

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Urška SIVKA

**VPLIV VRSTE IN KONCENTRACIJE TANINOV NA
OBSEG IN HITROST *IN VITRO* FERMENTACIJE
ŠKROBA IN CELULOZE V INOKULUMU
PRIPRAVLJENEM IZ VAMPNEGA SOKA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2005

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Urška SIVKA

**VPLIV VRSTE IN KONCENTRACIJE TANINOV NA OBSEG IN
HITROST *IN VITRO* FERMENTACIJE ŠKROBA IN CELULOZE V
INOKULUMU PRIPRAVLJENEM IZ VAMPNEGA SOKA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF DIFFERENT TANNIN EXTRACTS AND
CONCENTRATIONS ON EXTENT AND RATE OF *IN VITRO*
FERMENTATION OF STARCH AND CELLULOSE IN RUMEN
LIQUOR**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2005

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstvo-zootehnika. Opravljeno je bilo na Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Andreja Lavrenčiča.

Recenzent: prof. dr. Janez Salobir

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Urška Sivka

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 636.084/.087(043.2) = 863
KG	prehrana živali/tanini/taninski izvlečki/celuloza/škrob/fermentacija/vamp/ produkcija plina
KK	AGRIS L51
AV	SIVKA, Urška
SA	LAVRENČIČ, Andrej (mentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2005
IN	VPLIV VRSTE IN KONCENTRACIJE TANINOV NA OBSEG IN HITROST <i>IN VITRO</i> FERMENTACIJE ŠKROBA IN CELULOZE V INOKULUMU PRIPRAVLJENEM IZ VAMPNEGA SOKA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 59 str., 22 pregl., 18 sl., 2 pril., 48 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Proučevali smo vpliv vrste in koncentracije različnih taninskih izvlečkov na obseg in hitrost <i>in vitro</i> fermentacije škroba in celuloze v vampnem soku. Uporabili smo pet taninskih izvlečkov (F75, FAK, KPS, QUE in TAK) različnih koncentracij (0 (kontrola) 0,17, 0,33, 0,67, 1,33 in 2,67 mg/ml medija). <i>In vitro</i> produkcijo plina smo v prvih 12 urah merili na dve uri, potem do 48 ur na 12 ur in do 96 ur na 24 ur (pri koncentracijah 1,33 in 2,67 mg/ml medija smo inkubacijski čas celuloze podaljšali do 168 ur ter po 48 urah opravljali meritve na 8 in 16 ur). S pomočjo Gompertzove funkcije smo ocenili kazalnike fermentacije (skupna potencialna produkcija plina (B), specifična hitrost fermentacije (C) in konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A)) ter izračunali čas največje hitrosti fermentacije (TMFR), največjo hitrost fermentacije (MFR) in časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG). F75 (366,8 ml/g SS) je najbolj zavrli skupno potencialno produkcijo plina iz celuloze. Čas največje hitrosti fermentacije celuloze je bil največji pri TAK (37,3 h), ki je tudi najbolj zmanjšal največjo hitrost fermentacije celuloze (15,7 ml/h). Čeprav je bila hitrost fermentacije škroba največja pri QUE (37,4 ml/h), je le-ta najbolj zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina iz škroba (386,5 ml/g SS). TAK je najbolj zavrli produkcijo plina iz škroba v 24 urah (370,7 ml/g SS) in produkcijo plina iz celuloze v 48 urah (346,4 ml/g SS). Največja koncentracija (2,67 mg/ml medija) taninskih izvlečkov je imela največji negativni učinek na produkcijo plina v 24 in 48 urah.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 636.084/.087(043.2) = 863
CX animal nutrition/tannins/tannin extracts/cellulose/starch/fermentation/rumen/gas production
CC AGRIS L51
AU SIVKA, Urška
AA LAVRENČIČ, Andrej (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department
PY 2005
TI EFFECTS OF DIFFERENT TANNIN EXTRACTS AND CONCENTRATIONS ON EXTENT AND RATE OF IN VITRO FERMENTATION OF STARCH AND CELLULOSE IN RUMEN LIQUOR
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 59 p., 22 tab., 18 fig., 2 ann., 48 ref.
LA sl
AL sl/en
- AB Effects of different tannin extracts and concentrations on the extent and rate of *in vitro* fermentation of starch and cellulose in rumen liquor were investigated in this study. Five different types (F75, FAK, KPS, QUE and TAK) and six concentrations (0 (control) 0.17, 0.33, 0.67, 1.33 and 2.67 mg/ml medium) of tannin extracts were used. Gas readings were taken at two hours interval for the first 12 hours then each 12 hours up to 48 hours and each 24 hours up to 96 hours (for concentrations 1.33 and 2.67 mg/ml medium the incubation time of cellulose was extended to 168 hours and after 48 hours readings were taken at intervals of 8 and 16 hours. With Gompertz model we estimated total potentially gas production (B), relative degradation rate (C) and constant decay in relative degradation rate (A). We calculated the time of maximum fermentation rates (TMFR), maximum fermentation rate (MFR), and lag phase (LAG). F75 (366.8 ml/g DM) had the highest negative effect on total potential gas production from cellulose. TAK (37.3 h) had the highest time of maximum fermentation rate of cellulose and the lowest maximum fermentation rate of cellulose (15.7 ml/h). Although QUE (37.4 ml/h) had the highest maximum fermentation rate of starch it also had the lowest potential gas production from starch (386.5 ml/g DM). TAK had the highest negative effect on gas production from starch in 24 hours (370.7 ml/g DM) and gas production from cellulose in 48 hours (346.4 ml/g DM). Concentration 2.67 mg/ml medium had the highest negative effect on gas production in 24 and 48 hours.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 LASTNOSTI TANINOV	3
2.1.1 Vrste taninov	5
2.1.1.1 Hidrolizirajoči tanini	5
2.1.1.2 Kondenzirani tanini	6
2.2 DELOVANJE TANINOV	8
2.2.1 Povezovanje z makromolekulami	8
2.2.1.1 Taninsko-beljakovinski kompleks	8
2.2.1.2 Kompleksi z ogljikovimi hidrati, rudninskimi snovmi in vitamini	10
2.2.2 Prebavljivost in razgradnja taninskih kompleksov	10
2.2.2.1 Taninsko-beljakovinski kompleks	10
2.2.2.2 Kompleksi z ogljikovimi hidrati	11
2.2.3 Učinek taninov na vampne mikroorganizme	12
3 MATERIAL IN METODE	15
3.1 SUBSTRAT	15
3.2 TANINSKI IZVLEČKI	15
3.2.1 Kostanjevi izvlečki (F75, FAK, KPS)	16
3.2.2 Taninska kislina	16
3.2.3 Quebracho izvleček	17
3.3 PLINSKI TEST	17
3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	19

3.4.1	Kazalniki fermentacije	19
3.4.2	Model	21
4	REZULTATI	23
4.1	OPISNA STATISTIKA	23
4.2	SKUPNA POTENCIALNA PRODUKCIJA PLINA (B)	24
4.2.1	Celuloza	24
4.2.2	Škrob	25
4.3	SPECIFIČNA HITROST FERMENTACIJE (C)	26
4.3.1	Celuloza	26
4.3.2	Škrob	27
4.4	KONSTANTNI FAKTOR MIKROBNE (NE)UČINKOVITOSTI (A)	28
4.4.1	Celuloza	28
4.4.2	Škrob	29
4.5	ČAS NAJVEČJE HITROSTI FERMENTACIJE (TMFR)	30
4.5.1	Celuloza	30
4.5.2	Škrob	31
4.6	NAJVEČJA HITROST FERMENTACIJE (MFR)	32
4.6.1	Celuloza	32
4.6.2	Škrob	34
4.7	ČASOVNI ZAOSTANEK ZAČETKA FERMENTACIJE (LAG)	35
4.7.1	Celuloza	35
4.7.2	Škrob	36
4.8	PRODUKCIJA PLINA V 24 URAH (GAS ₂₄)	38
4.8.1	Celuloza	38
4.8.2	Škrob	39
4.9	PRODUKCIJA PLINA V 48 URAH (GAS ₄₈)	40
4.9.1	Celuloza	40
4.9.2	Škrob	41
5	RAZPRAVA	43
5.1	RAZPRAVA	43
5.2	SKLEPI	47
6	POVZETEK	50

7	VIRI	54
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Lastnosti BWW 40 in škroba (podatki proizvajalcev)	15
Preglednica 2: Sestava taninskih izvlečkov (podatki proizvajalcev)	15
Preglednica 3: Sestava raztopin A, B in C	18
Preglednica 4: Sestava redukcijske raztopine in pufra	18
Preglednica 5: Vsebnost substrata, taninskih izvlečkov (TI) ter medija uporabljenega v poskusu	19
Preglednica 6: Opisna statistika po substratu	23
Preglednica 7: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na skupno potencialno produkcijo plina (ml/g SS) iz celuloze	24
Preglednica 8: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na skupno potencialno produkcijo plina (ml/g SS) iz škroba	26
Preglednica 9: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na specifično hitrost fermentacije celuloze	27
Preglednica 10: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na specifično hitrost fermentacije škroba	28
Preglednica 11: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti pri celulozi	28
Preglednica 12: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti pri škrobu	29
Preglednica 13: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na čas, ko je dosežena največja hitrost fermentacije celuloze (h)	30
Preglednica 14: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na čas, ko je dosežena največja hitrost fermentacije škroba (h)	31
Preglednica 15: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na največjo hitrost fermentacije celuloze (ml/h)	33

Preglednica 16:	Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na največjo hitrost fermentacije škroba (ml/h)	34
Preglednica 17:	Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na časovni zaostanek začetka fermentacije celuloze (h)	35
Preglednica 18:	Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na časovni zaostanek začetka fermentacije škroba (h)	37
Preglednica 19:	Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na produkcijo plina iz celuloze v 24 urah (ml/g SS)	38
Preglednica 20:	Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na produkcijo plina iz škroba v 24 urah (ml/g SS)	39
Preglednica 21:	Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na produkcijo plina iz celuloze v 48 urah (ml/g SS)	41
Preglednica 22:	Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na produkcijo plina iz škroba v 48 urah (ml/g SS)	42

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Taninska kislina	6
Slika 2: Kemijska zgradba kondenziranega tanina	7
Slika 3: Nastanek in razgradnja taninsko-beljakovinskega kompleksa	10
Slika 4: Shematski prikaz Gompertzove funkcije (B – skupna potencialna produkcija plina (ml), MFR – največja hitrost fermentacije (ml/h), LAG – časovni zaostanek začetka fermentacije (h))	20
Slika 5: Shematski prikaz MFR glede na TMFR (MFR – največja hitrost fermentacije (ml/h), TMFR – čas, ko je dosežena največja hitrost fermentacije (h))	21
Slika 6: Skupna potencialna produkcija plina (ml/g SS) iz celuloze	25
Slika 7: Skupna potencialna produkcija plina (ml/g SS) iz škroba	26
Slika 8: Čas, v katerem je dosežena največja hitrost fermentacije celuloze (h)	31
Slika 9: Čas, v katerem je dosežena največja hitrost fermentacije škroba (h)	32
Slika 10: Največja hitrost fermentacije celuloze (ml/h)	33
Slika 11: Največja hitrost fermentacije škroba (ml/h)	34
Slika 12: Časovni zaostanek začetka fermentacije celuloze (h)	36
Slika 13: Časovni zaostanek začetka fermentacije škroba (h)	37
Slika 14: Produkcija plina iz celuloze v 24 urah (ml/g SS)	38
Slika 15: Produkcija plina iz škroba v 24 urah (ml/g SS)	40
Slika 16: Produkcija plina iz celuloze v 48 urah (ml/g SS)	41
Slika 17: Produkcija plina iz škroba v 48 urah (ml/g SS)	42
Slika 18: Kumulativna produkcija plina iz škroba z naraščajočo koncentracijo quebracho izvlečka (QUE)	44

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Opisna statistika po substratu in taninskih izvlečkih
Priloga B: Opisna statistika po substratu in koncentracijah taninskih izvlečkov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

F75	farmatan 75
FAK	farmatan 75 z dodano kislino
KPS	kps
QUE	quebracho taninski izvleček
TAK	taninska kislina
B	skupna potencialna produkcija plina
C	specifična hitrost fermentacije
A	konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti
TMFR	čas največje hitrosti fermentacije
MFR	največja hitrost fermentacije
LAG	časovni zaostanek začetka fermentacije
PEG	polietilenglikol
SS	suha snov
h	ura
ml	mililiter
l	liter
mg	miligram
g	gram
°C	stopinje Celzija

1 UVOD

Človek je zelo radovedno in znanja željno bitje. Njegova lakota po znanju je nenasitna in prav ta želja »vedeti več« mu je omogočila, da se je razvil v najbolj inteligentno bitje na Zemlji. Želja po obleki je človeka pripeljala do uporabe taninov. Sprememba živalske kože v usnje je poznana že od 600 let p. n. š. (Haslam, 1989). Kožo živali so namočili v vodo, kamor so predhodno dodali zmleto hrastovo lubje ali šiške. Seveda te pretvorbe kože v usnje niso povezovali s tanini, ampak so sklepali, da je sprememba povezana s hrastovim lubjem, ki skrči in strdi kožo. Šele nekje v 18. stoletju je človek odkril tanine in njihovo lastnost pretvorbe kože v usnje (Haslam, 1989). Od tod tudi izvor besede tanin, saj angleški izraz »tanning« pomeni strojenje.

Šele v prejšnjem stoletju so ugotovili, da imajo tanini mnogo več koristnih lastnosti, kot samo pretvorbo kož v usnje. Tanine najdemo v travinju, grmovju in drevesih. V rastlinah imajo tanini obrambno funkcijo, saj s svojim trpkim okusom varujejo rastline pred rastlinojedimi živalmi. Tanine lahko uporabljamo tudi v zdravstvu, saj pomagajo pri zdravljenju ran, opeklin in vnetij. Prisotni so v prehrani ljudi in živali ter tvorijo s hranljivimi snovmi reverzibilne in ireverzibilne vezi. Najpogosteje se tanini povezujejo z beljakovinami, ogljikovimi hidrati, rudninskimi snovmi, vitamini ter mikroorganizmi. Zelo dobro je raziskana tvorba kompleksa med taninom in beljakovinami. Z vezavo taninov na beljakovine krme se izboljša prireja mleka, mesa ter volne (Makkar, 2003). Tvorba taninsko-beljakovinskega kompleksa vodi tudi do zmanjšane produkcije metana ter manjše izgube sečnine s sečem, kar vodi do manjšega onesnaževanja okolja (Makkar, 2003). Vendar pa prekomerno zaužitje taninov povzroči zastrupitev organizma, ki je posledica prekomerne koncentracije fenolov v krvi. Živali se pred zastrupitvijo lahko zaščitijo s povečanim izločanjem beljakovin v slini, ki vežejo tanine. Tanini omejujejo delovanje mikroorganizmov z vezavo na njihovo membrano ali encime, ki sodelujejo pri razgradnji hranljivih snovi. Negativno delujejo tako na bakterije kot na glive in kvasovke.

Namen naše naloge je ugotoviti, kako različni taninski izvlečki v različnih koncentracijah vplivajo na potek *in vitro* fermentacije celuloze in škroba. S spremembo poteka *in vitro* fermentacije bo posredno spremenjeno tudi delovanje mikroorganizmov vampnega soka.

Zanima nas obseg kazalnikov fermentacije (skupna potencialna produkcija plina (B), specifična hitrost fermentacije (C) in konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A)) ter obseg časovnega zaostanka začetka fermentacije (LAG), največja hitrost fermentacije (MFR) in čas največje hitrosti fermentacije (TMFR). Hkrati nas zanima tudi produkcija plina v 24 in 48 urah. Predpostavljamo, da bodo različni taninski izvlečki različno delovali na potek *in vitro* fermentacije ter, da se bo zaviralen učinek povečeval s povečevanjem koncentracije taninskih izvlečkov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 LASTNOSTI TANINOV

Tanini so rastlinski polimeri, sestavljeni iz fenolnih enot. Hidroksilne skupine fenolnih obročev so večinoma proste in niso derivatizirane kot pri ligninu. Zaradi velikega števila monomernih enot je najmanjša molekulska masa okoli 500, medtem ko so največje molekulske mase lahko večje od 20000. Na splošno so tanini topni v vodi, čeprav je lahko topnost molekul z veliko molekulsko maso močno omejena (Lavrenčič, 2001). Zaradi velikega števila hidroksilnih skupin tvorijo tanini različne vrste vezi z beljakovinami (encimi), aminokislinami, ogljikovimi hidrati, kovinskimi ioni, vitamini in bakterijskimi celičnimi membranami (Makkar, 2003; Mole in Waterman, 1987; Butter in sod., 1999). Pri tem nastajajo različni kompleksi, ki pogosto onemogočajo mikrobnno razgradnjo substrata.

Tanini rastline ščitijo pred rastlinojedimi organizmi, patogenimi mikroorganizmi ter pred gnitjem. Najdemo jih v travinju, grmovju in drevesih (v lubju, lesu, listju, plodovih in koreninah) (Scalbert, 1991). Prvi odziv živali na krmo bogato s tanini, je zmanjšanje zauživanja krme, ki je odvisno od okusnosti in prebavljivosti krme. Tanini so poznani po svojem astringentnem (trpkem) okusu, ki zmanjšuje okusnost in zauživanje krme, kar vpliva na produktivnost živali (Butter in sod., 1999; Kumar in Vaithyanathan, 1990). Na splošno so tanini nezaželeni v prehrani neprežvekovalcev, ker zmanjšujejo prirejo s slabšanjem dostopnosti hranljivih snovi (Mangan, 1988).

Po Mangan (1988) je napenjanje pri govedu in ovcah najbolj razširjena prehranska motnja, ki nastane zaradi krmljenja voluminozne krme bogate z beljakovinami, kot so lucerna in različne vrste detelj. Butter in sod. (1999) ugotavljajo, da krmljenje zelo nizkih koncentracij taninov (pod 5 g/kg SS) preprečuje napenjanje živali. Prav tako nizke koncentracije taninov povečujejo sintezo mikrobnih beljakovin in zmanjšujejo razgradljivost beljakovin in ostalih makromolekul v vampu, kar zmanjšuje produkcijo metana ter izločanje dušika v okolje (Makkar, 2003). Pri prežvekovalcih imajo ti procesi pozitiven učinek, saj povečujejo tok esencialnih aminokislin v tanko črevo in tako izboljšujejo prirejo mleka, mesa in volne. Poleg tega, da tanini preprečujejo napenjanje pri

prežvekovalcih, delujejo tudi kot sredstvo proti črevesnim zajedavcem (Kahn in Diaz-Hernandez, 2000). Z zmanjševanjem razgradljivosti beljakovin, izboljšujejo tanini kakovost silaž. Zaradi vseh zgoraj naštetih učinkov, Makkar (2003) meni, da oznaka taninov kot antinutritivnih snovi ni več primerna.

