

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Andreja LISJAK

**VPLIV TANINSKIH IZVLEČKOV IZ LESA PRAVEGA KOSTANJA
IN KEBRAČA NA HRANILNO VREDNOST SOJINIH TROPIN**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF SWEET CHESTNUT AND QUEBRACHO WOOD
TANNIN EXTRACTS ON NUTRITIVE VALUE OF SOYBEAN MEAL**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2010

S tem diplomskim delom končujem univerzitetni študij kmetijstva - zootehniko. Laboratorijski poskusi so bili opravljeni na Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Andreja Lavrenčiča.

Recenzentka: doc. dr. Tatjana Pirman

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Antonija HOLCMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Članica: doc. dr. Tatjana PIRMAN
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.

Andreja LISJAK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 636.084/.087(043.2)=163.6
KG prehrana živali/kostanjev tanin/kebračo/sojine tropine/*in vitro* fermentacija/produkcija plina/hlapne maščobne kisline/predželodci/*in vitro* navidezna prebavljivost/*in vitro* navidezna razgradljivost
KK AGRIS L51
AV LISJAK, Andreja
SA LAVRENČIČ, Andrej (mentor)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2010
IN VPLIV TANINSKIH IZVLEČKOV IZ LESA PRAVEGA KOSTANJA IN KEBRAČA NA HRANILNO VREDNOST SOJINIH TROPIN
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 48 str., 13 pregl., 9 sl., 6 pril., 56 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V diplomski nalogi smo ugotavljali, kakšen vpliv imata taninska izvlečka (TI) iz lesa pravega kostanja (F75) in kebrača (QUE) na *in vitro* aktivnost vampovih mikroorganizmov ter na *in vitro* razgradljivost in prebavljivost suhe snovi (SS) in surovih beljakovin (SB). Kot substrat smo uporabili sojine tropine (ST), ki smo jim dodali F75 in QUE v različnih koncentracijah (0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100g ST), ter jih inkubirali *in vitro* v puferiranem vampovem soku. Izmerili smo prostornine nastalega plina ob različnih časih inkubacije (od 0 do 96 ur), določili vsebnosti posameznih hlapnih maščobnih kislin (HMK) v inokulumu po 24. urah *in vitro* inkubacije, določili *in vitro* razgradljivosti SS (IVNRSS) in SB (IVNRSB) po 24. urah *in vitro* inkubacije ter določili *in vitro* prebavljivosti SS in SB na vzorcih, ki smo jim predhodno določili razgradljivost SS (IVNPSS) in SB (IVNPSB). Kazalnike produkcije plina smo ocenili z Gompertzovim modelom. Skupna potencialna produkcija plina (B), prostornina plina, ki je nastala v 24. urah fermentacije (GAS₂₄) in največja hitrost fermentacije (MFR) so se z naraščajočo koncentracijo TI zmanjševale. Na B in GAS₂₄ je imel večji inhibitorski učinek F75 (171 in 159 ml/g SS), na MFR pa QUE (6,7 ml/h). Čas največje hitrosti fermentacije (TMFR) se med TI in različnimi koncentracijami TI ni statistično značilno razlikoval. Vsebnost očetne kisline in vsota HMK se z naraščajočo koncentracijo TI nista spreminjali, medtem ko sta se vsebnosti propionske in maslene kisline zmanjšali, pri tem pa je F75 imel večji vpliv na nastanek propionske in maslene kisline (1,07 in 0,44 mmol/g SS) kot QUE (1,16 in 0,48 mmol/g SS). IVNRSS in IVNRSB sta se z naraščajočo koncentracijo TI zmanjševali, pri tem pa je F75 pri enakih koncentracijah bolj zmanjšal IVNRSB (187 g/kg SS) kot QUE (287 g/kg SS). IVNPSS in IVNPSB se pri manjših koncentracijah TI med F75 in QUE nista razlikovali, pri večjih pa je QUE (902 in 934 g/kg) pokazal večji inhibitorski učinek kot F75 (926 in 945 g/kg).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 636.084/.087(043.2)=163.6
CX animal nutrition/chestnut tannin/quebracho/soybean meal/*in vitro* fermentation/gas production/volatile fatty acids/rumen/*in vitro* apparent degradability/*in vitro* apparent digestibility
CC AGRIS L51
AU LISJAK, Andreja
AA LAVRENČIČ, Andrej (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2010
TI THE EFFECT OF SWEET CHESTNUT AND QUEBRACHO WOOD TANNIN EXTRACTS ON NUTRITIVE VALUE OF SOYBEAN MEAL
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 48 p., 13 tab., 9 fig., 6 ann., 56 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the present graduation thesis the effect of chestnut (F75) and quebracho (QUE) wood tannin extracts (TE) on *in vitro* activity of ruminal microorganisms and on *in vitro* degradability and digestibility of dry matter (DM) and crude protein (CP) was determined. As a substrate we used soybean meal (SM) with added F75 and QUE in different concentrations (0; 1.48; 2.91; 5.67; 10.71; 19.35 g/100 g SM) and incubated them *in vitro* in buffered rumen fluid. We measured volumes of gas at different times of incubation (from 0 to 96 hours) and determined the individual volatile fatty acids (VFA) content in inoculum after 24 hours *in vitro* incubation, *in vitro* DM and CP degradability (IVADMDeg and IVACPDeg) after 24 hours *in vitro* incubation and *in vitro* DM and CP digestibility (IVADMDig and IVACPDig) on the samples, that we previously determined IVADMDeg and IVACPDeg. With Gompertz model we estimated indicators of gas production. The total potential gas production (B), gas production in 24 hours (GAS₂₄) and maximum fermentation rate (MFR) were decreased with increasing concentration of TE. F75 had the greatest inhibitory effect on B and GAS₂₄ (171 in 159 ml/g DM) while QUE had the greatest inhibitory effect on MFR (6.7 ml/h). The time of maximum fermentation rates (TMFR) between TE and different concentrations of TE was not statistically significantly different. The content of acetic acid and the sum of VFA did not change with growing concentration, while the contents of propionic and butyric acid were decreased. F75 had greater effect on the formation of propionic and butyric acid (1.07 and 0.44 mmol/g DM) than QUE (1.16 and 0.48 mmol/g SS). IVADMDeg and IVACPDeg were with increasing concentration of TE decreased, while the F75 at the same concentration decreased IVACPDeg more than QUE. IVADMDig and IVACPDig did not differ at low concentrations of TE between F75 and QUE, but at higher concentrations QUE (902 and 934 g/kg) showed greater inhibitory effect than F75 (926 in 945 g/kg).

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 Delovanje na mikroorganizme in encime	6
2.2.2 Delovanje na beljakovine krme	7
2.2.3 Delovanje na ogljikove hidrate, vitamine in rudninske snovi	8
2.2.4 Vpliv taninov na prirejo mleka in mesa	9
2.3 VPLIV TANINOV NA TVORBO METANA	10
2.4 VPLIV TANINOV NA FERMENTACIJO IN TVORBO KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN	11
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 TANINSKI IZVLEČKI IN NJIHOVE KONCENTRACIJE	13
3.1.1 Vodni izvleček iz kostanjevega lesa Farmatan 75 (F75)	13
3.1.2 Vodni izvleček iz lesa kebrača (QUE)	13
3.2 SUBSTRAT	14
3.2.1 Tretiranje sojinih tropin	15

3.3	IN VITRO DOLOČANJE MIKROBNE AKTIVNOSTI IN PREBAVLJIVOSTI TER RAZGRADLJIVOSTI SOJINIH TROPIN	15
3.3.1	Mikrobna aktivnost	15
3.3.1.1	Plinski test	15
3.3.1.1.1	Izračun	17
3.3.1.2	Določitev analize kratkoverižnih maščobnih kislin	18
3.3.1.2.1	Priprava etrske ekstrakcije	18
3.3.1.2.2	Analitska oprema s pogoji analize	19
3.3.2	<i>In vitro</i> prebavljivost in razgradljivost SS in SB	20
3.3.2.1	Priprava filter vrečk in vzorca	20
3.3.2.2	Inkubacija vzorcev	20
3.3.2.3	Določanje <i>in vitro</i> navidezne razgradljivosti in prebavljivosti suhe snovi	21
3.3.2.4	Določanje <i>in vitro</i> navidezne razgradljivosti in prebavljivosti surovih beljakovin	21
3.3.2.4.1	Izračuni	21
3.4	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	22
3.4.1	Statistični model	22
4	REZULTATI	23
4.1	VPLIV TANINA, NJEGOVE KONCENTRACIJE TER INTERAKCIJE MED TANINOM IN KONCENTRACIJO NA POSAMEZNE PARAMETRE	23
4.2	KEMIJSKA SESTAVA SUBSTRATA	24
4.3	PLINSKI TEST	25
4.3.1	Skupna potencialna produkcija plina (B)	25
4.3.2	Specifična hitrost fermentacije (C) in konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A)	26
4.3.3	Največja hitrost fermentacije (MFR)	26
4.3.4	Čas največje hitrosti fermentacije (TMFR)	27
4.3.5	Produkcija plina v 24. urah (GAS₂₄)	27
4.4	VSEBNOST IN DELEŽI Hlapnih maščobnih kislin	28
4.5	<i>IN VITRO</i> RAZGRADLJIVOST SUHE SNOVI IN SUROVIH BELJAKOVIN	31

4.6	<i>IN VITRO</i> PREBAVLJIVOST SUHE SNOVI IN SUROVIH BELJAKOVIN	32
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	34
5.1	RAZPRAVA	34
5.1.1	Vpliv na mikrobnost	34
5.1.1.1	Plinski test	34
5.1.1.2	Hlapne maščobne kisline	35
5.1.2	Vpliv na prebavljivost in razgradljivost beljakovin krme	37
5.2	SKLEPI	39
6	POVZETEK	41
7	VIRI	43
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava taninskih izvlečkov	13
Preglednica 2: Koncentracije taninov na 100 g substrata	14
Preglednica 3: Sestava sojinih tropin, tretiranih z različnimi koncentracijami kostanjevega in kebračo tanina	14
Preglednica 4: Sestava raztopin A, B, C	16
Preglednica 5: Sestava redukcijske raztopine in pufra	16
Preglednica 6: Delovna standardna raztopina	18
Preglednica 7: Kromatografski pogoji za določanje hlapnih maščobnih kislin (HMK)	19
Preglednica 8: Vpliv tanina, njegove koncentracije ter interakcije med taninom in koncentracijo na kazalnike <i>in vitro</i> fermentacije, količino nastalih HMK ter <i>in vitro</i> prebavljivost in razgradljivost SS in SB	23
Preglednica 9: Vpliv taninov na specifično hitrost fermentacije (C) in na konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A)	26
Preglednica 10: Vpliv taninov na največjo hitrost fermentacije (MFR) (ml/h)	27
Preglednica 11: Vpliv taninov na čas največje fermentacije (TMFR) (h)	27
Preglednica 12: Vpliv vrste in koncentracije taninov na vsebnost očetne, propionske in maslene kisline ter skupnih hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 24. urah <i>in vitro</i> fermentacije	29
Preglednica 13: Vpliv vrste in koncentracije taninov na deleže (%) očetne, propionske in maslene kisline od vseh HMK po 24. urah fermentacije	30

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Kemijska struktura hidrolizirajočega tanina (Rochfort in sod., 2008)	4
Slika 2: Kemijska struktura kondenziranega tanina (Rochfort in sod., 2008)	5
Slika 3: Vpliv taninov na fermentacijo beljakovin (Mueller-Harvey, 2006)	8
Slika 4: Vpliv koncentracije taninov na skupno potencialno produkcijo plina (ml/g SS)	25
Slika 5: Produkcija plina v 24. urah (ml/g SS)	28
Slika 6: <i>In vitro</i> razgradljivost suhe snovi po 24. urah <i>in vitro</i> inkubacije (g/kg)	31
Slika 7: <i>In vitro</i> razgradljivost surovih beljakovin po 24. urah <i>in vitro</i> inkubacije (g/kg)	32
Slika 8: <i>In vitro</i> prebavljivost suhe snovi po 24. urah <i>in vitro</i> inkubacije (g/kg)	33
Slika 9: <i>In vitro</i> prebavljivost surovih beljakovin po 24. urah <i>in vitro</i> inkubacije (g/kg)	33

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Vpliv taninov na skupno potencialno produkcijo plina (B; ml/g SS)
- Priloga B: Vpliv taninov na produkcijo plina v 24. urah fermentacije (GAS₂₄; ml/g SS)
- Priloga C: Vpliv taninov na *in vitro* navidezno razgradljivost SS po 24. urah *in vitro* inkubacije (IVNRSS; g/kg)
- Priloga D: Vpliv taninov na *in vitro* navidezno razgradljivost SB po 24. urah *in vitro* inkubacije (IVNRSB; g/kg)
- Priloga E: Vpliv taninov na *in vitro* navidezno prebavljivost SS po 24. urah *in vitro* inkubacije (IVNPSS; g/kg)
- Priloga F: Vpliv taninov na *in vitro* navidezno prebavljivost SB po 24. urah *in vitro* inkubacije (IVNPSB; g/kg)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti
B	skupna potencialna produkcija plina
C	specifična hitrost fermentacije
C2	ocetna kislina
C3	propionska kislina
C4	maslena kislina
DHMK	delež hlapnih maščobnih kislin
F75	farmatan 75
GAS ₂₄	produkcija plina v 24. urah fermentacije
HMK	hlapne maščobe kisline
IVNPSB	<i>in vitro</i> navidezna prebavljivost surovih beljakovin
IVNPSS	<i>in vitro</i> navidezna prebavljivost suhe snovi
IVNRSB	<i>in vitro</i> navidezna razgradljivost surovih beljakovin
IVNRSS	<i>in vitro</i> navidezna razgradljivost suhe snovi
K0	oznaka za koncentracijo 0 g/100 g sojinih tropin
K1	oznaka za koncentracijo 1,48 g/100 g sojinih tropin
K2	oznaka za koncentracijo 2,91 g/100 g sojinih tropin
K3	oznaka za koncentracijo 5,67 g/100 g sojinih tropin
K4	oznaka za koncentracijo 10,71 g/100 g sojinih tropin
K5	oznaka za koncentracijo 19,35 g/100 g sojinih tropin
MFR	največja hitrost fermentacije
QUE	kebračo taninski izvleček
SB	surove beljakovine
SHMK	vsota hlapnih maščobnih kislin

SS	suha snov
ST	sojine tropine
TI	taninski izvleček
TMFR	čas največje hitrosti fermentacije

1 UVOD

Pri intenzivni reji visoko produktivnih prežvekovalcev, kot so npr. krave molznice, mikrobnna masa, sintetizirana v predželodcih, pogosto ne zadovolji vseh potreb prežvekovalca po beljakovinah. Mikroorganizmi namreč porabljajo beljakovine obroka za svojo rast in razmnoževanje, čeprav bi jih gostitelj učinkoviteje izkoristil, če bi jih prebavljaj neposredno v pravem želodcu in tankem črevesu. Zato je za veliko prirejo mleka in mesa potrebno zmanjšati razgradnjo surovih beljakovin v predželodcih, za kar je na voljo več načinov; še najpogosteje krmo in krmila obdelamo s toploto ali formaldehidom. Za toplotno obdelavo porabimo veliko energije, vendar pa obdelava pri prenizki temperaturi ne zaščiti beljakovin pred razgradnjo. Pri uporabi previsoke temperature pa beljakovine zaščitimo tudi pred prebavo v tankem črevesu, kar ni zaželeno. Z uporabo formaldehida sicer dosežemo ugodne rezultate, vendar je njegova uporaba močno omejena zaradi njegove kancerogenosti (Lavrenčič, 2001).

V zadnjih letih se je v Zahodni Evropi izrazilo povečalo zanimanje za uporabo taninskih izvlečkov, predvsem zaradi prepovedi uporabe krme živalskega izvora v prehrani prežvekovalcev in zaradi prepovedi uporabe nutritivnih antibiotikov (Lavrenčič, 2001). Krma živalskega izvora je bila zanimiva z vidika velike vsebnosti surovih beljakovin in rudninskih snovi. Namesto nje danes uporabljamo žita ter sojine in sončnične tropine (Sellier, 2003). Nutritivne antibiotike smo uporabljali za selektivno delovanje na posamezne mikroorganizme in boljšo izkoristljivost energije. Kot alternativo nutritivnim antibiotikom danes uporabljamo probiotike, prebiotike, zelišča in rastlinske izvlečke, med katere spadajo tudi tanini (Jouany in Morgavi, 2007).

Prav slednjim v zadnjih letih posvečamo posebno pozornost, saj so le-ti sposobni tvoriti (i)reverzibilne vezi z beljakovinami, rudninskimi snovmi, ogljikovimi hidrati, kot so celuloza, hemiceluloze in pektini, z encimi, ki so vključeni v prebavo ogljikovih hidratov in beljakovin, ter (nezaželenimi) mikroorganizmi, kot sta *E.coli* in *Salmonella spp.* Povezujejo se tudi z endogenimi beljakovinami, ki sestavljajo bakterijske celične membrane (Makkar in sod., 1987, cit. po Roth, 2003). Dodajanje taninskih preparatov v obrok ugodno deluje na zdravje in počutje domačih živali, poleg tega nimajo negativnih posledic za okolje (Lavrenčič, 2001).

