نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد چهارم، شماره چهارم، ۱۳۹۵
http://ejrr.gau.ac.ir

تأثیر محصولات فرعی پسته بر فعالیت‌های آنزیمی شکمبه

حمید تقوی[۱]، *عباسعلی ناصریان[۲]، رضا ولی‌زاده[۲]، احمد آسوده[۳] و علیرضا حق‌پرست[۴]

[۱]دانشجوی دکتری و [۲]استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، [۳]استاد، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، [۴]دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: طبق آمار سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل (فائو) ایران بزرگترین تولیدکننده پسته (*Pistachio vera*) در جهان می‌باشد. با این حال وجود سطوح بالای ترکیبات فنلی و تانن در محصولات فرعی پسته، استفاده از آن‌ها در جیره حیوانات را محدود نموده است. تانن‌ها در ابتدا به عنوان ترکیبات ضدتغذیه‌ای مورد توجه قرار گرفتند امادر سال‌های اخیر به عنوان مواد گیاهی مفید جهت تنظیم تخمیر میکروبی معرفی شده‌اند که دارای اثراتی همچون کاهش تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه می‌باشند. با این وجود مکانیسم‌هایی که تانن‌ها به وسیله آن‌ها سبب کاهش تجزیه شکمبه‌ای اجزای مختلف مواد غذایی می‌گردند به طور کامل روشن نیست. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر محصولات فرعی پسته بر برخی از فعالیت‌های آنزیمی شکمبه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: آزمایش در ۳ بخش طراحی گردید. بخش اول با هدف بررسی اثر تانن محصولات فرعی پسته بر ممانعت از دسترسی میکروارگانیسم‌های شکمبه به سوبسترا انجام شد. در این بخش محصولات فرعی پسته با حرارت، رطوبت و پلی اتیلن گلایکول فرآوری شده تا تیمارهایی با میزان تانن متفاوت و ترکیبات شیمیایی یکسان حاصل گردد. سپس تیمارها به‌مدت ۱۲ ساعت در شکمبه کیسه‌گذاری شده و فعالیت‌های آنزیمی در میکروارگانیسم‌های متصل به ذرات غذایی تعیین گردید. بخش دوم آزمایش با هدف بررسی اثر تانن محصولات فرعی پسته بر فعالیت‌های آنزیمی بخش خارج سلولی (شیرابه شکمبه) انجام شد که عصاره آبی حاوی تانن

*مسئول مکاتبه: abasalin@yahoo.com

محصولات فرعی پسته در سه سطح به محیط کشت اضافه گردید و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد، فعالیت‌های آنزیمی در آن‌ها اندازه‌گیری شد. هدف از انجام بخش سوم، بررسی اثر تانن محصولات فرعی پسته بر فعالیت آنزیم‌های میکروبی مختلف در عصاره فاقد سلول شیرابه شکمبه (مهار نمودن یا افزایش فعالیت آنزیم) بود. در این مرحله پس از تهیه شیرابه شکمبه عاری از سلول، عصاره حاوی تانن محصولات فرعی پسته در سه سطح به محیط کشت اضافه گردید و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد، فعالیت‌های آنزیمی در آن‌ها اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بالاترین ضریب همبستگی منفی میان فعالیت‌های پروتئازی، کربوکسی متیل سلولازی و زایلانازی، با تانن متراکم و سپس تانن کل وجود داشت. این در حالی است که همبستگی مثبتی میان فعالیت آمیلازی و بخش‌های مختلف ترکیبات فنلی مشاهده شد. در بخش اول آزمایش با کاهش میزان تانن در تیمارهای آزمایشی، فعالیت‌های پروتئازی، کربوکسی متیل سلولازی و زایلانازی، هم در کل میکروارگانیسم‌های متصل به ذرات غذایی و هم در میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم به ذرات غذایی افزایش یافته اما فعالیت آمیلازی آن‌ها کاهش یافت. همچنین فعالیت‌های پروتئازی، زایلانازی و آمیلازی در میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم به ذرات غذایی پایین تر از میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم و ضعیف به ذرات غذایی بود. در بخش دوم آزمایش، با افزایش سطح عصاره، فعالیت های آنزیمی پروتئازی، آمیلازی، کربوکسی متیل سلولازی و زایلانازی به طور معنی‌داری کاهش یافت که نشان می‌دهد تانن محصولات فرعی پسته دارای اثرات منفی بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولازی در بخش خارج سلولی (شیرابه شکمبه) می‌باشند. در بخش سوم نیز با افزایش سطح عصاره، فعالیت‌های آنزیمی پروتئازی، آمیلازی، کربوکسی متیل سلولازی و زایلانازی به طور معنی داری کاهش یافت که نشان می‌دهد تانن‌های محصولات فرعی پسته دارای اثرات منفی مهارکنندگی آنزیم‌های هیدرولازی می‌باشند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که محصولات فرعی پسته احتمالاً به‌علت دارابودن تانن می‌توانند سبب محدودیت فعالیت‌های آنزیمی در نشخوارکنندگان شوند، که به نظر می‌رسد این عمل را از طریق کاهش دسترسی میکروارگانیسم‌ها به سوبسترا، اثر بر میکروارگانیسم‌ها و آزادسازی آنزیم‌ها و اثر بر ساختار آنزیم‌های خارج سلولی و مهار آن‌ها انجام می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: تانن، محصولات فرعی پسته، فعالیت آنزیمی، شکمبه

مقدمه

یکی از اهداف مهم میکروبیولوژیست‌های شکمبه، دستکاری اکوسیستم میکروبی شکمبه برای افزایش راندمان متابولیسم شکمبه می‌باشد. تعدادی از افزودنی‌های شیمیایی خوراک در تغذیه نشخوارکنندگان جهت بهبود رشد و بهبود راندمان مصرف خوراک معرفی شده‌اند. اما نگرانی از وجود باقی‌مانده‌های شیمیایی در محصولات حیوانی و افزایش مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک‌ها (۳) سبب تحقیق بر روی افزودنی‌های طبیعی سالم‌تر گردیده است. نشان داده شده است که گیاهان یا عصاره‌های گیاهی حاوی اسانس‌ها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها و تعدادی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی سبب بهبود متابولیسم شکمبه با هدف‌گذاری بر گروه‌های خاصی از جمعیت میکروبی می‌گردند (۳۱).

تانن‌ها پلیمرهای پلی‌فنولیک محلول در آب با وزن ملکولی بالا می‌باشند که با داشتن تعداد زیادی گروه‌های هیدروکسیل فنولی، ظرفیت تشکیل کمپلکس به‌ویژه با پروتئین‌ها و به مقدار کمتر با کربوهیدرات‌ها، یون‌های فلزی و آمینواسیدها را دارند (۱۸ و ۳۲). تانن‌ها در ابتدا به‌عنوان ترکیبات ضد تغذیه‌ای مورد توجه قرار گرفتند اما در سال‌های اخیر به‌عنوان مواد فعال شیمیایی گیاهی[1] مفید برای تنظیم تخمیر میکروبی معرفی شده‌اند که دارای اثراتی همچون کاهش تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه، جلوگیری از نفخ و ممانعت از فعالیت متانوژن‌ها می‌باشند. وجود تانن در جیره سبب بهبود وزن بدن، رشد پشم، عملکرد تولیدمثلی و عملکرد تولیدی می‌شود. با این وجود اثرات مفید تانن بر روی تنظیم شکمبه‌ای و عملکرد حیوانی به طور کامل شناسایی نشده است (۳۲).

مکانیسم‌هایی که تانن به وسیله آن‌ها سبب کاهش تجزیه شکمبه‌ای اجزای مختلف مواد غذایی می‌گردد به طور کامل روشن نیست. با این وجود مکانیسم‌های قابل قبول شامل ممانعت از دسترسی به سوبسترا، مهار آنزیمی و اثر مستقیم بر میکروارگانیسم‌های شکمبه می‌باشد (۲۲ و ۳۸). در خصوص اولین مکانیسم، محققین مختلفی گزارش کرده‌اند که تانن‌ها سبب جلوگیری و یا کاهش اتصال میکروارگانیسم‌های شکمبه به دیواره‌های سلولی اجزای خوراکی می‌شوند (۸). از طرف دیگر تشکیل کمپلکس‌های تانن‌ها با کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها، سبب کاهش دسترسی میکروارگانیسم‌ها به این مواد مغذی می‌شود (۲۶). همچنین تانن‌ها از عوامل ایجاد کلیت می‌باشند که می‌توانند دسترسی به

1- Phytochemical

یون‌های فلزی خاص مورد نیاز برای سوخت و ساز میکروارگانیسم‌های شکمبه را کاهش دهد (۳۸). در مورد مهار آنزیمی، تانن‌ها می‌توانند با آنزیم‌های میکروبی (هم باکتریایی و هم قارچی) واکنش داده و سبب ممانعت و یا کاهش فعالیت آن‌ها گردند (۱۹ و ۲۳).

