

مقایسه روش‌های مختلف تانن‌زدایی برگ گردوی ایرانی (*Juglans regia L.*) و اثر آنها بر

## ترکیب شیمیایی و فراسنجه‌های تخمیری در شرایط برون تنی

بهزاد امیر<sup>۱</sup>، سعید سبحانی راد<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۰

## چکیده

هدف از انجام این آزمایش، تعیین ترکیبات شیمیایی و بررسی روش‌های تانن‌زدایی در برگ گردوی ایرانی (*Juglans regia L.*) و تخمین فراسنجه‌های تخمیری آنها به روش تولید گاز بود. روش‌های مذکور شامل روش‌های خیساندن، جوشاندن، پرکولاسیون و سوکسله بودند. نتایج نشان داد که کاهش مقدار تانن در تمامی روش‌های فرآوری نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار بود. همچنین روش خیساندن سبب افزایش معنی‌دار پروتئین خام، انرژی خام، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی نسبت به سایر تیمارها شد. فرآوری به روش خیساندن نسبت به سایر تیمارها سبب افزایش معنی‌دار تولید گاز جمعی و تولید گاز از بخش نامحلول (b) و افزایش غیرمعنی‌دار نرخ تولید گاز (c)، انرژی قابل متابولیسم و هضم‌پذیری ماده آلی شد ( $p > 0.05$ ). لذا با توجه به نتایج به دست آمده، روش خیساندن و استفاده از آب مقطر نسبت به اتانول، روش مناسبی جهت استخراج تانن از برگ گردو و مصرف آن در خوراک نشخوارکنندگان می‌باشد.

## واژه‌های کلیدی: برگ گردو، تولید گاز، خصوصیات تخمیری، روش‌های تانن‌زدایی

## مقدمه

گردو از درختان بسیار مهم و ارزشمند می‌باشد که در بسیاری از نقاط جهان یافت می‌شود. گردو متعلق به خانواده *Juglandaceae* می‌باشد. گردوی ایرانی (*Juglans regia L.*) مهم‌ترین گونه شناخته شده آن می‌باشد. پوست، مغز، برگ و پوسته گردو در صنایع داروسازی و لوازم آرایشی استفاده می‌شود (Pereira et al., 2007). برگ درخت گردو نیز به عنوان یک محصول فرعی کشاورزی در کشور محسوب می‌شود که سالانه مقدار قابل توجهی از آن به دلیل نبود صنایع فرآوری، سوزانده یا دور ریخته می‌شود. محصول فراوری نشده برگ گردو به دلیل داشتن ماده ضد تغذیه‌ای تانن، گس بوده و همچنین دارای خوش‌خوراکی پایین بوده و به تنهایی قابل مصرف نمی‌باشد، در حالی که پس از استحصال و فرآوری و جداسازی تانن، برگ فرآوری شده را می‌

۱- دانش آموخته گروه علوم کشاورزی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۲- استادیار، گروه علوم کشاورزی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

\* (نویسنده مسئول: sobhanirad@gmail.com)

توان به عنوان یک ماده خوراکی در جیره نشخوارکنندگان استفاده نمود (Min & Attwood, 2003). همچنین برگ گردو غنی از اجزای آنتی‌اکسیدانی نظیر فنولیک اسیدها و فلاونوئیدها می‌باشد (Amaral *et al.*, 2004). تانن استخراج شده را نیز می‌توان در صنایع داروسازی به عنوان آنتی‌بیوتیک و اثر ضد سرطانی (Yildirim & Kutlu, 2015) و در صنایع غذایی (Lamy *et al.*, 2016) و بهداشتی (Asghari & Mazaheritehrani, 2010) مورد استفاده قرار داد.

اصطلاح تانن برای اولین بار در سال ۱۷۹۶ توسط سیگوبین در تشریح مواد استخراج شده از بعضی از گیاهان که می‌توانستند در روند تبدیل پوست حیوانات به چرم نقش بسزایی داشته باشند به کار گرفته شد (Handa & Kapoor, 2003). تانن‌ها که به اسم‌های دیگری چون اسید تانیک، گالوتانن و اسید گالوتانیک شناخته شده‌اند، ترکیبات پیچیده طبیعی هستند که از مواد شیمیایی پلی‌فنلی تشکیل شده‌اند و در پوست، برگ و ریشه اکثر گیاهان از جمله چای، سیب، هلو، گردو و غلات به وفور یافت می‌شوند. این مواد با وزن مولکولی بالا (۵۰۰ تا ۳۰۰۰ دالتون) و دارای تعداد قابل ملاحظه‌ای گروه هیدروکسیل فنلیک (۱ تا ۲ درصد وزن مولکولی) هستند که امکان تشکیل ارتباطات تقاطعی بین پروتئین و سایر ماکرومولکول‌ها را میسر می‌سازند، بنابراین موجب بازدارندگی عمل آنزیم‌ها به خصوص آنزیم‌های مورد استفاده در هضم نشاسته شده که در نتیجه انرژی مصرفی نیز کاهش می‌یابد. همچنین تانن‌ها موجب اختلال در کار سلول‌ها شده و در نتیجه می‌توانند بر هضم سلولز تداخل ایجاد کنند. این ترکیبات در دسترسی عناصر معدنی، خصوصاً کلسیم و آهن مواد خوراکی اختلالاتی را پدید می‌آورند. طعم تلخ و گسی آنها نیز موجب کاهش اشتها و کاهش مصرف خوراک در حیوانات می‌شود که از ترکیبات حاوی آنها تغذیه می‌کنند (Min & Attwood, 2003).

