

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Tina KOS

**VPLIV TANINOV NA TVORBO KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH
KISLIN IN METANA PRI *IN VITRO* FERMENTACIJI V VAMPNEM
SOKU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF TANNINS ON VOLATILE FATTY ACIDS AND
METHANE PRODUCTION IN *IN VITRO* FERMENTATION IN
RUMEN FLUID**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstva – zootehniko. Kemijske analize so bile opravljene na Katedri za prehrano in Katedri za mikrobiologijo in mikrobnou biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Andreja Lavrenčiča in za somentorico asist. dr. Alenko Levart.

Recenzent: prof. dr. Janez Salobir

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jurij POHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Andrej LAVRENČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: asist. dr. Alenka LEVART
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Janez SALOBIR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Tina KOS

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 636.084/.087(043.2)=163.6
KG	prehrana živali/tanin/ <i>in vitro</i> fermentacija/hlapne maščobne kisline/ocetna kislina/propionska kislina/maslena kislina/metan/vamp
KK	AGRIS L51
AV	KOS, Tina
SA	LAVRENČIČ, Andrej (mentor)/LEVART, Alenka (somentorica)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2007
IN	VPLIV TANINOV NA TVORBO KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN IN METANA PRI <i>IN VITRO</i> FERMENTACIJI V VAMPNEM SOKU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 66 str., 16 pregl., 8 sl., 72 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V nalogi smo želeli ugotoviti kako dodatek taninskih izvlečkov vpliva na tvorbo kratkoverižnih maščobnih kislin (HMK) in metana pri <i>in vitro</i> fermentaciji v vamnem soku. HMK in metan smo po <i>in vitro</i> fermentaciji celuloze in škroba določili s plinsko kromatografijo. Uporabili smo tri taninske izvlečke (F75, QUE in TAK) v različnih koncentracijah (0 (kontrola), 0,33, 0,67 in 1,33 mg/ml medija). Producijo HMK in metana smo izmerili po 24. in 48. urah <i>in vitro</i> fermentacije. Nastanek ocetne kisline je najbolj zavrl dodatek QUE celulozi (od 10,5 na 3,6 mmol/g SS), nastanek propionske kisline pa dodatka F75 in TAK celulozi (od 5,7 na 1,2 mmol/g SS). Najmanj maslene kisline je nastalo ob dodatku F75 in TAK celulozi in škrobu (0,5 mmol/g SS). Skupno je najmanj HMK nastalo pri fermentaciji celuloze ob dodatku F75 (od 4,5 do 5,4 mmol/g SS). Najširše razmerje med ocetno in propionsko kislino smo zabeležili ob dodatku TAK in QUE celulozi (4,1 : 1). Na produkcijo metana sta najbolj zaviralno delovala dodatka F75 in TAK celulozi (0,3 ml/g SS) ter TAK dodana škrobu (10,6 ml/g SS). Najožje razmerje med produkcijo metana in skupnimi HMK smo zabeležili ob dodatku F75 in TAK celulozi (0,1 : 1) ter pri dodatku F75 škrobu (1,0 : 1). Dodatek taninov substratu je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal nastanek HMK in metana, najbolj zaviralno pa je delovala največja koncentracija vseh taninskih izvlečkov (1,33 mg/ml medija).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 636.084/.087(043.2)=163.6
CX animal nutrition/tannin/*in vitro* fermentation/volatile fatty acids/acetic acid/propionic acid/butyric acid/methane/rumen
CC AGRIS L51
AU KOS, Tina
AA LAVRENČIČ, Andrej (supervisor)/LEVART, Alenka (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department
PY 2007
TI INFLUENCE OF TANNINS ON VOLATILE FATTY ACIDS AND METHANE PRODUCTION IN *IN VITRO* FERMENTATION IN RUMEN FLUID
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 66 p., 16 tab., 8 fig., 72 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of our study was to ascertain how tannins influence the volatile fatty acids (VFA) and methane production in *in vitro* fermentation in rumen fluid. The concentration of VFA and methane produced in *in vitro* fermentation of cellulose and starch was determined using gas chromatography. Three tannin extracts (F75, QUE and TAK) in different concentrations (0 (control), 0.33, 0.67, 1.33 mg/ml medium) were used in the study. The production of VFA and methane was measured after 24 and 48 hours of *in vitro* fermentation. The addition of QUE to cellulose highly influenced the production of acetic acid (from 10.5 to 3.6 mmol/g DM) and the addition of F75 and TAK to cellulose the production of propionic acid (from 5.7 to 1.2 mmol/g DM). The lowest concentration of butyric acid was produced when F75 and TAK were added to cellulose and starch (0.5 mmol/g DM). The lowest concentration of total VFA was produced in *in vitro* fermentation of cellulose with added F75 (from 5.4 to 4.5 mmol/g DM). The widest ratio of acetic and propionic acid was determined with added TAK and QUE to cellulose (4.1 : 1). The addition of F75 and TAK to cellulose (0.3 ml/g DM) and TAK to starch (10.6 mmol/g DM) had a significant effect on reduced methane production. The lowest rate between methane production and total VFA concentration was obtained if F75 and TAK were added to cellulose (0.1 : 1) and F75 was added to starch (1.0 : 1). The addition of tannins to the substrate statistically significantly ($p < 0.05$) reduced the production of VFA and methane. The production was greatly reduced by the addition of tannin extracts in the highest concentration (1.33 mg/ml medium).

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VRSTE TANINOV	3
2.1.1 Hidrolizirajoči tanini	3
2.1.2 Kondenzirani tanini	4
2.2 DELOVANJE TANINOV	5
2.2.1 Vezava taninov z beljakovinami in pomen teh kompleksov v prehrani prežvekovalcev	7
2.2.2 Vezava taninov z ogljikovimi hidrati, rudninskimi snovmi in vitaminimi	8
2.2.3 Vpliv taninov na vampne mikroorganizme	10
2.3 KRATKOVERIŽNE MAŠČOBNE KISLINE	10
2.3.1 Ocetna kislina	12
2.3.2 Propionska kislina	12
2.3.3 Maslena kislina	13
2.3.4 Vplivi na tvorbo hlapnih maščobnih kislin	13
2.4 METAN	14
2.4.1 Lastnosti metana	14
2.4.2 Metanogeneza	14
2.4.3 Metanogeni mikroorganizmi	16
2.4.4 Učinek metana na okolje	18

3	MATERIAL IN METODE	20
3.1	SUBSTRAT	20
3.2	TANINSKI IZVLEČKI	20
3.2.1	Kostanjev izvleček	21
3.2.2	Taninska kislina	21
3.2.3	Quebracho izvleček	22
3.3	<i>IN VITRO</i> FERMENTACIJA SUBSTRATOV	21
3.4	ANALIZA KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN	25
3.4.1	Priprava etrskih ekstraktov	25
3.4.2	Analitska oprema in pogoji analize	26
3.5	ANALIZA METANA	27
3.5.1	Priprava vzorcev za določanje produkcije plina in metana	27
3.5.2	Analitska oprema in pogoji analize	27
3.5.3	Določanje produkcije metana s plinsko kromatografijo	28
3.6	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	28
3.6.1	Statistični model	28
4	REZULTATI	30
4.1	ANALIZA VARIANCE	30
4.2	VPLIV SUBSTRATA	32
4.3	VPLIV VRSTE IN KONCENTRACIJE TANINSKEGA IZVLEČKA	34
4.3.1	Fermentacija celuloze v 24. urah <i>in vitro</i> inkubacije v vampnem soku	34
4.3.2	Fermentacija škroba v 24. urah <i>in vitro</i> inkubacije v vampnem soku	38
4.3.3	Fermentacija celuloze v 48. urah <i>in vitro</i> inkubacije v vampnem soku	41
4.3.4	Fermentacija škroba v 48. urah <i>in vitro</i> inkubacije v vampnem soku	46
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	50
5.1	RAZPRAVA	50

5.2	SKLEPI	54
6	POVZETEK	55
7	VIRI	58
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Fizikalne in kemiske lastnosti metana (Budavari in sod., 1989)	14
Preglednica 2: Klasifikacija metanogenih mikroorganizmov (Madigan in sod., 2003)	17
Preglednica 3: Fizikalne lastnosti škroba in celuloze	20
Preglednica 4: Sestava preparatov taninskih izvlečkov (Vegetabil, 2000)	20
Preglednica 5: Sestava raztopin A, B in C	23
Preglednica 6: Sestava redukcijske raztopine in pufra	23
Preglednica 7: Količina preparatov taninskih izvlečkov, substrata in medija	24
Preglednica 8: Sestava delovne standardne raztopine	25
Preglednica 9: Kromatografski pogoji in pretoki plinov za določanje hlapnih maščobnih kislin (HMK)	26
Preglednica 10: Kromatografski pogoji in sestava kalibracijske mešanice za določanje metana	28
Preglednica 11: Analiza variance za posamezne vplive in njihove interakcije po 24. urah <i>in vitro</i> fermentacije	30
Preglednica 12: Analiza variance za posamezne vplive in njihove interakcije po 48. urah <i>in vitro</i> fermentacije	31
Preglednica 13: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK), metana in razmerji med C ₂ in C ₃ ter prostornino metana in vsoto HMK po 24. urah <i>in vitro</i> fermentacije celuloze ob dodatku različnih taninskih izvlečkov	36
Preglednica 14: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK), metana in razmerji med C ₂ in C ₃ ter prostornino metana in vsoto HMK po 24. urah <i>in vitro</i> fermentacije škroba ob dodatku različnih taninskih izvlečkov	40
Preglednica 15: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK), metana in razmerji med C ₂ in C ₃ ter prostornino metana in vsoto HMK po 48. urah <i>in vitro</i> fermentacije celuloze ob dodatku različnih taninskih izvlečkov	44
Preglednica 16: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK), metana in razmerji med C ₂ in C ₃ ter prostornino metana in vsoto HMK po 48. urah <i>in vitro</i> fermentacije škroba ob dodatku različnih taninskih izvlečkov	48

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Kemijska struktura taninske kisline (Chung in sod., 1998b)	3
Slika 2: Kemijska struktura kondenziranega tanina (McSweeney in sod., 2001)	4
Slika 3: Nastanek hlapnih maščobnih kislin z mikrobnim razgradnjo ogljikovih hidratov (prirejeno po Žgajnar, 1990)	11
Slika 4: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 24. in 48. urah <i>in vitro</i> fermentacije celuloze in škroba	32
Slika 5: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 24. urah <i>in vitro</i> fermentacije celuloze	34
Slika 6: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 24. urah <i>in vitro</i> fermentacije škroba	38
Slika 7: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 48. urah <i>in vitro</i> fermentacije celuloze	42
Slika 8: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 48. urah <i>in vitro</i> fermentacije škroba	46

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vpliv vrste taninskega izvlečka po 24. in 48. urah *in vitro* fermentacije celuloze in škroba

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

F75	farmatan 75
QUE	quebracho taninski izvleček
TAK	taninska kislina
CT	kondenzirani tanini
HMK	hlapne (kratkoverižne) maščobne kisline
C2	ocetna kislina
C3	propionska kislina
C4	maslena kislina
CH ₄	metan
CO ₂	ogljikov dioksid
H ₂	vodik
SS	suha snov
mg	miligram
g	gram
ml	mililiter
l	liter
°C	stopinje Celzija
vol %	volumski delež

1 UVOD

Ljudje rastline povezujemo z naravo, z zelenim okoljem, s hrano, ki jo zauživamo in s krmo, ki jo krmimo domačim živalim. Od rastlinstva pa nismo odvisni le zaradi hranljivih snovi, ki jih vnesemo v telo ali od kisika, ki ga rastline proizvajajo v procesu fotosinteze, ampak tudi od sekundarnih presnovkov rastlin, kot so alkaloidi, terpenoidi, glikozidi in fenoli. Sekundarni presnovki so kemične snovi, ki neposredno ne vplivajo na delovanje, rast, razvoj ali razmnoževanje organizmov. Rastline jih uporabljajo za zaščito pred napadalci, paraziti, boleznimi, za privabljanje žuželk (opraševalcev) in podobno. Človek je kmalu spoznal njihove učinke in jih začel uporabljati v vsakdanjem življenju, predvsem v zdravilstvu.

Tanine in njihove lastnosti so odkrili v 18. stoletju. Nahajajo se v travinju, grmovnicah in drevesih. Poimenovanje tanina izhaja iz antične keltske besede za hrast, ki je tipičen vir taninov za proizvodnjo usnja. Angleški izraz »tanning«, opisuje proces spreminjanja kože živali v usnje s pomočjo taninov. Že v starem veku (600 let p.n.š.) so kožo živali strojili v vodi z mletim hrastovim lubljem in šiškami, da se je ob obdelavi skrčila in strdila (Haslam, 1989). V prejšnjem stoletju so odkrili tudi veliko drugih koristnih lastnosti taninov. Zaradi trpkega okusa služijo kot obramba rastlin pred rastlinojedimi živalmi, saj jih odvračajo od zauživanja. Delujejo pozitivno na srčne bolezni, imunski sistem in infekcije urinarnega trakta, pomagajo pri zdravljenju pikov, krvavitev in opeklin, nahajajo pa se tudi v rdečem vinu (Chung in sod., 1998a). Tanini tvorijo komplekse z beljakovinami, ogljikovimi hidrati, vitaminimi in rudninskimi snovmi ter mikroorganizmi. Tanini se lahko vežejo na aktivno mesto na celični steni bakterijske celice ali na izvencelične encime, ki jih te izločajo in tako zmanjšujejo njihovo aktivnost. Negativno delujejo tako na bakterije kot na glive in kvasovke. Velike koncentracije taninov v krmi zmanjšujejo njeno okusnost, prebavljljivost, izkoristljivost in zauživanje krme. Majhne koncentracije taninov v obroku živali povečujejo sintezo mikrobnih beljakovin in zmanjšujejo razgradljivost beljakovin krme v predželodcih prežvekovalcev, kar zmanjšuje produkcijo metana ter izločanje dušika v okolje. Posledica teh sprememb je tudi večja prireja mesa, mleka in volne (Makkar, 2003).

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kako različne vrste taninskih izvlečkov, dodane čistim hranljivim snovem v različnih koncentracijah, vplivajo na intenzivnost mikro fermentacije, merjene kot tvorbo kratkoverižnih maščobnih kislin in metana v *in vitro* fermentaciji v vamnem soku. Predpostavljamo, da bo vpliv različnih taninskih izvlečkov zaviralno vplival na nastajanje ocetne, propionske, maslene kisline in metana, torej, da se bo njihova koncentracija s povečevanjem koncentracije dodanih taninskih izvlečkov zmanjševala.

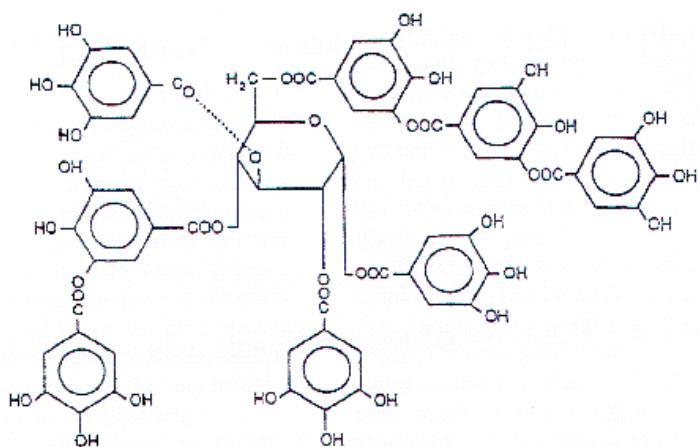
2 PREGLED OBJAV

2.1 VRSTE TANINOV

Tanini so rastlinski polimeri, sestavljeni iz fenolnih enot. Hidroksilne skupine fenolnih obročev so v večini primerov proste. Zaradi velikega števila monomernih enot imajo lahko tanini relativno molekulsko maso od 500 do 20.000 in več. So topni v vodi in se od ostalih polifenolov razlikujejo po sposobnosti, da oborijo beljakovine iz raztopin (Scalbert, 1991). Številne fenolne hidroksilne skupine taninov se povezujejo v komplekse z beljakovinami (encimi), aminokislinami, ogljikovimi hidrati, kovinskimi ioni in bakterijskimi celičnimi stenami (Makkar, 2003).

2.1.1 Hidrolizirajoči tanini

Hidrolizirajoči tanini so estri, ki vsebujejo ogljikohidratno jedro (ponavadi D-glukoza) s hidroksilnimi in s fenolnimi skupinami kot so galna kislina, elagna kislina in heksahidroksidifenska kislina (Haslam, 1989). Galotanini so estri galne in elagne kisline, elagitanini pa heksahidroksidifenske kisline z D-glukozo. Pri hidrolizi estrskih vezi prostih heksahidroksidifenskih kislin se tvori elagna kislina (lakton) (Hagerman in Butler, 1991), medtem ko galotanini pri hidrolizi s kislinami, bazami ali encimi razpadejo na glukozo in galno kislino (Chung in sod., 1998a). Najbolj znani hidrolizirajoči tanin je taninska kislina, ki jo uvrščamo med galotanine (Scalbert, 1991).



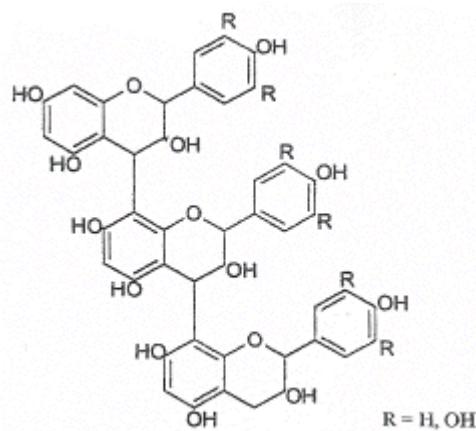
Slika 1: Kemijska struktura taninske kisline (Chung in sod., 1998b)

Ob prisotnosti kislin, baz in encimov esteraz, hidrolizirajoči tanini razpadejo na sladkorje in fenolne karboksilne kisline. Estrske vezi v vamu prežvekovalcev cepijo mikroorganizmi vrst *Selenomonas ruminantium* in *Streptococcus* spp., ki tvorijo esterazo, encim imenovan tanin acilhidrolaza (McSweeney in sod., 2001). Produkta razgradnje sta presnovka galna in elagna kislina. Galna kislina se nato v vamu dekarboksilira do pirogalolala, ki se pretvori v resorcinol in floroglucinol (Krumholz in Bryant, 1986).

Hidrolizirajoče tanine najdemo v semenih, strokih, šiškah rastlin iz družin octovk (*Anacardiaceae*), metuljnic (*Leguminosae*), bukvovk (*Fagaceae*), kombretovk (*Combretaceae*) in mirtovk (*Myrtaceae*) (Mueller-Harvey, 2001), v lesu, listih, sadju in v mladikah grmovnic. Produkti razgradnje hidrolizirajočih taninov se za razliko od kondenziranih absorbirajo iz tankega črevesa in so potencialno toksični za prežvekovalce (Dollahite in sod., 1962).

2.1.2 Kondenzirani tanini

Kondenzirani tanini so kompleksi oligomerov in polimerov flavanoidnih enot (flavan-3-olov, flavan-3,4-diolov in biflavanov), povezanih z ogljikovimi vezmi. Imenujemo jih tudi proantocianidini, ker pri segrevanju z dodatkom kisline in kovinskimi ioni tvorijo barvne antocianidine. Med flavan-3,4-diole uvrščamo leukocianidine, leukopelargonidine in leukodelphinidine, med flavan-3-ole pa katehine, epikatehine, epigalokatehine (Hagerman in Butler, 1991).



Slika 2: Kemijska struktura kondenziranega tanina (McSweeney in sod., 2001)

V primerjavi s hidrolizirajočimi tanini imajo kondenzirani kompleksnejšo strukturo. Nimajo ogljikohidratnega jedra kot hidrolizirajoči tanini, vendar se pojavljajo kot različni polimeri sestavljeni iz flavanolnih enot (procianidin) (Mangan, 1988). Produkti razgradnje flavanoidov v predželodcih vključujejo acetat, butirat, mono- in dihidroksifenole ter floroglucinol, ni pa dokazov o cepitvi heterocikličnega sistema flavan-3-olov (catehin, epicatehin), ki so sestavni deli kondenziranih taninov (Lowry in Kennedy, 1996, cit. po McSweeney in sod., 2001). Depolimerizacija kondenziranih taninov s cepitvijo ogljikovih vezi (C – C) ne poteka pod anaerobnimi pogoji, zato se njihova razgradnja najverjetneje ne odvija v predželodcih prežekovalcev (McSweeney in sod., 2001).

Škodljivi vplivi kondenziranih taninov se pojavi, ko njihova koncentracija preseže 6 % suhe snovi (SS) krme, kažejo pa se v zmanjšanem zauživanju krme, prebavljivosti SS in dušika ter v zmanjšanju prieje živali (Waghorn in sod., 1994). Kondenzirani tanini (quebracho tanin) imajo večji vpliv na zmanjšanje *in vitro* produkcije plina in pravo prebavljivost kot hidrolizirajoči tanini (taninska kislina) (Makkar in sod., 1995). Kondenzirani tanini se pojavljajo v zelo majhnih koncentracijah pri normalnih pašnih sistemih, v travah, metuljnicih in zeleh, in sicer v celičnih vakuolah. Najdemo jih v čaju, kakavu, sirku in strokih rožiča (Scalbert, 1991).

2.2 DELOVANJE TANINOV

Tanini so snovi, ki lahko tvorijo komplekse z različnimi polimeri. V tem se razlikujejo od najpreprostejših fenolov kot so catehol, pirogalol, galna kislina, catehin in ostali flavanoidi (McManus in sod., 1985, cit. po Scalbert, 1991). Trpkost (astringentnost) taninov je dobro povezana s kemijsko strukturo taninov (molekulsko maso) in je posledica tvorbe kompleksov z encimi in substrati.

