

POTEK FERMENTACIJE ŠKROBA OB DODATKU RAZLIČNIH VRST TANINOV

Urška SIVKA ^{a)} in Andrej LAVRENČIČ ^{b)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška Fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, e-pošta: sursek@gmail.com.

^{b)} Isti naslov kot ^{a)}, doc., dr.

Delo je prispelo 12. julija 2007, sprejeto 26. oktobra 2007.

Received July 12, 2007, accepted October 26, 2007.

IZVLEČEK

Proučevali smo vpliv vrste in koncentracije različnih taninskih izvlečkov na kinetiko *in vitro* fermentacije škroba v vampnem soku. K škrobu smo dodali tri taninske izvlečke: kostanjev tanin (F75), kebračo tanin (QUE) in taninsko kislino (TAK) v različnih koncentracijah: 0 (kontrola), 0,33, 0,67 in 1,33 mg taninskega izvlečka ml⁻¹ medija. S pomočjo Gompertzove funkcije smo ocenili kazalnike fermentacije, skupno potencialno produkcijo plina (B), specifično hitrost fermentacije (C) in konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A) ter izračunali čas največje hitrosti fermentacije (ČNHF), največjo hitrost fermentacije (NHF) in časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG). Z dodatkom F75 (507,8 ml g⁻¹ SS) in QUE (474,2 ml g⁻¹ SS), se je skupna potencialna produkcija plina iz škroba v primerjavi s kontrolo (528,4 ml g⁻¹ SS) statistično značilno zmanjšala ($p < 0,05$). Nasprotno pa se je skupna potencialna produkcija plina z dodatkom TAK v povprečju povečala. Največjo hitrost fermentacije škroba (50,6 ml h⁻¹) smo izmerili po skoraj 9. urah inkubacije. ČNHF se je z dodatkom taninskih izvlečkov statistično značilno podaljšal, še najbolj ob dodatku 0,33 mg taninskih izvlečkov/ml medija. Vrsta taninskega izvlečka in koncentracija taninskega izvlečka sta statistično značilno vplivala ($p < 0,01$) na največjo hitrost fermentacije škroba. Še najmanj se je NHF zmanjšala ob dodatku F75 (42,0 ml h⁻¹), medtem ko se je NHF ob dodatku TAK zmanjšala na 38,1 ml h⁻¹, ob dodatku QUE pa na 34,7 ml h⁻¹. NHF se je najbolj zmanjšala ob dodatku taninskih izvlečkov v koncentraciji 0,67 mg ml⁻¹ medija.

Ključne besede: prehrana živali / tanini / škrob / fermentacija / vamp / Gompertz / produkcija plina

THE COURSE OF FERMENTATION OF STARCH WITH THE ADDITION OF DIFFERENT TYPES OF TANNINS

ABSTRACT

Four different concentrations (0 (control), 0.33, 0.67 and 1.33 mg ml⁻¹ medium) of three tannin extracts (chestnut (F75) and quebracho (QUE) tannin extracts and tannic acid (TAK) were used to investigate their effect on the kinetics of *in vitro* fermentation of starch. Gas production was measured at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 h after the start of incubation. Gompertz model was used to estimate kinetic parameters "B" (total potential gas production), "C" (relative degradation rate) and "A" (constant decay in relative degradation rate). First and second derivatives of Gompertz model were used to calculate the maximum fermentation rate (MFR) and time of maximum fermentation rates (TMFR). Addition of F75 (507.8 ml g⁻¹ DM) and QUE (474.2 ml g⁻¹ DM) significantly decreased ($P < 0.05$) total potential gas production compared to control (528.4 ml g⁻¹ DM). On contrary, the addition of TAK (560.5 ml g⁻¹ DM) significantly increased total potential gas production. Maximum fermentation rate of starch (50.6 ml h⁻¹) occurred after almost 9 hours of incubation. The addition of tannin extracts significantly increased TMFR; this increase was greatest when 0.33 mg of tannin extracts were added to the

medium. Type and concentration of tannin extracts had significant effect ($P < 0.01$) on maximum fermentation rate of starch. The lowest reduction in MFR was determined when F75 was used (MFR reduced to 42.0 ml h^{-1}), while it was reduced to 38.1 ml h^{-1} when TAK and 34.7 ml g^{-1} when QUE were used. The greatest reduction in MFR was determined when the concentration of 0.67 mg of tannin extracts/ml medium was used.

Key words: animal nutrition / tannins / starch / fermentation / rumen / Gompertz / gas production

UVOD

Izmed nestrukturnih ogljikovih hidratov je škrob najpomembnejša sestavina krme, ki zagotavlja energijo visoko produktivnim kravam molznicam in govejim pitancem. Razgradnja škroba v predželodcih poteka pod vplivom anaerobnih bakterij vrst *Streptococcus bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteriodes ruminicola* in *Selenomonas ruminatium* (Huntington, 1997). Pri anaerobni fermentaciji škroba nastaja poleg hlapnih maščobnih kislin tudi mlečna kislina. Ob prekomernem zauživanju škroba se zaradi fermentacije začnejo kopičiti hlapne maščobne kisline in mlečna kislina, kar zniža pH predželodcev na raven, ki negativno vpliva na delovanje predželodcev, prirejo mleka in zdravje živali (Hoover in Miller-Webster, 1998). Hitrost in obseg razgradnje škroba v predželodcih sta odvisna od sestave obroka, količine zaužite krme, mehanične in kemične obdelave krme ter prilagoditve vampnih mikroorganizmov na substrat (Huntington, 1997). Na razgradnjo škroba v predželodcih lahko vplivamo z dodatki, kot so maščobe in maščobne kisline, formaldehid ali fenolne spojine, med katere prištevamo tudi tanine.