Namen našega dela je bil ugotoviti, v kolikšni meri lahko zaščitimo beljakovine pred razgradnjo v predželodcih, če jim dodamo različne koncentracije vodnega izvlečka iz kostanjevega lesa in lesa kebrača in kako to vpliva na njihovo prebavljivost in razgradljivost. S plinskim testom smo želeli ugotoviti, ali vodni izvlečki iz lesa kostanja in kebrača vplivajo na aktivnost mikroorganizmov, z analizo hlapnih maščobnih kislin pa smo želeli ugotoviti, ali se pri tem spreminja tudi potek fermentacije.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VRSTE TANINOV

Tanine definiramo kot naravno pridobljene vodotopne polifenole različnih molekulskih mas, ki se od ostalih naravnih fenolnih komponent razlikujejo po tem, da oborijo beljakovine iz raztopin (Spencer in sod., 1988, cit. po Bhat in sod., 1998). Pri vodotopnosti taninov velja poudariti, da je ta odvisna od njihove molekulske mase in da je pri molekulah z veliko molekulsko maso močno omejena (Lavrenčič, 2001).

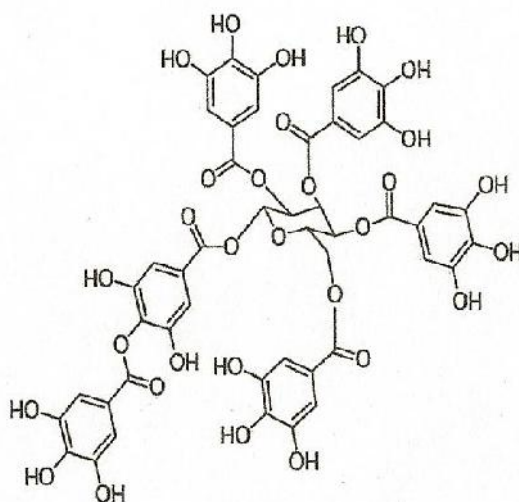
Veliko topnih fenolov ima taninom podobno strukturo in kemične lastnosti, vendar ne obarjajo beljakovin. Obstajajo tudi fenoli z veliko molekulsko maso, ki imajo podobno zgradbo kot tanini, a niso topni v vodi (Bate-Smith, 1972, cit. po Van Soest in sod., 1987).

Glede na njihovo kemijsko strukturo (Hagerman in Butler, 1989, cit. po Hagerman in sod. 1992) in lastnosti, jih delimo v dve veliki skupini: hidrolizirajoče in kondenzirane tanine.

2.1.1 Hidrolizirajoči tanini

Hidrolizirajoči tanini so sestavljeni iz ogljikohidratnega jedra, v katerem so hidroksilne skupine zaestrene z galno, elagno ali heksahidroksidifensko kislino (Mangan, 1988). Ti tanini zlahka hidrolizirajo v vroči vodi, bodisi s pomočjo encimov acilhidrolaze, lahko pa tudi v rahlo kislih ali v alkalnih pogojih (Haslam, 1966, cit. po Van Soest in sod., 1987).

Hidrolizirajoče tanine delimo na elagitanine in galotanine (slika 1). Elagitanini vsebujejo enega ali več hidroksidifenolnih ostankov, ki so z estersko vezjo povezani z glukozo in galno kislino. S hidrolizo so ostanki hidroksidifenola izpostavljeni laktonizaciji, zaradi česar nastane elagna kislina (Chung in sod., 1998a). Pri hidrolizi galotaninov encimi tanin acilhidrolaze, ki nastanejo v predželodcih kot produkti mikroorganizmov vrst *Selenomonas ruminatum* in *Streptococcus* spp., cepijo esterske vezi (McSweeney in sod., 2001). Tako nastaneta galna in elagna kislina. Galna kislina nato dekarboksilira v pirogalol, ta pa se pretvori v resorcinol in fluoroglucinol (Krumholz in Bryant, 1986, cit po McSweeney in sod., 2001). Hidroliza galotaninov lahko poteka tudi s kisljinami ali bazami (Chung in sod., 1998a).



Slika 1: Kemijska struktura hidrolizirajočega tanina (Rochfort in sod., 2008)

Takechi in sod. (1985, cit. po De Bruyne in sod., 1999) navajajo, da je aktivnost hidrolizirajočih taninov odvisna od števila galoilnih ali heksahidroksidifenolnih skupin, pri kondenziranih taninih pa je aktivnost odvisna od stopnje kondenzacije.

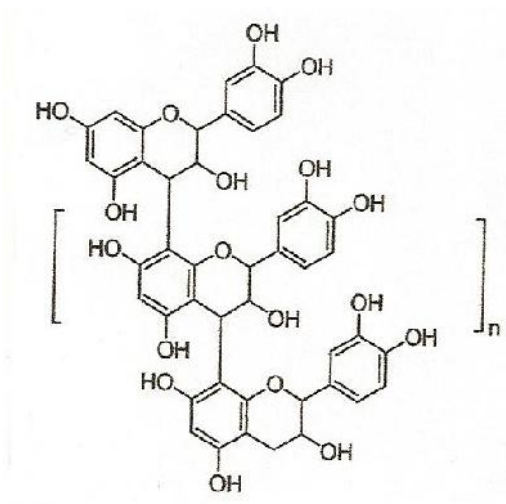
Schanderl (1970, cit. po Van Soest in sod., 1987) hidrolizirajoče tanine, glede na produkte hidrolize, razvršča v štiri razrede. Poleg galotaninov in elagitaninov, dodaja še tara-galotanine (galna kislina in kininska kislina kot jedro) in kavne tanine (kavna kislina in kininska kislina).

2.1.2 Kondenzirani tanini

Kondenzirane tanine (slika 2), ki jih imenujemo tudi proantocianidini, sestavlja mešanica flavonoidnih polimerov. Ime proantocianidini so dobili zaradi rdeče barve, ki nastaja med segrevanjem v kislini (Van Soest in sod., 1987).

Perez-Maldonado in Norton (1996, cit. po Kairuki in Norton, 2008) sta ugotovila, da je vpliv kondenziranih taninov na prebavo v predželodcih odvisen predvsem od rastlinske vrste, v kateri se nahajajo, njihove kemijske oblike in koncentracije. Rastlinska vrsta določa tako trpkost taninov, kot tudi njihovo molekularno strukturo. Kondenzirani tanini so lahko v prosti obliki, vezani na beljakovine ali na vlaknino (Perez-Maldonado in Norton 1996, cit. po Kairuki in Norton, 2008).

Chung in sod. (1998b) navajajo, da imajo kondenzirani tanini kompleksnejšo strukturo kot hidrolizirajoči tanini. Strukture kondenziranih taninov so polimerizirani produkti flavan-3-olov in flavan-3,4-diolov ali kombinacije obeh. Flavan-3-ole pogosto imenujemo tudi katehini. Molekule flavan-3-olov zavzamejo dva asimetrična ogljikova atoma na pozicijah C-2 in C-3, zato lahko nastanejo štiri izomere. Molekule flavan-3,4-diolov pa zavzemajo pozicije C-2, C-3 in C-4 asimetričnih ogljikovih atomov in tako lahko nastane osem izomer. Med flavan-3,4-diole spadajo tudi leukoantocianini, ki po segrevanju v kisli raztopini polimerizirajo v produkte podobne flobafenu in proizvajajo antocianidine z značilno rdečo barvo.



Slika 2: Kemijska struktura kondenziranega tanina (Rochfort in sod., 2008)

Chung in sod. (1998b) so poročali, da imajo kondenzirani tanini sposobnost zaviranja delovanja vseh prebavnih encimov, vključno z amilazo, pektinazo, celulazo, lipazo, proteolitičnimi encimi in β -galaktozidazo. Največji prehranski učinek kondenziranih taninov v prebavnem traktu je sposobnost oblikovanja kompleksov z beljakovinami iz krme (krmil). En mol tanina nase veže tudi 12 molov beljakovin (Chung in sod., 1998a).

2.2 DELOVANJE TANINOV

Prisotnost velikega števila fenolnih hidroksilnih skupin taninom omogoča, da tvorijo komplekse z veliko molekulsko maso; zlasti z beljakovinami, redkeje s celulozo in pektini (McLeod, 1974, cit. po Bhat in sod., 1998; Mueller-Harvey in McAllan, 1992, cit. po Bhat in sod., 1998).

Dolgotrajno krmljenje (1 do 2 meseca) prežvekovalcev s krmo, ki vsebuje veliko tanina, povzroči večje izločanje mucinov. Takšno delovanje taninov so raziskovalci najprej opazili pri prostoživečih prežvekovalcih, ki imajo zaradi tega povečane žleze slinavke. To antilopam, srnjadi, jelenjadi in kozam omogoča, da prenesejo večje vsebnosti tanina v obrokih (Van Soest in sod., 1987). Pri udomačenem govedu in ovcah Austin in sod. (1989, cit. po Kos, 2007) niso opazili te sposobnosti.

2.2.1 Delovanje na mikroorganizme in encime

Tanini preprečujejo rast gliv, bakterij, kvasovk in virusov (Chung, 1998a). Hkrati preprečujejo tudi delovanje teh mikroorganizmov in se upirajo razgradnji (Field in Lettinga, 1992, cit. po Bhat in sod. 1998). Jacob in Pignal (1972, cit. po Chung in sod., 1998b) sta ugotovila, da so taninski izvlečki kebrača, taninske kisline in kostanjevega tanina zaustavili rast različnih vrst kvasovk. Izvlečki kostanjevih taninov so bolj vplivali na kvasovke, kot tanini kebrača. Kljub znanim antimikrobnim lastnostim taninov, pa veliko mikroorganizmov nanje ni občutljivih (Dechamps, 1989, cit. po Bhat in sod., 1998). Mikroorganizmi namreč lahko zunaj celice izločajo polisaharide, ki ločijo mikrobnno celično steno od taninov. Poleg tega tvorijo še debelo plast glikoproteinov (McSweeney in sod., 2001), na katere se, raje kot na mikrobne encime, ki so pomembni za rast mikroorganizma, povežejo tanini (Scalbert, 1991).

Lavrenčič (2001) in Scalbert (1991) sta poročala o treh mehanizmih delovanja taninov na mikroorganizme. Prvi je vezava taninov na mikrobne encime, ki mikroorganizmom prepreči izrabo substrata. Pri drugem mehanizmu govorimo o vezavi taninov na fosfolipide celične stene mikroorganizmov, ki tako povzročijo morfološke spremembe mnogih bakterij v predželodcih in posledično zmanjšajo mikrobno aktivnost. Obstaja tudi vezava taninov na ione posameznih kovin (npr. železo), ki jih mikroorganizmi ne morejo vključiti v lastne biosintetske procese.

Tanini vplivajo na mikrobno sintezo in na propustnost celičnih sten mikroorganizmov (Zimmer in Cordesse, 1996), saj imajo sposobnost vezave s celično steno mikroorganizma in z zunajcelično izločenimi mikrobnimi encimi. Tako zaustavijo prenos hranljivih snovi v celico in ovirajo rast mikroorganizma (McSweeney in sod., 2001).

Tanini preprečujejo aktivnost encimov celulaze, pektinaze, ksilanaze, peroksidaze, lakaze ali glikosiltransferaze, ki sodelujejo v presnovi ogljikovih hidratov (Scalbert, 1991).

Chung in sod. (1993; cit. po Chung in sod. 1998b) so raziskovali vpliv taninske kisline in propil galata na zaustavitev rasti nezaželenih mikroorganizmov *E.coli* in *Salmonella spp.* To jim je uspelo s tvorbo esterske vezi med galno kislino in polioli.

2.2.2 Delovanje na beljakovine krme

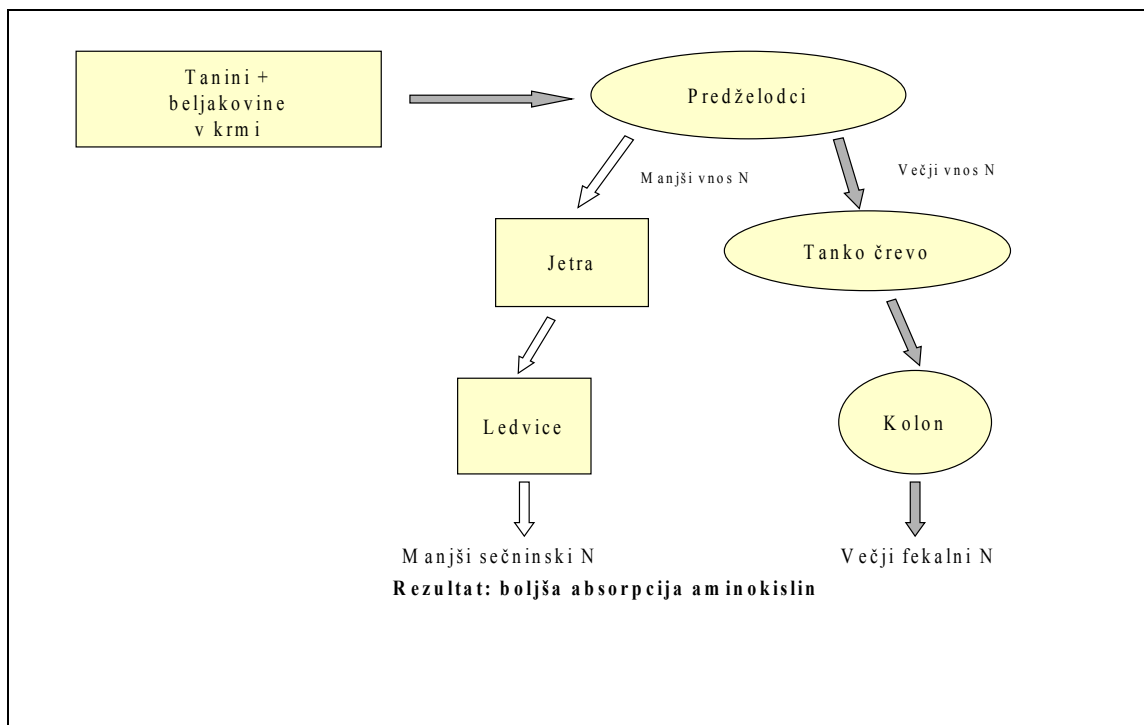
Lastnost taninov, da tvorijo močne komplekse z beljakovinami, je najpomembnejši vidik njihovega delovanja v prebavilih (Hagerman in Butler, 1981; cit. po Reed, 1995). Velikost teh kompleksov je odvisna od lastnosti obeh, tako beljakovin kot taninov. Sem uvrščamo molekulsko maso, terciarno strukturo, izoelektrično točko in število mest, ki se povezujejo. Tanini imajo veliko število prostih fenolnih hidroksilnih skupin, ki lahko tvorijo močne vodikove vezi z beljakovinami in ogljikovimi hidrati (Haslam, 1989, cit. po Reed, 1995).

Kumar in Singh (1984, cit. po Frutos in sod., 2004) sta poročala o štirih načinih povezovanja taninov z beljakovinskimi kompleksi. To so lahko vodikove vezi, hidrofobne interakcije, ionske vezi ali kovalentna povezava. Vodikove vezi nastanejo med hidroksilnimi radikali fenolnih skupin in kisikom amidnih skupin v peptidnih vezeh beljakovin. Hidrofobne vezi najdemo med aromatskim obročem fenolnih komponent in hidrofobnim področjem beljakovin. Ionske vezi nastanejo med fenolatnim ionom in kationsko stranjo beljakovin (velja le za hidrolizirajoče tanine). Kovalentna povezava pa nastane med oksidacijo polifenolov do kinonov in s poznejšo kondenzacijo z nukleofilnimi skupinami beljakovin. Reed (1995) je kot vpliv za nastanek kovalentne povezave omenjal tudi delovanje encima polifenol oksidaze.

Jones in Mangan (1977, cit. po Jouany in Morgavi, 2007) sta v *in vitro* študiji pokazala, da se taninsko-beljakovinski kompleksi tvorijo v predželodcih pri pH 6 do 7, razpadejo pa v siriščniku pri pH manjšem od 3,5 in v tankem črevesu pri pH nad 7. Na ta način tanini zaščitijo beljakovine pred prehitro razgradnjo z mikrobnimi encimi (Reed, 1995).

Slika 3 prikazuje povezavo med tanini in beljakovinami, kar povzroči povečanje toka dušika iz predželodcev v tanko črevo. Ta proces imenujemo 'rumen escape protein' ali 'by pass' beljakovine. Prežvekovalci, ki uživajo krmo s tanini, ponavadi izločijo manj dušika v

seču in nekoliko več dušika v blatu. Kot rezultat tega živali vsrkajo več aminokislin iz obrokov, ki vsebujejo tanine, kot iz obrokov, ki taninov ne vsebujejo. Dušik v blatu lahko nastane s povezovanjem taninov z beljakovinami iz krme, bakterijskimi celičnimi stenami ali izločki, z živalskimi tkivi ali slino (Mueller-Harvey, 2006).