Rastlinam tanini služijo za kemično zaščito pred vdorom patogenih mikroorganizmov, pred insekti, ki se hranijo z njimi, in pred objedanjem rastlinojedov (Swain, 1979, cit. po Barry in McNabb, 1999). White in sod. (1952, cit. po Scalbert, 1991) navajajo, da so si rastline izbrale za zaščito tanine najverjetneje zato, ker so tanini sposobni tvoriti zelo koncentrirane raztopine, ki jih rastlina hrani v celičnih vakuolah.

Prisotnost taninov v krmi zmanjša njeno prebavljivost v predželodcih prežvekovalcev, saj ti zmanjšajo možnost vezave mikroorganizmov na delce krme. Zaradi trpekega okusa krme, ki vsebuje tanine, se zmanjša njeno zauživanje, kar zmanjuje pirejo živali. Posledice zauživanja rastlin z veliko koncentracijo taninov so lahko zastrupitve, čiri in nekroze črevesa ter celo smrt (Hervas in sod., 2003). Do zastrupitve organizma pride zaradi absorpcije razgradnih produktov hidrolizirajočih taninov in povečane koncentracije fenolov v krvi, ki jih jetra niso sposobna razstrupiti. Posledice so poškodbe notranjih organov. Kondenzirani tanini (CT) se ne absorbirajo v kri, zato za notranje organe niso nevarni (Makkar in Becker, 1998). Tanini prisotni v krmi zmanjšajo hranilno vrednost krme in dostopnost hranljivih snovi za prežvekovalce (Mangan, 1988), saj zmanjujejo celulolitično aktivnost vamnih mikroorganizmov (Akin in sod., 1988).

Nekatere živali so razvile zaščito pred neželenimi vplivi zaužitih taninov. Srnjad izloča v slino s prolinom bogate beljakovine (*proline-rich proteins* - PRPs), ki vežejo kondenzirane tanine in tako kljubujejo rastlinski kemični obrambi ter zmanjšajo antinutritivni učinek visokih koncentracij taninov. Udomačene živali, kamor sodijo govedo in ovce, ne tvorijo teh beljakovin (Austin in sod., 1989), kar je pravzaprav dobro, saj lahko z dodajanjem taninov vplivamo na izkoristljivost dušika iz krme. Vampni mikroorganizmi so sposobni razgrajevati hidrolizirajoče tanine (Makkar, 2003), medtem ko razgradnja kondenziranih taninov v predželodcih ne poteka (McSweeney in sod., 2001).

Pri pašnih živalih se pogosto pojavlja napihovanje (*bloat*), ki ga povzročijo saponini, prisotni v spomladanski, z beljakovinami bogati paši (večinoma pri metuljnicih). V vamu nastane pena, ki prepreči izrigavanje nastalih plinov. Tanini v metuljnicih zmanjšajo nastajanje plinov tako, da oborijo beljakovine v peni in s tem preprečijo napihovanje (Jones in sod., 1973). Li in sod. (1996) poročajo, da je za preprečitev napihovanja minimalna potrebna koncentracija taninov v krmi najmanj 5 g CT/kg SS krme ali več. Tanini vplivajo tudi na manjšo kontaminacijo pašnikov in živali z ličinkami parazitov, saj prekinejo življenjski cikel nematodov. Na ta način lahko zmanjšamo odvisnost od anthelmintičnih zdravil, s katerimi kontroliramo okuženost živali s paraziti (Molan in sod., 2000).

Min in sod. (2003) poročajo, da tanini pozitivno vplivajo na prirejo ovac. Pri krmi, ki je vsebovala od 22 do 38 g CT/kg SS krme, se je prireja volne povečala za 10 %. Paša ovac na navadni nokoti (*Lotus corniculatus*) je izboljšala plodnost, saj je povečala odstotek ovulacij za 22 % (Min in sod., 1999). Tanini vplivajo na količino mleka, ki se je povečala za 21 %. Večji sta bili tudi vsebnosti laktoze (12 %) in maščob mleka (14 %) (Wang in sod., 1996). Majhne koncentracije taninov povečujejo sintezo mikrobnih beljakovin in zmanjšujejo razgradljivost beljakovin in ostalih makromolekul v predzelodcih, kar zmanjšuje produkcijo metana ter izločanje dušika v okolje. Pri prežvekovalcih imajo ti procesi pozitiven učinek, saj povečujejo tok esencialnih aminokislin v tanko črevo in tako izboljšujejo prirejo mleka, mesa in volne (Makkar, 2003).

Tanini so prisotni tudi v človeški prehrani. Najdemo jih v zeliščnih čajih, rožičevih strokih, kakavu in pravih čajih (Scalbert, 1991; Chung in sod., 1998b). Polifenoli pravega čajevca in mnoge sestavine taninov delujejo antikancerogeno. Določene sestavine taninov zmanjšujejo mutageno aktivnost različnih snovi. Kancerogene in/ali mutagene snovi sprožijo nastanek prostih kisikovih radikalov, ki se vežejo na celične makromolekule. Antikancerogenost in antimutagenost sta povezani z antioksidativno sposobnostjo taninov, ki je pomembna pri zaščiti celic pred oksidacijo, vključno z lipidno peroksidacijo (Chung in sod., 1998b).

2.2.1 Vezava taninov z beljakovinami in pomen teh kompleksov v prehrani prežvekovalcev

Tanini so v prehrani prežvekovalcev zelo zanimivi, ker vežejo beljakovine, jih s tem naredijo v vamu nerazgradljive in tako povečajo količino beljakovin v tankem črevesu (Mangan, 1988; Reed, 1995). Reaktivnost med tanini in beljakovinami krme je odvisna od pH v predzelodcih, kjer se stabilni kompleksi tvorijo pri pH od 3,5 do 7,5 (Jones in Mangan, 1977; Perez-Maldonado in sod., 1995). Kompleksi disociirajo v kislem pH siriščnika (pH < 3,5) in sprostijo se beljakovine (Jones in Mangan, 1977; Perez-Maldonado in sod., 1995). Kondenzirani tanini se na beljakovine vežejo s hidrofobnimi in vodikovimi vezmi, ki nastanejo med hidroksilnimi skupinami taninov in karboksilnimi skupinami beljakovin (Haslam, 1989; Salawu in sod., 1997; Barry in McNabb, 1999).

Rastlinske beljakovine je koristno zaščititi pred mikrobnim razgradnji v predželodcih prežvekovalcev (nastanek kompleksov), ki bi se kasneje prebavile v siriščniku in tankem črevesu in se kot aminokisline absorbirale v tankem črevesu. Ti vplivi se v večini primerov nanašajo na delovanje kondenziranih taninov, medtem ko je za hidrolizirajoče tanine znano, da z beljakovinami tvorijo šibke komplekse (Driedger in Hatfield, 1972).

Tanini lahko vplivajo na vezavo vamnih mikroorganizmov s substratom. Tanini tudi zmanjšujejo encimsko aktivnost mikroorganizmov, saj se neposredno vežejo na njihovo celično steno in njihove encime (Jones in sod., 1994). Pri prežvekovalcih velike koncentracije taninov v krmi inhibirajo mikrobne encime, ki so vpleteni v razgradnjo vlaknine, kot so na primer celulaze, amilaze, pektinaze, ksilanaze, peroksidaze, lipaze, laktaze, glikoziltransferaze in drugi (Scalbert, 1991; Chung in sod., 1998a). V nekaterih primerih lahko zaščita beljakovin zmanjša nivo amoniaka (NH_4^+) v vamu pod nivo, ki je potreben za učinkovito prebavo voluminozne krme (sena, zlasti celuloze) (McSweeney in sod., 2001).

2.2.2 Vezava taninov z ogljikovimi hidrati, rudninskimi snovmi in vitaminimi

Tanini zmanjšajo prebavljenost vlaknine s tvorbo kompleksov z lignocelulozo, s čimer preprečijo mikroben prebavo, in z neposrednim zmanjšanjem aktivnosti celulolitičnih mikroorganizmov (McSweeney in sod., 2001). Vplivi taninov se razlikujejo glede na vrsto tanina, njegovo molekulsko maso in topnost ter vrsto rastlinskega materiala. Slednje predstavljajo različni neškrobeni ogljikovi hidrati (celuloza, hemiceluloza), škrob in pektini (Waghorn in sod., 1994).

Tanini se z ogljikovimi hidrati povezujejo s hidrofobnimi vezmi (Haslam, 1989), najpogosteje s celulozo, hemicelulozo, škrobom ter pektinom (McSweeney in sod., 2001; Reed, 1995). Barry in McNabb (1999) predvidevata, da kondenzirani tanini, vezani na beljakovine zmanjšujejo razgradnjo beljakovin krme v predželodcih, medtem ko se prosti tanini lahko vežejo na mikrobne encime in jih inaktivirajo ter tako zmanjšajo fermentacijo

ogljikovih hidratov. Tanini prisotni v svežih listih rastlin niso v vezani obliki (Barry in McNabb, 1999).

Perez-Maldonado in Norton (1996) poročata, da se tanini pri vezavi na vlaknino (celično steno) najverjetneje vežejo na beljakovine znotraj celične stene, zaradi česar onemogočijo razgradnjo celične stene. Z vezavo na celulozo ali hemicelulozo pa tanini onemogočijo encimsko razgradnjo vlaknine (Butter in sod., 1999). Kostanjevi tanini zmanjšajo razgradnjo polisaharidov (hemiceluloza, pektin), kadar je razmerje med količino taninov in količino substratov večje od ena (Scalbert, 1991).

Velika koncentracija kondenziranih taninov v močvirski nokoti (*Lotus pedunculatus*) (95 in 106 g/kg SS) je zmanjšala prebavlјivost topnih sladkorjev, pektina in hemiceluloz v predželodcih. Prebavlјivosti ogljikovih hidratov v obroku za ovce, krmljene z navadno nokoto (*Lotus corniculatus*), ki je vsebovala med 25 in 35 g CT/kg SS, kondenzirani tanini niso prizadeli (Waghorn in sod., 1987).

Makkar in sod. (1995) so ugotovili, da tanini zmanjšajo tvorbo hlapnih maščobnih kislin (HMK) in plina pri *in vitro* fermentaciji substrata. Zmanjšanje tvorbe HMK je rezultat vezave taninov na substrat in mikrobne encime ter njihovo inhibicijo (Chiquette in sod., 1988; Van Hoven in Furstenburg, 1992). Poleg zmanjšane produkcije HMK, se ob prisotnosti taninov zootira tudi razmerje med ocetno in propionsko kislino (Butter in sod., 1999).

Tanini se povezujejo tudi z rudninskimi snovmi in vplivajo na njihovo izkoristljivost. Znano je, da tanini tvorijo netopne komplekse z dvovalentnim železom, zaradi česar se absorpcija železa zmanjša. Kompleks med železom in taninom namreč ne razpade niti v siriščniku, kar je značilno za druge komplekse s tanini. South in Miller (1998) sta ugotovila, da je dodatek etilendiamintetraocetne kisline (EDTA) preprečil vezavo tanina na železo in hkrati razcepil železo-taninske komplekse. Prisotnost taninov v obroku zmanjšuje vsebnost vitamina A in zmanjšuje izkoristljivost vitamina B₁₂ (Chung in sod., 1998a).

2.2.3 Vpliv taninov na vampne mikroorganizme

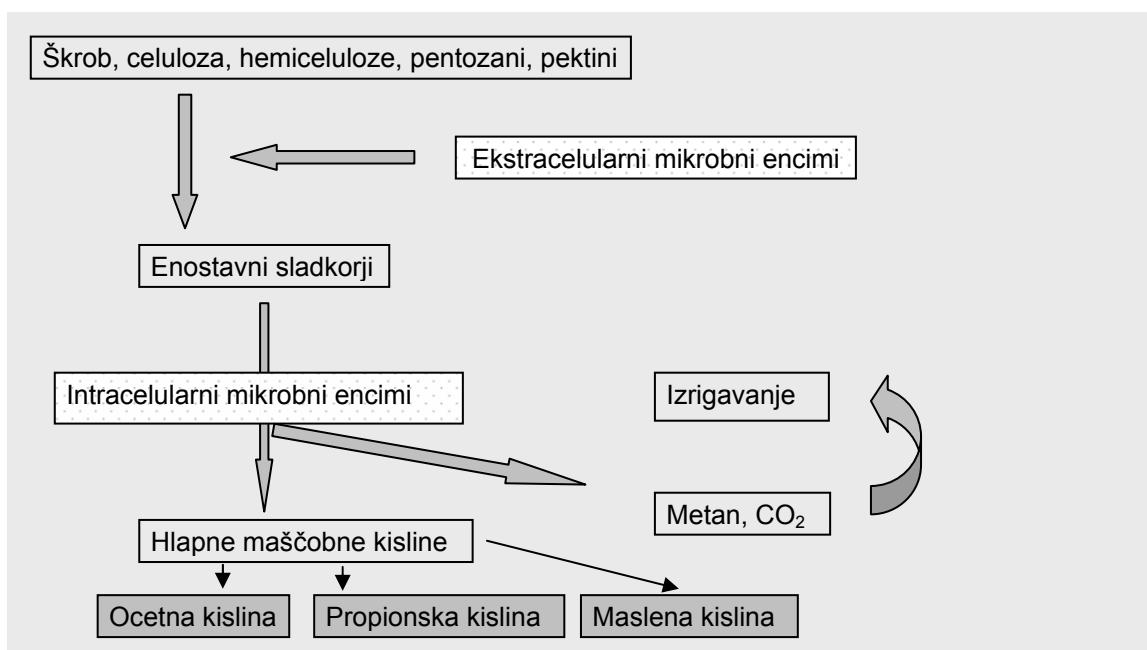
Tanini se lahko vežejo na aktivno mesto na celični steni bakterijske celice in na njihove izvencelične (ekstracelularne) encime. Obe interakciji zavirata transport hranljivih snovi v celice in tako zavirata rast (mikro)organizma. Kondenzirani tanini navadne nokote (*Lotus corniculatus*) so v *in vitro* poskusih inhibirali izvencelično aktivnost endoglukanaze, bakterije *Fibrobacter succinogenes* (Bae in sod., 1993), prav tako pa so zavrli tudi rast proteolitičnih bakterij (*Ruminobacter amylophilus*, *S. bovis*) (Jones in sod., 1994). McSweeney in sod. (1998, cit. po McSweeney in sod., 2001) poročajo, da imajo kondenzirani tanini manjši vpliv na sposobnost razgradnje vlaknine pri vampnih glivah kot pri celulolitičnih bakterijah.

Nekateri vampni mikroorganizmi so na delovanje večjih koncentracij hidrolizirajočih in kondenziranih taninov odporni. Ti mikroorganizmi izločajo debelo plast glikokaliksa ali glikoproteina, ki ima veliko sposobnost vezave taninov (Chiquette in sod., 1988). Jansman (1993) poroča, da so interakcije med prostimi tanini in mikroorganizmi v predželodcih najverjetneje manjše od pričakovanih, saj tanini tvorijo komplekse z ogljikovimi hidrati, beljakovinami in minerali pri pH-ju vsebine predželodcev. Dokazano je, da je rezultat teh interakcij neto izguba prostih kondenziranih taninov 78 % v vampu ovac in koz (Perez-Maldonado in Norton, 1996).

2.3 KRATKOVERIŽNE MAŠČOBNE KISLINE

Pri prežvekovalcih razgradnja ogljikovih hidratov poteka v predželodcih. Ogljikove hidrate mikroorganizmi v predželodcih razgradijo do enostavnih sladkorjev in jih porabijo v lastni presnovi. Pri tem nastanejo hlapne maščobne kisline (HMK), kot so ocetna, propionska in maslena ter plina ogljikov dioksid (CO_2) in metan (CH_4). Hlapne maščobne kisline se absorbirajo skozi vampno sluznico s pasivno difuzijo in jih organizem prežvekovalca uporabi v svoji presnovi. Te kisline so zelo pomembne za energijsko preskrbo prežvekovalca, saj predstavljam kar 65 do 80 % vse energije, ki jo žival potrebuje za pokritje svojih energijskih potreb. Poleg navedenih kislin v manjših količinah nastajajo tudi mlečna, mravljična in valerianska. Če je v krmi veliko škroba in drugih enostavnih

ogljikovih hidratov, se kot vmesni produkt tvori mlečna kislina. Posledica je znižanje pH (< 6,0), zaradi česar se poveča delovanje amilolitične mikroflore na račun celulolitične in lahko pride do acidoze predželodcev (Žgajnar, 1990).



Slika 3: Nastanek hlapnih maščobnih kislin z mikrobiom razgradnjo ogljikovih hidratov (prirejeno po Žgajnar, 1990)

Razmerja med posameznimi HMK so odvisna od vrste substrata (krme), ki pride v predželodce in od strukture obroka. Odnosi med obrokom in nastanjnjem HMK v vamu so pomembni za izkoriščanje energije krme in za sintezo posameznih sestavin mleka (maščobe mleka). Koncentracija vseh HMK niha v predželodcih od 2 do 15 g/l, dnevna proizvodnja pri kravah pa znaša 3 do 6 kg. Krava z 20 litri mleka tvori dnevno od 3 do 5 kg ocetne kisline, od 0,6 do 1,2 kg propionske kisline in od 0,3 do 0,6 kg maslene kisline. Hlapne maščobne kisline, predvsem maslena in propionska, stimulirajo razvoj papil v predželodcih mladih prežvekovalcev (Žgajnar, 1990).

2.3.1 Ocetna kislina

Ocetna kislina (C₂), s sistematičnim imenom etanojska kislina (CH_3COOH), je ena najenostavnejših karboksilnih kislin. Je brezbarvna tekočina, kislega okusa, rezkega vonja in je korozivna. Topna je v vodi, etanolu, acetonu, toluenu in heksanu (Budavari in sod., 1989).

Pri krmljenju starejše voluminozne krme (veliko celuloze) nastaja več ocetne kisline v primerjavi z mlado voluminozno krmo. Pri kravah molznicah pospešujemo nastajanje ocetne kisline, saj je od količine ocetne kisline odvisna količina maščobe v mleku. Pri kravah molznicah je najugodnejše razmerje med ocetno in propionsko kislino (C₂ in C₃) v vampu od 2,6 do 3,5 : 1. Pri obroku z drobno mletim senom, je delež ocetne kisline manjši kot v obroku z dolgim senom (Žgajnar, 1990).

2.3.2 Propionska kislina

Propionska kislina (C₃), s sistematičnim imenom propanojska kislina ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$), je organska karboksilna kislina. Je brezbarvna tekočina, topna v vodi, z rezkim vonjem in korozivnim delovanjem (Budavari in sod., 1989).

Pri krmljenju mlade voluminozne krme in večji količini koncentriranih krmil (zrnje žit, škrob, sladkorji) nastaja več propionske kisline kot ocetne kisline. Pomanjkanje strukturne vlaknine v obroku usmerja mikrobnno prebavo proti propionski kislini in s tem zmanjšuje vsebnost maščobe v mleku (razmerje med ocetno in propionsko kislino). Izkoriščanje energije je boljše, če nastaja več propionske kisline, zato pri pitanju govedi pospešujemo nastajanje le-te (Žgajnar, 1990).

Propionska kislina predstavlja za visoko produktivno mlečno žival vir glukoze, ki je vir energije za delovanje možganov, služi pa tudi za tvorbo laktoze (mlečni sladkor). Propionska kislina se v steni predželodcev večinoma pretvarja v piruvat in laktat. Pri krmljenju obroka, ki ga sestavlja drobno mleto seno, nastane večji delež propionske kisline kot, če živali krmimo z obrokom sestavljenim na osnovi dolgega sena (Žgajnar, 1990).

2.3.3 Maslena kislina

Maslena kislina (C4) ali butanojska kislina ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), je prav tako kot C2 in C3, organska karboksilna kislina. Je neprijetnega vonja, trpkega okusa, topna v vodi, etanolu in etru (Budavari in sod., 1989).

Maslena kislina se od vseh HMK najbolje absorbira skozi steno predželodcev, sledita ji propionska in ocetna. Od maslene in ocetne kisline je odvisen nastanek maščob, iz njiju pa ni mogoč nastanek ogljikovih hidratov (glukoza), torej nista glukogeni kislini (Žgajnar, 1990). Velikost delcev krme nima velikega vpliva na nastanek maslene kisline, saj se delež nastale maslene kisline pri obroku z drobno mletim senom od obroka z dolgim senom razlikuje za manj kot 1 % (McDonald in sod., 2002).

2.3.4 Vplivi na tvorbo hlapnih maščobnih kislin

Nastanek hlapnih maščobnih kislin je v največji meri odvisen od prehrane živali, predvsem od vrste krme, ki jo živalim pokladamo, njene kakovosti, kemične sestave, prebavljenosti in energijske vrednosti (Žgajnar, 1990).

Eden izmed pristopov kako izboljšati prehrano prežvekovalcev na način, ki bi zmanjšal nastanek metana in stimuliral zaželjene procese (mikrobna sinteza beljakovin in HMK), je zaščititi hranljive snovi (topne ogljikove hidrate, kot sta škrob in sladkorji, ter proteine) pred fermentacijo v predželodcih, da bi se prebavile v tankem črevesu. Spreminjanje vampne mikroflore z antibiotiki je bilo uspešno, vendar so uporabo antibiotikov prepovedali zaradi odpornosti mikroorganizmov, ki so škodljivi živalim in ljudem. Danes uporabljamo antibiotike, na primer monezin in salinomicin, ki delujeta proti gram negativnim bakterijam in stimulirata nastanek propionata ter zmanjšujeta nastanek acetata in butirata ter probiotike, ki povečajo nastanek propionata in zmanjšajo nastanek acetata in metana. Način zaščite hranljivih snovi temelji na toplotni ali kemični obdelavi krme, kamor uvrščamo na primer obdelavo krme s tanini ali formaldehidom. Topne ogljikove hidrate kot je škrob, je težje zaščititi v primerjavi z beljakovinami, čeprav škrob iz nekatere

krme uide fermentaciji v vamu (riževi stranski produkti in v manjši meri koruza) (McDonald in sod., 2002).