Tanine delimo na hidrolizirajoče in kondenzirane tanine. Obe skupini taninov imata tako škodljive kot koristne učinke, ki so odvisni od vrste in koncentracije tanina v obroku, vrste živali ter fiziološkega stanja živali (Kumar in Vaithyanathan, 1990; Butter in sod., 1999; Makkar, 2003). Hidrolizirajoči in kondenzirani tanini se med seboj razlikujejo po strukturi in reaktivnosti s hidrolitičnimi reagenti (Kumar in Vaithyanathan, 1990).

Dolgotrajno zauživanje krme bogate s tanini lahko povzroči zastrupitev živali (Kumar in Vaithyanathan, 1990). Strupene učinke imajo tako kondenzirani kot hidrolizirajoči tanini. Vampni mikroorganizmi so sposobni razgrajevati hidrolizirajoče tanine (Makkar, 2003), medtem ko razgradnja kondenziranih taninov v vampu ne poteka (McSweeney in sod., 2001; Makkar, 2003). Do zastrupitve organizma pride zaradi absorpcije razgradnjih produktov hidrolizirajočih taninov in povečane koncentracije fenolov v krvi, ki jih jetra niso sposobna razstrupiti. Posledica so poškodbe notranjih organov. Kondenzirani tanini se ne absorbirajo v kri, zato za notranje organe niso nevarni. Živali se pred škodljivimi učinki taninov zaščitijo s povečanim izločanjem s prolinom bogatih beljakovin (*proline-rich proteins* (PRPs)) v slini (Mehansho in sod., 1987, cit. po Makkar in Becker, 1998). Ker se PRPs hitro vežejo na tanine, je za vezavo na tanine potrebno manj beljakovin krme, kar vodi do zmanjšanja izločanja dušika v okolje (Makkar in Becker, 1998).

S tanini se srečujemo tudi v človeški prehrani. Chung in sod. (1998a) povezujejo nastanek raka na požiralniku z zauživanjem hrane bogate s tanini kot so betelovi orehi (*Areca catechu L.*) in zeliščni čaji, čeprav še ni znano ali je karcinogenost odvisna samo od taninov ali tudi od drugih faktorjev oziroma molekul, ki se povezujejo s tanini. Mnogo raziskav poroča o antikarcinogenosti taninov. Polifenoli čaja in mnoge sestavine taninov delujejo antikarcinogeno. Določene sestavine taninov zmanjšujejo mutageno aktivnost različnih snovi. Karcinogene in/ali mutagene snovi sintetizirajo proste kisikove radikale, ki se vežejo na celične makromolekule. Antikarcinogenost in antimutagenost sta povezani z

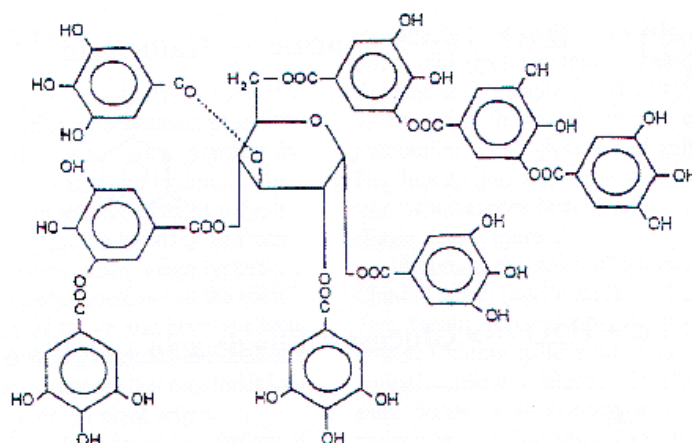
antioksidativno sposobnostjo taninov, ki je pomembna pri zaščiti celic pred oksidacijo, vključno z lipidno peroksidacijo (Chung in sod., 1998b).

2.1.1 Vrste taninov

2.1.1.1 Hidrolizirajoči tanini

Hidrolizirajoči tanini vsebujejo ogljikohidratno jedro (ponavadi D-glukozo) s hidroksilnimi skupinami, ki tvorijo estre s karboksilnimi kislinami kot so galna, elagna in heksahidroksidifenska kislina (Mangan, 1988). Hidrolizirajoče tanine delimo na galotanine in elagitanine (Chung in sod., 1998a). Galotanini so estri galne in elagne kisline, elagitanini pa heksahidroksidifenske kisline z D-glukozo. Pri hidrolizi esterskih vezi prostih heksahidroksidifenskih kislin se tvori elagna kislina (lakton) (Hagerman in Butler, 1991), medtem ko galotanini pri hidrolizi s kislinami, bazami ali encimi razpadejo na glukozo in galno kislino (Chung in sod., 1998a). Taninska kislina (slika 1) je tipičen hidrolizirajoči tanin (Singh in sod., 2001) in jo uvrščamo med galotanine. Po Mangan (1988) vsebuje taninska kislina 8 do 10 molov galne kisline na mol glukoze. Najenostavnejši elagitanin je korilagin in ga najdemo v rodovih in vrstah *Caesalpinia*, *Coriaria*, *Terminalia chebula*, *Schinopsis* in *Eucalyptus sieberiana*. Med elagitanine uvrščamo tudi čebulinsko in čebulagno kislino.

Ob prisotnosti kislin, baz in encimov esteraz, hidrolizirajoči tanini razpadejo na sladkorje in fenolne karboksilne kisline. V vampu prežvekovalcev esterske vezi cepijo mikroorganizmi vrst *Selenomonas ruminantium* in *Streptococcus spp.*, ki sintetizirajo esteraze imenovane tanin acilhidrolaze (McSweeney in sod., 2001). Pri razgradnji hidrolizirajočih taninov, s tanin acilhidrolazo, nastaneta galna in elagna kislina. V vampu galna kislina dekarboksilira v pirogalol, le-ta pa se nato pretvori v resorcinol in fluoroglucionol. Tudi Singh in sod. (2001) poročajo o nastanku galne kisline, pirogalola in resorcinola pri *in vitro* razgradnji taninske kisline z vampnim sokom goved.

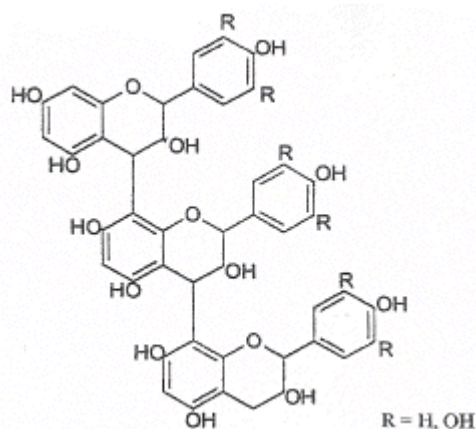


Slika 1: Taninska kislina (Chung in sod., 1998b)

Hidrolizirajoči tanini se nahajajo v semenih, strokih, lubju, lesu, sadju, listju ter šiškah rastlin iz družin octovk (*Anacardiaceae*), metuljnic (*Leguminosae*), bukvovk (*Fagaceae*), kombretovk (*Combretaceae*) in mirtovk (*Myrtaceae*) (Mueller-Harvey, 2001).

2.1.1.2 Kondenzirani tanini

Po Hagerman in Butler (1991) so kondenzirani tanini (slika 2) oligomeri in polimeri flavanolnih enot (flavan-3-olov in flavan-3,4-diolov), povezanih z ogljikovimi vezmi (C-C), ki niso dovzetne na hidrolizo. Kondenzirane tanine imenujemo tudi proantocianidini, ker pri segrevanju z dodatkom kisline in kovinskimi ioni v sledovih, tvorijo barvne antocianidine. Nastanek antocianidinov v kislem mediju uvršča flavan-3,4-diole med leukoantocianidine. Leukocianidine, leukopelargonidine in leukodelfinidine uvrščamo med flavan-3,4-diole. Flavan-3-oli, pogosto jih imenujemo katehini, tvorijo štiri izomere. Po Chung in sod. (1998a) lahko epikatehin izoliramo iz kakavovih zrn, epigalokatehin pa iz zelenih čajev. V zelenih čajih so poleg epigalokatehina prisotni tudi galokatehin, katehin in epikatehin.



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

Kondenzirani tanini nimajo ogljikohidratnega jedra kot hidrolizirajoči, vendar se pojavljajo kot različni polimeri sestavljeni iz flavanolnih enot (procianidin) (Mangan, 1988) v celičnih vakuolah (Min in sod., 2003). V primerjavi s hidrolizirajočimi tanini imajo kondenzirani tanini kompleksnejšo strukturo. Odpornost ogljikovih vezi na hidrolizo omogoča kondenziranim taninom večjo stabilnost kot hidrolizirajočim. Depolimerizacija kondenziranih taninov, s cepitvijo ogljikovih vezi, ne poteka pod anaerobnimi pogoji, zato razgradnja kondenziranih taninov v vampu verjetno ne poteka (McSweeney in sod., 2001; Makkar, 2003).

Kondenzirane tanine najdemo v navadni nokoti (*Lotus corniculatus*), močvirski nokoti (*Lotus pedunculatus*) in medenici (*Hedysarum coronarium*) (Barry in sod., 2001) ter tudi v navadni turški detelji (*Onobrychis viciifolia*), topolistni kislici (*Rumex obtusifolius*), akaciji (*Acacia spp.*), bombaževem semenu (*Gossypium sp.*), sirku (*Sorghum sp.*) ter bobu (*Vicia faba*) (Butter in sod., 1999).

2.2 DELOVANJE TANINOV

2.2.1 Povezovanje z makromolekulami

Koristni in škodljivi učinki taninov so posledica tvorbe kompleksov z:

1. beljakovinami (encimi),
2. ogljikovimi hidrati,
3. rudninskimi snovmi in vitamini,
4. bakterijskimi celičnimi stenami.

2.2.1.1 Taninsko-beljakovinski kompleks

Sposobnost vezave taninov na beljakovine je znana že od začetkov usnjarske industrije. Pri strojenju tvorijo tanini s kolagenom komplekse, ki trajno zaščitijo usnje pred napadi mikroorganizmov (Mangan, 1988). Mnogi avtorji opisujejo nastanek taninsko-beljakovinskega kompleksa, ki nastane pri obarjanju beljakovin ob prisotnosti taninov (Kumar in Singh, 1984; Hagerman in Klucher, 1986; Mangan, 1988; Kumar in Vaithyanathan, 1990; Chung in sod., 1998b; Butter in sod., 1999).

Obstojnost vezi med taninsko-beljakovinskim kompleksom je odvisna od lastnosti taninov in lastnosti beljakovin, kot so molekulska masa, terciarna struktura, izoelektrična točka in kompatibilnost mest za vezavo (*compatibility of binding sites*) (Silanikove in sod., 2001). Velikost molekule tanina je zelo pomembna za nastanek taninsko-beljakovinskega kompleksa. Molekula tanina mora biti dovolj majhna, da prodre med verige beljakovinske molekule in dovolj velika, da se lahko veže na več mest beljakovinske verige (Chung in sod., 1998b). Najmanjša molekulska masa tanina za učinkovito obarjanje beljakovin je 350 (Kumar in Singh, 1984; Chung in sod., 1998b). Teoretično sta za obarjanje beljakovin, pri hidrolizirajočih taninih, dovolj najmanj dve galni kislini ali ena elagna kislina.

Kot poročata Hagerman in Klucher (1986) se tanini z beljakovinami povezujejo na osnovi kovalentnih, ionskih, vodikovih ter hidrofobnih interakcij. Najpogosteje se na beljakovine vežejo z vodikovimi vezmi, ki nastanejo med hidroksilnimi skupinami taninov in karboksilnimi skupinami beljakovin. Nastanek vodikovih vezi pri prežvekovalcih poteka že v ustih med žvečenjem krme ter se nadaljuje v vampu. Nastanek kovalentnih vezi je

povezan z oksidacijo fenolov pri visokem pH (Hagerman in Klucher, 1986). Tvorba kovalentnih, ionskih in vodikovih vezi je odvisna od pH okolja, medtem ko je hidrofobna interakcija neodvisna od pH okolja (Hagerman in Klucher, 1986).

Nastanek taninsko-beljakovinskega kompleksa je odvisen od lastnosti taninov in beljakovin, pH okolja ter kot so ugotovili Perez-Maldonado in sod. (1995) tudi od temperature in prisotnosti anorganskih ionov (Ca, Mg, Na in K). Po Hagerman in Klucher (1986) ima vsaka beljakovina svoj optimalen pH, ki je ponavadi blizu izoelektrične točke beljakovine. V ustih in vampu prežvekovalcev je pH ugoden za obstoj taninsko-beljakovinskega kompleksa. *In vitro* je taninsko-beljakovinski kompleks najbolj stabilen pri pH med 5,6 in 7,0 (Martin in sod., 1985, cit. po Butter in sod., 1999), pod pH 5,6 in nad pH 7,0 kompleks razpade. Tudi Perez-Maldonado in sod. (1995), ki so naredili poskuse *in vitro* z govejim serumskim albuminom in rastlinskimi beljakovinami, so prišli do podobnih zaključkov. Netopni kompleksi z govejim serumskim albuminom so nastali pri pH med 4,5 in 5,5, medtem ko so kompleksi z rastlinskimi beljakovinami nastali pri pH med 3,5 in 5,5.

Tanini imajo do nekaterih beljakovin zelo veliko afiniteto (privlačnost), do drugih beljakovin pa zelo majhno. Zelo veliko privlačnost imajo do s prolinom bogatih beljakovin slin. Po Hagerman in Klucher (1986) imajo tanini majhno afiniteto do beljakovin, ki so majhne in imajo zaprto terciarno strukturo, zaradi česar ne morejo tvoriti vodikovih vezi s tanini. Goveji serumski albumin je za tanine bolj privlačen kot ovalbumin.

Sintetični polimeri, kot so v vodi topen polivinil pirolidin, v vodi netopen polivinil pirolidin in v vodi topen polietilenglikol (PEG), tvorijo močne vodikove vezi s tanini (Silanikove in sod., 2001), s tem pa preprečujejo nastanek taninsko-beljakovinskega kompleksa. Na PEG se v širokem pH območju vežejo tako kondenzirani kot hidrolizirajoči tanini. PEG se uporablja za preprečevanje škodljivih učinkov taninov na mikrobo fermentacijo v predželodcih in hkrati izboljšuje prirejo živali (Getachew in sod., 2001).

2.2.1.2 Kompleksi z ogljikovimi hidrati, rudninskimi snovmi in vitamini

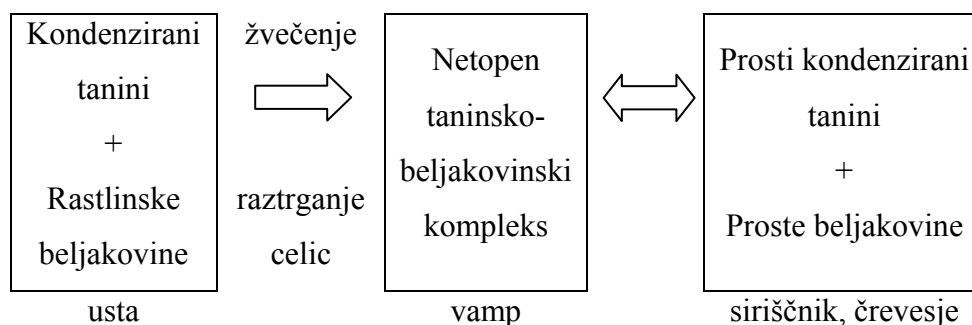
Kot pri taninsko-beljakovinskemu kompleksu, na tvorbo vezi med ogljikovimi hidrati in tanini vplivajo topnost, molekulska masa in struktura ogljikovih hidratov (Haslam, 1989). Tanini se z ogljikovimi hidrati povezujejo z reverzibilnimi hidrofobnimi vezmi. Najpogosteje se tanini povezujejo s celulozo, hemicelulozo, škrobom ter pektinom (McSweeney in sod., 2001; Reed, 1995).

Fenolne skupine taninov se povezujejo z rudninskimi snovmi in vplivajo na njihovo izkoriščanje. Obarvanje mineralnih soli s taninsko kislino je odvisno od pH. Kompleks med železom in taninom ne razpade niti v siriščniku, kar je značilno za ostale komplekse s tanini. South in Miller (1998) sta ugotovila, da dodatek etilendiamintetraočetne kisline (EDTA) *in vitro* preprečuje vezavo tanina na železo in hkrati cepi železo-taninske komplekse. Tanini delujejo negativno na absorpcijo vitamina A in zmanjšujejo izkoristljivost vitamina B₁₂ (Chung in sod., 1998b).

2.2.2 Prebavljivost in razgradnja taninskih kompleksov

2.2.2.1 Taninsko-beljakovinski kompleks

Nastanek taninsko-beljakovinskega kompleksa zaščiti beljakovine krme pred mikrobnou razgradnjo v vampu prežvekovalcev.



Slika 3: Nastanek in razgradnja taninsko-beljakovinskega kompleksa (povzeto po Mangan, 1988)

Kot prikazuje slika 3 nastanejo taninsko-beljakovinski kompleksi že v ustih prežvekovalcev pri žvečenju krme. Po Mangan (1988) je najbolj pogosta rastlinska beljakovina F1 beljakovina oziroma ribuloza-1,5-difosfat karboksilaza. Min in sod. (2003)

poročajo o zmanjšani mikrobní razgradnji F1 beljakovine pri uporabi kondenziranih taninov iz navadne nokote (*Lotus corniculatus*) in močvirske nokote (*Lotus pedunculatus*). V vampu prežvekovalcev je taninsko-beljakovinski kompleks netopen zaradi neugodnega pH (od 5 do 7), kar vodi do povečanega toka taninsko-beljakovinskega kompleksa v sirišnik in tanko črevo. O povečanem toku taninsko-beljakovinskega kompleksa v tanko črevo pri ovcah in kozah krmljenih z *Desmodium intortum* in *Calliandra calothyrsus* poročata tudi Perez-Maldonado in Norton (1996). Zaradi nizkega pH v sirišniku (od 2,5 do 3,5) in visokega pH soka trebušne slinavke (8,0) taninsko-beljakovinski kompleks razpade, s tem pa postanejo beljakovine dostopne za razgradnjo in absorbcijo v tankem črevesu (Butter in sod., 1999).

Vezava kondenziranih taninov na beljakovine pri ovcah zmanjša koncentracijo amoniaka v vampu, poveča koncentracijo esencialnih aminokislin v plazmi in tok neamoniakalnega dušika iz vampa (Min in sod., 2003). Tudi Butter in sod. (1999) poročajo o povečanem neamoniakalnem dušiku in zmanjšani koncentraciji amoniaka. Manjša koncentracija amoniaka v vampu vodi do zmanjšane izgube sečnine s sečem (Reed, 1995; Butter in sod., 1999). Sliwinski in sod. (2002) poročajo o manjši produkciji metana v *in vitro* poskusu s hrastovimi tanini. Tudi Roth (2003) poroča o statistično značilnem zmanjševanju proizvedenega metana s povečevanjem količine dodanega tanina v *in vitro* poskusu s sojinimi tropinami. Manjša izguba sečnine s sečem in produkcija metana vodita do manjšega onesnaževanja okolja.

