

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Niko REDENŠEK

**VPLIV TANINOV IN ETERIČNIH OLJ NA *IN VITRO*
FERMENTABILNOST SUHE SNOVI IN
METANOGENEZO PRI PREŽVEKOVALCIH**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Niko REDENŠEK

**VPLIV TANINOV IN ETERIČNIH OLJ NA *IN VITRO*
FERMENTABILNOST SUHE SNOVI IN METANOGENEZO PRI
PREŽVEKOVALCIH**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**THE EFFECT OF TANNIN AND ESSENTIAL OILS ON *IN VITRO*
FERMENTABILITY OF THE DRY MATTER AND
METHANOGENESIS IN RUMINANTS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Znanost o živalih. Delo je bilo opravljeno na Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Andreja Lavrenčiča

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Silvester ŽGUR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Andrej LAVRENČIČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisani Niko Redenšek izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja, ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Niko Redenšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 636.2.084/087(043.2)=163.6
- KG prehrana živali/prežvekovalci/tanin/eterična olja/*in vitro* produkcija plina/metanogeneza/Gompertzova funkcija
- AV REDENŠEK, Niko, dip.inž. agronomije in hortikulture
- SA LAVRENČIČ, Andrej (mentor)
- KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- LI 2016
- IN VPLIV TANINOV IN ETERIČNIH OLJ NA *IN VITRO* FERMENTABILNOST SUHE SNOVI IN METANOGENEZO PRI PREŽVEKOVALCIH
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
- OP X, 39 str., 8 pregl., 2 sl., 35 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V poskusu smo preučevali vpliv taninov in eteričnih olj na *in vitro* fermentabilnost suhe snovi in metanogenezo pri prežvekovalcih. Uporabili smo razvojni produkt FD (FD) podjetja Tanin Sevnica d.d. in njegove sestavine, ki so izvleček kostanjevega lesa (farmatan; FAR), eugenol (EUG), lignocelulozo (LCE) in cinamaldehyd (CIN)). Vse dodatke smo testirali v treh koncentracijah, ki odgovarjajo količinam zaužitih s 50, 100 in 150 g FD na dan. *In vitro* produkcijo plina smo spremljali 72 ur. Z Gompertzovo funkcijo smo ocenili kazalnike fermentacije (skupna potencialna produkcija plina (B), specifična hitrost fermentacije (C) in faktor mikrobne učinkovitosti (A)), ter izračunali čase največje hitrosti fermentacije (TMFR), največje hitrosti fermentacije (MFR) in prostornine plina, nastale v 24. urah (GAS24). Po 24. urah inkubacije smo določili vsebnost posameznih hlapnih maščobnih kislin (HMK; očetna, maslena, propionska kislina), na osnovi katerih smo s pomočjo stehiometrijskih enačb izračunali tvorbo metana. Samo EUG je zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina. Ta se je zmanjšala s 309 (TMR) na 183 ml/g SS (EUG150). CIN je podaljšal TMFR s 5,32 (TMR) na 6,93 h (CIN150), medtem ko je na MFR in GAS24 najbolj vplival EUG, ki je MFR zmanjšal z 19,6 (TMR) na 13,2 ml/h (EUG150), GAS24 pa z 297 (TMR) na 178 ml/g SS (EUG150). Povečevanje koncentracije EUG, je zmanjšalo produkcijo očetne kisline z 1,57 (TMR) na 1,25 mmol/g SS (EUG150) in produkcijo propionske kisline z 0,64 (TMR) na 0,44 mmol/g SS (EUG150) ter posledično tudi produkcijo hlapnih maščobnih kislin z 2,55 (TMR) na 0,46 mmol/g SS (EUG150). Nasprotno pa se je s povečevanjem koncentracije CIN povečala produkcija očetne kisline z 1,57 (TMR) na 2,06 mmol/g SS (CIN150), maslene kisline z 0,19 (CIN50) na 0,33 mmol/g SS (CIN150) in metana z 0,75 (TMR) na 0,97 mmol/g SS (CIN150).

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du2
- DC UDC 636.2.084/087(043.2)=163.6
- CX animal nutrition/ruminants/tannin/essential oils/*in vitro* gas production/methanogenesis/Gompertz model
- AU REDENŠEK, Niko
- AA LAVRENČIČ, Andrej (supervisor)
- PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
- PY 2016
- TY THE EFFECT OF TANNIN AND ESSENTIAL OILS ON *IN VITRO* FERMENTABILITY OF THE DRY MATTER AND METHANOGENESIS IN RUMINANTS
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
- NO X, 39 p., 8 tab., 2 fig., 35 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB We studied the effect of tannin and essential oils on *in vitro* dry matter fermentability and methanogenesis in ruminants. We used development product FD (FD) of the firm Tanin Sevnica d.d., and its components, i.e. as water extract from chestnut wood (farmatan, FAR), eugenol (EUG), lignocellulose (LCE) and cinnamaldehyde(CIN). All components were tested in concentrations corresponding to the intake of 50, 100 and 150 g of FD per cow daily. *In vitro* production of gas was monitored for 72 hours. Gompertz model was used to estimate kinetic parameters of fermentation (total gas production (B), specific rate of fermentation (C) and factor of microbial efficiency(A)), which were used to calculate the time of fermentation rate (TMFR), maximum rate of fermentation (MFR) and volume of gas produced in 24 hours (GAS24). After 24 hrs of incubation, concentrations of short chain fatty acids (SCFA; acetic, butyric and propionic acid) were determined and stoichiometric equation was used to calculate methane production. Only EUG decreased the parameter B from 309 (TMR) to 183 ml/g DM (EUG150). CIN prolonged the TMFR from 5,32 (TMR) to 6,93 h (CIN150), while EUG decreased MFR from 19,6 (TMR) to 13,2 ml/h (EUG150) and GAS24 from 297 (TMR) to 178 ml/g SS (EUG150). Increasing the concentration of EUG decreased the productions of acetic acid from 1,57 (TMR) to 1,25 mmol/g DM (EUG150)) and propionic acid from 0,64 (TMR) to 0,44 mmol/g DM (EUG150) and consequently also the production of SCFA from 2,55 (TMR) to 0,46 mmol/g DM (EUG150). On the contrary, increasing concentrations of CIN increased the production of acetic acid from 1,57 (TMR) to 2,06 mmol/g DM (CIN150)), butyric acid from 0,19 (CIN50) to 0,33 mmol/g DM (CIN150)) and methane from 0,75 (TMR) to 0,97 mmol/g DM (CIN150)).

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	VII
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
SEZNAM GESEL	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 <i>IN VITRO</i> FERMENTACIJA	3
2.2 VPLIV ETERIČNIH OLJ NA FERMENTACIJO V PREDŽELODCIH	3
2.2.1 Eugenol	4
2.2.2 Cinamaldehyd	4
2.2.3 Delovanje mešanice cinamaldehyda in eugenola	5
2.3 TANINI	6
2.3.1 Hidrolizirajoči tanini.....	7
3 MATERIALI IN METODE	10
3.1 ZASNOVA POSKUSA	10
3.2 SUBSTRAT	10
3.3 RAZVOJNI PRODUKT FD IN NJEGOVE KOMPONENTE	11
3.4 <i>IN VITRO</i> FERMENTACIJA	11
3.5 DOLOČANJE HLAJNIH MAŠČOBNIH KISLIN	13

3.5.1	Analitska oprema in pogoji analize	15
3.6	IZRAČUN IN OBDELAVA PODATKOV.....	16
3.6.1	Kazalniki fermentacije.....	16
3.6.2	Izračun vsebnosti metana	18
3.7.1	Model.....	19
4	REZULTATI.....	20
4.1	OCENJENI KAZALNIKI PRODUKCIJE PLINA.....	20
4.2	IZRAČUNANI KAZALNIKI FERMENTACIJE.....	22
4.3	PRODUKCIJA HLAJNIH MAŠČOBNIH KISLIN (HMK).....	24
5	RAZPRAVA IN SLEPI	27
5.1	RAZPRAVA.....	27
5.2	SKLEPI	31
6	POVZETEK	32
7	VIRI	35

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Količine posameznih dodatkov ob različnih koncentracijah (50, 100 in 150 g razvojnega produkta FD/kravo TM 650 kg na dan) dodanih substratu v 30 ml medija (pufer in vampov sok) in poimenovanje substratov.....	10
Preglednica 2: Sestava raztopin A, B, C	12
Preglednica 3: Raztopine potrebne za pripravo pufra in redukcijske raztopine.....	13
Preglednica 4: Sestava standardne raztopine hlapnih maščobnih kislin (HMK)	14
Preglednica 5: Kromatografski pogoji in pretok plina za določanje hlapnih maščobnih kislin (HMK).....	16
Preglednica 6: Ocenjeni kazalniki fermentacije.....	20
Preglednica 7: Izračunani kazalniki fermentacije	22
Preglednica 8: Produkcija hlapnih maščobnih kislin (HMK) in metana po 24 urah inkubacije substratov	24

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shematski prikaz kazalnikov fermentacije MFR (hitrost fermentacije) in TMFR (čas ko je dosežena največja hitrost fermentacije) po Gompertzovem modelu	17
Slika 2: Shematski prikaz kazalnikov fermentacije GAS24 (prostornina plina nastala v 24 urah) in B (največja skupna produkcija plina) po Gompertzovem modelu	18

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

FD	razvojni produkt FD
FAR	izvleček kostanjevega lesa (farmatan)
EUG	eugenol
LCE	lignoceluloza
CIN	cinamaldehyd
B	skupna potencialna produkcija plina
C	specifična hitrost fermentacije
A	faktor mikrobne učinkovitosti
TMFR	čas največje hitrosti fermentacije
MFR	največja hitrost fermentacije
GAS24	prostornine plina, nastale v 24. urah
HMK	hlapne maščobne kisline
Ac	ocetna kislina
nBu	maslena kislina
Pr	propionska kislina
CO ₂	ogljikov dioksid
CH ₄	metan
SS	suha snov

SEZNAM GESEL

IN VITRO FERMENTABILNOST: *In vitro* metoda s katero določamo količino nastalega plina ob fermentaciji krme v puferiranem vampovem soku prežvekovalcev.

METANOGENEZA: Je proces formiranja metana iz razgradnje organskega ogljika, kot posledica aktivnosti metanogenih bakterij.

HLAPNE MAŠČOBNE KISLINE: Maščobne kisline, ki so produkt anaerobne fermentacije (vampovih) mikroorganizmov. Najpogostejše so ocetna, propionska in maslena kislina.

TANINI: So rastlinske polifenolne spojine grenkega okusa, ki vežejo in obarjajo ali zvišajo proteine.

1 UVOD

V Sloveniji in svetu je živinoreja pomembna panoga v kmetijstvu. Kot druge panoge v gospodarstvu se tudi kmetijstvo dandanes srečuje z mnogimi novimi spremembami in izzivi. Napredki v tehnologiji omogočajo razvoj sodobnega kmetijstva, napredki v selekciji visoko produktivnih živali zahtevajo kakovostnejšo, boljše krmo, da lahko izkoristimo hranljive snovi, ne nazadnje pa so tu še potrošniki, ki so vsak dan bolj in bolj zahtevni pri kakovosti in ceni na enoto proizvoda. Pridelava in prireja živalske hrane zaradi pritiska potrošnika stremi k karseda naravnemu in zdravemu proizvodu, zato industrija zmanjšuje uporabo antibiotikov, zdravil in podobnih pripravkov za varovanje zdravja živali, kar pa je pri tako visoko selekcioniranih živalih, stresu in pogojih, ki jih danes doživljajo živali skoraj nemogoče. Zato se rejci poslužujejo dodatkov za prehrano domačih živali, ki lahko v največji meri nadomestijo uporabo zdravil oziroma antibiotikov.