2.4 METAN

2.4.1 Lastnosti metana

Metan je plin, drugače imenovan metil hidrid. V naravi je široko zastopan, v atmosferi ga je 0,00022 vol %. Metan (CH_4) nastane tako, da se čisti ogljik veže s čistim vodikom pri temperaturah nad 1100 °C. Metan je plin brez barve in vonja in ni strupen. Je vnetljiv in lahko tvori mešanice z zrakom, ki so vnetljive ali eksplozivne. Metan je topen v vodi, alkoholu, etru in drugih organskih topilih. Lastnosti metana so predstavljene v preglednici 1.

Preglednica 1: Fizikalne in kemijske lastnosti metana (Budavari in sod., 1989)

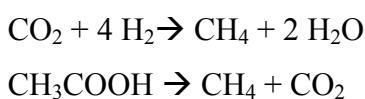
Metan, CH_4	
Barva	brezbarven
Oblika molekule	tetraedrična
Molska masa	16,04 g/mol
Masni delež ogljika in vodika	$W_C = 74,87\%$; $W_H = 25,13\%$
Specifična gostota	0,717 kg/m ³
Topnost v vodi	3,5 ml/100 ml H_2O (pri 17°C)
Tališče	-182,5 °C
Vrelišče	-161,4 °C
Kritična temperatura	-82,25 °C pri 45,8 atm
Temperatura samovžiga	650 °C

2.4.2 Metanogeneza

Metanogenezo srečamo v mnogih naravnih ekosistemih: v atmosferi, v oceanih, v sladkovodnih sedimentih, v poplavljenih riževih poljih, v močvirjih, v šotiščih ter v prebavilih sesalcev in žuželk. Prežvekovalec je z mikroorganizmi, ki se nahajajo v njegovih obsežnih predzelodcih, povezan v simbiotskem odnosu. Krma prežvekovalcev je bogata z ogljikovimi hidrati, ki jih živali ne morejo razgraditi z lastnimi encimi, zato jim pri tem pomagajo mikroorganizmi. Ti s svojimi encimi razgradijo ogljikove hidrate do enostavnih sladkorjev, ki jih nadalje pretvorijo v HMK. V teh presnovnih procesih nastaneta poleg hlapnih maščobnih kislin, ki jih organizem prežvekovalca porabi v

presnovi, tudi CH_4 in CO_2 . Metan in CO_2 izhajata iz vampa z izrigavanjem, pri čemer se z metanom izgubi okoli 7 % vse energije iz krme (Žgajnar, 1990).

Mikroorganizme odgovorne za metanogenezo imenujemo metanogeni mikroorganizmi, ki so striktni anaerobi. Terminalni akceptor elektronov pri metanogenezi ni kisik, temveč ogljik. Dva najbolj pogosta terminalna akceptorja elektronov pri metanogenezi sta CO_2 in acetna kislina (CH_3COOH) (Madigan in sod., 2003):



Substance z veliko molekularno maso, kot so ogljikovi hidrati, beljakovine in maščobe, se preoblikujejo v hlapne maščobne kisline, CH_4 in CO_2 s pomočjo interakcij številnih sodelujočih skupin prokariontov. Tako se npr. proces razgradnje celuloze prične s celulolitičnimi bakterijami, ki cepijo molekulo celuloze na celobiozo (glukoza – glukoza) in v prosto glukozo. Glukozo fermentirajo primarni fermentorji v številne produkte fermentacije, kjer so glavni proizvodi acetat, propionat, butirat, sukcinat, alkoholi, vodik (H_2) in CO_2 . Vodik takoj porabijo vodikovi porabniki, kot so metanogeni mikroorganizmi. Acetat se v vampu ne pretvori do CH_4 , ker je njegov zadrževalni čas v vampu prekratek, da bi se namnožile acetotrofne metanogene bakterije. Ocenita, propionska in maslena kislina se skozi steno predželodcev absorbirajo v krvni obtok (Madigan in sod., 2003).

Metanogene in acetogene bakterije med seboj tekmujejo za H_2 , saj so oboje njegove porabnice, vendar imajo metanogene vedno nekaj prednosti pred acetogenimi. V predželodcih odraslih živali je število acetogenih bakterij precej manjše (10^5 ml^{-1}) (Morvan in sod., 1996) kot pri mladih živalih ($10^8\text{-}10^9 \text{ ml}^{-1}$) (Morvan in sod., 1994), saj se s staranjem živali njihovo število zmanjšuje.

Metan nastane samo iz acetata in butirata (Wolin, 1960). Johnson K.A. in Johnson D.E. (1995) ter Church (1988) so poročali, da obroki bogati s škrobom dajejo prednost nastanku propionata in hkrati zmanjšajo nastanek metana v predželodcih. Iz tega so sklepali, da ima pH vpliv na tvorbo metana (nižji pH, manj CH_4). Obratno pa obroki bogati z vlaknino

širijo razmerje. Tako so ugotovili, da je nivo izgub metana pri krmljenju na ravni vzdrževanja (seno) med 6 in 7 %, pri intenzivnem krmljenu (koncentrirana krma, krmljena *ad libitum*) pa med 2 in 3 %. Tvorba metana se poveča, če živalim krmimo zrelo posušeno ali grobo narezano krmo, seno (bolj kot fino mleto ali peletirano) in zmanjša, ko se krmi silažo (Johnson K.A. in Johnson D.E., 1995).

2.4.3 Metanogeni mikroorganizmi

V predželodcih prežvekovalcev se nahaja ogromno število prokariontov (10^{10} - 10^{11} bakterij/g vamnega soka). Metanogenih vamnih mikroorganizmov je preko 50 vrst in spadajo v kraljestvo arhej (*Archaea*), ki evolucijsko predstavljajo samostojno enoto med mikroorganizmi. Arheje ločimo v dve veliki skupini oz. debli: *Crenarchaeota* in *Euryarchaeota*. Slednjo sestavlja skupina halofilnih bakterij in skupina metanogenih bakterij, ki živijo v anaerobnih pogojih in iz substratov tvorijo metan. Metanogeni mikroorganizmi so razdeljeni v tri razrede, in sicer *Methanobacteria*, *Methanococci* in *Methanosarcinales* (preglednica 2).

Vamne metanogene mikroorganizme predstavljajo *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanobacterium sp.*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanosarcina barkeri* (Madigan in sod., 2003).

Preglednica 2: Klasifikacija metanogenih mikroorganizmov (Madigan in sod., 2003)

Kraljestvo (Regnum)	Archaea
Deblo (Phylum)	Euryarchaeota
Razred I (Class)	Methanobacteria
Red I (Ordo)	Methanobacteriales
Družina I (Familia)	Methanobacteriaceae
Rod I (Genus)	<i>Methanobacterium</i> <i>Methanobrevibacter</i> <i>Methanospaera</i> <i>Methanothermus</i>
Razred II	Methanococci
Red I	Methanococcales
Družina I	Methanococcaceae
Rod I	<i>Methanococcus</i> <i>Methanotermococcus</i>
Družina II	Methanocaldococcaceae
Rod II	<i>Methanocaldococcus</i> <i>Methanotorris</i>
Red II	Methanomicrobiales
Družina I	Methanomicrobiaceae
Rod I	<i>Methanoculleus</i> <i>Methanogenium</i> <i>Methanolacinia</i> <i>Methanomicrobium</i> <i>Methanoplanus</i> <i>Methanofollis</i>
Družina II	Methanocorpusculaceae
Rod II	<i>Methanocorpusculum</i>
Red III	Methanosarcinales
Družina I	Methanosarcinaceae
Rod I	<i>Methanococcoides</i> <i>Methanohalobium</i> <i>Methanohalophilus</i> <i>Methanolobus</i> <i>Methanosarcina</i> <i>Methanosalsum</i>
Družina II	Methanosaetaceae
Rod II	<i>Methanosaeta</i>

2.4.4 Učinek metana na okolje

Učinek tople grede je v zadnjem obdobju zelo pogosta tema naravovarstvenikov in meteorologov, ki opozarjajo na njene negativne posledice. Poleg CO₂, ki je glavni faktor globalnega segrevanja, je toplogredni plin tudi metan. Njegova prisotnost v atmosferi je znana že od leta 1940. Kmetijstvo ima pomembno vlogo pri njegovem nastanku, saj so viri metana poplav(lje)na riževa polja, fermentacija v prebavilih in živalski odpadki. Leta 1990 so bile v EU emisije v kmetijstvu nastalega metana ocenjene na 10,2 milijona ton na leto (to je 45 % vsega nastalega metana), od tega ga je 2/3 izviralo iz fermentacije v prebavilih živali, 1/3 pa iz živinorejskega odpadka (gnoj). Anaerobna prebava v predželodcih prezvekovalcev je glavni vir emisij metana (Moss in sod., 2000).

Znanstveniki veliko pozornosti namenjajo odkrivanju načinov, kako zmanjšati emisije metana, ki so posledica fermentacije hranljivih snovi v predželodcih. Metan predstavlja izgubo ogljika in energije potrebne za mikroorganizme in za žival, zato bi z zmanjšanjem teh izgub izboljšali izkoriščanje krme v živalske proizvode kot sta mleko in meso, hkrati pa bi zmanjšali tudi emisije ogljika v atmosfero (Blümmel in sod., 2005).

Na zmanjšanje količine metana, nastale pri fermentaciji v predželodcih, naj bi vplivali kloroform, amikloral, trikloroacetamid, trikloroetil, bromoklorometan in druge spojine, vendar so se izkazale za neuporabne zaradi negativnih ali nezadostnih učinkov (Moss in sod., 2000). Martin (1998) je predlagal, da bi dodatek soli dikarboksilnih kislin, kot je malat, spremenil potek fermentacije v predželodcih na enak način kot ionofori (zamenjava gram pozitivnih bakterij za gram negativne s hkratno zamenjavo v fermentaciji iz acetata v propionat) (Chen in Wolin, 1979). Dodatek taninov krmi je prav tako uspešen pri zmanjševanju tvorbe metana in je eden izmed najcenejših in zelo preprostih načinov zmanjševanja emisij metana zaradi živinoreje (Tavendale in sod., 2005).

Idealni inhibitor metanogeneze bi moral zmanjšati nastanek metana, torej hkrati povečati nastanek propionata in sintezo mikrobnih beljakovin v predželodcih, kar pa z vidika mlečnosti ni ugodno, saj je odstotek maščobe v mleku odvisen od količine nastale ocetne

kisline. Proizvodnja HMK in metana v predželodcih je povezana z razmerjem med ocetno in propionsko kislino, ki pa je odvisno od pH v predželodcih in od substrata (Russell, 1998).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SUBSTRAT

V raziskavi smo za substrat uporabili krompirjev škrob (Merck, Darmstadt, Nemčija) in celulozo (BWW 40) (Arbocel[®], J. Rettenmaier & Sohne, Nemčija). Fizikalne lastnosti substratov so podane v preglednici 3.

Preglednica 3: Fizikalne lastnosti škroba in celuloze

	Škrob	BWW 40 [†]
Barva	bela	bela
Oblika	fini prah	kosmiči
Gostota	300 g l ⁻¹	530 – 630 g l ⁻¹
pH [*]	6,0 – 7,5	6,0 ± 1,0

[†]BWW 40 = celuloza

* pri 25°C in 2 % vodni raztopini

Škrob je brez vonja in okusa ter vsebuje 89,6 % suhe snovi. Topnost škroba v vodi pri temperaturi 90°C znaša 50 g/l.

BWW 40 je brez vonja in okusa ter vsebuje 93,9 % suhe snovi. V suhi snovi BWW 40 je 0,6 % surovih beljakovin, manj kot 0,1 % surovih maščob, 72,0 % surovih vlaknin, 20,9 % brezdušičnega izvlečka in 0,3 % pepela.

3.2 TANINSKI IZVLEČKI

V raziskavi smo uporabili tri vrste preparatov taninskih izvlečkov. Farmatan 75 (F75; Tanin Sevnica) in taninska kislina (TAK; Sigma-Aldrich, Nemčija) vsebujeta predvsem hidrolizirajoče tanine, medtem ko taninski izvleček iz quebracha (QUE; Roy Wilson Dickson, Velika Britanija) vsebuje predvsem kondenzirane tanine. Sestava taninskih izvlečkov je podana v preglednici 4.

Preglednica 4: Sestava preparatov taninskih izvlečkov (Vegetabil, 2000)

	F75	TAK	QUE
Tanini (%)	76	90	72
Netaninske topne snovi (%)	17	5	3,6
Netopne snovi (%)	1,5	0	0,3
pH	3,6	3	4,5 – 5,0

3.2.1 Kostanjev izvleček

- Družina: Bukvovke (*Fagaceae*)
- Rod: Kostanj (*Castanea P. Mill.*)
- Vrsta: Evropski kostanj (*Castanea sativa P. Mill.*)
- Nahajališče: Evropa

Kostanjevi tanini so naravni izvlečki iz kostanjevega lesa (*Castanea P. Mill.*). Kostanjev taninski ekstrakt je zmes estrsko in glikozidno vezanih taninov, to je hidrolizirajočih in kondenziranih taninov, kjer hidrolizirajoči prevladujejo. Spada med elagitanine (Scalbert, 1991). Farmatan se uporablja v pogojih intenzivne reje kot dodatek h krmi, saj preprečuje driske, ščiti sluznico pred dražljaji, preprečuje resorpcijo škodljivih snovi in dehidracijo organizma (Farmatan ..., 2003).

3.2.2 Taninska kislina

- Družina: Bukvovke (*Fagaceae*)
- Rod: Hrast (*Quercus L.*)
- Vrsta: *Quercus infectoria*
- Nahajališče: Evropa

Taninska kislina je fin rumen prah, ki potemni izpostavljen zraku in svetlobi. Je hidrolizirajoči tanin, pridobljen iz hrastovih šišk (*Q. infectoria*). Taninska kislina tvori netopne oborine z albuminom, gelatinom, večino alkaloidov in težkimi kovinskimi ioni. Taninska kislina je topna v etanolu (100 mg/ml), pri čemer nastane rumeno do rjava raztopina. Razaplja se tudi v vodi (2,8 g/ml), v toplem glicerolu (1 mg/ml) in acetolu. Skoraj netopna je v benzenu, kloroformu, etru, petrol etru, ogljikovem disulfidu in ogljikovem tetrakloridu. Raztopine moramo hraniti v dobro zaprtih posodah, zaščitene pred svetlobo in zrakom, sicer potemnijo (Product Information, 2003).

3.2.3 Quebracho izvleček

- Družina: Octovke (*Anacardiaceae*)
- Rod: *Schinopsis Engler*
- Vrsta: Quebracho (*Schinopsis balansae*) in rdeč quebracho (*Schinopsis lorentzii*)
- Nahajališče: Južna Amerika (Argentina)

Ekstrakt quebracha je pripravljen iz stržena quebracho dreves, ki rastejo le v južni Ameriki, na geografskem območju imenovanem Chaco, ki pokriva severni del Argentine in Paragvaja. Drevesa so primerna za predelavo šele po najmanj 80. letih rasti. Quebracho tanin je topen v hladni vodi, z naraščanjem temperature vode se njegova topnost povečuje. Ima največji delež kondenziranih taninov izmed vseh komercialnih taninskih izvlečkov (Quebracho Extract, 2003).

3.3 IN VITRO FERMENTACIJA SUBSTRATOV

In vitro fermentacijo škroba in celuloze za določanje HMK smo izvedli z metodo po Menke in Steingass (1988) (Hohenheimski plinski test). Vampni sok smo odvzeli iz vampov dveh kastriranih fistuliranih ovnov jezersko-solčavske pasme, eno do dve uri po jutranjem krmljenju. Živali sta bili krmljeni s senom za pokrivanje potreb za vzdrževanje. Termo steklenico, v katero smo prečrpali vampni sok, smo predhodno ogreli na 39 °C in jo prepihovali s CO₂, da bi zagotovili čim bolj ugodne pogoje za vampne mikroorganizme, podobne pogojem v vampu.

Pred pričetkom plinskega testa smo pripravili ustrezno število osušenih čistih steklenih brizgalk za plinski test in jih ustrezno označili. Delali smo v dveh ponovitvah. V brizgalke smo zatehtali vzorce. Vzorci so bili sestavljeni iz 175 mg substrata (celuloza ali škrob) in različnih koncentracij taninskih izvlečkov. Brizgalke smo nato zaprli z batom brizgalke, naoljenim s parafinskim oljem, za lažje in neprodušno zapiranje ter s plastičnim zamaškom. Dobro zaprte smo postavili v stojalo za brizgalke.

Pripravili smo pufer, ki ga sestavljajo destilirana voda, raztopine A, B in C (preglednica 5) ter resazurin (indikator prisotnosti za kisik; preglednica 6). Mešanico pufrov in resazurina smo segreli na $39 \pm 0,5$ °C, jo mešali z magnetnim mešalom in ves čas prepihovali s CO₂ pod pritiskom od 1,8 do 2,0 bara. Tik pred odvzemom vampnega soka smo pripravili reduksijsko raztopino (preglednica 6) in jo dodali dobro prepihani mešanici pufrov in resazurina, in sicer pet minut pred dodajanjem vampnega soka. Modrikasta raztopina se je obarvala najprej v rdeče, potem pa se je razbarvala.

Preglednica 5: Sestava raztopin A, B in C

Raztopina A	Raztopina B	Raztopina C
13,2 g CaCl ₂ × 2H ₂ O	35, 0 g NaHCO ₃	5,7 g Na ₂ HPO ₄
10,0 g MnCl ₂ × 4H ₂ O	4,0 g (NH ₄)HCO ₃	6,2 g KH ₂ PO ₄
1,0 g CoCl ₂ × 6H ₂ O	destilirana voda do 1000 ml	0,6 g MgSO ₄ × 7H ₂ O
0,8 g FeCl ₂ × 6H ₂ O		destilirana voda do 1000 ml
destilirana voda do 100 ml		

Preglednica 6: Sestava reduksijske raztopine in pufra

Redukcijska raztopina	Raztopina resazurina	Pufer*
47,5 ml destilirane vode	100 mg resazurina	474 ml destilirane vode
2 ml 1 M NaOH	destilirana voda do 100 ml	0,12 ml raztopine A
285 mg Na ₂ S × H ₂ O		237 ml raztopine B
		237 ml raztopine C
		1,22 ml resazurin
		50,0 ml reduksijske raztopine

*količina pufra zadošča za 50 brizgalk

Vampni sok smo prefiltrirali skozi štiri plasti gaze v ogret (40 °C) in s CO₂ prepihan meritni valj. Vampni sok smo dodali v popolnoma brezbarvno pufersko raztopino, ki smo jo stalno prepihovali s CO₂ in mešali. Količina potrebnega vampnega soka je bila odvisna od števila vzorcev v raziskavi. Mešanico vampnega soka in puferske raztopine (v razmerju 1 : 2) smo prepihovali s CO₂ še 15 minut.

Ob začetku polnjenja brizgalk smo CO₂ uvajali v prostor nad mešanico vampnega soka in pufra pod pritiskom 1 bara. Ogrete brizgalke smo napolnili s pomočjo avtomatske pipete, in sicer s 30 ml mešanice vampnega soka in pufra (10 ml vampnega soka in 20 ml pufra).

Tako nato smo iz brizgalk iztisnili zrak, jih zamašili s plastičnimi zamaški, postavili v stojalo, ki je bilo v kadi, napolnjeni z vodo, ogreti na $39 \pm 0,5$ °C.

Vzorci so vsebovali 175 mg substrata, to je celuloze ali škroba, kateremu smo dodali taninske izvlečke, tako, da je bila njihova koncentracija v mešanici vamnega soka in pufra v treh različnih koncentracijah (10, 20 in 40 mg taninskega izvlečka/30 ml mešanice), to je 0,33, 0,67 in 1,33 mg taninskega izvlečka/ml mešanice vamnega soka in pufra (preglednica 7). V poskus smo poleg vzorcev vključili tudi slepe vzorce (brizgalke brez vzorca) in standardne vzorce (seno mnogocvetne ljuljke). Prostornino proizvedenega plina smo merili po 4, 8, 12, 24, 36 in 48 urah fermentacije. Če je po 8. urah nastalo več kot 50 ml plina, smo brizgalko obrnili, plin iztisnili, brizgalko postavili nazaj v vodno kopel ter nadaljevali z inkubacijo.

Preglednica 7: Količina preparatov taninskih izvlečkov, substrata in medija

TI [†] (mg)	Substrat* (mg)	Medij [#] (ml)	Koncentracija TI (mg/ml medija)
0	175	30	0
10	175	30	0,17
20	175	30	0,33
40	175	30	1,33

[†]taninski izvlečki: F75, TAK, QUE

*substrat: celuloza in škrob

[#] medij: 20 ml pufra, 10 ml vamnega soka

Poskus smo opravili v dveh serijah zaradi omejenega števila mest za brizgalke v stojalu za brizgalke in velikosti vodne kopeli. V prvi seriji smo merili nastanek plina v 24. urah, v drugi seriji pa v 48. urah.

Po končani fermentaciji smo brizgalke z vsebino postavili v hladno vodo in njihovo vsebino prelili v epruvete, v katere smo dodali AgCl₂, da bi ustavili mikrobnou fermentacijo. Označene epruvete smo shranili na -20 °C v zamrzovalno skrinjo, kjer smo jih hranili do analize vsebnosti kratkoverižnih maščobnih kislin.

3.4 ANALIZA KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN

3.4.1 Priprava etrskih ekstraktov

Vzorce, ki smo jih po končanem plinskem testu zamrznili v epruvetah, smo odmrznili pri sobni temperaturi. Pripravili smo tri serije epruvet z navojem in zamaškom ter jih označili. V epruvete druge serije smo zatehtali približno 0,4 g suhega NaCl, v epruvete tretje serije okoli 0,3 g CaCl₂ (sušilno sredstvo), pri obeh pa smo naredili tudi standardno raztopino (stock solution), katere sestava je podana v preglednici 8.

Preglednica 8: Sestava delovne standardne raztopine

Ime kislina	Koncentracija (g/l)
ocetna	0,525
propionska	0,099
izo-maslena	0,095
n-maslena	0,096

Za delovni standard smo osnovno raztopino 10-krat razredčili z deionizirano vodo. Za interni standard smo uporabili krotonsko kislino, in sicer s koncentracijo 1 g/100 ml.