2.2.2.2 Kompleksi z ogljikovimi hidrati

Na splošno ogljikovi hidrati tanine manj privlačijo kot beljakovine. Perez-Maldonado in Norton (1996) ugotavljata, da se tanini pri vezavi na vlaknino (celično steno) najverjetneje vežejo na beljakovine znotraj celične stene, zaradi česar onemogočijo razgradnjo celične stene. Z vezavo na celulozo ali hemicelulozo tanini onemogočajo encimsko razgradnjo vlaknine. Razgradljivost ogljikovih hidratov se ob dodatku močvirske nokote (*Lotus pedunculatus*) zmanjša (Barry in Manley, 1984). Tanini zmanjšujejo razgradljivost vlaknine tako z vezavo na lignocelulozo, kar preprečuje mikrobnó razgradnjo kot z neposrednim oviranjem celulolitičnih mikroorganizmov (McSweeney in sod., 2001).

Butter in sod. (1999) trdijo, da je manjša razgradnja vlaknine v večji meri posledica ovirane mikrobne razgradnje s strani taninov. McSweeney in sod. (2001) so ugotovili, da že 2 do 3 odstotke taninov v obroku, zmanjša populacijo mikroorganizmov vključenih v razgradnjo vlaknine. Razpad polisaharidov (hemiceluloza, pektin) je zaradi kostanjevih taninov močno zmanjšan, kadar je razmerje med taninom in substratom večje kot ena (Scalbert, 1991). Prisotnost taninske kisline ali katehinov zmanjša prebavljivost škroba za 9 do 17 odstotkov.

Slabša prebavljivost vlaknine vodi do zmanjšanja sinteze ATP, ki je potreben vampnim mikroorganizmom za rast in sintezo mikrobnih beljakovin. Makkar in sod. (1995) so ugotovili, da se ob prisotnosti taninov *in vitro* zmanjša produkcija hlapnih maščobnih kislin. Poleg zmanjšane produkcije hlapnih maščobnih kislin, se ob prisotnosti taninov zmanjša tudi razmerje med očetno in propionsko kislino (Butter in sod., 1999). Kot sta ugotovila Perez-Maldonado in Norton (1996) je koncentracija hlapnih maščobnih kislin pri ovcah večja kot kozah, vendar se deleži posameznih hlapnih maščobnih kislin med ovci in kozami ne razlikujejo. Tudi Zimmer in Cordesse (1996) poročata o spremenjeni koncentraciji hlapnih maščobnih kislin pri ovcah in kozah.

2.2.3 Učinek taninov na vampne mikroorganizme

Na splošno tanini omejujejo rast mikroorganizmov. Tanini se lahko vežejo na celično steno bakterije ali se povezujejo z mikrobnimi encimi, kar onemogoča transport hranljivih snovi v celico in ovira rast organizma (McSweeney in sod., 2001). Vezava taninov na železove ione omejuje njihovo dostopnost mikroorganizmom (Scalbert, 1991). Tanini preprečujejo aktivnost bakterijskih encimov kot so celulaza, amilaza in galaktozidaza, ki so vključeni v presnovo ogljikovih hidratov (Makkar in sod., 1987, cit. po Butter in sod., 1999). Makkar in sod. (1988) poročajo o zmanjšani aktivnosti ureaze, karboksimetil celulaze, glutamat dehidrogenaze ter alanin aminotransferaze v poskusu s hrastovimi tanini *in sacco*. *In vitro* kondenzirani tanini iz navadne nokote (*Lotus corniculatus*) omejujejo rast nekaterim proteolitičnim bakterijam (Min in sod., 2003). V poskusu s taninsko kislino in encimom tripsinom sta Mole in Waterman (1987) ugotovila, da taninska kislina preprečuje delovanje tripsina, vendar ne z vezavo na encim, ampak z vezavo na goveji serumski albumin. Tudi

Scalbert (1991) poroča o oviranem delovanju proteolitičnih bakterij, ki je posledica vezave taninov na substrat (beljakovino ali celično steno bakterije).

Tanini negativno učinkujejo na bakterije, kvasovke in glive. V primerjavi z bakterijami in glivami so kvasovke bolj občutljive na kostanjeve tanine, tanine iz *Quebracha* ter taninsko kislino. Po Scalbert (1991) je najmanjša koncentracija taninov, ki preprečuje rast 0,5 g/l pri kvasovkah, medtem ko je pri bakterijah ponavadi manjša in se giblje med 0,012 in 1 g/l.

Kondenzirani tanini omejujejo rast proteolitičnih bakterij (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminobacter amylophilus* in *Streptococcus bovis*) ter preprečujejo endoglukanazno delovanje *Fibrobacter succinogenes in vitro* (McSweeney in sod., 2001). V poskusu s kondenziranimi tanini iz navadne nokote (*Lotus corniculatus*) in močvirske nokote (*Lotus pedunculatus*) so Molan in sod. (2001) ugotovili, da je pri koncentraciji 400 in 600 µg/ml *in vitro* rast proteolitičnih bakterij onemogočena. Prisotnost taninov v mediju *in vitro* ovira rast *Streptococcus gallolyticus* in *Streptococcus bovis*. V primerjavi s *Streptococcus gallolyticus* je *Streptococcus bovis* 30-krat bolj občutljiv na taninsko kislino ali akacijeve kondenzirane tanine (O'Donovan in Brooker, 2001). Po Sliwinski in sod. (2002) se je pri največji koncentraciji taninov (2,5 g/kg SS), koncentracija amoniaka zmanjšala najverjetneje zaradi manjše aktivnosti mikrobne deaminaze. Galna kislina, elagna kislina in katehini veliko bolj omejujejo razgradnjo celuloze kot taninska kislina (Acamovic in Stewart, 1999), vendar pa taninska kislina veliko bolj zavira metanogene bakterije kot galna kislina ali pirogalol (Scalbert, 1991).

Kljub antimikrobnemu delovanju taninov, lahko veliko mikroorganizmov normalno raste in se razvija v prisotnosti taninov (Scalbert, 1991). Mikroorganizmi zunaj celice izločajo polisaharide in tvorijo debel sloj glikoproteinov, ki loči mikrobno celično steno od taninov (Scalbert, 1991; McSweeney in sod., 2001). Ker so glikoproteini za tanine zelo privlačni, se le-ti vežejo nanje in ne na mikrobne encime, ki se pomembni za rast mikroorganizmov (Scalbert, 1991). Po McSweeney in sod. (2001) *Streptococcus gallolyticus*, *Clostridium sp.* in *Proteobacteria* dobro prenašajo visoke koncentracije hidrolizirajočih in kondenziranih taninov. *Streptococcus gallolyticus* bo rasel tudi v 10-krat večji koncentraciji taninov kot *Streptococcus bovis* (O'Donovan in Brooker, 2001). Ravno zaradi tega je najbolj razširjen

pri prežvekovalcih, ki se prehranjujejo s tanini bogato krmo. Mnogim encimom tanini preprečujejo delovanje, vendar obstajajo encimi kot so tanaze in α -amilaze, ki normalno delujejo v visokih koncentracijah taninov. *Penicillium* in *Aspergillus* lahko izkoriščata hidrolizirajoče tanine kot vir ogljika za svojo rast (Haslam, 1989). Po Scalbert (1991) mikroorganizmi rodov *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fomes*, *Polyporus*, *Poria* in *Trametes* bolje rastejo v prisotnosti galotaninov kot elagitaninov (kostanjevi tanini) ali kondenziranih taninov, medtem ko *Achromobacter sp.* raste samo v prisotnosti galotaninov in kostanjevih taninov. Mikroorganizmi, ki rastejo v prisotnosti taninov, rastejo tudi v prisotnosti enostavnih fenolov kot je galna kislina in katehin (Scalbert, 1991).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SUBSTRAT

Za substrat smo uporabili celulozo (BWW 40) (Arbocel®) in krompirjev škrob (Merck). Lastnosti obeh substratov so predstavljene v preglednici 1.

Preglednica 1: Lastnosti BWW 40 in škroba (podatki proizvajalcev)

	BWW 40	Škrob
Oblika	kosmiči	fini prah
Barva	bela	bela
Gostota	530 – 630 g l ⁻¹	300 g l ⁻¹
pH vrednost	6,0 ± 1,0	6,0 – 7,5 (pri 25°C in 2 % vodni raztopini)

BWW 40 je nevtralnega okusa in vonja. Vsebuje 93,8 % suhe snovi in 6,2 % vode. Suho snov sestavlja 0,6 % surovih beljakovin, < 0,1 % surovih maščob, 72,0 % surovih vlaknin, 20,9 % brezdušičnega izvlečka in 0,3 % pepela.

Škrob vsebuje 89,6 % suhe snovi ter 10,4 % vode. Topnost škroba v vodi pri temperaturi 90 °C znaša 50 g l⁻¹.

3.2 TANINSKI IZVLEČKI

V poskusu smo uporabili pet vrst taninskih izvlečkov. Farmatan 75 (F75), farmatan 75 z dodano kislino (FAK), KPS (KPS) in taninska kislina (TAK) so predstavljali hidrolizirajoče tanine, medtem ko je quebracho (QUE) kondenzirani tanin. Kostanjeve tanine (F75, FAK in KPS) smo prejeli od podjetja Tanin Sevnica, taninsko kislino od Sigma-Aldrich ter quebracho tanin od podjetja Roy Wilson Dickson iz Velike Britanije. Sestava posameznih taninskih izvlečkov je predstavljena v preglednici 2.

Preglednica 2: Sestava taninskih izvlečkov (podatki proizvajalcev)

	F75	FAK	KPS	QUE*	TAK
Tanin (%)	75,8	60,7	68,5	72,0	90,0
Netanin (%)	16,5	15,0	23,6	3,6	5,0
Netopno (%)	1,5	10,6	0,7	0,3	0,0
pH	3,6	2,8	4,6	4,5 – 5,0	3,0

*vir: Vegetabil extracts (2000)

3.2.1 Kostanjevi izvlečki (F75, FAK, KPS)

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

Kostanjevi tanini so naravni izvlečki iz kostanjevega lesa (*Castanea sativa P. Mill.*). So zmes estersko in glikozidno vezanih taninov to je hidrolizirajočih in kondenziranih, kjer hidrolizirajoči tanini prevladujejo. Farmatan se uporablja kot dodatek h krmi, saj preprečuje driske, ščiti sluznico črevesja pred dražljaji in preprečuje resorpcijo škodljivih snovi (Farmatan ..., 2003). FAK sestavlja farmatan 75 (F75) kateremu so bile dodane fosforna, metanojska in mlečna kislina. KPS vsebuje poleg taninske in netaninske substance še natrijev sulfit in natrijev hidroksid.

3.2.2 Taninska kislina

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

Taninska kislina je rumen prah, ki na zraku in svetlobi potemni. Kemijsko je taninska kislina penta-m-digalo-glukoza z visoko molekularno maso. Je hidrolizirajoči tanin, ki ga pridobivajo iz hrastovih šišk. Netopne oborine tvori z albuminom, gelatinom, alkaloidi in težkimi kovinskimi solmi. Taninska kislina se raztaplja v etanolu (100 mg/ml), vodi (2,8 g/ml), toplem glicerolu (1 mg/ml) in acetonu. Raztopina je bistra, rumeno rjave barve. Tudi raztopina je občutljiva na svetlobo in zrak, saj pri izpostavljanju potemni. V benzenu, kloroformu, etru, petrol etru, ogljikovem disulfidu in ogljikovem tetrakloridu se taninska kislina ne topi (Product Information, 2003).

3.2.3 Quebracho izvleček

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

Quebracho izvleček pripravljajo iz Quebracho Colorado dreves (*Schinopsis balansae* in *Schinopsis lorentzii*), ki rastejo samo v Južni Ameriki, v geografskem območju Chaco. Quebracho izvleček vsebuje zelo velik delež kondenziranih taninov. Raztaplja se v hladni vodi, a se topnost povečuje s segrevanjem vode. Zelo je cenjen v usnjarski industriji, saj je zaradi nevtralnega pH odlično sredstvo za strojenje usnja (Quebracho Extract, 2003).

3.3 PLINSKI TEST

Metodo izvedbe plinskega testa smo povzeli po Menke in Steingass (1988) (Hohenheimski plinski test). Vampni sok smo odvzeli eno do dve uri po krmljenju, iz dveh fistuliranih kastriranih ovnov jezersko-solčavske pasme. Ovna sta bila krmljena s senom in koncentratom za pokrivanje vzdrževalnih potreb. Vampni sok smo zbirali v termo steklenico, ki smo jo predhodno segreli na 39°C. Pred in po odvzemu vampnega soka smo steklenico prepihovali z ogljikovim dioksidom.

Pred dodatkom vampnega soka smo pufer v vodni kopeli segreli na $39 \pm 0,5^\circ\text{C}$ in ga prepihovali z ogljikovim dioksidom pod tlakom 1,8 do 2,0 bara. Pufer je vseboval destilirano vodo, raztopine A, B in C (preglednica 3), raztopino resazurin in redukcijsko raztopino (preglednica 4). Dobro prepihanem in premešanem pufru, smo dodali redukcijsko raztopino pet minut pred dodatkom vampnega soka. Redukcijsko raztopino smo vedno pripravili tik pred odvzemom vampnega soka. Pri dodatku redukcijske raztopine se je modra raztopina pufra najprej obarvala rdeče, kasneje pa se je razbarvala.

Preglednica 3: Sestava raztopin A, B in C

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

Preglednica 4: Sestava redukcijske raztopine in pufra

Redukcijska raztopina	Raztopina resazurin	Pufer*
47,5 ml destilirane vode	100 mg resazurin	474,0 ml destilirane vode
2 ml NaOH 1M	destilirana voda do 100 ml	0,12 ml raztopine A
285 mg Na ₂ S x 7H ₂ O		237 ml raztopine B
		237 ml raztopine C
		1,22 ml raztopine resazurin
		50,0 ml redukcijske raztopine

*količina pufra zadošča za 50 brizgalk

Vampni sok smo precedili skozi štiri plasti gaze v merilni valj, ogret na 40°C in prepihan z ogljikovim dioksidom. Vampni sok smo dodali v popolnoma brezbarvno pufersko tekočino. Količina vampnega soka in pufra je bila odvisna od števila brizgalk, ki smo jih morali napolniti. Mešanico vampnega soka in pufra (v razmerju 1:2) smo pred polnjenjem brizgalk mešali in prepihovali z ogljikovim dioksidom še 15 minut pod tlakom 1,0 bara.

Ob začetku polnjenja brizgalk smo v prostor nad mešanico vampnega soka in pufra uvajali ogljikov dioksid pod tlakom 1,0 bara. Brizgalke smo napolnili s 30 ml mešanice vampnega soka in pufra (10 ml vampnega soka in 20 ml pufra). V vsako serijo poskusa smo vključili slepe vzorce (brizgalke brez vzorca) in standardne vzorce (seno mnogocvetne ljuljke). Za slepe in standardne vzorce smo namenili šest brizgalk, ki smo jih napolnili z mešanico pufra in vampnega soka na samem začetku polnjenja brizgalk, na sredini polnjenja in na koncu polnjenja.

Brizgalke z vzorci so vsebovale okoli 175 mg substrata (celuloza ali škrob) in različne koncentracije taninskih izvlečkov. Ob dodatku 30 ml mešanice vampnega soka in pufra, smo brizgalke postavili v vodno kopel ogreto na 39 ± 0,5°C. Količino proizvedenega plina smo prvih 12 ur odčitavali na 2 uri, potem do 48 ur na 12 ur in do 96 ur na 24 ur. Ko je bilo proizvedenega več kot 50 ml plina, smo brizgalko obrnili, iztisnili proizvedeni plin in

brizgalko postavili nazaj v vodno kopel. Vsako kombinacijo substrata z različno koncentracijo in vrsto taninskega izvlečka smo izvedli v treh ponovitvah. V preglednici 5 so predstavljene vsebnosti substrata, taninskih izvlečkov in medija.

Preglednica 5: Vsebnost substrata, taninskih izvlečkov (TI) ter medija uporabljenega v poskusu

TI (mg)	Substrat (mg)	Medij (ml)	Koncentracija TI (mg/ml medija)
0 (kontrola)	~ 175	30	0
5	~ 175	30	0,17
10	~ 175	30	0,33
20	~ 175	30	0,67
40	~ 175	30	1,33
80	~ 175	30	2,67

*substrat: celuloza in škrob
taninski izvlečki: F75, FAK, KPS, QUE in TAK
medij: 20 ml pufra in 10 ml vampnega soka

Ker je bila vodna kopel dovolj velika samo za 48 brizgalk, smo poskus opravili v šestih serijah. Šesto serijo poskusa smo izvedli zato, ker smo v prvih treh serijah pri fermentaciji celuloze pri največjih koncentracijah (1,33 in 2,67 mg/ml medija) taninskih izvlečkov opazili, da se proizvedejo večje količine plina šele na koncu inkubacijske dobe (72 in 96 ur). Zaradi te ugotovitve smo v šesti seriji podaljšali inkubacijsko dobo na 168 ur in smo po 48 urah meritve opravljali na 8 in 16 ur.

3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

3.4.1 Kazalniki fermentacije

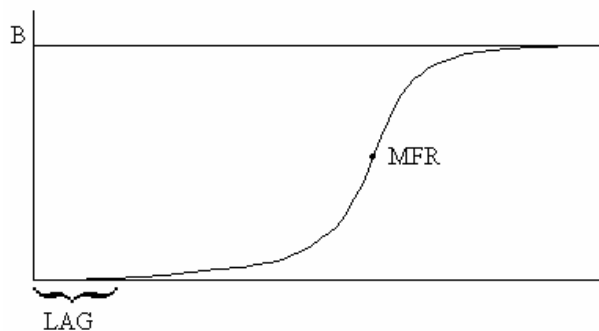
S pomočjo Gompertzove funkcije smo izračunali kumulativno produkcijo plina za vsak substrat, koncentracijo in vrsto taninskega izvlečka. Za ocenitev kazalnikov B, C in A smo uporabili nelinearno regresijsko metodo (PROC NLIN) v statističnem programskem paketu SAS/STAT (SAS Institute Inc., 2001).

Gompertzova funkcija:

$$y(t) = B e^{-C} e^{-A t} \quad \dots (1)$$

Kjer je:

- y = kumulativna produkcija plina (ml)
- B = skupna potencialna produkcija plina (ml/g SS)
- C = specifična hitrost fermentacije, na katero vpliva kazalnik A
- A = konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti
- t = čas (h)



Slika 4: Shematski prikaz Gompertzove funkcije (B – skupna potencialna produkcija plina (ml/g SS), MFR – največja hitrost fermentacije (ml/h), LAG – časovni zaostanek začetka fermentacije (h))

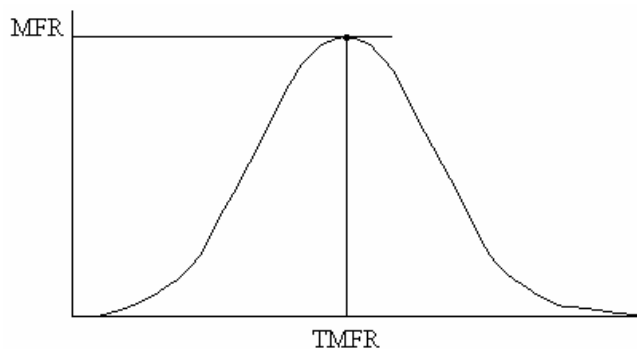
Čas največje hitrosti fermentacije (TMFR – Time of Maximum Fermentation Rate (h)) smo izračunali z drugim odvodom Gompertzove funkcije (3). Z vstavitvijo TMFR v prvi odvod Gompertzove funkcije (2) smo izračunali največjo hitrost fermentacije (MFR – Maximum Fermentation Rate (ml/h)).