V Evropski uniji so že leta 2006 ukinili in prepovedali uporabo nutritivnih antibiotikov. Najbližja alternativa so sekundarni presnovki rastlin kot so eterična olja in tanini, ki so jih ljudje že davno proizvajali in uporabljali, večinoma za zdravljenje domačih živali. Prav prepoved uporabe nutritivnih antibiotikov je znova vzbudila raziskave na tem področju, ki so pokazale, da lahko s sekundarnimi presnovki rastlin vplivamo na pomembne dejavnike kot sta prireja in onesnaževanje okolja, za katerega vemo, da je ena ključnih težav sodobnega sveta (Calsamiglia in sod., 2006).

Tako taninom pripisujejo antimikrobiološke, antioksidativne in antihelmintične vplive. Z vezavo taninov na beljakovine, ogljikove hidrate, rudninske snovi, vitamine in mikroorganizme lahko pri prežvekovalcih izboljšamo prirejo mesa, mleka in volne, obenem pa to pomeni zmanjšano produkcijo metana, manj izgub sečnine s sečem, kar vodi do manjšega onesnaževanja okolja. Skupaj z nekaterimi eteričnimi olji tanini vplivajo tudi na tvorbo hlapnih maščobnih kislin (HMK), kot so očetna, propionska in maslena kislina, preko katerih lahko vplivamo na vsebnost beljakovin, maščob in laktoze v mleku, ki pri molznicah predstavljajo kriterij za kakovost in ceno končnega produkta (Komprij in sod., 2003).

Namen našega dela je bil ugotoviti, kako razvojni produkt FD (FD) in nekatere njegove najpomembnejše sestavine (vodni izvleček iz kostanjevega lesa – farmatan (FAR), eugenol (EUG), lignoceluloza (LCE) in cinamaldehyd (CIN)) vplivajo na sam potek *in vitro* fermentacije v vampovem soku, na spreminjanje sestave hlapnih maščobnih kislin in produkcijo metana ob količinah, ki bi jih krave molznice zaužile s 50, 100 in 150 g razvojnega produkta FD na dan.

2 PREGLED OBJAV

2.1 *IN VITRO* FERMENTACIJA

Pri fermentaciji v prebavnem traktu domačih živali nas najpogosteje zanima aktivnost celotne mikrobne združbe. To lahko ugotovimo z metodami, s katerimi merimo hitrost produkcije mikrobnih beljakovin in/ali količine končnih produktov fermentacije, kot so hlapne maščobne kisline (HMK). Aktivnost celotne mikrobne populacije lahko ugotavljamo tudi z meritvami proizvedenega plina. To metodo izvajamo v anaerobnih razmerah in jo uporabljamo v raziskavah aktivnosti mikrobiote v predželodcih prežvekovalcev, prebavnem traktu in iztrebkih prašičev, ter slepemu črevesju kuncev (Lavrenčič, 2001).

2.2 VPLIV ETERIČNIH OLJ NA FERMENTACIJO V PREDŽELODCIH

Eterična olja pri prežvekovalcih predstavljajo možno alternativo nutritivnim antibiotikom. Dokazano je, da nekateri ekstrakti rastlin zvišujejo dnevne priraste živali podobno kot antibiotiki (Kamel, 2001), vendar so raziskave na tem področju trenutno še vedno zelo redke.

Prvo raziskavo o vplivu eteričnih olj na fermentacijo v predželodcih je predstavil Borchers (1965). V začetku 1970-ih let pa je uporaba promotorjev rasti ustavila raziskave o krmljenju in vplivih eteričnih olj na rast prežvekovalcev zato je bilo v naslednjih 30 letih izvedenih zelo malo raziskav na tem področju (Broderick in Balthrop, 1979). Leta 2006 je Evropska Unija ukinila in prepovedala uporabo nutritivnih antibiotikov (Regulation ..., 2003) in s tem ponovno povečala zanimanje za študije o vplivih eteričnih olj na fermentacijo v vampu (Calsamiglia in sod., 2006).

2.2.1 Eugenol

Eugenol je eterično olje pridobljeno iz klinčkov oziroma nagelnovih žbic (*Syzygium aromaticum*), v katerih predstavlja 85 % eteričnih olj prav eugenol. Klinčki so močno dišeči in pekoči posušeni cvetni popki dišečega klinčevca, samo drevo pa izhaja iz Moluških otokov. Eugenol najdemo še v cimetovem olju (*Cinnamomum cassia*) (Davidson in Naidu, 2000).

Eugenol ima širok spekter antimikrobnega delovanja proti Gram-pozitivnim in Gram-negativnim bakterijam. Pokazano je, da eugenol vpliva na fermentacijo v predželodcih tako, da zmanjšuje tvorbo očetne kisline, razvejanih hlapnih maščobnih kislin in amoniakalnega dušika, zvišuje pa tvorbo propionske kisline, maslene kisline in amonijevih ionov, zato raziskovalci menijo, da znižuje presnovo amonijevih ionov v predželodcih (Busquet in sodelavci, 2005, 2006). Dodatek eugenola nakazuje, da se izkoristka energije in beljakovin v predželodcih izboljšujeta. Prav tako vpliva na tvorbo HMK in izrabo amoniaka v vampu pri molznicah (kravah v laktaciji), zato ga priporočamo predvsem kot dodatek za mlečne pasme govedi.

2.2.2 Cinamaldehyd

Cinamaldehyd je glavna aktivna komponenta cimetovega olja, ki ga pridobivajo iz kitajskega cimetovega drevesa (*Cinnamomum cassia*). V cimetovem olju je 75 % cinamaldehyda. Cardozo in sodelavci (2004) so bili prvi, ki so dokazali, da cimetovo olje vpliva na mikroorganizme in njihovo izkoriščanje amoniaka v predželodcih, zavira nastajanje peptidov, vplivi na koncentracijo HMK pa so bili zanemarljivi.

Kasneje so Busquet in sod. (2006) ugotovili, da cinamaldehyd povečuje vsebnost propionske kisline, ne da bi vplival na vsebnosti očetne in maslene kisline. V primerjavi z cimetovim oljem, ki vsebuje ob 75 % cinamaldehyda še 8 % eugenola, sam cinamaldehyd povečuje vsebnost očetne kisline, pri tem pa ne vpliva na vsebnost maslene in propionske kisline. Omenjena raziskava je pripomogla k ugotovitvam, da imajo tudi druge sestavine cimetovega olja vpliv na fermentacijo v predželodcih. Tudi Busquet in sodelavci (2005) so

pri svojem poskusu opazili, da se pri nizkih koncentracijah cinamaldehida vsebnosti očetne in maslene kisline niso spremenile. Pri visokih koncentracijah pa je dodatek cinamaldehida povečal vsebnost propionske kisline in zmanjšal vsebnost maslene kisline.

Raziskave Busquet in sodelavci (2005 in 2006) in Cardozo in sodelavci (2004) niso potrdile, da cinamaldehyd zavira metanogenezo. Antimikrobno delovanje cinamaldehyda je najverjetneje povezano z neaktivnostjo njegove karbonilne skupine, čeprav natančnejši mehanizem delovanja ni poznan (Helander in sod.,1998). Helander in sodelavci (1998) so opazili, da v nasprotju z ostalimi sekundarnimi presnovki cinamaldehyd ni vplival na stabilnost membrane mikroorganizmov in so nakazali, da je mehanizem delovanja povezan z interakcijo beljakovin v periplazmi (Nikaido, 1994). Cardozo in sodelavci (2005) so opazili, da na samo delovanje cinamaldehyda vpliva pH v vampu in pa različni obroki. Ugotovili so, da nižji kot je pH v predželodcih, bolj pozitivno deluje cinamaldehyd na vampove mikroorganizme. Enako so ugotovili tudi Juven in sodelavci (1994), ki navajajo, da se je učinek cinamaldehyda povečal, ko se je pH v predželodcih zmanjšal.

2.2.3 Delovanje mešanice cinamaldehyda in eugenola

Cardozo in sodelavci (2006) so testirali kombinacijo eugenola in cinamaldehyda pri govejih pitancih. Opazili so zmanjšano zauživanje krme in vode, kar je verjetno povezano z neokusnostjo krme. Zato so priporočali inkapsulacijo teh dveh dodatkov. Mešanica obeh eteričnih olj ni vplivala na skupno in posamezno vsebnost HMK razen na koncentracijo razvejanih HMK, ki je bila nekoliko nižja. To znižanje vsebnosti razvejanih HMK je lahko pokazatelj količine mikroorganizmov v vampu in skupaj z znižanjem koncentracije amoniaka nakazuje na zaviranje delovanja mikroorganizmov v predželodcih.

Busquet in sodelavci (2003) so enak poskus zastavili pri kravah molznicah, a so bili rezultati podobni rezultatom, ki so jih opisali Cardozo in sodelavci (2006).

V naslednjem poskusu so Cardozo in sodelavci (2006) ponovili poskus, pri čemer pa so koncentracijo eugenola in cinamaldehyda povečali za trikrat in sicer na 600 mg cinamaldehyda/kravo na dan in 300 mg eugenola/kravo na dan, ter jih živalim ponudili v

inkapsulirani obliki. Konzumacija krme in vode se nista spremenili, kar kaže na to, da je bila inkapsulacija uspešna rešitev pri težavah zaradi neokusnosti obroka. Vplivi višjih koncentracij so bili očitnejši. Skupna koncentracija HMK se ni spremenila, znižala se je koncentracija očetne kisline, koncentracija propionske kisline pa se je zvišala. Uporaba cinamaldehida in eugenola skupaj v obroku je povzročila kopičenje majhnih peptidov in aminokislin, ter znižanje koncentracije razvejanih HMK in amoniaka, kar je nakazovalo na manjši obseg deaminacije. Ti rezultati so spodbudni za razvoj dodatkov na osnovi eteričnih olj za govedo, saj dokazujejo, da imata eugenol in cinamaldehyd nasprotno učinke (Cardozo in sod., 2006).

2.3 TANINI

Tanini so rastlinski polimeri, sestavljeni iz fenolnih enot. Hidroksilne skupine fenolnih obročev so v večini primerov proste. Zaradi velikega števila monomernih enot imajo lahko tanini relativno molekularno maso od 500 do 20.000 in več. So topni v vodi in se od ostalih polifenolov razlikujejo po sposobnosti, da lahko oborijo beljakovine iz raztopin. Njihova topnost je odvisna od molske mase (Scalbert, 1991).

Tanini so naravne polifenolne snovi, ki jih najdemo pri različnih drevesnih vrstah, sadnemu drevju, rožnicah in travah, kjer so v njihovih plodovih, semenih in lubju. Glavna vloga taninov je zaščita rastlin pred bakterijami, glivami, plesnimi in mnogimi rastlinojedimi organizmi. Tanini zaščitijo rastline pred zauživanjem živali predvsem z neokusnostjo, saj delujejo astringentno, kar se odraža v grenkem in trpkem okusu. Taninom pripisujejo široko področje delovanja, saj imajo antimikrobiološko, antioksidativno in antihelmintično delovanje. Za prežvekovalce so tanini pomembni, ker z beljakovinami tvorijo stabilne taninsko-beljakovinske komplekse v predželodcih in tako preprečujejo prekomerno mikrobo razgradnjo beljakovin. Ti kompleksi so prepuščeni encimski razgradnji in absorpciji v tankem črevesju. Reagirajo tudi z drugimi hranljivimi snovmi v prebavnem traktu in encimi, vendar v manjši meri kot z beljakovinami. Nastanek taninsko beljakovinskih kompleksov vodi tudi do zmanjšane produkcije metana, ter manjše izgube sečnine s sečem in posledično do manjšega onesnaževanja okolja. Zaradi povezovanja taninov z beljakovinami, ogljikovimi hidrati, rudninskimi snovmi, vitamini in

mikroorganizmi lahko pri prežvekovalcih izboljšamo prirejo mesa, mleka in volne. S tanini tako vplivamo na samo vsebnost beljakovin, maščob in laktoze v mleku, saj tanini vplivajo tudi na produkcijo hlapnih maščobnih kislin, kot so očetna, propionska in maslena kislina (Komprij in sod., 2003).