Tanini so razširjeni po vseh rastlinskih družinah. Najdemo jih tako v travniških rastlinah, kot tudi v grmovnih in drevesnih vrstah. Na splošno so tanini topni v vodi, vendar pa se topnost molekul s povečevanjem molekulske mase zmanjšuje (Lavrenčič, 2001). Zaradi velikega števila hidroksilnih skupin tvorijo tanini različne vrste vezi z beljakovinami, aminokislinami, ogljikovimi hidrati, kovinskimi ioni, vitamini, bakterijskimi celičnimi membranami in encimi vključenimi v razgradnjo beljakovin in ogljikovih hidratov (Mole in Waterman, 1987; Haslam, 1989; Butter in sod., 1999; Makkar, 2003).

Tanine delimo na kondenzirane in hidrolizirajoče tanine. Kondenzirani tanini so oligomeri in polimeri flavanolnih enot (flavan-3-olov in flavan-4-diolov), povezanih z ogljikovimi vezmi, ki niso dovzetne na hidrolizo (Hagerman in Butler, 1991). Hidrolizirajoči tanini vsebujejo ogljikohidratno jedro (ponavadi D-glukozo), ki tvori estre z galno kislino (galotanini) ali heksahidroksidifensko kislino (elagitanini) (Mangan, 1988). Obe skupini taninov lahko vplivata na zdravje živali tako pozitivno kot negativno, kar je odvisno od vrste in koncentracije tanina v obroku, vrste živali ter fiziološkega stanja živali (Kumar in Vaithyanathan, 1990; Butter in sod., 1999; Makkar, 2003). Nizke koncentracije taninov (pod 50 g/kg SS obroka) povečujejo sintezo mikrobnih beljakovin in zmanjšujejo razgradljivost beljakovin v predželodcih prežvekovalcev, zaradi česar se zmanjša količina izločenega dušika v okolje (Butter in sod., 1999; Makkar, 2003). Zaradi njihovega vpliva na delovanje mikroorganizmov se zmanjša tudi tvorba metana v predželodcih prežvekovalcev (Roth, 2003). Tanini v majhnih koncentracijah torej pozitivno vplivajo na prirejo mleka, mesa in volne, saj povečujejo tok esencialnih aminokislin v tanko črevo. Nasprotno pa so (pre)velike koncentracije tako kondenziranih kot tudi hidrolizirajočih taninov strupene. Presežke hidrolizirajočih taninov vampni mikroorganizmi lahko do neke mere razgradijo (Makkar, 2003), kar pa ne velja za kondenzirane tanine (McSweeney in sod., 2001).

Tvorba kompleksov med tanini in beljakovinami oz. aminokislinami je še vedno predmet številnih raziskav vpliva taninov na razgradljivost beljakovin v predželodcih prežvekovalcev. Manj so se raziskovalci posvečali preučevanju vpliva taninov na razgradnjo oz. fermentacijo ogljikovih hidratov. Reed (1995) in McSweeney in sod. (2001) navajajo, da tanini tvorijo močne vodikove vezi s celulozo, hemicelulozo, škrobom ter pektini. Poleg tega pa se tanini vežejo na

mikrobne encime (beljakovine), ki so vključeni v presnovo ogljikovih hidratov (Makkar in sod., 1987, cit po. Butter in sod., 1999; McSweeney in sod., 2001), s čimer inhibirajo njihovo delovanje. Kljub temu antimikrobnemu delovanju, pa Scalbert (1991) navaja, da lahko številni mikroorganizmi v prisotnosti taninov normalno rastejo in se razvijajo.

In vitro produkcija plina je ena od tehnik, s katerimi ugotavljamo mikrobno aktivnost vampnih mikroorganizmov (Williams in sod., 2001). Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kako različni taninski izvlečki v različnih koncentracijah vplivajo na kinetiko sproščanja plina pri *in vitro* fermentaciji čistega škroba oz. kako ti izvlečki vplivajo na amilolitično aktivnost vampnih mikroorganizmov.

MATERIAL IN METODE

In vitro fermentacijo škroba smo izvedli po metodi, ki jo navajata Menke in Steingass (1988), le da smo vampni sok odvzeli uro in pol po jutranjem krmljenju. Vampni dok smo odvzeli iz dveh fistuliranih kastriranih ovnov jezersko-solčavske pasme, ki smo jih krmili s senom (po volji), sestavljeno krmno mešanico (300 g dan⁻¹) in rudninsko vitaminsko mešanico (50 g dan⁻¹), ter tako pokrili vzdrževalne potrebe po hranljivih snoveh.

Krompirjev škrob (Art.št. 101252, Merck, Darmstadt, Nemčija) smo uporabili kot substrat za *in vitro* fermentacijo. Pred inkubacijo smo škrobu primešali tri različne taninske izvlečke: kostanjev tanin (farmatan 75[®] (F75); Tanin Sevnica, Slovenija), taninsko kislino (TAK; Sigma-Aldrich, Nemčija) in kebračo tanin (QUE; Roy Wilson Dickson, Velika Britanija) v koncentracijah 0 (kontrola), 0,33, 0,67 in 1,33 mg ml⁻¹ medija.

V brizgalke smo zatehtali 175 mg substrata in dodali ustrezno količino taninskega izvlečka. Substratu s taninskim izvlečkom ali brez njega smo nato dodali še 30 ml mešanice vampnega soka in pufru (10 ml vampnega soka in 20 ml pufru) ter jih postavili v vodno kopel ogreto na 39 ± 0,5 °C. Vsako kombinacijo substrata in taninskega izvlečka v različnih koncentracijah smo izvedli v treh ponovitvah. Skupaj z vzorci smo inkubirali tudi slepe vzorce (brizgalke brez vzorca) in vzorec standardnega krmila (seno mnogocvetne ljujke), s katerim smo primerjali aktivnosti vampnega soka med posameznimi serijami.