تانن‌ها را بسته به حلالیت آن‌ها به دو گروه قابل هیدرولیز و متراکم تقسیم می‌کنند. چهار دسته از تانن‌های قابل هیدرولیز وجود دارند که عبارتند از: گالوتانن‌ها<sup>۱</sup>، الاجیتانن‌ها<sup>۲</sup>، تاراگالوتانن‌ها<sup>۳</sup> و کافه تانن‌ها<sup>۴</sup>. گزارش شده است برگ گردو در حدود ۱۰ درصد تانن دارد که از نوع الاجیتانن‌ها می‌باشد (Blumenthal *et al.*, 2000). روش‌های مختلفی برای غیر فعال کردن تانن‌های مواد خوراکی و بهبود ارزش غذایی آنها انجام شده است که از جمله آنها می‌توان به نگهداری بی‌هوازی، خشک کردن، اضافه کردن خاکستر چوب و استفاده از مواد شیمیایی و پلی‌اتیلن گلیکول اشاره کرد (Singh *et al.*, 2005)، اما روش‌های مختلفی به منظور استخراج تانن از مواد خوراکی حاوی آنها وجود دارند که مهم‌ترین آنها شامل روش‌های خیساندن (Pourshafi Zanganeh, 1993)، جوشاندن (Vijayakumari *et al.*, 2007)، پرکولاسیون<sup>۵</sup> (Robber, 1996) و سوکسله<sup>۶</sup> (Pansera *et al.*, 2004) می‌باشند. در روش خیساندن و جوشاندن از آب مقطر و در روش پرکولاسیون و سوکسله از اتانول استفاده می‌شود. لازم

<sup>1</sup> Galotannins

<sup>2</sup> Ellagitannins

<sup>3</sup> Taragalotannins

<sup>4</sup> Coffetannins

<sup>5</sup> Percolation

<sup>6</sup> Soxhlet

به ذکر است با بررسی مقالات پیشین، هیچ گونه گزارشی از روش‌های فرآوری و استخراج تانن از برگ گردو و ترکیبات شیمیایی عصاره‌های حاصله مشاهده نشد.

کمبود علوفه با کیفیت در بسیاری از مناطق خشک مخصوصاً مناطق دارای خاک‌های اسیدی، کم بارور و فصل‌های خشک طولانی، مشکل عمده دامپروران به منظور بهبود تولیدات دامی است (Tiemann *et al.*, 2008). بنابراین با توجه به محصولات فرعی کشاورزی و باغی قابل دسترس در این مناطق و تاثیر میکروبی‌های شکمبه بر هضم آنها، جایگزینی تمام یا قسمتی از علوفه مصرفی نشخوارکنندگان با این محصولات از اهداف مهم محققین تغذیه دام می‌باشد. از طرف دیگر، به دلیل وجود بسیار زیاد برگ درختان که سالانه مقدار بسیار زیادی از آن در باغ‌های کشور سوزانده یا دور ریخته می‌شود، فرآوری برگ درختان گردو و استخراج تانن آن، می‌تواند هضم ترکیبات فرآوری شده در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان را کاهش دهد (Min & Attwood, 2003). با توجه به اینکه اطلاعات موجود در زمینه ارزش غذایی برگ گردو و محصولات حاصل از روش‌های استخراج تانن بسیار محدود است، بررسی ارزش غذایی و خصوصیات تخمیری در محصولات تانن‌زدایی شده می‌تواند داده‌های مفیدی را در اختیار متخصصان تغذیه دام قرار دهد (Makkar, 2005). همچنین با استخراج تانن علاوه بر مصرف برگ درخت برای دام می‌توان تانن آن را در صنایع داروسازی، جواهرسازی، چرم‌سازی و صنایع چوب مورد استفاده قرار داد. بنابراین هدف از انجام این آزمایش، تعیین ترکیب شیمیایی و بررسی فراسنجه‌های تولید گاز در عصاره‌های تانن‌زدایی شده، و همچنین تعیین مناسب‌ترین روش استخراج تانن از نظر خصوصیات تخمیری باقیمانده‌های حاصل بود.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری، نمونه‌گیری و تعیین ترکیبات شیمیایی