Tanine v osnovi razdelimo na hidrolizirajoče, kondenzirane in kompleksne tanine (flavanoelagitanini), ki združujejo lastnosti obeh skupin. Med seboj se razlikujejo v kemični strukturi, reaktivnosti s hidrolitičnimi reagenti, pa tudi v prehranskih in toksičnih učinkih (Komprij in sod., 2003).

Dosedanje raziskave so pokazale, da imajo hidrolizirajoči tanini večji učinek na zmanjšanje produkcije metana, obenem pa tudi manj neželenih učinkov na reprodukcijo kot kondenzirajoči tanini (Beauchemin in sod., 2008). Zato v nadaljevanju opisujemo samo hidrolizirajoče tanine.

2.3.1 Hidrolizirajoči tanini

Hidrolizirajoči tanini imajo ogljikohidratno jedro, ki je običajno glukoza, katere hidroksilne skupine so zaestrene z fenolnimi karboksilnimi kislinami, kot so galna kislina, elagna kislina in heksahidroksidifenska kislina. Estri z galno in elagno kislino so galotanini. Estri z heksahidroksidifensko kislino pa se imenujejo elagitanini (Bennick, 2002). Najbolj poznan galotanin je taninska kislina, ki vsebuje 8 do 10 molov galne kisline na mol glukoze (Jansman, 1993).

Hidrolizirajoče tanine najdemo v semenih, strokih, šiškah rastlin iz družin octovk (*Anacardiaceae*), metuljnic (*Leguminosae*), bukovk (*Fagaceae*), kombretovk (*Combretaceae*) in mirtovk (*Myrtaceae*), ter v lesu, listih, sadju in v mladikah grmovnic (Mueller-Harvey, 2001).

Dosedanje raziskave so pokazale, da imajo hidrolizirajoči tanini večjo sposobnost obarjanja beljakovin kot kondenzirajoči tanini. Sposobnost obarjanja beljakovin je posledica njihove afinitete, da vežejo beljakovine na celično membrano mikroorganizmov

ali encimov. Tako vezane beljakovine niso več prepuščene mikrobnim razgradnjam v predželodcih, ampak encimski prebavi v tankem črevesju pri prežvekovalcih (McSweeney in sod., 2001).

Večja kot je sposobnost precipitacije beljakovin v predželodcih, večja je zmožnost zmanjševanja emisij metana, ki je stranski produkt fermentacije ogljikovih hidratov. Vse vrste taninov znižujejo koncentracije metana. Kondenzirajoči tanini znižujejo hitrost metanogeneze nekoliko bolj kot hidrolizirajoči, na samo koncentracijo metana pa imajo večji vpliv hidrolizirajoči tanini, kar pripisujejo večji zmožnosti obarjanja beljakovin pri hidrolizirajočih taninih (McSweeney in sod., 2001).

Vsi tanini znižujejo tudi številčnost populacij metanogenih arhej v predželodcih. Pri 10 mg taninov/ml vampovega soka se je število metanogenih bakterij znižalo z 59 % na 37 %. Poskus je pokazal, da na biološko aktivnost taninov pri metanogenezi bolj vpliva vrsta taninov kot pa njihova koncentracija (Jayanegara in sod., 2009).

Po Fieldu in Lettingi (1987) so hidrolizirajoči tanini lahko razgradljivi in lahko izgubijo sposobnost delovanja z nekaterimi spojinami, medtem ko se kondenzirajoči tanini v predželodcih ne razgradijo in se lahko močneje vežejo na hranljive snovi. Pri prežvekovalcih, ki zauživajo velike količine hidrolizirajočih taninov, so opazili znake zastrupitve in zato znižanje prirasta (McSweeney in sod., 2001). Čeprav hidrolizirajoče tanine nekatere vrste vampovih mikroorganizmov lahko razgradijo, je toksičnost posledica razgradnih produktov hidrolizirajočih taninov in večje vsebnosti fenolov v krvnem obtoku, kar vpliva na delovanje jeter (Makkar in sod., 2007).

Možnost, da se izognemo zastrupitvam, a hkrati ohranimo pozitivne vplive hidrolizirajočih taninov pri prežvekovalcih je, da živalim ponudimo nizke ali zmerne doze hidrolizirajočih taninov (≤ 20 g/kg SS) (Kruger in sod., 2010; Toreal in sod., 2011).

Po Jayanegara in sodelavci (2009) hidrolizirajoči tanini znižujejo skupno produkcijo plina, prav tako znižujejo tudi *in vitro* fermentabilnost organskih snovi. Ob povečevanju koncentracij zmanjšujejo količino HMK. Znižujejo tudi delež očetne in maslene kisline,

delež propionske kisline pa se ob dodatku hidrolizirajočih taninov poveča. Posledično se razmerje med očetno in propionsko kislino zmanjša. Avtor navaja tudi, da so hidrolizirajoči tanini najbolj znižali emisije metana. Jayanegara in sodelavci (2009) so v poskusu uporabili tri koncentracije kostanjevih taninov (0,5, 0,75 in 1,0 mg/ml).

V poskusu, ki so ga izvedli Bhatta in sodelavci (2009) avtorji navajajo, da hidrolizirajoči kostanjevi tanini znižujejo skupno produkcijo HMK, povečujejo količine očetne, propionske in maslene kisline. Tudi razmerje med očetno in propionsko kislino se je s povečevanjem koncentracije taninov povečalo. Produkcija plina v 24 urah se je s povečevanjem koncentracij zmanjševala, prav tako tudi produkcija metana.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 ZASNOVA POSKUSA

Poskus smo zasnovali tako, da smo uporabili takšne koncentracije farmatana (FAR), eugenola (EUG), cinamaldehida (CIN) in lignoceluloze (LCE), kot bi jih živali dobile, če bi z obrokom zaužile 50, 100 ali 150 g razvojnega produkta FD (FD) na dan (preglednica 1). Pri preračunu potrebnih koncentracij smo upoštevali, da pri povprečni telesni masi krave (650 kg), prostornina prebavil predstavlja 65 % telesne mase, kar pomeni 423 litrov. Ker predželodci predstavljajo 65 % prostornine prebavil je to 275 litrov. Trda in tekoča oblika predstavljata 2/3 prostornine volumna predželodcev, to je 180 litrov (Kirchgessner, 1997)

Preglednica 1: Količine posameznih dodatkov ob različnih koncentracijah (50, 100 in 150 g razvojnega produkta FD/ kravo TM 650 kg na dan) dodanih v 30 ml medija (pufer in vampov sok) in poimenovanje substratov

Dodatek/Koncentracija	50	oznaka	100	oznaka	150	oznaka
Razvojni produkt FD	8,3 mg	FD50	16,6 mg	FD100	25 mg	FD150
Lignoceluloza	2,5 mg	LCE50	5,0 mg	LCE100	7,5 mg	LCE150
Farmatan	2,8 mg	FAR50	5,5 mg	FAR100	8,3 mg	FAR150
Eugenol	7,1 µl	EUG50	13,7 µl	EUG100	19,9 µl	EUG150
Cinamaldehyd	4,3 µl	CIN50	8,2 µl	CIN100	11,8 µl	CIN150

3.2 SUBSTRAT

V poskusu smo za osnovni substrat (kontrola) uporabili popolni krmni obrok (TMR) za krave molznice. Obrok je pokrival potrebe za vzdrževanje in prirajo 30 kg mleka na dan. TMR je bil izračunan v skladu s priporočili DLG (DLG, 1997) in je bil sestavljen (na kg suhe snovi obroka) iz 495 g koruzne silaže, 123 g travne silaže, 63 g pšenične slame, 19 g sena, 83 g pšeničnega zrnja, 83 g koruznega zrnja, 87 g sončničnih tropin, 34 g sojinih tropin, in 13 g mineralno-vitaminske mešanice (apnenec, sol, vitamini in mikro-minerali). TMR je vseboval v (g/kg SS) 158 g surovih beljakovin, 40 g surovih maščob, 385 g v nevtralnem detergentu netopne vlaknine in 52 g surovega pepela.

3.3 RAZVOJNI PRODUKT FD IN NJEGOVE KOMPONENTE

V poskusu smo testirali razvojni produkt FD (FD) proizvajalca Tanin Sevnica d.d. Njegove sestavine so lignoceluloza (LCE), Na-acetat anhidrid, vodni izvleček kostanjevega lesa – farmatan (FAR), biopleks Zn, eugenol (EUG) in cinamaldehyd (CIN). V poskusu smo preučevali vpliv FD, LCE, FAR, EUG in CIN na fermentacijo v predželodcih. Ostale komponente smo iz poskusa izločili, ker smo bili mnenja, da na aktivnost vampovih mikroorganizmov ne vplivajo ali pa so v FD v tako majhnih koncentracijah, da jih brez večjih napak pri odmerjanju ne bi mogli vključiti v substrat (TMR) za ugotavljanje *in vitro* fermentabilnosti.

LCE sestavljata celuloza in lignin. V Tanin d.d. jo pridobivajo iz lesa hrasta vrste dob (*Quercus robur*). LCE je sušena in sterilizirana na temperaturi okoli 200 °C.

FAR je naravni izvleček (ekstrakt) iz izbranega lesa pravega kostanja (*Castanea sativa Mill*) iz družine Fagaceae. Pridobljen je z okolju prijaznim postopkom – vodno ekstrakcijo. Osnovna sestavina FAR so vodotopni rastlinski polifenoli, ki imajo široko območje delovanja. Poleg polifenolov vsebuje še enostavne sladkorje, lignin in celulozo ter mineralne snovi (Tanin..., 2016).

EUG je eterično olje, ki ga v podjetju Tanin d.d. kupijo od proizvajalcev, ki EUG pridobivajo z destilacijo plodov (klinčkov) dišečega klinčevca (*Syzygium aromaticum*) v skladu z EU direktivo in GMP standardi.

CIN je eterično olje, ki ga v podjetju Tanin d.d. kupijo od proizvajalcev, ki CIN pridobivajo z destilacijo skorje kitajskega cimetovega drevesa (*Cinnamomum cassia*) v skladu z EU direktivo in GMP standardi.

3.4 *IN VITRO* FERMENTACIJA

Pred pričetkom *in vitro* fermentacije smo pripravili in osušili 77 steklenih brizgalk in jih ustrezno označili. Za vsak substrat smo pripravili 4 brizgalke in sicer dve za določanje HMK in dve za meritve prostornine nastalega plina. V brizgalke smo zatehtali vzorce, jih zaprli z batom, ki je bil naoljen s parafinskim oljem, s katerim smo zagotovili neprodušnost

brizgalk in jih zaprli s plastičnim zamaškom. Istočasno smo inkubirali tudi slepe vzorce, standardno krmilo in substrate (glej poglavje 3.1).

Brizgalke s substrati smo pred inkubacijo ogreli v vodni kopeli na $39\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Predhodno pripravljene pufer smo prepihovali z ogljikovim dioksidom pod tlakom 1,8 do 2,0 bara ter ga mešali z magnetnim mešalom. Pufer smo sestavili z mešanjem destilirane vode in raztopin A, B in C ter raztopine resazurin (indikator prisotnosti kisika) (Preglednica 2). Pred odvzemom vampovega soka smo pripravili tudi redukcijsko raztopino in jo dodali mešanici s CO_2 dobro prepihanega pufra in resazurina. Ob dodajanju redukcijske raztopine (Preglednica 3) se je modra raztopina najprej obarvala rdeče, potem pa se je razbarvala (Kos, 2007).