Prvi odvod:

$$\frac{d y}{d t} = A B C e^{-A t} e^{-C} e^{-A t} \quad \dots (2)$$

Drugi odvod:

$$\frac{d^2 y}{d^2 t} = A B^2 C^2 (e^{-A t})^2 e^{-C e^{-A t}} - A B C^2 e^{-C e^{-A t}} \quad \dots(3)$$



Slika 5: Shematski prikaz MFR glede na TMFR (MFR – največja hitrost fermentacije (ml/h), TMFR – čas, ko je dosežena največja hitrosti fermentacije (h))

Za vsak substrat, vrsto ter koncentracijo taninskega izvlečka smo s pomočjo kazalnikov fermentacije izračunali tudi časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG (h)).

$$LAG = \frac{\log C - 1}{A} \quad \dots (4)$$

3.4.2 Model

Za razvoj modela smo uporabili metodo najmanjših kvadratov v proceduri GLM (General Linear Model). Model smo razvili glede na substrat, zato vpliv substrata nismo vključili v model kot sistematski vpliv. Vpliv taninskega izvlečka (pet razredov) in koncentracije taninskega izvlečka (šest razredov) smo v model vključili kot sistematska vpliva z nivoji. Za izbor modela smo se odločili na podlagi statistično značilnega vpliva (p – vrednost), koeficienta determinacije (R^2) ter stopinj prostosti za posamezen vpliv in model v celoti. S pomočjo Tukey-Kramer testa smo ovrednotili statistično značilne razlike ($p < 0,05$) med vrsto in koncentracijo taninskega izvlečka pri posameznem substratu.

Statistični model:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + K_j + e_{ijk} \quad \dots(5)$$

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), časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG), produkcija plina v 24 urah (GAS₂₄) in produkcija plina v 48 urah (GAS₄₈)

μ = srednja vrednost

T_i = taninski izvleček; $i = 1, 2, 3, 4$ in 5

K_j = koncentracija taninskega izvlečka; $j = 1, 2, 3, 4, 5$ in 6

e_{ijk} = ostanek

4 REZULTATI

4.1 OPISNA STATISTIKA

V preglednici 6 je predstavljena opisna statistika za posamezno opazovano lastnost glede na substrat. V povprečju je bila skupna potencialna produkcija plina (B) iz celuloze 390,6 ml/g SS, z razponom med 222,6 in 513,6 ml/g SS. Razpon specifične hitrosti fermentacije (C) je pri celulozi segal od 3,3 do 1340,5. Faktor mikrobne (ne)učinkovitosti je pri celulozi v povprečju dosegal 0,166, s standardnim odklonom 0,028. Največja hitrost fermentacije (MFR) celuloze je bila v povprečju 16,7 ml/h in je nastopila v povprečno 27,5 uri (TMFR). Razpon časovnega zaostanka začetka fermentacije (LAG) celuloze se je raztezal od 5,2 do 90,9 ure. V 24 urah je bila povprečna produkcija plina (GAS₂₄) iz celuloze 254,2 ml/g SS, v 48 urah (GAS₄₈) pa 372,8 ml/g SS.

Povprečna skupna potencialna produkcija plina (B) iz škroba je bila 414,1 ml/g SS. Razpon med najmanjšo (349,3 ml/g SS) in največjo (485,5 ml/g SS) skupno produkcijo plina je znašal 136,2 ml/g SS. Specifična hitrost fermentacije (C) škroba je bila povprečno 18,8, s standardnim odklonom 16,4. Pri škrobu je bil faktor mikrobne (ne)učinkovitosti v povprečju 0,246, z razponom med 0,086 in 0,421. V povprečno 11,7 uri (TMFR) je nastopila največja hitrost fermentacije, ki se je gibala od 15,4 ml/h do 61,2 ml/h. Časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG) škroba je segal od 5,3 do 10,9 ure. V 24 urah (GAS₂₄) je iz škroba nastalo v povprečju 375,6 ml/g SS plina, medtem ko je v 48 urah nastalo povprečno 420,6 ml/g SS plina.

Preglednica 6: Opisna statistika po substratu

Lastnost	CELULOZA					ŠKROB				
	N	μ	SD	MIN	MAX	N	μ	SD	MIN	MAX
B (ml/g SS)	87	390,6	48,1	222,6	513,6	90	414,1	28,4	349,3	485,5
C	87	65,0	199,5	3,3	1340,5	90	18,8	16,4	5,4	105,6
A	87	0,116	0,028	0,019	0,153	90	0,246	0,072	0,086	0,421
TMFR (h)	87	27,5	20,0	12,8	105,6	90	11,7	2,6	8,3	21,2
MFR (ml/h)	87	16,7	4,6	2,3	22,3	90	37,3	11,0	15,4	61,2
LAG (h)	87	17,5	17,3	5,2	90,9	90	7,2	1,3	5,3	10,9
GAS ₂₄ (ml/g SS)	162	254,2	114,5	7,8	356,5	150	375,6	40,9	176,6	448,8
GAS ₄₈ (ml/g SS)	162	372,8	101,2	29,0	454,8	150	420,6	28,8	354,8	471,7

4.2 SKUPNA POTENCIALNA PRODUKCIJA PLINA (B)

Na skupno potencialno produkcijo plina sta statistično značilno ($p < 0,05$) vplivala tako vrsta kot koncentracija taninskega izvlečka. V primerjavi s škrobom ($R^2 = 0,60$) je bil koeficient determinacije pri celulozi ($R^2 = 0,44$) manjši.

4.2.1 Celuloza

Skupna potencialna produkcija plina (B) se je statistično značilno razlikovala ($p < 0,05$) med koncentracijami posameznih taninskih izvlečkov (preglednica 7). V primerjavi z drugimi koncentracijami sta največji koncentraciji F75 in KPS najbolj zmanjšali skupno potencialno produkcijo plina (265,6 ml/g SS in 258,1 ml/g SS) (slika 6). Glede na kontrolo je QUE (največjo koncentracijo smo zaradi prevelikega negativnega učinka izključili) pri vseh koncentracijah statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina. Pri FAK (445,1 ml/g SS) in TAK (457,9 ml/g SS) je največja koncentracija povečala skupno potencialno produkcijo plina. Razlika med kontrolo in največjo koncentracijo ni bila statistično značilna ($p > 0,05$).

Preglednica 7: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na skupno potencialno produkcijo plina (ml/g SS) iz celuloze

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	431,9 ^a	431,9 ^{ab}	431,9 ^a	431,9 ^a	431,9 ^{abc}
0,17	369,4 ^{bAB}	388,5 ^{deA}	363,4 ^{dB}	378,2 ^{bAB}	387,6 ^{bcAB}
0,33	357,6 ^b	369,1 ^e	386,1 ^{cd}	371,4 ^b	365,0 ^c
0,67	386,4 ^{abC}	413,6 ^{bcB}	426,6 ^{abAB}	376,8 ^{bc}	441,8 ^{abA}
1,33	389,9 ^{abB}	396,4 ^{cdAB}	407,5 ^{bcAB}	347,5 ^{bc}	417,0 ^{abcA}
2,67	265,6 ^{cb}	445,1 ^{aA}	258,1 ^{eb}	/	457,9 ^{aA}

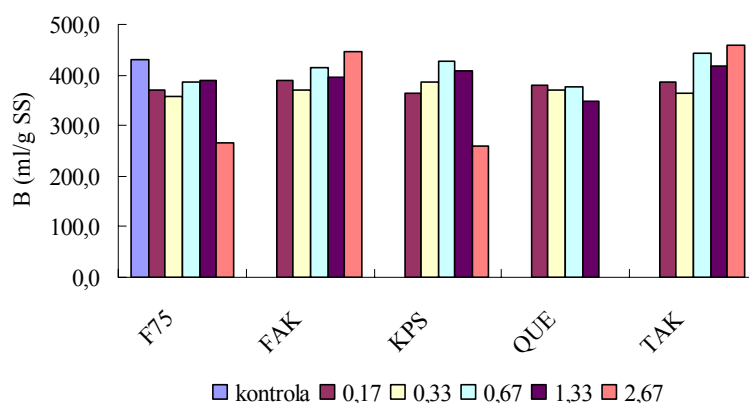
*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c, d, e vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B, C vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

Statistično značilne razlike smo opazili tudi med taninskimi izvlečki znotraj posameznih koncentracij (preglednica 7). Glede na ostale taninske izvlečke je KPS (363,4 ml/g SS) pri koncentraciji 0,17 mg/ml medija najbolj zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina in se je statistično značilno razlikoval samo od FAK (388,5 ml/g SS). Pri koncentracijah 0,67 (376,8 ml/g SS) in 1,33 mg/ml (347,5 ml/g SS) je bila skupna potencialna produkcija plina pri QUE statistično značilno ($p < 0,05$) manjša od ostalih taninskih izvlečkov, razen od F75 (386,4 ml/g SS) pri koncentraciji 0,67 mg/ml medija. Največja koncentracija KPS (258,1

ml/g SS) je najbolj zmanjšala skupno potencialno produkcijo plina (slika 6). Skupna potencialna produkcija plina je bila pri F75 (265,6 ml/g SS) in KPS (258,1 ml/g SS) statistično značilno ($p < 0,05$) manjša od FAK (445,1 ml/g SS) in TAK (457,9 ml/g SS), ki sta najmanj ovirala produkcijo plina. Najbolj sta skupno potencialno produkcijo plina zmanjšala F75 in KPS. Pri koncentraciji 0,33 mg/ml medija razlike med taninskimi izvlečki niso bile statistično značilne ($p > 0,05$).



Slika 6: Skupna potencialna produkcija plina (ml/g SS) iz celuloze

4.2.2 Škrob

Kot pri celulozi se je tudi pri škrobu skupna potencialna produkcija plina statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovala med koncentracijami znotraj posameznih taninskih izvlečkov (preglednica 8). V primerjavi s celulozo so taninski izvlečki manj ovirali skupno potencialno produkcijo plina iz škroba (slika 7). Najmanjše koncentracije F75 (397,1 ml/g SS), FAK (402,5 ml/g SS) ter TAK (415,1 ml/g SS) in največji koncentraciji KPS (377,6 ml/g SS) in QUE (354,9 ml/g SS) so najbolj zmanjšale skupno potencialno produkcijo plina. Samo pri QUE je zaslediti trend zmanjševanja skupne potencialne produkcije plina z naraščajočo koncentracijo (slika 7).

Tudi med taninskimi izvlečki znotraj posameznih koncentracij so bile statistično značilne ($p < 0,05$) razlike (preglednica 8). Najmanj je skupno potencialno produkcijo plina oviral TAK, ki je pri koncentracijah 0,67 (473,1 ml/g SS), 1,33 (449,4 ml/g SS) in 2,67 mg/ml medija (481,0 ml/g SS) povečal skupno potencialno produkcijo plina (slika 7). QUE je

najbolj zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina iz škroba in je pri koncentracijah 0,67 (370,1 ml/g SS), 1,33 (364,6 ml/g SS) in 2,67 mg/ml medija (354,6 ml/g SS) statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina.

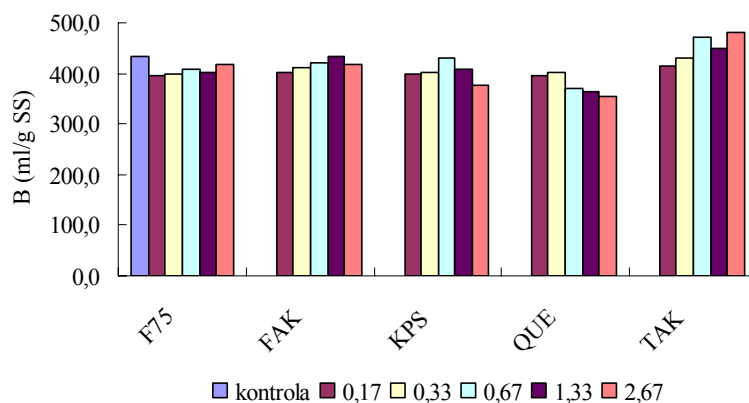
Preglednica 8: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na skupno potencialno produkcijo plina (ml/g SS) iz škroba

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	432,5 ^a	432,5 ^a	432,5 ^a	432,5 ^a	432,5 ^{cd}
0,17	397,1 ^{cb}	402,5 ^{baB}	399,3 ^{bcB}	396,0 ^{bb}	415,1 ^{dA}
0,33	399,0 ^{cc}	410,1 ^{bb}	400,4 ^{bBC}	400,8 ^{bBC}	429,9 ^{cdA}
0,67	408,0 ^{bcC}	422,1 ^{abBC}	431,5 ^{aB}	370,1 ^{cd}	473,1 ^{abA}
1,33	402,6 ^{cb}	432,1 ^{aAB}	407,2 ^{bb}	364,6 ^{cc}	449,4 ^{bcA}
2,67	418,1 ^{abB}	417,1 ^{abB}	377,6 ^{cc}	354,9 ^{cc}	481,0 ^{aA}

*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c, d vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B, C, D vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)



Slika 7: Skupna potencialna produkcija plina (ml/g SS) iz škroba

4.3 SPECIFIČNA HITROST FERMENTACIJE (C)

Pri obeh substratih sta na specifično hitrost fermentacije statistično značilno ($p < 0,05$) vplivala tako vrsta kot koncentracija taninskih izvlečkov. Koeficient determinacije je bil pri celulozi ($R^2 = 0,27$) manjši kot pri škrobu ($R^2 = 0,44$).

4.3.1 Celuloza

Specifična hitrost fermentacije se je statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovala samo med koncentracijami FAK, KPS in QUE (preglednica 9). Na splošno je bila specifična hitrost

fermentacije najmanjša brez dodanih taninskih izvlečkov (5,5), medtem ko je bila pri FAK največja koncentracija tista, ki je najbolj zmanjšala specifično hitrost fermentacije (3,6).

Preglednica 9: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na specifično hitrost fermentacije celuloze

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	5,5	5,5 ^b	5,5 ^c	5,5 ^b	5,5
0,17	10,2 ^A	7,1 ^{bB}	9,6 ^{cAB}	10,1 ^{bA}	7,5 ^{AB}
0,33	11,6 ^{AB}	9,3 ^{bAB}	10,0 ^{cAB}	14,7 ^{bA}	6,9 ^B
0,67	40,5 ^A	6,5 ^{bB}	8,0 ^{cB}	6,6 ^{bB}	14,9 ^B
1,33	125,3 ^{AB}	75,0 ^{aB}	128,6 ^{aAB}	43,2 ^{aB}	211,0 ^A
2,67	432,4	3,6 ^b	89,7 ^b	/	574,3

*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

^{a, b, c} vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

^{A, B} vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

Razlike med taninskimi izvlečki so bile statistično značilne ($p < 0,05$) le pri koncentracijah 0,33, 0,67 in 1,33 mg/ml medija. TAK je najmanj zmanjšal specifično hitrost fermentacije. Razpon specifične hitrosti fermentacije je segal od 3,6 (FAK) do 574,3 (TAK).

4.3.2 Škrob

Samo pri KPS se specifična hitrost fermentacije ni statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovala med koncentracijami taninskega izvlečka (preglednica 10). Največja koncentracija taninskih izvlečkov je najbolj zmanjšala specifično hitrost fermentacije. Razpon specifične hitrosti fermentacije škroba je bil manjši in je segal od 5,9 (TAK pri največji koncentraciji) do 87,7 (QUE pri najmanjši koncentraciji).

Specifična hitrost fermentacije se je med taninskimi izvlečki statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovala pri koncentracijah 0,17, 0,33, 1,33 in 2,67 mg/ml medija (preglednica 10). Pri koncentracijah 0,17 (87,7) in 0,33 mg/ml medija (59,7) je bila specifična hitrost fermentacije pri QUE statistično značilno ($p < 0,05$) večja od ostalih taninskih izvlečkov. QUE je najmanj zmanjšal specifično hitrost fermentacije, medtem ko jo je TAK najbolj.

Preglednica 10: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na specifično hitrost fermentacije škroba

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	14,4 ^b	14,4 ^b	14,4	14,4 ^c	14,4 ^{ab}
0,17	14,8 ^{bb}	25,7 ^{ab}	26,3 ^B	87,7 ^{aA}	16,5 ^{aB}
0,33	9,2 ^{bb}	11,2 ^{bb}	12,3 ^B	59,7 ^{bA}	10,0 ^{bcB}
0,67	24,2 ^a	17,0 ^{ab}	17,7	15,6 ^c	15,4 ^{ab}
1,33	15,1 ^{baB}	15,4 ^{abAB}	21,0 ^A	12,7 ^{cb}	10,8 ^{abcB}
2,67	9,4 ^{bbC}	7,8 ^{bbC}	18,6 ^A	12,4 ^{cb}	5,9 ^{cc}

*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B, C vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

4.4 KONSTANTNI FAKTOR MIKROBNE (NE)UČINKOVITOSTI (A)

Vpliv vrste in koncentracije taninskega izvlečka na konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti, je bil statistično značilen ($p < 0,05$) tako pri celulozi ($R^2 = 0,82$) kot pri škrobu ($R^2 = 0,62$).

4.4.1 Celuloza

Samo pri QUE se konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti ni statistično značilno ($p > 0,05$) razlikoval med koncentracijami taninskega izvlečka (preglednica 11). Kot pri specifični hitrosti fermentacije škroba je tudi pri konstantnem faktorju mikrobne (ne)učinkovitosti največja koncentracija taninskih izvlečkov najbolj zmanjšala konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti. Brez dodanega taninskega izvlečka je bil konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti največji.

Preglednica 11: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti pri celulozi

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	0,132 ^a	0,132 ^b	0,132 ^a	0,132	0,132 ^a
0,17	0,124 ^{aAB}	0,120 ^{caB}	0,123 ^{abAB}	0,137 ^A	0,117 ^{abB}
0,33	0,112 ^{abB}	0,120 ^{caB}	0,113 ^{bb}	0,138 ^A	0,100 ^{bbB}
0,67	0,121 ^{abc}	0,132 ^{baB}	0,133 ^{aA}	0,127 ^{AB}	0,113 ^{abc}
1,33	0,136 ^{aAB}	0,149 ^{aA}	0,132 ^{ab}	0,133 ^B	0,100 ^{bc}
2,67	0,058 ^b	0,033 ^d	0,075 ^c	/	0,058 ^c

*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c, d vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B, C vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

Med taninskimi izvlečki se je konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti statistično značilno ($p < 0,05$) razlikoval pri koncentracijah 0,33, 0,67 in 1,33 mg/ml medija (preglednica 11). Pri vseh treh koncentracijah je konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti TAK (0,100, 0,113 in 0,100) statistično značilno ($p < 0,05$) manjši od QUE (0,138, 0,127 in 0,133). Razpon konstantnega faktorja mikrobne (ne)učinkovitosti je segal od 0,033 (FAK pri največji koncentraciji) do 0,149 (FAK pri koncentraciji 1,33 mg/ml medija).