Za analizo kratkoverižnih maščobnih kislin smo uporabili modificirano metodo etrske ekstrakcije hlapnih maščobnih kislin po Holdeman in sod. (1977).

Odmrznjene vzorce smo centrifugirali 5 minut pri 2000 obratih v minuti. Nato smo odvzeli 3 ml supernatanta in ga prenesli v prvo serijo epruvet (prazne). Supernatantu smo dodali 0,2 ml 50 % H₂SO₄, da smo dobili pH ~ 2. Epruvete s tako pripravljenim vzorcem smo centrifugirali 10 minut pri 3000 obratih v minuti. V epruvete druge serije (z NaCl) smo odpipetirali 1,0 ml nakisanega vzorca, 0,2 ml 50 % H₂SO₄, 0,1 ml internega standarda (krotonska kislina) ter 1,0 ml dietiletra. Epruvete smo dobro zaprli in ročno stresali tako, da smo jo 20 krat obrnili, pri čemer pride do ekstrakcije HMK v dietileter. Epruvete smo postavili v centrifugo, jo vklopili in pri doseženih 2000 obratih v minuti izklopili. Iz epruvet smo s Pasteurjevimi pipetami posesali zgornjo etrsko fazo, v kateri so bile ekstrahirane kisline in jo prenesli v epruvete tretje serije (s CaCl₂). Epruvete smo morali

hitro zapirati, da ne bi prišlo do izgub kislin. Ekstrakcijo z 1 ml dietiletra smo ponovili in združili obe etrski fazi. Vse analize smo izvedli v dveh ponovitvah.

Raztopine za umerjanje plinskega kromatografa smo ekstrahirali na enak način kot vzorce, uporabili smo 1 ml raztopine. Rezultate analize smo podali v gramih posamezne HMK v litru medija po inkubaciji.

3.4.2 Analitska oprema in pogoji analize

Za analizo hlapnih maščobnih kislin smo uporabili plinski kromatograf Hewlett Packard 5890 A, proizvajalca Hewlett Packard (ZDA), opremljen s split/splitless injektorjem in FID detektorjem. Za ločbo HMK smo uporabili kapilarno kolono NUKOLTM, FUSED SILICA Capillary Column (Col:20988-03A), dolžine 30 m, premera 0,25 mm in debelino standardne faze 0,25 µm, proizvajalca SUPELCO (ZDA). V preglednici 9 so navedeni kromatografski pogoji in pretoki plinov za določanje HMK.

Preglednica 9: Kromatografski pogoji in pretoki plinov za določanje hlapnih maščobnih kislin (HMK)

TEMPERATURNI PROGRAM	
temperatura injektorja	185 °C
temperatura detektorja	290 °C
začetna temperatura kolone	75 °C
začetni zadrževalni čas	3,5 min
hitrost dviga temperature	14 °C/min
končna temperatura kolone	160 °C
končni zadrževalni čas	3 min
prostornina injiciranja	1 µl; split 30:1
čas analize	20 min
PRETOK PLINOV	
argon (nosilni plin)	2 ml/min
dušik (make-up plin)	30 ml/min
vodik (gorilni plin)	30 ml/min
sintetični zrak	300 ml/min

3.5 ANALIZA METANA

3.5.1 Priprava vzorcev za določanje produkcije plina in metana

Za določanje metana in skupne količine plina smo pripravili ustrezeno število 100 ml serumskih stekleničk in gumijastih zamaškov z aluminijastim navojnim tesnilom. Vse stekleničke in zamaške smo predhodno oprali, posušili in sterilizirali. V stekleničke smo zatehtali okoli 175 mg vzorcev, ki so jim bili dodani TI, tako, da so bile koncentracije TI v mediju enake kot pri plinskem testu. Istočasno smo pripravili tudi vzorce standardnega sena in slepe vzorce. Vse meritve smo opravili v dveh ponovitvah.

Postopek dodajanja mešanice vamnega soka in pufra vzorcem ter razmerje raztopin je bilo popolnoma enako kot pri plinskem testu, le da smo tu uporabili serumske stekleničke in ne brizgalk. Zatehtanim vzorcem v stekleničkah smo dodali 30 ml mešanice vamnega soka in pufrov ter s CO₂ preprihovali vsebino (3 minute) in prostor nad mešanico (2 minuti). Iz ogljikovega dioksida smo predhodno odstranili sledi kisika tako, da smo ga dovajali na segreto bakrovo (Cu) kolono. Po končanem preprihovanju smo z gumijastim zamaškom zatesnili stekleničko, da smo preprečili vdor zraka. Tako pripravljeni vzorce smo inkubirali v vodni kopeli, ogreti na 39 ± 0,5 °C.

3.5.2 Analitska oprema in pogoji analize

Za določitev skupnega volumna nastalega plina smo uporabili vodni stolpec povezan z injekcijsko brizgo, s pomočjo katerega smo določili prostornino nastalega plina in hkrati izenačili pritisk v steklenici z atmosferskim pritiskom.

Za določitev vsebnosti metana smo uporabili plinski kromatograf Shimadzu GC 14-A, opremljen z detektorjem na toplotno prevodnost. Uporabili smo jekleno kolono, polnjeno s polnilom PORAPACK Q, dolžine 4 m in premera 1/8 inča. V preglednici 10 so navedeni kromatografski pogoji in sestava kalibracijske mešanice za določanje metana.

Preglednica 10: Kromatografski pogoji in sestava kalibracijske mešanice za določanje metana

KROMATOGRAFSKI POGOJI	
temperatura injektorja	50 °C
temperatura detektorja	80 °C
temperatura kolone	30 °C
temperatura detektorskega bloka	80 °C
prostornina injiciranja	50 µl
čas analize	5,5 min
pretok nosilnega plina (Ar)	25 ml/min
KALIBRACIJSKA MEŠANICA	
CO ₂ (vol %)	44,67%
H ₂ (vol %)	14,92%
CH ₄ (vol %)	20,12%
N ₂ (vol %)	20,29%

3.5.3 Določanje produkije metana s plinsko kromatografijo

Pred merjenjem vsebnosti metana v nastalem plinu smo morali izenačiti pritisk v stekleničkah z zunanjim pritiskom in hkrati izmerili prostornino nastalega plina. Nato smo s plinotesno brizgalko (injektorsko iglo) iz steklenice odvzeli 50 µl plinskega vzorca in ga aplicirali v injektor plinskega kromatografa ter sprožili analizo. Pri inkubaciji nastale pline smo kvantitativno določili na osnovi zadrževalnega (retencijskega) časa na kromatografski koloni in jih kvantitativno ovrednotili na osnovi površine detektorskega signala. Rezultate smo izrazili v volumskih deležih metana v plinski mešanici.

3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

3.6.1 Statistični model

Podatke za statistično obdelavo smo pripravili v programu Microsoft Excel. Podatke pridobljene pri analizi HMK in metana smo korigirali na suho snov substrata. Korigirani podatki predstavljajo relativno vsebnost nastalih HMK, saj podatkov nismo korigirali z vsebnostjo HMK v mešanici vamnega soka in pufrov ob začetku inkubacije. Ob analizi podatkov smo ugotovili, da je pri vzorcu celuloze z dodanim 0,67 mg F75/ml medija prišlo do napake v tehtanju vzorca, zato ga v rezultati ne predstavljamo.

Z Microsoft Excelom urejene podatke smo obdelali s statističnim programom SAS/STAT (2001) po metodi najmanjših kvadratov v proceduri GLM (General Linear Model). Testirali smo sistematske vplive substrata (2 razredi), taninskega izvlečka (4 razredi) in koncentracije (4 razredi) ter interakcije med njimi in jih v model vključili kot sistematske vplive z nivoji. Za model smo se odločili na podlagi statistične značilnosti vpliva (p-vrednost), deleža pojasnjene variance (R^2) ter stopinj prostosti za posamezni vpliv in model v celoti. Za ugotavljanje statistično značilnih razlik med vplivi smo uporabili Duncan test.

Pri tem smo uporabili naslednji statistični model:

$$y_{ijkl} = \mu + K_i + S_j + T_k + KS_{ij} + KT_{ik} + ST_{jk} + e_{ijkl}, \quad \dots (1)$$

kjer je:

- y_{ijkl} = vsebnost ocetne kisline, propionske kisline, maslene kisline, metana,
razmerje med ocetno in propionsko kislino, vsota hlapnih maščobnih kislin,
razmerje med metanom in vsoto hlapnih maščobnih kislin
- μ = srednja vrednost
- K_i = koncentracija taninskega izvlečka; $i = 1, 2, 3, 4$
- S_j = vrsta substrata; $j = 1, 2$
- T_k = vrsta taninskega izvlečka; $k = 1, 2, 3$
- KS_{ij} = interakcija med koncentracijo taninskega izvlečka in vrsto substrata
- KT_{ik} = interakcija med koncentracijo in vrsto taninskega izvlečka
- ST_{jk} = interakcija med vrsto substrata in vrsto taninskega izvlečka
- e_{ijkl} = ostanek

4 REZULTATI

4.1 ANALIZA VARIANCE

Analiza variance za vsebnost C2, C3, C4, vsoto HMK, razmerje med C2 in C3, vsebnost metana (CH_4) in razmerje med metanom in vsoto HMK je podana v preglednicah 11 in 12 in zajema delež pojasnjene variance (R^2) ter p-vrednosti za posamezne vplive in njihove interakcije.

Preglednica 11: Analiza variance za posamezne vplive in njihove interakcije po 24. urah *in vitro* fermentacije

Parametri	ocetna (mmol/g SS)	propionska (mmol/g SS)	maslena (mmol/g SS)	vsota HMK	C2 : C3	metan (ml/g SS)	metan (vol %)	razmerje CH_4/HMK
R^2	0,96	0,98	0,93	0,98	0,96	0,97	0,95	0,94
konc	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
sub	<0,0001	<0,0001	0,0009	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
tanin	0,4021	<0,0001	0,0002	0,1609	<0,0001	0,3927	0,5715	0,1766
konc*sub	0,0303	<0,0001	0,0208	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
konc*tanin	0,0604	0,0449	0,9589	0,0207	0,0679	0,0038	0,0229	0,0001
sub*tanin	0,0335	0,0005	0,1133	0,9520	<0,0001	0,4849	0,5039	0,0966

*C2 : C3 = razmerje med ocetno in propionsko kislino, konc = koncentracija taninskega izvlečka, sub = vrsta substrata, tanin = vrsta taninskega izvlečka, konc*sub, konc*tanin, sub*tanin = interakcije med vplivi, razmerje CH_4/HMK = razmerje med prostornino metana in vsoto hlapnih maščobnih kislin

Delež pojasnjene variance (R^2) je pri vseh opazovanih lastnostih presegal 0,90. Na vsebnost HMK in metana sta statistično značilno vplivala tako koncentracija taninskega izvlečka kot uporabljen substrat ($p < 0,001$). Vrsta taninskega izvlečka je imela statistično značilen vpliv na vsebnost propionske ($p < 0,001$) in maslene kisline ($p < 0,001$) ter na razmerje med C2 in C3 ($p < 0,001$). Zabeležili smo tudi statistično značilen vpliv interakcij med koncentracijo taninskega izvlečka in uporabljenim substratom na vsebnost ocetne kisline ($p = 0,03$), propionske kisline ($p < 0,001$), maslene kisline ($p = 0,021$), vsoto HMK ($p < 0,001$), razmerje med C2 in C3 ($p < 0,001$), vsebnost metana ($p < 0,001$) in razmerje med metanom in vsoto HMK ($p < 0,001$). Interakcija med koncentracijo taninskega izvlečka in vrsto taninskega izvlečka je imela statistično značilen vpliv na vsebnost propionske kisline ($p = 0,045$), vsoto HMK ($p = 0,021$), vsebnost metana in volumski delež metana ($p = 0,004$ in $p = 0,023$) ter razmerje med metanom in vsoto HMK ($p < 0,001$). Interakcije med uporabljenim substratom in vrsto taninskega izvlečka so imele statistično

značilen vpliv na vsebnost ocetne kisline ($p = 0,034$), propionske kisline ($p < 0,001$) in posledično na razmerje med C2 in C3 ($p < 0,001$).

Preglednica 12: Analiza variance za posamezne vplive in njihove interakcije po 48. urah *in vitro* fermentacije

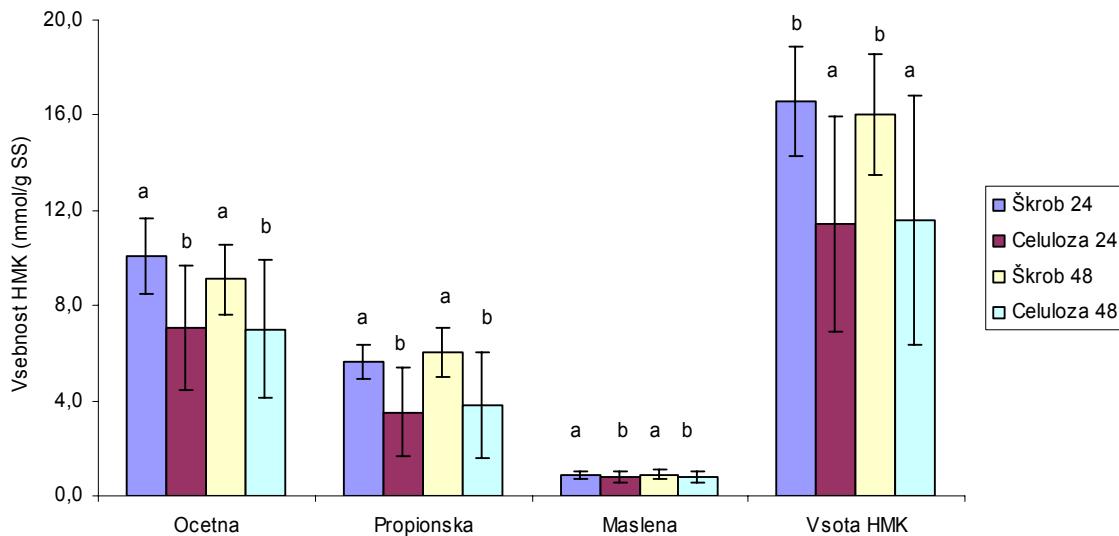
Parametri	ocetna (mmol/g SS)	propionska (mmol/g SS)	maslena (mmol/g SS)	vsota HMK	C2 : C3	metan (ml/g SS)	metan (vol %)	razmerje CH ₄ /HMK
R ²	0,91	0,90	0,95	0,93	0,89	0,96	0,88	0,58
konc	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,9326
sub	<0,0001	<0,0001	0,0176	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0554
tanin	0,0205	0,0274	0,0341	0,0119	0,0576	0,0081	0,2085	0,2047
konc*sub	0,0003	0,0002	0,0173	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0197	0,6205
konc*tanin	0,0134	0,5265	0,0015	0,0406	0,5222	<0,0001	0,0063	0,1236
sub*tanin	0,0580	0,0334	0,2201	0,0292	0,4800	0,0004	0,0101	0,0031

*C2 : C3 = razmerje med ocetno in propionsko kislino, konc = koncentracija taninskega izvlečka, sub = vrsta substrata, tanin = vrsta taninskega izvlečka, konc*sub,konc*tanin,sub*tanin = interakcije med vplivi, razmerje CH₄/HMK = razmerje med prostornino metana in vsoto hlapnih maščobnih kislin

Delež pojasnjene variance (R^2) po 48. urah *in vitro* fermentacije je v primerjavi s 24. urno fermentacijo nekoliko manjši, a je vedno presegal 0,88, z izjemo pri razmerju med metanom in vsoto HMK ($R^2 = 0,58$). Na vsebnost vseh HMK in metana sta statistično značilno vplivala koncentracija taninskega izvlečka in uporabljen substrat ($p < 0,001$), le pri razmerju med metanom in vsoto HMK ni statistične značilnosti ($p > 0,05$). Vrsta taninskega izvlečka je statistično značilno vplivala na vsebnost ocetne kisline ($p = 0,021$), propionske kisline ($p = 0,027$), maslene kisline ($p = 0,034$), vsoto HMK ($p < 0,012$) in na tvorbo metana ($p = 0,008$). Pri interakciji med koncentracijo taninskega izvlečka in uporabljenim substratom smo zabeležili statistično značilen vpliv na vsebnost ocetne in propionske kisline, vsoto HMK, razmerje med C2 in C3 in na nastanek metana ($p < 0,001$) ter na vsebnost maslene kisline ($p = 0,017$) in volumski delež metana ($p = 0,020$). Interakcija med koncentracijo taninskega izvlečka in vrsto taninskega izvlečka je imela statistično značilen vpliv na vsebnost ocetne kisline ($p = 0,013$), maslene kisline ($p = 0,002$), vsoto HMK ($p = 0,041$), vsebnost metana ($p < 0,001$) in volumski delež metana ($p = 0,006$). Interakcija med uporabljenim substratom in vrsto taninskega izvlečka je imela statistično značilen vpliv na vsebnost propionske kisline ($p = 0,033$), na vsoto HMK ($p = 0,029$), na nastanek metana ($p < 0,001$), volumski delež metana ($p = 0,010$) ter razmerje med metanom in vsoto HMK ($p = 0,003$).

4.2 VPLIV SUBSTRATA

Na sliki 4 so predstavljene povprečne vsebnosti posameznih HMK, vsota HMK, standardni odkloni in razlike v vsebnostih nastalih HMK med škrobom in celulozo v 24. in 48. urah fermentacije.



Slika 4: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 24. in 48. urah *in vitro* fermentacije celuloze in škroba

Po 24. urah fermentacije so se vsebnosti nastalih HMK med substratoma razlikovale. Statistično značilno ($p < 0,05$) več ocetne kisline je nastalo pri fermentaciji škroba (10,1 mmol/g SS) kot pri fermentaciji celuloze (7,1 mmol/g SS). Prav tako so mikroorganizmi tvorili statistično značilno več propionske kisline pri fermentaciji škroba (5,6 mmol/g SS) kot pri fermentaciji celuloze (3,5 mmol/g SS). Pri fermentaciji škroba je nastalo le nekoliko več (0,9 mmol/g SS) maslene kisline kot pri fermentaciji celuloze (0,8 mmol/g SS), kljub temu pa je bila razlika med substratoma statistično značilna ($p < 0,05$). Statistično značilno ($p < 0,05$) je vsota HMK večja pri fermentaciji škroba (16,6 mmol/g SS) kot pri fermentaciji celuloze (11,4 mmol/g SS).

Po 48. urah fermentacije je v povprečju nastalo statistično značilno ($p < 0,05$) več ocetne kisline pri fermentaciji škroba (9,1 mmol/g SS) kot pri fermentaciji celuloze (7,0 mmol/g SS), prav tako pa je nastalo statistično značilno ($p < 0,05$) več propionske kisline pri

fermentaciji škroba (6,0 mmol/g SS) kot pri fermentaciji celuloze (3,8 mmol/g SS) in statistično značilno ($p < 0,05$) več maslene kisline pri fermentaciji škroba (0,9 mmol/g SS) kot pri fermentaciji celuloze (0,8 mmol/g SS). Vsota HMK je bila statistično značilno večja pri fermentaciji škroba (16,0, mmol/g SS) kot pri fermentaciji celuloze (11,6 mmol/g SS).

Po 24. urah *in vitro* fermentacije je bilo razmerje med C2 in C3 širše pri fermentaciji celuloze (2,4 : 1) kot pri fermentaciji škroba (1,8 : 1). Razmerje med C2 in C3 je bilo po 48. urah *in vitro* fermentacije škroba ožje (1,5 : 1) kot pri fermentaciji celuloze (2,3 : 1). Med uporabljenima substratoma so obstajale statistično značilne razlike ($p < 0,05$) v razmerjih med C2 in C3.

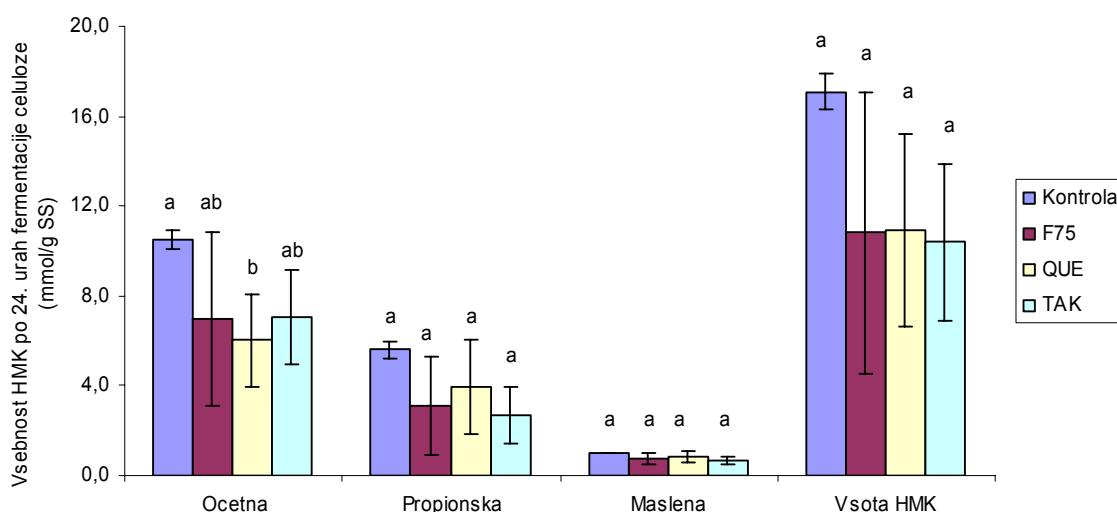
Po 24. urah inkubacije je nastalo statistično značilno ($p < 0,05$) manj metana pri fermentaciji celuloze (6,0 ml/g SS) kot pri fermentaciji škroba (16,2 ml/g SS). Temu podobna je bila tudi razlika v volumskem deležu nastalega metana med fermentacijo celuloze in škroba. V 48. urah inkubacije je nastalo statistično značilno ($p < 0,05$) več metana pri fermentaciji škroba (24,6 ml/g SS oziroma 5,8 vol %) kot pri fermentaciji celuloze (14,6 ml/g SS oziroma 4,2 vol % plina nastalega pri fermentaciji). Med uporabljenima substratoma so obstajale statistično značilne razlike ($p < 0,05$) v količini in volumskem deležu nastalega metana.