Prostornino sproščenega plina smo odčitali 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 in 96 ur po začetku inkubacije.

Kazalnike *in vitro* fermentacije škroba smo ocenili za vsako kombinacijo koncentracije in vrste taninskega izvlečka s pomočjo Gompertzove funkcije (Bidlack in Buxton, 1992; Lavrenčič in sod., 1997):

$$y(t) = B e^{-C} e^{-At}, \quad [1]$$

kjer je »y« produkcija plina (ml) v času inkubacije »t«, »B« skupna potencialna produkcija plina (ml g⁻¹ SS), »C« specifična hitrost fermentacije, na katero vpliva konstantni faktor »A«, s katerim označujemo faktor mikrobne (ne)učinkovitosti. Kazalnike B, C in A smo ocenili kot nelinearno regresijo (PROC NLIN) v statističnem programskem paketu SAS (SAS, 2001).

Spremembe v hitrosti fermentacije smo ocenili s prvim odvodom Gompertzove funkcije po času »t«:

$$\frac{dy}{dt} = BCA e^{-At} e^{-Ce^{-At}}. \quad [2]$$

Z drugim odvodom Gompertzove funkcije po času, ki smo ga izenačili z nič (0) in rešili po času »t«, smo izračunali čas največje hitrosti fermentacije (h; ČNHF):

$$\frac{d^2y}{dt^2} = AB^2C^2(e^{-At})^2 e^{-Ce^{-At}} - ABC^2 e^{-Ce^{-At}} = 0. \quad [3]$$

Največjo hitrost fermentacije (ml h⁻¹; NHF) smo izračunali tako, da smo ustrezne ČNHF vstavili v prvi odvod Gompertzove funkcije.

Za substrat z vsako kombinacijo koncentracije in vrste taninskega izvlečka smo s pomočjo kazalnikov fermentacije izračunali tudi časovni zaostanek začetka fermentacije (h; LAG):

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

Ocenjene kazalnike fermentacije (B, C in A) ter izračunane kazalnike ČNHF, NHF in LAG smo analizirali z metodo najmanjših kvadratov v proceduri GLM (General Linear Model):

$$y_{ijk} = \mu + T_i + K_j + TK_{ij} + e_{ijk},$$

kjer je »y_{ijk}« opazovana vrednost, »μ« srednja vrednost, »T_i« sistematski vpliv vrste taninskega izvlečka, »K_j« sistematski vpliv koncentracije taninskega izvlečka ter »TK_{ij}« interakcija med taninskim izvlečkom in koncentracijo taninskega izvlečka. Statistično značilne razlike (p < 0,05) med vrstami in koncentracijami posameznega taninskega izvlečka smo ovrednotili s pomočjo Tukey-Kramer testa (SAS, 2001).

REZULTATI

Vpliv taninskega izvlečka

V preglednici 1 so predstavljeni ocenjeni kazalniki fermentacije škroba. Na vse tri ocenjene kazalnike fermentacije sta statistično značilno (p < 0,01) vplivala tako vrsta kot koncentracija taninskega izvlečka. Poleg vrste in koncentracije taninskega izvlečka je na ocenjene kazalnike fermentacije vplivala (p < 0,001) tudi interakcija med vrsto taninskega izvlečka in njegovo koncentracijo.

Dodatka taninskih izvlečkov F75 in QUE v medij sta skupno potencialno produkcija plina iz škroba v primerjavi s kontrolo zmanjšala. Najbolj je skupno potencialno produkcijo plina zmanjšal dodatek QUE (za 54,2 ml g⁻¹ SS), medtem ko je dodatek F75 zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina za 20,6 ml g⁻¹ SS. Ravno nasprotno pa je dodatek taninske kisline (TAK) skupno potencialno produkcijo plina povečal od 528,4 ml g⁻¹ SS (kontrola) na 560,5 ml g⁻¹ SS (pregl. 1).

Specifična hitrost fermentacije škroba (C) brez dodanega taninskega izvlečka je bila 10,1 (pregl. 1). Dodatek QUE in TAK sta specifično hitrost fermentacije škroba zmanjšala na 7,6 (QUE) in 8,4 (TAK), medtem ko je specifična hitrost fermentacije ob dodanem F75 ostala bolj ali manj nespremenjena (10,8).

Konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A) škroba (0,260) se je dodajanjem taninskih izvlečkov zmanjšal za 30 % ob dodatku TAK, 23 % ob dodatku QUE in 14 % ob dodatku F75 (pregl. 1).

V preglednici 2 so predstavljeni izračunani kazalniki fermentacije škroba. Na izračunane kazalnike fermentacije (LAG, ČNHF in NHF) sta statistično značilno (p < 0,05) vplivala vrsta in koncentracija taninskega izvlečka. Enako kot pri ocenjenih kazalnikih fermentacije je tudi

interakcija med vrsto taninskega izvlečka in njegovo koncentracijo statistično značilna ($p < 0,01$).

Preglednica 1. Ocenjeni kazalniki fermentacije po inkubaciji z različnimi vrstami in koncentracijami taninskih izvlečkov

Table 1. Estimated kinetic parameters after incubation with different types and concentrations of tannins extracts