استفاده از محصولات فرعی صنایع کشاورزی در تغذیه دام به علت کاهش هزینه تأمین مواد مغذی موردنیاز دام و در نتیجه جلوگیری از آلودگی محیط زیست حاصل از انباشت این پسماندها و عدم نیاز به فعالیت‌های پرهزینه از بین بردن پسماندهای صنایع تبدیلی کشاورزی حائز اهمیت است (۱۳، ۲۵). محصولات فرعی پسته یکی از محصولات جانبی مهم می‌باشد. طبق آمار سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل (فائو،۲۰۱۱) میزان تولید پسته در ایران بیش از ۴۰۰ هزار تن بوده است که حدود ۵۰ درصد پسته جهان را شامل می‌شود (۹). نسبت فرآورده‌های فرعی پسته به پسته خشک ۱/۲۵ تا ۲ برابر گزارش شده‌است (۳۹)؛ بنابراین میزان محصولات فرعی حاصل از برداشت پسته در ایران بیش از ۶۰۰ هزار تن تخمین زده می‌شود. این فراورده فرعی شامل پوسته نرم خارجی پسته[1]، ساقه خوشه[2]، برگ و مقادیر اندکی مغز و پوسته چوبی می‌باشد (۵). طبق آخرین گزارش موجود، این فراورده حاوی ۱۵/۸۲ درصد پروتئین خام، ۶/۹۵ درصد عصاره اتری ، ۲۵/۰۰ درصد دیواره سلولی[3] (NDF)، ۲۰/۷۵ درصد دیواره سلولی بدون همی‌سلولز[4] (ADF) و ۴/۵ درصد تانن در ماده خشک می‌باشد (۴). محصولات فرعی پسته به صورت خشک و سیلو شده برای استفاده در جیره نشخوارکنندگان مناسب هستند (۱۲ و ۴۰). لاباویچ و همکاران (۱۹۸۲) گزارش کردند محتوای تانن پوسته پسته ۵ تا ۷ برابر پوسته بادام است و این مسأله مصرف آن را درخوراک حیوانات با تردید مواجه می‌کند، زیرا ترکیبات فنولی موجود در آن می توانند بر فعالیت میکروب‌های شکمبه مؤثر باشند (۱۶).

اگرچه استفاده از محصولات فرعی پسته در بخش‌هایی از کشور آغاز شده‌است با این حال با توجه به وجود عوامل ضدتغذیه‌ای همانند انواع مختلف تانن، مصرف زیاد و طولانی مدت این محصول فرعی ممکن است محدودیت‌هایی داشته باشد. لذا هدف تحقیق حاضر بررسی اثر محصولات فرعی پسته بر برخی از فعالیت‌های آنزیمی شکمبه می‌باشد تا با شناسایی بیشتر اثرات محصولات فرعی پسته راه برای استفاده گسترده از این محصولات در تغذیه نشخوارکنندگان فرآهم گردد.

1- Peduncle
2- Hull
3- Neutral Detergent Fiber (NDF)
4- Acid Detergent Fiber (ADF)

مواد و روش‌ها

جهت بررسی مکانیسم‌های احتمالی تأثیر تانن‌های محصولات فرعی پسته بر فعالیت‌های آنزیمی شکمبه، آزمایشی در ۳ بخش در آزمایشگاه مرکزی گروه علوم دامی و گاوداری تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۴ انجام شد.

بخش اول- بررسی اثرات محصولات فرعی پسته بر فعالیت‌های آنزیمی میکروبی در میکروارگانیسم‌های متصل به ذرات غذایی (*In situ*): این بخش آزمایش با هدف بررسی اثر تانن محصولات فرعی پسته بر ممانعت از دسترسی میکروارگانیسم‌های شکمبه به سوبسترا انجام شد. در این بخش از یک رأس گاو هلشتاین دارای فیستولای شکمبه‌ای استفاده شد که برای رسیدن به شرایط یکسان و سازگاری از جیره متعادل مخلوط علوفه و کنسانتره فاقد تانن در تغذیه آن برای مدت ۲ هفته استفاده شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌های محصولات فرعی پوست پسته از ارقام مختلف (فندقی، کله قوچی، احمدآقایی و اکبری) و مناطق مختلف (شهرستان‌های رفسنجان، دامغان و نهبندان) و آنالیز شیمیایی میزان کل ترکیبات فنلی[1] (TF)، تانن کل[2] (TT) و تانن متراکم[3] (CT) موجود در آن‌ها، محصولات فرعی پسته فندقی رفسنجان که تقریباً بیشترین میزان ترکیبات فنلی، تانن کل و تانن متراکم را در میان سایر نمونه‌ها داشت و کیفیت محصول از نظر سایر ترکیبات شیمیایی و ظاهری ضمن فرآیند خشک شدن حفظ گردیده بود و همچنین فاقد هر گونه آلودگی خارجی و کپک زدگی بود برای انجام آزمایش انتخاب گردید.

برای دسترسی به تیمارهایی با ترکیب شیمیایی یکسان و فقط متفاوت از نظر میزان تانن موجود در آن‌ها، غیرفعال‌سازی تانن‌های محصولات فرعی پسته فندقی رفسنجان با ستفاده از پلی اتیلن گلایکول[4] (PEG) مدنظر قرار گرفت (۱۵). پس از بررسی فرآوری‌های مختلف، تیمارهای انتخاب شده عبارت بودند از: محصولات فرعی پسته فندقی رفسنجان (تیمار ۱)، محصولات فرعی پسته فندقی رفسنجان عمل آوری شده با حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت (تیمار ۲)، محصولات فرعی پسته فندقی رفسنجان مرطوب شده به میزان ۶۰ درصد و سپس عمل‌آوری شده با حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت (تیمار ۳) و محصولات فرعی پسته فندقی رفسنجان عمل‌آوری شده با ۳

1- Total Phenolics (TF)
2- Total Tannins (TT)
3- Condensed Tannins (CT)
4- Polyethylene Glycol (PEG)

درصد PEG (تیمار ۴) (برای اضافه نمودن PEG باید رطوبت محصولات ۶۰ درصد باشد، بنابراین PEG در آب موردنیاز برای رساندن رطوبت محصولات به ۶۰ درصد حل شده و به محصول اضافه گردید). لازم به ذکر است که در تمامی تیمارها، محصولات فرعی پسته قبل از فرآوری در زیر نور خورشید به‌طور کامل خشک و با اندازه قطعات ۱ میلی‌متر آسیاب شدند. پس از فرآوری، تیمارهای مذکور تا ثابت شدن وزن در آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد که بدین وسیله تغییرات در میزان تانن و فعالیت تانن به حداقل برسد (۱۷). میزان ماده خشک (روش ۹۳۴/۰۱)، خاکستر (روش ۹۴۲/۰۵) و کل نیتروژن (روش ۲۰۰۱/۱۱) تیمارها بر اساس AOAC (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد (۱). میزان پروتئین خام با ضرب مقدار کل نیتروژن در عدد ۶/۲۵ محاسبه شد. میزان ADF و NDF نیز بر اساس روش ون سوست و همکاران (۱۹۹۱) اندازه‌گیری شد (۴۲). به‌منظور اندازه‌گیری تانن، نمونه‌های خشک شده آسیاب و از توری‌های ۰/۵ میلی‌متری رد شدند. سنجش کل ترکیبات فنولی و کل تانن بر اساس روش ماکار (۲۰۰۰) انجام گرفت (۱۷) و تانن‌های متراکم به روش پورتر و همکاران (۱۹۸۶) اندازه‌گیری شد (۳۶). آنالیز ترکیبات شیمیایی و فنولی تیمارهای مورد بررسی در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی تیمارهای مورد استفاده جهت آزمایش بخش اول (درصدی از ماده خشک).

Table 1. Chemical composition of treatments used in the first part of the experiment (DM based %).

CT تانن متراکم	TT تانن کل	TF کل‌ترکیبات فنلی	ADF دیواره سلولی بدون همی سلولز	NDF دیواره سلولی	EE عصاره اتری	CP پروتئین خام	تیمار Treatment
0.83[a]	11.15[a]	14.67[a]	24.8	34.8	6.07	8.89	محصولات فرعی پسته (تیمار ۱) Pistachio by-products (PBs)
0.42[b]	8.17[b]	14.20[a]	20.8	35.4	7.89	9.42	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با حرارت (تیمار ۲) PBs treated with heat
0.33[bc]	7.40[bc]	12.17[b]	22.8	36.2	6.32	9.36	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با حرارت و رطوبت (تیمار ۳) PBs treated with heat and moisture
0.28[c]	6.86[c]	12.29[b]	23.8	37.2	6.37	8.78	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با PEG (تیمار ۴) PBs treated with PEG
0.024	0.216	0.336	1.092	1.212	0.571	0.227	اشتباه استاندارد (Standard error)
0.0016	0.0024	0.0268	0.2411	0.5970	0.2781	0.2917	سطح احتمال (P-Value)

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Different letters within each column show significant differences at 5% level.

در مرحله بعد ۵ گرم از هر تیمار در کیسه‌های نایلونی با اندازه ۹۰×۱۵۰ میلی‌متر و قطر منافذ ۳۵ میکرومتر ریخته شد. کیسه‌ها ۱۲ ساعت در شکمبه قرار داده شدند. ۳ تکرار برای هر نمونه وجود داشت و آزمایش دو مرتبه تکرار شد. پس از گذشت زمان مذکور کیسه‌های نایلونی از شکمبه خارج شده و محتویات آن‌ها به کیسه‌های دیگری منتقل و فشرده شده تا آب و مایعات آن‌ها به طور کامل خارج گردد. سپس ۲ گرم از مواد جامد آبگیری شده برداشته شده و ۶ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۵ مولار و pH=۷) به آن افزوده شد و مخلوط حاصل در دستگاه سونیکاتور در جریان ۶۰ میلی‌آمپر (به‌مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) سونیکیت شد. این عمل سبب انتقال محتویات میکروبی به محیط مایع شد. پس از سونیکیت نمودن، مخلوط حاصل در ۲۵۰۰۰g به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و قسمت رویی جهت آنالیزهای آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین برای بررسی اثرات تانن بر اتصال میکروارگانیسم‌های شکمبه به اجزای خوراکی از بافر مکدوگال[1] جهت تفکیک میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم و ضعیف به اجزای خوراکی موجود در کیسه‌ها استفاده شد (۱۹).