نمونه‌های برگ گردوی ایرانی (*Juglans regia L.*) از چندین منطقه شهر شاندیز به صورت تصادفی انتخاب گردیده، جمع‌آوری شده و در سایه خشک شدند. سپس نمونه‌های مورد آزمایش آسیاب شده و میزان ماده خشک، انرژی خام و پروتئین خام با استفاده از روش‌های استاندارد نشریه انجمن رسمی شیمی تجزیه AOAC<sup>۲</sup> (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد. الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی با استفاده از روش ون سوست<sup>۳</sup> و همکاران (۱۹۹۱) تعیین شد.

### روش‌های استخراج تانن از برگ گردو

چهار روش فرآوری به منظور استخراج تانن در این آزمایش استفاده شده است که عبارت بودند از:

<sup>۱</sup> مقدار انرژی شیمیایی غذا با تبدیل آن به انرژی حرارتی اندازه‌گیری می‌شود. این تبدیل با سوزاندن غذا صورت گرفته و به مقدار حرارتی که از اکسیداسیون کامل واحد وزن غذا به دست می‌آید «انرژی خام» یا «حرارت احتراق» غذا اطلاق می‌گردد.

<sup>۲</sup> Association of Official Analytical Chemists

<sup>۳</sup> Van Soest

۱) روش خیساندن<sup>۱</sup>: در این روش ابتدا برگ‌های گردو جمع‌آوری شده را با یک ترازو حساس به مقدار ۱۰ گرم وزن کرده و بعد آن‌ها به صورت نیم کوب شده تبدیل شدند. پس از توزین، آنها را در داخل یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و به مقدار ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به داخل ارلن اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط آزمایشگاه قرار داده شدند. بعد از اتمام ۲۴ ساعت اول، ارلن به مدت ۲ ساعت بر روی دستگاه بن ماری گذاشته شده تا گرم شود و بعد از آن عمل صاف کردن صورت گرفت. با استفاده از کاغذ صافی مواد داخل ارلن صاف شده و مواد روی کاغذ صافی را مجدداً با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط کرده و دوباره به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شده و دوباره مواد داخل ارلن از کاغذ صافی عبور داده شدند (Pourshafi, Zanganeh, 1993).

۲) روش جوشاندن<sup>۲</sup>: در این روش ابتدا با ترازوی حساس به مقدار ۱۰ گرم برگ گردو وزن شده و سپس به صورت نیم کوب شده تبدیل شدند و در داخل یک ارلن ۱۰۰ میلی لیتری آب مقطر اضافه شدند. پس از بستن درب ظروف با فویل آلومینیومی، نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در حمام آب جوش قرار گرفتند و پس از خنک شدن با استفاده از کاغذ صافی و به کمک پمپ مکنده، نمونه‌ها صاف شدند (Vijayakumari et al., 2007).

۳) روش پرکولاسیون<sup>۳</sup>: در این روش ابتدا به کمک یک کیف دکانتور، یک دستگاه پرکولار ساخته و در مرحله اول شیر دکانتور را خارج کرده و دو طرف آن را کاملاً مسدود کرده، سپس انتهای دکانتور را با یک لایه پنبه پر کرده و روی آن یک لایه شن شسته شده ریخته شدند. بعد از آن با یک ترازوی حساس مقدار ۱۰ گرم برگ گردو را وزن کرده و به وسیله دستگاه آسیاب آنها به صورت پودر درآمدند. سپس پودر برگ گردو آسیاب شده بر روی لایه شن که قبلاً در درون دستگاه پرکولار ریخته شده قرار داده شدند. روی برگ گردو آسیاب شده به وسیله یک کاغذ صافی پوشانده شدند. بعد از این مراحل با استفاده از اتانول ۹۶ درصد، به آرامی درون دستگاه پرکولار ریخته طوری که تمام پودر برگ گردو آسیاب شده بر زیر اتانول قرار گیرد. سرعت خروج اتانول از زیر دستگاه پرکولار حدود ۵ میلی لیتر در دقیقه تنظیم گردید. این کار تا ۴۸ ساعت ادامه پیدا کرده و اتانول خارج شده جمع‌آوری شد و بعد از آن کاغذ صافی را برداشته و برگ گردو آسیاب شده خارج گردید (Robber, 1996).

