگرم ماده خشک) به جیره حاوی تفاله انگور، اثرات متفاوتی بر جمعیت پروتوزوایی داشت، به این صورت که جمعیت ایزوتریش‌ها و دیستیریش‌ها^۱ کاهش و انتودینیوم و دیپلودینیوم افزایش یافت. نتایج متفاوت به‌دست آمده در آزمایش ابرقویی و همکاران (۱) علاوه بر نوع و ماهیت تانن به میزان ساپونین موجود در تفاله انگور نیز ارتباط دارد. نتایج متفاوت در رابطه با اثرات متفاوت تانن و پلی‌اتیلن گلیکول بر جمعیت پروتوزوای شکمبه ممکن است به دلیل نوع جیره، گونه حیوان، تفاوت‌های فردی، روش نمونه‌برداری (۴)، مقدار و نوع تانن (میزان تانن متراکم و قابل هیدرولیز) نمونه آزمایشی (۳۹) مرتبط باشد. افزایش تعداد پروتوزوا در تیمار آون نسبت به سایر روش‌های خشک کردن به دلیل پایین‌تر بودن ترکیبات فنولی در تیمار آون می‌باشد. چرا که تانن‌ها با اثر مستقیم بر پروتوزواها و با محدود کردن فرآیند تخمیر شکمبه می‌توانند جمعیت پروتوزوای شکمبه را کاهش دهند (۴۶). کاتسوبه و همکاران (۲۷) نشان دادند استفاده از مقدار ۱۰۵ گرم ماده خشک برگ درخت گوش (*Entretolobium*) که حاوی تانن می‌باشد، در جیره باعث کاهش تعداد کل پروتوزوا شد. از آن‌جا که برخلاف باکتری‌ها سلولولایتیک، جمعیت پروتوزوای از پروتئین با قابلیت انحلال‌پذیری کم به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده می‌کنند (۱)، لذا غلظت کم تانن جیره به دلیل

تیمار انجماد و کم‌ترین مربوط به تیمار آون بود. همچنین روش‌های مختلف خشک کردن اثر معنی‌داری بر غلظت تانن متراکم و تانن قابل هیدرولیز داشت ($P < 0/05$). اما روش خشک کردن بر محتوای کل تانن تأثیر معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$). کاهش ترکیبات فنولی ممکن است به دلیل فرآیندهای آنزیمی باشد که در طی مراحل خشک کردن اتفاق می‌افتد. روش‌های سنتی خشک کردن (مانند خشک کردن در مجاورت آفتاب و جریان طبیعی هوا) نمی‌توانند آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات فنولی همانند پلی‌فنول اکسیداز را غیرفعال کنند (۲۳). سطح رطوبت در برگ‌ها نقش مهمی در غیر فعال‌سازی تانن ایفا می‌کند و روش‌هایی که در آن از دماهای پایین‌تری برای دهیدراسیون استفاده می‌شود محتوای ترکیبات فنولی را کم‌تر کاهش می‌دهند (۱۵). در آزمایش حاضر با توجه به این‌که همه روش‌های خشک کردن محتوای رطوبت را به زیر ۱۵ درصد کاهش دادند، اتلاف کم‌تر ترکیبات فنولی در روش سایه نسبت به آفتاب می‌تواند به این واقعیت نسبت داده شود که کاهش سطح رطوبت برگ‌های بلوط هنگام خشک کردن گیاه، می‌تواند سطح تانن را کاهش دهد. مشابه با نتایج آزمایش حاضر، آنتیا و همکاران (۳) گزارش کردند که خشک کردن گیاه نعنای با آون و انجماد به‌ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین ترکیبات فنولی را داشت و روش‌های سنتی خشک کردن (آفتاب و سایه) نسبت به آون ترکیبات فنولی بالاتری داشتند. در پژوهشی دیگر دزولوا و همکاران (۱۶) که روی برگ و ساقه آکاسیا صورت گرفت، بیش‌ترین و کم‌ترین میزان ترکیبات فنولی به‌ترتیب مربوط به روش‌های خشک کردن در انجماد و آون بود. همچنین پادماجا و همکاران (۳۷) کاهش در محتوای تانن متراکم برای برگ‌های کاساوا و لئوکانا که در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت خشک شده بودند را به‌ترتیب ۱۰/۱ و ۲۱/۴ درصد بیان کردند. نتایج آزمایش دیملو و تاپلین (۱۴) نشان داد که دماهای بالا محتوای تانن برگ لکونا را کاهش می‌دهد. از طرفی انور و همکاران (۱۴) بیان کردند خشک کردن کلم بروکلی به روش آون (۳ روز در ۴۰ درجه سانتی‌گراد) در مقایسه با روش هوا خشک (۱۰ روز در ۲۵ درجه سانتی‌گراد) سبب افزایش محتوای ترکیبات فنولی می‌شود. برخلاف نتایج پژوهش حاضر، کاتسوبه و همکاران (۲۹) در آزمایشی نشان دادند خشک کردن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد یا کم‌تر بر غلظت ترکیبات فنولی تأثیری ندارد.