آنزیم‌های مورد بررسی عبارتند بودند از: کربوکسی متیل سلولازها[2] (CMCase)، پروتئازها، زایلانازها (همی سلولازها) و آمیلازها که فعالیت آن‌ها در آزمایشگاه سورن تک طوس مشهد (شهرک فناوری صنایع غذایی و بیوتکنولوژی شمال شرق کشور) اندازه‌گیری شد. فعالیت پروتئازی مطابق روش اصلاح شده فتحی نجفی و همکاران (۲۰۰۵) (۱۱)، فعالیت سلولازی و زایلانازی مطابق روش جامی‌الاحمدی و همکاران (۲۰۰۸) (۱۴) و فعالیت آمیلازی مطابق روش اصلاح شده فتحی نجفی و کمبهاوی (۲۰۰۵) (۱۰) اندازه‌گیری شد. روش اندازه‌گیری فعالیت پروتئازی، روش اسپکتروفتومتری بود که واکنش در مخلوطی شامل ۴۵۰ میکرولیتر کازئین ۱ درصد (وزنی/حجمی) با ۵۰ میکرولیتر تریس- اسیدکلریدریک[3] (pH=۸) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به‌دست آمده از مراحل مختلف آزمایش (نمونه‌های تحت آزمون که قبلاً به میزان کافی جهت ایجاد جذب مناسب در دستگاه اسپکتروفتومتر رقیق شده بودند) انجام شد. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت و سپس واکنش با افزودن ۷۵۰ میکرولیتر محلول تری کلرو استیک

1- McDougall'sbuffer
2- Carboxymethylcellulase (CMCase)
3- Tris-HCl

اسید[1] (TCA) (۵ درصد وزنی/ حجمی) متوقف شد. مخلوط واکنش پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ شد و سپس جذب محلول رویی در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. هر واحد فعالیت آنزیمی پروتئازی به صورت مقدار آنزیمی که در واحد زمان و حجم قادر است ۰/۰۰۱ واحد جذب نمونه در ۲۸۰ نانومتر را تغییر دهد تعریف شد (۱۱). فعالیت سلولازی و زایلانازی توسط اندازه‌گیری مقدار قند احیاء آزاد شده به ترتیب از پلیمرهای کربوکسی متیل‌سلولز (CMC) و زایلان تعیین شدند. عصاره آنزیمی به‌دست آمده از مراحل مختلف آزمایش (نمونه‌های تحت آزمون) با محلول سوبسترای واکنش (CMC، ۱ درصد وزنی/ حجمی و یا زایلان، ۱ درصد وزنی/حجمی؛ هر دو در ۱۰۰ میلی‌مول بافر سدیم فسفات، pH=۷/۵) مخلوط شده وبه مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۰/۶ میلی‌لیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید به مخلوط اضافه شده و مخلوط به‌مدت ۱۰ دقیقه جوشید. سپس اجازه داده شد تا مخلوط تا رسیدن به دمای محیط سرد شود. مقدار قندهای احیا آزاد شده بوسیله خواندن جذب در ۵۴۰ نانومتر تعیین شد. هر واحد فعالیت آنزیم برای سلولاز به صورت مقدار آنزیمی که قادر است در واحد زمان و حجم ۱ ماکرو مول گلوکز آزاد نماید، و در خصوص آنزیم زایلاناز به صورت مقدار آنزیمی که قادر است در واحد زمان و حجم ۱ ماکرو مول قند زایلوز آزاد نماید، تعریف شد (۱۴). سنجش فعالیت آمیلازی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه در یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش، شامل ۰/۹ میلی‌لیتر محلول یک درصد وزنی/حجمی نشاسته محلول در ۲۰ میلی‌مول بافر MES[2] (pH =۶/۵) و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به‌دست آمده از مراحل مختلف آزمایش (نمونه‌های تحت آزمون)، انجام شد (۱۰). مقدار قند احیاء آزاد شده از نشاسته توسط روش سوموگی (۱۹۴۵) در طول موج ۵۰۰ نانومتر با استفاده از گلوکز به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (۴۱). هر واحد فعالیت آنزیم به‌صورت مقدار آنزیم موردنیاز برای تولید ۱ میکرومول گلوکز در هر دقیقه در شرایط آزمایش تعریف شد (۱۰).

بخش دوم- بررسی اثرات محصولات فرعی پسته بر فعالیت‌های آنزیمی بخش خارج سلولی (*In vitro*)

این بخش از آزمایش با هدف بررسی اثر تانن محصولات فرعی پسته بر فعالیت‌های آنزیمی بخش خارج سلولی (شیرابه شکمبه) انجام شد که شامل مراحل زیر بود:

1- Trichloroacetic Acid (TCA)
2- Polylysine, 2-(*N*-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES buffer)

تهیه عصاره حاوی تانن محصولات فرعی پسته: برای تهیه عصاره حاوی تانن، محصولات فرعی پسته فندقی رفسنجان پس از خشک شدن در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد، با آب به نسبت ۱ به ۵ (وزنی/ حجمی) در ظروف پلاستیکی درب‌دار خیسانده شد. سپس درب ظروف بسته شده و به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. سپس محلول حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد و پس از تغلیظ شدن در شرایط خلا و سرما، محصول حاصل تا هنگام انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره‌شد. غلظت تانن کل در عصاره به‌دست آمده ۷۲/۲۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که در سه سطح برآورد شده برای ۲/۵، ۵ و ۷/۵ درصد جیره به ترتیب به میزان ۱/۷۵، ۳/۵ و ۵/۲۵ میلی‌لیتر (با سه تکرار) به سرنگ‌های آزمایشی منتقل گردیدند و به‌منظور ایجاد شرایط یکسان کشت در تیمارها، تفاوت حجم عصاره‌ها با افزودن آب مقطر تصحیح شد. سه تکرار نیز برای تیمار شاهد (۵/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر) در نظر گرفته شد. این آزمایش نیز دو بار تکرار شد.

تهیه شیرابه شکمبه: در این مرحله از دو راس گاو هلشتاین دارای فیستولای شکمبه‌ای استفاده شد که برای رسیدن به شرایط یکسان و عادت‌پذیری از جیره متعادل مخلوط علوفه و کنسانتره فاقد تانن در تغذیه آن‌ها برای مدت ۲ هفته استفاده شده بود. شیرابه شکمبه قبل از تغذیه صبحگاهی در فلاسک‌های مجزا جمع‌آوری شده و در شرایط بی هوازی نگهداری و به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه شیرابه شکمبه دو حیوان با نسبت مساوی با یکدیگر مخلوط شده و به‌عنوان محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی فعالیت آنزیمی: نمونه‌ای از خوراک مصرفی گاوهای دارای فیستولای شکمبه‌ای، پس از خشک شدن و آسیاب شدن با توری ۱ میلی‌متری به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم (۳۳)، و شیرابه شکمبه پس از آماده‌سازی به روش منک و استینگاس (۱۹۸۸) (۲۴) به میزان ۳۰ میلی‌لیتر در سرنگ‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف عصاره ریخته شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری گردید. پس از پایان انکوباسیون، محتویات هر سرنگ به بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل شده و با ۵ میلی‌لیتر کربن تترا کلرید و ۵ میلی‌لیتر محلول لیزوزیم (۰/۴ میلی گرم لیزوزیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH=۶/۸) به ازای هر ۳۰ میلی‌لیتر محتویات سرنگ‌ها مخلوط گردید. سپس بشرها دوباره به‌مدت ۳ ساعت در انکوباسیون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده

شدند و پس از آن در سونیکاتور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سونیکیت شدند. سرانجام نمونه‌های سونیکیت شده به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت g ۲۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و مایع شفاف رویی جهت آنالیز آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (۳۳). در این مرحله نیز فعالیت‌های آنزیمی کربوکسی متیل سلولازی، پروتئازی، زایلانازی و آمیلازی مورد بررسی قرار گرفت.