۴) روش سوکسله<sup>۴</sup>: در این روش ابتدا ۱۰ گرم برگ گردو، به وسیله ترازوی حساس وزن شده و برگ‌ها به صورت نیم کوب در آمدند و در داخل فیلتری از جنس فایبرگلاس<sup>۵</sup> (ریبون بلک، ساخت آلمان) ریخته و در داخل دستگاه سوکسله قرار داده شدند. سپس ۳۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد در بالون دستگاه ریخته و روی اجاق به نقطه جوش رسانده شدند. بخارات اتانول در بالای دستگاه در قسمت مبرد که به جریان آب سرد متصل است، به حالت میعان رسیده و قطره قطره بر روی نمونه که درون فیلتر

<sup>1</sup> Maceration Method

<sup>2</sup> Boiling Method

<sup>3</sup> Percolation Method

<sup>4</sup> Soxhlet Method

<sup>5</sup> Fiberglass

است ریخته شدند. پس از اینکه حجم الکل در مخزن طبقه فوقانی به ۲۵۰ میلی لیتر رسید به علت پیدایش فشار منفی در لوله دستگاه، اتانول دوباره به بالن اولیه برگشته و مجدداً در معرض جوشش قرار گرفت. مراحل جوشاندن در دو مرحله چهار ساعته و به فاصله زمانی ۲۴ ساعت انجام گرفت. اتانول حاوی عصاره از طریق دستگاه تقطیر در فشار کم که در درجه حرارت ۴۵ درجه سانتی گراد با سرعت ۶۰ دور در دقیقه مورد جداسازی قرار می‌گیرد و در این حالت عصاره استخراج شده به صورت لایه در ته ظرف رسوب نمود. این رسوب با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر شسته شده و برای حل شدن کامل بهتر است از بن ماری استفاده گردد، سپس نمونه‌ها با فیلتر صاف شدند (Pansera *et al.*, 2004).

### اندازه‌گیری تانن موجود در تیمارهای آزمایشی

در این مرحله ابتدا هر یک از نمونه‌های حاصل از استخراج تانن به روش‌های خیساندن، جوشاندن، پرکولاسیون و سوکسله را با آسیاب حاوی غربال ۲ میلی‌متری آسیاب نموده و مقدار ۲ گرم از هر نمونه برای اندازه‌گیری تانن مورد آزمایش قرار داده شد. جهت اندازه‌گیری درصد تانن در نمونه‌های فوق، روش تیتریمتریک<sup>۱</sup> مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور، از خاصیت احیاکنندگی استفاده شد به این صورت که به وسیله پرمنگنات پتاسیم تیتراسیون انجام می‌شود. برای تعیین نقطه انتهایی از معرف ایندیگوکارمین<sup>۲</sup> استفاده شد (Hagerman & Butler, 1978).

### اعمال تیمارهای آزمایشی

تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) برگ گردو فرآوری نشده (شاهد)، (۲) برگ گردو فرآوری شده با روش خیساندن، (۳) برگ گردو فرآوری شده با روش جوشاندن، (۴) برگ گردو فرآوری شده با روش پرکولاسیون و (۵) برگ گردو فرآوری شده با روش سوکسله بودند. برای هر تیمار آزمایشی ۵ تکرار نیز در نظر گرفته شد.

### آزمون تولید گاز

اندازه‌گیری تولید گاز در تیمارهای آزمایشی بر اساس روش پیشنهادی توسط منکا<sup>۳</sup> و همکاران (۱۹۷۹) انجام شد. مایع شکمبه از دو رأس گوسفند تغذیه شده با جیره بر پایه علوفه که دارای فیستولای شکمبه‌ای بودند قبل از وعده خوراک‌دهی صبح گرفته شد و فوراً به وسیله پارچه متقال چهار لایه صاف گردید. ترکیب نهایی محیط کشت به میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر شامل آب مقطر (۲۳۷ میلی لیتر)، نمک‌های پر نیاز (۱۱۸/۵ میلی لیتر)، محلول بافر (۱۱۸/۵ میلی لیتر)، نمک‌های کم نیاز (۰/۰۶ میلی لیتر)، رزوزارین<sup>۴</sup> (۰/۶۱ میلی‌لیتر)، محلول احیاکننده (۲۵ میلی لیتر شامل: ۲۳/۸ میلی لیتر آب مقطر، ۱ میلی لیتر سود ۱ نرمال