جمعیت پروتوزوا

اثر روش‌های مختلف خشک کردن و افزودن پلی‌اتیلن گلیکول بر جمعیت پروتوزوا در جدول ۳ نشان داده شده است. اثر پلی‌اتیلن گلیکول بر جمعیت پروتوزوا معنی‌دار بود ($P < 0/01$). اثر روش خشک کردن بر جمعیت پروتوزوای انتودینیوم، ایزوتریشیا

1- *Dasytricha*

جمعیت پروتوزوای افزایش پیدا کرد. هم‌چنین در میان جنس‌های بررسی شده، گونه انتودینومورف بیش‌ترین پاسخ را به افزودن پلی‌اتیلن گلیکول نشان داد.

اتصال کمتر به پروتئین جیره و جلوگیری از تجزیه سریع آن می‌تواند دلیل افزایش جمعیت پروتوزوای در تیمارهای مذکور باشد (۱). اثر متقابل بین روش خشک کردن و پلی‌اتیلن گلیکول بر جمعیت پروتوزوای معنی‌دار نبود ($P > 0.05$)، اما در همه موارد با افزودن پلی‌اتیلن گلیکول

جدول ۲ - اثر روش‌های مختلف خشک کردن بر غلظت ترکیبات فنولی برگ بلوط (درصد ماده خشک)^۱

Table 2- Effect of different drying methods on concentration of phenolic compounds of oak leave (% DM)¹

ترکیبات شیمیایی Chemical composition	روش خشک کردن Method of drying				SEM	P-Value
	آفتاب Sun shine	سایه Shadow	آون Oven	انجماد Freeze		
کل ترکیبات فنولی Total Phenolic compounds	17.4 ^b	19.4 ^{ab}	14.7 ^b	24.0 ^a	1.2	<0.01
تانن کل Total tannins	9.5	9.9	9.1	10.2	1.6	0.96
تانن متراکم Condensed tannins	1.2 ^b	1.3 ^b	1.5 ^a	1.2 ^b	0.05	<0.01
تانن قابل هیدرولیز Hydrolysable tannins	8.2 ^b	8.6 ^a	7.9 ^c	8.7 ^a	0.05	<0.01

^۱ میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

^۱ Mean with different alphabets are statistically different ($P < 0.05$).

تولید کل گاز

رشد میکروبی و کاهش فعالیت آنزیم‌های میکروبی می‌شود (۳۱). در واقع تانن‌ها با مهار فعالیت میکروارگانیسم‌ها و یا آنزیم‌های ترشح شده توسط میکروب‌ها تخمیر شکمبه‌ای و در پی آن تولید گاز را مهار می‌کنند (۳۱). عامل دیگر ترکیب شدن تانن‌ها با مواد مغذی مانند پروتئین‌ها (۱۶)، کربوهیدرات‌ها و مواد معدنی (۴۳) است که آن‌ها را از دسترس میکروارگانیسم‌ها خارج می‌کنند و در نتیجه موجب کاهش تخمیر و تولید گاز می‌شوند. در ساختار مولکولی پلی‌اتیلن گلیکول تعداد زیادی اکسیژن فعال وجود دارند که قادر به تشکیل پیوند هیدروژنی با گروه‌های فنولی موجود در تانن می‌باشند به این ترتیب ترکیبات فنولی را از محلول جدا کرده و رسوب می‌دهند (۲۴) و با افزایش فراهمی مواد مغذی برای میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه افزایش رشد و افزایش فعالیت آن‌ها تولید گاز بیش‌تر می‌شود (۵). نتایج به‌دست آمده با نتایج آرهاب و همکاران (۵)، بوتنو و همکاران (۹)، سالاما و همکاران (۴۱) و بن سلام و همکاران (۸) که گزارش کردند استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول تولید گاز در شرایط آزمایشگاه را افزایش می‌دهد، مطابقت داشت.

اثر پلی‌اتیلن گلیکول و روش خشک کردن بر تولید گاز برگ بلوط پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در جدول ۳ آورده شده است. هرچند افزودن پلی‌اتیلن گلیکول توان تولید گاز را به لحاظ عددی افزایش داد اما تفاوت بین تیمارهای آزمایشی پس از ۲۴ ساعت معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). هم‌چنین اثر روش‌های خشک کردن بر توان تولید گاز معنی‌دار نبود اما بیش‌ترین میزان تولید گاز مربوط به تیمار آون و کم‌ترین مربوط به تیمارهای انجماد و سایه بود ($P > 0.05$). نمودارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ میزان گاز تولیدی تیمارهای آزمایشی با و بدون پلی‌اتیلن گلیکول را طی ۹۶ ساعت انکوباسیون نشان می‌دهند. هرچند که میزان گاز تولیدی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت اما نتایج این مطالعه نشان داد که ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون کل گاز تولیدی با افزودن پلی‌اتیلن گلیکول در تمام تیمارهای آزمایشی افزایش یافت. افزایش تولید گاز در حضور پلی‌اتیلن گلیکول نشان‌دهنده کاهش اثرات منفی تانن بر فرآیندهای تخمیر شکمبه است (۱۱). اثر مهارکنندگی تانن‌ها احتمالاً باعث کاهش اتصال میکروبی به ذرات خوراک، کاهش