	Ocenjeni kazalniki fermentacije / Estimated kinetic parameters								
	B (ml g ⁻¹ SS) [†] B (ml g ⁻¹ DM)			C [†]			A [†]		
	F75	QUE	TAK	F75	QUE	TAK	F75	QUE	TAK
Koncentracija TI [‡] Concentration TE									
0		528,4 ^{a†}		10,1 ^a			0,260 ^a		
1	504,8 ^{ba}	503,7 ^{ba}	537,3 ^{acB}	6,1 ^{ba}	9,3 ^{ab}	6,6 ^{ba}	0,130 ^{ba}	0,186 ^{bb}	0,120 ^{ba}
2	511,0 ^{ba}	462,2 ^{cb}	581,5 ^{bc}	15,9 ^{ca}	7,1 ^{bb}	11,0 ^{ab}	0,308 ^{ca}	0,213 ^{cb}	0,266 ^{ac}
3	507,6 ^{ba}	456,6 ^{cb}	562,7 ^{bcC}	10,5 ^{aa}	6,4 ^{bb}	7,5 ^{baB}	0,234 ^{da}	0,199 ^{bcAB}	0,164 ^{bb}
SDO [§] / RMSE		9,26		1,06			0,01		
Statistična značilnost Statistical significance									
Taninski izvleček (T) Tannin extract (T)		***		***			***		
Koncentracija TI (K) Concentration TE (K)		**		***			***		
TI × K TE × K		***		***			***		

[†] B – skupna potencialna produkcija plina / total potentially gas production, C – specifična hitrost fermentacije / relative degradation rate, A – konstantni faktor mikrobn(e)učinkovitosti / constant decay in relative degradation rate;

[‡] 0 – kontrola / control, 1 – 0,33 mg ml⁻¹ medija / 0.33 mg ml⁻¹ medium, 2 – 0,67 mg ml⁻¹ medija / 0.67 mg ml⁻¹ medium, 3 – 1,33 mg ml⁻¹ medija / 1.33 mg ml⁻¹ medium;

[§] SDO – standardni odklon ostanka / RMSE – root mean square error;

^{abcd} vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$) / means in a column differ significantly ($p < 0,05$);

^{ABCD} vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$) / means in a row differ significantly ($p < 0,05$);

Dodatek taninskih izvlečkov je glede na kontrolo podaljšal časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG) škroba (pregl. 2). LAG je bil najkrajši ob dodatku QUE (5,1 ure) in najdaljši ob dodatku TAK (6,3 ure). LAG je bil ob dodatku TAK v povprečju za 20 % daljši od izračunanega za kontrolo (5,0 ure).

Škrob brez dodatkov taninskih izvlečkov je najhitreje fermentiral 8,9 ure po začetku inkubacije, ko se je sprostil 50,6 ml/uro (pregl. 2 in slika 1). Najkasneje je največjo hitrost fermentacije škrob dosegel z dodatkom TAK (12,5 h), medtem ko je dodatek F75 in QUE v medij čas največje hitrosti fermentacije (ČNHF) podaljšal za največ dve uri.

Največja hitrost fermentacije (NHF) škroba je se je z dodatkom taninskih izvlečkov zmanjšala (pregl. 2 in slika 1). V primerjavi s kontrolo (50,6 ml h⁻¹) je najmanjši vpliv na NHF imel dodatek F75 (42,0 ml h⁻¹), kateremu sta sledila dodatka TAK (38,1 ml h⁻¹) ter QUE (34,7 ml h⁻¹).

Vpliv koncentracije taninskega izvlečka

S povečevanjem koncentracije posameznih taninskih izvlečkov se skupna potencialna produkcija plina zmanjšuje. V primerjavi s kontrolo (528,4 ml g⁻¹ SS) je dodatek 1,33 mg QUE

ml⁻¹ medija najbolj zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina (456,6 ml g⁻¹ SS), medtem ko se skupna potencialna produkcija plina pri različnih koncentracijah F75 ni statistično značilno spremenila. Za razliko od QUE in F75 pa je v primerjavi s kontrolo dodatek TAK povečal skupno potencialno produkcijo plina iz škroba, ki je do koncentracije 0,67 mg TAK ml⁻¹ medija naraščala (581,5 ml g⁻¹ SS), pri največji koncentraciji pa se je zmanjšala na 562,7 ml g⁻¹ SS. Taninska izvlečka F75 in QUE sta imela enak učinek na skupno potencialno produkcijo plina pri koncentraciji 0,33 mg ml⁻¹ medija (pregl. 1). Pri večjih koncentracijah (0,67 in 1,33 mg ml⁻¹ medija) je QUE statistično značilno zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina iz škroba.

Preglednica 2. Izračunani kazalniki fermentacije po inkubaciji z različnimi vrstami in koncentracijami taninskih izvlečkov

Table 2. Calculated kinetic parameters after incubation with different types and concentrations of tannins extracts

	Izračunani kazalniki fermentacije Calculated kinetic parameters								
	LAG (h) [†]			ČNHF (h) [†] TMFR (h)			NHF (ml h ⁻¹) [†] MFR (ml h ⁻¹)		
	F75	QUE	TAK	F75	QUE	TAK	F75	QUE	TAK
Koncentracija TI [‡] Concentration TE									
0		5,0 ^{a†}			8,9 ^a		50,6 ^a		
1	6,1 ^{bA}	6,6 ^{bB}	7,4 ^{bC}	13,8 ^{bA}	12,0 ^{bB}	15,8 ^{bC}	24,2 ^{bA}	34,4 ^{bB}	23,6 ^{bA}
2	5,7 ^{abA}	4,5 ^{cB}	5,2 ^{aA}	8,9 ^a	9,2 ^a	9,0 ^a	58,0 ^{cA}	36,2 ^{bB}	56,9 ^{aA}
3	5,7 ^{abA}	4,3 ^{cB}	6,2 ^{cA}	10,0 ^c	9,3 ^a	12,6 ^c	43,8 ^d	33,4 ^b	33,8 ^b
SDO [§] / RMSE		0,28			0,74			2,82	
Statistična značilnost Statistical significance									
Taninski izvleček (TI) Tannin extract (TE)		***			***			**	
Koncentracija TI (K) Concentration TE (K)		***			***			***	
TI × K TE × K		***			**			***	

[†] LAG – časovni zaostanek začetka fermentacije (h) / lag phase (h), ČNHF – čas največje hitrosti fermentacije (h) / TMFR – time of maximum fermentation rates (h), NHF – največja hitrost fermentacije (ml h⁻¹) / MFR – maximum fermentation rate (ml h⁻¹);