<sup>۱</sup> Titrimetric

<sup>۲</sup> Indigo Carmine

<sup>۳</sup> Menke

<sup>۴</sup> Resazurin

و ۱۴۲/۵ میلی‌گرم سولفید سدیم) بود. برای انجام آزمایش تولید گاز ۳۰۰ میلی‌گرم از تیمارهای آزمایشی در زمان‌های ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. حجم گاز تولیدی در زمان‌های مختلف به صورت تجمعی مورد محاسبه قرار گرفت. هضم‌پذیری ماده آلی و انرژی قابل متابولیسم با استفاده از معادله منک و استینگاس<sup>۱</sup> (۱۹۸۸)، محاسبه شد:

$$1) \text{ GP (گرم در کیلوگرم ماده آلی) هضم‌پذیری ماده آلی} = 14.88 + 0.8893 \text{ GP} + 0.448 \text{ CP} + 0.0651 \text{ A}$$

$$2) \text{ (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) انرژی قابل متابولیسم} = 2.2 + 0.1357 \text{ GP} + 0.057 \text{ CP} + 0.0029 \text{ CP}^2$$

در روابط بالا، CP مقدار پروتئین خام (گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک)، A خاکستر خام (گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک) و GP نرخ خالص تولید گاز به ازای ۳۰۰ میلی‌گرم ماده خشک نمونه بعد از ۲۴ ساعت می‌باشد.

## تجزیه و تحلیل آماری

ضرایب تولید گاز با نرم افزار آماری SAS۹/۱ براساس فرمول زیر محاسبه شد (Blummel & Orskov, 1993) و مقایسه داده‌های ضرایب و حجم تجمعی گاز تولیدی در سطح ۵ درصد انجام شد.

$$p = b(1 - e^{-ct})$$

در این مدل، p حجم تولید گاز در زمان t، b گاز تولیدشده از بخش نامحلول اما تخمیرپذیر، c ثابت نرخ تولید گاز، t مدت زمان انکوباسیون و e اثر خطای آزمایش می‌باشد. فراسنجه‌های تولید گاز تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ مورد مقایسه آماری قرار گرفتند.

## نتایج و بحث

### تاثیر روش‌های استخراج تانن از برگ گردو بر مقدار تانن محصولات فرآوری شده

میزان تانن باقیمانده در عصاره‌های حاصل از روشهای تانن زدایی در جدول ۱ نشان داده شده است. تغییرات میزان تانن در بین تیمارهای آزمایشی معنی دار بود، به این صورت که میزان تانن کل در تمامی روش‌های فرآوری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت ( $p < 0.05$ )، اما مقدار این ترکیب در بین تیمارهای فرآوری شده با روش‌های خیساندن، جوشاندن، پرکولاسیون و سوکسله تفاوت معنی داری نداشت (به ترتیب ۰/۲۱، ۰/۳۱، ۰/۳۱ و ۰/۶۳ درصد).

<sup>1</sup> Steingass

### تاثیر روش های استخراج تانن از برگ گردو بر ترکیب شیمیایی محصولات فرآوری شده

ترکیب شیمیایی برگ گردو فرآوری نشده و در عصاره های تانن زدایی شده در جدول ۱ نشان داده شده است. در این آزمایش طبق نتایج بدست آمده از آنالیز برگ گردو بیشترین پروتئین خام مربوط به برگ گردو فرآوری شده به روش خیساندن بود ( $p < 0.05$ )، اما با پروتئین برگ گردو فرآوری نشده تفاوت معنی داری نداشت. همچنین در این تحقیق میزان انرژی خام در برگ گردو فرآوری شده به روش خیساندن نسبت به بقیه تیمارها به جز روش جوشاندن، تفاوت معنی داری داشت ( $p < 0.05$ )

همان طور که داده های جدول ۱ نشان می دهد میزان دیواره سلولی اعم از میزان دیواره سلولی (Neutral Detergent Fiber) و دیواره سلولی منهای همی سلولز (Acid Detergent Fiber) در نمونه های فرآوری شده با روش خیساندن نسبت به بقیه نمونه ها دارای بیشترین مقادیر دیواره سلولی و دیواره سلولی منهای همی سلولز بود ( $p < 0.05$ ).