بخش سوم- بررسی اثرات محصولات فرعی پسته بر فعالیت آنزیم‌های مختلف در شیرابه فاقد سلول شکمبه

هدف از انجام این بخش، بررسی اثر تانن محصولات فرعی پسته بر فعالیت آنزیم‌های میکروبی مختلف در شیرابه فاقد سلول شکمبه (مهار نمودن یا افزایش فعالیت آنزیم) بود. در این مرحله از دو راس گاو هلشتاین دارای فیستولای شکمبه‌ای استفاده شد که برای رسیدن به شرایط یکسان و آداپتاسیون از جیره متعادل مخلوط علوفه و کنسانتره فاقد تانن در تغذیه آن‌ها به‌مدت ۲ هفته استفاده شد. شیرابه شکمبه قبل از تغذیه صبحگاهی در فلاسک‌های مجزا جمع‌آوری شده و تحت شرایط بی‌هوازی نگهداری و به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه شیرابه شکمبه دو حیوان با نسبت مساوی با یکدیگر مخلوط شد. جهت انجام آزمایش نیاز به تهیه شیرابه شکمبه عاری از سلول[1] بود که به روش ماکار (۱۹۸۱) تهیه شد (۲۰). پس از تهیه شیرابه عاری از سلول که حاوی مخلوطی از آنزیم‌های مختلف بود، عصاره حاوی تانن محصولات فرعی پسته که قبلاً تهیه و تغلیظ گردیده بود در سه سطح برآورد شده برای ۲/۵، ۵ و ۷/۵ درصد جیره به‌ترتیب به میزان ۱/۷۵، ۳/۵ و ۵/۲۵ میلی‌لیتر (با سه تکرار) به سرنگ‌های آزمایشی حاوی ۳۰ میلی‌لیتر عصاره عاری از سلول منتقل گردید و به منظور ایجاد شرایط یکسان کشت در تیمارها، تفاوت حجم عصاره‌ها با افزودن آب مقطر تصحیح شد. سه تکرار نیز برای تیمار شاهد (۵/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر) در نظرگرفته شد. سپس سرنگ‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند. سرانجام نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت g۲۷۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و مایع شفاف رویی جهت آنالیز آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایش دو بار تکرار شد. در این مرحله نیز فعالیت‌های آنزیمی کربوکسی متیل سلولازی، پروتئازی، زایلانازی و آمیلازی مورد بررسی قرار گرفت.

1- Cell free extract

در بخش اول آزمایش پس از اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی در میکروارگانیسم‌های متصل به ذرات غذایی، جهت تعیین اثر بخش‌های مختلف ترکیبات فنلی بر فعالیت‌های آنزیمی و تعیین مؤثرترین بخش، ضریب همبستگی (پیرسون) میان آن‌ها با استفاده از رویه CORR نرم‌افزار SAS ویرایش ۹/۱ مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های مربوط به هر بخش آزمایش نیز با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار مذکور و در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. در صورت معنی دار بودن اثر تیمار، از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار[1] (LSD) برای مقایسه میانگین تیمارها استفاده شد (۳۷). مدل آماری طرح کاملاً تصادفی به‌صورت زیر بود:

$$Yij = \mu + Ti + \varepsilon ij$$

که در این معادله: Yij= مشاهده عمومی؛ μ= میانگین کل؛ Ti= اثر تیمار و εij= خطای باقیمانده می‌باشد.

نتایج و بحث

جهت تعیین اثر بخش‌های مختلف ترکیبات فنلی بر فعالیت‌های آنزیمی، ضریب همبستگی میان آن‌ها در میکروارگانیسم‌های متصل به ذرات غذایی در جدول ۲ ارائه شده‌است. مشاهده می‌شود که بالاترین ضریب همبستگی منفی میان فعالیت پروتئازی، سلولازی و زایلانازی، با تانن متراکم و سپس تانن کل وجود دارد. این در حالی است که همبستگی مثبتی میان فعالیت آمیلازی و بخش‌های مختلف ترکیبات فنلی وجود دارد که بالاترین مقدار آن مربوط به تانن کل می‌باشد. با توجه به مطالعات محدود انجام شده در این زمینه، در بررسی منابع مختلف گزارشاتی مشابه جهت مقایسه نتایج به‌دست آمده با آن‌ها موجود نمی‌باشد و به‌نظر می‌رسد علت کاهش فعالیت آمیلازی با کاهش میزان تانن، این است که میکروارگانیسم‌ها به‌علت ارتباط و اتصال بهتر به ترکیبات نشاسته‌ای، در اولویت اول جهت تأمین انرژی و مواد مغذی موردنیاز این ترکیبات را مورد استفاده قرار می‌دهند که با کاهش میزان تانن مواد خوراکی، میزان دسترسی میکروارگانیسم‌ها به سایر مواد مغذی شامل پروتئین‌ها، سلولز و همی‌سلولز افزایش یافته و با تأمین بخشی از انرژی و مواد مغذی موردنیاز میکروارگانیسم‌ها از این طریق، سهم ترکیبات نشاسته‌ای در تأمین مواد مغذی موردنیاز میکروارگانیسم‌ها کاهش می‌یابد و لذا کاهشی در میزان فعالیت آمیلازی مشاهده می‌شود.

1- Least Significance Difference

جدول ۲- ضریب همبستگی پیرسون میان بخش‌های مختلف ترکیبات فنلی و فعالیت‌های آنزیمی.

Table 2. Pearson correlation coefficient between various portions of phenolic compounds and enzyme activities.

تانن متراکم Condensed tannins	تانن کل Total tannins	کل ترکیبات فنلی Total phenolic compounds	
-0.720 0.044	-0.707 0.050	*-0.642 0.086	فعالیت پروتئازی Protease activity
0.683 0.062	0.690 0.058	0.618 0.103	فعالیت آمیلازی Amylase activity
-0.344 0.404	-0.295 0.478	-0.064 0.881	فعالیت کربوکسی متیل سلولازی CMCase activity
-0.466 0.244	-0.432 0.285	0.047 0.912	فعالیت زایلانازی Xylanase activity

*در هر بخش عدد ردیف بالا بیانگر ضریب همبستگی و عدد پایین بیانگر سطح احتمال می‌باشد.

* In each square the upper number is correlation coefficient and the lower number is P-value.

میکروارگانیسم‌های چسبیده به ذرات غذایی، فعالترین بخش میکروارگانیسم‌های شکمبه‌اند که به طور عمده شامل باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشند (۷). نتایج بخش بررسی اثرات محصولات فرعی پسته بر تغییر فعالیت‌های آنزیمی میکروبی در میکروارگانیسم‌های متصل به ذرات غذایی در جداول ۳ تا ۶ ارائه شده‌است. همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود تیمارهای مورد استفاده در این مرحله از نظر ترکیبات شیمیایی شامل CP، ADF، NDF و EE مشابه بوده و تفاوت میان آن‌ها فقط از نظر میزان ترکیبات فنلی و تانن می‌باشد؛ بنابراین پس از کیسه‌گذاری در شکمبه تغییرات مشاهده شده میان آن‌ها فقط مربوط به اثرات ترکیبات فنلی و تانن موجود در آن‌ها بر فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه می‌باشد.

همان‌طور که در جداول ۳ تا ۶ مشاهده می‌شود با کاهش میزان تانن کل و تانن متراکم در تیمارهای آزمایشی، فعالیت‌های آنزیمی پروتئازی، کربوکسی متیل سلولازی (به جز در تیمار ۴) و زایلانازی، هم در کل میکروارگانیسم‌های متصل به ذرات غذایی (دارای اتصالات محکم و ضعیف) و هم در میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم به ذرات غذایی افزایش یافته اما فعالیت آمیلازی آن‌ها کاهش می‌یابد. بالاترین فعالیت پروتئازی در محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با حرارت و رطوبت، و کمترین آن در محصولات فرعی پسته بدون عمل‌آوری دیده می‌شود ($P<۰۰۰۱$). بالاترین

فعالیت کربوکسی متیل سلولازی در محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با حرارت، و حرارت و رطوبت، و کمترین آن در محصولات فرعی پسته بدون عمل‌آوری و عمل‌آوری شده با PEG دیده می‌شود (P<۰۰۰۱). بالاترین فعالیت زایلانازی در محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با حرارت، و کمترین آن در محصولات فرعی پسته بدون عمل‌آوری دیده می‌شود (P<۰۰۰۱). بالاترین فعالیت آمیلازی در محصولات فرعی پسته بدون عمل‌آوری و کمترین آن در محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با PEG دیده می‌شود (P<۰۰۰۱).

اطلاعات جداول ۳ تا ۶ همچنین نشان می‌دهد که فعالیت‌های آنزیمی پروتئازی، زایلانازی و آمیلازی در میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم به ذرات غذایی پایین‌تر از میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم و ضعیف به ذرات غذایی می‌باشد اما تفاوتی در فعالیت آنزیمی کربوکسی متیل سلولازی (به جز در تیمار محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با PEG) میان این دو دسته از میکروارگانیسم‌ها مشاهده نمی‌شود؛ که بیان می‌کند احتمالاً تانن‌های محصولات فرعی پسته در اتصال میکروارگانیسم‌های دارای فعالیت عمده پرتئولایتیک، همی‌سلولایتیک و آمیلولایتیک به ذرات غذایی اختلال وارد می‌کند اما اثر معنی‌داری بر اتصال میکروارگانیسم‌های دارای فعالیت عمده سلولایتیک به ذرات غذایی ندارد. دلیلی که می‌توان برای آن ذکر نمود این است که سلولز دارای پیوندهای قوی گلوکوزیدازی در ساختار خود می‌باشد که برای تجزیه آن می‌بایست ابتدا میکروارگانیسم‌ها به‌طور محکم به ذرات غذایی متصل شده تا شکستن پیوندها انجام گیرد و بنابراین اتصالات ضعیف تأثیری زیادی بر هضم سلولز ندارد. علاوه بر این، تفاوت‌های مشاهده شده میان محدودیت‌های آنزیمی ممکن است به دلیل ویژگی‌های ذاتی آنزیم‌ها باشد؛ مثلاً تفاوت در ترکیب اسید آمینه‌ای یا تفاوت در ساختار دوم و سوم و یا درجه گلیکوزیلاسیون‌آن‌ها (۲). باراهونا و همکاران (۲۰۰۶) نیز گزارش نمودند تانن‌ها فعالیت زایلانازی را بیشتر از فعالیت سلولازی کاهش می‌دهند که دلیل آن را این چنین بیان نمودند که آنزیم‌های بتا-دی-گلوکوزیداز[1] و بتا-دی-گزیلوزیداز[2] نسبت به حضور تانن‌ها حساسیت کمتری دارند و فعالیت آن‌ها کمتر تحت تأثیر قرار می‌گیرد و بنابراین در حضور تانن، فعالیت سلولازی کاهش کمتری را نسبت به فعالیت زایلانازی نشان می‌دهد (۲). انساهلای و همکاران (۲۰۱۱) بیان نمودند که باکتری‌های فیبرولایتیک جهت فعالیت معمولاً به سوبسترا متصل می‌شوند که در حضور تانن ممکن است برخی