Preglednica 2: Sestava raztopin A, B, C

Raztopina A	Raztopina B	Raztopina C
13,2 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	35,0 g NaHCO_3	5,7 g Na_2HPO_4
10,0 g $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	4,0 g $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$	6,2 g KH_2PO_4
1,0 g $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	destilirana voda do 1000 ml	0,6 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
0,8 g $\text{FeCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$		destilirana voda do 1000 ml
destilirana voda do 100 ml		

Vampov sok smo odvzeli iz dveh fistuliranih ovnov jezersko-solčavske pasme. Ovna sta bila krmljena s senom po volji, močnim krmilom, ter mineralno-vitaminskim dodatkom v obliki lizalnega kamna. Vampov sok smo odvzeli tako, da smo skozi fistulo v vamp vstavili plastični kateter z luknjicami, skozi katere se je v katetru nabral vampni sok. Vampni sok smo prečrpali v večjo plastično brizgalko in ga prenesli v termo steklenico, predhodno ogreto na $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ in prepihano z ogljikovim dioksidom, da bi zagotovili anaerobne razmere za vampove mikroorganizme.

Vampov sok smo prefiltrirali skozi 4 plasti gaze v merilni valj, ki je bil ogret na $39\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ in prepihan s CO_2 . Vampov sok smo nato dodali v popolnoma razbarvano pufersko raztopino. Količino puferske raztopine in vampovega soka smo predhodno izračunali glede na število brizgalk. Mešanico vampovega soka in pufrov v razmerju (1:2) smo pred

polnjenjem v brizgalke mešali in prepihovali z ogljikovim dioksidom še 15 minut pod tlakom 1,0 bara.

Preglednica 3: Raztopine potrebne za pripravo pufru in redukcijske raztopine

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

Brizgalke napolnjene z različnimi substrati glede na njihovo koncentracijo v razvojnem produktu FD (FAR, EUG, CIN in LCE) smo napolnili z avtomatsko pipeto. Vsako brizgalko smo napolnili s 30 ml puferiranega vampovega soka, iz njih takoj po polnjenju iztisnili zrak, jih zamašili s plastičnim pokrovčkom in jih postavili v stojalo v vodni kopeli ogreti na 39 °C ± 0,5 °C. V poskus smo poleg vzorcev vključili tudi tri slepe vzorce (brizgalka z puferiranim vampovim sokom brez substrata) in tri standardne vzorce (brizgalka s standardom: seno mnogocvetne ljuke, košene v cvetenju).

Takoj po polnjenju smo odčitali prostornino vzorca v brizgalki, nato pa smo prostornino proizvedenega plina merili še po 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 in 72 urah fermentacije. Po 24 urah fermentacije smo po dve brizgalki iz vsake skupine odvzeli iz kopeli, jih ohladili in vsebino prelili v epruvete, ki smo jih predhodno označili in vsebino takoj zamrznili. V raztopini smo določili vsebnosti HMK, iz ostalih brizgalk, ki so v tem času presegle prostornino 80 ml plina smo izpustili plin, ponovno očitali prostornino in jih postavili nazaj v kopel, ter nadaljevali z inkubacijo.

Poskus smo zaradi omejenega števila mest za brizgalke v stojalu opravljali v dveh ponovitvah. Obe seriji sta bili enako zastavljeni in izpeljani le, da smo v prvi seriji testirali vplive FD, LCE in FAR, v drugi seriji pa smo testirali vplive CIN, EUG in TMR (kontrola).

3.5 DOLOČANJE Hlapnih Maščobnih Kislin

Za analizo HMK smo uporabili modificirano metodo etrske ekstrakcije po Holdeman in sodelavci ((1977); cit. po Kos, 2007))

Pred vsakim pričetkom dela smo pripravili tri serije označenih epruvet in zamaškov z navojem, ker morajo biti epruvete med delom dobro zaprte. Vse vzorce smo pripravili v paralelkah, vzporedno smo pripravili tudi standardni vzorec, ki je služil kot kontrola.

Preglednica 4: Sestava standardne raztopine hlapnih maščobnih kislin (HMK)

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

Za delovni standard smo standardno raztopino 10 krat razredčili z deionizirano vodo. (preglednica 4). Za interni standard smo uporabili krotosko kislino s koncentracijo 1 g/100 ml.

Zamrznjene vzorce, ki smo jih pripravili za plinski test smo odmrznili, premešali in iz centrifugirk odvzeli po 3 ml vzorca, ki smo ga prenesli v prvo serijo praznih epruvet. Omenjeno količino vzorca smo centrifugirali 10 minut pri 3000 vrtljajih na minuto (rpm) (centrifuga Janetcki T23, Nemčija).

Po centrifugiranju smo supernatant prenesli v epruvete druge serije, v katere smo dali:

- 0,4 g sušenega NaCl
- 1 ml filtrata vzorca
- 0,2 ml 50 % H₂SO₄
- 1 ml internega standarda
- 1 ml dietiletra

Vsako epruveto smo ročno stresali in sicer tako, da smo vsako obrnili 20 krat, pri čemer je prišlo do ekstrakcije HMK v dietileter. Epruvete smo postavili v centrifugo, ter centrifugirali do 2000 rpm (centrifuga Janetcki T23, Nemčija), da se je popolnoma ločila etrska faza.

Iz epruвет druge serije smo zgornjo etrsko fazo, v kateri so bile ekstrahirane kisline, s Pasteurjevimi pipetami pazljivo posesali in jo prenesli v epruvete tretje serije, ki smo jih predhodno napolnili z 0,3 g CaCl₂, ki je vezal preostalo vodo.

V epruvete druge serije smo ponovno dodali 1 ml dietiletra, premešali 20 krat, centrifugirali do 2000 rpm (centrifuga Janetcki T23, Nemčija) in s Pasteurjevo pipeto prenesli etrsko frakcijo v epruveto tretje serije, kjer je že bil etrski ekstrakt. Raztopine za umerjanje plinskega kromatografa smo ekstrahirali na enak način kot vzorce.

3.5.1 Analitska oprema in pogoji analize

V poglavju 3.5.1 smo pripravljene etrske ekstrakte injicirali v plinski kromatograf. En mikroliter ekstrakta smo injicirali ob naprej točno določenemu programu na aparatu (preglednica 5) ta pa nam grafično izriše vrhove in vrednosti posameznih HMK v vzorcu.

Za analizo HMK kislin smo uporabili plinski kromatograf Hewlett Packard 5890 A (Hewlett Packard, ZDA), opremljen z injektorjem split/splitless in detektorjem FID. Za ločbo HMK smo uporabili kapilarno kolono NUKOLTM, FUSED SILICA Capillary Column (Col:20988-03A), dolžine 30 m, premera 0,25 mm in debelino standardne faze 0,25 μm, proizvajalca SUPELCO (ZDA). Kromatografske pogoje in pretok plina za določanje HMK navajamo v preglednici 5.

Preglednica 5: Kromatografski pogoji in pretok plina za določanje hlapnih maščobnih kislin (HMK)

Temperaturni program

temperatura injektorja	185 °C
temperatura detektorja	290 °C
začetna temperatura kolone	75 °C
začetni zadrževalni čas	3,5 min
hitrost dviga temperature	14 °C/min
končna temperatura kolone	160 °C
končni zadrževalni čas	3 min
prostornina injiciranja	1 µl; split 30:1
čas analize	20 min

Pretok plinov

argon (nosilni plin)	2 ml/min
dušik (make-up plin)	30 ml/min
vodik (gorilni plin)	30 ml/min
sintetični zrak	300 ml/min

V poskusu smo določali vsebnosti očetne, propionske, izo- in n-maslene kisline ter vsebnosti izo- in n-valerianske kisline

Izo- in n-valerianske kisline v nadaljnjih izračunih skupnih HMK nismo upoštevali, ker so bile njihove vsebnosti majhne, na meji ali pa celo pod mejo detekcije.

3.6 IZRAČUN IN OBDELAVA PODATKOV

3.6.1 Kazalniki fermentacije

S pomočjo Gompertzovega modela (1) (Lavrenčič in sod., 1997) smo izračunali kazalnike produkcije plina za substrate brez in z različnimi rastlinskimi izvlečki. Pri tem smo uporabili nelinearno regresijsko metodo (PROC NLIN) v statističnem programskem paketu SAS (slika 2).

...(1)

$$y_t = B e^{-C e^{-At}}$$

y_t = kumulativna produkcija plina v času t (ml)

B = skupna potencialna produkcija plina (ml/g SS) (slika 2)

C = specifična hitrost fermentacije, na katero vpliva kazalnik A

A = konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti

t = čas (h)

Čas največje hitrosti fermentacije (TMFR – time of maximum fermentatium rate (h)) (slika 1) smo izračunali z drugim odvodom Gompertzovega modela, ki smo ga izenačili z nič.

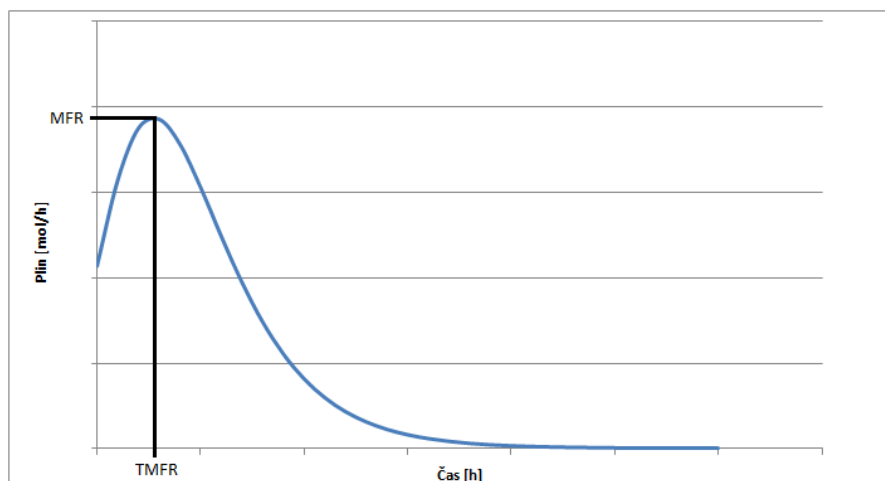
$$\frac{d^2y}{dt^2} = AB^2C^2(e^{-At})^2e^{-Ce^{-At}} - ABC^2e^{-Ce^{-At}} = 0$$

Z vstavitvijo TMFR v prvi odvod Gompertzove funkcije

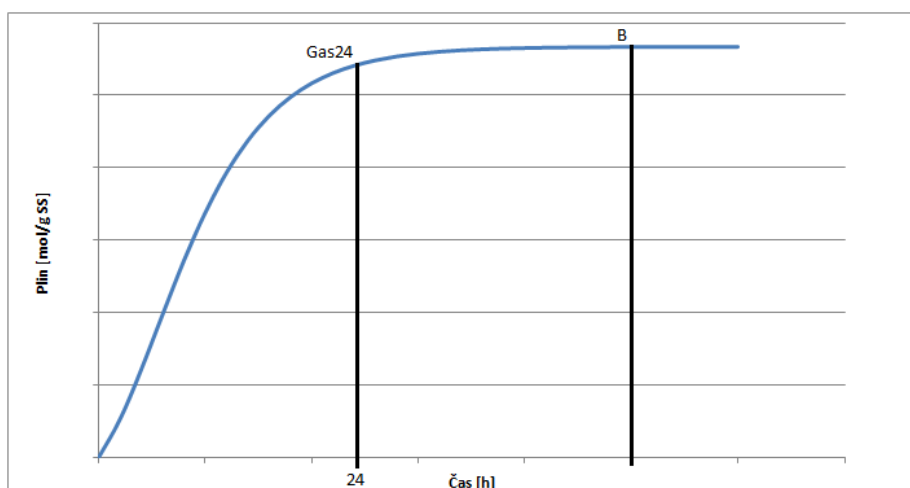
$$\frac{dy}{dt} = ABCe^{-At}e^{-Ce^{-At}}$$

smo izračunali največjo hitrost fermentacije (MFR – maximum fermentation rate (ml/h)) (slika 1).