Slika 3: Vpliv taninov na fermentacijo beljakovin (prirejeno po Mueller-Harvey, 2006)

2.2.3 Delovanje na ogljikove hidrate, vitamine in rudninske snovi

Tanini in ogljikovi hidrati se povezujejo z reverzibilnimi hidrofobnimi vezmi. Najpogosteje najdemo vezave s celulozo, hemicelulozo, škrobom in pektinom (Reed, 1995). Na tvorbo vezi med ogljikovimi hidrati in tanini vplivajo topnost, molekulska masa in struktura ogljikovih hidratov (Haslam, 1989, cit. po Sivka, 2005).

McSweeney in sod. (2001) so poročali, da tanini s tvorbo kompleksov z lignocelulozo zmanjšajo aktivnost celulolitičnih mikroorganizmov in s tem tudi razgradljivost vlaknine. Kostanjevi tanini vplivajo na razgradnjo hemiceluloze in pektina, ko je razmerje med taninom in substratom večje od ena proti ena (Scalbert, 1991).

Barry in Manley (1984) ter Barry in sod. (1986) so poročali, da se je razgradljivost hemiceluloze in pektina ob dodatku močvirske nokote (*Lotus pedunculatus*) zmanjšala,

vendar sta Barry in Manley (1984) ugotovila, da kondenzirani tanini močvirske nokote niso vplivali na razgradljivost celuloze.

Tanini vplivajo na izkoriščanje vitaminov in mineralov. Tako na primer zmanjšujejo vsebnost vitamina A in tudi izkoristljivost vitamina B₁₂. Z dvovalentnim železom pa tanini tvorijo netopne komplekse, ki se v manjši meri absorbirajo (Chung in sod., 1998a).

2.2.4 Vpliv taninov na prirejo mleka in mesa

Prirejo živalskih produktov, reprodukcijo in ohranjanje telesnih funkcij pogojuje ustrezna oskrba živali z vsemi hranljivimi snovmi. Intenzivnejša reja prežvekovalcev zahteva krmila z beljakovinami, ki se v določenem obsegu izogonejo razgradnji v predželodcih. Kompleksi med tanini in beljakovinami učinkovito preprečujejo delovanje mikroorganizmov na beljakovine krme. Ti kompleksi niso topni pri pH v predželodcih, v kislem okolju siriščenika pa razpadejo. S prebavo v siriščeniku in tankem črevesu se beljakovine izkoristijo za ohranjanje telesnih funkcij in prirejo (Lavrenčič, 2001).

Wang in sod. (1996, cit. po Kos, 2007) so navajali, da se je mlečnost ovc, po krmljenju z navadno nokoto, povečala za 21 %, hkrati pa so opazili tudi večjo vsebnost maščob (za 14 %) in laktoze (12 %) v mleku. Petacchi in Buccioni (2007) sta v poskusu z ovcami ugotovila, da vsebnost kostanjevih taninov v krmi ni vplivala na mlečnost in vsebnosti maščobe ter laktoze v mleku, temveč na raven beljakovin mleka, ki se je povečala za 10 %.

Min in sod. (1999, cit. po Rochfort in sod., 2008) so ugotovili, da je paša na navadni turški detelji (*Onobrychis viciifolia*) in navadni nokoti (*Lotus corniculatus*), ki vsebujeta kondenzirane tanine, vplivala na večje vsrkavanje aminokislin in na boljšo retencijo dušika v telesu. Zato so imele ovce boljšo plodnost, hkrati pa se je izboljšala tudi rast volne, ki je občutljiva na absorpcijo beljakovin.

Vaithyanathan in sod. (2007) so raziskovali vpliv dodatka listov *Prosopis cineraria* na rast volne pri ovcah in ugotovili, da se je premer vlaken, z naraščanjem vsebnosti taninov v krmi v obroku jagnjet, zmanjševal. Vaithyanathan in sod. (2007) so tudi predvidevali, da bi velike vsebnosti tanina lahko povzročale motnje v absorpciji in poznejše vključevanje aminokislin, ki so pomembne za rast volne.

Tanini v obroku ovc, ki so bile krmljene z navadno nokoto (*Lotus corniculatus*), so vplivali na povečanje absorpcije aminokislin iz tankega črevesa (50 %), kar se je poznalo pri boljši prireji mleka, večjem dnevnem prirastu in večjem številu ovuliranih jajčec (Barry in McNabb, 1999, cit. po Tabacco in sod., 2006).

Raziskava, ki so jo opravili Ben Salem in sod. (2005), je pokazala, da je dodatek manjše količine listov akacije (*Acacia cyanophylla* Lindl.) v obrok, koristno vplival na razgradnjo beljakovin v predželodcih in da se je pri tem izboljšala rast jagnjet.

Luciano in sod. (2009) so poročali o izboljšani stabilnosti barve mesa sveže jagnjetine ob dodatku taninov kebrača v obroke. Priolo in sod. (2000) so ugotovili, da je dodatek rožičeve moke z 2,5 % kondenziranih taninov negativno vplival na rast jagnjet in na kakovost mesa. Jagnjetom, ki so imela v obroku poleg rožičeve moke dodan polietilen glikol, pa sta se izboljšali hitrost rasti in kakovost mesa.

2.3 VPLIV TANINOV NA TVORBO METANA

Nastajanje metana za žival in mikroorganizme predstavlja izgubo ogljika in energije ter s tem slabše izkoriščanje krme za prirejo živalskih produktov, kot sta mleko in meso. Emisije ogljika v atmosfero povzročajo učinek tople grede (Blümmel in sod., 2005), kar vpliva na višanje povprečnih letnih temperatur zraka (Moss in sod., 2000).

Vzrok za nastanek metana je kompleksna mikrobiološka fermentacija v predželodcih, kjer fermentira celuloza in ostale makro molekule. Kot stranski produkt nastaja metan (CH_4), ki se iz telesa živali izloči z izrigavanjem skozi nos in usta (Moss in sod., 2000). To je natančno usklajen mehanizem, povezan s kontrakcijami posameznih delov predželodcev. Osnovna reakcija za nastanek metana je redukcija CO_2 z vodikom (Žgajnar, 1990).

Zaradi emisije metana mikrobná aktivnost v predželodcih predstavlja neproduktivno 5 do 15 % izgubo energije, odvisno od vrste krme (Czerkawski, 1969, cit. po Wood in sod., 2009). Zato stremimo k zmanjševanju oddajanja metana na enoto zaužite krme ali na enoto proizvoda živali (meso, mleko...; Lassey, 2007).

Za zmanjševanje emisije CH_4 pri prežvekovalcih lahko uporabimo kondenzirane tanine. Animut in sod. (2008) so v svoji raziskavi ugotovili, da različni kondenzirani tanini v

predželodcih koz sicer nimajo enakega vpliva na prebavo dušika, vendar pa vsi učinkujejo podobno na mikrobnno emisijo CH₄. Avtorji predvidevajo, da kondenzirani tanini različnih rastlin (*Lespedeza cuneata*, *Lespedeza striata*) vplivajo na delovanje (aktivnost) metanogenih bakterij, čeprav je možno, da tanini spremenijo delovanje tudi drugih vrst bakterij in/ali protozojev.

Tavendale in sod. (2005) so poročali, da so kondenzirani tanini delovali na metanogenezo posredno, z zmanjševanjem produkcije H₂ in neposredno z zaviralnimi učinki na metanogenezo.

2.4 VPLIV TANINOV NA FERMENTACIJO IN TVORBO KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN

Fermentacija ogljikovih hidratov pri prežvekovalcih poteka v predželodcih, kjer jih mikroorganizmi razgradijo do hlapnih maščobnih kislin (HMK), CO₂ in CH₄. Te hlapne maščobne kisline (ocetna, propionska in maslena kislina) se absorbirajo skozi sluznico, kjer jih prežvekovalci uporabijo v svoji presnovi kot vir energije ali substrate za sintezo hranljivih snovi ali rezervnih snovi. Kot vmesni presnovki se kratkotrajno in v majhnih količinah pojavljajo tudi nekatere druge kisline, kot so na primer mlečna, mravljična in valerianska kislina (Žgajnar, 1990).

Fermentacija ogljikovih hidratov v predželodcih do HMK je energijsko neučinkovita, zaradi česar prežvekovalcem primanjkuje glukoze, saj jo mikroorganizmi hitro razgradijo do HMK (McDonald in sod., 2002). Prežvekovalci glukozo potrebujejo za preskrbo možganov z energijo, za nastajanje laktoze ter reprodukcijo. Od HMK je le propionska kislina glukogena. Iz nje nastajajo glukoza, glikogen, laktoza, neesencialne maščobne kisline in druge snovi. Iz očetne in maslene kisline ogljikovi hidrati ne nastajajo, nastajajo pa maščobe. Ob normalnem odstotku maščob v mleku (~ 4 %) je potrebno razmerje med očetno in propionsko kislino 2,6 proti 1 (Žgajnar, 1990).

Wolin (1960) je v svoji študiji predstavil teoretično izračunana molarna razmerja med HMK v predželodcih, ki znašajo: 65 % očetne, 20 % propionske in 15 % maslene kisline. Ta razmerja veljajo, če je v obrok vključena voluminozna krma, torej seno, travna ali koruzna silaža, slama... Pri teoretičnem izračunu ni upošteval drugih produktov fermentacije, kot so etanol, mlečna kislina, jantarna kislina, mravljična kislina, sukcinat,

format, saj so to vmesni presnovki pri nastanku končnih produktov fermentacije, ki jih je količinsko zelo malo.

Skupna količina in razmerje med HMK sta odvisna od kakovosti in količine zaužite krme. Več očetne kisline nastaja pri krmljenju s starejšo voluminozno krmo in z dolgim senom, medtem ko na nastajanje večje količine propionske kisline vpliva krmljenje z drobno mletim senom (Žgajnar, 1990). Na nastanek maslene kisline velikost delcev krme nima velikega vpliva (McDonald in sod., 2002).

Skupna koncentracija HMK v vampu znaša 2 do 15 g/l, dnevna sinteza pri kravah pa od 3 do 6 kilogramov. Zelo pomembno je razmerje med očetno in propionsko kislino, ki je odvisno od zaužite krme. Pri kravah molznicah želimo več očetne kisline, saj iz nje nastajajo mlečne maščobe. Več propionske kisline omogoča boljše izkoriščanje energije, zato je ta zaželena pri pitanju govedi (Žgajnar, 1990).

Različni avtorji so poročali o vplivu hidrolizirajočih taninov na fermentacijo v predželodcih. Tako je Singleton (1981, cit. po Sliwinski in sod., 2002) poročal o vplivu taninov na zmanjšanje števila celulolitičnih mikroorganizmov v vampovem soku, inhibiranje celulaze (Makkar, 1993, cit. po Sliwinski in sod., 2002), preprečevanje pritrjevanja mikroorganizmov na delce krme (Leinmuller in Menke, 1990, cit. po Sliwinski in sod., 2002) in zmanjšanju razgradnje z nastajanjem kompleksov s celulozo (McSweeney in sod., 2001).

Salawu in sod. (1997; cit. po Roth, 2003) in Hayer (1999, cit. po Roth, 2003) so ugotovili, da so tanini vplivali na molarno razmerje posameznih HMK, saj je ob njihovem zauživanju nastalo več očetne in manj propionske kisline. V *in vitro* poskusih, ki so jih izvedli Makkar in Becker (1996, cit. po Roth, 2003) ter Salawu in sod. (1999), so kondenzirani tanini kebrača povečali obseg fermentacije hranljivih snovi, pri čemer pa je nastalo več propionske kisline.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 TANINSKI IZVLEČKI IN NJIHOVE KONCENTRACIJE

V poskusu smo uporabili dve vrsti taninov: kostanjev izvleček – Farmatan 75 (F75) (proizvajalec Tanin Sevnica) in izvleček kebračo (QUE) (proizvajalec Roy Wilson Dickson). F75 uvrščamo med hidrolizirajoče tanine, QUE pa med kondenzirane tanine.

Osnovne podatke o taninskih izvlečkih smo povzeli po diplomski nalogi Kos (2007) in jim dodali še analize suhe snovi in surovih beljakovin (preglednica 1).

Preglednica 1: Sestava taninskih izvlečkov

	F75	QUE
Suha snov (g/kg SS)	936	922
Surove beljakovine (g/kg)	10	9
Tanini (%)	76	72
Netaninske topne snovi (%)	17	3,6
Netopne snovi (%)	1,5	0,3
pH	3,6	4,5 – 5,5

F75- farmatan 75; QUE- kebračo

3.1.1 Vodni izvleček iz kostanjevega lesa Farmatan 75 (F75)

Pravi kostanj (*Castanea sativa P. Mill.*) uvrščamo v družino octovke (*Anacardiaceae*) in v rod kostanj (*Castanea P. Mill.*). Najdemo ga predvsem v Evropi.

Izvleček iz lesa kostanja, Farmatan 75 (Tanin Sevnica) je sestavljen iz vodotopnih rastlinskih polifenolov, enostavnih sladkorjev, lignina, celuloze in rudninskih snovi. Uporabljamo ga kot naravni dodatek tako v humani, kot tudi v živalski prehrani. Deluje kot naravni antibiotik in ugodno vpliva na ravnotežje mikroflore, saj zavira delovanje škodljivih mikroorganizmov. Poleg tega učinkuje kot naravni antioksidant, omogoča boljšo absorpcijo hranil in stimulira imunski sistem (Farmatan ..., 2010).

3.1.2 Vodni izvleček iz lesa kebrača (QUE)

Quebracho (*Schinopsis balansae*) oziroma rdeči quebracho (*Schinopsis lorentzii*) uvrščamo v družino octovke (*Anacardiaceae*) in v rod *Schinopsis Engler*. Drevo raste v Južni Ameriki.

Kebračo je topen v hladni vodi, z naraščajočo temperaturo se njegova topnost povečuje. Veliko ga uporablja usnjarska industrija. Vsebuje večji delež kondenziranih taninov na tržišču (Kos, 2007 in Sivka, 2005).

3.2 SUBSTRAT

Kot substrat smo uporabili sojine tropine, ki smo jih obdelali z različnimi količinami izvlečkov iz lesa pravega kostanja in kebrača, katerih sestava je podana v preglednici 3, kemijska sestava taninskih izvlečkov F75 in QUE je prikazana v preglednici 1. Uporabljene količine taninskih izvlečkov so podane v preglednici 2.

Preglednica 2: Koncentracije taninov na 100 g substrata

Oznaka koncentracije	Koncentracija TI (g/100 g ST)
K0	0 (Kontrola)
K1	1,48
K2	2,91
K3	5,67
K4	10,71
K5	19,35

TI- taninski izvleček (QUE, F75), ST- sojine tropine, K0, K1, K2, K3, K4, K5- koncentracije taninskih izvlečkov

Preglednica 3: Sestava sojinih tropin, tretiranih z različnimi koncentracijami kostanjevega in kebračo tanina

	K0	F75					QUE				
		K1	K2	K3	K4	K5	K1	K2	K3	K4	K5
SS (g/kg)	923	911	867	851	873	880	912	933	920	894	914
SB (g/kgSS)	567	524	525	501	470	413	521	533	523	477	428
SM (g/kgSS)	11	14	14	14	11	10	12	12	13	12	11
SV (g/kgSS)	58	49	51	47	47	42	48	50	50	48	42
SP (g/kgSS)	79	76	74	72	74	60	75	74	76	75	73
BDI (g/kgSS)	285	337	336	366	399	475	344	331	338	389	446

SS- suha snov, SB- surove beljakovine, SM- surove maščobe, SV- surova vlaknina, SP- surov pepel, BDI- brezdušični izvleček, F75- farmatan 75, QUE- kebračo; K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST

3.2.1 Tretiranje sojinih tropin

Taninske izvlečke smo v navedenih koncentracijah (preglednica 2) dodali k predhodno na 1 mm zmletim sojinih tropinam in mešali, dokler ni obarvanje substrata postalo enakomerno. V mešanico smo postopoma dodajali vodo (2,5 do 3 g na g substrata) in jo mešali še 5 do 10 minut po tistem, ko se je zmes spremenila v rjavkasto pastozno maso. Tako pripravljeno maso smo pustili čez noč (12 ur) na sobni temperaturi, potem pa smo jo posušili. Prvih 24 ur smo to maso sušili pri temperaturi do 80 °C, nato pa pri temperaturi do 50 °C do konstantne mase. S taninskimi izvlečki tretirane substrate smo po sušenju še enkrat zmleli in shranili do nadaljnjih analiz v plastičnih posodah (prahovkah) v temnem prostoru pri sobni temperaturi.

3.3 IN VITRO DOLOČANJE MIKROBNE AKTIVNOSTI IN PREBAVLJIVOSTI TER RAZGRADLJIVOSTI SOJINIH TROPIN

Vpliv taninskih izvlečkov na fermentacijo, razgradnjo in prebavo sojinih tropin smo ugotavljali na dva načina:

- Z *in vitro* fermentacijo substrata (plinski test, določanje hlapnih maščobnih kislin) smo ugotavljali njihov vpliv na mikrobnost
- Z navidezno *in vitro* prebavljivostjo in razgradljivostjo SS ter SB smo ugotavljali stopnjo zaščitenosti SS in SB pred razgradnjo v predželodcih in vpliv taninskih izvlečkov na prebavljivost SS in SB

3.3.1 Mikrobna aktivnost

3.3.1.1 Plinski test

Dan pred začetkom poskusa smo pripravili čiste steklene brizgalke z dobro vidnimi oznakami. Če je bilo potrebno, smo oznake obnovili. V posamezno brizgalko smo zatehtali okoli 175 mg substrata oz. standardnega vzorca (seno). Vzorce smo predhodno zmleli na velikost delcev 1 mm. Naredili smo dve ponovitvi v štirih paralelkah. Brizgalke smo zaprli z batom, naoljenim s parafinskim oljem, ki omogoča lažje zapiranje in učinkovitejše tesnenje ter na drugi strani s plastičnim zamaškom. Tako pripravljene brizgalke smo postavili v stojalo. Pripravili smo pufer, katerega sestava je podana v preglednici 5.