1- β -D-glucosidases
2- β-D-xylosidases

فرآیندهای اتصال میکروبی به‌علت اثر متقابل ترکیبات پروتئینی با تانن مختل شده که در نتیجه سبب تاخیر اتصال میکروارگانیسم‌ها به ذرات غذایی شود (۲۸). به هرحال به دنبال اتصال موفق، دامنه فعالیت میکروارگانیسم‌ها به نزدیک فیبر کشیده می‌شود که در نهایت هیدرولیز می‌شوند؛ ممکن است این مکانیسم اتصال، شانس اثر متقابل میان تانن‌های متراکم آزاد در محلول و آنزیم‌های فیبرولایتیک خارج سلولی را در محل هضم کاهش دهد (۲۸). به هر حال مانند سایر مطالعات انجام شده، ممکن است آنزیم‌های مورد بررسی از نظر میزان پرولین (توالی‌های غنی از پرولین) و ساختار دوم و سوم با یکدیگر متفاوت باشند که شاید توجیه کننده تفاوت پاسخ آن‌ها به تانن باشد (۲۱).

جدول ۳- فعالیت آنزیمی پروتئازی در میکروارگانیسم‌های متصل به ذرات غذایی پس از ۱۲ ساعت کیسه‌گذاری در شکمبه.

Table 3. Protease enzyme activity in the micro-organisms that are bound to the solid matrix after incubation in the rumen for 12 h.

P-Value	Standard error	میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم tightly bound micro-organisms	میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم+ضعیف loosely plus tightly bound micro-organisms	تیمار Treatment
<0.0001	0.009	2.08 B^{d}	2.92 A^{d}	محصولات فرعی پسته Pistachio by-products (PBs)
<0.0001	0.008	7.51 B^{b}	12.38 A^{c}	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با حرارت PBs treated with heat
<0.0001	0.016	10.22 B^{a}	19.06 A^{a}	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با حرارت و رطوبت PBs treated with heat and moisture
<0.0001	0.035	6.23 B^{c}	13.50 A^{b}	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با PEG PBs treated with PEG
		0.219	0.028	اشتباه استاندارد (Standard error)
		<0.0001	<0.0001	سطح احتمال (P-Value)

فعالیت آنزیمی بر حسب واحد فعالیت آنزیم در میلی‌گرم ماده خشک محلول در ۴ ساعت می‌باشد. حروف غیر مشابه در هر ستون (a-d) و هر ردیف (A و B) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Enzyme activity is defined as the unit of enzyme activity per mg dry matter of solution after 4h. Different letters within each column (a-d) and each row (A & B) show significant differences at 5% level.

جدول ۴- فعالیت آنزیمی کربوکسی متیل سلولازی در میکروارگانیسم‌های متصل به ذرات غذایی پس از ۱۲ ساعت کیسه‌گذاری در شکمبه.

Table 4. CMCase enzyme activity in the micro-organisms that are bound to the solid matrix after incubation in the rumen for 12 h.

P-Value	Standard error	میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم tightly bound micro-organisms	میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم+ضعیف loosely plus tightly bound micro-organisms	تیمار Treatment
0.3436	0.077	1.61[b]	1.72[b]	محصولات فرعی پسته Pistachio by-products (PBs)
0.7099	0.110	3.71[a]	3.77[a]	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با حرارت PBs treated with heat
0.7716	0.118	3.66[a]	3.71[a]	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با حرارت و رطوبت PBs treated with heat and moisture
0.0284	0.056	1.33 B[b]	1.54 A[b]	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با PEG PBs treated with PEG
		0.094	0.088	اشتباه استاندارد (Standard error)
		<0.0001	<0.0001	سطح احتمال (P-Value)

فعالیت آنزیمی بر حسب واحد فعالیت آنزیم در میلی‌گرم ماده خشک محلول در ۴ ساعت می‌باشد. حروف غیر مشابه در هر ستون (a و b) و هر ردیف (A و B) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Enzyme activity is defined as the unit of enzyme activity per mg dry matter of solution after 4h. Different letters within each column (a & b) and each row (A & B) show significant differences at 5% level.

نتایج این بخش با نتایج به‌دست آمده توسط ماکار و همکاران (۱۹۸۸) مطابقت دارد (۱۹). آن‌ها جهت تعیین اثرات تانن‌های بلوط (*Quercus incana*) بر فعالیت‌های آنزیمی مختلف شکمبه، برگ‌های *Q. incana* با میزان تانن ۴۱ گرم در کیلوگرم ماده خشک را با برگ‌های *Celtis australis* که از نظر ترکیب شیمیایی مشابه برگ‌های *Q. incana* و فقط فاقد تانن بودند در کیسه‌های نایلونی در شکمبه کیسه‌گذاری نمودند و بیان نمودند تفاوت مشاهده شده میان فعالیت‌های آنزیمی در برگ‌های این دو گیاه مربوط به اثرات تانن‌های بلوط می‌باشد.

جدول ۵- فعالیت آنزیمی زایلانازی در میکروارگانیسم‌های متصل به ذرات غذایی پس از ۱۲ ساعت کیسه‌گذاری در شکمبه.

Table 5. Xylanase enzyme activity in the micro-organisms that are bound to the solid matrix after incubation in the rumen for 12 h.

P-Value	Standard error	میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم tightly bound micro-organisms	میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم+ضعیف loosely plus tightly bound micro-organisms	تیمار Treatment
0.0006	0.012	0.12 B^{c}	0.21 A^{c}	محصولات فرعی پسته Pistachio by-products (PBs)
<0.0001	0.054	1.37 B^{a}	2.02 A^{a}	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با حرارت PBs treated with heat
<0.0001	0.030	0.49 B^{b}	0.92 A^{b}	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با حرارت و رطوبت PsB treated with heat and moisture
<0.0001	0.032	0.43 B^{b}	1.00 A^{b}	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با PEG PBs treated with PEG
		0.026	0.041	اشتباه استاندارد (Standard error)
		<0.0001	<0.0001	سطح احتمال (P-Value)

فعالیت آنزیمی بر حسب واحد فعالیت آنزیم در میلی‌گرم ماده خشک محلول در ۱ ساعت می‌باشد. حروف غیر مشابه در هر ستون (a-c) و هر ردیف (A و B) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Enzyme activity is defined as the unit of enzyme activity per mg dry matter of solution after 1h. Different letters within each column (a-c) and each row (A & B) show significant differences at 5% level.

جدول ۶- فعالیت آنزیمی آمیلازی در میکروارگانیسم‌های متصل به ذرات غذایی پس از ۱۲ ساعت کیسه‌گذاری در شکمبه.

Table 6. Amylase enzyme activity in the micro-organisms that are bound to the solid matrix after incubation in the rumen for 12 h.

P-Value	Standard error	میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم tightly bound micro-organisms	میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم+ضعیف loosely plus tightly bound micro-organisms	تیمار Treatment
<0.0001	1.048	57.38 B^{a}	69.37 A^{a}	محصولات فرعی پسته Pistachio by-products (PBs)
<0.0001	0.943	35.91 B^{b}	64.23 A^{b}	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با حرارت PBs treated with heat
<0.0001	1.030	38.25 B^{c}	50.93 A^{b}	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با حرارت و رطوبت PBs treated with heat and moisture
<0.0001	1.287	32.25 B^{d}	47.07 A^{c}	محصولات فرعی پسته عمل‌آوری شده با PEG PBs treated with PEG
		1.169	0.948	اشتباه استاندارد (Standard error)
		<0.0001	<0.0001	سطح احتمال (P-Value)

فعالیت آنزیمی بر حسب واحد فعالیت آنزیم در میلی‌گرم ماده خشک محلول در ۱ ساعت می‌باشد. حروف غیر مشابه در هر ستون (a-d) و هر ردیف (A و B) نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Enzyme activity is defined as the unit of enzyme activity per mg dry matter of solution after 1h. Different letters within each column (a-d) and each row (A & B) show significant differences at 5% level.