Za izračun GAS24 (slika 2) smo uporabili osnovno Gompertzovo funkcijo (1), kjer smo namesto t vstavili vrednost 24 ur.



Slika 1: Shematski prikaz kazalnikov fermentacije MFR (hitrost fermentacije) in TMFR (čas ko je dosežena največja hitrost fermentacije) po Gompertzovem modelu



Slika 2: Shematski prikaz kazalnikov fermentacije GAS24 (prostornina plina nastala v 24 urah) in B (največja skupna produkcija plina) po Gompertzovem modelu

3.6.2 Izračun vsebnosti metana

Količini CO₂ in metana, ki sta nastali pri fermentaciji ogljikovih hidratov smo izračunali po naslednjih enačbah (Blümmel in sod., 1999).

$$\text{mmol CO}_{2\text{ferm}} = a/2 + p/4 + 1,5 b \quad \dots(2)$$

$$\text{mmol CH}_{4\text{ferm}} = a + 2 \times b - \text{CO}_{2\text{ferm}} \quad \dots(3)$$

CO_{2ferm} – pri fermentaciji nastali ogljikov dioksid

CH_{4ferm} – pri fermentaciji nastali metan

a – pri fermentaciji nastala očetna kislina

p – pri fermentaciji nastala propionska kislina

b – pri fermentaciji nastala maslena kislina,

3.7.1 Model

Vpliv vrste dodatka, koncentracije dodatka in interakcije med dodatkom in koncentracijo dodatka smo ugotavljali s statističnim modelom:

$$y_{ijk} = \mu + K_i + V_j + KV_{ij} + e_{ijk}, \quad \dots(4)$$

kjer je:

y_{ijk} - skupna potencialna produkcija plina (B), specifična hitrost fermentacije (C), konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A), čas največje hitrosti fermentacije (TMFR), največja hitrost fermentacije (MFR), produkcija plina v 24 urah (GAS24), produkcija hlapnih maščobnih kislin (HMK), produkcija očetne, maslene in propionske kisline in produkcija metana.

μ - srednja vrednost

K_i - sistematski vpliv vrste dodatka

V_j - sistematski vpliv koncentracije dodatka

KV_{ij} - interakcija med vrsto dodatka in koncentracijo dodatka

e_{ijk} - ostanek

4 REZULTATI

4.1 OCENJENI KAZALNIKI PRODUKCIJE PLINA

V preglednici 6 prikazujemo z Gompertzovim modelom ocenjene kazalnike fermentacije B, C in A in vplive vrste dodatka in koncentracije na ocenjene kazalnike fermentacije ter interakcije med vrsto dodatka in njegovo koncentracijo.

Preglednica 6: Ocenjeni kazalniki fermentacije

	B	C	A
TMR	309 ^{ab}	2,52 ^b	0,173 ^{bcd}
FD50	325 ^a	2,48 ^b	0,157 ^f
FD100	309 ^{ab}	2,57 ^b	0,162 ^{ef}
FD150	309 ^{ab}	2,61 ^{ab}	0,169 ^{cdef}
FAR50	307 ^{ab}	2,67 ^{ab}	0,163 ^{def}
FAR100	313 ^{ab}	2,66 ^a	0,158 ^f
FAR150	309 ^{ab}	2,70 ^{ab}	0,159 ^f
EUG50	284 ^{bcd}	2,70 ^{ab}	0,184 ^b
EUG100	256 ^d	2,84 ^{ab}	0,177 ^{bc}
EUG150	183 ^e	2,70 ^{ab}	0,196 ^a
LCE50	311 ^{ab}	2,61 ^{ab}	0,172 ^{cde}
LCE100	313 ^{ab}	2,66 ^{ab}	0,165 ^{def}
LCE150	310 ^{ab}	2,64 ^{ab}	0,163 ^{def}
CIN50	298 ^{abc}	2,69 ^{ab}	0,179 ^{bc}
CIN100	296 ^{abc}	2,69 ^{ab}	0,169 ^{cdef}
CIN150	291 ^{bc}	2,72 ^{ab}	0,144 ^g
statistična verjetnost (P=)			
dodatek	<,0001	0,0483	<,0001
koncentracija	0,0047	0,4293	0,0768
dodatek×koncentracija	0,0031	0,9277	0,0002

Legenda: B – skupna potencialna produkcija plina (ml plina/g SS)

C – specifična hitrost fermentacije (/)

A – faktor mikrobne učinkovitosti (/)

Vrednosti označene z različnimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

Vrsta dodatka je vplivala ($P < 0,05$) na vse tri kazalnike fermentacije (»B«, »C« in »A«), medtem ko koncentracija ni imela vpliva na kazalnik »C« in »A«. Interakcijo med vrsto in

koncentracijo dodatka smo ugotovili pri kazalnikih »B« in »A«. Z uporabljenim statističnim modelom smo pojasnili med 57 (kazalnik »C«) in 96 (kazalnik »A«) % variance (ni prikazano). Pri fermentaciji substratov smo ugotovili (preglednica 6), da dodatek EUG zmanjša ($P < 0,05$) skupno potencialno produkcijo plina (kazalnik »B«), medtem ko drugi dodatki ne vplivajo na ta kazalnik, ki je variiral v povprečju med 395 (dodatek CIN) in 314 ml plina/g SS (dodatek FD). Med posameznimi substrati smo največji »B« določili pri fermentaciji FD50 (325 ml/g SS), najmanjšega pa pri fermentaciji EUG150 (183 ml/g SS). V povprečju je le največja koncentracija dodatka statistično značilno zmanjšala kazalnik »B« ($P < 0,05$), kar pa velja samo za dodatek EUG, z uporabo katerega se je kazalnik »B« zmanjšal s 309 (TMR) preko 284 (EUG50) in 256 (EUG100) na 183 ml/g SS (EUG150). Pri drugih dodatkih povečevanje njihove koncentracije ni statistično značilno vplivalo na kazalnik »B«.

V povprečju so dodatki EUG, CIN in FAR povzročili večjo ($P < 0,05$) specifično hitrost fermentacije (kazalnik »C«; med 2,68 in 2,75) kot FD (2,55) in TMR (2,52). Med LCE (2,64) in TMR ni bilo razlik. Največji »C« smo določili pri EUG100 (2,84), medtem ko smo najmanjšega določili pri fermentaciji FD50 (2,48). Koncentracija dodatka na kazalnik »C« ni imela vpliva.

Ugotovili smo, da na kazalnik fermentacije »C« statistično značilno vpliva le vrsta dodatka, vendar je imel le substrat FAR100 večji ($P < 0,05$) »C« (2,66) od TMR (2,52). Med ostalimi substrati razlik ni bilo.

Kazalnik »A« je bil pri fermentaciji TMR (0,174) in TMR z dodatkom EUG (0,186) večji kot ob fermentaciji TMR z dodatki CIN (0,164), FD (0,162) in FAR (0,160), medtem ko se ni razlikoval s fermentacijo TMR z dodatkom LCE (0,167). Največji »A« smo določili ob fermentaciji EUG150 (0,195), najmanjšega pa ob fermentaciji CIN150 (0,143). S povečevanjem koncentracije dodatka se je »A« povečal ($P < 0,05$) le med TMR, EUG50, EUG150 in EUG150, zmanjšal ($P < 0,05$) pa pri dodatku CIN od 0,174 (TMR), preko 0,179 (CIN50) in 0,169 (CIN100) na 0,143 (CIN150). V primerjavi s TMR (0,174) so bili kazalniki »A« manjši ($P < 0,05$) tudi pri fermentaciji FD50 (0,157) in FD100 (0,162) ter FAR100 (0,158) in FAR150 (0,159).

4.2 IZRAČUNANI KAZALNIKI FERMENTACIJE

V preglednici 7 prikazujemo izračunane kazalnike fermentacije, TMFR, MFR in GAS24, kjer prikazujemo tudi vplive vrste in koncentracije dodatkov ter interakcije med vrsto in koncentracijo dodatka.

Preglednica 7: Izračunani kazalniki fermentacije

	TMFR	MFR	GAS24
TMR	5,32 ^{fg}	19,6 ^a	297 ^{ab}
FD50	5,77 ^{bcdef}	18,8 ^{ab}	307 ^a
FD100	5,83 ^{bcdef}	18,4 ^{ab}	293 ^{ab}
FD150	5,69 ^{cdef}	19,2 ^{ab}	295 ^{ab}
FAR50	6,02 ^{bcd}	18,4 ^{ab}	291 ^{ab}
FAR 100	6,29 ^b	18,2 ^{ab}	295 ^{ab}
FAR 150	6,15 ^{bc}	18,1 ^{ab}	292 ^{ab}
EUG50	5,40 ^{efg}	19,2 ^{ab}	275 ^{bc}
EUG 100	5,88 ^{bcdef}	16,7 ^{bc}	246 ^{cd}
EUG 150	5,07 ^g	13,2 ^{de}	178 ^e
LCE50	5,57 ^{defg}	19,7 ^a	298 ^{ab}
LCE 100	5,91 ^{bcde}	19,0 ^{ab}	297 ^{ab}
LCE 150	5,95 ^{bcde}	18,7 ^{ab}	295 ^{ab}
CIN50	5,54 ^{defg}	19,6 ^a	287 ^{ab}
CIN100	5,84 ^{bcdef}	18,4 ^{ab}	283 ^{ab}
CIN150	6,93 ^a	15,4 ^{cd}	267 ^{bc}
statistična verjetnost (P=)			
Dodatek	0,0011	0,0072	<,0001
Koncentracija	0,0270	0,0019	0,0022
Dod.×Konc.	0,0032	0,0293	0,0053

Legenda: TMFR - čas največje hitrosti fermentacije (čas v urah)

MFR - največja hitrosti fermentacije (ml plina/uro)

GAS24 - prostornina plina, nastala v 24. urah (ml plina/g SS)

Vrednosti označene z različnimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

Na izračunane kazalnike fermentacije (TMFR, MFR in GAS24) so vplivali ($P < 0,05$) tako vrsta kot koncentracija dodatka, statistično značilna pa je bila tudi interakcija med vrsto in koncentracijo dodatka. Z uporabljenim statističnim modelom smo pojasnili med 90 (MFR) in 94 (TMFR) % variance (ni prikazano).

Razlike v povprečnih TMFR so majhne. Med TMFR TMR (5,31 ure) in TMFR FAR (6,16 ure) je manj kot ena ura razlike, a so razlike med TMFR različnih substratov statistično značilne (med TMR in FD, LCE, CIN ter FAR, med EUG in CIN ter FAR in med FD in FAR). Fermentacija EUG150 je najprej dosegla MFR (5,07 ure), najdlje pa je za doseganje MFR potreboval CIN150 (6,93 ure). Znotraj posameznih dodatkov se je s povečevanjem koncentracije TMFR skrajšal ($P < 0,05$) pri TMR z dodatkom EUG s 5,88 (EUG100) na 5,07 ure (EUG150), medtem ko se je ob fermentaciji TMR z dodatkom CIN TMFR podaljšal ($P < 0,05$) s 5,54 (CIN50) preko 5,84 (CIN100) na 6,93 ure (CIN150).