Na dan začetka dela na plinskem testu smo stojalo z brizgalkami namestili v kad za inkubacijo vzorcev in vanjo dolili destilirano vodo. Steklenico s pripravljnim pufrom smo namestili v manjšo kad za mešanje pufru. Namestili smo oba potopna grelca, ju vklopili in vodo v obeh kadeh ogreli na $39 \pm 0,5$ °C. Pufer v steklenici smo mešali z magnetnim mešalom. Vsebino (pufer) steklenice smo prepilovali s CO₂ pod pritiskom 1,8 do 2,0 bara. V sušilni omari smo ogreli 500 ml merilni valj na temperaturo okoli 40 °C. Med mešanjem in prepilovanjem pufru smo pripravili redukcijsko raztopino, katere sestava je podana v preglednici 5.

Preglednica 4: Sestava raztopin A, B, C

A	B	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 5: Sestava redukcijske raztopine in pufru

Redukcijska raztopina	Raztopina resazurina	Pufer*
51 ml destilirane vode	100 mg resazurina	533 ml destilirane vode
2128 µl 1M NaOH	destilirana voda do 100 ml	133 µl raztopine A
353 mg Na ₂ S × 10H ₂ O		266 ml raztopine B
		266 ml raztopine C
		1330 µl resazurina
		53 ml redukcijske raztopine

*Količina zadošča za 50 brizgalk

Vampov sok smo odvzeli od dveh kastriranih fistuliranih ovnov jezersko-solčavske pasme približno eno uro po jutranjem krmljenju. Vampov sok smo nalili v termos steklenico, ki smo jo predhodno segreli na 39 °C in jo prepilali s CO₂.

Redukcijsko raztopino smo dodali v s CO₂ dobro prepilhan pufer 5 do 10 minut pred dodajanjem vampovega soka. Modrikasta raztopina se je najprej obarvala rdeče, potem pa se je razbarvala. Vampov sok smo v termos steklenici prinesli v *in vitro* laboratorij, ga prefiltrirali skozi 4 plasti gaze v ogret in s CO₂ prepilhan 500 ml merilni valj. Količino

vampovega soka smo izračunali glede na število brizgalk s substratom ter s standardnim in slepim vzorcem. Prefiltriran vampov sok smo prelili v steklenico s pufrom, ki smo ga mešali in prepihovali s CO₂ še okoli 15 minut pod pritiskom 1 bara.

Brizgalke smo napolnili z 30 ml inokuluma, iz njih iztisnili višek plina (zraka) ter odčitali in zapisali prostornino inokuluma v brizgalki. Vsebino brizgalke smo premešali in brizgalko postavili v stojalo v veliki kadi. Prostornino nastalega plina smo nato odčitavali po 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 in 96 urah. Po vsakem odčitavanju prostornine, smo vsebino brizgalk premešali. Če je prostornina plina v brizgalkah po 8. do 10. urah inkubacije narasla čez 50 ml, smo plin iz brizgalke iztisnili. Istočasno z brizgalkami s substratom smo napolnili tudi tri brizgalke s slepim vzorcem in tri s standardnim vzorcem: prvi brizgalki s slepim in standardnim vzorcem smo napolnili na začetku polnjenja brizgalk, drugi na sredini in tretji na koncu polnjenja brizgalk.

3.3.1.1.1 Izračun

Kazalnike produkcije plina smo ocenili z Gompertzovim modelom (Bidlack in Buxton, 1992, cit. po Lavrenčič in sod., 2007):

$$y_t = Be^{-Ce^{-At}} \quad \dots (1)$$

kjer je y_t prostornina plina (ml), nastalega v času t , B je skupna potencialna produkcija plina (ml/g SS), C je specifična hitrost fermentacije, na katero vpliva kazalnik A , ki je konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti in t je čas (h). Posamezne kazalnike fermentacije smo ocenili v statističnem programskem paketu SAS/STAT (2001) z Marquardtovo nelinearno regresijo (PROC NLIN).

Čas največje hitrosti fermentacije (TMFR) smo izračunali z drugim odvodom Gompertzovega modela, ki smo ga izenačili z 0 in rešili po t :

$$\frac{d^2Y}{dt^2} = AB^2C^2(e^{-At})^2 e^{-Ce^{-At}} - ABC^2 e^{-Ce^{-At}} = 0 \quad \dots (2)$$

Največjo hitrost fermentacije (MFR) smo izračunali z vstavljanjem ustrezne vrednosti TMFR v enačbo prvega odvoda.

... (3)

$$\frac{dY}{dt} = BC Ae^{-At} e^{-Ce^{-At}}$$

Prostornino plina, ki je nastal v 24. urah fermentacije (GAS₂₄), smo izračunali tako, da smo v Gompertzov model vstavili čas inkubacije 24 ur.

3.3.1.2 Določitev analize kratkoverižnih maščobnih kislin

Hlapne maščobne kisline smo določali po 24. urah inkubacije. Dve brizgalki za vsak substrat in slepi vzorec smo, po odčitavanju prostornine plina, postavili v mrzlo vodo in s tem zaustavili fermentacijo. Ustrezno brizgalko smo odprli in vsebino prelili v centrifugirno epruveto. Epruvete z vsebino smo do analize shranili v zamrzovalni skrinji pri -18 °C.

3.3.1.2.1 Priprava etrske ekstrakcije

Analizo kratkoverižnih maščobnih kislin smo naredili po metodi etrske ekstrakcije hlapnih maščobnih kislin (Holdeman in sod., 1977). Vzorce, zamrznjene po končanem plinskem testu, smo dan pred začetkom analize vsebnosti hlapnih maščobnih kislin iz zamrzovalnika prestavili v hladilnik. Odmrznjene vzorce smo 5 minut centrifugirali pri 2000 rpm (obratih na minuto). V prazne Hachove epruvete z navojem in zamaškom smo odpipetirali 3 ml supernatanta in mu dodali 0,2 ml 50 % H₂SO₄ (do pH 2). Epruvete smo nato centrifugirali 10 minut pri 3000 rpm.

V drugi seriji Hachovih epruvet smo pripravili 0,4 g (2 mali spatuli) sušenega NaCl in mu dodali 1 ml supernatanta. Vzoredno smo naredili še ekstrakcijo delovne standardne raztopine. Njena sestava je prikazana v preglednici 6.

Preglednica 6: Delovna standardna raztopina

Ime kisline	Koncentracija (g/l)
očetna	0,525
propionska	0,099
izo-maslana	0,095
n-maslana	0,096

Vzorcu in standardu smo dodali 0,2 ml 50 % H₂SO₄, 0,1 ml internega standarda (1 g krotanske kisline / 100 ml H₂O) ter 1,0 ml dietiletra. Epruvete smo dobro zaprli in jih ročno

stresali (20 obratov), nato pa še centrifugirali do 2000 rpm. Nato smo zgornjo (etersko) fazo odpipetirali s Pasteurjevimi pipetami v epruvete s pripravljenim 0,3 g CaCl₂. V spodnjo fazo smo dodali 1 ml dietiletra in ponovili ekstrakcijo. Na koncu smo obe eterski fazi združili.

Za umerjanje plinskega kromatografa smo uporabili 1 ml standarda. Rezultate analize smo podali kot gram posamezne HMK na liter medija. Zaradi začetne razredčitve z 0,2 ml 50 % H₂SO₄, smo rezultate korigirali s faktorjem 1,07 (3,2/3), tako smo dobili koncentracijo posamezne kisline v vzorcu.

3.3.1.2.2 Analitska oprema s pogoji analize

Pri analizi HMK smo uporabili plinski kromatograf Hewlett Packard 5890 A, proizvajalca Hewlett Packard (ZDA), s split/splitless injektorjem in FID detektorjem. Za ločbo (separacijo) HMK smo uporabili kapilarno kolono NUKOL™, FUSED SILICA Capillary Column (Col:20988-03 A), dolžine 30 m, premera 0,25 mm in debelino standardne faze 0,25 µm, proizvajalca Supelco (ZDA). V preglednici 7 so navedeni kromatografski pogoji s pretoki plinov za določanje HMK.

Preglednica 7: Kromatografski pogoji 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
Volumen injiciranja	1 µl; split 30:1

PRETOKI 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

3.3.2 *In vitro* prebavljivost in razgradljivost SS in SB

3.3.2.1 Priprava filter vrečk in vzorca

Filter vrečke F57 (proizvajalec Ankom, ZDA) smo predhodno 3 do 5 minut izpirali z acetonom ter jih nato posušili na zraku. Prazne in osušene filter vrečke F57 smo označili in stehtali. V posamezno filter vrečko smo nato zatehtali 0,5 g vzorca.

Filter vrečke smo s toplotnim varilcem zaprli in jih postavili v 2,5 l steklenico inkubatorja Daisy^{II}. V posodo smo vložili 24 vrečk z vzorci in 2 prazni vrečki (slepi vzorec). Vzorce smo enakomerno razvrstili na obe polovici steklenice. Pripravili smo 1600 ml pufru brez redukcijske raztopine (preglednica 5).

3.3.2.2 Inkubacija vzorcev

Inkubator Daisy^{II} smo prižgali 20 do 30 minut pred dolitjem vampovega soka. V inkubacijsko steklenico z vzorci smo nalili pufer (preglednica 5) in jo namestili v vodno kopel. Vkllopili smo potopni grelec in vodo v kadi ogreli na $39 \pm 0,5$ °C. Pufer v steklenici smo premešali periodično. V steklenico s pufrom smo namestili cevko za dovod CO₂ in jo pričeli prepiplovati nad pufrom, pod pritiskom 1,8 do 2,0 bara.

V sušilni omari smo 500 ml merilni valj ogreli na 40 °C. Pripravili smo redukcijsko raztopino in jo dodali s CO₂ dobro prepihanemu pufru 5 do 10 minut pred dodajanjem vampovega soka. Modrikasta raztopina se je najprej obarvala rdeče, nato pa se je razbarvala.

Vampov sok smo v termos steklenici prenesli v *in vitro* laboratorij in ga prefiltrirali skozi 4 plasti gaze v ogret in s CO₂ prepihan 500 ml merilni valj. Prefiltriran vampov sok smo prelili v inkubacijsko steklenico, jo zaprli in postavili v ogret Daisy^{II} inkubator. Filtrske vrečke smo inkubirali 24 ur, pri tem je Daisy^{II} inkubator sam vzdrževal temperaturo $39 \pm 0,5$ °C. Na koncu inkubacije smo vzeli inkubacijsko steklenico iz Daisy^{II} inkubatorja in odlili tekočino. Filtrske vrečke smo dobro sprali z mrzlo tekočo (vodovodno) vodo, dokler le ta ni bila čista. Pazili smo, da smo vrečke čim manj stiskali.

3.3.2.3 Določanje *in vitro* navidezne razgradljivosti in prebavljivosti suhe snovi

Za določanje *in vitro* navidezne razgradljivosti suhe snovi (IVNRSS), smo filtrske vrečke po pranju čez noč sušili pri 60 °C in jih nato posušili pri 105 °C do konstantne mase (3 ure). Po sušenju smo jih postavili v eksikator in jih ohlajene stehali.

In vitro navidezno prebavljivost suhe snovi (IVNPSS) smo določili tako, da smo filtrske vrečke po pranju v tekoči vodi osušili in jih prelili z mešanico pepsina (1g/l) v HCl (1M). Po inkubaciji smo jih ponovno sprali, jih čez noč sušili pri 60 °C in posušili pri 105 °C do konstantne mase. Filtrske vrečke smo po sušenju postavili v eksikator in jih ohlajene stehali.

3.3.2.4 Določanje *in vitro* navidezne razgradljivosti in prebavljivosti surovih beljakovin

Filtrske vrečke smo po določitvi IVNRSS in IVNPSS dali v Kjeldahlove epruvete in določili vsebnost SB.

3.3.2.4.1 Izračuni

IVNRSS in IVNRSB smo izračunali po naslednji enačbi:

$$IVNRSS(SB) = \frac{(W_2 - (W_1 \times C)) \times 100}{W_2} \quad \dots (4)$$

kjer je IVNRSS(SB) *in vitro* navidezna razgradljivost suhe snovi, oziroma surovih beljakovin (%), W_1 masa prazne vrečke F57 (g), W_2 zatehta vzorca (g) in C korekcijski faktor.

IVNPSS in IVNPSB smo izračunali po naslednji enačbi:

$$IVNPSS(SB) = \frac{(W_2 - W_3) \times 100}{W_2} \quad \dots (5)$$

kjer je IVNPSS *in vitro* navidezna prebavljivost suhe snovi, oziroma surovih beljakovin (%), W_2 zatehta vzorca (g) in W_3 končna masa vzorca po 24. urni inkubaciji in tretiranju s pepsin HCl.

3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

3.4.1 Statistični model

Statistično značilne razlike smo ugotavljali z modelom (SAS/STAT, 2001)

$$y_{ijk} = \mu + T_i + K_j + TK_{ij} + e_{ijk}, \quad \dots (6)$$

kjer je:

y_{ijk} = skupna potencialna produkcija plina (B), specifična hitrost fermentacije (C), konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A), čas največje hitrosti fermentacije (TMFR), največja hitrost fermentacije (MFR), produkcija plina v 24. urah (GAS_{24}), vsebnost oetne kisline (C2), propionske kisline (C3), maslene kisline (C4), vsota hlapnih maščobnih kislin (SHMK), *in vitro* navidezna razgradljivost SS (IVNRSS), *in vitro* navidezna razgradljivost SB (IVNRSB), *in vitro* prebavljivost SS (IVNPSS) ter *in vitro* navidezna prebavljivost SB (IVNPSB)

μ = srednja vrednost

T_i = taninski izvleček; i= F75, QUE

K_j = koncentracija taninskega izvlečka; j= 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST

TK_{ij} = interakcija med vrsto taninskega izvlečka in koncentracijo taninskega izvlečka

e_{ijk} = ostanek

4 REZULTATI

4.1 VPLIV TANINA, NJEGOVE KONCENTRACIJE TER INTERAKCIJE MED TANINOM IN KONCENTRACIJO NA POSAMEZNE PARAMETRE

V preglednici 8 so prikazane p-vrednosti za vpliv tanina, njegove koncentracije ter interakcije med taninom in koncentracijo na kazalnike *in vitro* fermentacije: skupno potencialno produkcijo plina (B), specifično hitrost fermentacije (C), faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A), čas največje hitrosti fermentacije (TMFR), največjo hitrost fermentacije (MFR) in količino plina po 24. urah fermentacije (GAS₂₄), hlapnih maščobnih kislin: očetne (C2), propionske (C3), maslene (C4) in vsote vseh hlapnih maščobnih kislin (SHMK), deležev hlapnih maščobnih kislin dC2, dC3 in dC4, *in vitro* razgradljivost SB in SS ter *in vitro* prebavljivost SB in SS. Poleg tega smo navedli tudi delež pojasnjene variance (R²).

Preglednica 8: Vpliv tanina, njegove koncentracije ter interakcije med taninom in koncentracijo na kazalnike *in vitro* fermentacije, količino nastalih HMK ter *in vitro* prebavljivost in razgradljivost SS in SB

Parameter	tanin	koncentracija	tanin×koncentracija	R ²
B	0,0464	<0,0001	0,3105	0,83
C	0,1681	<0,0001	0,1726	0,76
A	0,2935	0,5502	0,5807	0,20
TMFR	0,1513	0,4638	0,7282	0,21
MFR	0,3671	0,3415	0,5800	0,23
GAS ₂₄	0,0610	<0,0001	<0,0001	0,87
C2	0,4868	0,0012	0,2157	0,48
C3	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,82
C4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,82
SHMK	0,0404	<0,0001	0,3241	0,62
dC2	0,0005	0,2060	0,0009	0,57
dC3	0,0027	0,3488	0,0067	0,50
dC4	<0,0001	0,0553	<0,0001	0,71
IVNRSS	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,97
IVNRSB	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,98
IVNPSS	0,2458	<0,0001	0,0057	0,79
IVNPSB	0,1114	<0,0001	0,0132	0,93

B- skupna potencialna produkcija plina, C- specifična hitrost fermentacije, A- faktor mikrobne (ne)učinkovitosti, TMFR - čas največje stopnje fermentacije, MFR - največja stopnja fermentacije, GAS₂₄ - količina plina po 24. urah fermentacije, C2 - očetna kislina, C3 - propionska kislina, C4 - maslena kislina, SHMK - vsota hlapnih maščobnih kislin, dC2 - delež očetne kisline, dC3 - delež propionske kisline, dC4 - delež maslene kisline, IVNRSS - *in vitro* navidezna razgradljivost suhe snovi, IVNRSB - *in vitro* navidezna razgradljivost surovih beljakovin, IVNPSS - *in vitro* navidezna prebavljivost suhe snovi, IVNPSB - *in vitro* navidezna prebavljivost surovih beljakovin

Kazalnik B je edini od kazalnikov *in vitro* fermentacije, na katerega je statistično značilno ($p=0,0464$) vplivala vrsta taninskega izvlečka. Na kazalnike A, TMFR in MFR, vrsta in koncentracija taninskega izvlečka ter njuna interakcija, niso statistično značilno vplivale ($p>0,05$). Na kazalnike B, C in GAS_{24} je statistično značilno ($<0,0001$) vplivala koncentracija taninskega izvlečka, medtem ko je bila interakcija med taninskim izvlečkom in koncentracijo statistično značilna le pri kazalniku GAS_{24} . Največji delež variance (R^2) smo pojasnili pri GAS_{24} ($R^2 = 0,87$) in B ($R^2 = 0,83$), medtem pa ta pri kazalnikih A, TMFR in MFR ni presegal 0,23.