جدول ۳- اثر روش‌های مختلف خشک کردن و افزودن پلی اتیلن گلیکول بر جمعیت پروتوزوآ (تعداد $\times 10^5$)^۱
Table 3- Effect of different drying methods and polyethylene glycol on protozoa population ($\times 10^5$)¹

		انتودینیوم <i>Entodinium</i>	ایزوتریشا پروستوما <i>Isoترicha prostoma</i>	بوشلیا پاروا <i>Boshiliya paroa</i>
پلی اتیلن گلیکول Polyethylene glycol	+	5.7 ^a	3.2 ^a	1.7 ^a
	-	3.2 ^b	1.5 ^b	1.8 ^b
SEM		0.35	0.25	0.22
P- value		<0.01	<0.01	0.05
روش خشک کردن Method of drying	آفتاب Sun	4.2 ^{ab}	2.5 ^{ab}	1.3 ^b
	سایه Shadow	3.5 ^b	1.7 ^b	1 ^b
	آون Oven	6 ^a	3.3 ^a	2.7 ^a
	انجماد Freeze	4 ^b	1.3 ^b	0.5 ^b
	SEM	0.5	0.35	0.31
	P- value	0.015	0.017	<0.01
تیمار ^۲ Treatment ²	1	3.3	2	1
	2	2.3	1.3	0.67
	3	5	2	2.7
	4	2	0.7	0
	5	5	3	1.7
	6	4	2	1.3
	7	7	4	2.7
	8	6	3	1
SEM	0.71	0.5	0.44	
P- value	0.39	0.17	0.72	

^۱ میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$)

^۲ تیمار ۱- برگ بلوط خشک شده در آفتاب بدون PEG، تیمار ۲- برگ بلوط خشک شده در آفتاب با PEG، تیمار ۳- برگ بلوط خشک شده در سایه بدون PEG، تیمار ۴- برگ بلوط خشک شده در سایه با PEG، تیمار ۵- برگ بلوط خشک شده در آون بدون PEG، تیمار ۶- برگ بلوط خشک شده در آون با PEG، تیمار ۷- برگ بلوط خشک شده به روش انجماد بدون PEG، تیمار ۸- برگ بلوط خشک شده به روش انجماد با PEG.

^۱Mean with different alphabets are statistically different ($P < 0.05$).

^۲Treatments, 1- Sun dry without PEG, 2- Sun dry with PEG, 3- Shadow dry without PEG, 4- Shadow dry with PEG, 5- Oven dry without PEG, 6- Shadow dry with PEG, 7- Freez dry without PEG, 8- Freez dry with PEG.

جدول ۴- اثر روش‌های خشک کردن برگ بلوط و افزودن پلی‌اتیلن گلیکول بر تولید گاز و متان تولیدی به‌ازای ۳۷۵ میلی‌گرم نمونه خشک برگ بلوط بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون

Table 4- Effect of different drying methods on gas and methane production from 375 mg dry oak leave after 24h of incubation

		تولید گاز ^۱ Gas production ¹ (ml)	گاز متان (% از کل گاز تولیدی) Methane (% of total gas)
پلی‌اتیلن گلیکول polyethylene glycol	+	109.6	15.1 ^a
	-	101.1	7.0 ^b
SEM		3.84	0.56
P- value		0.13	<0.01
روش خشک کردن Method of drying	آفتاب Sun	103.7	9.6 ^b
	سایه Shadow	102.7	12.1 ^{ab}
	آون Oven	112.2	8.7 ^b
	انجماد Freeze	102.7	14.0 ^a
	SEM	5.4	0.92
P- value		0.54	<0.05
تیمار ^۲ Treatment ²	1	111.5	4.6 ^a
	2	104.3	5.4 ^a
	3	103.6	5.5 ^a
	4	112.8	12.0 ^b
	5	87.8	12.7 ^b
	6	103.2	13.9 ^b
	7	101.7	12.2 ^b
	8	111.7	21.7 ^c
SEM	7.7	1.13	
P- value	0.18	<0.05	

^۱ (ml gas/375 mg DM) a

^۲ تیمار ۱- برگ بلوط خشک شده در آفتاب بدون PEG، تیمار ۲- خشک شده در آفتاب با PEG، تیمار ۳- خشک شده در سایه بدون PEG، تیمار ۴- خشک شده در سایه با PEG، تیمار ۵- خشک شده در آون بدون PEG، تیمار ۶- خشک شده در آون با PEG، تیمار ۷- خشک شده به روش انجماد بدون PEG، تیمار ۸- خشک شده به روش انجماد با PEG