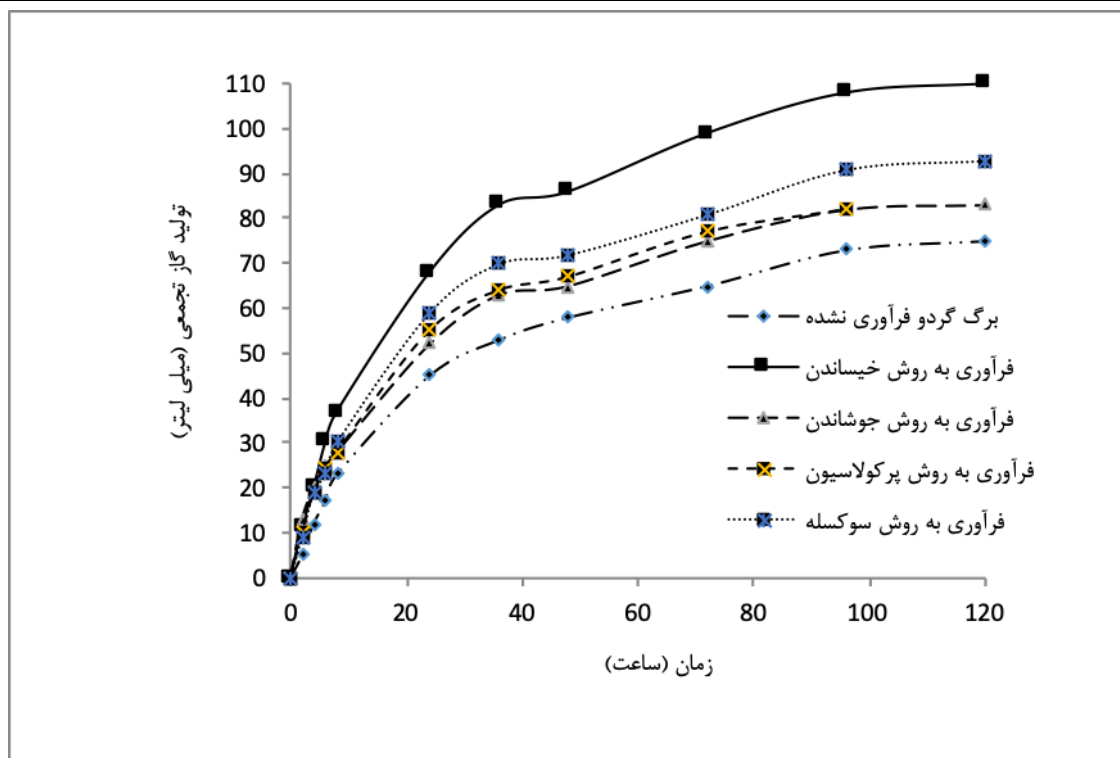
جدول ۱: میانگین ترکیبات شیمیایی در محصولات حاصل از روشهای مختلف استخراج تانن (خیساندن، جوشاندن، پرکولاسیون و سوکسله) در برگ گردو (درصد از ماده خشک)

تیمارهای آزمایشی	پروتئین خام (درصد)	انرژی خام (کیلو کالری/کیلوگرم)	دیواره سلولی (درصد)	دیواره سلولی منهای همی سلولز (درصد)	تانن کل (درصد)
برگ گردو فرآوری نشده	<sup>a</sup> ۷/۱۸	<sup>b</sup> ۴۴۰.۵	<sup>b</sup> ۳۲/۳۰	<sup>b</sup> ۲۸/۶۰	<sup>a</sup> ۸/۷۱
روش خیساندن	<sup>a</sup> ۷/۲۲	<sup>a</sup> ۷۴۰.۰	<sup>a</sup> ۴۵/۳۰	<sup>a</sup> ۳۹/۷۰	<sup>b</sup> ۰/۲۱
روش جوشاندن	<sup>ab</sup> ۵/۲۵	<sup>a</sup> ۶۲۰.۳	<sup>b</sup> ۳۸/۹۰	<sup>b</sup> ۳۳/۱۰	<sup>b</sup> ۰/۳۱
روش پرکولاسیون	<sup>b</sup> ۳/۵۹	<sup>c</sup> ۲۶۵.۰	<sup>b</sup> ۳۷/۲۰	<sup>b</sup> ۳۲/۵۰	<sup>b</sup> ۰/۳۱
روش سوکسله	<sup>b</sup> ۳/۴۷	<sup>c</sup> ۲۷۸.۲	<sup>b</sup> ۳۵/۴۰	<sup>b</sup> ۳۱/۷۰	<sup>b</sup> ۰/۶۳
میانگین اشتباه استاندارد	۱/۰۲	۸۵.۴	۴/۲۰	۳/۴۲	۲/۱۲
سطح معنی داری	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۴

\* میانگین های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند ( $P < 0.05$ ).

### تاثیر روش های فرآوری برگ گردو بر تولید تجمعی گاز در تیمارهای آزمایشی

روند تولید گاز (شکل ۱) در تیمارهای مربوطه نشان می دهد در ساعت های اولیه (تا ۱۲ ساعت پس از انکوباسیون) اختلاف معنی داری بین تیمارهای آزمایشی وجود نداشت ( $p > 0.05$ )، اما در ساعت ۲۴ بیشترین تولید گاز مربوط به برگ گردو فرآوری شده به روش خیساندن و کمترین مقدار گاز تولیدی مربوط به تیمار شاهد (برگ گردو فرآوری نشده) می باشد ( $p < 0.05$ ).