Po 24. urah *in vitro* fermentacije škroba smo ugotovili statistično značilno ($p < 0,05$) širše razmerje med prostornino nastalega metana in vsoto HMK (1,0 : 1) kot pri fermentaciji celuloze (0,5 : 1). Tudi po 48. urah fermentacije je bilo razmerje med metanom in vsoto HMK statistično značilno ($p < 0,05$) širše pri fermentaciji škroba (1,6 : 1) kot pri fermentaciji celuloze (1,3 : 1).

4.3 VPLIV VRSTE IN KONCENTRACIJE TANINSKEGA IZVLEČKA

4.3.1 Fermentacija celuloze v 24. urah *in vitro* inkubacije v vamnem soku

Na sliki 5 prikazujemo povprečne vsebnosti HMK, standardne odklone ter razlike v vplivu taninskih izvlečkov na vsebnost HMK po 24. urah *in vitro* fermentacije celuloze (priloga A). Vpliv vrste taninskega izvlečka na nastanek HMK je bil statistično neznačilen ($p > 0,05$), saj so bile razlike v vsebnostih nastalih HMK ob dodatku različnih taninskih izvlečkov neznatne. Dodatek taninskih izvlečkov k čisti celulozi je statistično značilno zmanjšal ($p < 0,05$) nastajanje HMK.



F75 – farmatan, QUE – quebracho, TAK – taninska kislina

Slika 5: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 24. urah *in vitro* fermentacije celuloze

Po 24. urah fermentacije je največ ocetne kisline nastalo pri fermentaciji celuloze brez dodanega taninskega izvlečka (10,5 mmol/g SS) (slika 5). Z dodajanjem taninskih izvlečkov celulozi se je sinteza ocetne kisline v 24. urah fermentacije zmanjšala, še najbolj z dodatkom QUE (6,0 mmol/g SS), nekoliko manjši, a podoben vpliv pa sta imela dodatka F75 in TAK. Propionske kisline je prav tako nastalo največ pri celulozi brez dodanega taninskega izvlečka (5,6 mmol/g SS), najmanj pa ob dodatku TAK (2,7 mmol/g SS). Največ maslene kisline je nastalo pri celulozi brez dodanega tanina (1,0 mmol/g SS), najbolj pa sta na njeno zmanjšanje vplivala dodatka F75 in TAK (0,7 mmol/g SS). Vsota

HMK je bila največja pri fermentaciji čiste celuloze (17,1 mmol/g SS), najmanjša pa pri dodatku TAK (10,4 mmol/g SS). Najširše razmerje med C2 in C3 smo zasledili ob dodatku TAK (2,9 : 1). Največ metana so mikroorganizmi tvorili pri fermentaciji celuloze brez dodanega taninskega izvlečka (11,4 ml/g SS), najmanj pa od dodatku TAK (4,1 ml/g SS). Razmerje med prostornino metana in vsoto HMK je bilo najširše pri fermentaciji čiste celuloze (0,7 : 1), najožje pa ob dodatku TAK (0,3 : 1).

V preglednici 13 so predstavljene povprečne vsebnosti posameznih HMK, vsote HMK, razmerje med C2 in C3, vsebnost metana in razmerje med prostornino metana in vsoto HMK, ki so nastale po 24. urah *in vitro* fermentacije celuloze ter vpliv vrste in koncentracije taninskih izvlečkov na vsebnost opazovanih lastnosti.

Največ ocetne kisline (C2) v vzorcih z dodanim taninskim izvlečkom je nastalo ob dodatku F75 v koncentraciji 0,33 mg/ml medija (10,3 mmol/g SS) (preglednica 13). Ob dodatku 0,67 mg QUE/ml medija je nastalo 6,5 mmol C2/g SS in podobno tudi pri TAK (7,1 mmol/g SS). Največja koncentracija dodane TAK (1,33 mg/ml medija) je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšala nastanek ocetne kisline na 4,7 mmol/g SS, še bolj pa sta zmanjšala nastajanje C2 F75 in QUE (3,7 in 3,6 mmol/g SS).

Največ propionske kisline je nastalo ob dodatku 0,33 mg QUE/ml medija (5,7 mmol/g SS) (preglednica 13). Največja koncentracija taninskih izvlečkov je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšala nastanek propionske kisline na 1,2 mmol/g SS ob dodatku F75 in TAK, ob dodatku QUE pa na 1,3 mmol/g SS.

Največ maslene kisline (C4) je nastalo ob dodatku 0,33 mg QUE/ml medija, in sicer 1,2 mmol/g SS (preglednica 13), podobne količine pa so nastale tudi ob dodatku F75 in TAK (1,0 in 0,9 mmol/g SS). Koncentracija 0,67 mg QUE/ml medija je zmanjšala nastanek maslene kisline na 0,9 mmol/g SS, medtem ko je z dodatkom enake količine pri TAK nastalo 0,7 mmol C4/g SS. Tudi na nastanek maslene kisline je statistično značilno vplivala ($p < 0,05$) največja koncentracija taninskega izvlečka. Ob dodatku 1,33 mg F75 in TAK/ml medija je nastalo 0,5 mmol C4/g SS, ob dodatku QUE pa 0,6 mmol C4/g SS.

Preglednica 13: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK), metana in razmerji med C2 in C3 ter prostornino metana in vsoto HMK po 24. urah *in vitro* fermentacije celuloze ob dodatku različnih taninskih izvlečkov

Opazovana lastnost	Konc. TI (mg/ml medija)	F75	QUE	TAK
Ocetna kislina (mmol/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	10,5±0,4 ^{aA} 10,3±1,2 ^{aA} - 3,7±0,1 ^{bB}	10,5±0,4 ^{aA} 8,0±0,0 ^{bB} 6,5±1,0 ^{bA} 3,6±0,0 ^{cB}	10,5±0,4 ^{aA} 9,4±0,3 ^{bAB} 7,1±0,6 ^{cA} 4,7±0,3 ^{dA}
Propionska kislina (mmol/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	5,6±0,4 ^{aA} 5,0±0,2 ^{aB} - 1,2±0,1 ^{bA}	5,6±0,4 ^{aA} 5,7±0,1 ^{aA} 4,9±0,1 ^{bA} 1,3±0,1 ^{cA}	5,6±0,4 ^{aA} 3,3±0,2 ^{bC} 3,0±0,0 ^{cB} 1,2±0,1 ^{dA}
Maslena kislina (mmol/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	1,0±0,0 ^{aA} 1,0±0,0 ^{aA} - 0,5±0,0 ^{bA}	1,0±0,0 ^{aA} 1,2±0,2 ^{aA} 0,9±0,0 ^{abA} 0,6±0,0 ^{bA}	1,0±0,0 ^{aA} 0,9±0,0 ^{bA} 0,7±0,0 ^{cB} 0,5±0,0 ^{dA}
Vsota HMK (mmol/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	17,1±0,8 ^{aA} 16,3±1,4 ^{aA} - 5,4±0,2 ^{bB}	17,1±0,8 ^{aA} 14,8±0,3 ^{bA} 12,3±0,9 ^{cA} 5,5±0,1 ^{dB}	17,1±0,8 ^{aA} 14,1±0,6 ^{bA} 10,8±0,4 ^{cA} 6,4±0,4 ^{dA}
C2 : C3	0 0,33 0,67 1,33	1,9±0,1 ^{bA} 2,0±0,2 ^{bB} - 3,1±0,1 ^{aB}	1,9±0,1 ^{bA} 1,4±0,0 ^{bC} 1,3±0,2 ^{bB} 2,8±0,3 ^{aB}	1,9±0,1 ^{cA} 2,4±0,1 ^{bA} 2,3±0,2 ^{bA} 4,0±0,1 ^{aA}
Metan (ml/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	11,4±0,8 ^{bA} 14,2±1,0 ^{aA} - 0,3±0,0 ^{cB}	11,4±0,8 ^{aA} 8,7±0,6 ^{bB} 4,3±0,1 ^{cA} 3,0±0,3 ^{cA}	11,4±0,8 ^{aA} 8,9±0,7 ^{bB} 3,0±0,8 ^{cA} 0,3±0,0 ^{dB}
Metan (vol %)	0 0,33 0,67 1,33	3,8±0,2 ^{aA} 4,2±0,4 ^{aA} - 0,6±0,0 ^{bB}	3,8±0,2 ^{aA} 2,8±0,2 ^{bB} 1,8±0,0 ^{dA} 2,3±0,0 ^{cA}	3,8±0,2 ^{aA} 3,5±0,3 ^{aAB} 1,9±0,2 ^{bA} 0,5±0,0 ^{cC}
Razmerje metan/vsota HMK	0 0,33 0,67 1,33	0,7±0,1 ^{aA} 0,9±0,1 ^{aA} - 0,1±0,0 ^{bB}	0,7±0,1 ^{aA} 0,6±0,0 ^{aB} 0,4±0,0 ^{bA} 0,5±0,0 ^{aA}	0,7±0,1 ^{aA} 0,6±0,0 ^{aAB} 0,3±0,1 ^{bA} 0,1±0,0 ^{cB}

*^{a b c} = vrednosti v stolpcih znotraj posameznih HMK, prostornine in volumskih deležev metana ter razmerij med C2 in C3, označene z malimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$), ^{A B C} = vrednosti v vrsticah, označene z velikimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$), C2 : C3 = razmerje med koncentracijami ocetne in propionske kisline, Konc. TI = koncentracija taninskega izvlečka, Razmerje metan/vsota HMK = razmerje med prostornino metana in vsoto HMK

Skupno je največ HMK nastalo pri fermentaciji čiste celuloze (17,1 mmol/g SS) (preglednica 13). Dodatek 0,33 mg TAK/ml medija je zmanjšal vsoto HMK na 14,1 mmol/g SS, dodatek 0,67 mg TAK/ml medija pa na 10,8 mmol/g SS. Statistično značilno ($p < 0,05$) je najmanj HMK nastalo ob dodatku 1,33 mg F75 in QUE/ml medija (5,4 oziroma 5,5 mmol/g SS), nekoliko več pa ob dodatku TAK (6,4 mmol/g SS).

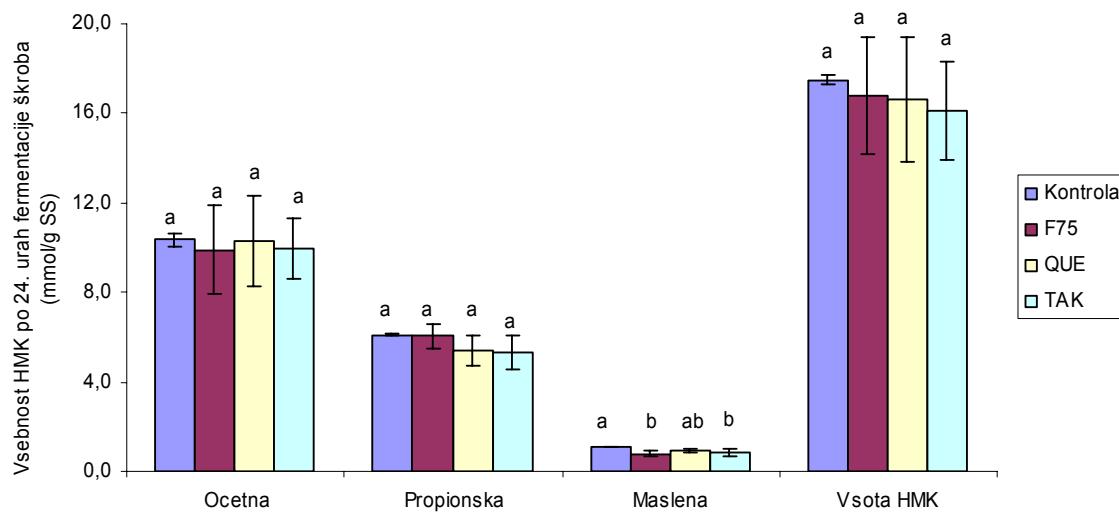
Razmerje med C2 in C3 se je po 24. urah fermentacije celuloze ob dodatku taninskih izvlečkov razširilo (preglednica 13). Najširše razmerje med C2 in C3 smo določili ob dodatku 1,33 mg TAK/ml medija (4,0 : 1), nekoliko ožje pa ob dodatku F75 in QUE (3,1 : 1 in 2,8 : 1). Najožje razmerje med C2 in C3 smo ugotovili ob dodatku 0,33 in 0,67 mg QUE/ml medija (1,4 : 1 in 1,3 : 1).

Metanogeni mikroorganizmi so pri fermentaciji celuloze brez dodatka taninskih izvlečkov po 24. urah fermentacije proizvedli 11,4 ml metana/g SS (preglednica 13). Med vrstami taninskih izvlečkov ni bilo statistično značilnih razlik ($p > 0,05$), medtem ko so znotraj koncentracij taninskih izvlečkov razlike obstajale. Največ metana je nastalo ob dodatku 0,33 mg F75/ml medija (14,2 ml/g SS oziroma 4,2 vol % nastalega plina). Na manjše nastajanje metana pa je statistično značilno ($p < 0,05$) vplival dodatek največje koncentracije F75 in TAK, kjer je nastalo 0,3 ml metana/g SS oziroma 0,5 in 0,6 vol % metana.

Najširše razmerje med prostornino nastalega metana in vsoto HMK pri fermentaciji celuloze smo ugotovili ob dodatku 0,33 mg F75/ml medija (0,9 : 1) (preglednica 13). Dodatek 1,33 mg F75 in TAK/ml medija je statistično značilno ($p < 0,05$) najbolj zožil razmerje med metanom in vsoto HMK (0,1 : 1). Med vrstami in koncentracijami taninskih izvlečkov so obstajale statistično značilne razlike ($p < 0,05$).

4.3.2 Fermentacija škroba v 24. urah *in vitro* inkubacije v vamnem soku

Na sliki 6 prikazujemo povprečne vsebnosti HMK, standardne odklone ter razlike v vplivu taninskih izvlečkov na vsebnost HMK po 24. urah *in vitro* fermentacije škroba (priloga A). Vpliv vrste taninskega izvlečka na nastanek HMK je bil statistično neznačilen ($p > 0,05$), saj so bile razlike med vsebnostmi nastalih HMK ob dodatku različnih taninskih izvlečkov v primerjavi s kontrolnim vzorcem zanemarljive.



F75 – farmatan, QUE – quebracho, TAK – taninska kislina

Slika 6: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 24. urah *in vitro* fermentacije škroba

Po 24. urah inkubacije škroba je največ ocetne kisline nastalo pri fermentaciji škroba brez dodanega taninskega izvlečka (10,3 mmol/g SS), ob dodatku taninskih izvlečkov pa se vsebnost ocetne kisline ni statistično razlikovala ($p < 0,05$) (slika 6). Dodatek taninskih izvlečkov ni imel statistično značilnega vpliva ($p > 0,05$) na tvorbo propionske kisline, saj so si bile nastale vsebnosti zelo podobne (od 6,1 do 5,3 mmol C3/g SS). Na manjši nastanek maslene kisline sta imela statistično značilen vpliv ($p < 0,05$) dodatka F75 in TAK (od 0,8 do 0,9 mmol C4/g SS). Vpliv vrste taninskih izvlečkov na vsoto HMK (zmanjšanje vsote HMK iz 17,5 na 16,1 mmol/g SS) in razmerje med C2 in C3 pri fermentaciji škroba ni bil statistično značilen ($p < 0,05$), sta pa dodatka QUE in TAK razširila razmerje med C2 in C3 (1,9 : 1). Vrsta taninskega izvlečka prav tako ni imela statistično značilnega vpliva ($p < 0,05$) na produkcijo metana in razmerje med prostornino

metana in vsoto HMK (1,0 : 1), se je pa produkcija metana ob dodatku taninskih izvlečkov zmanjšala.

V preglednici 14 so predstavljene povprečne vsebnosti posameznih HMK, vsote HMK, razmerje med C2 in C3, vsebnost metana in razmerje med prostornino metana in vsoto HMK, ki so nastale po 24. urah *in vitro* fermentacije škroba ter vpliv vrste in koncentracije taninskih izvlečkov na vsebnost opazovanih lastnosti.

Po 24. urah *in vitro* fermentacije škroba je največ ocetne kisline nastalo ob dodatku 0,33 mg QUE/ml medija (11,9 mmol/g SS) (preglednica 14). Podobne vsebnosti ocetne kisline so nastale tudi pri fermentaciji škroba brez dodanega taninskega izvlečka ter ob dodatku F75 ter TAK, vendar smo ugotovili, da razlike med njimi niso bile statistično značilne ($p < 0,05$). Dodatek 1,33 mg QUE in F75/ml medija je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal nastanek ocetne kisline na 7,7 in 7,8 mmol/g SS.

Največ propionske kisline je nastalo ob dodatku 0,33 mg F75/ml medija (6,5 mmol/g SS). Dodatek TAK je imel statistično značilen vpliv ($p < 0,05$) na nastajanje propionske kisline, kjer jo je nastalo najmanj (4,5 mmol/g SS) (preglednica 14).

Na koncentracijo maslene kisline vpliv vrste taninskih izvlečkov ni statistično značilno vplival, medtem ko je koncentracija taninskih izvlečkov statistično značilno vplivala ($p < 0,05$) na vsebnost C4. Večja koncentracija dodanega taninskega izvlečka je zmanjšala tvorbo maslene kisline, ki je bila statistično značilno najmanjša ob dodatku 1,33 mg F75/ml medija (0,6 mmol/g SS) (preglednica 14).

Preglednica 14: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK), metana in razmerji med C2 in C3 ter prostornino metana in vsoto HMK po 24. urah *in vitro* fermentacije škroba ob dodatku različnih taninskih izvlečkov

Opazovana lastnost	Konc. TI (mg/ml medija)	F75	QUE	TAK
Ocetna kislina (mmol/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	10,3±0,3 ^{aA} 11,8±1,7 ^{aA} 10,2±0,2 ^{abA} 7,8±0,1 ^{bA}	10,3±0,3 ^{bA} 11,9±0,6 ^{aA} 11,2±0,2 ^{abA} 7,7±0,4 ^{cA}	10,3±0,3 ^{abA} 11,4±0,7 ^{aA} 9,8±1,0 ^{abA} 8,7±0,3 ^{bA}
Propionska kislina (mmol/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	6,1±0,1 ^{aA} 6,5±0,2 ^{aA} 6,2±0,3 ^{aA} 5,4±0,0 ^{bA}	6,1±0,1 ^{aA} 6,0±0,0 ^{abA} 5,6±0,2 ^{bA} 4,6±0,3 ^{cA}	6,1±0,1 ^{aA} 6,0±0,4 ^{aA} 5,3±0,4 ^{aA} 4,5±1,0 ^{aA}
Maslena kislina (mmol/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	1,1±0,0 ^{aA} 1,0±0,0 ^{bA} 0,8±0,0 ^{cA} 0,6±0,0 ^{dB}	1,1±0,0 ^{aA} 1,0±0,0 ^{bA} 0,9±0,0 ^{cA} 0,8±0,0 ^{dA}	1,1±0,0 ^{aA} 1,0±0,1 ^{abA} 0,9±0,1 ^{bA} 0,7±0,0 ^{cB}
Vsota HMK (mmol/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	17,5±0,2 ^{aA} 19,3±1,9 ^{aA} 17,3±0,1 ^{aA} 13,8±0,1 ^{bA}	17,5±0,2 ^{aA} 18,9±0,6 ^{aA} 17,7±0,3 ^{bA} 13,1±0,2 ^{cA}	17,5±0,2 ^{aA} 18,4±1,1 ^{aA} 15,9±1,5 ^{abA} 14,1±1,3 ^{bA}
C2 : C3	0 0,33 0,67 1,33	1,7±0,1 ^{abA} 1,8±0,2 ^{aA} 1,6±0,1 ^{abB} 1,4±0,0 ^{bA}	1,7±0,1 ^{aA} 2,0±0,1 ^{aA} 2,0±0,0 ^{aA} 1,7±0,2 ^{aA}	1,7±0,1 ^{aA} 1,9±0,0 ^{aA} 1,9±0,0 ^{aAB} 1,9±0,3 ^{aA}
Metan (ml/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	18,9±0,0 ^{aA} 18,7±0,6 ^{aA} 16,6±0,3 ^{bB} 13,5±0,2 ^{cA}	18,9±0,0 ^{aA} 15,2±0,7 ^{bB} 18,0±0,3 ^{aA} 13,7±0,9 ^{bA}	18,9±0,0 ^{aA} 18,6±0,4 ^{aA} 18,4±0,5 ^{aA} 10,6±5,4 ^{bA}
Metan (vol %)	0 0,33 0,67 1,33	4,8±0,1 ^{aA} 4,7±0,0 ^{bA} 4,5±0,0 ^{cA} 4,2±0,0 ^{dA}	4,8±0,1 ^{aA} 4,9±0,3 ^{aA} 4,7±0,2 ^{abA} 4,1±0,3 ^{bA}	4,8±0,1 ^{aA} 4,8±0,1 ^{aA} 4,8±0,1 ^{aA} 4,2±0,2 ^{bA}
Razmerje metan/vsota HMK	0 0,33 0,67 1,33	1,1±0,0 ^{aA} 1,0±0,1 ^{abA} 1,0±0,0 ^{bB} 1,0±0,0 ^{abA}	1,1±0,0 ^{aA} 0,8±0,0 ^{bb} 1,0±0,0 ^{aAB} 1,1±0,1 ^{aA}	1,1±0,0 ^{aA} 1,0±0,0 ^{aA} 1,2±0,1 ^{aA} 0,7±0,3 ^{aA}

*^{a b c} = vrednosti v stolpcih znotraj posameznih HMK, prostornine in volumskih deležev metana ter razmerij med C2 in C3, označene z malimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$), ^{A B C} = vrednosti v vrsticah, označene z velikimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$), C2 : C3 = razmerje med koncentracijami ocetne in propionske kisline, Konc. TI = koncentracija taninskega izvlečka, Razmerje metan/vsota HMK = razmerje med prostornino metana in vsoto HMK

Skupno je največ HMK nastalo ob dodatku 0,33 mg F75/ml medija (preglednica 14). Koncentracija taninskih izvlečkov je imela na vsoto HMK statistično značilen vpliv ($p < 0,05$); najmanj jih je nastalo ob dodatku 1,33 mg QUE/ml medija (13,1 mmol/g SS).