Na vsebnost hlapnih maščobnih kislin so statistično značilno ($<0,05$) vplivali tako vrsta taninskega izvlečka, kot koncentracija in interakcija med taninskim izvlečkom in koncentracijo. Izjemi sta bili očetna kislina (C2), na katero taninski izvleček ($p=0,4868$) in interakcija med taninskim izvlečkom in koncentracijo ($p=0,2157$) nista statistično značilno vplivala ter SHMK, na katero interakcija med taninskim izvlečkom in koncentracijo ni statistično značilno vplivala ($p=0,3241$).

Na deleže hlapnih maščobnih kislin sta statistično značilno vplivali vrsta taninskega izvlečka in interakcija med taninskim izvlečkom in koncentracijo, medtem ko koncentracija taninskih izvlečkov ni bila statistično značilna ($p>0,05$). Največji delež variance (R^2) smo pojasnili pri dC4 (0,71).

Na IVNRSS in IVNRSB so statistično značilno ($p<0,05$) vplivale tako vrsta taninskega izvlečka in koncentracija, kot tudi interakcija med taninskim izvlečkom in koncentracijo. Na IVNPSS in IVNPSB taninski izvleček ni imel statistično značilnega ($p>0,05$) vpliva. Največji delež variance (R^2) smo pojasnili pri IVNRSS (0,97) in IVNRSB (0,98).

4.2 KEMIJSKA SESTAVA SUBSTRATA

V naši raziskavi smo sojine tropine, obdelane z različnimi koncentracijami taninskih izvlečkov F75 in QUE (preglednica 2), kemijsko analizirali (preglednica 3).

Vsebnost SS je bila najmanjša pri K2 (867 g/kg F75 in 933 g/kg QUE) in K3 (851 g/kg pri F75 in 920 g/kg pri QUE).

Vsebnost SB se je z naraščanjem koncentracij taninskih izvlečkov zmanjševala, izjema je bila K2 pri QUE, ki se je nekoliko povečala v primerjavi s K1.

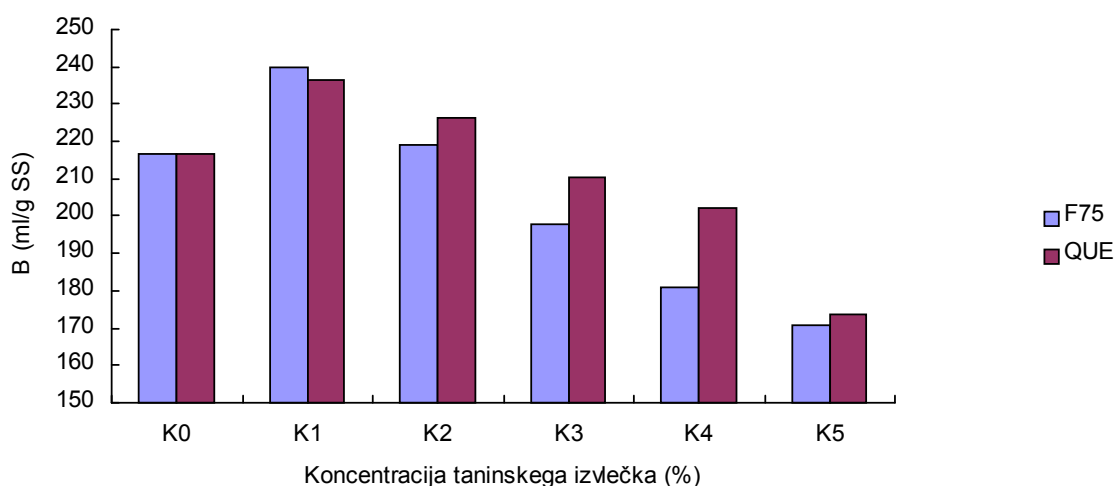
Pri vsebnostih SM in SV med substrati ni bilo večjih razlik z naraščanjem koncentracij TI. To velja tudi za SP, vendar s to razliko, da je bila vsebnost SP pri najvišji koncentraciji F75 (K5) nekoliko manjša (60 g/kg SS) kot pri najvišji koncentraciji QUE (73 g/kg SS).

BDI je v substratih naraščal s povečevanjem višine koncentracije TI. Vsebnosti BDI so se med substrati najbolj razlikovale pri K3 (366 g/kg SS pri F75 in 338 g/kg SS pri QUE) in K5 (475 g/kg SS pri F75 in 446 g/kg SS pri QUE).

4.3 PLINSKI TEST

4.3.1 Skupna potencialna produkcija plina (B)

Na skupno produkcijo plina sta vplivali tako vrsta kot koncentracija taninskega izvlečka (preglednica 8). Največjo skupno potencialno produkcijo plina (B) smo izmerili pri najmanjšem dodatku izvlečkov K1 (slika 4). Razlike znotraj koncentracij med taninskimi izvlečki niso bile statistično značilne ($p > 0,05$). Ob povečevanju koncentracije taninskih izvlečkov se je B pri dodatku obeh vrst TI statistično značilno zmanjševala ($p > 0,05$) (priloga A). F75 je imel nekoliko večji inhibitorni učinek kot QUE.



F75- farmatan 75, QUE- kebračo;

K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST;

QUE $y = -2,8007 x + 229,74$ ($R^2 = 0,67$);

F75 $y = -3,1821 x + 225,42$ ($R^2 = 0,68$)

Slika 4: Vpliv koncentracije taninov na skupno potencialno produkcijo plina (ml/g SS)

4.3.2 Specifična hitrost fermentacije (C) in konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A)

Na specifično hitrost fermentacije (C) je vplivala koncentracija taninskega izvlečka, vrsta TI pa ni bila statistično značilna. Na mikrobno (ne)učinkovitost vrsta in koncentracija taninskega izvlečka nista vplivala (preglednica 8). Pri specifični hitrosti fermentacije (C) (preglednica 9) razlike med koncentracijami taninskih izvlečkov QUE in F75 niso bile statistično značilne ($p > 0,05$), prav tako tudi razlike znotraj koncentracij med taninskimi izvlečki. Pri F75 je bila statistično značilna le pri K0. Pri QUE se je C ob povečevanju koncentracije taninskih izvlečkov zmanjševala od 2,39 (K2) do 2,06 (K5), pri F75 se je zmanjševala do K2 (2,13), nato pa ohranila približno iste vrednosti.

Pri konstantnem faktorju mikrobne (ne)učinkovitosti (A) (preglednica 9) so bile razlike znotraj koncentracij med taninskima izvlečkoma, statistično značilne le pri K5. Ob povečevanju koncentracije taninskih izvlečkov so se vrednosti A pri QUE statistično neznačilno ($p > 0,05$) zmanjševale, pri F75 pa so se povečevale.

Preglednica 9: Vpliv taninov na specifično hitrost fermentacije (C) in na konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A)

Kazalnik fermentacije Koncentracija	C		A	
	F75	QUE	F75	QUE
K0	2,67 ^a	2,67 ^a	0,14 ^{abc}	0,14 ^{abc}
K1	2,26 ^b	2,39 ^{ab}	0,13 ^{abcd}	0,15 ^a
K2	2,13 ^b	2,32 ^{ab}	0,10 ^d	0,13 ^{abcd}
K3	2,14 ^b	2,27 ^b	0,12 ^{abcd}	0,12 ^{abcd}
K4	2,17 ^b	2,11 ^b	0,13 ^{abcd}	0,11 ^{bcd}
K5	2,15 ^b	2,06 ^b	0,14 ^{ab*}	0,10 ^{cd*}

a, b, c, d vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), * vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), F75- farmatan 75, QUE- kebračo; K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST

4.3.3 Največja hitrost fermentacije (MFR)

Na največjo hitrost fermentacije (MFR) koncentracija in vrsta taninskega izvlečka nista vplivali (preglednica 8). Pri QUE (preglednica 10) so bili rezultati statistično značilno različni ($p < 0,05$), pri F75 pa se rezultati pri K3 in K4 niso statistično značilno razlikovali ($p > 0,05$). Razlike znotraj koncentracij taninskih izvlečkov so bile statistično značilne ($p < 0,05$) pri K2 in K5. Obe vrsti taninskih izvlečkov sta največjo MFR dosegli pri K1, kjer sta znašali 11,9 ml/h (F75) oz. 13,1 ml/h (QUE). Ob povečevanju koncentracije taninskih

izvlečkov se je MFR pri QUE zmanjševala do 6,7 ml/h (K5). Pri F75 je bila najmanjša MFR dosežena pri K2 (8,1 ml/h).

Preglednica 10: Vpliv taninov na največjo hitrost fermentacije (MFR) (ml/h)

Koncentracija	F75	QUE
K0	11,0 ^b	11,0 ^b
K1	11,9 ^{ab}	13,1 ^a
K2	8,1 ^{de*}	10,5 ^{bc*}
K3	8,4 ^{de}	9,1 ^{cd}
K4	8,3 ^{de}	8,1 ^{de}
K5	9,0 ^{d*}	6,7 ^{e*}

^{a, b, c, d, e}vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), * vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), F75- farmatan 75, QUE- kebračo; K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST

4.3.4 Čas največje hitrosti fermentacije (TMFR)

Čas največje hitrosti fermentacije ni bil odvisen od koncentracije in vrste taninskega izvlečka (preglednica 8). TMFR se z dodatkom F75 in dodatkom QUE ni statistično značilno razlikovala ($p > 0,05$) (preglednica 11), prav tako kot ni bilo statistično značilnih razlik znotraj koncentracij TI.

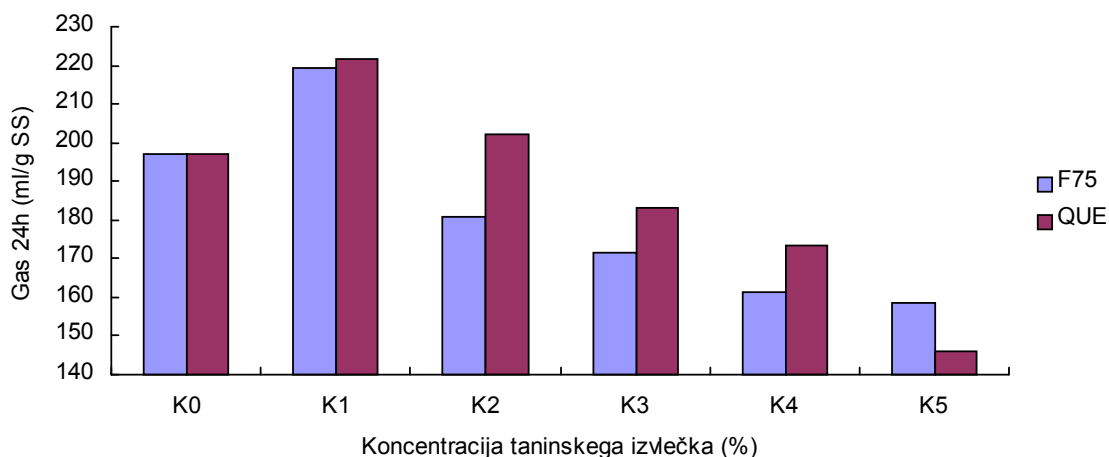
Preglednica 11: Vpliv taninov na čas največje fermentacije (TMFR) (h)

Koncentracija	F75	QUE
K0	7,0	7,0
K1	6,1	5,8
K2	7,5	6,7
K3	6,7	7,0
K4	6,2	6,9
K5	5,4	7,0

F75- farmatan 75, QUE- kebračo; K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST

4.3.5 Produkcija plina v 24. urah (GAS₂₄)

Na produkcijo plina v 24. urah je vplivala koncentracija taninskega izvlečka (preglednica 8). Razlike v produkciji plina v 24. urah znotraj koncentracij med taninskima izvlečkoma niso bile statistično značilne ($p > 0,05$) (slika 5). Ob povečevanju koncentracije taninskih izvlečkov se je GAS₂₄ pri obeh taninskih izvlečkih zmanjševala. Produkcijo plina v 24. urah je bolj zmanjševal F75, vendar je QUE pri K5 statistično značilno dosegel najmanjšo produkcijo (priloga B).



F75- farmatan 75, QUE- kebračo;

K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST,

QUE $y = -3,3137x + 209,34$ ($R^2 = 0,78$);

F75 $y = 0,2177x^2 - 6,807x + 209,61$ ($R^2 = 0,67$)

Slika 5: Produkcija plina v 24. urah (ml/g SS)

4.4 VSEBNOST IN DELEŽI Hlapnih Maščobnih Kislín

V preglednici 12 so predstavljene povprečne vsebnosti očetne (C2), propionske (C3) in maslene (C4) kisline ter vsota vseh teh hlapnih maščobnih kislin (SHMK) po 24. urah inkubacije. Na vsebnost posameznih HMK (C2, C3 in C4) ter vsote skupnih HMK je vplivala koncentracija taninskega izvlečka, vrsta taninskega izvlečka pa je vplivala na C3, C4 in SHMK (preglednica 8).

Vsebnost očetne kisline po 24. urah inkubacije se med F75 in QUE ni statistično značilno razlikovala ($p > 0,05$), prav tako tudi ne znotraj koncentracij taninskih izvlečkov. Največ očetne kisline je pri obeh taninskih izvlečkih nastalo ob dodatku K1, pri QUE (6,48 mmol/g SS) in pri F75 (5,18 mmol/g SS). Ob povečanju koncentracij taninskih izvlečkov se je vsebnost očetne kisline pri QUE zmanjšala do 3,94 mmol/g SS (K4), medtem ko se sploh ni zmanjševala pri F75, čeprav je najmanj očetne kisline nastalo ob največjem dodatku (K5) F75 (4,17 mmol/g SS).

Vsebnost propionske kisline se je pri obeh taninskih izvlečkih ob povečanju koncentracije statistično neznačilno zmanjševala. Razlike znotraj koncentracij taninskih izvlečkov so bile statistično značilne le pri K2 in K3. Največ propionske kisline je nastalo pri K1 (1,76 mmol/g SS F75 in 1,81 mmol/g SS QUE).

Preglednica 12: Vpliv vrste in koncentracije taninov na vsebnost očetne, propionske in maslene kisline ter skupnih hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 24. urah *in vitro* fermentacije

Vrsta kisline	Koncentracija	F75	QUE
Očetna kislina (mmol/g SS)	K0	4,45	4,45 ^{ab}
	K1	5,18	6,48 ^a
	K2	4,65	5,14 ^{ab}
	K3	4,77	4,38 ^{ab}
	K4	4,46	3,94 ^b
	K5	4,17	4,24 ^{ab}
Propionska kislina (mmol/g SS)	K0	1,40 ^{abcd}	1,40 ^{abcd}
	K1	1,76 ^{ab}	1,81 ^a
	K2	1,12 ^{d*}	1,63 ^{ab*}
	K3	1,05 ^{d*}	1,59 ^{abc*}
	K4	1,03 ^d	1,34 ^{bcd}
	K5	1,07 ^d	1,16 ^{cd}
Maslena kislina (mmol/g SS)	K0	0,60 ^{abcd}	0,60 ^{abcd}
	K1	0,75 ^{ab}	0,80 ^a
	K2	0,44 ^{d*}	0,73 ^{ab*}
	K3	0,46 ^{d*}	0,69 ^{abc*}
	K4	0,45 ^d	0,57 ^{bcd}
	K5	0,49 ^{cd}	0,48 ^{cd}
Vsota HMK (mmol/g SS)	K0	6,46	6,46 ^{ab}
	K1	7,69	9,09 ^a
	K2	6,22	7,51 ^{ab}
	K3	6,28	6,66 ^{ab}
	K4	5,94	5,85 ^b
	K5	5,73	5,88 ^b

^{a, b, c, d} vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), *vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), F75- farmatan 75, QUE- kebračo; K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST

Ob povečevanju koncentracije taninskih izvlečkov se vsebnost maslene kisline pri dodajanju QUE ni statistično značilno zmanjševala, pri dodajanju F75 to velja za K3, K4 in K5. Razlike znotraj koncentracij taninskih izvlečkov pa so bile statistično značilne pri K2 in K3.

Vsota HMK (SHMK) se, ob povečevanju koncentracij pri F75 in QUE, ni statistično značilno spreminjala ($p > 0,05$), prav tako se vsebnost SHMK ni statistično značilno razlikovala znotraj koncentracij TI.