Pri fermentaciji TMR brez dodatkov smo izračunali največji MFR (19,7 ml/uro), ki pa se je razlikoval ($P < 0,05$) le od fermentacije TMR z dodatkom EUG (16,4 ml/uro). Od MFR TMR (16,7 ml/uro) so imeli manjši MFR samo EUG100 (16,7 ml/uro), EUG150 (13,2 ml/uro) in CIN150 (15,4 ml/uro). Povečevanje koncentracije dodatka je vplivalo na MFR le ob fermentaciji TMR z dodatkom EUG in CIN. Povečevanje koncentracije EUG je zmanjšalo ($P < 0,05$) z 19,7 (TMR) preko 19,2 (EUG50) in 16,7 (EUG100) na 13,2 ml/uro (EUG150), medtem ko je bilo zmanjšanje z uporabo CIN manjše, saj se je MFR zmanjšal z 19,2 (TMR) preko 19,6 (CIN50) in 18,4 (CIN100) na 15,4 ml/uro (CIN150).

V povprečju je bila prostornina plina, ki se je sprostila ob fermentaciji substratov, pri vseh substratih enaka (med 279 in 299 ml/g SS), manjša ($P < 0,05$) je bila samo pri fermentaciji TMR z dodatkom EUG (233 ml/g SS). Največjo GAS24 smo izračunali za FD50 (307 ml/g SS), ki pa se od večine substratov ni razlikovala in je variirala med 283 (CIN100) in 307 ml/g SS (FD50). Le ob fermentaciji TMR z dodatkom EUG je bila GAS24 manjša ($P < 0,05$) in se je glede na TMR (297 ml/g SS) zmanjševala od 275 (EUG50) preko 246 (EUG100) do 178 ml/g SS (EUG150). Le največja koncentracija CIN (CIN150) je

zmanjšala GAS24 s 297 (TMR) na 267 ml plina/g SS vendar ne statistično značilno ($P > 0,05$).

4.3 PRODUKCIJA Hlapnih Maščobnih Kislín (HMK)

V preglednici 8 prikazujemo produkcijo hlapnih maščobnih kislín (HMK) in metana po 24 urah inkubacije substratov, kjer navajamo tudi vplive vrste in koncentracije dodatka na produkcijo HMK in metana.

Preglednica 8: Produkcija hlapnih maščobnih kislín (HMK) in metana po 24 urah inkubacije substratov

	mmol Ac	mmol Pr	mmol nBu	mmol HMK	mmol CH ₄
TMR	1,57 ^{bc}	0,64 ^a	0,34 ^a	2,55 ^{abc}	0,75 ^{bc}
FD50	1,42 ^c	0,35 ^{de}	0,22 ^{de}	1,99 ^d	0,70 ^c
FD100	1,43 ^c	0,35 ^{de}	0,22 ^{de}	1,99 ^d	0,70 ^c
FD150	1,59 ^{bc}	0,39 ^{cde}	0,24 ^{de}	2,21 ^{cd}	0,78 ^{bc}
FAR50	1,43 ^c	0,37 ^{cde}	0,23 ^{de}	2,02 ^{cd}	0,70 ^c
FAR100	1,44 ^c	0,37 ^{cde}	0,22 ^{de}	2,02 ^{cd}	0,70 ^c
FAR150	1,31 ^c	0,34 ^e	0,21 ^{de}	1,86 ^d	0,64 ^c
EUG50	1,86 ^{ab}	0,58 ^{ba}	0,32 ^{ab}	2,76 ^{ab}	0,90 ^{ab}
EUG100	1,65 ^{bc}	0,47 ^{de}	0,27 ^{bcd}	2,38 ^{bcd}	0,80 ^{bc}
EUG150	1,26 ^c	0,44 ^{cde}	0,30 ^{abc}	1,99 ^d	0,64 ^c
LCE50	1,43 ^c	0,36 ^{de}	0,23 ^{de}	2,02 ^{cd}	0,70 ^c
LCE100	1,45 ^c	0,38 ^{cde}	0,23 ^{de}	2,06 ^{cd}	0,71 ^c
LCE150	1,30 ^c	0,34 ^e	0,22 ^{de}	1,86 ^d	0,64 ^c
CIN50	1,44 ^c	0,37 ^{cde}	0,19 ^e	1,99 ^d	0,68 ^c
CIN100	1,60 ^{bc}	0,48 ^{bc}	0,25 ^{cde}	2,33 ^{cd}	0,76 ^{bc}
CIN150	2,06 ^a	0,64 ^a	0,33 ^{ab}	3,03 ^a	0,97 ^a
statistična verjetnost ($P =$)					
Dodatek	0,0152	<,0001	0,0010	0,0032	0,0477
Koncentracija	0,9872	0,4778	0,1637	0,9170	0,9985
Dod.×Konc.	0,0060	0,0028	0,0249	0,0053	0,0138

Legenda: Ac – očetna kislina (mmol/g SS)

Pr – propionska kislina (mmol/g SS)

nBu – maslena kislina (mmol/g SS)

HMK – hlapne maščobne kisline (mmol/g SS)

CH₄ – metan (mmol/g SS)

Vrednosti označene z različnimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$)

Vrsta dodatka je vplivala ($P < 0,05$) na produkcijo vseh posameznih HMK, na skupno produkcijo HMK in na tvorbo metana, izračunali pa smo tudi značilne ($P < 0,05$)

interakcije med vrsto in koncentracijo dodatka. Nasprotno pa koncentracija dodatka ni vplivala na produkcijo HMK in metana. Z uporabljenim statističnim modelom smo pojasnili med 72 (metan) in 89 % (propionska kislina) variance (ni prikazano).

Največjo produkcijo oetne kisline (Ac) smo v povprečju določili ob fermentaciji TMR s CIN (1,70 mmol/g SS), ki je bila statistično značilno večja od fermentacije TMR z dodatkom LCE in FAR (oba 1,39 mmol/g SS), medtem ko se od produkcije oetne kisline ob fermentaciji TMR (1,58 mmol/g SS) in TMR z dodatki EUG (1,59 mmol/g SS) in FD (1,48 mmol/g SS) ni razlikovala. Največjo produkcijo oetne kisline smo tako določili ob fermentaciji CIN150 (2,06 mmol/g SS), najmanjšo pa ob fermentaciji EUG150 (1,26 mmol/g SS). Produkcija oetne kisline se s povečevanjem koncentracije dodatkov FD, FAR in LCE ni spreminjala ($P > 0,05$). Pri EUG50 in EUG150 smo v primerjavi s TMR najprej ugotovili neznačilno povečanje produkcije oetne kisline s 1,57 (TMR) na 1,86 (EUG50) in 1,65 mmol/g SS (EUG100), ob fermentaciji EUG150 pa močno zmanjšanje ($P < 0,05$) produkcije oetne kisline na 1,26 mmol/g SS. Nasprotno pa se je s povečevanjem koncentracije CIN produkcija oetne kisline najprej neznačilno zmanjšala (1,44 pri CIN50 in 1,60 mmol/g SS pri CIN100), nato pa se je znatno povečala ($P < 0,05$) produkcija oetne kisline pri CIN150 (2,06 mmol/g SS).

Vsi uporabljeni dodatki so v primerjavi s TMR (0,64 mmol/g SS) v povprečju zmanjšali ($P < 0,05$) produkcijo propionske kisline (Pr) (na 0,50 pri CIN, 0,49 pri EUG, 0,36 pri LCE, FD in FAR). Med posameznimi substrati je le CIN150 (0,64 mmol/g SS) proizvedel enako količino propionske kisline kot TMR. S povečevanjem koncentracije EUG se je produkcija propionske kisline zmanjševala, še največja razlika ($P < 0,05$) pa je nastala pri fermentaciji EUG50 (0,58 mmol/g SS) in EU150 (0,44 mmol/g SS). V nasprotju z EUG je dodatek CIN v najmanjši koncentraciji (E50) najbolj zmanjšal produkcijo propionske kisline (0,37 mmol/g SS), vpliv CIN pa se je s povečevanjem koncentracije zmanjševal, značilno med CIN100 (0,48 mmol/g SS) in CIN150 (0,64 mmol/g SS), ko je produkcija propionske kisline enaka kot pri TMR.

Vsi obroki (TMR) z dodatki so proizvedli manj maslene kisline (nBu) kot TMR (0,34 mmol/g SS). Ta razlika je največja ($P < 0,05$) med produkcijo maslene kisline pri fermentaciji TMR in CIN (0,26 mmol/g SS), LCE (0,23 mmol/g SS), FD in FAR (oba 0,22 mmol/g SS). Prav pri fermentaciji TMR z dodatkom FD smo določili najmanjšo produkcijo maslene kisline (med 0,22 in 0,24 mmol/g SS), medtem ko je dodatek EUG najmanj zaviral njeno produkcijo (med 0,27 in 0,32 mmol/g SS), ki pa je bila v povprečju še vedno manjša od TMR. S povečevanjem koncentracije dodatkov v TMR se pri večini substratov produkcija maslene kisline ni bistveno spreminjala, le pri fermentaciji TMR s CIN se je povečevala ($P < 0,05$) z 0,19 mmol/g SS (CIN50) na 0,33 mmol/g SS (CIN150), kar je enako kot pri TMR.

Spremembe v produkciji posameznih HMK se odražajo tudi v produkciji vsote HMK. Največ HMK je v povprečju nastalo ob fermentaciji TMR (2,55 mmol/g SS), najmanj pa ob fermentaciji FAR (1,97 mmol/g SS). Absolutno pa je največ HMK nastalo ob fermentaciji CIN150 (3,03 mmol/g SS), najmanj pa ob fermentaciji FAR150 in LCE150 (1,86 mmol/g SS). Povečevanje koncentracije dodatkov pri večini substratov nima vpliva na produkcijo HMK. Le pri fermentaciji TMR z dodatkom EUG smo opazili, da se je produkcija HMK zmanjšala ($P < 0,05$) med EUG50 (2,76 mmol/g SS) in EUG150 (1,99 mmol/g SS), medtem ko je pri fermentaciji CIN150 (3,03 mmol/g SS) nastalo več ($P < 0,05$) HMK kot pri fermentaciji CIN50 (1,99 mmol/g SS).