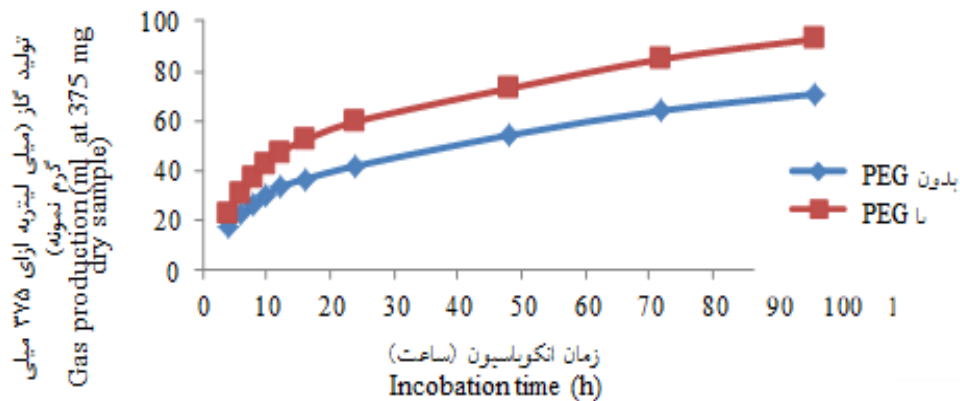
²Treatments, 1- Sun dry without PEG, 2- Sun dry with PEG, 3- Shadow dry without PEG, 4- Shadow dry with PEG, 5- Oven dry without PEG, 6- Shadow dry with PEG, 7- Freez dry without PEG, 8- Freez dry with PEG.

تولید متان

اثر روش‌های مختلف خشک کردن برگ بلوط و افزودن پلی‌اتیلن گلیکول بر تولید متان در جدول ۳ آمده است. روش‌های مختلف خشک کردن و افزودن پلی‌اتیلن گلیکول اثر معنی‌داری بر تولید گاز متان داشتند ($P < 0.01$). به طوری که کم‌ترین تولید گاز متان در تیمار آون و بیش‌ترین در تیمار خشک کردن با برودت مشاهده شد. همچنین اثر متقابل پلی‌اتیلن گلیکول و روش خشک کردن بر تولید گاز متان معنی‌دار بود ($P < 0.01$). بیشترین افزایش در تولید متان پس از افزودن پلی‌اتیلن گلیکول به ترتیب در تیمار سایه (۵۴/۱۷ درصد) و انجماد (۴۳/۸ درصد) مشاهده شد. در این دو تیمار برگ بلوط بیشترین غلظت ترکیبات فنولی را در بین روش‌های خشک کردن داشت. بنابراین به نظر می‌رسد هرچقدر غلظت ترکیبات فنولی بیشتر باشد افزودن پلی‌اتیلن گلیکول سبب افزایش بیشتری در تولید متان خواهد شد. کاهش بیشتر تولید گاز متان در برگ بلوط خشک شده با آون احتمالاً به دلیل بالاتر بودن میزان تانن متراکم آن می‌باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن پلی‌اتیلن گلیکول به محیط کشت حاوی برگ بلوط منجر به افزایش تولید متان شد ($P < 0.01$). تیمار حاوی برگ بلوط خشک شده به روش انجماد همراه پلی‌اتیلن گلیکول بیش‌ترین مقدار تولید گاز متان را داشت. بالاتر بودن تولید گاز متان با افزودن پلی‌اتیلن گلیکول احتمالاً به دلیل افزایش جمعیت پروتوزوای و کاهش اثرات ترکیبات فنولی (خصوصاً تانن متراکم) بر باکتری‌های تولیدکننده متان می‌باشد. پروتوزوا با فراهم کردن هیدروژن مورد نیاز باکتری‌های متانوژن شرایط مناسب را برای فعالیت آن‌ها ایجاد می‌کنند. بنابراین با استفاده از ترکیباتی مانند پلی‌اتیلن گلیکول که کاهنده اثرات ضد پروتوزوای تانن‌ها می‌باشند جمعیت پروتوزوا و در پی آن تولید متان افزایش می‌یابد (۵۳). مطالعات پیشین کاهش تولید متان با افزودن تانن‌ها و یا ترکیبات تانن‌دار را گزارش کرده‌اند (۲۰ و ۵۰). استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول جهت خنثی کردن تانن و اثرات سمی آن بسیار چالش برانگیز و قابل بحث می‌باشد، ممکن است کاهش اثرات سمی تانن‌های متراکم با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول مناسب نباشد چراکه باعث افزایش تولید گاز متان و کاهش بازده استفاده از انرژی می‌شود (۴). متانوژن‌ها در شرایط بی‌هوازی شکمبه با دی‌اکسید کربن و گاز هیدروژن محیط، گاز متان تولید می‌کنند (۱۸) که به کاهش گاز هیدروژن موجود در