V preglednici 13 so predstavljeni deleži očetne (dC2), propionske (dC3) in maslene (dC4) kisline. Na deleže hlapnih maščobnih kislin je vplivala vrsta taninskega izvlečka (preglednica 8).

Preglednica 13: Vpliv vrste in koncentracije taninov na deleže (%) očetne, propionske in maslene kisline od vseh HMK po 24. urah fermentacije

Delež (%)	Koncentracija	F75	QUE
Ocetna kislina	K0	68,8 ^{cde}	68,8 ^{cde}
	K1	67,3 ^{de}	70,7 ^{bcde}
	K2	74,5 ^{ab*}	68,1 ^{cde*}
	K3	76,0 ^{a*}	65,7 ^{e*}
	K4	75,1 ^{ab*}	67,3 ^{de*}
	K5	72,7 ^{abc}	72,2 ^{abcd}
Propionska kislina	K0	21,9 ^{abc}	21,9 ^{abc}
	K1	23,0 ^{ab}	20,3 ^{abcd}
	K2	18,4 ^{cd}	22,0 ^{abc}
	K3	16,7 ^{d*}	24,0 ^{a*}
	K4	17,4 ^{d*}	22,9 ^{ab*}
	K5	18,7 ^{cd}	19,7 ^{bcd}
Maslena kislina	K0	9,3 ^{abc}	9,3 ^{abc}
	K1	9,7 ^{abc}	9,0 ^{bcd}
	K2	7,1 ^{f*}	9,9 ^{ab*}
	K3	7,3 ^{f*}	10,3 ^{a*}
	K4	7,5 ^{ef*}	9,8 ^{ab*}
	K5	8,6 ^{cde}	8,1 ^{def}

^{a, b, c, d, e, f} vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), *vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), F75- farmatan 75, QUE- kebračo; K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST

Ob povečevanju koncentracije taninskih izvlečkov, se je delež očetne kisline pri F75 povečeval do K3 (76,0 %), nato pa se je pri K4 in K5 statistično neznačilno zmanjšal. Pri QUE se je delež očetne kisline, ob povečevanju koncentracije taninskih izvlečkov, statistično neznačilno zmanjševal (K2 in K3), nato pa se je pri K5 delež povečal na 72,2 %. Razlike znotraj koncentracij taninskih izvlečkov so bile statistično značilne pri K2, K3 in K4.

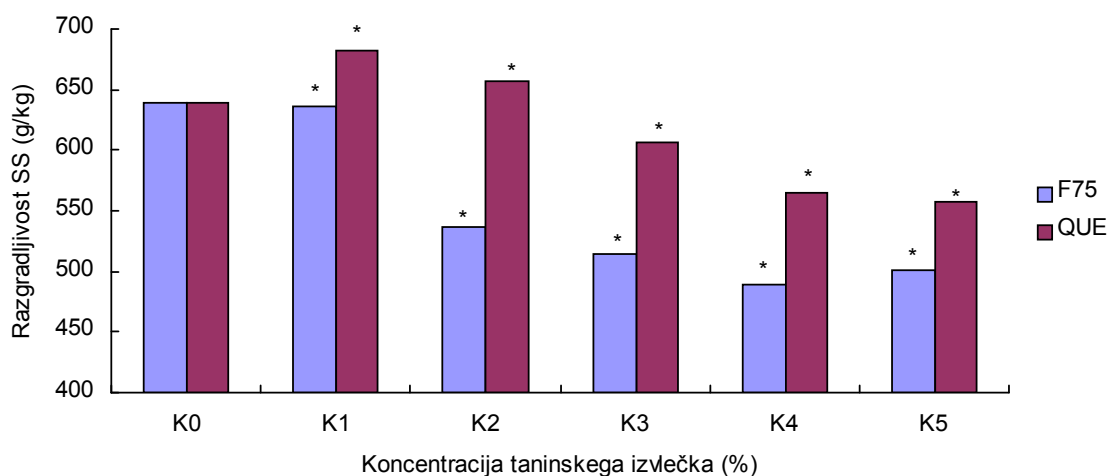
Delež propionske kisline se je pri F75, ob povečevanju koncentracij taninskih izvlečkov, statistično značilno zmanjšal pri K2, pri višjih koncentracijah pa razlike niso bile statistično značilne. Prav tako tudi pri QUE razlike med koncentracijami niso bile statistično značilne. Znotraj koncentracij sta se taninska izvlečka statistično značilno razlikovala pri K3 in K4.

Delež maslene kisline se je pri F75 ob povečanju koncentracij taninskih izvlečkov statistično značilno zmanjšal pri K2, pri višjih koncentracijah razlike niso bile statistično značilne. Pri QUE se je vsebnost maslene kisline statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšala

ob dodatku K5. Znotraj koncentracij sta se TI statistično značilno razlikovala pri K2, K3 in K4.

4.5 *IN VITRO* RAZGRADLJIVOST SUHE SNOVI IN SUROVIH BELJAKOVIN

Na sliki 6 je prikazana *in vitro* razgradljivost SS, ki je odvisna od vrste in koncentracije taninskih izvlečkov (preglednica 8). Razgradljivost SS QUE in F75 se je z naraščanjem koncentracije taninov statistično značilno zmanjševala (priloga C). Tudi razlike znotraj koncentracij med TI so bile statistično značilne. F75 je z naraščajočo koncentracijo imel tudi večji inhibitorni učinek kot QUE.



F75- farmatan 75, QUE- kebračo;

K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST,

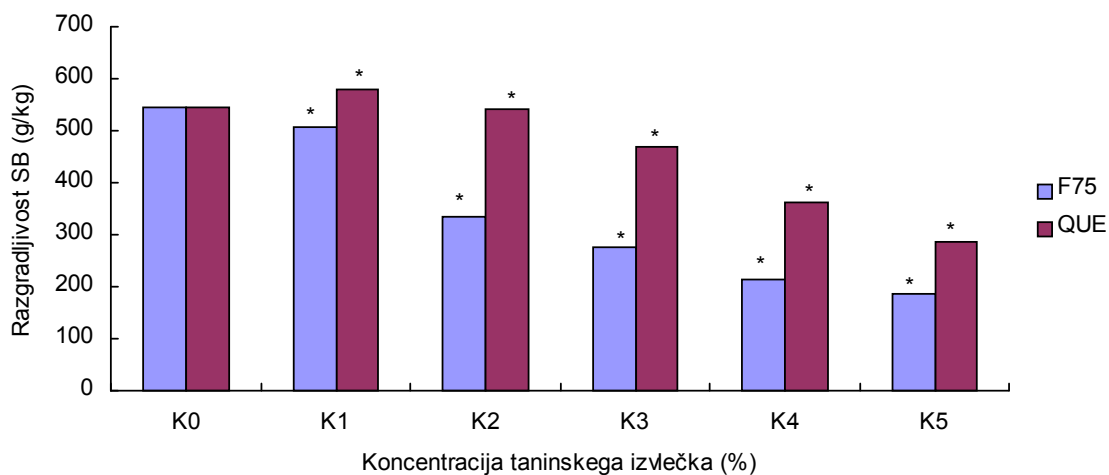
QUE $y = 0,307 x^2 - 11,9597 x + 670,85$ ($R^2 = 0,77$);

F75 $y = 0,9925 x^2 - 26,2254 x + 640,11$ ($R^2 = 0,84$);

*statistično značilne razlike med taninskima izvlečkoma ($p < 0,05$)

Slika 6: *In vitro* razgradljivost suhe snovi po 24. urah *in vitro* inkubacije (g/kg)

Na sliki 7 je prikazana *in vitro* razgradljivost SB v odvisnosti od vrste in koncentracije taninskih izvlečkov. Razgradljivost SB se je z naraščanjem koncentracije TI statistično značilno zmanjševala (priloga D). Tudi razlike znotraj koncentracij taninskih izvlečkov so bile statistično značilne. Večji inhibitorni učinek na razgradljivost SB je imel F75.



F75- farmatan 75, QUE- kebračo;

K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST;

QUE $y = 0,3503 x^2 - 22,2956 x + 581,75$ ($R^2 = 0,93$);

F75 $y = 1,8189 x^2 - 52,77 x + 535,25$ ($R^2 = 0,91$);

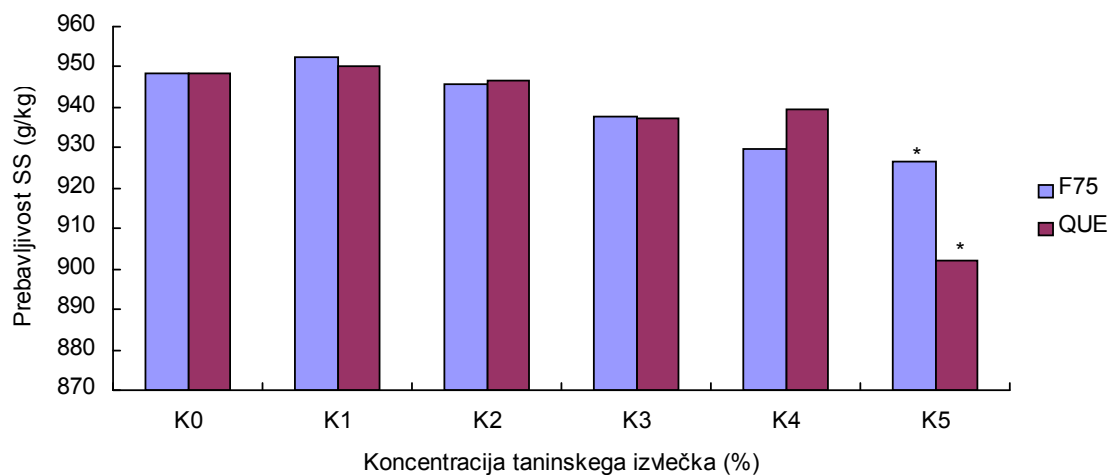
*statistično značilne razlike med taninskima izvlečkoma ($p < 0,05$)

Slika 7: *In vitro* razgradljivost surovih beljakovin po 24. urah *in vitro* inkubacije (g/kg)

4.6 IN VITRO PREBAVLJIVOST SUHE SNOVI IN SUROVIH BELJAKOVIN

Na sliki 8 je prikazana *in vitro* prebavljivost SS v odvisnosti od koncentracije taninskega izvlečka, ne pa tudi od vrste TI. Ob povečanju koncentracij obeh taninskih izvlečkov, se prebavljivost SS ni statistično značilno zmanjševala ($p > 0,05$), izjema je bila K5 pri QUE, ki je bila statistično značilno najmanjša (priloga E). Tudi razlike med TI znotraj koncentracij so bile statistično značilne pri K5. Manjši inhibitorni učinek na prebavljivost SS je imel F75.

Na sliki 9 je prikazana *in vitro* prebavljivost surovih beljakovin v odvisnosti od koncentracije taninskega izvlečka, vrsta TI pa ni imela statistično značilnega vpliva. Prebavljivost SB je bila s povečevanjem koncentracije obeh TI pri K3, K4 in K5 statistično značilno manjša od K0, K1 in K2 (priloga F). Razlike med TI znotraj koncentracij so bile statistično značilne pri K5. Na prebavljivost SB je manj vplival F75 kot QUE.



F75- farmatan 75, QUE- kebračo;

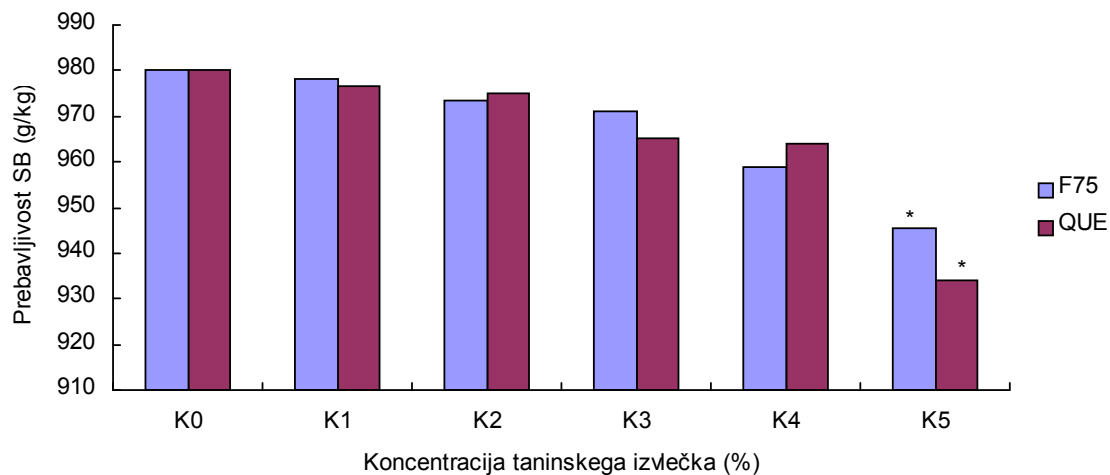
K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST;

QUE $y = -2,3354 x + 952,97$ ($R^2 = 0,74$);

F75 $y = -1,3488 x + 949,12$ ($R^2 = 0,57$);

*stat. značilne razlike med taninskima izvlečkoma ($p < 0,05$)

Slika 8: *In vitro* prebavljivost suhe snovi po 24. urah *in vitro* inkubacije (g/kg)



F75- farmatan 75, QUE- kebračo;

K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST;

QUE $y = -2,2661 x + 980,97$ ($R^2 = 0,89$);

F75 $y = -1,8321 x + 980,20$ ($R^2 = 0,89$);

*stat. znač. razlike med taninskima izvlečkoma ($p < 0,05$)

Slika 9: *In vitro* prebavljivost surovih beljakovin po 24. urah *in vitro* inkubacije (g/kg)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Vpliv na mikrobnost

Pri mikrobni prebavi krme v predželodcih nastajajo kratkoverižne maščobne kisline - očetna, propionska in maslena kislina, plini (CO_2 in CH_4) in mikrobnost biomasa (Beever, 1993, cit. po Blümmel in sod., 2005; Leng, 1993, cit. po Blümmel in sod., 2005; Van Soest, 1994, cit. po Blümmel in sod., 2005). S preprostimi *in vitro* laboratorijskimi metodami lahko, ob znanem zauživanju krme, stimuliramo nastajanje plina (Blümmel, 2005), kratkoverižnih maščobnih kislin in mikrobnost biomase (Blümmel in sod., 1997). S temi podatki spoznavamo kinetiko prebave topnih in netopnih hranljivih snovi krme (Getachew in sod., 1998, cit. po Sivka, 2005). Z *in vitro* plinskim testom preučujemo potencialne mehanizme delovanja mikroorganizmov in njihove učinke na razgradnjo fitokemičnih snovi v predželodcih. Z analizo kratkoverižnih maščobnih kislin dobimo informacije o fermentabilnosti krme (Makkar, 2005, cit. po Bueno in sod., 2008).

5.1.1.1 Plinski test

Razlike v učinku taninov na kazalnike fermentacije ter produkcijo plina med drugim lahko pripišemo tudi uporabljenemu substratu pri inkubaciji. Učinek taninov na fermentacijo je odvisen od uporabljenega substrata ter od količine in vrste tanina (Deshpande in Salunkhe, 1982, cit. po Getachew in sod., 2008). Pri uporabi lucerne kot substrata, je imel izvleček kebrača, ki vsebuje veliko, predvsem kondenziranih, taninov, večji učinek na produkcijo plina kot taninska in galna kislina (Getachew in sod., 2008). V našem poskusu, kjer smo kot substrat uporabili sojine tropine, pa je hidrolizirajoči tanin F75 bolj vplival na produkcijo plina kot QUE.

V naši raziskavi je F75 bolj zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina (B) v primerjavi s QUE. Za oba taninska izvlečka velja, da je največja koncentracija (K5) najbolj zmanjšala skupno potencialno produkcijo plina. Lavrenčič (2001) in Roth (2003) sta prav tako poročala o zmanjšani skupni (totalni) produkciji plina z naraščajočo koncentracijo taninskih izvlečkov. Tudi pri kuncih sta Kermauner in Lavrenčič (2008a) ugotovila, da naraščajoče koncentracije kostanjevih taninov zmanjšujejo produkcijo plina. Sivka (2005)

je v svojem poskusu z dvema različnima substratoma (celuloza in škrob) in taninskimi izvlečki ugotovila, da je F75 bolj zmanjšal obseg fermentacije celuloze, QUE pa obseg fermentacije škroba.

Pri času, ko je bila hitrost fermentacije največja (TMFR), nismo zabeležili statistično značilnih razlik med taninskima izvlečkoma in koncentracijami. Pri največji hitrosti fermentacije (MFR) smo pri QUE zabeležili enakomerno padanje. Tudi Sivka (2005) le za QUE poroča o enakomernem padanju največje hitrosti fermentacije škroba. Hkrati je QUE tudi bolj zmanjšal največjo hitrost fermentacije (MFR) kot enaka koncentracija F75.

Tudi produkcija plina v 24. urah (GAS_{24}) se je s povečevanjem koncentracij taninskih izvlečkov manjšala. Tako kot pri B, je tudi GAS_{24} bolj zmanjšal F75 kot enaka koncentracija QUE.