4.4.2 Škrob

Konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti je bil pri škrobu (0,246) v povprečju 2-krat večji kot pri celulozi (0,116). Statistično značilne ($p < 0,05$) razlike med koncentracijami najdemo znotraj vseh taninskih izvlečkov (preglednica 12). Glede na ostale koncentracije taninskih izvlečkov je največja koncentracija zmanjšala konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti. Konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti je pri škrobu segal od 0,090 (TAK pri največji koncentraciji) do 0,400 (QUE pri koncentraciji 0,17 mg/ml medija).

Preglednica 12: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti pri škrobu

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	0,291 ^b	0,291 ^a	0,291 ^a	0,291 ^c	0,291 ^{ab}
0,17	0,222 ^{cB}	0,281 ^{aB}	0,268 ^{aB}	0,400 ^{aA}	0,226 ^{bcB}
0,33	0,164 ^{dC}	0,192 ^{bcB}	0,192 ^{bB}	0,359 ^{bA}	0,145 ^{deC}
0,67	0,363 ^{aA}	0,249 ^{abBC}	0,199 ^{bC}	0,305 ^{cAB}	0,310 ^{aA}
1,33	0,278 ^{bA}	0,262 ^{aAB}	0,208 ^{bAB}	0,277 ^{cA}	0,199 ^{cdB}
2,67	0,186 ^{cdA}	0,147 ^{cb}	0,202 ^{bA}	0,199 ^{dA}	0,090 ^{eC}

*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c, d, e vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B, C vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

Tudi med taninskimi izvlečki najdemo statistično značilno ($p < 0,05$) razlike znotraj posameznih koncentracij (preglednica 12). Pri koncentracijah 0,17 (0,400) in 0,33 mg/ml medija (0,359) je bil konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti statistično značilno ($p < 0,05$) največji pri QUE. QUE je najmanj zmanjšal konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti. Konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti je bil pri največji koncentraciji TAK (0,090) statistično značilno ($p < 0,05$) najmanjši. V primerjavi z

ostalimi taninskimi izvlečki je TAK najbolj zmanjšal konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti.

4.5 ČAS NAJVEČJE HITROSTI FERMENTACIJE (TMFR)

Pri obeh substratih je bil vpliv vrste in koncentracije taninskih izvlečkov na čas največje hitrosti fermentacije statistično značilen ($p < 0,05$). Koeficient determinacije je bil pri celulozi ($R^2 = 0,84$) večji kot pri škrobu ($R^2 = 0,66$).

4.5.1 Celuloza

Čas v katerem je bila dosežena največja hitrost fermentacije, se je statistično značilno ($p < 0,05$) razlikoval med koncentracijami posameznih taninskih izvlečkov (preglednica 13). Pri vseh taninskih izvlečkih je bil čas največje hitrosti fermentacije pri največji koncentraciji statistično značilno ($p < 0,05$) daljši kot pri ostalih koncentracijah. Prav tako so vse koncentracije taninskih izvlečkov podaljšale čas največje hitrosti fermentacije glede na kontrolo (12,9 h). Naraščanje časa največje hitrosti fermentacije s povečevanjem koncentracije taninskega izvlečka opazimo pri vseh taninskih izvlečkih (slika 8).

Preglednica 13: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na čas, ko je dosežena največja hitrost fermentacije celuloze (h)

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	12,9 ^c	12,9 ^e	12,9 ^e	12,9 ^d	12,9 ^c
0,17	18,8 ^{bcA}	16,3 ^{cdB}	18,3 ^{cdAB}	16,9 ^{bcAB}	17,3 ^{cAB}
0,33	21,9 ^{bcA}	18,6 ^{cb}	20,5 ^{cAB}	19,3 ^{bAB}	19,3 ^{cAB}
0,67	30,5 ^{bA}	14,2 ^{deC}	15,5 ^{deC}	14,7 ^{cdC}	23,2 ^{cb}
1,33	35,4 ^{bB}	29,0 ^{bC}	36,9 ^{bB}	28,3 ^{aC}	52,3 ^{bA}
2,67	69,9 ^{aB}	38,8 ^{aC}	59,9 ^{aBC}	/	98,7 ^{aA}

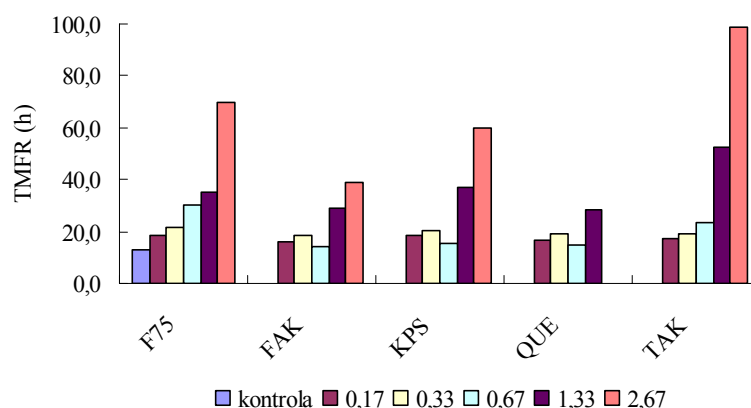
*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c, d, e vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B, C vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

Statistično značilne ($p < 0,05$) razlike smo opazili tudi med taninskimi izvlečki znotraj posameznih koncentracij (preglednica 13). Pri koncentracijah 0,17 in 0,33 mg/ml medija je bil čas največje hitrosti fermentacije pri F75 (18,8 h in 21,9 h) najdaljši, vendar je bil statistično značilno ($p < 0,05$) daljši samo od FAK (16,3 h in 18,6 h). V primerjavi z ostalimi taninskimi izvlečki je F75 pri koncentraciji 0,67 mg/ml medija (30,5 h) statistično značilno ($p < 0,05$) podaljšal čas največje hitrosti fermentacije. Čas največje hitrosti

fermentacije je bil pri TAK pri koncentracijah 1,33 (52,3 h) in 2,67 mg/ml medija (98,7 h) statistično značilno ($p < 0,05$) najdaljši (slika 8). Najkasneje je čas največje hitrosti fermentacije nastopil pri TAK, medtem ko je pri QUE največja hitrost fermentacije nastopila najprej.



Slika 8: Čas, v katerem je dosežena največja hitrost fermentacije celuloze (h)

4.5.2 Škrob

Pri škrobu ni zaslediti enakomernega naraščanja časa največje hitrosti fermentacije s povečevanjem koncentracije taninskih izvlečkov (slika 9). Čas največje hitrosti fermentacije se je med koncentracijami taninskih izvlečkov statistično značilno ($p < 0,05$) razlikoval (preglednica 14). Le pri FAK (14,0 h), QUE (12,7 h) in TAK (19,8 h) je največja koncentracija statistično značilno ($p < 0,05$) podaljšala čas največje hitrosti fermentacije. Pri ostalih dveh taninskih izvlečkih čas največje hitrosti fermentacije pri največji koncentraciji ni bil najdaljši (slika 9).

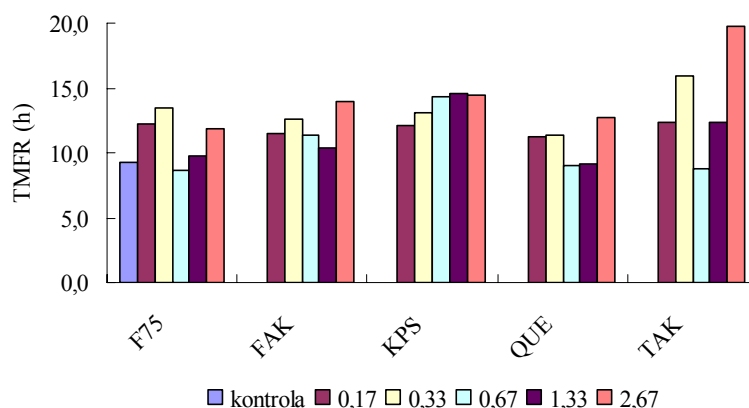
Preglednica 14: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na čas, ko je dosežena največja hitrost fermentacije škroba (h)

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	9,2 ^c	9,2 ^e	9,2 ^c	9,2 ^c	9,2 ^{de}
0,17	12,2 ^b	11,5 ^c	12,1 ^b	11,2 ^b	12,3 ^c
0,33	13,5 ^{ab}	12,6 ^{bc}	13,1 ^{abBC}	11,4 ^{BD}	15,9 ^{bA}
0,67	8,7 ^{cC}	11,3 ^{cB}	14,3 ^{aA}	9,0 ^{cC}	8,8 ^{eC}
1,33	9,7 ^{cB}	10,4 ^{dB}	14,6 ^{aA}	9,1 ^{cB}	12,3 ^{cdAB}
2,67	11,9 ^{bC}	14,0 ^{aB}	14,4 ^{aB}	12,7 ^{aBC}	19,8 ^{aA}

*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c, d, e vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B, C, D vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)



Slika 9: Čas, v katerem je dosežena največja hitrost fermentacije škroba (h)

Pri koncentraciji 0,33 mg/ml medija je bil čas največje hitrosti fermentacije pri TAK (15,9 h) statistično značilno ($p < 0,05$) najdaljši, medtem ko je bil pri QUE (11,4 h) statistično značilno ($p < 0,05$) najkrajši (preglednica 14). Čas največje hitrost fermentacije je pri KPS (14,3 h in 14,6 h) in koncentracijah 0,67 ter 1,33 mg/ml medija nastopil kasneje kot pri ostalih taninskih izvlečkih, vendar je bila razlika med KPS in ostalimi taninskimi izvlečki statistično značilna ($p < 0,05$) samo pri koncentraciji 0,67 mg/ml medija. Čeprav je bil čas največje hitrosti fermentacije pri najmanjši koncentraciji (0,17 mg/ml medija) TAK najdaljši, razlika med taninskimi izvlečki ni bila statistično značilna ($p > 0,05$). V povprečju sta TAK (13,0 h) in KPS (12,9 h) najbolj podaljšala čas največje hitrosti fermentacije, QUE (10,4 h) pa najmanj.

4.6 NAJVEČJA HITROST FERMENTACIJE (MFR)

Pri celulozi ($R^2 = 0,87$) in škrobu ($R^2 = 0,59$) sta na največjo hitrost fermentacije statistično značilno ($p < 0,05$) vplivala tako vrsta kot koncentracija taninskih izvlečkov.

4.6.1 Celuloza

Hitrost fermentacije se je med koncentracijami znotraj posameznih taninskih izvlečkov statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovala (preglednica 15). Največja koncentracija (2,67 mg/ml medija) taninskih izvlečkov je najbolj upočasnila hitrost fermentacije, medtem ko je hitrost fermentacije celuloze potekala najhitreje brez dodanega taninskega izvlečka (21,0 ml/h). Čeprav je pri vseh taninskih izvlečkih največja koncentracija najbolj upočasnila

hitrost fermentacije, se je samo pri F75 (5,2 ml/h), FAK (5,4 ml/h) in KPS (7,1 ml/h) statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovala. Trend padanja največje hitrosti fermentacije z naraščajočo koncentracijo taninskega izvlečka opazimo le pri QUE (slika 10).

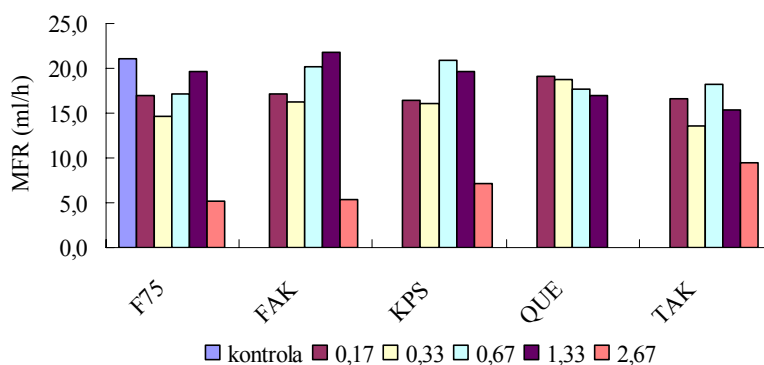
Preglednica 15: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na največjo hitrost fermentacije celuloze (ml/h)

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	21,0 ^a	21,0 ^a	21,0 ^a	21,0 ^a	21,0 ^a
0,17	16,9 ^{bcAB}	17,2 ^{bAB}	16,4 ^{bB}	19,1 ^{bA}	16,6 ^{bcB}
0,33	14,7 ^{cB}	16,3 ^{bAB}	16,0 ^{bAB}	18,7 ^{bA}	13,5 ^{cdB}
0,67	17,2 ^{bcB}	20,1 ^{aA}	20,9 ^{aA}	17,6 ^{bcB}	18,3 ^{abB}
1,33	19,6 ^{abA}	21,7 ^{aA}	19,7 ^{aA}	17,0 ^{cB}	15,3 ^{bcB}
2,67	5,2 ^d	5,4 ^c	7,1 ^c	/	9,5 ^d

*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c, d vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)



Slika 10: Največja hitrost fermentacije celuloze (ml/h)

Od vseh taninskih izvlečkov je QUE (19,1 ml/h in 18,7 ml/h) pri koncentracijah 0,17 in 0,33 mg/ml medija najmanj upočasnil hitrost fermentacije celuloze (preglednica 15). Pri obeh koncentracijah je bila največja hitrost fermentacije pri QUE (19,1 in 18,7 ml/h) statistično značilno večja od TAK (16,6 in 13,5 ml/h). Na splošno je QUE (18,7 ml/h) najmanj upočasnil hitrost fermentacije celuloze, F75 (15,8 ml/h) in TAK (15,7 ml/h) pa najbolj. Statistično značilnih ($p < 0,05$) razlik med taninskimi izvlečki pri koncentracijah 0 in 2,67 mg/ml medija ni bilo.

4.6.2 Škrob

Največja hitrost fermentacije škroba se je statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovala tako med koncentracijami kot med taninskimi izvlečki (preglednica 16). V primerjavi s celulozo (16,5 ml/h) je fermentacija škroba potekala hitreje (37,4 ml/h). Največja koncentracija (2,67 mg/ml medija) FAK (22,5 ml/h), KPS (28,0 ml/h), QUE (25,9 ml/h) in TAK (15,9 ml/h) je najbolj upočasnila hitrost fermentacije, ki je bila v primerjavi s kontrolo (46,3 ml/h) statistično značilno ($p < 0,05$) manjša. Statistično značilne ($p < 0,05$) razlike med kontrolo (46,3 ml/h) in ostalimi koncentracijami taninskega izvlečka opazimo samo pri QUE, kjer z naraščajočo koncentracijo hitrost fermentacije enakomerno pada (slika 11).

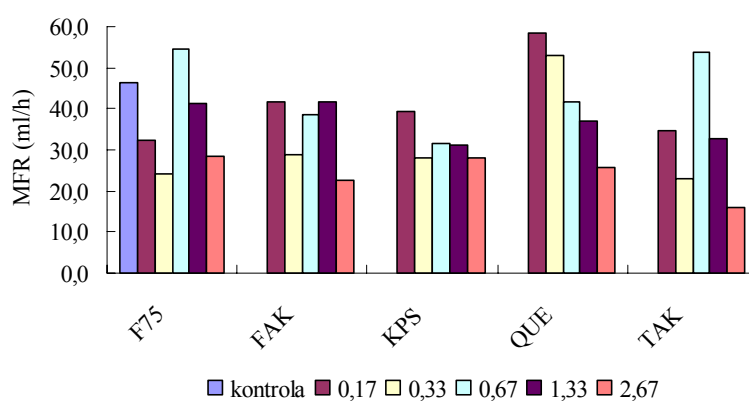
Preglednica 16: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na največjo hitrost fermentacije škroba (ml/h)

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	46,3 ^b	46,3 ^a	46,3 ^a	46,3 ^c	46,3 ^a
0,17	32,4 ^{cB}	41,6 ^{aB}	39,4 ^{abB}	58,3 ^{aA}	34,6 ^{bB}
0,33	24,1 ^{dC}	29,0 ^{bcB}	28,2 ^{cbB}	52,9 ^{bA}	22,9 ^{cdC}
0,67	54,5 ^{aA}	38,7 ^{abB}	31,6 ^{bcB}	41,5 ^{dB}	53,9 ^{aA}
1,33	41,2 ^b	41,6 ^a	31,2 ^{bc}	37,2 ^d	32,7 ^{bc}
2,67	28,6 ^{cdA}	22,5 ^{cb}	28,0 ^{cA}	25,9 ^{eAB}	15,9 ^{dC}

*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c, d, e vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B, C vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)



Slika 11: Največja hitrost fermentacije škroba (ml/h)

V primerjavi z ostalimi taninskimi izvlečki je QUE (58,3 in 52,9 ml/h) pri koncentracijah 0,17 in 0,33 mg/ml medija pospešil hitrost fermentacije škroba (slika 11). Pri obeh koncentracijah so bile razlike med QUE in ostalimi taninskimi izvlečki statistično značilne ($p < 0,05$). Kot pri celulozi je QUE (43,7 ml/h) najmanj zmanjšal hitrost fermentacije

škroba. Največja koncentracija (2,67 mg/ml medija) TAK (15,9 ml/h) je najbolj upočasnila največjo hitrost fermentacije.

4.7 ČASOVNI ZAOSTANEK ZAČETKA FERMENTACIJE (LAG)

Na časovni zaostanek začetka fermentacije sta statistično značilno vplivala vrsta in koncentracija taninskih izvlečkov. Koeficient determinacije je bil pri celulozi ($R^2 = 0,68$) nekoliko večji kot pri škrobu ($R^2 = 0,62$).

4.7.1 Celuloza

Časovni zaostanek začetka fermentacije celuloze je povprečno trajal 16,4 ure. Pri vseh taninskih izvlečkih se je časovni zaostanek začetka fermentacije med koncentracijami statistično značilno ($p < 0,05$) razlikoval (preglednica 17). Največja koncentracija (2,67 mg/ml medija) taninskih izvlečkov je časovni zaostanek začetka fermentacije najbolj podaljšala. Z naraščajočo koncentracijo je časovni zaostanek začetka fermentacije pri vseh taninskih izvlečkih, razen FAK naraščal (slika 12). F75 (43,9 h), KPS (46,5 h) in TAK (80,0 h) so imeli najdaljši časovni zaostanek začetka fermentacije pri največji koncentraciji (2,67 mg/ml medija). Pri TAK (80,0 h) je bil časovni zaostanek začetka fermentacije pri največji koncentraciji (2,67 mg/ml medija) statistično značilno ($p < 0,05$) najdaljši.