Produkcija metana se med TMR in TMR z dodatki ni zelo razlikovala. Razlike ($P < 0,05$) v produkciji metana smo določili pri fermentaciji TMR z dodatkom CIN (0,81 mmol/g SS) in LCE ter FAR (oba 0,68 mmol/g SS), ne pa tudi ob fermentaciji TMR (0,75 mmol/g SS), in TMR z dodatki EUG (0,78 mmol/g SS) in FD (0,73 mmol/g SS). Po stehiometričnem izračunu bi največ metana moralo nastati ob fermentaciji EUG50 (0,90 mmol/g SS), najmanj pa ob fermentaciji FAR150, EUG150 in LCE150 (povsod 0,64 mmol/g SS). S povečevanjem koncentracije EUG se je produkcija metana zmanjševala ($P < 0,05$) in sicer od 0,90 mmol/g SS (EUG50) do 0,64 mmol/g SS (EUG150), medtem ko se je pri fermentaciji TMR s CIN povečevala ($P < 0,05$) od 0,68 mmol/g SS (CIN50) na 0,97 mmol/g SS (CIN150).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Eugenol (EUG) je bil edini dodatek, ki je statistično značilno ($p \leq 0,05$) zmanjšal skupno produkcijo plina (kazalnik »B«) še posebej pri največji uporabljeni koncentraciji. Da EUG zavira fermentacijo so ugotovili tudi Busquet in sodelavci (2006). V omenjeni raziskavi je EUG zaviralno vplival na fermentacijo, saj je zmanjšal skupno produkcijo plina, koncentracijo HMK in amonijaka v predželodcih. Po Jayanegara in sodelavci (2009) tudi hidrolizirajoči tanini znižujejo skupno produkcijo plina, kar pa v našem poskusu nismo dokazali. Menimo, da je najverjetnejši vzrok za slabše delovanje FAR v premajhni koncentraciji hidrolizirajočih taninov v našem poskusu, saj so Jayanegara in sodelavci (2009) pri največji koncentraciji dodali 1 g hidrolizirajočih taninov/ml vampovega soka, v našem poskusu pa smo uporabili 0,28 g FAR/ml inokuluma pri najvišji koncentraciji FAR150. Eugenol je bil edini dodatek, ki je pri velikih koncentracijah (EUG100 in EUG150) zmanjšal skupno količino plina, nastalo v 24 urah (GAS24). Bhatta in sodelavci (2009) nasprotno navajajo, da tudi hidrolizirajoči kostanjevi tanini zmanjšujejo količino plina nastalo v 24 urah pri koncentracijah, ki so jih uporabili (0,79 mg hidrolizirajočih kostanjevih taninov/ml in 1,12 mg hidrolizirajočih kostanjevih taninov/ml), vendar tega v našem poskusu nismo potrdili. Dodatek FD ni vplival na obseg fermentacije TMR, kar je najverjetneje posledica nasprotujočega si delovanja njegovih sestavin ali pa nevtralizacije delovanja EUG, ki je edini zmanjševal obseg fermentacije.

Na samo hitrost fermentacije (MFR) sta zaviralno vplivala le dodatka EUG in CIN. Učinek EUG in CIN se je povečeval s povečevanjem njune koncentracije. Pri času, ko je dosežena največja hitrost fermentacije (TMFR), smo pri fermentaciji TMR z dodatkom FAR opazili, da se TMFR s povečevanjem koncentracije podaljšuje. Menimo, da s povečevanjem koncentracije FAR ne zaviramo obsega fermentacije (kazalnik »B« oziroma GAS24), glede na TMR (kontrola), pač pa podaljšamo obdobje, ko fermentacija doseže svojo največjo hitrost (TMFR). TMFR podaljšujeta tudi dodatka LCE in CIN. Pri slednjem se TMFR podaljša zgolj pri njegovi največji koncentraciji (CIN150). Razlike v TMFR med najmanjšo in največjo koncentracijo dodatkov CIN in EUG so velike, statistično značilne ($P < 0,05$) in nasprotujoče si. Ker EUG s povečevanjem koncentracije skrajšuje TMFR in

ker ga CIN s povečevanjem koncentracije podaljšuje in ker ostali dodatki nimajo vpliva, menimo, da zaradi tega dodatek FD ne vpliva na TMFR.

Tudi pri produkciji posameznih HMK lahko zasledimo nasprotujoče si delovanje CIN in EUG. Dodatek CIN v majhnih koncentracijah (CIN50 in CIN100) je zavrnil produkcijo propionske in maslene kisline. S povečevanjem koncentracije CIN v TMR se povečuje produkcija oetne, propionske in maslene kisline. Slednje šele pri največji koncentraciji dodatka CIN (CIN150) dosežejo vrednosti, ki jih navajamo za TMR. Ker se povečuje produkcija posameznih HMK, se s tem povečuje tudi produkcija celokupnih HMK, kar pa se še posebej izrazi pri največji koncentraciji CIN (CIN150). Nasprotno pa EUG zmanjšuje produkcijo oetne in propionske kisline, še posebej pri največji koncentraciji (EUG150), medtem ko na produkcijo maslene kisline nima učinka. Zaradi delovanja na produkcijo oetne in propionske kisline EUG zmanjšuje produkcijo celokupnih HMK. Ker ostale sestavine FD na produkcijo HMK nimajo vpliva, menimo, da ima FD slabši vpliv na produkcijo posameznih in celokupnih HMK, predvsem zaradi nasprotujočih učinkov CIN in EUG. Delovanje CIN in EUG se odraža na delovanju FD. Do podobnih ugotovitev o učinkovanju CIN in EUG so prišli tudi Cardozo in sodelavci (2006) ter Busquet in sodelavci (2003), ki so v poskusih uporabili mešanico CIN in EUG, pri katerih niso ugotovili vplivov na produkcijo oetne kisline. Nasprotno pa so Busquet in sodelavci (2006) ugotovili, da EUG povečuje produkcijo oetne kisline, medtem ko Busquet in sodelavci (2005) navajajo, da CIN zmanjšuje produkcijo oetne kisline, vendar le pri visokih koncentracijah. V našem poskusu dodatek FAR ni vplival na produkcijo oetne kisline, čeprav Jayanegara in sodelavci (2009) in Bhatta in sodelavci (2009) poročajo, da hidrolizirajoči tanini zmanjšujejo produkcijo oetne kisline.

Glede na TMR je FD zmanjšal produkcijo propionske kisline. To je najverjetneje posledica dejstva, da so vse sestavine FD zmanjšale produkcijo propionske kisline razen CIN, ki produkcijo propionske kisline povečuje. Podobno kot pri produkciji oetne kisline, je EUG zmanjševal produkcijo propionske kisline s povečevanjem koncentracije. Vendar pa Busquet in sodelavci (2005, 2006) ugotavljajo, da tako EUG kot CIN povečujeta produkcijo propionske kisline.

Busquet in sodelavci (2005) navajajo, da EUG zmanjšuje produkcijo maslene kisline. V našem poskusu takšnega delovanja EUG nismo potrdili, kar navajajo tudi Busquet in sodelavci (2006), a le pri majhnih koncentracijah EUG. Cardozo in sodelavci (2006) in Busquet in sodelavci (2003) navajajo, da mešanica CIN in EUG ni vplivala na produkcijo maslene kisline, v našem poskusu v primerjavi s TMR pa je dodatek FD zmanjšal produkcijo maslene kisline pri vseh treh uporabljenih koncentracijah FD. Enako kot za FD velja tudi za dodatek FAR in LCE. Menimo, da prav ti sestavini zmanjšujeta produkcijo maslene kisline. Zmanjšano produkcijo maslene kisline pod vplivom hidrolizirajočih taninov potrjujejo tudi drugi avtorji (Jayanegara in sod., 2009; Bhatta in sod., 2009).

Ob dodatku FAR smo opazili trend zniževanja produkcije hlapnih maščobnih kislin (HMK), še posebej ob največji uporabljeni koncentraciji (FAR150). Takšno delovanje FAR navajajo tudi raziskave Jayanegara in sodelavci (2009) in Bhatta in sodelavci (2009). Zato predvidevamo, da FAR zavira sproščanje HMK in zaradi tega zavira tudi fermentacijo v vampu. Raziskava Busquet in sodelavci (2006) se sklada z našimi ugotovitvami, da EUG zmanjšuje produkcijo HMK. CIN je v našem poskusu povečeval koncentracijo HMK. Cardozo in sodelavci (2004) so ugotovili, da dodatek CIN ne vpliva na produkcijo HMK. Tudi pri delovanju na produkcijo HMK smo opazili, da imata CIN in EUG pri največjih koncentracijah izrazito nasprotujoče si vplive na produkcijo HMK, zato menimo, da pri fermentaciji TMR z dodatkom FD obe komponenti učinkovanje druga druge izničita, zaradi česar se produkcija HMK ob dodatku FD ni spremenila. Do takšnih ugotovitev so prišli tudi Cardozo in sodelavci (2006) in Busquet in sodelavci (2003), ki v poskusu z mešanico EUG in CIN niso izmerili nobenih sprememb v produkciji HMK.

Produkcija metana se je z dodatkom FD nekoliko povečala. Za to povečevanje je odgovoren predvsem CIN, ki sam povečuje produkcijo metana, še posebej ob večji koncentraciji v obroku. Vendar pa Busquet in sodelavci (2006) navajajo ravno nasprotno, saj trdijo da CIN zavira metanogenezo. V našem poskusu smo ugotovili, da za razliko od CIN EUG zmanjšuje produkcijo metana, kar navajajo tudi Busquet in sodelavci (2006). Vendar pa smo opazili tudi, da je EUG pri majhnih koncentracijah (EUG50) produkcijo metana glede na TMR celo povečal. Zaradi nasprotujočega delovanja CIN in EUG je njun skupni učinek v FD zanemarljiv. Dodatek FAR ni vplival na produkcijo metana, čeprav

avtorji, kot so Jayanegara in sodelavci (2009), Field in Lettinga (1987) ter McSweeney in sodelavci (2001) navajajo, da se s povečevanjem koncentracije hidrolizirajočih taninov produkcija metana zmanjšuje. Pri tem omenjeni avtorji navajajo tudi, da je biološka aktivnost taninov odvisna bolj od vrste taninov kot od njihove koncentracije.

Menimo, da krivdo za različne ugotovitve in rezultati avtorjev, ki jih zasledimo v strokovni literaturi lahko pripišemo različnim zasnovam in izvedbam samih poskusov.

5.2 SKLEPI

- Na skupno produkcijo plina (kazalnik »B«) je najbolj vplival dodatek EUG, ki je skupno produkcijo plina zmanjšal ($P < 0,05$) s 309 ml/g SS (TMR), preko 284 ml/g SS (EUG50), 256 ml/g SS (EUG100) na 183 ml/g SS (EUG150). Drugi dodatki niso imeli statistično značilnega vpliva na skupno potencialno produkcijo plina.
- Na hitrost fermentacije (MFR) zaviralno delujeta dodatka CIN in EUG, vendar le pri največjih uporabljenih koncentracijah (CIN 150 in EUG150)
- Samo EUG ima izrazit vpliv na količino plina, ki se tvori v 24 urah inkubacije (GAS24).
- Dodatki FD, FAR, LCE in CIN podaljšujejo čas, ko je bila dosežena najvišja hitrost fermentacije (TMFR), medtem ko dodatek EUG ta čas skrajšuje.
- EUG zmanjšuje produkcijo očetne in propionske kisline ter celokupnih HMK, medtem ko CIN povečuje produkcijo teh kislin, poleg tega pa povečuje še produkcijo maslene kisline. Drugi dodatki nimajo vpliva na produkcijo posameznih in celokupnih HMK.
- CIN povečuje produkcijo metana, medtem ko ostali dodatki na produkcijo metana ne vplivajo. Pri majhnih koncentracijah EUG (EUG50) celo povečuje produkcijo metana glede na TMR.
- Dodatek FD ne vpliva na skupno potencialno produkcijo plina (kazalnik »B«), na GAS24, TMR, TMFR in produkcijo metana predvsem zaradi nasprotujočega si delovanja CIN in EUG kar pride do izraza posebej pri visokih koncentracijah

6 POVZETEK

Uporaba eteričnih olj in drugih sekundarnih presnovkov rastlin (tanini) v prehrani prežvekovalcev predstavlja alternativo prepovedanim nutritivnim antibiotikom. Taninom pripisujejo t.j. antimikrobiološko področje delovanja. Za prežvekovalce so tanini pomembni saj z beljakovinami tvorijo t.i. stabilne taninsko-beljakovinske komplekse v predželodcih in tako preprečujejo prekomerno razgradnjo beljakovin pod vplivom mikroorganizmov, kasneje pa se ti kompleksi encimsko razgradijo, beljakovine pa se prebavijo in absorbirajo v tankem črevesju. Taninsko beljakovinski kompleksi vodijo tudi do zmanjšane produkcije metana, ter manjše izgube sečnine s sečem in posledično do manjšega onesnaževanja okolja.