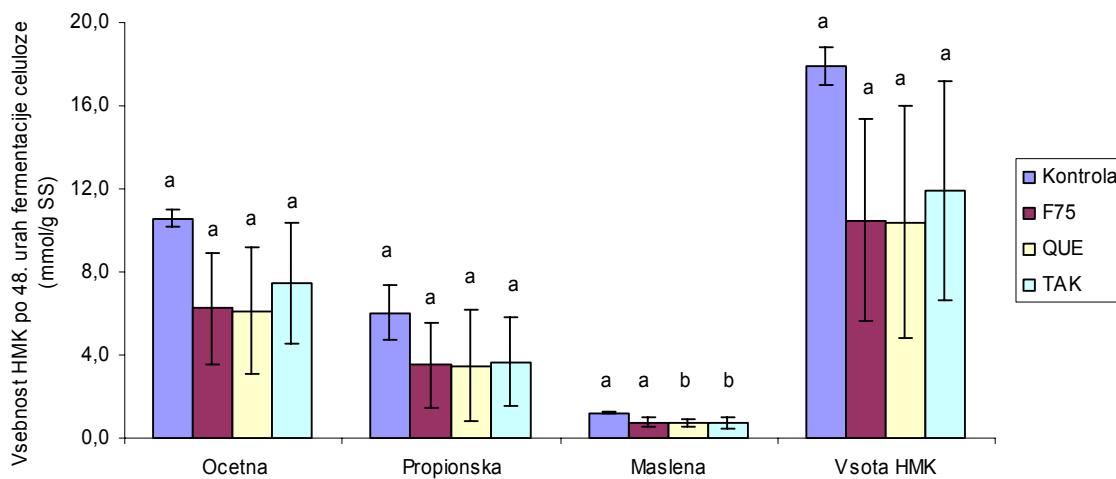
Razmerje med C2 in C3 je bilo najširše od dodatku 0,33 in 0,67 mg QUE/ml medija (2,0 : 1) (preglednica 14). Največja koncentracija dodanega taninskega izvlečka je statistično značilno ($p < 0,05$) zožila razmerje med C2 in C3, najbolj pri F75 (1,4 : 1). Dodatek 0,67 mg F75/ml medija je zmanjšal razmerje med C2 in C3 na 1,6 : 1, prav tako statistično značilno.

Pri fermentaciji škroba je po 24. urah fermentacije nastalo največ metana pri fermentaciji škroba brez dodanega tanina (18,9 ml/g SS oziroma 4,8 vol % nastalega plina) (preglednica 14). Dodatek 0,33 mg QUE/ml medija je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal nastanek metana na 15,2 ml/g SS oziroma 4,9 vol %, dodatek 0,67 mg F75/ml medija pa na 16,6 ml metana/g SS oziroma 4,5 vol %. Največja koncentracija vseh taninskih izvlečkov je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšala nastanek metana, najbolj pri dodatku TAK (10,6 ml/g SS oziroma 4,2 vol %).

Najširše razmerje med prostornino metana in vsoto HMK smo ugotovili ob dodatku 0,67 mg TAK/ml medija (1,2 : 1), najožje pa ob dodatku 1,33 mg TAK/ml medija (0,7 : 1). Med koncentracijami in vrstami taninskih izvlečkov smo ugotovili majhne, a statistično značilne razlike ($p < 0,05$).

4.3.3 Fermentacija celuloze v 48. urah *in vitro* inkubacije v vamnem soku

Na sliki 7 prikazujemo povprečne vsebnosti HMK, standardne odklone ter razlike v vplivu taninskih izvlečkov na vsebnost HMK po 48. urah *in vitro* fermentacije celuloze (priloga A). Vpliv vrste taninskega izvlečka na nastanek HMK je bil statistično neznačilen ($p > 0,05$), saj razlik v vsebnosti nastalih HMK med dodatki različnih taninskih izvlečkov ni bilo. Največ HMK je nastalo pri fermentaciji celuloze brez dodanega taninskega izvlečka, statistično značilno ($p < 0,05$) manj pa ob dodatku taninskih izvlečkov, v primerjavi s kontrolnim vzorcem.



F75 – farmatan, QUE – quebracho, TAK – taninska kislina

Slika 7: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 48. urah *in vitro* fermentacije celuloze

Največ ocetne kisline so mikroorganizmi v 48. urah *in vitro* fermentacije sintetizirali pri fermentaciji celuloze brez dodanega tanina, in sicer 10,6 mmol/g SS (slika 7). Dodatek taninskih izvlečkov je zmanjšal nastanek ocetne kisline (od 7,5 do 6,1 mmol C₂/g SS), vendar med vrstami taninskih izvlečkov ni bilo statistično značilnih razlik ($p < 0,05$). Prav tako je največ propionske kisline nastalo pri fermentaciji celuloze brez dodanega taninskega izvlečka (6,0 mmol/g SS) in manj ob dodatku taninskih izvlečkov (od 3,7 do 3,5 mmol C₃/g SS). Vrsta dodanih taninskih izvlečkov ni imela statistično značilnega vpliva ($p < 0,05$) na nastanek propionske kisline. Največ maslene kisline so mikroorganizmi sintetizirali pri fermentaciji celuloze brez dodanega taninskega izvlečka (1,2 mmol/g SS), njihov dodatek pa je vsebnost C₄ zmanjšal na 0,7 mmol/g SS. Skupno je največ HMK nastalo pri fermentaciji čiste celuloze (17,9 mmol/g SS), manj pa ob dodatku taninskih izvlečkov (od 11,9 do 10,4 mmol/g SS). Dodatek taninskih izvlečkov je razmerje med C₂ in C₃ razširil (iz 1,8 : 1 na 2,5 : 1). Na manjšo produkcijo metana pa sta statistično značilno ($p < 0,05$) najbolj vplivala dodatka QUE in TAK (12,4 ml in 11,8 ml metana/g SS). Najširše razmerje med produkcijo metana in vsoto HMK smo ugotovili pri fermentaciji celuloze z dodanim F75 (1,6 : 1), statistično značilno ($p < 0,05$) ožje pa ob dodatku TAK (0,8 : 1).

V preglednici 15 so predstavljene povprečne vsebnosti posameznih HMK, vsote HMK, razmerje med C₂ in C₃, vsebnost metana in razmerje med prostornino metana in vsoto HMK, ki so nastale po 48. urah *in vitro* fermentacije celuloze ter vpliv vrste in koncentracije taninskih izvlečkov na vsebnost opazovanih lastnosti.

Povečanje koncentracije taninskih izvlečkov je statistično značilno zmanjšalo ($p < 0,05$) nastajanje ocetne kisline, kar je še najbolj očitno pri povečanju koncentracije QUE od 0,33 mg/ml medija (9,9 mmol/g SS) na 0,67 mg/ml medija (4,4 mmol/g SS) (preglednica 15). Najmanj ocetne kisline je nastalo ob dodatku 1,33 mg F75/ml medija (3,0 mmol/g SS) (preglednica 15).

Vsebnost propionske kisline po 48. urah *in vitro* fermentacije celuloze se je ob dodatku taninskih izvlečkov v primerjavi s kontrolo statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšala. Izmed dodanih taninskih izvlečkov je največ propionske kisline nastalo ob dodatku 0,33 mg QUE/ml medija (5,9 mmol/g SS), medtem ko jo je pri večjih koncentracijah nastalo manj (preglednica 16). Dodatek 1,33 mg taninskih izvlečkov/ml medija je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal nastanek propionske kisline (1,0 mmol/g SS) (preglednica 15).

Največ maslene kisline je nastalo pri fermentaciji čiste celuloze (1,2 mmol/g SS). Dodatek največje koncentracije taninskih izvlečkov je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal nastanek maslene kisline, še najbolj pa dodatka 1,33 mg QUE in TAK/ml medija (0,5 mmol/g SS) (preglednica 15).

Preglednica 15: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK), metana in razmerji med C2 in C3 ter prostornino metana in vsoto HMK po 48. urah *in vitro* fermentacije celuloze ob dodatku različnih taninskih izvlečkov

Opazovana lastnost	Konc. TI (mg/ml medija)	F75	QUE	TAK
Ocetna kislina (mmol/g SS)	0	10,6±0,4 ^{aA}	10,6±0,4 ^{aA}	10,6±0,4 ^{aA}
	0,33	8,9±0,2 ^{bA}	9,9±1,1 ^{aA}	9,7±0,7 ^{abA}
	0,67	6,9±0,0 ^{cAB}	4,4±1,5 ^{bB}	8,9±0,1 ^{bA}
	1,33	3,0±0,1 ^{dB}	4,1±0,2 ^{bA}	3,8±0,4 ^{cAB}
Propionska kislina (mmol/g SS)	0	6,0±1,3 ^{aA}	6,0±1,3 ^{aA}	6,0±1,3 ^{aA}
	0,33	5,4±0,1 ^{abA}	5,9±0,5 ^{aA}	5,5±0,2 ^{aA}
	0,67	4,1±0,2 ^{bA}	3,6±3,4 ^{aA}	4,6±0,5 ^{aA}
	1,33	1,0±0,7 ^{cA}	1,0±0,1 ^{aA}	1,0±0,1 ^{bA}
Maslena kislina (mmol/g SS)	0	1,2±0,0 ^{aA}	1,2±0,0 ^{aA}	1,2±0,0 ^{aA}
	0,33	1,0±0,0 ^{bAB}	0,9±0,1 ^{bB}	1,1±0,0 ^{aA}
	0,67	0,8±0,0 ^{cA}	0,7±0,2 ^{bcA}	0,7±0,1 ^{bA}
	1,33	0,5±0,0 ^{dA}	0,6±0,0 ^{cA}	0,5±0,1 ^{cA}
Vsota HMK (mmol/g SS)	0	17,8±0,9 ^{aA}	17,8±0,9 ^{aA}	17,8±0,9 ^{aA}
	0,33	15,3±0,1 ^{bA}	16,7±1,6 ^{aA}	16,3±0,9 ^{abA}
	0,67	11,7±0,2 ^{cA}	8,7±5,1 ^{bA}	14,2±0,5 ^{bA}
	1,33	4,5±0,2 ^{dA}	5,7±0,2 ^{bA}	5,2±0,6 ^{cA}
C2 : C3	0	1,8±0,5 ^{bA}	1,8±0,5 ^{bA}	1,8±0,5 ^{bA}
	0,33	1,6±0,1 ^{bA}	1,7±0,0 ^{bA}	1,8±0,1 ^{bA}
	0,67	1,7±0,1 ^{bA}	1,8±1,3 ^{bA}	2,0±0,2 ^{bA}
	1,33	2,9±0,1 ^{aB}	4,1±0,5 ^{aA}	3,8±0,1 ^{aB}
Metan (ml/g SS)	0	24,2±1,0 ^{bA}	24,2±1,0 ^{aA}	24,2±1,0 ^{aA}
	0,33	29,1±0,7 ^{aA}	17,0±0,7 ^{bB}	18,4±3,8 ^{bB}
	0,67	11,8±0,4 ^{cB}	10,7±0,5 ^{cB}	15,4±0,7 ^{bA}
	1,33	8,9±0,8 ^{dA}	9,4±0,7 ^{cA}	1,5±0,5 ^{cB}
Metan (vol %)	0	5,7±0,2 ^{bA}	5,7±0,2 ^{aA}	5,7±0,2 ^{aA}
	0,33	6,2±0,0 ^{aA}	4,2±0,2 ^{bB}	5,6±0,4 ^{aA}
	0,67	3,4±0,1 ^{dB}	3,2±0,2 ^{cB}	4,5±0,2 ^{bA}
	1,33	4,5±0,1 ^{cA}	3,4±0,1 ^{cB}	1,0±0,2 ^{cC}
Razmerje metan/vsota HMK	0	1,4±0,1 ^{bA}	1,4±0,1 ^{bA}	1,4±0,1 ^{bA}
	0,33	1,9±0,0 ^{aA}	1,0±0,1 ^{ab}	1,1±0,2 ^{aB}
	0,67	1,0±0,0 ^{bA}	1,5±0,9 ^{aA}	1,1±0,9 ^{aA}
	1,33	2,0±0,3 ^{aA}	1,7±0,1 ^{aA}	0,3±0,1 ^{bB}

*^{a b c} = vrednosti v stolpcih znotraj posameznih HMK, prostornine in volumskih deležev metana ter razmerij med C2 in C3, označene z malimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$), ^{A B C} = vrednosti v vrsticah, označene z velikimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$), C2 : C3 = razmerje med koncentracijami ocetne in propionske kisline, Konc. TI = koncentracija taninskega izvlečka, Razmerje metan/vsota HMK = razmerje med prostornino metana in vsoto HMK

Skupno je največ HMK nastalo pri fermentaciji čiste celuloze (17,8 mmol/g SS) (preglednica 15), dodatek taninskih izvlečkov v različnih koncentracijah pa je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal njihov nastanek. Najmanj je HMK nastalo ob dodatku 1,33 mg F75/ml medija (4,5 mmol/g SS).

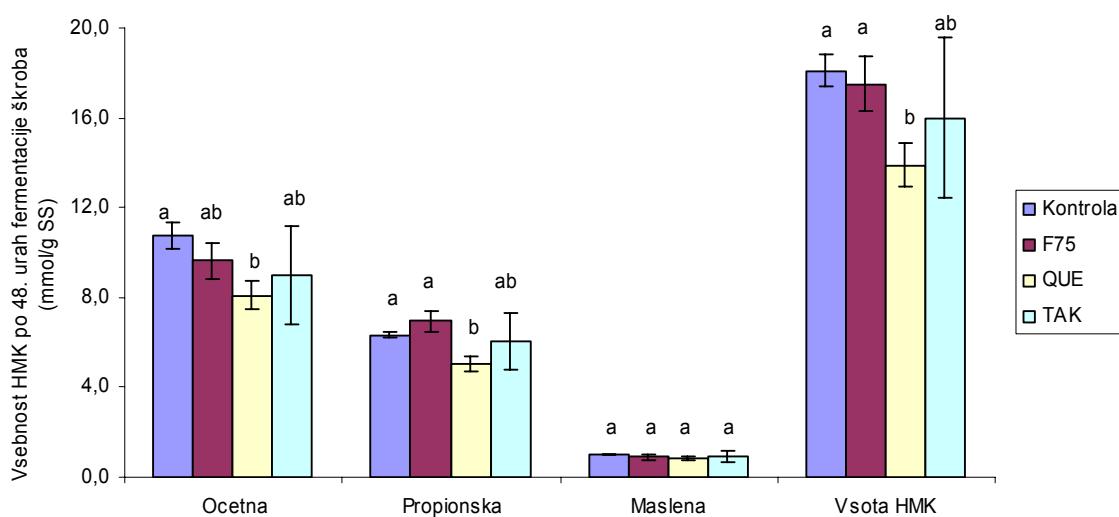
Razmerje med C2 in C3 je bilo najširše ob dodatku 1,33 mg QUE/ml medija (4,1 : 1) (preglednica 15). Največja koncentracija (1,33 mg/ml medija) dodanih taninskih izvlečkov celulozi je statistično značilno ($p < 0,05$) razširila razmerje med C2 in C3 v primerjavi s fermentacijo celuloze brez dodanega taninskega izvlečka. Ob dodatku taninskih izvlečkov v koncentracijah 0,33 in 0,67 mg/ml medija so si bila razmerja med C2 in C3 podobna (od 1,7 do 2,0 : 1). Najožje razmerje med C2 in C3 smo zabeležili ob dodatku 0,33 mg F75/ml medija (1,6 : 1).

Največ metana je po 48. urah *in vitro* fermentacije celuloze nastalo ob dodatku 0,33 mg F75/ml medija (29,1 ml/g SS oziroma 6,2 vol % nastalega plina) (preglednica 15). Dodatek 0,67 mg F75 in QUE/ml medija je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal nastanek metana v primejavi z dodatkom 0,33 mg taninskega izvlečka/ml medija. Največja koncentracija taninskega izvlečka (1,33 mg/ml medija) je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšala nastanek metana; najmanj ga je nastalo ob dodatku TAK (1,5 ml/g SS oziroma 1,0 vol % nastalega plina).

Najširše razmerje med produkcijo metana in vsoto HMK smo zabeležili pri fermentaciji celuloze z dodanim 1,33 mg F75/ml medija (2,0 : 1) (preglednica 15). Koncentracija taninskih izvlečkov dodanih celulozi je statistično značilno ($p < 0,05$) vplivala na razmerje le pri dodatku F75 in TAK, medtem ko pri QUE ni imela vpliva. Razlike med vrstami taninskih izvlečkov so obstajale pri dodatku 0,33 mg QUE in TAK/ml medija ter pri dodatku 1,33 mg TAK/ml medija. Najožje razmerje med produkcijo metana in vsoto HMK smo ugotovili pri dodatku 1,33 mg TAK/ml medija (0,3 : 1).

4.3.4 Fermentacija škroba v 48. urah *in vitro* inkubacije v vamnem soku

Na sliki 8 prikazujemo povprečne vsebnosti HMK, standardne odklone ter razlike v vplivu taninskih izvlečkov na vsebnost HMK po 48. urah *in vitro* fermentacije škroba (ne glede na koncentracijo dodanih taninskih izvlečkov) (priloga A). Vpliv vrste taninskega izvlečka na nastanek ocetne in propionske kisline je bil statistično značilen ($p < 0,05$), saj so med vsebnostmi nastale ocetne in propionske kisline obstajale razlike, medtem ko jih pri nastali masleni kislini ni bilo.



F75 – farmatan, QUE – quebracho, TAK – taninska kislina

Slika 8: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 48. urah *in vitro* fermentacije škroba

V 48. urah *in vitro* fermentacije škroba je največ ocetne kisline nastalo pri škrobu brez dodanega taninskega izvlečka (10,8 mmol/g SS) (slika 8). Različni taninski izvlečki so statistično značilno ($p < 0,05$) vplivali na nastanek ocetne kisline, in sicer je na zmanjšanje C2 najbolj vplival QUE (8,1 mmol/g SS). Največ propionske kisline je nastalo ob dodatku F75 (7,0 mmol/g SS), statistično značilno ($p < 0,05$) manj pa ob dodatku TAK (6,1 mmol/g SS) in najmanj ob dodatku QUE (5,0 mmol/g SS). Vrsta taninskega izvlečka ni imela statistično značilnega ($p < 0,05$) vpliva na nastanek maslene kisline (od 1,0 do 0,8 mmol/g SS). Skupno je največ HMK nastalo pri fermentaciji čistega škroba (18,1 mmol/g SS), statistično značilno ($p < 0,05$) najmanj pa ob dodatku QUE (13,9 mmol/g SS). Na ožje razmerje med C2 in C3 sta imela statistično značilen vpliv ($p < 0,05$) F75 in TAK (od 1,4

do 1,5 : 1). Na manjšo produkcijo metana je imela vrsta taninskega izvlečka statistično značilen vpliv ($p < 0,05$), predvsem QUE (22,4 ml metana/g SS). Na razmerje med produkcijo metana in vsoto HMK vrsta taninskega izvlečka ni imela statistično značilnega vpliva ($p > 0,05$).

V preglednici 16 so predstavljene povprečne vsebnosti posameznih HMK, vsote HMK, razmerje med C₂ in C₃, vsebnost metana in razmerje med prostornino metana in vsoto HMK, ki so nastale po 48. urni *in vitro* fermentaciji škroba ter vpliv vrste in koncentracije taninskih izvlečkov na vsebnost opazovanih lastnosti.

Največ ocetne kisline je nastalo ob dodatku 0,33 mg TAK/ml medija (11,2 mmol/g SS), medtem ko jo je manj nastalo ob dodatku F75 in QUE (10,2 in 8,6 mmol/g SS) (preglednica 16). Na manjše nastajanje ocetne kisline je statistično značilno ($p < 0,05$) vplivala največja koncentracija (1,33 mg/ml medija), predvsem TAK (6,5 mmol/g SS) in QUE (7,5 mmol/g SS), medtem ko dodatek F75 ni statistično značilno vplival na nastanek ocetne kisline.

Največ propionske kisline je nastalo ob dodatku 0,67 mg F75/ml medija (7,3 mmol/g SS) in nekoliko manj ob dodatku 0,33 mg TAK in F75/ml medija (7,1 in 7,0 mmol/g SS). Največja koncentracija (1,33 mg/ml medija) dodanih TAK in QUE je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšala nastanek propionske kisline (4,6 mmol/g SS) (preglednica 16).

Največ maslene kisline je nastalo ob dodatku 0,33 mg TAK/ml medija (1,2 mmol/g SS), statistično značilno manj pa ob dodatku QUE (0,9 mmol/g SS) (preglednica 16). Koncentracija 0,67 mg QUE/ml medija je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšala nastanek maslene kisline na 0,8 mmol/g SS, medtem ko je statistično značilno ($p < 0,05$) najmanj maslene kisline nastalo ob dodatku TAK v največji koncentraciji (0,6 mmol/g SS).