[‡] 0 – kontrola / control, 1 – 0,33 mg ml⁻¹ medija / 0,33 mg ml⁻¹ medium, 2 – 0,67 mg ml⁻¹ medija / 0,67 mg ml⁻¹ medium, 3 – 1,33 mg ml⁻¹ medija / 1,33 mg ml⁻¹ medium;

[§] SDO – standardni odklon ostanka / RMSE – root mean square error;

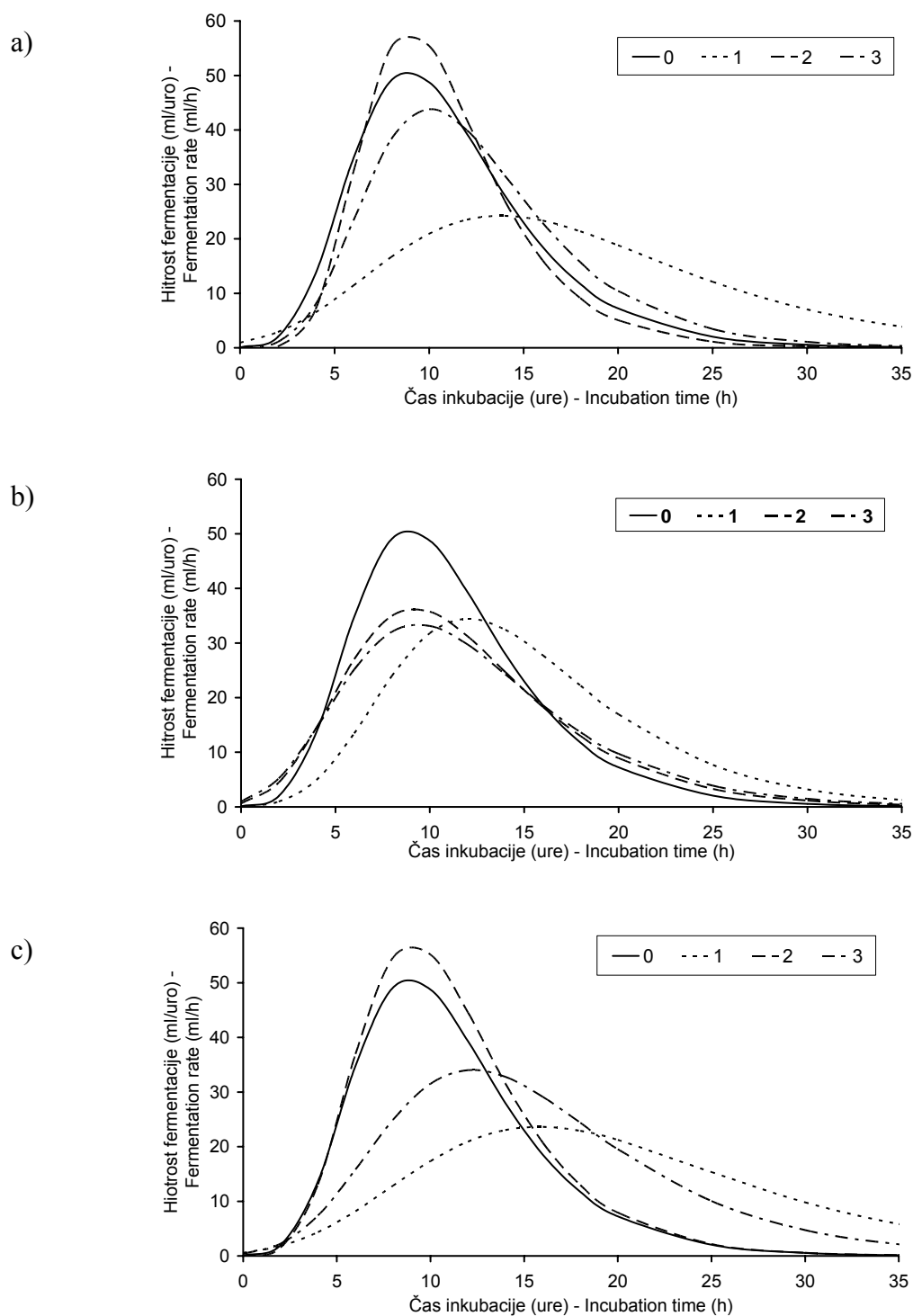
^{abcd} vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo (p < 0,05) / means in a column differ significantly (P < 0,05);

^{ABCD} vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo (p < 0,05) / means in a row differ significantly (P < 0,05);

Pri koncentraciji F75 in TAK 0,33 mg ml⁻¹ medija je bila specifična hitrost fermentacije škroba statistično značilno manjša (6,1 za F75 in 6,6 za TAK) od škroba, brez dodanega taninskega izvlečka. Specifična hitrost fermentacije se je s povečanjem koncentracije F75 in TAK povečala na 15,9 in 11,0, potem pa upadla na 10,5 in 7,5. S povečevanjem koncentracije QUE se je specifična hitrost fermentacije škroba zmanjšala od 9,3 pri koncentraciji 0,33 mg ml⁻¹ medija na 6,4 pri 1,33 mg ml⁻¹ medija.

Na konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti najbolj vplivajo najmanjše koncentracije taninskih izvlečkov (pregl. 1). Z naraščanjem koncentracije taninskega izvlečka do koncentracije

0,67 mg ml⁻¹ medija narašča tudi konstantni faktor mikrobnе (ne)učinkovitosti, ki pa se pri največji koncentraciji ponovno zmanjša.



Slika 1. Hitrost fermentacije škroba pri različnih koncentracijah taninskih izvlečkov a) F75, b) QUE in c) TAK (0 – kontrola, 1– 0,33 mg ml⁻¹; 2 – 0,67 mg ml⁻¹ in 3 – 1,33 mg ml⁻¹ medija).