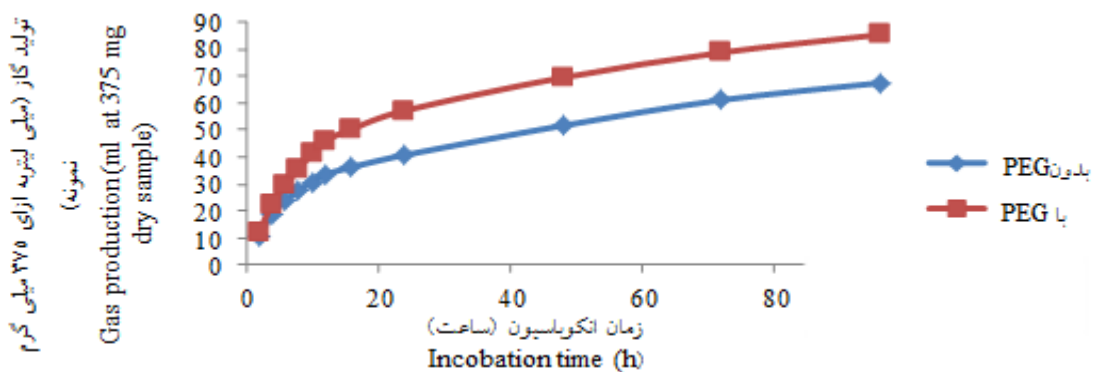
محیط شکمبه می‌انجامد. در صورتی که گاز هیدروژن در محیط شکمبه تجمع یابد واکنش اکسیداسیون و احیای نیکوتین آمید دی‌هیدروژناز مهار و سبب کند شدن واکنش‌های رشد میکروبی، هضم علوفه و در نهایت مهار تولید اسیدهای چرب فرار می‌گردد (۷). جمعیت پروتوزوای مژک‌دار از طریق تأمین هیدروژن برای باکتری‌های تولیدکننده متان در تولید متان نقش دارند (۳۷). پروتوزوای پلیپلاسترون، اپیدینیوم کوداتوم، ایزوتریشیا پروستوما و انتودینیوم کوداتوم نقش به‌سزایی در تولید متان دارند (۴۱ و ۳۷). همان طور که قبل بحث شد، با توجه به نتایج جدول ۲، پروتوزوای ایزوتریشیا پروستوما و ایزوتریشیا پروستوما در تیمار انجماد به همراه پلی‌اتیلن گلیکول به ترتیب ۳ و ۴ برابر بیش‌تر بود. مشابه با نتایج این آزمایش، صفائی و همکاران (۴۴) نیز افزایش تولید گاز متان را در اثر افزودن پلی‌اتیلن گلیکول به تفاله انگور گزارش کردند. بیوجمین و همکاران (۷) گزارش کردند استفاده از برگ درختان حاوی تانن متراکم، به مقدار ۱۸ گرم در کیلوگرم ماده خشک، در جیره گوساله‌های پرواری تأثیری بر تولید متان و قابلیت هضم ماده خشک ندارد. کمتر بودن تولید متان در برگ بلوط خشک شده با آون احتمالاً به خاطر بالاتر بودن میزان تانن متراکم آن می‌باشد. مطالعات نشان داده که تانن‌های متراکم به میزان بیشتری از تانن قابل هیدرولیز خاصیت ممانعتی از تولید متان دارند (۲۸ و ۴۹). همچنین هوریگوم و همکاران (۲۴) کاهش تولید متان در شرایط آزمایشگاهی و پاچالا (۴۱) در دام‌هایی که از علوفه‌های حاوی تانن متراکم تغذیه می‌کردند را گزارش کردند. سالاما و همکاران (۴۴) و چرچ (۱۳) نیز در تحقیقی تأکید کردند که تولید متان در شکمبه بر اثر فعالیت آرکیهای متانوژن صورت می‌گیرد و وجود تانن‌های متراکم در خوراک نشخوارکنندگان برای آرکیها سمی است و در نهایت باعث کاهش تولید متان می‌گردد. می‌توان درصد بالای تولید متان در تیمار انجماد را به میزان کم‌تر تانن متراکم آن نسبت داد.

غلظت تانن متراکم در برگ بلوط خشک شده با آون به‌طور معنی‌داری نسبت به برگ خشک شده با سایر روش‌های خشک کردن بالاتر بود (۱/۵ در مقابل ۱/۲ و ۱/۳ درصد ماده خشک). کمتر بودن تولید متان و بالاتر بودن جمعیت پروتوزوا در برگ بلوط خشک شده با آون نشان می‌دهد که احتمالاً اثر مستقیم برخی تانن‌ها بر متانوژن‌ها بیشتر از اثر غیر مستقیم آنها به‌واسطه تأثیر بر پروتوزوا می‌باشد.