Namen našega poskusa je bil ugotoviti, kako razvojni produkt FD in nekatere njegove komponente (farmatan (FAR), eugenol (EUG), lignoceluloza (LCE) in cinamaldehyd (CIN)) vplivajo na sam potek *in vitro* fermentacije v vampovem soku. Spremljali smo obseg fermentacije (skupna potencialna produkcija plina – kazalnik »B« in prostornina plina, tvorjena v 24 urah inkubacije (GAS24), največjo hitrost fermentacije (MFR) in čas, ko je bila dosežena največja hitrost fermentacije (TMFR)), spreminjanje sestave hlapnih maščobnih kislin (vsebnosti očetne, propionske in maslene kisline, ter skupnih hlapnih maščobnih kislin (HMK) in produkcijo metana. Pri tem smo količine razvojnega produkta FD (FD) in njegovih sestavin preračunali na koncentracije v vampovem soku tako, kot da bi krave molznice zaužile 50, 100 in 150 g FD na dan.

V poskusu smo za substrat uporabili popolni krmni obrok (TMR) izračunan v skladu z DLG priporočili (DLG, 1997) za krave molznice, ki proizvajajo 30 kg mleka, ki smo mu dodali razvojni produkt FD (FD) in posamezne sestavine FD, ki jih proizvaja Tanin Sevnica d.d.

Na skupno potencialno produkcijo plina (kazalnik fermentacije B) je najbolj vplival EUG. Kazalnik B se je ob uporabi visokih koncentracij EUG zmanjšal skoraj za polovico v primerjavi s TMR s 284 ml/g SS (EUG50) na 183 ml/g SS (EUG150). Tudi na specifično hitrost fermentacije (kazalnik fermentacije »C«) je statistično značilno vplival le dodatek EUG, ki jo je povečal pri visokih koncentracijah in sicer z 2,52 (TMR) na 2,82 (EUG100). Konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (kazalnik fermentacije »A«) sta FD in FAR nekoliko zmanjšala, EUG pa je kazalnik fermentacije A s povečevanjem koncentracije povečeval. Čas največje hitrosti fermentacije (TMFR) sta statistično značilno podaljšala le dodatka FAR in LCE in sicer s 5,32 h (TMR) na 6,29 h (FAR150) oziroma na 5,95 h (LCE150). Največjo hitrost fermentacije (MFR) sta zmanjšala le dodatek CIN in EUG pri visokih koncentracijah z 19,6 ml/h (TMR) na 15,4 h (CIN150) oziroma na 13,2 ml/h (EUG150). Dodatek FD je povečal prostornino plina, ki je nastala v 24. urah (GAS24) pri nizkih koncentracijah z 297 ml/g SS (TMR) na 307 ml/g SS (FD50), medtem ko je EUG GAS24 zmanjšal z 297 ml/g SS (TMR) na 246 ml/g SS (EUG100) in 178 ml/g SS (EUG150). Pri dodatku EUG je opazen znaten, statistično značilen padec tvorbe očetne kisline s povečevanjem koncentracije EUG v primerjavi s TMR. EUG je zmanjšal produkcijo očetne kisline z 1,86 mmol/g SS (EUG50) na 1,26 mmol/g SS (EUG150). CIN pa je statistično značilno povečal produkcijo očetne kisline v primerjavi z TMR in sicer pri CIN50 z 1,44 mmol/g SS na 2,06 mmol/g SS pri CIN150. Očetno kislino je statistično značilno zmanjšal tudi FD50. Vsi dodatki so statistično značilno zmanjšali produkcijo propionske kisline, z izjemo CIN, ki jo je statistično značilno povečal. Količino maslene kisline so vsi dodatki statistično značilno zmanjšali, z izjemo EUG, ki na produkcijo maslene kisline ni imel vpliva. Dodatek FD in FAR sta statistično značilno zmanjšala produkcijo HMK, medtem ko sta EUG in LCE na zniževanje produkcije HMK vplivala le pri visokih koncentracijah. Pri dodatku CIN smo opazili trend naraščanja HMK s povečevanjem koncentracije in sicer iz 1,99 mmol (CIN50) na 3,03 mmol (CIN150). Pri produkciji metana dodatki FD, FAR in LCE ne vplivajo na produkcijo metana v primerjavi s TMR. EUG je statistično značilno med različnimi koncentracijami zmanjšal količino metana za razliko od CIN, ki je edini statistično značilno povečal produkcijo metana v primerjavi s TMR.

Zaključimo lahko, da razvojni produkt FD (FD) bistveno ne zmanjšuje produkcije metana, in ne vpliva na ocenjene in izračunane kazalnike fermentacije plinskega testa. Menimo, da sta za to odgovorna predvsem CIN in EUG z nasprotujočim delovanjem. Pozitivno pa FD vpliva na razmerje in količino posameznih HMK, predvsem na propionsko in masleno kislino, ki nastajajo med fermentacijo v predželodcih.

7 VIRI

- Beauchemin K.A., Kreuzer M., O'Mara F., McAllister T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48: 21-27
- Bennick A. 2002. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13, 2: 184–196
- Bhatta R., Uyeno Y., Tajima K., Takenaka A., Yabumoto Y., Nonaka I., Enishi O., Kurihara M. 2009. Difference in the nature of the tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, 92: 5512-5522
- Blümmel M. K., Aiple P., Steingass H., Becker K. 1999. A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas formation *in vitro* in feedstuffs of widely differing quality. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 81: 157-167
- Borchers R. 1965. Proteolytic activity of rumen fluid *in vitro*. *Journal of Animal Science*, 24: 1033-1038
- Broderick G. A., Balthrop J. E. 1979. Chemical inhibition of amino acid deamination by ruminal microbes *in vitro*. *Journal of Animal Science*, 49: 1101-1111
- Busquet M., Greathead H., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. 2003. Efecto del extracto de ajo y el cinamaldehido sobre la produccion, composicion y residuos en leche en vacas de alta produccion. *ITEA*, 242: 756-758
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Cardozo P. W., Kamel C. 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continious culture. *Journal of Dairy Science*, 88: 2508-2516

- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89: 716-771
- Calsamiglia S., Castillejos L., Busquet M. 2006. Alternatives to antimicrobial growth promoters in cattle. V: *Recent advances in animal nutrition 2005*. Garnsworthy P. C., Wiseman J. (ur.). Nottingham, Nottingham University Press: 129-167
- Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. 2004. Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*, 82: 3230-3236
- Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. 2005. Screening of the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high – concentrate diet for beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83: 2572-2579
- Cardozo P. W., S. Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. 2006. Effects of alfaalfa extract, anise, capsicum and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and degradation in beef heifers fed a high concentrate diet. *Journal of Animal Science*, 84: 2801-2808
- Davidson P. M., Naidu A. S. 2000. Phyto-phenols. V: *Natural Food Antimicrobial Systems*. Naidu A. S. (ur.). Boca Raton, CRC Press: 265-293
- DLG. 1997. *Futterwerttabellen. Wiederkäuer*. Frankfurt, DLG Verlag: 212 str.
- Field J.A., Lettinga G. 1987. The methanogenic toxicity and anaerobic degradability of a hydrolysable tannin. *Water Research*, 21: 367-374

- Helander I. M., Alakomi H. L., Latva – Kala K., Mattila – Sandholm T., Pol I., Smidd E. J., Gorris L. G. M., Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram – negative bacteria. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3590-3595
- Jansman A. J. M. 1993. Tannins in feedstuffs for simple – stomached animals. *Nutrition Research Reviews*, 6: 209-236
- Jayanegara A., Togtokhbayar N., Makkar H.P.S., Becker K. 2009. Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an *in vitro* experiments. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96: 365-375
- Juven B. J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *The Journal of Applied Bacteriology*, 76: 626-631
- Kamel C. 2001. Tracing modes of action and the roles of plant extracts in non – ruminants. V: *Recent advances in animal nutrition*. Garnsworthy P. C., Wiseman J. (ur.). Nottingham, Nottingham University Press: 135-150
- Kirchgessner M. 1997. *Tierernährung : Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis*. 10. neubearb. Auflage. Frankfurt (Main), Verlags Union Agrar: 582 str.
- Komprej A., Orešnik A., Pogačnik M., Vidrih A. 2003. Vpliv peroralno dodanih kostanjevih taninov na dnevni prirast in sestavo iztrebkov pri ovcah in kozah. *Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo (Zootehnika)* 82, 1: 25-36
- Kos T. 2007. Vpliv taninov na tvorbo kratkoverižnih maščobnih kislin in metana pri *in vitro* fermentaciji v vampnem soku. *Diplomsko delo*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 66 str.

- Kruger, W. K., Gutierrez – Banuelos H., Carstens G. E., Min B. R., Pinchak W. E., Gomez R. R., Anderson R. C., Krueger N. A., Forbes T. D. A. 2010. Effect of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non – carcass traits in steers fed a high – grain diet. *Animal Feed Science and Technology*, 159: 1-9
- Lavrenčič A., Stefanon B., Susmel P. 1997. An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components. *Animal Science*, 64: 423-431
- Lavrenčič A. 2001. Razgradljivost beljakovin v predželodcih prežvekovalcev. V: 9. tradicionalno posvetovanje "Uporaba kostanjevega tanina v prehrani živali", Podčetrtek, 22. Mar. 2001. Sevnica, Tanin: 39-42
- Makkar H. P. S., Francis G., Becker K. 2007. Bioactivity of phytochemicals in some lesser – known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal*, 1: 1371-1391
- McSweeney C.S., Palmer B., McNeil D.M., Krause D. O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 83-93
- Mueller-Harvey I. 2001. Analysis of hydrolysable tanins. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 3-20
- Nikaido H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science*, 264: 382-388
- Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22. September 2003 on additives for Use in Animal Nutrition. 2003. Official Journal of the European Union: L268: 29-43
- Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tanins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883

Tanin Sevnica d.d. Prehrana živali.

http://www.tanin.si/podstrani_slo/prehrana_zivali/prehrana_zivali.php (11. jan. 2016)

Toreal P. G., Hervas G., Bichi E., Belenguer A., Frutos P. 2011. Tannins as feed additives to modulate ruminal biohydrogenation: effects on animal performance, milk fatty acid composition and ruminal fermentation in dairy ewes fed a diet containing sunflower oil. *Animal Feed Science Technology*, 164: 199-206

ZAHVALA

Najprej bi se rad zahvalil mentorju Prof. dr. Andreju Lavrenčiču za njegovo pomoč, čas in strokovno kritiko, tako pri *in vitro* poskusu kot tudi pri pisanju magistrske naloge.

Recenzentu prof. dr. Gorazdu Avguštinu za korekten pregled in kritično presojo naloge.

Zahvalil bi se tudi g. Mojci Koman Rajšp in Marku Kodri, ter vsem ostalim zaposlenim v laboratoriju na Katedri za prehrano, Oddelka za zootehniko za sproščeno vzdušje in vso pomoč pri *in vitro* poskusu, ter izvedbi vseh analiz.

Zahvaljujem se g. Ivanu Mirtu in sodelavcem iz podjetja Tanin Sevnica d.d. za predlagano tematiko in vse dodatke, ki smo jih potrebovali za izvedbo poskusa.

Posebna zahvala gre vsem mojim prijateljem, kolegom in kolegicam tako doma kot v Ljubljani, ki so mi stali ob strani in mi vedno nudili pomoč kakršna je bila v tistem trenutku potrebna.

Nazadnje pa se morem zahvaliti svoji družini za vso njihovo podporo, spodbudo, razumevanje in zaupanje skozi celotno študijsko obdobje. Brez vas, ki ste mi vsa leta omogočali študij moj cilj nebi bil dosegljiv. Hvala!