Figure 1. Starch fermentation rate at different tannin extract concentrations a) F75, b) QUE and c) TAK (0 – control, 1 – 0.33 mg ml⁻¹; 2 – 0.67 mg ml⁻¹ in 3 – 1.33 mg ml⁻¹ of medium).

V primerjavi s škrobom brez dodanega taninskega izvlečka je koncentracija 0,67 mg taninskega izvlečka ml⁻¹ medija podaljšala časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG) v povprečju za 2 %, medtem ko je koncentracija 1,33 mg taninskega izvlečka ml⁻¹ medija podaljšala LAG za 7 %. LAG se je ob dodatku F75 in QUE skrajšal, vendar je bil pri vseh koncentracijah F75 daljši kot LAG kontrole, medtem ko se je bil pri največjih koncentracijah QUE statistično značilno krajši od kontrole (pregl. 2). Ob uporabi 0,33 mg TAK ml⁻¹ medija je bil LAG v primerjavi s kontrolo statistično značilno daljši, nato pa se je skrajšal na 6,2 ure.

Daljši časovni zaostanek začetka fermentacije je vplival tudi na čas največje hitrosti fermentacije (ČNHF; pregl. 2 in slika 1). Ob dodajanju različnih koncentracij taninskih izvlečkov se je čas največje hitrosti fermentacije škroba podaljšal. Najdaljši ČNHF smo izračunali za škrob, ki smo ga inkubirali s taninskimi izvlečki v koncentraciji 0,33 mg ml⁻¹ medija (13,8 ure za F75, 12,0 ure za QUE in 15,8 ure za TAK). ČNHF je bil pri koncentraciji 0,67 mg taninskega izvlečka ml⁻¹ medija enak kot pri kontroli. Pri koncentraciji 1,33 mg taninskega izvlečka ml⁻¹ medija sta se glede ČNHF od kontrole statistično razlikovala samo F75 in TAK. ČNHF se med taninskimi izvlečki pri koncentracijah 0,67 in 1,33 mg ml⁻¹ medija ni statistično značilno razlikoval.

Pri koncentraciji 0,67 mg ml⁻¹ medija se največja hitrost fermentacije (NHF; 50,4 ml h⁻¹) ni statistično značilno razlikovala od kontrole (50,6 ml h⁻¹). V primerjavi s kontrolo pa je bila NHF statistično značilno manjša (27,4 ml h⁻¹) pri koncentraciji taninskih izvlečkov 0,33 mg ml⁻¹ medija (pregl. 2 ter slike 1, 2 in 3). Pri koncentraciji 0,67 mg ml⁻¹ medija F75 (58,0 ml h⁻¹) in TAK (56,9 ml h⁻¹) je bila NHF večja kot kontrola, medtem ko so bile NHF pri največji koncentraciji statistično značilno manjše kot pri kontroli.

RAZPRAVA

Taninska izvlečka F75 in QUE sta zmanjšala *in vitro* produkcijo plina med anaerobno inkubacijo škroba. Do podobnih rezultatov je z istima vrstama izvlečkov prišla tudi Roth (2003). Zmanjšan obseg fermentacija škroba v prisotnosti taninov v primerjavi s kontrolo je najverjetneje posledica tvorbe kompleksov med tanini in škrobom (Butter in sod., 1999; McSweeney in sod., 2001; Makkar, 2003) oziroma povezava taninov z vampnimi mikroorganizmi (Jones in sod., 1994) in/ali njihovimi encimi, ki so vključeni v fermentacijo škroba (Makkar in sod., 1987, cit. po Butter in sod., 1999). Martínez in sod. (2006) navajajo, da tanini kebrača in taninska kislina ne inhibirajo vezave mikroorganizmov na škrobna zrna, ampak zmanjšujeta hidrolizo škroba tako, da zmanjšujeta razgradnje beljakovinske ovojnice škrobnih zrn. TAK je za razliko od F75 in QUE povečal skupno potencialno produkcijo plina iz škroba. Ti rezultati so v skladu z rezultati, ki jih navajajo Nelson in sod. (1995) ter Singh in sod. (2001). To pomeni, da taninska kislina ne inhibira mikrobne aktivnosti. To sta potrdila tudi O'Donovan in Brooker (2001), ki sta gojila bakterijo *Streptococcus gallolyticus* v prisotnosti taninske kisline in ugotovila, da ta bakterija normalno raste tudi pri koncentraciji 7 % (w/v) taninske kisline. Nelson in sod (1995) je preučeval rast vampnih anaerobnih bakterij in ugotovil, da so rasle neovirano pri koncentraciji 3 % (w/v) taninske kisline, kar je kar trikrat večja koncentracija od tiste, ki smo jo uporabili v našem poskusu. Čeprav mnogi avtorji poročajo o zmanjševanju produkcije plina zaradi povečevanja koncentracije taninskih izvlečkov (Longland in sod., 1995; Zimmer in Cordesse, 1996; Lavrenčič, 2001; Roth, 2003), tega trenda v naši raziskavi nismo mogli dokazati za vse preučevane taninske izvlečke (pregl. 1). Silanikove in sod. (2001) ter Reed (1995) navajajo, da je vezava taninov na ogljikove hidrate in beljakovine odvisna od lastnosti taninov in lastnosti substratov, ki jih opredeljujejo molekulska masa, terciarna struktura, izoelektrična točka in kompatibilnost mest za vezavo. Tudi to je lahko razlog, da se naši rezultati razlikujejo od objavljenih v strokovni literaturi.

Časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG) je faza prilagajanja mikroorganizmov na novo okolje in poselitev mikroorganizmov na substrat. Dodatek taninskih izvlečkov je podaljšal časovni zaostanek začetka fermentacije škroba (pregl. 2). O'Donovan in Brooker (2001) sta opazila, da je začetek rasti *Streptococcus gallolyticus* in *Streptococcus bovis* odložen ob dodatku taninske kisline. Roth (2003) poroča, da je časovni zaostanek začetka fermentacije graha podaljšan s povečevanjem koncentracije taninskega izvlečka mimoze (kondenziran tanin). Daljši časovni zaostanek začetka fermentacije je verjetno posledica vezave taninskih izvlečkov na mikrobne encime. Ker se tanini vežejo tudi na substrat, le ta postane nedostopen za encime, ki razkrajajo ogljikove hidrate (Scalbert, 1991; McSweeney in sod., 2001; Kumar in Singh, 1984). O'Donovan in Brooker (2001) menita, da je daljši časovni zaostanek začetka fermentacije substrata lahko posledica tvorbe zaščitnega sloja na površini mikroorganizmov. Ta sloj sestavljajo predvsem glikoproteini, ki imajo veliko afiniteto do taninov. Vendar pa tvorba kompleksov med glikoproteini zaščitnega sloja in tanini prepreči predvsem vezavo taninov na mikrobne encime (Scalbert, 1991; McSweeney in sod., 2001), zato tanini ne bi smeli bistveno vplivati na časovni zaostanek začetka fermentacije.

Najhitreje je škrob fermentiral po 9 urah inkubacije ter dosegel hitrost $50,6 \text{ ml h}^{-1}$ (pregl. 2 in slika 1). Dodatek taninskih izvlečkov je podaljšal čas največje hitrosti fermentacije škroba in zmanjšal največjo hitrost fermentacije škroba. Najmanjši učinek na največjo hitrost fermentacije škroba je imel kostanjev tanin (Farmatan 75), največjega pa dodatek kebračo taninov (QUE). Roth (1003) je primerjala kinetike *in vitro* fermentacije sojinih tropin v prisotnosti taninskih izvlečkov in ugotovila, da kostanjev tanin (farmatan) upočasni fermentacijo sojinih tropin bolj kot pa tanini kebrača in mimoze. Manjšo hitrost *in situ* razgradnje travniškega sena v prisotnosti kostanjevih taninov sta ugotovila tudi Zimmer in Cordesse (1996). Hervás in sod. (2003) so ugotavljali potek *in vitro* fermentacije voluminozne krme ob dodatku različnih koncentracij taninov kebrača in ugotovili, da se hitrost fermentacije s povečevanjem koncentracije taninskega izvlečka zmanjšuje. Do podobnih rezultatov *in vitro* so prišli tudi Makkar in sod. (1995), ki so dokazali, da se obseg in hitrost razgradnje travniškega sena s povečevanjem koncentracije taninov kebrača zmanjšuje.

SKLEPI

Dodatek taninskih izvlečkov je spremenil potek *in vitro* fermentacije škroba. Pri tem se zmanjšata prostornina proizvedenega plina in hitrost fermentacije. Vrsta in koncentracija taninskega izvlečka sta imela močan vpliv ($p < 0,01$) na skupno potencialno produkcijo plina. Dodatek taninskih izvlečkov je podaljšal začetek fermentacije škroba za največ dve uri ($0,33 \text{ mg ml}^{-1} \text{ TAK}$). Največjo hitrost fermentacije ($50,6 \text{ ml h}^{-1}$) škroba smo zabeležili po skoraj 9. urah od začetka fermentacije. Z dodatkom taninskih izvlečkov se je največja hitrost fermentacije zmanjšala, podaljšal pa se je čas, v katerem je škrob najhitreje fermentiral. S povečevanje koncentracije taninskih izvlečkov se zmanjšujeta skupna potencialna produkcija plina in največja hitrost fermentacije ter podaljšujeta časovni zaostanek začetka fermentacije in čas, v katerem je škrob najhitreje fermentiral.

SUMMARY

Starch is the major energy component in ruminant nutrition. Rate and extent of starch digestion in the rumen are affected by different factors, including source of dietary starch, diet composition, amount of feed consumed, mechanical in chemical alterations and degree of adaptation of rumen microbiota to the diet (Huntington, 1997). Additives such as dietary fat or treatment with formaldehyde or phenolic substances, such as tannins, reduce the rate and extent

starch fermentation in the rumen (Huntington, 1997). Condensed and hydrolysable tannins are capable to form complexes with proteins, amino acids, carbohydrates, metal ions, vitamins, bacterial cell membranes and their enzymes (Mole in Waterman, 1987; Butter in sod., 1999; Makkar, 2003). These complexes are often resistant to microbial attack. The objective of the present work was to investigate effect of different types and concentrations of tannins extracts on extent and rate of starch fermentation.

Potato starch (Merck, Darmstadt, Germany) was used as a substrate and to it three different tannin extracts were added. Chestnut tannin (F75; Tanin Sevnica, Slovenia) and tannic acid (TAK; Sigma-Aldrich, Germany) were members of hydrolysable tannins, whilst quebracho tannin (QUE; Roy Wilson Dickson, Great Britain) belongs to condensed tannin. Concentrations of added tannin extracts were control (0), 0.33 mg ml⁻¹ medium (1), 0.67 mg ml⁻¹ medium (2) and 1.33 mg ml⁻¹ medium (3). In vitro gas production method was performed according to Menke and Steingass (1988). Rumen liquor was taken from two fistulated and castrated adult Jezersko-Solčavska male sheep fed to their maintenance requirements with hay (ad libitum), compound feed (300 g dan⁻¹) and vitamin-mineral supplement (50 g dan⁻¹). Measurements of produced gas were taken 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 hours after the start of incubation.

Gompertz model was used for the determination of total potentially gas production (B), relative degradation rate (C) and constant (A) describing the decay in relative degradation rate. First and second derivatives of Gompertz equation were used to calculate the maximum fermentation rate (MFR) and the time of maximum fermentation rate (TMFR).