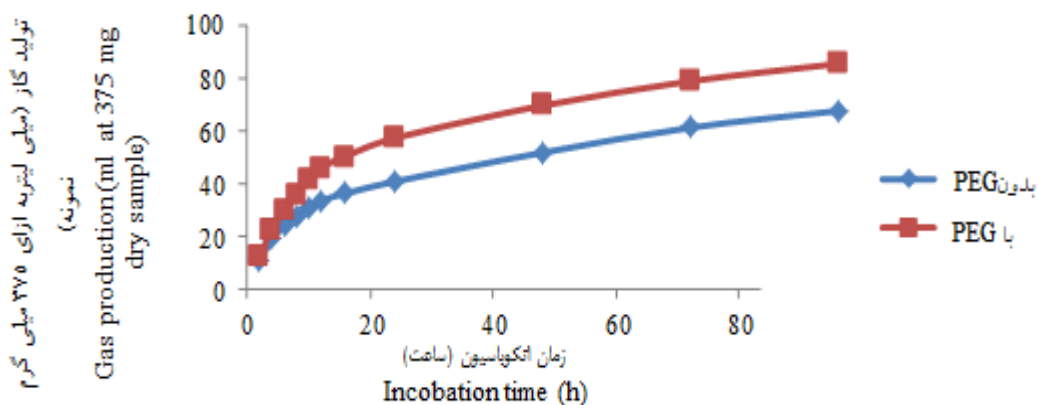
شکل ۱- گاز تولیدی (میلی لیتر) برگ بلوط خشک شده در آفتاب با و بدون پلی اتیلن گلیکول در زمان‌های مختلف انکوباسیون

Figure 1- Gas production (ml) of sun dried oak leave with and without PEG at different times of incubation



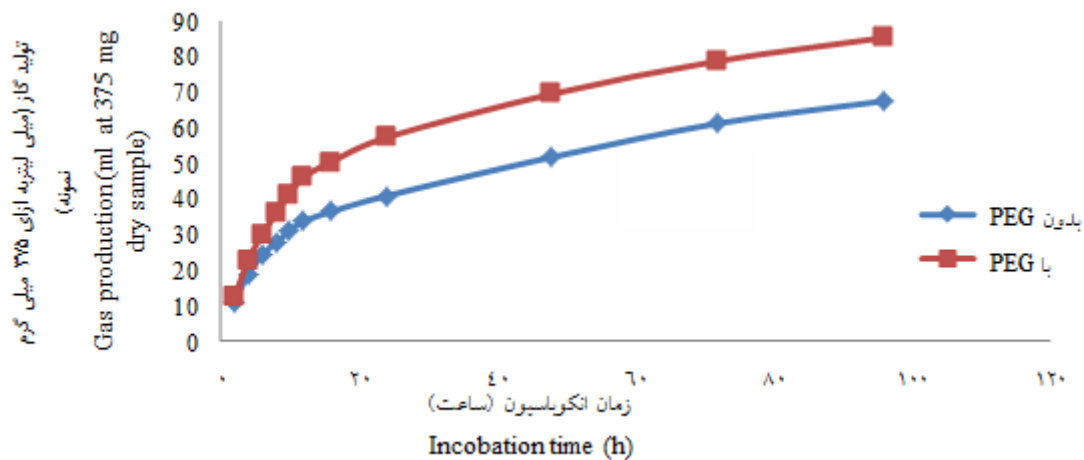
شکل ۲- گاز تولیدی (میلی لیتر) برگ بلوط خشک شده در سایه با و بدون پلی اتیلن گلیکول در زمان‌های مختلف انکوباسیون

Figure 2- Gas production (ml) of shadow dried oak leave with and without PEG at different times of incubation



شکل ۳- گاز تولیدی (میلی لیتر) برگ بلوط خشک شده در آون با و بدون پلی اتیلن گلیکول در زمان‌های مختلف انکوباسیون

Figure 3- Gas production (ml) of oven dried oak leave with and without PEG at different times of incubation



شکل ۴- گاز تولیدی (میلی‌لیتر) برگ بلوط خشک شده در فریزر با و بدون پلی‌اتیلن‌گلیکول در زمان‌های مختلف انکوباسیون

Figure 4- Gas production (ml) of freeze dried oak leaf with and without PEG at different times of incubation

بهتری می‌باشند. اما با توجه به تاثیر متفاوت این روش‌ها بر غلظت تانن متراکم باید اثر روش خشک کردن بر دیگر جنبه‌های تخمیر شکمبه‌ای نیز مورد مطالعه قرار گیرد. از طرفی بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه به نظر می‌رسد کاهش اثرات سمی تانن‌های متراکم با افزودن پلی‌اتیلن‌گلیکول روشی مناسب نباشد چون باعث افزایش تولید گاز متان می‌شود. همچنین نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کند که هر چقدر غلظت ترکیبات فنولی در ماده خوراکی بیشتر باشد میزان افزایش در تولید متان با افزودن پلی‌اتیلن‌گلیکول بیشتر خواهد بود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که روش خشک کردن بر غلظت ترکیبات فنولی برگ بلوط موثر است. در بین روش‌های مورد استفاده روش خشک کردن با انجماد و در سایه بیشترین غلظت ترکیبات فنولی را سبب شد. در حالی که روش خشک کردن در آفتاب و آون سبب کاهش تولید متان از تخمیر برگ بلوط نسبت به روش سایه و انجماد شد. بنابراین به نظر می‌رسد در انتخاب روش‌های خشک کردن مواد خوراکی حاوی ترکیبات فنولی استفاده از روش‌های خشک کردن مبتنی بر استفاده از حرارت ناشی از نور مستقیم آفتاب و یا آون از نظر زیست‌محیطی و بازده استفاده از انرژی در شکمبه روش‌های