Zakaj je na kazalnike fermentacije (B, GAS_{24}) bolj vplival F75, lahko pojasnimo s tem, da vsa količina plina izvira iz fermentacije ogljikovih hidratov, saj beljakovine fermentirajo za 1/3 slabše kot ogljikovi hidrati, maščobe pa v predželodcih ne fermentirajo (Lavrenčič, 2001). Substrati, ki smo jih tretirali z F75, so vsebovali več BDI, torej več ogljikovih hidratov. S tem lahko pojasnimo tudi to, da razlike v kazalnikih fermentacije niso nujno posledica vezave taninov na beljakovine, temveč posledica delovanja taninov na mikroorganizme (Lavrenčič, 2001). Tudi Grm (2007, cit. po Kermauner in Lavrenčič, 2008b) je navedla, da sta se v prisotnosti kostanjevih taninov povečali *in vitro* rast in proteolitična aktivnost dveh vrst bakterij. Salawu in sod. (1999) pa so v poskusu s kebračom ugotovili, da je prisotnost teh taninov v obroku za ovce prekinila mikrobnost aktivnost s povezovanjem s hranili, kot so beljakovine, ogljikovi hidrati in/ali rudninskimi snovmi ter s povezovanjem z mikrobnimi celicami.

5.1.1.2 Hlapne maščobne kisline

Aiple (1987, cit. po Roth, 2003) je navajal, da je manjša *in vitro* produkcija plina povezana z zmanjšano koncentracijo HMK. V našem poskusu pri taninskem izvlečku F75 nismo opazili statistično značilnega trenda zmanjševanja vsebnosti očetne kisline in vsote HMK, kar je lahko posledica laboratorijske napake. Kos (2007) je v svojem poskusu uporabila dva substrata (celulozo in škrob) in ugotovila, da obstajajo razlike v nastanku HMK med substratoma ob dodanih taninskih izvlečkih. Tako so F75, QUE in taninska kislina bolj

zmanjšali nastanek očetne, propionske in maslene kisline pri fermentaciji celuloze, kot pri fermentaciji škroba. Nastanek očetne kisline pa je pri obeh substratih najbolj zmanjšal QUE. Nastanek propionske kisline in maslene kisline sta pri fermentaciji celuloze najbolj zmanjšala F75 in taninska kislina. Pri fermentaciji škroba je imela na propionsko kislino največji inhibitorni učinek taninska kislina, vsebnost maslene kisline pa je najbolj zmanjšal F75. V našem primeru je F75 bolj zmanjšal nastanek propionske in maslene kisline ter vsote HMK v primerjavi s QUE. Med taninskima izvlečkoma smo opazili statistično značilne razlike pri propionski in masleni kislini.

Martinez in sod. (2006) so v raziskavi primerjali vpliva taninske kisline in kebrača na vsebnost skupnih in posameznih HMK pri koruzi in pšenici. Ugotovili so, da so bile vse koncentracije HMK nižje pri fermentaciji koruze, v obeh primerih pa je imel kebračo nanje večji inhibitorni učinek kot taninska kislina.

Deleži hlapnih maščobnih kislin so se v naši raziskavi razlikovali v primerjavi s teoretično raziskavo, ki jo je opravil Wolin (1960). Ugotovil je, da pri zauživanju voluminozne krme nastane 65 % očetne, 20 % propionske in 15 % maslene kisline. V našem primeru, kjer smo uporabili sojine tropine, ki spadajo med beljakovinska krmila, so deleži očetne kisline pri obeh vrstah in tudi koncentracijah taninskih izvlečkov presegali 65 %. Pri vsebnosti propionske kisline smo opazili, da je je pri dodatku F75 nastal manjši delež, pri dodatku QUE pa večji delež v primerjavi s teoretičnim izračunom. Delež maslene kisline je pri obeh taninskih izvlečkih znašal največ 10,3 % in je bil torej manjši od teoretičnega izračuna 15 %. Če pogledamo razmerja med vsemi tremi HMK pri obeh TI, ugotovimo, da je imel F75 večji delež očetne kisline kot QUE, medtem pa je QUE vseboval večji delež propionske in maslene kisline v primerjavi s F75.

Širše molarno razmerje propionata pri *in vitro* fermentaciji in manjše število protozojev zaradi delovanja taninov (Makkar, 1995, cit. po Makkar, 2003), je skladno z večjo učinkovitostjo mikrobne beljakovinske sinteze, opažene v prisotnosti taninov (Makkar, 2003).

Martinez in sod. (2006) so ugotovili, da je zmanjšanje produkcije HMK zaradi dodajanja TI povezano z zmanjševanjem mikrobne fermentacije beljakovin in vlaknine. Blümmel in sod. (1997) pa so poročali o povezavi med produkcijo HMK ter *in vitro* prostornino plina.

V našem poskusu je tudi produkcijo HMK bolj zmanjšal taninski izvleček F75, kar je skladno s trditvijo Blümmel in sod. (1997). Povezava med HMK in mikrobno biomaso ni konstantna, saj imajo substrati, za katere so značilni veliki volumni plina, razmeroma majhen pridelek mikrobne biomase (Blümmel in sod., 1997).

5.1.2 Vpliv na prebavljivost in razgradljivost beljakovin krme

Z *in vitro* razgradljivostjo suhe snovi in surovih beljakovin laboratorijsko simuliramo razgradljivost SS in SB v pogojih predželodcev prežvekovalcev. Pri tem želimo doseči čim manjšo razgradljivost SB, ker jih želimo zaščititi pred preveliko mikrobno prebavo. Nasprotno pa stremimo k čim večji prebavljivosti SB, ker le tako lahko prežvekovalcem zagotovimo dovolj beljakovin za optimalno prirejo mleka ali prirast mesa.

V naši raziskavi smo pri sojinih tropinah, obdelanih z različnimi koncentracijami taninskih izvlečkov F75 in QUE (preglednica 4), ugotovili nekaj razlik v kemijski sestavi, ki bi lahko vplivale na naše rezultate. QUE je namreč vseboval več SS in SB, medtem ko je imel F75 več BDI pri enakih koncentracijah TI. V vsebnosti SM in SV se taninska izvlečka nista razlikovala, pri SP pa smo opazili razliko pri K5, kjer je bila vsebnost SP pri QUE nekoliko večja.

Kot sta navajala Orešnik in Kermauner (2008), brezdušični izvleček (BDI) sestavlja zelo heterogena skupina snovi, večinoma pa so to ogljikovi hidrati, kot so polisaharidi z α -glikozidno vezjo, topni sladkorji, fruktozani, pektini, topni del celuloze in hemiceluloz in organske kisline.

Gonzalez in sod. (2002) so poročali, da je bil padeč prebavljivosti suhe snovi po tretiranju s pepsinom v HCl pri kostanjevih taninih manjši kot pri taninih akacije ali kebrača. Predvidevajo, da je bila povezava med beljakovinami soje iz krmnega obroka in hidrolizirajočimi tanini v pogojih predželodcev manjša kot pri kondenziranih taninih. Čeprav je to veljalo za *in vitro* poskus, so predvidevali, da bi podobno učinkoval tudi pri poskusu *in vivo*, vendar bi se lahko zmanjšala tvorba vampovih beljakovin in HMK. Z višanjem koncentracije taninov je bila prebavljivost SS manjša. V našem poskusu smo ugotovili, da so bile sicer razlike med taninskima izvlečkoma pri nižjih koncentracijah majhne, vendar je bila prebavljivost SS F75 pri K5 večja.

Frutos in sod. (2000) so v *in sacco* poskusu ugotovili, da je tretiranje sojinih tropin s kebračo tanini zmanjšalo razgradljivost sojinih tropin brez škodljivih učinkov na prebavo v tankem črevesu. Tretiranje s kebračo tanini je statistično značilno zmanjšalo razgradljivost sojinih tropin. V našem primeru se je razgradljivost SS z večjo koncentracijo taninskih izvlečkov zmanjševala, a je razgradljivost SS bolj zmanjšal dodatek F75 kot QUE. Gonzalez in sod. (2002) so v *in vitro* poskusu ugotovili, da so bili kostanjevi tanini, v primerjavi s taninskimi izvlečki akacijevih ali kebračo taninov, bolj učinkoviti pri zaščiti sojinih beljakovin pred razgradljivostjo vampovih bakterij.

Lavrenčič (2001) je ugotovil, da se je dejanska razgradljivost SB sojinih tropin tretiranih s F75 z večanjem koncentracije zmanjševala, pri tem pa razlika v velikosti delcev substrata ni imela večjega vpliva. Pri skupni razgradljivost SB ni opazil sprememb, saj so bile SB sojinih tropin skoraj 100 % razgradljive ne glede na količino dodanega F75. Takšne rezultate je zabeležil pri sojinih tropinah v moknati obliki, medtem ko se je pri peletiranih sojinih tropinah razgradljivost nekoliko zmanjšala, na kar bi lahko vplivale višje temperature, uporabljene pri peletiranju. Višje temperature obdelave so lahko vplivale na razgradljivost sojinih tropin tudi v našem poskusu, saj smo jih obdelali s TI tako, da smo jim najprej dodali vodo, da je nastala pastozna masa, nato pa smo jih prvih 24 ur sušili pri temperaturi 80 °C, torej pri temperaturi, ki je zelo podobna temperaturi, ki jo dosežemo pri peletiranju krme. Lavrenčič (2001) je menil, da je bila količina dodanega F75 premajhna (3,6 in 7,32 %), da bi vplivala na razgradljivost sojinih tropin. Nasprotno pa se je razgradljivost sojinih tropin v našem poskusu z naraščajočo koncentracijo TI zmanjševala tako pri F75, kot tudi pri QUE.

Kriaa in Thewis (1998-99) sta v svoji raziskavi ugotovila, da se je z dodatkom kostanjevega tanina izboljšala retencija dušika. Ker pa sta uporabila majhne koncentracije tanina (4 g kostanjevih taninov/100 g skupnega dušika), se prebavljivost skupnega dušika ni spremenila. V našem poskusu sta na prebavljivost SB sojinih tropin vplivali tako koncentracija, kot tudi vrsta taninskega izvlečka. Z večanjem koncentracije taninskih izvlečkov se je prebavljivost SB manjšala. Hagerman in sod. (1992) so v svoji raziskavi ugotovili, da hidrolizirajoči tanini (taninska kislina) niso vplivali na prebavljivost beljakovin pri ovcah, kondenzirani tanini pa so zmanjšali prebavljivost beljakovin. V našem primeru smo z F75 dosegli nekoliko večjo prebavljivost SB v primerjavi s QUE.

Decruyenaere in sod. (1996) so v *in sacco* poskusu z arašidnimi pogačami ter v *in vivo* poskusu s travno silažo ugotovili, da se je skupna razgradljivost SB, ob dodajanju večjih koncentracij kostanjevih taninskih izvlečkov, zmanjševala. Do podobnih sklepov so prišli tudi Salawu in sod. (1999), ki so kot substrat uporabili silažo iz mnogocvetne ljulke in Zimmer in sod. (1996) z uporabo travniškega sena. Ugotovili so, da so učinkovite že manjše koncentracije taninov. Salawu in sod. (1999) so opazili tudi zmanjšano aktivnost celulaze in ksilanaze. V našem poskusu smo zasledili, da se je z večanjem koncentracije taninskih izvlečkov razgradljivost SB zmanjševala. F75 je imel večji inhibitorni učinek kot QUE.

Ugotovili smo, da je F75 nekoliko bolj zmanjšal mikrobo aktivnost in potek mikrobne fermentacije v primerjavi s QUE. Ob uporabi enakih koncentracij F75 in QUE, smo z F75 uspeli učinkoviteje zaščititi SB (SS) pred razgradnjo v *in vitro* pogojih kot s QUE. Na *in vitro* prebavljivost noben TI ni imel velikega učinka, razen pri največji uporabljeni koncentraciji (K5). Min in sod. (2003, cit. po Animut in sod., 2008) so poročali, da je povezava med kondenziranimi tanini in beljakovinami odvisna od molekulske mase, tipa terciarne strukture in aminokislinske sestave beljakovin. Medtem pa je znano, da imajo kostanjevi tanini največ vodotopnih polifenolov (Gonzalez in sod., 2002). Hidrolizirajoči tanini imajo več hidroksilnih skupin kot kondenzirani tanini (Hagerman in Butler, 1991, cit. po Gonzalez in sod., 2002). Zato menimo, da je na ugodnejše rezultate pri F75 vplivalo delovanje taninov na mikroorganizme.

5.2 SKLEPI

V raziskavi smo ugotovili, da so dodatki taninskih izvlečkov F75 in QUE v različnih koncentracijah vplivali tako na potek *in vitro* fermentacije, kot na mikrobo aktivnost v ampovih mikroorganizmov:

- Skupna potencialna produkcija plina (B) in produkcija plina v 24. urah (GAS_{24}) sta se z naraščajočo koncentracijo taninskih izvlečkov zmanjševali (od 240 do 171 ml/g SS in od 222 do 146 ml/g SS). F75 je imel pri obeh kazalnikih fermentacije nekoliko večji inhibitorni učinek kot QUE, vendar pa je ta pri najvišji koncentraciji bolj zmanjšal GAS_{24} (146 ml/g SS) v primerjavi s F75 (159 ml/g SS).

- Časi največje hitrosti fermentacije (TMFR) se med TI in koncentracijami TI niso statistično značilno razlikovali.
- Na največjo hitrost fermentacije (MFR) sta vplivala tako vrsta TI, kot njegova koncentracija. S povečevanjem koncentracije TI se je MFR zmanjševala, na kar je bolj vplival QUE (od 13,1 do 6,7 ml/h) kot F75 (od 11,9 do 9,0 ml/h).
- Vsebnosti očetne kisline in vseh HMK se niso statistično značilno spreminjale z naraščanjem koncentracije TI. Nasprotno pa so se vsebnosti propionske in maslene kisline statistično značilno zmanjševale. Pri tem je pri uporabi F75 nastalo manj propionske in maslene kisline (1,07 in 0,44 mmol/g SS) kot ob uporabi QUE (1,16 in 0,48 mmol/g SS).
- Delež očetne kisline se je ob uporabi obeh TI z naraščajočo koncentracijo povečeval, medtem ko sta se deleža propionske in maslene kisline zmanjševala. Tudi med obema vrstama TI smo opazili razlike, saj je bil ob uporabi F75 delež očetne kisline večji kot pri uporabi QUE, medtem ko sta bila deleža propionske in maslene kisline večja ob uporabi QUE.

V raziskavi smo ugotovili, da sta dodatka F75 in QUE vplivala tudi na razgradljivost in prebavljivost suhe snovi in surovih beljakovin:

- *in vitro* razgradljivost suhe snovi in surovih beljakovin se je z naraščajočo koncentracijo TI zmanjševala. Pri tem je imel F75 večji inhibitorski učinek (501 in 187 g/kg) kot QUE (558 in 287 g/kg).
- *in vitro* prebavljivost suhe snovi in surovih beljakovin se ob uporabi nižjih koncentracij TI nista močno razlikovali. Razlike v *in vitro* prebavljivosti SS in SB smo opazili šele ob uporabi najvišjih koncentracij TI, pri čemer so bile sojine tropine, obdelane s F75 bolj prebavljive (926 in 945 g/kg), kot tiste obdelane s QUE (902 in 934 g/kg).

6 POVZETEK

Zaradi prepovedi uporabe prehranskih antibiotikov, se je v zadnjih letih povečalo zanimanje za uporabo alternativnih krmnih dodatkov. Pri tem so še posebej zanimivi tanini, saj so, poleg antimikrobnega delovanja, sposobni tudi zaščititi beljakovine pred pretirano razgradnjo v predželodcih prežvekovalcev (Lavrenčič, 2001). Tanini so namreč sposobni tvoriti vezi z beljakovinami, rudninskimi snovmi, ogljikovimi hidrati, encimi in mikroorganizmi (Makkar in sod. 1987; cit po Roth, 2003). Njihova najpomembnejša lastnost je vsekakor sposobnost tvorbe močnih kompleksov z beljakovinami (Hagerman in Butler, 1981; cit. po Reed, 1995), kar je odvisno od lastnosti beljakovin in taninov, torej od molekulske mase, terciarne strukture, izoelektrične točke in števila mest, ki se povezujejo (Haslam, 1989; cit. po Reed, 1995). Tanini pozitivno vplivajo na prirejo mleka (Wang in sod., 1996; cit. po Kos, 2007; Petacchi in Buccioni, 2007), volne (Vaithyanathan in sod., 2007) in mesa (Luciano in sod., 2009; Priolo in sod., 2000), pa tudi na zmanjšano tvorbo metana (Blümmel in sod., 2005) ter fermentacijo in tvorbo HMK (Žgajnar, 1990).

Namen našega dela je bil ugotoviti, v kolikšni meri lahko z uporabo različnih koncentracij taninskih izvlečkov (TI) iz lesa pravega kostanja (F75) in kebrača (QUE) vplivamo na potek fermentacije sojinih tropin v predželodcih, na mikrobnost aktivnost in v kolikšni meri lahko z njimi zaščitimo beljakovine pred razgradnjo v predželodcih in kakšen vpliv imajo na prebavljivost in razgradljivost suhe snovi ter surovih beljakovin.

Za ugotavljanje poteka fermentacije in aktivnosti v ampovih mikroorganizmov smo uporabili plinski test. Aktivnost v ampovih mikroorganizmov smo ugotavljali tudi z analizo hlapnih maščobnih kislin in njihovih deležev. Razgradljivost in prebavljivost SB (in SS) smo ugotavljali z 24 urno *in vitro* inkubacijo s TI tretiranih sojinih tropin v v ampovem soku ter njihovo nadaljnjo obdelavo s pepsinom v 1 M klorovodikovi kislini.