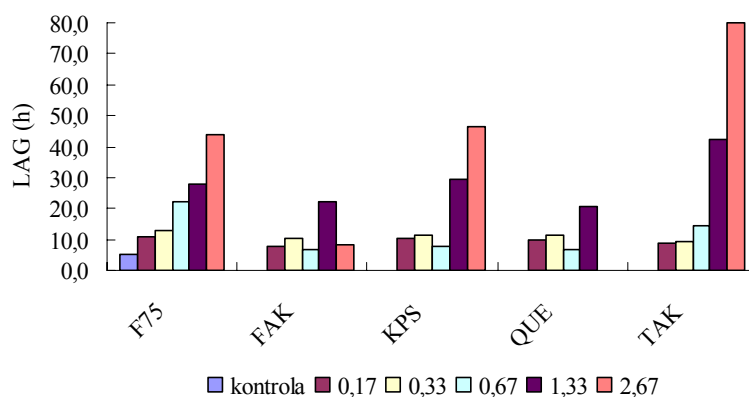
Preglednica 17: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na časovni zaostanek začetka fermentacije celuloze (h)

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	5,3 ^b	5,3 ^d	5,3 ^e	5,3 ^c	5,3 ^c
0,17	10,7 ^{bA}	8,0 ^{cC}	10,1 ^{cdAB}	9,6 ^{bABC}	8,7 ^{cBC}
0,33	13,0 ^{bA}	10,3 ^{bBC}	11,6 ^{cABC}	12,0 ^{bAB}	9,2 ^{cC}
0,67	22,2 ^{abA}	6,6 ^{cdC}	8,0 ^{dC}	6,9 ^{cC}	14,4 ^{cB}
1,33	28,0 ^{abB}	22,2 ^{aC}	29,3 ^{bB}	20,7 ^{aC}	42,3 ^{bA}
2,67	43,9 ^{aBC}	8,1 ^{cC}	46,5 ^{aAB}	/	80,0 ^{aA}

*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c, d, e vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B, C vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

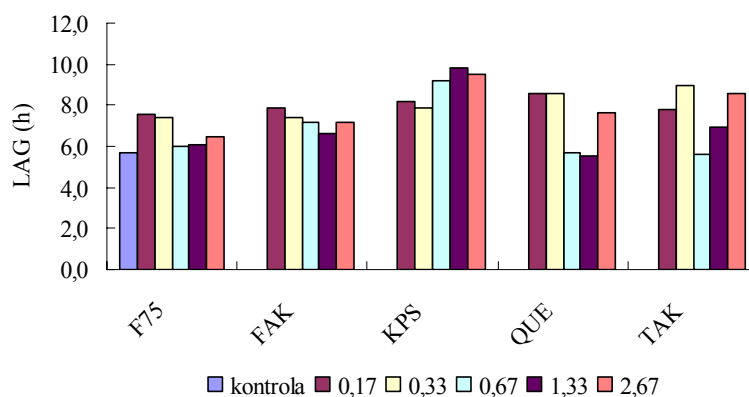


Slika 12: Časovni zaostanek začetka fermentacije celuloze (h)

Statistično značilne ($p < 0,05$) razlike med taninskimi izvlečki najdemo pri vseh koncentracijah taninskih izvlečkov (preglednica 17). F75 (10,7 h, 13,0 h ter 22,2 h) je pri koncentracijah 0,17, 0,33 in 0,67 mg/ml medija najbolj podaljšal časovni zaostanek začetka fermentacije, ki se je pri koncentraciji 0,67 mg/ml medija statistično značilno ($p < 0,05$) razlikoval od vseh taninskih izvlečkov. Pri koncentracijah 1,33 in 2,67 mg/ml medija je TAK (42,3 h in 80,0 h) statistično značilno ($p < 0,05$) podaljšal časovni zaostanek začetka fermentacije (preglednica 17 in slika 12). Najdlje je časovni zaostanek začetka fermentacije trajal pri TAK, medtem ko je bil pri QUE najkrajši.

4.7.2 Škrob

Med koncentracijami posameznih taninskih izvlečkov se je časovni zaostanek začetka fermentacije statistično značilno ($p < 0,05$) razlikoval. Pri FAK (7,2 h), KPS (9,5 h), QUE (7,6 h) in TAK (8,6 h) je bil časovni zaostanek začetka fermentacije pri največji koncentraciji (2,67 mg/ml medija) statistično značilno ($p < 0,05$) daljši od kontrole (5,7 h), vendar ni bil pri nobenem taninskem izvlečku najdaljši. Povprečno je najdaljši časovni zaostanek začetka fermentacije nastopil pri koncentracijah 0,17 (8,0 h) in 0,33 mg/ml medija (7,9 h).



Slika 13: Časovni zaostanek začetka fermentacije škroba (h)

Preglednica 18: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na časovni zaostanek začetka fermentacije škroba (h)

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	5,7 ^b	5,7 ^d	5,7 ^c	5,7 ^c	5,7 ^c
0,17	7,6 ^{aC}	7,9 ^{aBC}	8,2 ^{abAB}	8,6 ^{aA}	7,8 ^{abBC}
0,33	7,4 ^{aB}	7,4 ^{bB}	7,9 ^{bB}	8,6 ^{aA}	9,0 ^{aA}
0,67	6,0 ^{bC}	7,2 ^{bB}	9,2 ^{abA}	5,7 ^{cC}	5,6 ^{cC}
1,33	6,1 ^{bB}	6,6 ^{cB}	9,8 ^{aA}	5,5 ^{cB}	6,9 ^{bcB}
2,67	6,5 ^{bC}	7,2 ^{bBC}	9,5 ^{abA}	7,6 ^{bABC}	8,6 ^{aAB}

*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c, d, e vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B, C vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

Od vseh taninskih izvlečkov je F75 (7,6 h in 7,4 h) pri koncentracijah 0,17 in 0,33 mg/ml medija najmanj povečal časovni zaostanek začetka fermentacije (preglednica 18). KPS (9,2 h, 9,8 h in 9,5 h) je pri koncentracijah 0,67, 1,33 in 2,67 mg/ml medija najbolj podaljšal časovni zaostanek začetka fermentacije in je bil statistično značilno ($p < 0,05$) daljši od ostalih taninskih izvlečkov le pri koncentracijah 0,67 in 1,33 mg/ml medija. F75 (6,5 h) je najmanj povečal, KPS (8,4 h) pa je s svojim delovanjem najbolj podaljšal časovni zaostanek začetka fermentacije škroba.

4.8 PRODUKCIJA PLINA V 24 URAH (GAS₂₄)

V 24 urah sta na produkcijo plina vplivala vrsta in koncentracija taninskih izvlečkov. V primerjavi s celulozo ($R^2 = 0,89$) je bil koeficient determinacije pri škrobu ($R^2 = 0,44$) manjši.

4.8.1 Celuloza

Produkcija plina se je med koncentracijami taninskih izvlečkov statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovala (preglednica 19). V 24 urah je povprečno nastalo 254,3 ml/g SS plina. Pri vseh taninskih izvlečkih je bila produkcija plina pri največjih dveh koncentracijah (1,33 in 2,67 mg/ml medija) najmanjša (slika 14). Statistično značilno najmanjša je bila pri vseh taninskih izvlečkih razen pri F75 (32,0 in 34,2 ml/g SS). Najbolj sta produkcijo plina zmanjšali največji koncentraciji (1,33 in 2,67 mg/ml medija) taninskih izvlečkov.

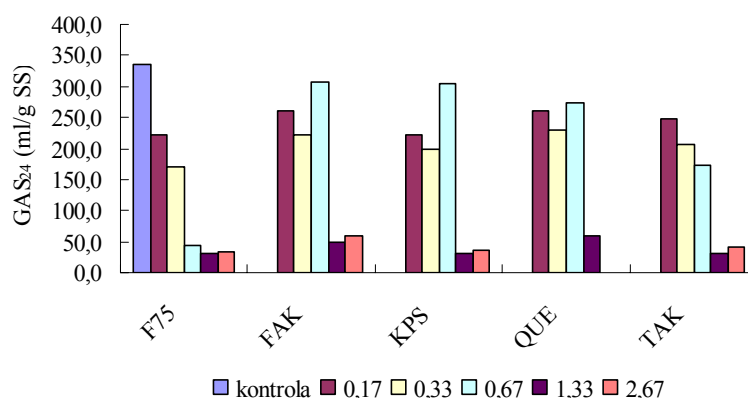
Preglednica 19: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na produkcijo plina iz celuloze v 24 urah (ml/g SS)

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	334,2 ^a	334,2 ^a	334,2 ^a	334,2 ^a	334,2 ^a
0,17	220,9 ^{bB}	259,7 ^{bA}	222,1 ^{bB}	259,6 ^{bA}	247,9 ^{bAB}
0,33	170,1 ^c	221,7 ^c	199,8 ^b	218,3 ^c	206,3 ^{bc}
0,67	44,3 ^{dC}	306,3 ^{aA}	305,8 ^{aA}	274,5 ^{bA}	173,7 ^{cB}
1,33	32,0 ^{dB}	49,1 ^{dAB}	30,0 ^{cB}	59,2 ^{dA}	31,1 ^{dB}
2,67	34,2 ^{dB}	58,2 ^{dA}	35,1 ^{cB}	/	42,3 ^{dB}

*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c, d, e vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B, C vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)



Slika 14: Produkcija plina iz celuloze v 24 urah (ml/g SS)

Učinek taninskih izvlečkov na produkcijo plina v 24 urah se je statistično značilno ($p < 0,05$) razlikoval znotraj posameznih koncentracij (preglednica 19). Pri koncentracijah 0,17, 0,33 in 0,67 mg/ml medija je F75 (220,9, 170,0 in 44,3 ml/g SS) najbolj zmanjšal produkcijo plina. FAK (259,7, 221,7 in 306,3 ml/g SS) je pri teh treh koncentracijah najmanj oviral produkcijo plina in je bil statistično značilno ($p < 0,05$) večji od F75. Tudi pri največji koncentraciji (2,67 mg/ml medija) je bila produkcija plina pri F75 (34,2 ml/g SS) statistično značilno ($p < 0,05$) manjša od FAK (58,2 ml/g SS). Na splošno je produkcijo plina iz celuloze v 24 urah najbolj zmanjšal F75 (227,9 ml/g SS).

4.8.2 Škrob

Tudi pri škrobu se je produkcija plina v 24 urah statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovala med koncentracijami taninskih izvlečkov (preglednica 20). Taninskimi izvlečki so imeli manjši vpliv na produkcijo plina iz škroba (376,3 ml/g SS) kot iz celuloze (254,3 ml/g SS). Največje koncentracije (2,67 mg/ml medija) FAK (338,2 ml/g SS), KPS (332,6 ml/g SS), QUE (316,6 ml/g SS) in TAK (209,9 ml/g SS) so najbolj zmanjšale produkcijo plina iz škroba v 24 urah. Čeprav je bila tudi pri največji koncentraciji (2,67 mg/ml medija) F75 (386,3 ml/g SS) produkcija plina manjša od kontrole (394,8 ml/g SS), ni bila v primerjavi z ostalimi koncentracijami najmanjša.

Preglednica 20: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na produkcijo plina iz škroba v 24 urah (ml/g SS)

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	394,8 ^a	394,8 ^a	394,8 ^a	394,8 ^a	394,8 ^b
0,17	343,1 ^b	356,8 ^{bc}	355,7 ^{ab}	363,2 ^{ab}	362,3 ^b
0,33	325,0 ^{bc}	349,4 ^{bcB}	342,9 ^{bB}	368,5 ^{abA}	319,0 ^{cC}
0,67	393,1 ^{aB}	380,4 ^{abB}	372,0 ^{abBC}	347,1 ^{bcC}	443,2 ^{aA}
1,33	398,9 ^{aAB}	406,0 ^{aA}	356,1 ^{abBC}	348,2 ^{bcC}	398,3 ^{bAB}
2,67	386,3 ^{aA}	338,2 ^{cB}	332,6 ^{bB}	316,6 ^{cB}	209,9 ^{dC}

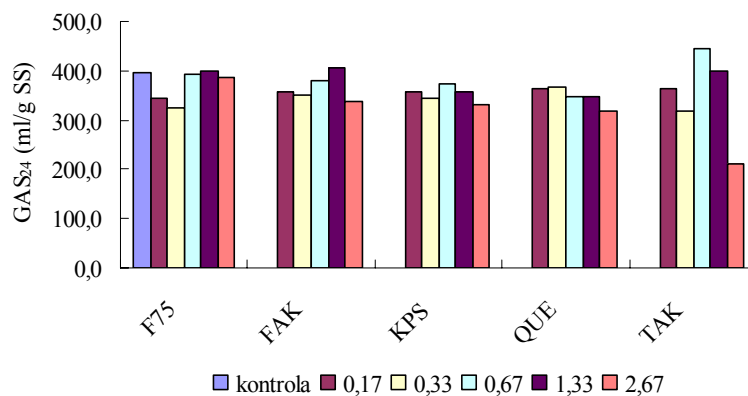
*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

^{a, b, c, d} vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

^{A, B, C} vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

QUE (363,2 in 368,5 ml/g SS) je pri koncentracijah 0,17 in 0,33 mg/ml medija najmanj zaviral produkcijo plina v 24 urah (preglednica 20). V primerjavi s QUE sta F75 (343,1 ml/g SS) pri koncentraciji 0,17 mg/ml medija in TAK (319,0 ml/g SS) pri koncentraciji 0,33 mg/ml medija najbolj zmanjšala produkcijo plina v 24 urah. TAK je pri največji

koncentraciji (2,67 mg/ml medija) statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal produkcijo plina v 24 urah (209,9 ml/g SS). Povprečno je produkcijo plina iz škroba v 24 urah najbolj zmanjšal TAK (370,7 ml/g SS).



Slika 15: Produkcija plina iz škroba v 24 urah (ml/g SS)

4.9 PRODUKCIJA PLINA V 48 URAH (GAS_{48})

Čeprav sta na GAS_{48} statistično značilno vplivala tako vrsta kot koncentracija taninskega izvlečka, je bil koeficient determinacije pri škrobu ($R^2 = 0,33$) manjši kot pri celulozi ($R^2 = 0,85$).

4.9.1 Celuloza

Produkcija plina v 48 urah se je statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovala med koncentracijami posameznih taninskih izvlečkov (preglednica 21). Pri vseh taninskih izvlečkih je nastalo najmanj plina pri največji koncentraciji (2,67 mg/ml medija). Samo pri F75 (40,3 ml/g SS), FAK (214,7 ml/g SS) in KPS (39,1 ml/g SS) je bila razlika med največjo koncentracijo in ostalimi koncentracijami statistično značilna ($p < 0,05$).

Statistično značilne ($p < 0,05$) razlike med taninskimi izvlečki opazimo samo pri največjih treh koncentracijah (0,67, 1,33 in 2,67 mg/ml medija) (preglednica 21). Pri koncentracijah 0,33 in 0,67 mg/ml medija je F75 (334,6 in 331,7 ml/g SS) najbolj, KPS (366,7 in 421,2 ml/g SS) pa najmanj zmanjšal produkcijo plina v 48 urah. Razlika med F75 in KPS je bila statistično značilna le pri koncentraciji 0,67 mg/ml medija. Glede na ostale taninske

izvlečke se je pri največji koncentraciji (2,67 mg/ml medija) FAK (214,7 ml/g SS) proizvedlo statistično značilno največ plina (slika 16). Čeprav je pri največji koncentraciji (2,67 mg/ml medija) KPS (39,1 ml/g SS) nastalo najmanj plina, razlika med F75 (40,3 ml/g SS), KPS (39,1 ml/g SS) in TAK (53,3 ml/g SS) ni bila statistično značilna ($p > 0,05$). Povprečno je bila produkcija plina iz celuloze v 48 urah najmanjša pri TAK (346,4 ml/g SS).

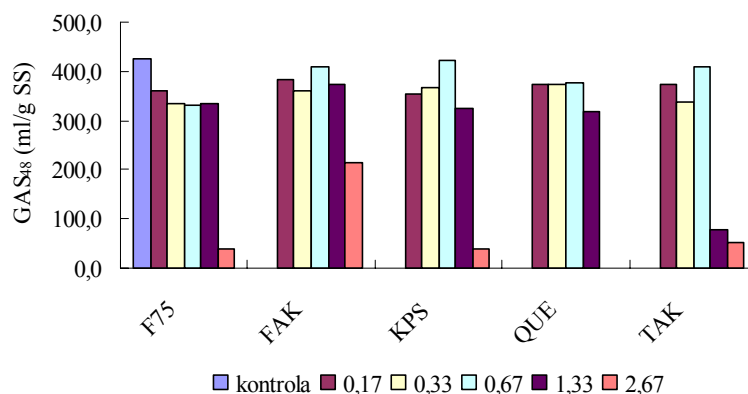
Preglednica 21: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na produkcijo plina iz celuloze v 48 urah (ml/g SS)

Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	426,6 ^a	426,6 ^a	426,6 ^a	426,6 ^a	426,6 ^a
0,17	359,3 ^b	382,3 ^b	354,5 ^b	373,2 ^b	372,4 ^b
0,33	334,6 ^c	358,9 ^c	366,7 ^b	363,9 ^b	336,8 ^c
0,67	331,7 ^{cC}	410,3 ^{aAB}	421,2 ^{aA}	375,8 ^{bB}	410,5 ^{aAB}
1,33	335,0 ^{cAB}	373,6 ^{bcA}	325,4 ^{cAB}	319,3 ^{cb}	78,2 ^{dC}
2,67	40,3 ^{dB}	214,7 ^{dA}	39,1 ^{dB}	/	53,3 ^{dB}

*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c, d, e vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B, C vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)



Slika 16: Produkcija plina iz celuloze v 48 urah (ml/g SS)

4.9.2 Škrob

V 48 urah je bila povprečna produkcija plina 420,3 ml/g SS. Statistično značilne ($p < 0,05$) razlike med koncentracijami najdemo samo pri KPS, QUE in TAK (preglednica 22). Le pri FAK (406,1 ml/g SS), KPS (376,1 ml/g SS) in QUE (359,3 ml/g SS) je največja koncentracija (2,67 mg/ml medija) najbolj zmanjšala produkcijo plina v 48 urah. Produkcija plina je bila pri največji koncentraciji (2,67 mg/ml medija) KPS (376,1 ml/g SS) in QUE (359,3 ml/g SS) statistično značilno ($p < 0,05$) manjša od kontrole (433,8 ml/g

SS). Pri ostalih taninskih izvlečkih največja koncentracija (2,67 mg/ml medija) ni najbolj zmanjšala produkcije plina v 48 urah.