منابع

- Abarghuei, M. J., Y. Rouzbehan, and D. Alipour. 2010. The influence of the grapepomace on the ruminal parameters of sheep. *Livestock Science*, 132(4):73-79.
- Animut, G., A. Goetsch, R. C. Estell, L. J. Merkel, T. Dawson, and R. Puchala. 2004. Effects of methods of exposure to Eastern red cedar foliage on cedar consumption by Boer crossbred wether goats, *Small Ruminant Research*, 54(2): 197-212.
- Antia, O., G. Vlasios, and G. Vassilis. 2013. Effect of Drying Method on the Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Spearmint. *Small Ruminant Research*, 31(3): 509-512.
- Anwar, F., U. Kalsoom, B. Sultana, M. Mushtaq, T. Mehmood, and H. A. Arshad. 2013. Effect of drying method and extraction solvent on the total phenolics and antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.) extracts. *International Food Research Journal*, 20(1): 653-659.
- Arhab, R., D. Macheboeuf, M. Aggoun, H. Bousseboua, D. Vialva, and J. M. Besle. 2009. Effect of polyethylene glycol on *in vitro* gas production and digestibility of tannin containing feedstuffs from North African Arid Zone. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(2): 475-478.
- Barry, T. N., and D. A. Forss, 1983. The condensed tannin content of vegetative *Lotus pedunculatus*, its regulation by fertiliser application, and effect upon protein solubility. *Journal of Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 34(3): 1047-1051.
- Beauchemin, K. A., S. M. McGinn, T. F. Martinez, and T. A. McAllister. 2007. Use of condensed tannin extract from *quebracho* trees to reduce methane emission from cattle. *Journal of Animal Science*, 85(2): 1900-1903.

33. Menke, K. H., and H. Steingass. 1988. Estimation of energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* production using rumen fluid. *Journal of Animal Research and Development*, 28(3): 7-10.
34. McSweeney, C. S., B. Palmer, D. M. McNeill, and D. O. Krause. 2001a. Microbial interactions with tanning polyphenolics: nutritional consequences for ruminants. *Journal of Animal Feed Science*, 91(3): 83-85.
35. Mueller-Harvey, I., and A. B. McAllan. 1992. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. I.A. Morrison, ed. *Advances in plant cell biochemistry and biotechnology*. JAI Press Ltd., London, UK, 1: 151-217.
36. Navas-Camacho, A., M. A. Laredo, A. Qaesta, H. J. Anzola, and C. Leon. 1993. Effect of supplementation with tree legume forage on rumen function livestock. *Livestock. Research Journal Development*, 5(2): 1-13.
37. Newbold, C. J., B. Lassalas, and J. P. Jouany. 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Letter Applied Microbial*, 21(4): 230-235.
38. Ogimato, K., and S. Imai. 1981. *Atlas of Rumen Microbiology*. Japan Scientific Societies Press: Tokyo Japan.
39. Orskov, E. R., and I. McDonald. 1997. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*, 92(1): 499-452.
40. Padmaja, G. 1989. Evaluation of techniques to reduce assayable tannin and cyanide in cassava leaves. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 37(2): 712-716.
41. Puchala, R., B. R. Min, A. L. Goetsch, and T. Sahl. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. 2005. *Journal of Animal Science*, 83(1):182-192.
42. Ranilla, M. J., J. P. Jouany, and D. P. Morgavi. 2007. Methane production and substrate degradation by rumen microbial communities containing single protozoal species *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology*, 45(2): 675-680.
43. Reay, D., P. Smith, and A. V. Amstel. 2010. *Methane and Climate Change: Ruminants*. First ed. TJ International: UK.
44. Safaei, A. R., N. M. Torabi nejad, H. Mansori, and S. Zerehdaran. 2015. Adding PEG on the methane gas production in the rumen, digestibility and metabolism energy of grape and lemon refuses. *Journal of Animal Production*, 9(1): 9-12.
45. Sallama, S. M. A. H., I. C. S. Buenob, P. B. Godoy, E. F. Nozella, D. M. S. S. Vittib, and A. L. Abdalla. 2010. Ruminal fermentation and tannins bioactivity if some browses using a semi-automated gas production technique. *Journal of Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12(3): 1-7.
46. SAS Institute. 2000. *SAS Use's Guide : Statistics Version 8.01 ed*. SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina.
47. Silankov, N., H. Tagari, and A. Shkolink. 1993. Comparison of rate of passage, fermentation rate and efficiency of digestion of highfiber diet in desert Bedouin goats as compared to Swiss Saanen goats. *Small Ruminant Research*, 12(1): 45-50.
48. Sliwinski, B. J., R. S. Carla, A. Machmuller, and M. Kreuzer, 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 101(2):101-114.
49. Tan, H. Y., C. C. Sieo, N. Abdullah, J. B. Liang, and X. D. Huang. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 169(3):185-193.
50. Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3-4): 185-197.
51. Van Acker, S. A. B. E., G. O. Plemper van Balen, D. J. Van den Berg, A. Bast, and W. J. F. van der Vijgh. 1998. Influence of iron chelation on the antipoxidant activity of flavanoids. *Biochemical Pharmacology*, 56(1): 935-938.
52. Wang, C. J., S. P. Wang, and H. Zhou. 2009. Influences of flavomycin, ropadiar and saponins on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 148(2): 157-166.
53. Williams, C. M., J. S. Eun, C. M. Dschaak, J. W. MacAdam, B. R. Min, and A. J. Young. 2010. Case study: *in vitro* ruminal fermentation characteristics of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) hay in continuous cultures. *Professional Animal Scientist*, 26(2): 570-575.
54. Yanez Ruiz, D. R., A. Moumen, A. I. Martin Garcia, and E. Molina Alaide. 2004. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two stage olive cake: effect of PEG supply. *Journal of Animal Science*, 82(4): 2023-2026.