در این تحقیق فعالیت کربوکسی متیل سلولاز و اوره‌آز به‌طور معنی‌داری (به‌ترتیب P<۰/۰۵ و P<۰/۰۰۵) در میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم به ذرات غذایی در برگ‌های *Q. incana* نسبت به برگ‌های *C. australis* پایین‌تر بود ولی در این آنزیم‌ها تفاوت میان فعالیت‌های آنزیمی در میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم، و میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم و ضعیف به ذرات غذایی معنی‌دار نبود. فعالیت پروتئازی به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) در هر دو گروه میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم و میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم و ضعیف به ذرات غذایی در برگ‌های *Q. incana* نسبت به برگ‌های *C. australis* پایین‌تر بود (۱۹). ماکار و

همکاران (۱۹۸۸) برای تأیید نتایج به‌دست آمده، آزمایشی مشابه با کیسه‌گذاری برگ‌های *Q. incana* و بامبو (*Dedrocalamus hamiltonii*) انجام دادند. میزان تانن *D. hamiltonii* (۵/۶ گرم در کیلوگرم ماده خشک) اندکی بیشتر از *C. australis* ولی کمتر از *Q. incana* بود. در این آزمایش نیز فعالیت کربوکسی متیل سلولاز و اوره‌آز به طور معنی‌داری (به‌ترتیب P<۰/۰۵ و P<۰/۰۰۵) در میکروارگانیسم‌های دارای اتصالات محکم به ذرات غذایی در برگ‌های *Q. incana* نسبت به برگ‌های *D. hamiltonii* پایین‌تر بود (۱۹). باراهونا و همکاران (۲۰۰۶) در آزمایشی اثر تانن‌های متراکم چسبیده به ذرات غذایی و تانن‌های مستقیم اضافه شده به محیط کشت بر فعالیت آنزیمی را مورد بررسی قرار دادند و به‌این نتیجه دست یافتند که تانن‌های متراکم چسبیده به ذرات غذایی نسبت به تانن‌های مستقیم اضافه شده به محیط کشت در ممانعت از فعالیت فیبرولایتیکی اثر بیشتری داشتند (۲).

نتایج بخش بررسی اثرات عصاره محصولات فرعی پسته بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولازی در بخش خارج سلولی (شیرابه شکمبه) در جدول ۷ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد با افزایش سطح عصاره، فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز، کربوکسی متیل سلولاز و زایلاناز به‌طور معنی‌داری (P<۰۰۰۱) کاهش می‌یابد که نشان می‌دهد به‌طور کلی تانن‌های محصولات فرعی پسته دارای اثرات منفی بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولازی در بخش خارج سلولی (شیرابه شکمبه) می‌باشند. این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط اوزکوز و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد (۳۰). آن‌ها اثرات اسید تانیک (نوعی تانن قابل هیدرولیز) را بر رشد و فعالیت‌های آنزیمی فیبرولایتیک در ۵ سویه باکتری بی‌هوازی *Ruminococcus albus* SY3، *Fibrobacter succinogenes* S85، *Streptococcus bovis* ES1، *Prevotella bryantii* B14 و *Butyrivibrio fibrisolvens* JW11 در محیط کشت مورد بررسی قرار دادند که نتایج تحقیق نشان داد با افزایش غلظت اسید تانیک در محیط کشت (درصد ۰/۳۰-۰/۰۵) فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز در تمام سویه‌ها کاهش یافت و یک روند پاسخ کاهشی را با افزایش غلظت تانن نشان داد (P<۰/۰۵). در این تحقیق فعالیت زایلاناز نیز در تمامی غلظت‌های اسید تانیک در تمامی سویه‌ها به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) پایین از شاهد بود. در غلظت‌های پایین اسید تانیک، مقدار اسید تانیک موردنیاز برای کاهش فعالیت زایلاناز تقریباً نصف مقدار اسید تانیک موردنیاز برای کاهش فعالیت کربوکسی متیل سلولاز بود که پیشنهاد می‌کند در این سویه‌ها آنزیم زایلاناز در مقایسه با آنزیم کربوکسی متیل سلولاز نسبت به حضور تانن‌ها حساسیت

بیشتری دارد (۳۰). پاترا و همکاران (۲۰۱۰) نیز اثر افزودن عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی گیاهی (در سه سطح ۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌لیتر) به محیط کشت بر فعالیت‌های آنزیمی را مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند افزودن عصاره حاوی تانن غنچه‌های گل میخک (*S. aromaticum*) به محیط کشت سبب کاهش فعالیت ویژه کربوکسی متیل سلولاز، زایلاناز و استیل استراز (P<۰/۰۵) و همچنین سبب کاهش جمعیت باکتری‌های سلولایتیک شکمبه می‌گردد (۳۴). باراهونا و همکاران (۲۰۰۶) اثر افزودن غلظت‌های مختلف (۰، ۱۲/۵، ۲۵، ۳۷/۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تانن متراکم لگوم‌های گرمسیری به محیط کشت حاوی مخلوط آنزیمی استخراج شده از قارچ شکمبه‌ای *Neocallimastyx hurleyesis* را مورد بررسی قراردادند و گزارش نمودند در تمامی غلظت‌ها، تانن‌های متراکم لگوم‌های گرمسیری فعالیت کربوکسی متیل سلولاز و زایلاناز را محدود کردند و پاسخ مقداری در ارتباط با غلظت تانن نشان دادند (P<۰/۰۵) (۲). اما پاترا و همکاران (۲۰۰۶) گزارش نمودند در گاومیش افزودن عصاره‌های گیاهی حاوی تانن (در سه سطح ۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌لیتر) به محیط کشت، تأثیر معنی داری بر فعالیت ویژه کربوکسی متیل سلولاز و زایلاناز نداشت (P<۰/۰۵) که بیان نمودند این نتیجه ممکن است به‌علت تفاوت در نوع و سطوح تانن موجود در این گیاهان باشد، اما در این مطالعه فعالیت استیل استراز نیز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵) (۳۳). علت اثر متفاوت عصاره‌های گیاهی بر فعالیت آنزیم استیل استراز نسبت به سایر آنزیم‌ها، ممکن است به این علت باشد که این آنزیم به‌طور عمده دارای منشا قارچی می‌باشد (۶).

نتایج بخش بررسی اثرات عصاره محصولات فرعی پسته بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولازی در عصاره فاقد سلول شیرابه شکمبه در جداول ۸ ارائه شده‌است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد با افزایش سطح عصاره، فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز، کربوکسی متیل سلولاز و زایلاناز به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد که نشان می‌دهد تانن محصولات فرعی پسته دارای اثرات منفی مهارکنندگی آنزیم‌های هیدرولازی می‌باشند. این نتایج مشابه نتایج به‌دست آمده توسط ماکار و همکاران (۱۹۸۸) می‌باشد (۱۹). آن‌ها در آزمایشی اثرات افزودن عصاره‌های حاوی تانن برگ‌های بلوط (*Q. incana*) را بر فعالیت‌های آنزیمی در عصاره فاقد سلول شیرابه شکمبه مورد مطالعه قرار دادند و کاهش شدید در فعالیت آنزیم‌های شکمبه‌ای اوره آز، کربوکسی متیل سلولاز، پروتئاز، گلوتامات دهیدروژناز و آلانین آمینو ترانسفراز را با افزایش مقدار عصاره گزارش نمودند. آن‌ها پیشنهاد کردند که تغییر در شکل آنزیم

در حضور تانن‌ها می‌تواند دلیلی بر ممانعت از فعالیت آنزیم باشد که این امر سبب کاهش یـا افـزایش توانایی اتصال سوبسترا به نواحی فعال آنزیم می‌گردد (۱۹).

جدول ۷- اثرات سطوح مختلف عصاره محصولات فرعی پسته بر فعالیـت‌هـای آنزیمـی در بخـش خـارج سـلولی (شیرابه شکمبه).

Table 7. Effects of various levels of PBs extract on the extracellular enzyme activities (rumen liquor).

سطح احتمال P-Value	اشتباه استاندارد Standard error	سطح عصاره levels of extract ۵/۲۵ میلی‌لیتر 5.25ml	۳/۵ میلی‌لیتر 3.5ml	۱/۷۵ میلی‌لیتر 1.75ml	۰ میلی‌لیتر 0ml	آنزیم Enzyme
<0.0001	0.409	2.50^{d}	6.22^{c}	8.32^{b}	24.35^{a}	پروتئاز[۱] Protease[1]
<0.0001	10.359	420.04^{d}	559.12^{c}	743.39^{b}	953.19^{a}	آمیلاز[۲] Amylase[2]
<0.0001	0.6358	9.30^{d}	18.27^{c}	30.75^{b}	49.78^{a}	کربوکسی متیل سلولاز[۱] CMCase[1]
<0.0001	0.284	1.20^{d}	6.50^{c}	8.32^{b}	22.59^{a}	زایلاناز[۲] Xylanase[2]

۱- فعالیت آنزیم بر حسب واحد فعالیت آنزیم در میلی‌گرم پروتئین محلول در ۴ ساعت می‌باشد.؛ ۲- فعالیت آنزیم بر حسب واحد فعالیت آنزیم در میلی‌گرم پروتئین محلول در ۱ ساعت می‌باشد. حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

1- Enzyme activity is defined as the unit of enzyme activity per mg protein of solution after 4h., 2- Enzyme activity is defined as the unit of enzyme activity per mg protein of solution after 1h. Different letters within each row show significant differences at 5% level.