Preglednica 22: Vpliv različnih vrst in koncentracij taninskih izvlečkov na produkcijo plina iz škroba v 48 urah (ml/g SS)

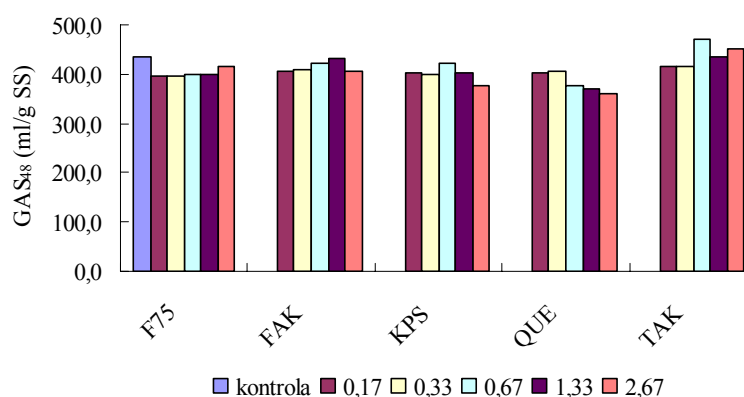
Konc.	F75	FAK	KPS	QUE	TAK
0	433,8	433,8	433,8 ^a	433,8 ^a	433,8 ^{ab}
0,17	397,7 ^B	406,3 ^{AB}	403,1 ^{abAB}	401,7 ^{abAB}	414,6 ^{bA}
0,33	396,4 ^C	410,1 ^{AB}	399,8 ^{abC}	404,5 ^{abBC}	416,6 ^{bA}
0,67	400,9 ^B	422,1 ^B	421,0 ^{ab}	378,2 ^{bcC}	469,5 ^{aA}
1,33	398,6 ^B	430,7 ^A	402,7 ^{abB}	368,6 ^{bcC}	435,5 ^{abA}
2,67	414,4 ^B	406,1 ^B	376,1 ^{bc}	359,3 ^{cC}	450,7 ^{abA}

*konc. – koncentracija (mg/ml medija)

a, b, c vrednosti v stolpcih označene z malimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

A, B, C vrednosti v vrsticah označene z velikimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

Produkcija plina v 48 urah se je statistično značilno ($p < 0,05$) razlikovala med taninskimi izvlečki znotraj posameznih koncentracij (preglednica 22). Od vseh taninskih izvlečkov je TAK pri vseh koncentracijah najmanj zavrnil produkcijo plina iz škroba (slika 17). Dodatek največjih treh koncentracij (0,67, 1,33 in 2,67 mg/ml medija) TAK (469,5, 435,5 in 450,7 ml/g SS) je povečal produkcijo plina iz škroba v 48 urah, ki je bila v primerjavi z ostalimi taninskimi izvlečki statistično značilno ($p < 0,05$) največja. QUE (378,2, 368,6 in 359,3 ml/g SS) je pri teh koncentracijah najbolj zmanjšal produkcijo plina.



Slika 17: Produkcija plina iz škroba v 48 urah (ml/g SS)

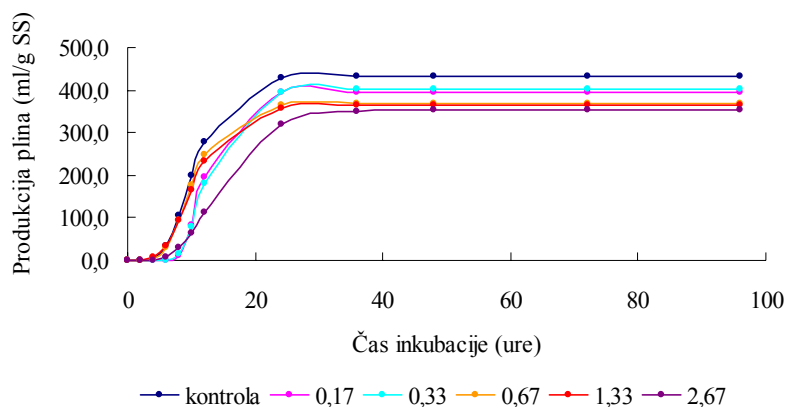
5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Menke in sod. (1979) so v svojih poskusih dokazali visoko povezavo med produkcijo plina *in vitro* in navidezno prebavljivostjo *in vivo*. Zaradi tega se danes plinski test v veliki meri uporablja za ocenjevanje hranilne vrednosti krme. Z merjenjem proizvedenega plina dobimo koristne podatke o kinetiki prebave topnih in netopnih hranilnih snovi krme (Getachew in sod., 1998). Pri *in vitro* dodatku substrata v vampni sok, ogljikovi hidrati fermentirajo v hlapne maščobne kisline (ocetna, propionska in maslena kislina), tvorijo se plini (ogljikov dioksid in metan) in mikrobne celice (Getachew in sod., 1998). Scalbert (1991) poroča o zmanjšani razgradnji polisaharidov ob dodatku kostanjevih taninov, še posebej, če je razmerje med taninom in substratom večje od ena. O zmanjšani produkciji hlapnih maščobnih kislin ob dodatku taninov poročajo Makkar in sod. (1995) ter Zimmer in Cordesse (1996). Ker pri fermentaciji beljakovin in maščob v predželodcih nastane zelo malo plina, je produkcija plina v večji meri posledica fermentacije ogljikovih hidratov (Getachew in sod., 1998). Od vrste substrata je odvisno molarno razmerje hlapnih maščobnih kislin. Pri ogljikovih hidratih, ki hitro fermentirajo (npr. škrob) nastane več propionske kisline in manj očetne kisline. Več očetne kot propionske kisline pa nastane pri fermentaciji počasi fermentajočih ogljikovih hidratov (npr. celuloza). Poleg zmanjšane produkcije hlapnih maščobnih kislin, se ob prisotnosti taninov spremeni tudi molarno razmerje hlapnih maščobnih kislin (Makkar in sod., 1995; Perez-Maldonado in Norton, 1996; Butter in sod., 1999).

V primerjavi s kontrolnimi vrednostmi so taninski izvlečki z naraščajočo koncentracijo zmanjšali kumulativno produkcijo plina in posledično razgradljivost substratov. Zmanjšana razgradnja substratov je, kot poročajo mnogi avtorji, posledica nastanka kompleksov med tanini in ogljikovimi hidrati, ki onemogočajo mikrobno razgradnjo substrata (Butter in sod., 1999; Makkar, 2003; McSweeney in sod., 2001). Prav tako tanini zmanjšujejo aktivnost bakterijskih encimov, ki so vključeni v presnovo ogljikovih hidratov (celulaza, amilaza in galaktozidaza) (Makkar in sod., 1987, cit. po Butter in sod., 1999). Makkar in

sod. (1988) poročajo o zmanjšani aktivnosti ureaze, karboksimetilcelulaze ter glutamat dehidrogenaze v *in sacco* poskusu s hrastovimi tanini.



Slika 18: Kumulativna produkcija plina iz škroba z naraščajočo koncentracijo quebracho izvlečka (QUE)

Slika 18 predstavlja kumulativno produkcijo plina iz škroba z naraščajočo koncentracijo QUE. Z naraščajočo koncentracijo se je kumulativna produkcija plina zmanjševala. Razlike med parametri Gompertzove funkcije so predstavljene v preglednicah 8, 10 in 12. Do enakih zaključkov so prišli tudi Hervás in sod. (2003), ki so pri ovcah proučevali vpliv različnih koncentracij quebracho izvlečka na potek fermentacije *in vitro*. Ugotovili so, da je bil učinek quebracho izvlečka na potek fermentacije *in vitro* odvisen od koncentracije taninskega izvlečka in vrste substrata.

Pri fermentaciji celuloze dodatek TAK in FAK ni imel enakega učinka kot QUE. V 168 urah je bila produkcija plina pri največji koncentraciji (2,67 mg/ml medija) TAK (446,2 ml/g SS) večja od produkcije plina iz celuloze (431,9 ml/g SS) brez dodanega taninskega izvlečka. Prav tako je dodatek TAK v 72 (476,6 ml/g SS) in 96 urah (480,5 ml/g SS) presegel produkcijo plina (432,5 ml/g SS pri 72 in 96 urah) iz škroba brez dodanega taninskega izvlečka. Podoben trend smo opazili tudi pri FAK (437,0 ml/g SS), ki je povečal produkcijo plina iz celuloze v 168 urah za 5,1 ml/g SS. Naša opažanja se ujemajo z opažanji Singh in sod. (2001), ki so proučevali mikrobno razgradnjo taninske kisline *in vitro*. Ob dodatku taninske kisline k škrobu se je povečala produkcija plina in zmanjšala koncentracija amoniaka v času od 24 do 72 ur (Singh in sod., 2001). Zaradi povečane

produkcije plina lahko sklepamo, da taninska kislina (TAK) ni ovirala delovanja vampnih mikroorganizmov oziroma so kot poročajo Singh in sod. (2001) vampni mikroorganizmi taninsko kislino razgradili na galno kislino, pirogalol in resorcinol.

Na splošno so taninski izvlečki bolj zmanjšali produkcijo plina iz celuloze (390,6 ml/g SS) kot iz škroba (414,1 ml/g SS). Najbolj je fermentacijo celuloze oviral F75 (366,8 ml/g SS), temu pa so sledili KPS (378,9 ml/g SS), QUE (381,2 ml/g SS), FAK (407,5 ml/g SS) in TAK (416,9 ml/g SS). Dodatek kostanjevih taninov k sojinim tropinam (Roth, 2003) in travniškemu senu (Zimmer in Cordesse, 1996) je statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal produkcijo plina oziroma razgradnjo substratov. Tudi fermentacijo škroba sta najmanj ovirala TAK (446,8 ml/g SS) in FAK (419,4 ml/g SS), medtem ko je kondenzirani tanin QUE (386,5 ml/g SS) fermentacijo škroba najbolj oviral. QUE je v *in vitro* poskusu Hervás in sod. (2003) statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal produkcijo plina z naraščajočo koncentracijo. Tudi v naši nalogi je QUE z naraščajočo koncentracijo statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina (B). Mnogi avtorji poročajo o zmanjšani produkciji plina z naraščajočo koncentracijo taninskih izvlečkov (Roth, 2003; Longland in sod., 1995; Lavrenčič, 2001; Zimmer in Cordesse, 1996), vendar v naši nalogi tega trenda ni moč zaslediti pri vseh taninskih izvlečkih. Kot poročajo avtorji je vezava taninov na ogljikove hidrate in beljakovine odvisna od lastnosti taninov in lastnosti makromolekul, kot so molekulska masa, terciarna struktura, izoelektrična točka in kompatibilnost mest za vezavo (Silanikove in sod., 2001; Reed, 1995). Eden od razlogov, da se naši rezultati razlikujejo od objavljenih v strokovni literaturi, je lahko tudi ena od teh. Pri večini taninskih izvlečkov je največja koncentracija (2,67 mg/ml medija) najbolj zmanjšala skupno potencialno produkcijo plina.

Časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG) je faza prilagajanja mikroorganizmov na novo okolje in poselitev mikroorganizmov na substrat. Taninski izvlečki so glede na kontrolo statistično značilno podaljšali časovni zaostanek začetka fermentacije. Časovni zaostanek začetka fermentacije celuloze se je s povečevanjem koncentracije podaljševal samo pri F75 in TAK (slika 12). O podaljšanem časovnem zaostanku začetka fermentacije graha s povečano koncentracijo mimoze poroča tudi Roth (2003). Daljši časovni zaostanek začetka fermentacije je verjetno posledica vezave taninskih izvlečkov na mikrobne encime

in substrat, ki postane po vezavi taninskih izvlečkov »neprepoznaven« za encime (Scalbert, 1991; McSweeney in sod., 2001; Kumar in Singh, 1984) oziroma kot poročata O'Donovan in Brooker (2001) je daljši časovni zaostanek začetka fermentacije posledica tvorbe zaščitne bariere mikroorganizmov. Zaščitno bariero predstavljajo glikoproteini, ki privlačijo tanine, s tem pa onemogočijo vezavo taninov na mikrobne encime, ki so pomembni za rast mikroorganizmov (Scalbert, 1991; McSweeney in sod., 2001). S podaljševanjem časovnega zaostanka začetka fermentacije se je posledično podaljševal tudi čas največje hitrosti fermentacije (TMFR). Čas največje hitrosti fermentacije je bil odvisen tako od vrste kot koncentracije taninskega izvlečka. Brez dodanega taninskega izvlečka je celuloza dosegla največjo hitrost fermentacije v 12,9 urah. Največja koncentracija (2,67 mg/ml medija) TAK je podaljšala čas največje hitrosti fermentacije celuloze na 98,7 ure. Razlika med najkrajšim (12,9 h) in najdaljšim (98,7 h) časom največje hitrosti fermentacije celuloze je bila statistično značilna ($p < 0,05$). Čas največje hitrosti fermentacije škroba je bil povprečno krajši od celuloze (27,5 h) za 15,8 ure. Razpon časa največje hitrosti fermentacije škroba je segal od 8,7 (F75 pri koncentraciji 0,67 mg/ml medija) do 15,9 ure (TAK pri koncentraciji 0,33 mg/ml medija).

Koncentracije taninskih izvlečkov so zmanjšale največjo hitrost fermentacije celuloze. Najbolj je upočasnila največjo hitrost fermentacije največja koncentracija (2,67 mg/ml medija) F75 (5,2 ml/h). Lavrenčič (2001) in Roth (2003) poročata o upočasneni fermentaciji sojinih tropin s povečevanjem koncentracije kostanjevega tanina (farmatan). Kot poročajo Salawu in sod. (1997) je upočasnjena fermentacija celuloze posledica zmanjšane celulolitičnega delovanja mikroorganizmov. Upočasnjena fermentacija celuloze (16,7 ml/h) se odraža v zmanjšani produkciji plina v 24 in 48 urah. V 24 in 48 urah je bila produkcija plina iz celuloze (254,2 in 372,8 ml/g SS) manjša od produkcije plina iz škroba (375,6 in 420,6 ml/g SS). Fermentacijo škroba je najbolj upočasnil TAK pri koncentraciji 0,33 mg/ml medija (22,9 ml/h). Enakomerno padanje največje hitrosti fermentacije škroba z naraščajočo koncentracijo taninskega izvlečka opazimo samo pri QUE (slika 11). O zmanjšani hitrosti razgradnje substratov ob povečani koncentraciji quebracho tanina poročajo Hervás in sod. (2003). Tudi Zimmer in Cordesse (1996) poročata o zmanjšani hitrosti razgradnje travniškega sena ob povečani koncentraciji kostanjevih taninov *in vivo*.

V naši nalogi so taninski izvlečki spremenili potek fermentacije z zmanjšano produkcijo plina in upočasnjeno fermentacijo substratov. Makkar in sod. (1995), Salawu in sod. (1997) in Getachew in sod. (2001) so v svojih poskusih proučevali učinek taninov s pomočjo polietilen glikola (PEG) in polivinil pirolidona (PVP). PEG in PVP tvorita močne vodikove vezi s tanini (Silanikove in sod., 2001), s tem pa preprečujeta nastanek kompleksov med makromolekulami in tanini. Dodatek PEG in PVP zmanjša negativen učinek taninov, kar se kaže v povečani produkciji plina in hitrejši razgradljivosti substratov. Getachew in sod. (2001) so ugotovili, da manjši večkratni odmerki PEG povečajo sintezo mikrobnih beljakovin v primerjavi z večjim enkratnim odmerkom. Večkratni odmerki PEG izboljšajo vampno fermentacijo (ki je rezultat usklajene dostopnosti energije mikroorganizmom in mikrobne sinteze beljakovin), kar se kaže v učinkovitejšem izkoriščanju krme bogate s tanini (Getachew in sod., 2001).

5.2 SKLEPI

Dodatek taninskih izvlečkov je spremenil potek *in vitro* fermentacije celuloze in škroba. Potek *in vitro* fermentacije se je spreminjal s/z:

- zmanjševanjem skupne potencialne produkcije plina (B)
 - taninski izvlečki so delovali veliko bolj negativno na skupno potencialno produkcijo plina iz celuloze (390,6 ml/g SS) kot iz škroba (414,1 ml/g SS). F75 je imel največji negativen učinek na skupno potencialno produkcijo plina. Od koncentracij je imela, po pričakovanju, največji negativen učinek največja koncentracija.
 - skupno potencialno produkcijo plina iz škroba je od taninskih izvlečkov najbolj zavrl QUE (386,5 ml/g SS). Najmanjša koncentracija (0,17 mg/ml medija) taninskih izvlečkov je najbolj zmanjšala skupno potencialno produkcijo plina iz škroba.
- spremenjenim časom največje hitrosti fermentacije (TMFR)
 - v primerjavi s škrobom (11,7 h) je največja hitrost fermentacije celuloze v povprečju nastopila kasneje (27,5 h). Med taninskimi izvlečki je največja hitrost fermentacije najkasneje nastopila pri TAK (37,3 h). Pri koncentracijah taninskih izvlečkov je razpon časa največje hitrosti fermentacije celuloze segal od 12,9 (kontrola) do 98,7 ure (TAK pri največji koncentraciji).

- pri TAK (13,0 h) in KPS (12,9 h) je največja hitrost fermentacije škroba nastopila najkasneje. Največja hitrost fermentacije je najhitreje nastopila pri F75 (koncentracija 0,67 mg/ml medija) (8,7 h) in najpočasneje pri TAK (koncentracija 2,67 mg/ml medija) (19,8 h).
- zmanjšano največjo hitrostjo fermentacije (MFR)
 - TAK je najbolj zmanjšal hitrost fermentacije celuloze (15,7 ml/h), kateremu so sledili F75 (15,8 ml/h) < FAK in KPS (16,9 ml/h) < QUE (18,7 ml/h). Največja koncentracija taninskih izvlečkov je najbolj upočasnila največjo hitrost fermentacije celuloze (6,8 ml/h).
 - v primerjavi s celulozo je bila največja hitrost fermentacije škroba večja (37,3 ml/h). Hitrost fermentacije škroba je bila največja pri QUE (43,7 ml/h) in najmanjša pri KPS (34,1 ml/h). Razpon največje hitrosti fermentacije škroba je pri koncentracijah taninskih izvlečkov segal od 24,1 ml/h (koncentracija 2,67 mg/ml medija) do 46,3 ml/h (kontrola).
- spremenjenim časovnim zaostankom začetka fermentacije (LAG)
 - začetek fermentacije celuloze je nastopil najprej pri FAK (10,1 h) in najkasneje pri TAK (26,7 h). Časovni zaostanek začetka fermentacije celuloze se je z naraščajočo koncentracijo taninskih izvlečkov podaljševal in je najdlje trajal pri največji koncentraciji taninskih izvlečkov.
 - začetek fermentacije škroba je nastopil v povprečju 9,4 ure prej kot pri celulozi (17,5 h). KPS je najbolj podaljšal časovni zaostanek začetka fermentacije škroba (8,4 h). Pri koncentracijah 0,17 in 0,33 mg/ml medija je bil časovni zaostanek začetka fermentacije največji (8,0 in 7,9 h).
- zmanjšano produkcijo plina v 24 in 48 urah (GAS₂₄, GAS₄₈)
 - na splošno so taninski izvlečki bolj zavirali fermentacijo substratov v 24 kot 48 urah. V 24 urah je produkcijo plina iz celuloze najbolj oviral F75 (227,9 ml/g SS), v 48 urah pa TAK (346,4 ml/g SS). Pri obeh časih sta produkcijo plina najbolj zmanjšali največji koncentraciji taninskih izvlečkov (42,4 ml/g SS v 24 in 86,8 ml/g SS v 48 urah).
 - TAK (370,7 ml/g SS) je najbolj zavrl produkcijo plina iz škroba v 24 urah, medtem ko je v 48 urah imel največji negativen učinek na produkcijo plina QUE (408,1 ml/g

SS). Tudi pri škrobu sta največji koncentraciji (2,67 mg/ml medija) taninskih izvlečkov najbolj zavrli produkcijo plina v 24 (316,7 ml/g SS) in 48 urah (401,3 ml/g SS).