Compared to control (528.4 ml g⁻¹ DM) F75 (507.8 ml g⁻¹ DM) and QUE (474.2 ml g⁻¹ DM) decreased total potential gas production (B) of starch (table 1). On contrary, TAK increased the total potential gas production of starch for 6% (560.5 ml g⁻¹ DM). Fermentation of starch started (LAG) after five hours of incubation (table 2). Tannin extracts extended the LAG. Maximum fermentation rate (MFR) of starch occurred after almost 9 hours. Addition of F75, QUE and TAK extended TMFR to 10.9, 10.2 and 12.5 hours, respectively. Maximum fermentation rate of starch was very high (50.6 ml h⁻¹). Addition of tannin extracts reduced MFR of starch to 42 ml h⁻¹ (F75), 38.1 ml h⁻¹ (TAK) and 34.7 ml h⁻¹ (QUE). These results suggest that tannin extracts with their ability to bind to microorganisms, their enzymes and substrate alter the kinetics of *in vitro* starch fermentation.

VIRI

- Bidlack, J. E./ Buxton, D. R. Content and deposition rates of cellulose, hemicellulose, and lignin during regrowth of forage grasses and legumes. *Canadian Journal of Plant Science*, 72(1992), 809–818.
- Butter N.L./ Dawson J.M., Buttery P.J. Effects of dietary tannins on ruminants. V: Secondary plant products: antinutritional and beneficial actions in animal feeding (ur.: Caygill J.C./ Mueller-Harvey I.). Nottingham, Nottingham University Press, 1999, 51–72.
- Hagerman A.E./ Butler L.G. Tannins and Lignins. V: Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites (ur.: Rosenthal G.A./ Berenbaum M.R.). California, Academic Press Inc., 1991, 355–383.
- Haslam E. Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. Cambridge, Cambridge University Press, 1989, 230 str.
- Hervás G./ Frutos P./ Javier Giráldez F./ Mantecón A.R./ Álvarez Del Pino M.C. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 109(2003), 65–78.
- Huntington G.B. Starch utilization by ruminants: From basics to the bunk. *Journal of Animal Science*, 75(1997), 852–867.
- Hoover W.H./ Miller-Webster T.K. Role of sugars and starch in ruminal fermentation. V: Tri-State Dairy Nutrition Conference (ur.: Eastridge M.L.). 1998-04-21/22. Ft. Wajne, ZDA, 1998, 1–16.
- Jones G.A./ McAllister T.A./ Muir A.D./ Cheng K.-J. Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1994)4, 1374–1378.

- Kumar R./ Singh M. Tannins: Their Adverse Role in Ruminant Nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(1984), 447–453.
- Kumar R./ Vaithyanathan S. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 30(1990), 21–38.
- Lavrenčič A. Razgradljivost beljakovin v predželodcih prežvekovalcev. V: 9. tradicionalno posvetovanje Uporaba kostanjevega tanina v prehrani živali, Podčetrtek, 2001-03-22. Sevnica, Tanin, 2001, 39–47.
- Lavrenčič, A./ Stefanon, B./ Susmel, P. An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components. *Animal Science*, 64(1997), 423–431.
- Longland A.C./ Theodorou M.K./ Sanderson R./ Lister S.J./ Powell C.J./ Morris P. Non-starch polysaccharide composition and *in vitro* fermentability of tropical forage legumes varying in phenolic content. *Animal Feed Science and Technology*, 55(1995), 161–177.
- Makkar H.P.S. 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(2003), 241–256.
- Makkar H.P.S./ Blümmel M./ Becker K. *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69(1995), 481–493.
- Mangan J.L. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Reviews*, 1(1988), 209–231.
- Martínez T.F./ McAllister T.A./ Wang Y./ Reuter T. Effects of tannic acid and quebracho tannins on *in vitro* ruminal fermentation of wheat and corn grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(2006), 1244–1256.
- McSweeney C.S./ Palmer B./ McNeill D.M./ Krause D.O. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91(2001), 83–93.
- Menke K.H./ Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28(1988), 7–55.
- Mole S./ Waterman P.G. Tannic acid and proteolytic enzymes: enzyme inhibition or substrate deprivation? *Phytochemistry*, 26(1987)1, 99–102.
- Nelson K.E./ Pell A.N./ Schofield P./ Zinder S. Isolation and characterization of an anaerobic ruminal bacterium capable of degrading hydrolyzable tannins. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1995)9, 3293–3298.
- O'Donovan L./ Brooker J.D. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*, 147(2001), 1025–1033.
- Perez-Maldonado R.A./ Norton B.W. 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(1996), 515–533.
- Reed J.D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73(1995), 1516–1528.
- Roth S. Reducing methane emission and optimising N-supply in ruminants by treating feeds with tannins. Doctoral Dissertation. Aachen, Schaker Verlag, 2003, 155 str.
- Salawu M.B./ Acamovic T./ Stewart C.S./ Hovell F.D.DeB. 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(1997), 67–78.
- Statistical Analysis Systems Institute Inc. The SAS System for Windows, Release 8.02. Cary, NC, USA, 2001.
- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(1991)12, 3875–3883.
- Silanikove N./ Perevolotsky A./ Provenza F.D. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91(2001), 69–81.
- Singh B./ Bhat T.K./ Sharma O.P. Biodegradation of tannic acid in an *in vitro* ruminal sistem. *Livestock Production Science*, 68(2001), 259–262.
- Zimmer N./ Cordesse R. Digestibility and ruminal digestion of non-nitrogenous compounds in adult sheep and goats: Effects of chestnut tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 61(1996), 259–273.
- Williams, B./ Verstegen, M.W.A./ Tamminga, S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews*, 14(2001), 207–227.