Z naraščanjem koncentracije taninskih izvlečkov sta se skupna potencialna produkcija plina (B) in produkcija plina v 24. urah (GAS_{24}) zmanjševali. F75 je imel pri obeh kazalnikih nekoliko večji inhibitorni učinek (od 240 do 171 ml/g SS in od 219 do 161 ml/g SS) kot QUE (od 237 do 174 ml/g SS in od 222 do 173 ml/g SS), vendar pa je QUE pri najvišji koncentraciji (K5) bolj zmanjšal GAS_{24} (146 ml/g SS) kot F75 (159 ml/g SS). Časi največje hitrosti fermentacije (TMFR) se med TI in koncentracijami le teh niso statistično

značilno razlikovali. Največja hitrost fermentacije (MFR) se je z povečevanjem koncentracije TI zmanjševala, pri tem pa je imel QUE (od 13 do 7 ml/h) večji inhibitorski učinek kot F75 (od 12 ml/h do 9 ml/h).

Vsebnosti očetne kisline in vsota HMK se niso statistično značilno spreminjale z naraščanjem koncentracije TI, medtem ko so se vsebnosti propionske in maslene kisline zmanjševale, pri čemer je bilo zmanjšanje večje ob uporabi F75 (1,07 in 0,44 mmol/g SS) kot QUE (1,16 in 0,48 mmol/g SS). Pri deležih HMK smo opazili statistično značilne razlike med taninskima izvlečkoma. Pri deležu očetne kisline sta se F75 in QUE statistično značilno razlikovala pri K2 (74,5 in 68,1 %), K3 (76,0 in 65,7 %) in K4 (75,1 in 67,3 %). Pri deležu propionske kisline smo opazili statistično značilne razlike med F75 in QUE pri K3 (16,7 in 24,0 %) in K4 (17,4 in 22,9 %). Delež maslene kisline je imel statistično značilne razlike pri istih koncentracijah kot očetna kislina, torej pri K2 (7,1 in 9,9 %), K3 (7,3 in 10,3 %) in K4 (7,5 in 9,8 %). F75 je imel večji delež očetne kisline, QUE pa večji delež propionske in maslene kisline.

In vitro navidezna razgradljivost suhe snovi (IVNRSS) in surovih beljakovin (IVNRSB) sta se z naraščajočo koncentracijo TI zmanjševali, pri tem pa je imel F75 večji inhibitorski učinek (501 in 187 g/kg) kot QUE (558 in 287 g/kg). Ob uporabi nizkih koncentracij TI, le te niso statistično značilno vplivale na *in vitro* navidezno prebavljivost suhe snovi (IVNPSS) in surovih beljakovin (IVNPSB). Le pri uporabi najvišje koncentracije TI sta se IVNPSS in IVNPSB statistično značilno zmanjšali, pri tem pa je imel F75 manjši vpliv na IVNPSS in IVNPSB (926 in 945 g/kg) kot QUE (902 in 934 g/kg).

7 VIRI

- Animut G., Puchala R., Goetsch A.L., Patra A.K., Sahlu T., Varel V.H., Wells J. 2008. Methane emission by goats consuming different sources of condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 144: 228-241
- Barry T.N., Manley T.R. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pendunculatus* for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *British Journal of Nutrition*, 51: 493-504
- Barry T.N., Manley T.R., Duncan S.J. 1986. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pendunculatus* for sheep. 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *British Journal of Nutrition*, 55: 123-137
- Ben Salem H., Makkar H.P.S., Nefzaoui A., Hassayoun L., Abidi S. 2005. Benefit from the association of small amounts of tannin-rich shrub foliage (*Accacia cyanophylla* Lindl.) with soya bean meal given as supplements to Barbarine sheep fed on oaten hay. *Animal Feed Science and Technology*, 122: 173-186
- Bhat T.K., Singh B., Sharma O.P. 1998. Microbial degradation of tannins – a current perspective. *Biodegradation*, 9: 343-357
- 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
- Blümmel M., Makkar H.P.S., Becker K. 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 77: 24-34
- Bueno I.C.S., Vitti D.M.S.S., Louvandini H., Abdalla A.L. 2008. A new approach for *in vitro* bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, 141: 153-170

- Chung K.T., Wei C.I, Johnson M.G. 1998a. Are tannins a double-edged sword in biology and health?. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 168-175
- Chung K.T., Wong T.Y., Wei C.I, Huang Y.W., Lin Y. 1998b. Tannin and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 6: 421-464
- De Bruyne T., Pieters L., Deelstra H., Vlietinck A. 1999. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27: 445-459
- Decruyenaere V., Remond D., Zimmer N., Poncet C., Jebri A., Thewis A. 1996. Effet des tanins de châtaignier sur la digestion *in sacco* et *in vivo* des matières azotées chez les ruminants. *Rencontre Recherche Ruminants*, 3: 93-96
- Farmatan, kostanjev ekstrakt za živalsko prehrano. Tanin Sevnica. http://www.tanin.si/podstrani_slo/prehrana_zivali/farmatan.php (13. maj 2010)
- Frutos P., Hervás G., Giráldez F.J., Fernandez M., Mantecón A.R. 2000. Digestive utilization of quebracho-treated soya bean meals in sheep. *Journal of Agricultural Science*, 134: 101-108
- Frutos P., Hervás G., Giráldez F.J., Mantecón A.R. 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2, 2: 191-202
- Getachew G., Pittroff W., Putnam D.H., Dandekar A., Goyal S., DePeters E.J. 2008. The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on *in vitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Animal Feed Science and Technology*, 140: 444-461
- González S., Pabón M.L., Carulla J. 2002. Effects of tannins on *in vitro* ammonia release and dry matter degradation of soybean meal. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal*, 10, 2: 97-101
- Hagerman A.E., Robbins C., Weerasuriya Y., Wilson T.C., McArthur C. 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *Journal of Range Management*, 45: 57-62

- 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.
- Jouany J.-P., Morgavi D.P. 2007. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*, 1, 10: 1443-1466
- Kairuki I.W., Norton B.W. 2008. The digestion of dietary protein bound by condensed tannins in the gastro-intestinal tract of sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 142: 197-209
- Kermauner A., Lavrenčič A. 2008a. Supplementation of rabbit diet with chestnut wood extract: Effect on *in vitro* gas production from three sources of carbohydrates. V: 9th World Rabbit Congress Nutrition and Digestive Physiology, Verona, 10-13 jun. 2008: 683-688
- Kermauner A., Lavrenčič A. 2008b. Supplementation of rabbit diet with chestnut wood extract: Effect on *in vitro* gas production from two sources of protein. V: 9th World Rabbit Congress Nutrition and Digestive Physiology, Verona, 10-13 jun. 2008: 689-693
- Kos T. 2007. Vpliv taninov na tvorbo kratkoverižnih maščobnih kislin in metana pri *in vitro* fermentaciji v vampnem soku. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 66 str
- Kriaa S., Thewis A. 1998-99. Effet de l'addition des tannins de châtaigniers sur la rétention azotée et la digestibilité chez les ruminants ingérant des produits herbagers. *Tropicultura*, 16-17, 1: 26-28
- Lassey K.R. 2007. Livestock methane emission: From the individual grazing animal through national inventories to the global methan cycle. *Agricultural and Forest Meteorology*, 142: 120-132
- Lavrenčič A. 2001. Razgradljivost beljakovin v predželodcih prežvekovalcev. V: Uporaba kostanjevega tanina v prehrani živali. 9. tradicionalno posvetovanje, Podčetrtek, 22. mar. 2001. Sevnica, Tanin Sevnica: 39-47

- Lavrenčič A., Sivka U., Kos T. 2007. *In vitro* fermentation, volatile fatty acid and methane production from cellulose treated with different concentrations of chestnut tannins. V: III Symposium of livestock production with international participation, Ohrid, 12-14 sept. 2007. Palaševski B. (ur.). Skopje, Institut za stočarstvo: 785 str.
- Luciano G., Monahan F.J., Vasta V., Biondi L., Lanza M., Priolo A. 2009. Dietary tannins improve lamb meat colour stability. *Meat Science*, 81: 120-125
- 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
- Mangan J.L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Reviews*, 1: 209-231
- Martinez T.F., McAllister T.A., Wang Y., Reuter T. 2006. Effects of tannic acid and quebracho tannins on *in vitro* ruminal fermentation of wheat and corn grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 1244-1256
- McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. 2002. *Animal nutrition*. 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
- Moss A.R., Jouany J.-P., Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnic*, 49: 231-253
- Mueller- Harvey I. 2006 Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of food and Agriculture*, 86: 2010-2037
- Orešnik A., Kermauner A. 2008. *Osnove prehrane živali*. Učbenik. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 134 str.

- Petacchi F., Buccioni A. 2007. Effect of chestnut tannin in the diet of lactating ewes on milk and cheese quality. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 1: 585-587
- Priolo A., Waghorn G.C., Lanza M., Biondi L., Pennisi P. 2000. Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: Effects on lamb growth performance and meat quality. *Journal of Animal Science*, 78: 810-816
- Reed J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73: 1516-1528
- Rochfort S., Parker A.J., Dunshea F.R. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, 69: 299-322
- Roth S. 2003. Reducing methane emission and optimising N-supply in ruminants by treating feeds with tannins. Doctoral Dissertation. Aachen, Schaker Verlag: 155 str.
- Salawu M.B., Acamovic T., Stewart C.S., Hovell F.D. DeB. 1999. Effects of feeding quebracho tannin diets, with or without a dietary modifier, on rumen function in sheep. *Animal Science*, 69: 265-274
- SAS Institute Inc. 2001. The SAS System for Windows, Release 8.02. Cary, NC, USA
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883
- Sellier P. 2003. Protein nutrition for ruminants in European countries, in the light of animal feeding regulations linked to bovine spongiform encephalopathy. *Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties*, 22, 1: 259-269
- Sivka U. 2005. Vpliv vrste in koncentracije taninov na obseg in hitrost *in vitro* fermentacije škroba in celuloze v inokulumu pripravljenem iz vampnega soka. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 57 str.
- 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

- Tabacco E., Borreani G., Crovetto G.M., Galassi G., Colombo D., Cavallarin L. 2006. Effect of chestnut tannin on fermentation quality, proteolysis and protein degradability of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*, 89: 4736-4746
- Tavendale M.H., Meagher L.P., Pacheco D., Walker N., Attwood G.A., 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
- Vaithyanathan S., Bhatta R., Mishra A.S., Prasad R., Verma D.L., Singh N.P. 2007. Effect of feeding graded levels of *Prosopis cineraria* leaves on rumen ciliate protozoa, nitrogen balance and microbial protein supply in lambs and kids. *Animal Feed Science and Technology*, 133: 177-191
- Van Soest P.J., Conklin N.L., Horvath P.J. 1987. Tannins in foods and feeds. V: Proceedings 1987, Cornell nutrition conference for feed manufacturers. A report research of the Cornell University agricultural experiment station, Syracuse Marriott, 26-28 okt. 1987. Ithaca, New York State College of Agriculture and Life Sciences, Cornell University: 115-122
- Wolin M.J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science*, 43: 1452-1459
- Wood T.A., Wallace R.J., Rowe A., Price R., Yanez-Ruiz D.R., Murray P., Newbold C.J. 2009. Encapsulated fumaric acid as a feed ingredient to decrease ruminal methane emissions. *Animal Feed Science and Technology*, 152: 62-71
- Zimmer N., Cordesse R. 1996. Digestibility and ruminal digestion of non-nitrogenous compounds in adult sheep and goats: Effects of chestnut tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 61: 259-273
- Žgajnar J. 1990. Prehrana in krmljenje goved. ČZP Ljubljana, Kmečki glas: 564 str.

ZAHVALA

- ❖ Mentorju prof. dr. Andreju Lavrenčiču se zahvaljujem za korektno mentorstvo, koristne nasvete za izboljšanje diplomske naloge ter za pomoč pri poskusu v laboratoriju in statistični obdelavi podatkov.
- ❖ Recenzentki doc. dr. Tatjani Pirman in predsednici komisije prof. dr. Antoniji Holcman se zahvaljujem za pregled naloge in za koristne popravke in napotke.
- ❖ G. Marku Kodri gre zahvala za odvzem vampnega soka, ga. Mojci Koman Rajšp pa za pomoč pri analizi hlapnih maščobnih kislin.
- ❖ Dr. Nataši Siard se zahvaljujem za bibliografski pregled diplomske naloge, ga. Karmeli Malinger za pregled angleškega izvlečka, knjižničarkama ga. Jerneji Bogataj in ga. Cvetki Grbec pa za pomoč pri iskanju težje dostopnih člankov.
- ❖ Študentski referentki ga. Sabini Knehtl hvala za prijaznost in sposobnost hitrega in učinkovitega reševanja administrativnih zadev skozi celoten študij.
- ❖ Sošolkama Hani in Ireni hvala za odgovore na moja številna vprašanja v zvezi z diplomsko nalogo ter za kakršnokoli pomoč v času študija.
- ❖ Za kakršnokoli pomoč v času študija sem prav tako hvaležna tudi vsem ostalim sošolkam in sošolcem, še posebej Andreju, Ani, Barbari, Martini, Mojci, Poloni, Simoni, Tini, Živi...
- ❖ Hvala staršema in bratu za podporo in razumevanje skozi vsa leta študija.
- ❖ Zahvaljujem se tudi vsem neimenovanim, ki ste mi kakorkoli pomagali.

Andreja

PRILOGE

Priloga A:

Vpliv taninov na skupno potencialno produkcijo plina (B; ml/g SS)

Koncentracija	F75	QUE
K0	217 ^{abcd}	217 ^{abcd}
K1	240 ^a	237 ^{ab}
K2	219 ^{abc}	226 ^{abc}
K3	198 ^{cdef}	210 ^{abcde}
K4	181 ^{def}	202 ^{bcdef}
K5	171 ^f	174 ^{ef}

^{a, b, c, d, e, f} vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), *vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), F75- farmatan 75, QUE- kebračo; K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST

Priloga B:

Vpliv taninov na produkcijo plina v 24. urah fermentacije (GAS₂₄; ml/g SS)

Koncentracija	F75	QUE
K0	197 ^{abc}	197 ^{abc}
K1	220 ^a	222 ^a
K2	181 ^{bcd}	202 ^{ab}
K3	172 ^{cde}	183 ^{bcd}
K4	161 ^{de}	173 ^{cd}
K5	159 ^{de}	146 ^e

^{a, b, c, d, e} vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), *vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), F75- farmatan 75, QUE- kebračo; K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST

Priloga C:

Vpliv taninov na in vitro navidezno razgradljivost SS po 24. urah in vitro inkubacije (IVNRSS; g/kg)

Koncentracija	F75	QUE
K0	639 ^{cb}	639 ^{cb}
K1	636 ^{c*}	682 ^{a*}
K2	537 ^{f*}	657 ^{b*}
K3	515 ^{g*}	607 ^{d*}
K4	489 ^{h*}	566 ^{e*}
K5	501 ^{gh*}	558 ^{e*}

^{a, b, c, d, e, f, g, h} vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), *vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), F75- farmatan 75, QUE- kebračo; K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST

Priloga D:

Vpliv taninov na *in vitro* navidezno razgradljivost SB po 24. urah *in vitro* inkubacije (IVNRSB; g/kg)

Koncentracija	F75	QUE
K0	544 ^b	544 ^b
K1	507 ^{c*}	578 ^{a*}
K2	333 ^{f*}	543 ^{b*}
K3	277 ^{g*}	468 ^{d*}
K4	213 ^{h*}	362 ^{e*}
K5	187 ^{h*}	287 ^{g*}

^{a, b, c, d, e, f, g, h} vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), *vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), F75- farmatan 75, QUE- kebračo; K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST

Priloga E:

Vpliv taninov na *in vitro* navidezno prebavljivost SS po 24. urah *in vitro* inkubacije (IVNPSS; g/kg)

Koncentracija	F75	QUE
K0	948 ^{abc}	948 ^{abc}
K1	953 ^a	950 ^{ab}
K2	946 ^{abc}	947 ^{abc}
K3	938 ^{cde}	937 ^{cde}
K4	929 ^{de}	939 ^{bcd}
K5	926 ^{e*}	902 ^{f*}

^{a, b, c, d, e, f} vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), *vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), F75- farmatan 75, QUE- kebračo; K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST

Priloga F:

Vpliv taninov na *in vitro* navidezno prebavljivost SB po 24. urah *in vitro* inkubacije (IVNPSB; g/kg)

Koncentracija	F75	QUE
K0	980 ^a	980 ^a
K1	978 ^a	977 ^{ab}
K2	974 ^{ab}	975 ^{ab}
K3	971 ^{bc}	965 ^{cd}
K4	959 ^d	964 ^d
K5	945 ^{e*}	934 ^{f*}

^{a, b, c, d, e, f} vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), *vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$), F75- farmatan 75, QUE- kebračo; K0, K1, K2, K3, K4, K5 = koncentracije TI 0; 1,48; 2,91; 5,67; 10,71; 19,35 g/100 g ST