Investigation the Effect of Different Drying Methods of *Q. persica* Oak Leaves and PEG Supplementation on Concentration of Phenolic Component, Protozoa Population, and Methane Production

Z. Gholami¹- F. fattahnia¹- H. Jahani-Azizabadi^{2*}- G, Taasoli¹

Received: 23-05-2017

Accepted: 23-12-2017

Introduction: Zagros forests that are classified as semi-arid forests, approximately includes around 40 percent of the Iran forests. Dominant tree species of Zagros forests is Oak trees. Oak leaves are an inexpensive and available feed source for ruminant, in particular in low forage seasons. The main problem for the use of Oak leaves and fruit are their phenolic compounds and its negative effects on animal performance at high concentration. The negative effects of high concentration of tannin and phenolic compounds on ruminant performance dependent on the kind and concentration of phenolic compounds, diet composition, and animal species. There are evidence that supplementation of polyethylene glycol (PEG) at high concentration of phenolic compounds resulted in a decrease of the negative effect of phenolic compounds. In contrast, low concentration of phenolic compounds resulted in an improvement in daily gain, milk production, ovulation rate and a decrease in methane and ammonia production. The objective of this study was to investigate the effect of different drying methods of oak leaves (*Q. persica*) on the concentration of phenolic components of dried leaves and PEG supplementation on in vitro protozoa population and total gas and methane production.

Materials and Methods: This experiment was conducted in a completely randomized design with a 4× 2 factorial arrangement of treatments to investigate the effects of dryings methods (sunshine, shadow, oven and freeze drying) on the concentration of phenolic compounds of Oak leaves and effects of PEG supplementation on in vitro ruminal microbial fermentation of dried Oak leaves. An *in vitro* gas production technique was used to measure the effects of drying methods and PEG supplementation on total gas and methane production and protozoa abundance with fermentation of Oak leaves. Rumen content was obtained from two fistulated sheep (39±4.5 kg body weight) before morning feeding. The ruminal content was immediately strained through four layers of cheesecloth. Animals were fed twice daily with a 50:50 alfalfa hay: concentrate diet that formulated for maintenance requirements. In the laboratory, under anaerobic conditions, 37.5 mL of buffered rumen fluid (ratio of rumen fluid to buffer was 1:2) was added into 120 mL bottles containing 0.375 g of ground Oak leaves with (0.75g) or without PEG (12 replicates for each treatment in two runs). The buffer was prepared as proposed by McDougall. Bottles were sealed and placed in shaking water bath for 96 h at 38.6°C. Headspace gas pressure was recorded using a pressure transducer at 2, 4, 6, 9, 12, 24, 48, 72 and 96 h of the incubation. Methane production and protozoa population were determined at 24 h of incubation. The concentration of phenolic compounds, condensed and hydrolysable tannins were determined.

Results and Discussion: Results of the present study showed that concentration of phenolic compounds, condensed and hydrolysable tannins affected by drying methods ($P<0.01$), but total tannins was not affected ($P>0.01$). In all experimental treatments, the protozoa population was increased by PEG supplementation ($P<0.01$). The highest and the lowest protozoa population were observed in freeze and oven drying methods, respectively ($P<0.05$). In all treatment (except for sunshine and oven drying) adding PEG resulted in a significantly increased ($P<0.01$) in the methane production after 24 h of incubation. It is notable that the highest and the lowest percentage of methane production were observed in freeze and oven dryings methods, respectively ($P<0.01$). The effect of drying method on the gas production was not significant ($P<0.05$) and the addition of PEG resulted to numerically increase in gas ($P>0.05$). Although, gas production at 24h of incubation not affected by treatments, but results of this experiment demonstrated an increase in 96h gas production with PEG supplementation.

1- Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

1- Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

2- Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

1- Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

(*- Corresponding author email: ho.jahani@uok.ac.ir)

Conclusion: The results of the present study demonstrated that the oven drying of oak leaves resulted in a further reduction in total phenolic compounds and hydrolysable tannins concentration and the most decrease in methane production due to microbial fermentation of oak leaves, relative to the control. In addition, it appears that PEG supplementation not recommendable method for decrease negative effects of tannins, because resulted in an increase in the methane production.

Keywords: Drying methods, Methane production, Oak leaves, Phenolic compound, Protozoa