آن‌ها همچنین بیان نمودند که در شرایط برون‌تنی، یافته‌های مرتبط با اثرات عصاره حاوی تانن بر روی آنزیم‌های شکمبه‌ای مختلف مشابه نتایج آزمایشگاهی می‌باشد (۱۹). زیدی- یاهیااوی و همکاران (۲۰۰۸) نیز اثر غلظت‌های متفاوت (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) اسیدهای فنولیک شامل اسید گالیک و اسید تانیک را بر فعالیت‌های آنزیمی پروتئازی و پکتات لیازی باکتری *Pectobacterium chrysanhemi* در محیط کشت آگار مورد بررسی قرار دادند که نتایج به‌دست آمده نشان داد با افزایش غلظت اسیدهای فنولیک، هر دو دسته فعالیت‌های آنزیمی پروتئازی و پکتات لیازی کاهش می‌یابد که اثرات اسیدتانیک بر مهار آنزیمی شدیدتر از اسید گالیک می‌باشد (۴۳).

بالاترین پتانسیل ضدمیکروبی و کاهش فعالیت‌های آنزیمی با اسید تانیک در غلظت µg/ml ۲۰۰ مشاهده شد. آن‌ها علت این کاهش فعالیت آنزیمی را باندشدن ترکیبات فنلی با نواحی فعال آنزیم ذکر نمودند که با غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها یا رسوب پروتئین‌های آنزیمی سبب ممانعت از اتصال آنزیم به سوبسترا می‌گردد (۴۳). انساهلای و همکاران (۲۰۱۱) نیز اثرات برگ و غلاف درختان آکاسیا از دو سویه *Acacia sieberiana* و *Acacia nilotica* را که به‌ترتیب دارای ۵۲/۷، ۱۰۴/۹، ۵ و ۶۸/۷ گرم تانن متراکم در کیلوگرم ماده خشک بودند در حضور PEG (۳۵ mg/g) بر فعالیت آنزیمی میکروبی در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار دادند و بیان نمودند افزودن PEG با خنثی‌سازی اثر تانن سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، زایلاناز، اندو و اگزو سلولاز گردید که نشان می‌دهد که تانن‌ها قابلیت هضم خوراک را تاحدی به وسیله مهار فعالیت این آنزیم‌ها کاهش می‌دهند (۲۸). انساهلای و همکاران (۲۰۱۱) در نهایت بیان نمودند که اثرات منفی تانن‌ها بر هضم خوراک، فقط به‌علت اثر متقابل تانن با ماکرومولکول‌های خوراک نیست، بلکه انعکاس اثر متقابل آن‌ها بر آنزیم‌های پروتئولایتیک و فیبرولایتیک نیز می‌باشد (۲۸). نگوا و همکاران (۲۰۰۳) نیز اثرات منفی تانن‌های غلاف درختان آکاسیا از دو سویه *Acacia sieberiana* و *Acacia nilotica* بر فعالیت پروتئازی را گزارش نمودند (۲۷). پول و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که مونومرهای فنولیک مانند کاتکول فعالیت کربوکسی متیل سلولاز، زایلاناز، بتا-گلوکوزیداز و استیل استراز را مهار کرد (۳۵). اسکالبرت (۱۹۹۱) بیان نمود در میان بسیاری از فاکتورهای مؤثر بر تجزیه فیبر در شکمبه، وجود تانن‌ها در علوفه‌ها می‌توانند سبب مهار مستقیم آنزیم‌های خارج سلولی میکروبی شوند (۳۸). اما در تحقیقات بررسی کننده پروتئولیز آلبومین سرم گاوی توسط تریپسین بیان شده است که اسید تانیک، مانع از دسترسی تریپسین به سوبسترا می‌شود نسبت به این‌که مستقیم بر روی آنزیم اثر بگذارد (۲۹).

جدول ۸- اثرات سطوح مختلف عصاره محصولات فرعی پسته بر فعالیت‌های آنزیمی در عصاره فاقد سلول شیرابه شکمبه.

Table 8. Effects of various levels of PBs extract on enzyme activities in cell-free extract of rumen liquor.

آنزیم Enzyme	سطح عصاره levels of extract				اشتباه استاندارد Standard error	سطح احتمال P-Value
	۰ میلی‌لیتر 0ml	۱/۷۵ میلی‌لیتر 1.75ml	۳/۵ میلی‌لیتر 3.5ml	۵/۲۵ میلی‌لیتر 5.25ml		
پروتئاز[۱] Protease[1]	3.30[a]	0	0	0	0.052	<0.0001
آمیلاز[۲] Amylase[2]	231.23[a]	211.13[b]	205.30[b]	200.66[b]	5.499	0.0047
کربوکسی متیل سلولاز[۲] CMCase[2]	3.10[a]	0.56[b]	0.38[c]	0.25[d]	0.038	<0.0001
زایلاناز[۲] Xylanase[2]	3.38[a]	0.69[b]	0.44[c]	0.30[d]	0.037	<0.0001

۱- فعالیت آنزیم بر حسب واحد فعالیت آنزیم در میلی‌گرم پروتئین محلول در ۴ ساعت می‌باشد.؛ ۲- فعالیت آنزیم بر حسب واحد فعالیت آنزیم در میلی‌گرم پروتئین محلول در ۱ ساعت می‌باشد. حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

1- Enzyme activity is defined as the unit of enzyme activity per mg protein of solution after 4h., 2- Enzyme activity is defined as the unit of enzyme activity per mg protein of solution after 1h. Different letters within each row show significant differences at 5% level.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که محصولات فرعی پسته احتمالاً به‌علت دارا بودن تانن می‌توانند سبب محدودیت فعالیت‌های آنزیمی فیبرولایتیک و پروتئولایتیک در نشخوارکنندگان شوند، که به‌نظر می‌رسد این عمل را از طریق کاهش دسترسی میکروارگانیسم‌ها به سوبسترا (نتایج بخش اول آزمایش)، اثر بر میکروارگانیسم‌ها و آزادسازی آنزیم‌ها (نتایج بخش دوم آزمایش) و اثر بر ساختار آنزیم‌های خارج سلولی و مهار آن‌ها (نتایج بخش سوم آزمایش) انجام می‌دهند. اگرچه برای شناسایی دقیق‌تر مکانیسم مهارکنندگی تانن‌های محصولات فرعی پسته، می‌بایست مطالعات بیشتری در زمینه تشخیص نوع تانن‌های محصولات فرعی پسته، ساختار آن‌ها، وضعیت اتصال میکروارگانیسم‌ها به

ذرات غذایی و نوع پیوندها و ساختار آنزیم‌های هیدرولازی انجام پذیرد. به هرحال این مدل نمی‌تواند اثرات پس شکمبه‌ای مواد غنی از تانن یا تانن زدا شده را برآورد نماید.

منابع

1. AOAC. 2005. Official Methods of Analysis, (18th ED). Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland, USA, Pp: 2087-2417.
2. Barahona, R., Sanchez, S., Lascano, C.E., Owen, E., Morris, P., and Theodorou, M. K. 2006. Effect of condensed tannins from tropical legumes on the activity of fibrolytic enzymes from the rumen fungus *Neocallimastyx hurleyensis*. Enzyme and Microbial Technology. 39: 2.281–288.
3. Barton, M.D. 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. Nutrition Research Reviews. 13: 2.279-299.
4. Behgar, M., Valizadeh, R., Mirzaee, M., Naserian, A.A., and Nasiri, M.R. 2009. Correlation between the physical and chemical properties of some forages and non forage fiber source. J. Animal and Veterinary Advances. 8: 11.2280–2285.
5. Bohluli, A., Naserian, A.A., Valizadeh, R., and Shahroodi, F.E. 2007. The chemical composition and in vitro digestibility of pistachio by-product. 'In Proceedings of British Society of Animal Science'(BSAS), Scarborough, UK, 224p.
6. Borneman, W.S., Hartley, R.D., Morrison, W.H., Akin, D.E., and Ljungdahl, L.G. 1990. Feruloyl and *p*-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. Applied Microbiology and Biotechnology. 33: 3.345–351.
7. Chen, X.L., Wang, J.K., Wu, Y.M., and Liu, J.X. 2008. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal microbes *in vitro*.J. Anim Feed Sci. and Tech. 141: 1.1–14.
8. Chiquette, J., Cheng, K.J., Costerton, J.W., and Milligan, L.P. 1988. Effect of tannins on the digestibility of two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) using in vitro and in sacco techniques. Canadian J. Anim. Sci. 68: 3.751-760.
9. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2011. Website: http://www.faostat.fao.org.
10. Fathi Najafi, M., and Kembhavi, A. 2005. One step purification and characterization of an extracellular α-amylase from marine *Vibrio* sp. Enzyme and Microbial Technology. 36: 4.535–539.
11. Fathi Najafi, M., Deobagkar, Di., and Deobagkar, De. 2005. Potential application of protease isolated from Pseudomonas aeruginosa PD100. Electronic Journal of Biotechnology. 8: 2.full5.