Preglednica 16: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin (HMK), metana in razmerji med C2 in C3 ter prostornino metana in vsoto HMK po 48. urah *in vitro* fermentacije škroba ob dodatku različnih taninskih izvlečkov

Opazovana lastnost	Konc. TI (mg/ml medija)	F75	QUE	TAK
Ocetna kislina (mmol/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	10,8±0,6 ^{aA} 10,2±0,2 ^{aAB} 9,3±1,2 ^{aA} 9,5±1,0 ^{aA}	10,8±0,6 ^{aA} 8,6±0,8 ^{bB} 8,1±0,2 ^{bA} 7,5±0,0 ^{bB}	10,8±0,6 ^{abA} 11,2±0,2 ^{aA} 9,3±1,2 ^{bA} 6,5±0,3 ^{cB}
Propionska kislina (mmol/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	6,3±0,1 ^{aA} 7,0±0,3 ^{aA} 7,3±0,1 ^{aA} 6,6±0,7 ^{aA}	6,3±0,1 ^{aA} 5,4±0,0 ^{bB} 5,2±0,2 ^{bC} 4,6±0,0 ^{cB}	6,3±0,1 ^{aA} 7,1±0,6 ^{aA} 6,5±0,1 ^{aB} 4,6±0,1 ^{bB}
Maslena kislina (mmol/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	1,0±0,0 ^{abA} 1,1±0,0 ^{aAB} 0,9±0,0 ^{bB} 0,8±0,1 ^{cA}	1,0±0,0 ^{aA} 0,9±0,0 ^{bB} 0,8±0,0 ^{cB} 0,7±0,0 ^{dAB}	1,0±0,0 ^{abA} 1,2±0,1 ^{aA} 1,0±0,0 ^{abA} 0,6±0,0 ^{cB}
Vsota HMK (mmol/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	18,1±0,7 ^{aA} 18,2±0,5 ^{aA} 17,5±1,3 ^{aA} 16,8±1,7 ^{aA}	18,1±0,7 ^{aA} 15,0±0,8 ^{bA} 14,0±0,1 ^{bcB} 12,8±0,0 ^{cB}	18,1±0,7 ^{aA} 19,5±0,9 ^{aA} 16,8±1,0 ^{bAB} 11,7±0,3 ^{cB}
C2 : C3	0 0,33 0,67 1,33	1,7±0,1 ^{aA} 1,5±0,0 ^{bA} 1,3±0,2 ^{bA} 1,4±0,0 ^{bB}	1,7±0,1 ^{aA} 1,6±0,2 ^{aA} 1,6±0,1 ^{aA} 1,6±0,0 ^{aA}	1,7±0,1 ^{aA} 1,6±0,1 ^{aA} 1,4±0,2 ^{aA} 1,4±0,0 ^{abA}
Metan (ml/g SS)	0 0,33 0,67 1,33	29,0±0,3 ^{aA} 29,0±0,0 ^{aA} 23,8±2,5 ^{bB} 18,1±0,1 ^{cB}	29,0±0,3 ^{aA} 23,5±1,2 ^{bB} 25,5±0,3 ^{bAB} 18,1±0,8 ^{cB}	29,0±0,3 ^{aA} 27,9±1,4 ^{aA} 28,5±0,7 ^{aA} 22,5±0,0 ^{bA}
Metan (vol %)	0 0,33 0,67 1,33	6,2±0,0 ^{aA} 6,1±0,0 ^{abA} 5,5±0,5 ^{bcA} 5,0±0,0 ^{cB}	6,2±0,0 ^{aA} 6,4±0,4 ^{aA} 5,9±0,2 ^{aA} 4,9±0,2 ^{bcB}	6,2±0,0 ^{aA} 6,2±0,3 ^{aA} 6,3±0,1 ^{aA} 5,5±0,0 ^{bA}
Razmerje metan/vsota HMK	0 0,33 0,67 1,33	1,6±0,0 ^{aA} 1,6±0,0 ^{aA} 1,4±0,2 ^{abA} 1,1±0,1 ^{bC}	1,6±0,0 ^{aA} 1,6±0,2 ^{abA} 1,8±0,0 ^{aA} 1,4±0,1 ^{bB}	1,6±0,0 ^{aA} 1,4±0,1 ^{bcA} 1,7±0,1 ^{abA} 1,9±0,0 ^{aA}

^{a b c} = vrednosti v stolpcih znotraj posameznih HMK, prostornine in volumskih deležev metana ter razmerij med C2 in C3, označene z malimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$), ^{A B C} = vrednosti v vrsticah, označene z velikimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$), C2 : C3 = razmerje med koncentracijami ocetne in propionske kisline, Konc. TI = koncentracija taninskega izvlečka, Razmerje metan/vsota HMK = razmerje med prostornino metana in vsoto HMK

Znotraj vpliva koncentracije taninskega izvlečka je imela vrsta taninskega izvlečka statistično značilen vpliv ($p < 0,05$) na tvorbo skupne količine HMK. Skupno je največ HMK nastalo pri fermentaciji škroba z dodatkom 0,33 mg TAK/ml medija (19,5 mmol/g SS). Pri enaki koncentraciji je statistično značilno ($p < 0,05$) manj HMK nastalo ob dodatku QUE (15,0 mmol/g SS). S povečevanjem koncentracije dodanih taninskih izvlečkov se je vsota HMK statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšala, najbolj ob dodatku 1,33 mg TAK/ml medija (11,7 mmol/g SS).

Vpliva vrste in koncentracije taninskega izvlečka na razmerje med C₂ in C₃ nista bila statistično značilna ($p > 0,05$) (preglednica 16), razen pri največji koncentraciji (1,33 mg TI/ml medija) dodanih taninskih izvlečkov. Razmerje med C₂ in C₃ je bilo najširše pri škrobu brez dodanega taninskega izvlečka (1,7 : 1). Ob dodatku F75 se je razmerje C₂ in C₃ le neznatno zožilo (od 1,5 : 1 na 1,3 : 1), ob dodatku QUE se ni spremenilo (1,6 : 1), ob dodatku TAK pa je bilo razmerje med C₂ in C₃ ožje le ob dodatku 1,33 mg TAK/ml medija (1,4 : 1).

Vpliv vrste taninskega izvlečka na nastanek metana je bil statistično značilen ($p < 0,05$), prav tako pa tudi vpliv koncentracije taninskih izvlečkov (preglednica 16). Največ metana je nastalo pri škrobu brez dodanega taninskega izvlečka in v vzorcu z dodanim 0,33 mg F75/ml medija (29,0 ml/g SS oziroma 6,2 vol % nastalega plina). Dodatek 0,33 mg QUE/ml medija je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal nastanek metana (23,5 ml/g SS oziroma 6,4 vol % nastalega plina). Najmanj metana je nastalo ob dodatku 1,33 mg F75 in TAK/ml medija, in sicer 18,1 ml/g SS oziroma 5,0 vol % nastalega plina.

Najširše razmerje med produkcijo metana in vsoto HMK smo ugotovili pri dodatku 1,33 mg TAK/ml medija (1,9 : 1), najožje pa pri dodatku 1,33 mg F75/ml medija (1,1 : 1). Koncentracija taninskega izvlečka znotraj vrste taninskih izvlečkov je imela statistično značilen vpliv ($p < 0,05$), medtem ko so med vrstami taninskih izvlečkov znotraj koncentracij obstajale statistično značilne razlike ($p < 0,05$) le pri največji koncentraciji (1,33 mg TI/ml medija).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Pri *in vitro* dodatku substrata v vampni sok ogljikovi hidrati fermentirajo v hlapne maščobne kisline (ocetna, propionska in maslena kislina), tvorijo se plini (ogljikov dioksid in metan) in nastaja mikrobna masa (Getachew in sod., 1998). Zmanjšanje prebavljivosti substrata ob dodatku taninskega izvlečka je lahko posledica oblikovanja kompleksov med tanini in beljakovinami ter ogljikovimi hidrati (Makkar in sod., 1988; Swain, 1979, cit. po Barry in McNabb, 1999). Lahko pa je tudi posledica zmanjšanja količine proteolitičnih, ureolitičnih, amilolitičnih in celulolitičnih encimov mikrobnih mikroorganizmov, njihovih glavnih fermentacijskih aktivnosti in celičnega razmnoževanja (Makkar in sod., 1988; McAllister in sod., 1994; Muhammed in sod., 1994). Sposobnost taninov, da zmanjšajo aktivnost vampnih mikroorganizmov in da reagirajo z beljakovinami in ogljikovimi hidrati, je odvisna od vrste tanina, molekulske mase, stopnje polimerizacije, pH in razmerja med beljakovinami in tanini (Mangan, 1988; McAllister in sod., 1994; Reed, 1995).

Molsko razmerje med nastalimi HMK je odvisno od vrste substrata. Iz hitro fermentirajočih ogljikovih hidratov (npr. škrob) nastane več propionske kisline v primerjavi z ocetno kislino. Pri počasi fermentirajočih ogljikovih hidratih (npr. celuloza) pa nastane več ocetne in manj propionske kisline (Butter in sod., 1999; Makkar in sod., 1995; Perez-Maldonado in sod., 1995). Tudi v našem poskusu smo pri fermentaciji celuloze zabeležili večjo tvorbo ocetne kisline v primerjavi s propionsko kislino (preglednica 14). Pri fermentaciji škroba je nastalo več propionske kisline kot pri fermentaciji celuloze (preglednica 15), medtem ko se vsebnost maslene kisline med substratoma ni statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovala. Ugotovili smo, da je več ocetne kisline in hkrati več metana nastalo pri fermentaciji škroba, kot pri fermentaciji celuloze. Predvidevamo, da je to posledica velikosti delcev substrata. V našem poskusu sta bila oba substrata zmleta v fin prah oziroma sta bila v obliki kosmičev, medtem ko ima substrat, ki ga žival zaužije in je v procesu prebave izpostavljen *in vivo* fermentaciji v predželodcih, veliko večje delce (bolj strukturiran). Fermentacija majhnih delcev substrata (npr. voluminozna krma, celuloza) vodi bolj v sintezo propionske kisline kot v sintezo ocetne

kisline. To pomeni, da bo pri tem nastalo manj metana, kljub temu, da je za voluminozno krmo znano, da se pri fermentaciji v predželodcih tvori več acetne kot propionske kisline. Zaradi manjše produkcije acetne kisline v predželodcih je sinteza maščob mleka manjša. Žgajnar (1990) poroča, da pri krmljenju obroka, ki ga sestavlja drobno mleto seno (celuloza), nastane večji delež propionske kisline in manjši delež acetne kisline kot, če živali krmimo z obrokom, sestavljenem predvsem na osnovi dolgega sena. Zato pri krmljenju drobno mletega sena nastane tudi manj metana. Prav tako je lahko povečana produkcija metana posledica prepihovanja mešanice vzorca in vamnega soka z ogljikovim dioksidom, ki je, tako kot acetna kislina, glavni vir ogljika za metanogenezo.

Na splošno naj bi bilo zmanjšanje produkcije plina *in vitro* povezano z manjšim nastankom HMK. Pred časom sta Blümmel in Bullerdieck (1997) predlagala, da je produkcija plina le odsev nastanka HMK. Das in sod. (1996) so izmerili skupno produkcijo plina in nastanek HMK po 24. in 48. urah *in vitro* fermentacije in ugotovili, da sta se produkcija plina in nastanek HMK zmanjševala s povečevanjem količine dodanega tanina. Do enakih ugotovitev smo prišli tudi v naši raziskavi, kjer je dodatek taninskih izvlečkov zavrl tvorbo HMK in zmanjšal produkcijo metana. S povečevanjem koncentracije taninskih izvlečkov se je zelo zmanjšal nastanek HMK in metana, najbolj pa je zmanjšala nastanek HMK in metana pri obeh uporabljenih substratih največja koncentracija taninskih izvlečkov (1,33 mg/ml medija). Širše razmerje med prostornino nastalega metana in vsoto HMK smo ugotovili ob uporabi manjše koncentracije dodanih taninskih izvlečkov, statistično značilno ($p < 0,05$) ožje razmerje pa ob dodatku največje koncentracije taninskih izvlečkov.

V poskusu smo zaznali razlike v nastanku HMK med substratoma ob dodanih taninskih izvlečkih. Na splošno so taninski izvlečki bolj zmanjšali nastanek acetne, propionske in maslene kisline pri fermentaciji celuloze, kot pri fermentaciji škroba. Najbolj je nastanek acetne kisline pri fermentaciji celuloze in škroba zaviral QUE (3,6 mmol/g SS in 7,7 mmol/g SS). Nastanek propionske kisline sta pri fermentaciji celuloze najbolj zavrla F75 in TAK (1,2 mmol/g SS), pri škrobu pa TAK (4,5 mmol/g SS). Nastanek maslene kisline sta pri fermentaciji celuloze najbolj ovirala F75 in TAK (0,5 mmol/g SS), pri fermentaciji škroba pa F75 (0,6 mmol/g SS). Muhammed in sod. (1994) so dokazali, da so se vsebnosti glavnih produktov fermentacije (acetna, propionska, maslena kislina) sorazmerno

zmanjšale pri fermentaciji substratov z dodatkom TAK, kar drži tudi v našem primeru (vsota HMK). Makkar in sod. (1995) ter Kumar in Vaithianathan (1990) poročajo, da se je zmanjšala vsebnost skupnih HMK pri *in vitro* fermentaciji v poskusih, v katerih so bili vključeni kondenzirani tanini. V naši raziskavi je vsebnost skupnih HMK zmanjšal dodatek QUE.

Razmerje med ocetno in propionsko kislino uporabljamo za oceno razlik med substrati (Getachew in sod., 1998). Salawu in sod. (1997) so zasledili spremembo v molarnem razmerju posameznih HMK, in sicer, da je ob prisotnosti taninov nastalo več ocetne in manj propionske kisline. Nasprotno pa Makkar in Becker (1996) poročata, da se je ob prisotnosti QUE delež propionske kisline povečal, delež ocetne kisline pa zmanjšal. V našem poskusu je dodatek QUE prav tako zožil razmerje med C2 in C3 po 24. urah fermentacije celuloze ter po 48. urah fermentacije celuloze in škroba. Dodatek F75 je zožil razmerje med C2 in C3 pri fermentaciji škroba, medtem ko je pri fermentaciji celuloze bilo razmerje med C2 in C3 nekoliko širše. Največja koncentracija taninskih izvlečkov (1,33 mg/ml medija) je razširila razmerje med C2 in C3 po 24. urah in 48. urah fermentacije celuloze. Nasprotno pa je dodatek TAK razširil razmerje med C2 in C3 po 24. urah fermentacije celuloze in škroba ter po 48. urah fermentacije celuloze. Po 48. urah fermentacije škroba je bilo razmerje med C2 in C3 ožje.

Wolin (1960) je poročal, da metan nastaja iz acetata in butirata, vendar ne iz propionata. Johnson K.A. in Johnson D.E. (1995) sta poročala, da obroki bogati s škrobom dajejo prednost nastanku propionata in hkrati zmanjšajo nastanek metana v vamu. Iz tega sta sklepala, da nižji pH pomeni manjšo produkcijo metana. V našem poskusu je več metana nastalo pri fermentaciji škroba kot pri fermentaciji celuloze. Pri fermentaciji škroba je nastalo relativno več propionske kisline kot pri fermentaciji celuloze, vendar pa je nastalo tudi veliko ocetne kisline, zato sklepamo, da je večja prostornina nastalega metana pri fermentaciji škroba posledica velike vsebnosti ocetne kisline, ki je znana kot terminalni akceptor elektronov v procesu metanogeneze (Madigan in sod., 2003). Dodatek taninskega izvlečka celulozi in škrobu je zmanjšal nastanek metana *in vitro*. S povečevanjem koncentracije dodanega taninskega izvlečka substratoma, se je količina nastalega metana zmanjšala. Pri fermentaciji celuloze sta na nastanek metana najbolj zaviralno delovala F75

in TAK (0,3 ml/g SS oziroma 0,5 vol % skupnega plina), prav tako pa tudi TAK pri fermentaciji škroba (10,6 ml/g SS oziroma 4,2 vol % skupnega plina). Sklepamo, da je močnejši vpliv F75 in TAK na nastanek metana najbrž posledica večje občutljivosti delovanja metanogenih bakterij na hidrolizirajoče tanine. Zucker (1983) poroča, da naj bi hidrolizirajoči tanini bolj zaviralno vplivali na vampne mikroorganizme kot kondenzirani tanini, medtem ko je Field (1989, cit. po Roth, 2003) dokazal, da je koncentracija, ki povzroči 50 % zmanjšanje delovanja metanogenih bakterij, 350 mg kondenziranih taninov/l medija in 700 mg hidrolizirajočih taninov/l medija. Śliwiński in sod. (2002) poročajo o manjši produkciji metana v *in vitro* poskusu s hrastovimi tanini, Roth (2003) pa poroča o statistično značilnem zmanjševanju nastalega metana s povečevanjem količine dodanega tanina v *in vitro* poskusu s sojinimi tropinami. Roth (2003) tudi poroča, da za vse vrste dodanih taninskih izvlečkov velja, da so emisije metana manjše kot skupna produkcija plina, ter da je F75 (hidrolizirajoči tanin) najbolj obetaven tanin, uporaben za zmanjšanje produkcije metana, ne da bi močno vplival na skupno produkcijo plina. Hess in sod. (2003) poročajo, da je hidroliziran taninski ekstrakt, kot je galotaninska kislina, inhibiral produkcijo metana za 50 %. Ekstrakti iz metuljnic, ki vsebujejo kondenzirane tanine so inhibirali metanogenezo (Hess in sod., 2003). Tavendale in sod. (2005) na podlagi rezultatov svojih raziskav vpliva kondenziranih taninov z ali brez dodatka polietenglikola (PEG) in 2-bromo-etilsulfonske kisline (BES) na nastanek metana pri *in vitro* inkubaciji močvirske nokote (*Lotus pedunculatus*) in lucerne (*Medicago sativa*) poročajo, da dodatek PEG posredno poveča nastanek metana, saj le-ta nase veže kondenzirane tanine in jih inaktivira. V vzorcih brez dodanega PEG je bila proizvodnja metana manjša, najverjetneje zaradi delovanja taninov (Tavendale in sod., 2005).

Dodatek taninskih izvlečkov krmi je zmanjšal intenzivnost mikrobine sinteze kratkoverižnih maščobnih kislin in metana pri fermentaciji v predželodcih (Chiquette in sod., 1988; Van Hoven in Furstenburg, 1992), kar je rezultat vezave in inhibicije delovanja tako mikrobnih encimov kot substrata (Das in sod., 1996). Zmanjšanje produkcije plina je posledica zmanjšane sinteze HMK (Blümmel in Bullerdieck, 1997), zmanjšanje nastajanja metana pa je posledica zmanjšane sinteze acetata in butirata (Wolin, 1960), ki sta poleg CO₂ glavna vira ogljika za metanogenezo.

5.2 SKLEPI

V naši raziskavi so taninski izvlečki zmanjšali tvorbo kratkoverižnih maščobnih kislin in metana pri *in vitro* fermentaciji celuloze in škroba v vamnem soku. S povečevanjem koncentracije dodanih taninskih izvlečkov se je intenzivnost mikrobne sinteze HMK in metana zmanjšala, najbolj pri največji koncentraciji taninskih izvlečkov (1,33 mg/ml medija). Na nastanek ocetne kisline je najbolj zaviralno vplival QUE, na sintezo propionske in maslene kisline pa F75, TAK. Razmerje med ocetno in propionsko kislino sta najbolj zožila dodatka QUE in F75, metana pa je najmanj nastalo od dodatku TAK.

Velikost delcev igra pomembno vlogo pri fermentaciji substratov v predželodcih prežvekovalcev. Fermentacija manjših delcev substrata (npr. voluminozna krma, celuloza) vodi v večjo sintezo propionske kisline v primerjavi z ocetno kislino, iz česar sledi, da bo nastalo manj metana. Zaradi manjše produkcije ocetne kisline v predželodcih, je prireja mleka slabša, saj je sinteza maščob mleka manjša.

Dodatek taninskih izvlečkov v krmo prežvekovalcev z namenom, da bi zmanjšali emisije metana v atmosferi, katere v velikem obsegu proizvedejo prežvekovalci, kažejo obetajoče rezultate, vendar pa je obseg zmanjšanja emisij metana omejen. Živali krmo z veliko koncentracijo taninskih izvlečkov zavračajo, zato je vnos taninskih izvlečkov preprečen, hkrati pa lahko velike koncentracije taninskih izvlečkov zaužite s krmo škodijo zdravstvenemu stanju živali in posledično zmanjšajo prirejo mleka (maščoba mleka). Delež maščobe v mleku je zmanjšan zaradi zavrte sinteze HMK, predvsem ocetne kisline, ki je glavna komponenta za sintezo maščob mleka, vendar pa je hkrati tudi glavni elektronov akceptor v procesu metanogeneze. Torej, če želimo zmanjšati emisijo metana v atmosferi, hkrati zavremo sintezo ocetne kisline in maščob mleka in obratno, če pa želimo doseči veliko prirejo živali, je posledica tega večja sinteza metana.

6 POVZETEK

Tanini so rastlinski polimeri, sestavljeni iz fenolnih enot, ki lahko tvorijo topne ali netopne komplekse z beljakovinami (encimi), aminokislinami, ogljikovimi hidrati, kovinskimi ioni in bakterijskimi celičnimi stenami (Makkar, 2003). Nastanek kompleksa je odvisen od lastnosti taninov, velikosti makromolekul (molekulska masa), pH okolja, temperature okolja (Perez-Maldonado in sod., 1995). Tanine delimo na hidrolizirajoče in kondenzirane, pri čemer imajo oboji tako koristne kot škodljive učinke. Po eni strani so posledice zauživanja rastlin z visoko koncentracijo taninov lahko zastrupitve, čiri in nekroze črevesa ter celo smrt (Hervas in sod., 2003), po drugi strani pa so tanini v prehrani prežvekovalcev zelo zanimivi zaradi sposobnosti povečanja vsebnosti beljakovin v tankem črevesu po prehodu skozi vamp (Mangan, 1988; Reed, 1995).

Namen naše naloge je bil ugotoviti, kako različne vrste taninskih izvlečkov in različne koncentracije taninskih izvlečkov vplivajo na tvorbo kratkoverižnih maščobnih kislin in metana pri *in vitro* fermentaciji celuloze in škroba v vamnem soku. Zanimalo nas je, ali bodo in kako bodo različni taninski izvlečki vplivali na nastajanje ocetne, propionske, maslene kisline in metana ter ali se bo njihova vsebnost s povečevanjem koncentracije taninskih izvlečkov zmanjševala.