نمودار ۱: روند تولید گاز کل در تیمارهای فرآوری شده برگ گردو پس از ۱۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری (میلی لیتر در ۳۰۰ میلی گرم ماده خشک)

### تاثیر روش‌های فرآوری برگ گردو بر خصوصیات تخمیری تیمارهای آزمایشی

اثر برگ گردو فرآوری شده بر فراسنجه‌های تخمیری شکمبه در جدول ۲ نشان داده شده است. تمامی روش‌های فرآوری و استخراج تانن از نمونه‌های برگ گردو، سبب افزایش معنی‌دار تولید گاز از بخش نامحلول (b) نسبت به تیمار شاهد شده است، به صورتی که بیشترین افزایش تولید گاز از بخش نامحلول مربوط به فرآوری به روش خیساندن و به ترتیب فرآوری به روش سوکسله، روش پروکولاسیون و روش جوشاندن قرار داشتند. کمترین تولید گاز از بخش نامحلول ( $p < 0.05$ ) نیز در تیمار شاهد (برگ گردو فرآوری نشده) تولید شد ( $p < 0.05$ ). تمامی روش‌های فرآوری و استخراج تانن از نمونه‌های برگ گردو در این آزمایش سبب افزایش نرخ تولید گاز (c) شده است ( $p < 0.05$ )، اما نرخ تولید گاز در نمونه‌های حاصل از روش‌های مختلف فرآوری تفاوت معنی‌داری نداشت.

انرژی قابل متابولیسم و هضم‌پذیری ماده آلی در تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشت، هرچند دو فراسنجه مذکور در تمامی نمونه‌های آزمایشی فرآوری شده بیشتر از تیمار شاهد بودند ( $P > 0.05$ ) و بیشترین مقدار انرژی قابل متابولیسم و هضم‌پذیری ماده آلی نیز در محصولات حاصل از روش خیساندن مشاهده شد ( $P > 0.05$ ).



جدول ۲: میانگین فراسنجه‌های تولید گاز و فراسنجه‌های تخمینی در تیمارهای آزمایشی

تیمارهای آزمایشی	فراسنجه‌های تولید گاز		انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)	هضم پذیری ماده آلی (درصد)
	تولید گاز از بخش قابل تخمیر (b)	ثابت نرخ تولید گاز (c)		
برگ گردو فرآوری نشده	<sup>c</sup> ۷۲/۸۵	<sup>b</sup> ۰/۰۳۸	۸/۸۷	۵۸/۵۴
روش خیساندن	<sup>a</sup> ۱۰۶/۵۸	<sup>a</sup> ۰/۰۴۳	۱۲/۱۷	۸۰/۰۷
روش جوشاندن	<sup>d</sup> ۷۹/۷۲	<sup>a</sup> ۰/۰۴۶	۹/۶۷	۶۴/۲۱
روش پرکولاسیون	<sup>c</sup> ۸۰/۷۲	<sup>a</sup> ۰/۰۴۶	۹/۹۷	۶۶/۳۱
روش سوکسله	<sup>b</sup> ۸۹/۲۸	<sup>a</sup> ۰/۰۴۶	۱۱/۲۷	۷۴/۶۵
میانگین اشتباه استاندارد	۰/۳۳	۰/۰۰۲	۱/۲۵	۳/۲۵
سطح معنی داری	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۸۱	۰/۱۱۲

\* میانگین های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند ( $P < 0.05$ ).

کاهش معنی دار تانن در تمامی روش های تانن زدایی در تحقیق حاضر نسبت به تیمار شاهد، کارایی استفاده از روش های استخراج و جداسازی تانن توسط روش های فوق را نشان می دهد. همچنین بیشترین کاهش ( $p < 0.05$ ) مقدار تانن نسبت به گروه شاهد در عصاره حاصل از روش خیساندن مشاهده شد.

در روش خیساندن با توجه به اینکه از حلال آب استفاده شده است و حرارت اعمال نشده است، خروج ترکیبات پروتئینی همراه با تانن از نمونه های آزمایشی انجام نشده است. اما دلیل احتمالی کاهش پروتئین در روش های پرکولاسیون و سوکسله می تواند استفاده از حلال اتانول باشد که سبب شستن پروتئین ها می شود (Yousef Elahi & Rouzbehan, 2007). در روش جوشاندن نیز اعمال حرارت، احتمالاً سبب خروج مقادیر زیادی ترکیبات پروتئینی همراه با تانن شده است.