6 POVZETEK

Tanini so rastlinski polimeri, ki tvorijo različne vrste vezi z beljakovinami (encimi), ogljikovimi hidrati ter ostalimi makromolekulami (Makkar, 2003; Mole in Waterman, 1978; Butter in sod., 1999). Nastanek kompleksov je odvisen od lastnosti taninov, lastnosti makromolekul (molekulska masa, topnost, terciarna struktura, izoelektrična točka), pH okolja, temperature in prisotnosti anorganskih ionov (Ca, Mg, Na in K) (Silanikove in sod., 2001; Hagerman in Klucher, 1986; Perez-Maldonado in sod., 1995). Tanine delimo na hidrolizirajoče in kondenzirane tanine. Obe skupini taninov imata tako škodljive kot koristne učinke, ki so odvisni od vrste in koncentracije tanina v obroku, vrste živali ter fiziološkega stanja živali (Kumar in Vaithiyanathan, 1990; Butter in sod., 1999; Makkar, 2003).

Namen dela je ugotoviti, kako različni taninski izvlečki v različnih koncentracijah vplivajo na potek *in vitro* fermentacije celuloze in škroba. Zanima nas obseg kazalnikov fermentacije (skupna potencialna produkcija plina (B), specifična hitrost fermentacije (C) in konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A)) ter obseg časovnega zaostanka začetka fermentacije (LAG), največja hitrost fermentacije (MFR) in čas največje hitrosti fermentacije (TMFR). Hkrati nas zanima tudi produkcija plina v 24 in 48 urah.

Plinski test smo izvedli po Menke in Steingass (1988) (Hohenheimski plinski test). Za substrat smo uporabili celulozo in krompirjev škrob. V poskusu smo uporabili pet vrst taninskih izvlečkov farmatan 75 (F75), farmatan 75 z dodano kislino (FAK), KPS (KPS) in taninska kislina (TAK) so predstavljali hidrolizirajoče tanine, medtem ko je izvleček iz drevesa quebracho (QUE) kondenzirani tanin.

Na splošno so taninski izvlečki bolj ovirali skupno potencialno produkcijo plina iz celuloze (390,6 ml/g SS) kot iz škroba (414,1 ml/g SS). Najbolj je skupno potencialno produkcijo plina iz celuloze oviral F75 (366,8 ml/g SS), QUE (386,5 ml/g SS) pa iz škroba. Največja koncentracija je pri večini taninskih izvlečkov najbolj zmanjšala skupno potencialno produkcijo plina. Pri celulozi je bil razpon specifične hitrosti fermentacije od 3,6 (FAK pri koncentraciji 2,67 mg/ml medija) do 574,3 (TAK pri koncentraciji 2,67 mg/ml medija),

medtem ko je bil pri škrobu manjši in je segal od 5,9 (TAK pri koncentraciji 2,67 mg/ml medija) do 87,7 (QUE pri koncentraciji 0,17 mg/ml medija). Konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti je pri celulozi segal od 0,033 (FAK pri koncentraciji 2,67 mg/ml medija) do 0,149 (FAK pri koncentraciji 1,33 mg/ml medija), pri škrobu pa od 0,090 (TAK pri koncentraciji 2,67 mg/ml medija) do 0,400 (QUE pri koncentraciji 0,17 mg/ml medija).

Časovni zaostanek začetka fermentacije celuloze se je z naraščajočo koncentracijo taninskih izvlečkov podaljševal in je najdlje trajal pri največji koncentraciji taninskih izvlečkov. Pri škrobu (7,2 h) je bil časovni zaostanek začetka fermentacije v povprečju krajši kot pri celulozi (17,5 h) za 10,3 ure. S podaljševanjem časovnega zaostanka začetka fermentacije se je posledično podaljševal tudi čas največje hitrosti fermentacije. V primerjavi s škrobom (11,7 h) je največja hitrost fermentacije celuloze v povprečju nastopila kasneje (27,5 h). Pri obeh substratih je največja hitrost fermentacije najkasneje nastopila pri TAK (37,3 h pri celulozi in 13,0 h pri škrobu). TAK je najbolj zmanjšal hitrost fermentacije celuloze (15,7 ml/h), medtem ko je bila največja hitrost fermentacije škroba najmanjša pri KPS (34,1 ml/h). Glede na kontrolo so koncentracije taninskih izvlečkov zmanjšale največjo hitrost fermentacije celuloze. Zmanjšana največja hitrost fermentacije se je odražala v zmanjšani produkciji plina. Produkcijo plina iz celuloze sta v 24 in 48 urah najbolj ovirala F75 (227,9 ml/g SS) in TAK (346,4 ml/g SS). TAK (370,7 ml/g SS) je najbolj zavrl produkcijo plina iz škroba v 24 urah, medtem ko je imel QUE (408,1 ml/g SS) največji negativen učinek na produkcijo plina v 48 urah. Zaključimo lahko, da je dodatek taninskih izvlečkov zmanjšal tako obseg kot hitrost *in vitro* fermentacije celuloze in škroba.

7 VIRI

- Acamovic T., Stewart C.S. 1999. Plant phenolic compounds and gastrointestinal microorganisms. V: Tannins in Livestock and Human Nutrition: Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 maj – 2 jun. 1999: 3 str.
- Barry T.N., Manley T.R. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *British Journal of Nutrition*, 51: 493-504
- Barry T.N., McNeill D.M., McNabb W.C. 2001. Plant secondary compounds; their impact on forage nutritive value and upon animal production. V: Proceedings of the XIX International Grassland Congress, Sao Paulo, Brazil, 2001/02. Gomide J.A., Mattos W.R.S., da Silva S.C. (eds.): 445-452
- Butter N.L., Dawson J.M., BATTERY P.J. 1999. Effects of dietary tannins on ruminants. V: Secondary plant products: antinutritional and beneficial actions in animal feeding. Caygill J.C., Mueller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 51-72
- Chung K.T., Wei C., Johnson M.G. 1998a. Are tannins a double-edged sword in biology and health?. *Food Science and Technology*, 9: 168-175
- Chung K.T., Wong T.Y., Wei C., Huang Y., Lin Y. 1998b. Tannins and Human Health: A Review. *Food Science and Nutrition*, 38, 6: 421-464
- Farmatan-naraven izvleček pridobljen iz zdravega kostanjevega lesa. 2003. Tanin Sevnica. http://www.tanin.si/slo/04-01_farmatan.html (22. jun. 2005)
- Getachew G., Blümmel M., Makkar H.P.S., Becker K. 1998. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 72: 261-281

- Getachew G., Makkar H.P.S., Becker K. 2001. Method of polyethylene glycol application to tannin-containing browses to improve microbial fermentation and efficiency of microbial protein synthesis from tannin-containing browses. *Animal Feed Science and Technology*, 92: 51-57
- Hagerman A.E., Klucher K.M. 1986. Tannin-protein interactions. *Progress in Clinical and Biological Research*, 213: 67-76
- Hagerman A.E., Butler L.G. 1991. Tannins and Lignins. V: Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites. Rosenthal G.A., Berenbaum M.R. (eds.). California, Academic Press Inc.: 355-383
- Haslam E. 1989. Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. Cambridge, Cambridge University Press: 230 str.
- Hervás G., Frutos P., Javier Giráldez F., Mantecón A.R., Álvarez Del Pino M.C. 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 109: 65-78
- Kahn L.P., Diaz-Hernandez A. 2000. Tannins with anthelmintic properties. V: Tannins in Livestock and Human Nutrition: Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia. Brooker J.D. (ed.). ACIAR proceedings, No. 92: 130-138
- Kumar R., Singh M. 1984. Tannins: Their Adverse Role in Ruminant Nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 447-453
- Kumar R., Vaithyanathan S. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 30: 21-38

- Lavrenčič A. 2001. Razgradljivost beljakovin v predželodcih prežvekovalcev. V: 9. tradicionalno posvetovanje Uporaba kostanjevega tanina v prehrani živali, Podčetrtek, 22. mar. 2001. Sevnica, Tanin: 39-47
- Longland A.C., Theodorou M.K., Sanderson R., Lister S.J., Powell C.J., Morris P. 1995. Non-starch polysaccharide composition and *in vitro* fermentability of tropical forage legumes varying in phenolic content. *Animal Feed Science and Technology*, 55: 161-177
- Makkar H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaption to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49: 241-256
- Makkar H.P.S., Becker K. 1998. Adaptation of cattle to tannins: role of proline-rich proteins in oak-fed cattle. *Animal Science*, 67: 277-281
- Makkar H.P.S., Blümmel M., Becker K. 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *British Journal of Nutrition*, 73: 897-913
- Makkar H.P.S., Singh B., Dawra R.K. 1988. Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. *British Journal of Nutrition*, 60: 287-296
- Mangan J.L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Reviews*, 1: 209-231
- McSweeney C.S., Palmer B., McNeill D.M., Krause D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 83-93

- Menke K.H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 93: 217-222
- Menke K.H., Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28: 7-55
- Min B.R., Barry T.N., Attwood G.T., McNabb W.C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106: 3-19
- Molan A.L., Attwood G.T., Min B.R., McNabb W.C. 2001. The effect of condensed tannins from *Lotus pedunculatus* and *Lotus corniculatus* on the growth of proteolytic rumen bacteria *in vitro* and their possible mode of action. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 626-633
- Mole S., Waterman P.G. 1987. Tannic acid and proteolytic enzymes: enzyme inhibition or substrate deprivation? *Phytochemistry*, 26, 1: 99-102
- Mueller-Harvey I. 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 3-20
- O'Donovan L., Brooker J.D. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*, 147: 1025-1033
- Perez-Maldonado R.A., Norton B.W. 1996. The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. *British Journal of Nutrition*, 76: 515-533

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

ProductInformation. 2003. Sigma[®].

<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/t0125pis.pdf>
(21. jun. 2005)

Quebracho Extract. 2003. Roy Wilson Dickson.

<http://www.r-w-d.co.uk/Quebracho.html> (21. jun. 2005)

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

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

Salawu M.B., Acamovic T., Stewart C.S., Hovell F.D.DeB. 1997. Quebracho tannins with or without Browse Plus (a commercial preparation of polyethylene glycol) in sheep diets: effect on digestibility of nutrients *in vivo* and degradation of grass hay *in sacco* and *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 69: 67-78

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

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

Silanikove N., Perevolotsky A., Provenza F.D. 2001. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 69-81

Singh B., Bhat T.K., Sharma O.P. 2001. Biodegradation of tannic acid in an *in vitro* ruminal sistem. *Livestock Production Science*, 68: 259-262

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

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

SpecificationSheet. Sigma-Aldrich.

<http://www.sigmaaldrich.com/cgi-bin/hsrun/Suite7/Suite.hjx> (16. jun. 2005)

Technical Data Sheet. Merck

<http://chemdot.merck.de/documents/tds/en/1012/101252.pdf> (16. jun. 2005)

Vegetabil extracts. 2000. Otto Dille®.

<http://www.otto-dille.de/english/quebracho.html> (23. jun. 2005)

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

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila svojemu mentorju doc. dr. Andreju Lavrenčiču, ki mi je s svojimi nasveti, kritiko in vzpodbudo pomagal pri izdelavi diplomske naloge. Prav tako bi se mu rada iskreno zahvalila za vso pomoč pri izvajanju *in vitro* poskusa.

Recenzentu prof. dr. Janezu Salobirju se zahvaljujem za pregled in kritično presojo diplomskega dela.

Zahvaljujem se g. Ivanu Mirtu in sodelavcem iz podjetja Tanin Sevnica d.d. za kostonjeve taninske izvlečke.

Zahvalila bi se tudi Marku Kodri, ki je vsak ponedeljek poskrbel za strokoven odvzem vampnega soka in me kljub zgodnji uri vedno spravil v dobro voljo. Hvala tudi vsem ostalim laboratorijskim delavcem, ki so mi pomagali, da so laboratoriji postali bolj domači. Na tem mestu bi se zahvalila fistuliranima ovnomu, Boleku in Loleku, ki sta darovala vampni sok za moj *in vitro* poskus.

Največja zahvala gre mojim staršem, Danici in Milanu Sivka, ki sta mi omogočila ta študij in me s svojo neomajno ljubeznijo in spodbudo pripeljala do mojega cilja. »Hvala, ker sta verjela vame!« Hvala tudi moji sestri Nataliji in staršem Cilki, Tiliki in Ivanu, ki so me spodbujali in podpirali tekom študija. Omi Cilki bi rada rekla: »Hvala za tvojo štipendijo in oprostite, ker sem bila takšna sitnoba!«

Nazadnje bi se zahvalila Iztoku, ki me je s svojo ljubeznijo, smehom in ogromno potrpežljivostjo spremljal v teh študentskih letih. »Hvala, ker si prenašal vse moje muhe in mi dajal veliko več kot sem dajala jaz tebi!«

PRILOGE

Priloga A:

Opisna statistika po substratu in taninskih izvlečkih

CELULOZA															
	F75			FAK			KPS			QUE			TAK		
Lastnosti	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD
B (ml/g SS)	18	366,8	55,6	18	407,5	27,4	18	378,9	61,0	15	381,2	30,6	18	416,9	39,1
C	18	104,3	289,9	18	17,8	26,6	18	41,9	50,7	15	16,0	15,0	18	136,7	319,0
A	18	0,114	0,03	18	0,114	0,04	18	0,118	0,02	15	0,133	0,01	18	0,103	0,03
TMFR (h)	18	31,6	19,9	18	21,6	9,6	18	27,3	17,0	15	18,4	5,6	18	37,3	31,4
MFR (ml/h)	18	15,8	5,4	18	16,9	5,7	18	16,9	5,0	15	18,7	1,5	18	15,7	4,0
LAG (h)	18	20,5	15,9	18	10,1	5,8	18	18,5	15,2	15	10,9	5,7	18	26,7	27,9
GAS ₂₄ (ml/g SS)	33	227,9	132,4	33	263,7	108,9	33	254,4	117,9	30	281,7	88,5	33	246,0	118,3
GAS ₄₈ (ml/g SS)	33	360,1	111,6	33	390,9	62,7	33	369,7	112,5	30	399,2	39,4	33	346,4	138,6
ŠKROB															
	F75			FAK			KPS			QUE			TAK		
Lastnosti	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD	N	\bar{x}	SD
B (ml/g SS)	18	409,6	13,6	18	419,4	12,8	18	408,1	20,9	18	386,5	27,7	18	446,8	25,5
C	18	14,5	5,6	18	15,3	6,7	18	18,4	6,4	18	33,7	30,9	18	12,2	4,2
A	18	0,251	0,1	18	0,237	0,1	18	0,227	0,0	18	0,305	0,1	18	0,210	0,1
TMFR (h)	18	10,9	1,8	18	11,5	1,6	18	12,9	2,1	18	10,4	1,4	18	13,0	4,0
MFR (ml/h)	18	37,8	11,1	18	36,6	9,0	18	34,1	7,3	18	43,7	10,9	18	34,4	13,7
LAG (h)	18	6,5	0,8	18	7,0	0,7	18	8,4	1,5	18	7,0	1,4	18	7,3	1,4
GAS ₂₄ (ml/g SS)	30	382,0	32,0	30	380,4	30,7	30	373,3	31,7	30	371,8	33,4	30	370,7	66,3
GAS ₄₈ (ml/g SS)	30	417,7	25,8	30	424,5	23,1	30	417,2	28,2	30	408,1	35,1	30	435,6	24,5

* lastnosti – glej stran 22, N - število meritev, \bar{x} - povprečje, SD - standardni odklon

Priloga B:

Opisna statistika po substratu in koncentracijah (mg/ml medija) taninskih izvlečkov

	CELULOZA																	
	kontrola			0,17			0,33			0,67			1,33			2,67		
	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD
Lastnosti																		
B (ml/g SS)	15	431,9	0,3	15	377,4	12,7	15	369,8	19,0	15	409,0	26,0	15	391,7	25,9	12	356,7	104,1
C	15	5,5	0,2	15	8,9	1,7	15	10,5	3,2	15	15,3	14,2	15	116,6	71,7	12	275,0	485,9
A	15	0,132	0,001	15	0,124	0,01	15	0,116	0,01	15	0,125	0,01	15	0,130	0,02	12	0,056	0,02
TMFR (h)	15	12,9	0,1	15	17,5	1,2	15	19,9	1,5	15	19,6	6,8	15	36,4	9,1	12	66,8	23,8
MFR (ml/h)	15	21,0	0,2	15	17,2	1,2	15	15,8	2,2	15	18,8	1,6	15	18,7	2,4	12	6,8	2,3
LAG (h)	15	5,3	0,2	15	9,4	1,2	15	11,2	1,6	15	11,6	6,5	15	28,5	8,0	12	44,6	29,0
GAS ₂₄ (ml/g SS)	90	334,2	27,7	15	242,0	21,1	15	203,2	26,4	15	220,9	108,2	15	40,3	14,1	12	42,4	10,9
GAS ₄₈ (ml/g SS)	90	426,6	14,1	15	368,3	13,8	15	352,2	23,6	15	390,0	36,1	15	286,3	110,6	12	86,8	77,5
	ŠKROB																	
	kontrola			0,17			0,33			0,67			1,33			2,67		
Lastnosti	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD	N	\bar{X}	SD
B (ml/g SS)	15	432,5	2,3	15	402,0	8,5	15	408,0	12,5	15	421,0	35,3	15	411,2	31,3	15	409,7	45,2
C	15	14,4	0,6	15	34,2	29,2	15	20,5	20,6	15	18,0	4,8	15	15,0	4,2	15	10,8	4,9
A	15	0,291	0,003	15	0,279	0,07	15	0,210	0,08	15	0,285	0,06	15	0,245	0,04	15	0,161	0,04
TMFR (h)	15	9,2	0,1	15	11,8	0,6	15	13,3	1,6	15	10,4	2,2	15	11,2	2,3	15	14,6	2,9
MFR (ml/h)	15	46,3	0,7	15	41,2	10,3	15	31,4	11,4	15	44,0	9,8	15	36,8	5,7	15	24,2	5,0
LAG (h)	15	5,7	0,1	15	8,0	0,4	15	8,0	0,7	15	6,7	1,4	15	7,0	1,6	15	7,9	1,2
GAS ₂₄ (ml/g SS)	75	394,8	27,5	15	356,2	10,8	15	341,0	19,0	15	387,1	34,3	15	381,5	28,9	15	316,7	61,5
GAS ₄₈ (ml/g SS)	75	433,8	26,7	15	404,7	7,5	15	405,5	7,5	15	418,3	32,0	15	407,2	25,9	15	401,3	34,1

*lastnosti – glej stran 22, N - število meritev, \bar{X} - povprečje, SD - standardni odklon