In vitro fermentacijo substratov smo izvedli z metodo po Menke in Steingass (1988) (Hohenheimski plinski test). Za substrat smo uporabili krompirjev škrob in celulozo, ki smo jim dodali tri vrste taninskih izvlečkov: farmatan 75 (F75) in taninsko kislino (TAK), ki sta hidrolizirajoča tanina ter quebracho (QUE), ki je kondenziran tanin. Hlapne maščobne kisline, ki so nastale po 24. in 48. urah fermentacije celuloze in škroba, smo določili s plinsko kromatografijo. Za pripravo etrskih ekstraktov smo uporabili modificirano metodo etrske ekstrakcije hlapnih maščobnih kislin po Anaerobe laboratory manual, fourth edition (Holdeman in sod., 1977). Delež metana, ki je nastal pri fermentaciji, smo določili s plinsko kromatografijo, prostornino nastalega plina pa smo izračunali iz njegovega deleža in prostornine nastalega plina.

Dodatek taninskih izvlečkov je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal vsebnost HMK in nastanek metana v primerjavi s kontrolnim vzorcem (substrat brez dodanega taninskega izvlečka). Vrste taninskih izvlečkov niso statistično značilno vplivale na tvorbo HMK, je pa na njihovo tvorbo statistično značilno ($p < 0,05$) vplivala koncentracija taninskih izvlečkov. S povečevanjem koncentracije dodanih taninskih izvlečkov so se vsebnosti ocetne, propionske in maslene kisline ter nastanek metana zmanjšale, tako pri fermentaciji celuloze kot pri fermentaciji škroba, razmerje med ocetno in propionsko kislino pa se je pri fermentaciji celuloze ob dodatku taninskih izvlečkov razširilo.

Dodatek QUE je zaviralno vplival na vsebnost ocetne kisline po 24. urah fermentacije celuloze (3,6 mmol/g SS) in škroba (7,7 mmol/g SS). Po 48. urah fermentacije celuloze je najbolj zaviralno vplival F75 (3,0 mmol/g SS), pri fermentaciji škroba pa TAK (6,5 mmol/g SS). Na vsebnost propionske kisline sta po 24. urah fermentacije celuloze najbolj zaviralno vplivala dodatka F75 in TAK (1,5 mmol/g SS), pri fermentaciji škroba pa dodatek QUE in TAK (4,5 mmol/g SS). Po 48. urah fermentacije celuloze je najmanj propionske kisline nastalo ob dodatku največje koncentracije vseh treh taninskih izvlečkov (1,0 mmol/g SS), pri fermentaciji škroba pa ob dodatku QUE (4,6 mmol/g SS). F75 in TAK v največji koncentraciji sta najbolj zmanjšala nastanek maslene kisline (0,5 mmol/g SS) po 24. urah fermentacije celuloze, pri fermentaciji škroba pa je najbolj zaviralno deloval F75 (0,6 mmol/g SS). Po 48 urah fermentacije celuloze je nastanek maslene kisline najbolj zavrl dodatek TAK (0,5 mmol/g SS), prav tako pa tudi pri fermentaciji škroba (0,6 mmol/g SS).

Na širše razmerje med ocetno in propionsko kislino je po 24. urah fermentacije celuloze najbolj vplival dodatek TAK (4,0 : 1), na ožje razmerje pa QUE (1,3 : 1). Pri fermentaciji škroba je na nekoliko širše razmerje vplival dodatek QUE (2,0 : 1), na ožje pa F75 (1,4 : 1). Po 48. urah fermentacije celuloze QUE razširil razmerje (4,1 : 1), zožil pa ga je najbolj F75 (1,6 : 1). Po 48. urah fermentacije škroba je dodatek taninskih izvlečkov le zožil razmerje med ocetno in propionsko kislino, najbolj F75 (1,3 : 1).

Dodataka F75 in TAK sta po 24. urah fermentacije celuloze najbolj zmanjšala nastanek metana (0,3 ml/g SS), pri fermentaciji škroba pa TAK (10,6 ml/g SS). Po 48. urni

fermentaciji celuloze je nastanek metana najbolj zavrl dodatek TAK (1,5 ml/g SS), pri fermentaciji škroba pa dodatek F75 (18,1 ml/g SS).

7 VIRI

Akin D.E., Rigsby L.L., Theodorou M.K., Hartley R.D. 1988. Population changes of fibrolytic rumen bacteria in the presence of phenolic acids and plant extracts. Animal Feed Science and Technology, 19: 261-275

Austin P.J., Suchar L.A., Robbins C.T., Hagerman A.E. 1989. Tannin-binding proteins in saliva of deer and their absence in saliva of sheep and cattle. Journal of Chemical Ecology, 15: 1335-1347

Bae H.D., McAllister T.A., Yanke J., Cheng K.J., Muir A.D. 1993. Effect of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. Applied Environmental Microbiology, 59: 2132-2138

Barry T.N., McNabb W.C. 1999. Review article: The implication of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. British Journal of Nutrition, 81: 263-272

Blümmel M., Bullerdieck P. 1997. The need to complement *in vitro* gas production measurements with residue determinations from *in sacco* degradabilities to improve the prediction of voluntary intake of hays. Journal of Animal Science, 64: 71-75

Blümmel M., Givens D.I., Moss A.R. 2005. Comparison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an *in vitro* gas procedure. Animal Feed Science and Technology, 123-124: 379-390

Budavari S., O'Neil M.J., Smith A. Heckelman P.E. 1989. The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Eleventh edition. Rahway N.J. (ed.). USA, Merck & co.: 1606 str.

- Butter N.L., Dawson J.M., Butterly P.J. 1999. Effects of dietary tannins on ruminants. V: Secondary plant products: antinutritional and beneficial actions in animal feeding. Caygill J.C., Mueller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 51-72
- Chen M., Wolin M.J. 1979. Effect of monesin & lasalocid-sodium on growth of methanogenic & rumen saccharolytic bacteria. Applicable Environmental Microbiology, 38: 72-77
- Chiquette J., Cheng K.J., Costerton J.W., 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 Journal of Animal Science, 68: 751-760
- Chung K.T., Wei C., Johnson M.G. 1998a. Are tannins a double-edged sword in biology and health? Food Science and Technology, 9: 168-175
- Chung K.T., Wong T.Y., Wei C., Huang Y., Lin Y. 1998b. Tannins and human health: a review. Food Science and Nutrition, 38, 6: 421-464
- Church D.C. 1988. The ruminant animal: digestive physiology and nutrition. 1988. New Jersey, Prentice Hall: 564 str.
- Das M.M., Dwivedi P.N., Karnani, L.K., Upadhyay V.S. 1996. *In vitro* gas production and rumen degradation characteristics of *Zizyphus* leaves. Indian Journal of Animal Nutrition, 13: 142-147
- Dollahite J.W., Pigeon R.F., Champ B.J. 1962. The toxicity of gallic acid, pyrogallol, tannic acid and *Quercus havardi* in the rabbit. American Journal of Veterinarian Research, 23: 1261-1267

Driedger A., Hatfield E.E. 1972. Influence of tannins on the nutritive value of soybean meal for ruminants. *Journal of Animal Science*, 34: 465–468

Farmatan - naraven izvleček pridobljen iz zdravega kostanjevega lesa. 2003. Tanin Sevnica.

http://www.tanin.si/slo/04-01_farmatan.html (14. nov. 2005)

Getachew G., Blümmel M., Makkar H.P.S., Becker K. 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 72: 261-281

Hagerman A.E., Butler L.G. 1991. Tannins and lignins. V: Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites. Rosenthal G.A., Berenbaum M.R. (eds.). New York, Academic Press: 355-383

Haslam E. 1989. Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. Cambridge, Cambridge University Press: 230 str.

Hervas G., Frutos P., Giraldez F.J., Mantecon A.R., Alvarez Del Pino A.C. 2003. Effects of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 109: 65-78

Hess H.D., Monsalve L.M., Lascano C.E., Carulla J.E., Diaz T.E., Kreuzer M. 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits : effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54: 703-713

Holdeman L.V, Cato E.P., Moore W.E.C. 1977. Ether extraction of volatile fatty acids. V: Anaerobe laboratory manual. 4th edition. Virginia, Southern Printing Company: 132 str.

Jansman A.J.M. 1993. Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. Nutrition Research Review, 6: 209-236

Johnson K.A., Johnson D.E. 1995. Methane emissions from cattle. Journal of Animal Science, 73: 2483-2492

Jones G.A., McAllister T.A., Muir A.D., Cheng K.J. 1994. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. Applied Environmental Microbiology, 60: 1374-1378

Jones W.T., Anderson L.B., Ross M.D. 1973. Bloat in cattle. XXXIX. Detection of protein precipitants (flavolans) in legumes. New Zealand Journal of Agriculture Research, 16: 441-446

Jones W.T., Mangan J.L. 1977. Complexes of the condensed tannins of sainfoin with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. Journal of the Science of Food and Agriculture, 28: 126-136

Krumholz L.R., Bryant M.P. 1986. *Eubacterium oxidoreducens* sp. nov. requiring H₂ or formate to degrade gallate pyrogallol, phloroglucinol and quercetin. Archives of Microbiology, 144: 8-14

Kumar R., Vaithianathan S. 1990. Occurrence, nutritional significances and effects on animal productivity of tannins in tree leaves. Animal Feed Science and Technology, 30: 21-38

Li Y.G., Tanner G., Larkin P. 1996. The DMCA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. Journal of the Science of Food and Agriculture, 70: 89-101

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock Biology of Microorganisms. Tenth edition. London, Pearson Prentice Hall: 1019 str.

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: 241-256

Makkar H.P.S., Becker K. 1996. Effects of pH, temperature, and time on inactivation of tannins and possible implications in detannification studies. Journal of the Agriculture Food and Chemistry, 44: 1291-1295

Makkar H.P.S., Becker K. 1998. Adaptation of cattle to tannins: role of proline-rich proteins in oak-fed cattle. Animal Science, 67: 277-281

Makkar H.P.S., Blümmel M., Becker K. 1995. *In vitro* effects and interactions of tannins and saponins and fate of tannins in rumen. Journal of the Science of Food and Agriculture, 69: 481-493

Makkar H.P.S., Singh B., Dawra R.K. 1988. Effect of tannin-rich forages (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. British Journal of Nutrition, 60: 287-296

Mangan J.L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. Nutrition Research Reviews, 1: 209-231

Martin S.A. 1998. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. Journal of Animal Science, 76: 3123-3132

McAllister T.A., Bae H.D., Yanke L.J., Cheng K.-J, Muir A. 1994. Effect of condensed tannins birdsfoot trefoil on endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by anaerobic fungi. Canadian Journal of Microbiology, 40: 298-305

McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. 2002. Animal Nutrition. Digestion. Sixth edition. Harlow, Pearson Prentice Hall: 693 str.

McSweeney C.S., Palmer B., McNeill D.M., Krause D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. Animal Feed Science and Technology, 91: 83-93

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

Min B.R., Barry T.N., Attwood G.T., McNabb W.C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. Animal Feed Science and Technology, 106: 3-19

Min B.R., McNabb W.C., Barry T.N., Kemp P.D., Waghorn G.C., McDonald M.F. 1999. The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive efficiency and wool production in sheep during late summer and autumn. Journal of Agricultural Science Cambridge, 132: 323-334

Molan A.L., Waghorn G.C., Min B.R., McNabb W.C. 2000. The effect of condensed tannins from seven herbages on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. Folia Parasitologica, 47: 39-44

Morvan B., Bonnemoy F., Fonty G., Gouet P. 1996. Quantitative determination of H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. Current Microbiology, 32: 129-133

Morvan B., Dore J., Rieu-Lesme F., Foucat L., Fonty G., Gouet P. 1994. Establishment of hydrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb. FEMS Microbiology Letters, 117: 249-256

Moss A.R., Jouany J.-P., Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*, 49: 231-253

Mueller-Harvey I. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 3-20

Muhammed S., Stewart C.S., Acamovic T. 1994. Effects of tannic acid in cellulose degradation, adhesion and enzymic activity of rumen microorganisms. *Proceedings of Society of Nutritional Physiology*, 3: 174

Perez-Maldonado R.A., Norton B.W. 1996. The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothrysus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. *British Journal of Nutrition*, 76: 515-533

Perez-Maldonado R.A., Norton B.W., Kerven G.L. 1995. Factors affecting *in vitro* formation of tannin-protein complexes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69: 291-298

Product Information. 2003. Sigma-Aldrich, Inc.

<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/t0125pis.pdf>
(28. jul. 2006)

Quebracho Extract. 2003. Roy Wilson Dickson (10. apr. 2003)

<http://www.r-w-d.co.uk/Quebracho.html> (28. jul. 2006)

Reed J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73: 1516-1528

Roth S. 2003. Reducing methane emission and optimising N-Supply in ruminants by treating feeds with tannins. Doctoral Dissertation. Aachen, Shaker Verlag: 155 str.

Russell J.B. 1998. The importance of pH on the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. Journal of Dairy Science, 81: 3222-3230

Salawu M.B., Acamovic T., Stewart C.S., Hovell F.D. DeB., McKay I. 1997. Assessment of the nutritive value of *Calliandra calothrysus*: *in sacco* degradation and *in vitro* gas production in the presence of Quebracho tannins with or without Browse Plus. Animal Feed Science and Technology, 63: 219-232

SAS Institute Inc. 2001. The SAS System for Windows, Release 8.02. Cary, NC, USA

Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, 30, 12: 3875-3883

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

South P.K., Miller D.D. 1998. Iron binding by tannic acid: effects of selected ligands. Food Chemistry, 63, 2: 167-172

Tavendale M.H., Meagher L.P., Pacheco D., Walker N., Attwood G.T., Sivakumaran S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. Animal Feed Science and Technology, 123-124: 403-419

Van Hoven W., Furstenburg D. 1992. The use of purified condensed tannins as a reference in determining its influence on rumen fermentation. Comparative Biochemistry and Physiology, 191: 381-385

Vegetabil extracts. 2000. Otto Dille (25. jun. 2006)

<http://www.otto-dille.de/english/quebracho.html> (28. jul. 2006)

- Waghorn G.C., Shelton I.D., McNabb W.C., McCutcheon S.N. 1994. Effects of condensed tannin in *Lotus pedunculatus* on nutritive value of sheep. Nitrogenous aspects. Journal of Agricultural Science, 123: 109-119
- Waghorn G.C., Ulyatt M.J., Johns A., Fisher M.T. 1987. The effect of condensed tannins on the site of digestion of aminoacids and other nutrients in sheep fed *Lotus corniculatus*. British Journal of Nutrition, 57: 115-126
- Wang Y., Douglas G.B., Waghorn G.C., Barry T.N., Foote A.G. 1996. Effects of condensed tannins on *Lotus corniculatus* upon lactation performance in ewes. Journal of Agricultural Science Cambridge, 126: 353-362
- Wolin M.J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. Journal of Dairy Science, 43: 1452-1459
- Zucker W.V. 1983. Tannins: Does structure determine function? An ecological perspective. The American Naturalist, 121: 335-365
- Žgajnar J. 1990. Prehrana in krmljenje goved. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 564 str.

ZAHVALA

Mentorju doc. dr. Andreju Lavrenčiču se iskreno zahvaljujem za mentorstvo, sproščeno vzdušje in vzpodbudo tekom izvajanja poskusa ter za vse korektne napotke pri izdelavi diplomskega dela.

Somentorici asist. dr. Alenki Levart se zahvaljujem za somentorstvo, ustrežljivost, prijaznost in strokovni pregled diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi vsemu tehničnemu osebju v laboratorijih na Katedri za prehrano in Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za zootehniko, ki so mi pomagali pri izvajanju poskusa.

Romani Marinšek – Logar se zahvaljujem za pomoč in zaupanje ter krasno izkušnjo, ko sem se seznanila s samostojnim raziskovalnim delom in odgovornostjo pri delu v laboratoriju.

Vsem prijateljem in znancem se zahvaljujem za razumevanje pri pomanjkanju prostega časa, kolegicama Petri in Barbari pa za koristne predloge in vzpodbudne besede.

Stanetu Zdešarju se zahvaljujem za tehnično podporo in možnost, da sem lahko vzdrževala svoje »sonce«.

Za reševanje računalniških zagat se iskreno zahvaljujem računalniškemu geniju, bratu Ivanu – prihranil si mi veliko živcev.

Rok, hvala za moč, da sem študij pripeljala do konca in ljubezen, ki me je napajala.

Staršema Tanji in Ivanu se najlepše zahvaljujem za vso ljubezen ter da sta mi omogočila študij, me vzpodbujala in zaupala v moje odločitve. V zahvalo vama posvečam to diplomsko delo.

PRILOGE

Priloga A:

Vpliv vrste taninskega izvlečka po 24. in 48. urah *in vitro* fermentacije celuloze in škroba

ŠKROB 24 UR

Lastnost	kontrola	F75	QUE	TAK
Ocetna (mmol/g SS)	10,3±0,3 ^a	9,9±2,0 ^a	10,3±2,0 ^a	10,0±1,3 ^a
Propionska (mmol/g SS)	6,1±0,1 ^a	6,1±0,5 ^a	5,4±0,7 ^a	5,31±0,8 ^a
Maslena (mmol/g SS)	1,1±0,0 ^a	0,8±0,2 ^b	0,9±0,1 ^{ab}	0,9±0,2 ^b
Vsota HMK (mmol/g SS)	17,5±0,2 ^a	16,8±2,6 ^a	16,6±2,8 ^a	16,1±2,2 ^a
Ocetna : Propionska	1,7±0,1 ^a	1,6±0,2 ^a	1,9±0,2 ^a	1,9±0,1 ^a
Metan (ml)	18,9±0,0 ^a	16,3±2,4 ^a	15,7±2,0 ^a	15,9±4,8 ^a
Metan (%)	4,8±0,1 ^a	4,5±0,2 ^a	4,6±0,4 ^a	4,6±0,3 ^a
Razmerje: CH4/vsota HMK	1,1±0,0 ^a	1,0±0,0 ^a	1,0±0,1 ^a	1,0±0,2 ^a

CELULOZA 24 UR

Lastnost	kontrola	F75	QUE	TAK
Ocetna (mmol/g SS)	10,5±0,4 ^a	7,0±3,9 ^{ab}	6,0±2,0 ^b	7,1±2,1 ^{ab}
Propionska (mmol/g SS)	5,6±0,4 ^a	3,1±2,2 ^a	4,0±2,1 ^a	2,7±1,2 ^a
Maslena (mmol/g SS)	1,0±0,0 ^a	0,7±0,2 ^a	0,9±0,3 ^a	0,7±0,2 ^a
Vsota HMK (mmol/g SS)	17,1±0,8 ^a	10,8±6,3 ^a	10,9±4,3 ^a	10,4±3,5 ^a
Ocetna : Propionska	1,9±0,1 ^a	2,6±0,6 ^a	1,9±0,8 ^a	2,9±0,8 ^a
Metan (ml)	11,4±0,8 ^a	7,2±8,1 ^a	5,3±2,7 ^a	4,1±4,0 ^a
Metan (%)	3,8±0,2 ^a	2,4±0,1 ^a	2,3±0,4 ^a	1,9±1,4 ^a
Razmerje: CH4/vsota HMK	0,7±0,1 ^a	0,5±0,5 ^a	0,5±0,1 ^a	0,3±0,3 ^a

ŠKROB 48 UR

Lastnost	kontrola	F75	QUE	TAK
Ocetna (mmol/g SS)	10,8±0,6 ^a	9,7±0,8 ^{ab}	8,1±0,6 ^b	9,0±2,2 ^{ab}
Propionska (mmol/g SS)	6,3±0,1 ^a	7,0±0,4 ^a	5,0±0,4 ^b	6,1±1,2 ^{ab}
Maslena (mmol/g SS)	1,0±0,0 ^a	0,9±0,1 ^a	0,8±0,1 ^a	0,9±0,3 ^a
Vsota HMK (mmol/g SS)	18,1±0,7 ^a	17,5±1,2 ^a	13,9±1,0 ^b	16,0±3,6 ^{ab}
Ocetna : Propionska	1,7±0,1 ^a	1,4±0,1 ^a	1,6±0,1 ^{ab}	1,5±0,1 ^{bc}
Metan (ml)	29,0±0,3 ^a	23,6±5,0 ^{ab}	22,4±3,5 ^b	26,3±3,1 ^{ab}
Metan (%)	6,2±0,0 ^a	5,5±0,6 ^a	5,7±0,7 ^a	6,0±0,4 ^a
Razmerje: CH4/vsota HMK	1,6±0,0 ^a	1,4±0,3 ^a	1,6±0,2 ^a	1,7±0,2 ^a

CELULOZA 48 UR

Lastnost	kontrola	F75	QUE	TAK
Ocetna (mmol/g SS)	10,6±0,4 ^a	6,2±2,7 ^a	6,1±3,1 ^a	7,5±2,9 ^a
Propionska (mmol/g SS)	6,0±1,3 ^a	3,5±2,0 ^a	3,5±2,7 ^a	3,7±2,1 ^a
Maslena (mmol/g SS)	1,2±0,0 ^a	0,7±0,2 ^a	0,7±0,2 ^b	0,7±0,3 ^b
Vsota HMK (mmol/g SS)	17,9±0,9 ^a	10,5±4,9 ^a	10,4±5,6 ^a	11,9±5,3 ^a
Ocetna : Propionska	1,8±0,5 ^a	2,1±0,7 ^a	2,5±1,4 ^a	2,5±1,0 ^a
Metan (ml)	24,2±1,0 ^a	16,6±9,8 ^{ab}	12,4±3,7 ^b	11,8±8,3 ^b
Metan (%)	5,7±0,2 ^a	4,7±1,3 ^a	3,6±0,5 ^a	3,7±2,2 ^a
Razmerje: CH4/vsota HMK	1,4±0,1 ^{ab}	1,6±0,5 ^a	1,4±0,5 ^{ab}	0,8±0,4 ^b

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Tina KOS

**VPLIV TANINOV NA TVORBO KRATKOVERIŽNIH
MAŠČOBNIH KISLIN IN METANA PRI *IN VITRO*
FERMENTACIJI V VAMPNEM SOKU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007