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.J. Anim Pro. Scie. 52: 1052-1057.
13. Grasser, L.A., Garneit, J., and Depeters, E.J. 1995. Quantity and Economic Importance of Nine Selected By-products Used in California Dairy Rations. J. Dairy Sci. 78: 4.962-971.
14. Jami alahmadi, K., Tabatabaei Yazdi, M., and Fathi Najafi, M. 2008. Isolation and characterization of a chitionolytic enzyme producing microorganism, *paenibacillus chitinolyticus* JK2 from Iran. Research Journal of Microbiology. 3: 6.395-404.
15. Jones, W.T., and Mangan, J.L. 1977. Complexes of condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis vicifolia* Scop) with fraction-1 leaf protein and with sub maxillary mucoprotein and their reversal by polyethylene glycol and pH. J. Sci. Food and Agri. 28: 2.126–136.
16. Labavitch, J.M., Heintz, C.M., Rae, H.L., and Kader, A.A. 1982. Physiological and compositional changes associated with maturation of 'Kerman' pistachio. J. American Society for Horticultural Science. 107: 4.688-692.
17. Makkar, H.P.S. 2000. Quantification of Tannins in Tree Foliage. A Laboratory Manual for the FAO/IAEA Co-ordinated Research Project on Use of Nuclear and Related techiquea to Develop Simple Tannin Assays for Predicting and Improving the safety and Efficiency of Feeding Ruminants on Tanniniferous Tree Foliage. Joint FAO/IAEA, FAO/IAEA of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Animal Production and Health Subprogram, FAO/IAEA Working Document. IAEA, Vienna, Austria.
18. Makkar, H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small Ruminant Research. 49: 3. 241–256.
19. Makkar, H.P.S., Singh, B., and Dawra, R.K. 1988. Effect of tannin-rich leaves of oak *(Quercus incana)* on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. British Journal of Nutrition. 60: 2.287-296.
20. Makkar, H.P.S., Sharma, 0.P., Pal, R.N., and Negi, S.S. 1981. *In vitro* inhibition of rumen urease by melon (*Cucumis melo*) seed urease Inhibitor. J. Dairy Sci. 63: 5.785-788.
21. McAllister, T.A, Bae, H.D., Yanke, L.J., Cheng, K.J., and Muir, A. 1994. Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminant fungi. Canadian Journal of Microbiology. 40: 4.298–305.
22. McMahon, L.R., McAllister, T.A., Berg, B.P., Majak, W., Acharya, S.N., Popp, J.D., Coulman, B.E., Wang, Y., and Cheng, K.J. 2000. A review of the effects

of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. Canadian Journal of Plant Science. 80: 3.469-485.
23. McSweeney, C.S., Palmer, B., Bunch, R., and Krause, D.O. 2001. Effect of tropical forage Callindra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. J. Applied Microbiology. 90: 1.78–88.
24. Menke, K.H., and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained by chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Animal research and development. 28: 7–55.
25. Mowrey, A., and Spain, J.N. 1999. Results of a nationwide survey to determine feedstuffs fed to lactating dairy cows. J. Dairy Science. 82: 2.445-451.
26. Mueller-Harvey, I., and McAllan, A.B. 1992. Tannins. Their biochemistry and nutritional properties. P 151-217, In: I.M. Morrison (ed), Advances in plant cell biochemistry and biotechnology, Vol. 1. JAI Press Ltd., London, UK.
27. Ngwa, A.T., Nsahlai, I.V., and Iji, P.A. 2003. Effect of feeding pods or alfalfa in combination with poor quality grass straw on microbial enzyme activity and production of VFA in the rumen of South African Merino sheep. Small Ruminant Research. 48: 2.83-94.
28. Nsahlai, I.V., Fon, F.N., and Basha, N.A.D. 2011. The effect of tannin with and without polyethylene glycol on *in vitro* gas production and microbial enzyme activity. South African. J. Anim Sci. 41: 4.337-344.
29. Osawa, T., Lilley, T.H., and Haslam, E. 1987. Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit.J. Phytochemistry. 26: 2937–42.
30. Ozkose, E., Kuloğlu, R., Comlekcioglu, U., Kar, B., Akyol, I., and Ekinci, M.S. 2011. Effects of tannic acid on the fibrolytic enzyme activity and survival of some ruminal bacteria. International. J. Agricultural and Biological. 13: 3.386–390.
31. Patra, A.K., and Saxena, J. 2009. Dietary phytochemicals as rumenmodifiers: a review of the effects on microbial populations. Anton van Leeuwen. 96: 4.363–375.
32. Patra, A.K., and Saxena, J. 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. J. Sci. of Food and Agri. 91: 1.24–37.
33. Patra, A.K., Kamra, D.N., and Agarwal, N. 2006. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. Animl Feed Sci. and Tech. 128: 276–291.
34. Patra, A.K., Kamra, D.N., and Agarwal, N. 2010. Effects of extracts of spices on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds *in vitro*. J. Sci. of Food and Agri. 90: 511–520.
35. Paul, S.S., Kamra, D.N., Sastry, V.R.B., Sahu, N.P., and Kumar, A. 2003. Effect of phenolic monomers on biomass and hydrolytic enzyme activities of an

anaerobic fungus isolated from wild nil gai *Baselophus tragocamelus*. Letters in Applied Microbiology. 36: 377–381.
36. Porter, L.J., Hrstich, L.N., and Chan, B.G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. Phytochemistry. 25: 1.223–230.
37. SAS Institute Inc. 2001. SAS/STAT User's Guide: Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
38. Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins.J. Phytochemistry. 30: 12.3875-3883.
39. Seyd momen, S.M. 2003. The effects of residual levels of pistachio peeling and its tannin on body growth and hair production in Rayini goats. Animal Science Master's thesis. Islamic Azad University of Karaj. (In Persian).
40. Shakeri, P., Riasi, A., Alikhani, M., Fazaeli, H., and Ghorbani, G.R. 2013. Effects of feeding pistachio byproducts silage on growth performance, serum metabolites and urine characteristics in Holstein male calves. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 97: 6.1022-1029.
41. Somogy, M. 1945. Determination of blood sugar. J. Biol. Chem. 160: 69–73.
42. Van Soest, P.J., Robertson, J.B., and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 10.3583–3597.
43. Zaidi–Yahiaoui, R., Zaidi, F., and Ait Bessai, A. 2008. Influence of gallic and tannic acids on enzymatic activity and growth of *Pectobacterium chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi* bv. *chrysanthemi*). African. J. Biotechnology. 7: 4.482-486.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 4(4), 2016
http://ejrr.gau.ac.ir

Effects of pistachio by-products on rumen enzyme activities

H. Taghavi[1], *A.A. Naserian[2], R. Valizadeh[2], A. Asoodeh[3] and A.R. Haghparast[4]

[1]Ph.D. Student, [2]Professor, Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, [3]Professor, Dept. of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, [4]Associate Prof., Dept. of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Received: 09/04/2016; Accepted: 11/15/2016

Abstract

Background and Objectives: According to the Food and Agriculture Organization (FAO) Iran is the largest pistachio (*Pistachio vera*) producer in the world. Nevertheless, pistachio by-products (PBs) contain a high level of phenolic compounds and tannins, which can affect their utilization by animals. Tannins were primarily considered as anti-nutritional biochemical, however, in recent years, they have been recognized as useful phytochemicals for modulating rumen that they have different effects such as reducing protein degradation in the rumen. The mechanisms by which tannins reduce ruminal degradation of different dietary components are not entirely clear. The present study was conducted to evaluate the effects of PBs tannins on hydrolytic enzyme activities in ruminants.

Materials and Methods: An experiment was designed in three parts. The first was carried out to examine the effects of PBs tannins on attachment of rumen microorganisms to the substrate. PBs was processed with heat, moisture and poly ethylene glycol to create treatments with different tannin content and similar chemical composition. The treatments were incubated in nylon bags in the rumen for 12 hours and enzyme activities were determined in microbes attached to solid matrix. The second part was carried out to evaluate the effects of PBs tannins on the extracellular enzyme activities (rumen liquor). The PBs aqueous extract containing tannins were added to the culture medium and after 24 hours of incubation at 39 °C, enzyme activities were determined. The aim of the third part was to investigate the effects of PBs tannins on enzyme activities in cell-free

*Corresponding author; abasalin@yahoo.com

extract of rumen liquor (inhibit or enhance the enzyme activities). At this part, after preparation ruminally cell-free extract, the PBs aqueous extract containings tannins were added to the culture medium, and after 24 hours of incubation at 39 °C, enzyme activities were determined.

Results: The highest negative correlations there was between the activity of protease, carboxymethylcellulase (CMCase) and xylanase, with condensed tannins and then total tannins. While there was a positive correlation between amylase activity and various portions of phenolic compounds. In the first part of the experiment, the activities of protease, CMCase and xylanase were increased with decrease the quantity of tannins in treatments, for both micro-organisms that are tightly bound to the washed solid matrix and the fraction containing loosely plus tightly bound micro-organisms, but amylase activity were decreased for two compartments. Moreover the activities of protease, xylanase and amylase were lower in micro-organisms that are tightly bound to the washed solid matrix than the fraction containing loosely plus tightly bound micro-organisms. In the second part of the experiment, the activities of protease, amylase, CMCase and xylanase significantly decreased with increasing the levels of extract, which indicates PBs tannins have negative effects on extracellular enzyme activities (rumen liquor). In the third part by increasing levels of extract the activities of protease, amylase, CMCase and xylanase significantly decreased, which indicates PBs tannins have inhibition effects on hydrolytic enzymes.

Conclusion: Results of this study showed that PBs tannins can restrict proteolytic and fibrolytic enzyme activities in ruminants, which probably do it by reducing the access of microorganisms to substrate, effects on micro-organisms and release enzymes, and effects on the structure of extracellular enzymes and inhibit them.

Keywords: Tannin, Pistachio by-products, Enzyme activity, Rumen