کاهش معنی دار انرژی خام در عصاره حاصل از روش خیساندن می تواند به علت کاهش معنی دار مقدار تانن در محصول حاصل از روش خیساندن باشد زیرا یک همبستگی منفی بین مقدار تانن و انرژی خام وجود دارد که باعث افزایش مقدار انرژی خام در محصولات حاصل شده است، اما مقادیر انرژی خام در محصولات حاصل از روش پرکولاسیون (تیمار ۴) و روش سوکسله (تیمار ۵) ممکن است به دلیل شسته شدن کربوهیدرات ها کاهش یافته باشد (Yousef Elahi & Rouzbehan, 2007).

یکی از دلایل اختلاف در میزان دیواره سلولی و دیواره سلولی منهای همی سلولز بین روش خیساندن و بقیه روش ها، ممکن است عدم استفاده از حرارت و حلال های آلی به منظور استخراج تانن می باشد، در نتیجه کربوهیدرات های ساختمانی بیشتری را در عصاره حاصله حفظ می کند.

با توجه به وجود تانن بالا (۸/۷۱ درصد) در تیمار شاهد، دلایل احتمالی مهار تولید گاز در این تیمار، باند شدن تانن ها با غشاء سلولی و یا آنزیم های تولیدی توسط میکروارگانیسم ها است (McSweeney *et al.*, 2001)، عامل دیگر ترکیب شدن تانن ها با مواد مغذی اعم از پروتئین ها، کربوهیدرات ها و مواد معدنی است (Kamalak *et al.*, 2004; Reed, 1995). اما در تیمارهای فرآوری شده، استخراج تانن از نمونه های برگ گردو سبب حذف اثرات منفی آن شده است. دیگر محققان نیز در عصاره های

تانن‌زدایی برگ بلوط، افزایش ( $p < 0.01$ ) حجم تولید گاز و هضم پذیری ماده آلی را مشاهده نمودند (Maldar *et al.*, 2010). همچنین علت افزایش حجم گاز تولیدی از ساعت ۲۴ ممکن است به دلیل وجود کربوهیدرات‌های ساختمانی بالاتر در تیمارهای فرآوری شده باشد، بنابراین تاثیر میکروارگانیزم‌های شکمبه بر فرآیند تخمیر نمونه‌های آزمایشی با تاخیر زمانی صورت گرفته است.

افزایش تولید گاز از بخش نامحلول (b) و افزایش نرخ تولید گاز (c) در عصاره‌های حاصل از روش‌های تانن‌زدایی با نتایج سایر محققان مطابقت دارد که با خنثی نمودن اثرات منفی تانن (Makkar *et al.*, 1995)، افزایش در تولید گاز از بخش نامحلول و تولید گاز تجمعی را مشاهده کردند (Alipour & Rouzbehan, 2007; Mlambo *et al.*, 2007).

دلیل احتمالی افزایش مقدار انرژی قابل متابولیسم و هضم‌پذیری ماده آلی در آزمایش حاضر، کاهش معنی‌دار تانن در تیمارهای فرآوری شده و ارتباط معکوس آن با قابلیت هضم (Silanikove *et al.*, 1996) و قابلیت بهره‌وری مواد خوراکی حاوی آنها (Frutos *et al.*, 2004) در نشخوارکنندگان می‌باشد. دیگر محققان نیز با فرآوری شیمیایی پسماند کشمش و حذف اثرات منفی تانن، افزایش در انرژی قابل متابولیسم و قابلیت هضم ماده آلی را مشاهده کردند (Alipour *et al.*, 2010). با عمل‌آوری محصولات فرعی پسته به منظور غیرفعال کردن تانن و بهبود ارزش تغذیه‌ای این محصولات، گزارش شده است همبستگی مثبتی بین تولید گاز و انرژی قابل متابولیسم و همچنین بین تولید گاز و قابلیت هضم ماده آلی وجود دارد و از طرف دیگر، همبستگی منفی بین میزان تانن و فراسنجه‌های تولید گاز وجود دارد (Mokhtarpour *et al.*, 2012).

## نتیجه‌گیری کلی

به عنوان نتیجه‌گیری نهایی، این تحقیق نشان داد تمامی روش‌های استخراج تانن ذکر شده در این آزمایش، سبب کاهش معنی‌دار تانن از برگ گردو می‌شوند. همچنین با مقایسه ترکیب شیمیایی و خصوصیات تخمیری محصولات حاصل از روش‌های فرآوری، می‌توان نتیجه گرفت روش خیساندن و استفاده از آب مقطر نسبت به اتانول، روش مناسبی جهت استخراج تانن و مصرف آن در خوراک نشخوارکنندگان می‌باشد. بنابراین با توجه به کاهش سالانه منابع آبی کشور و کاهش تولید علوفه توسط کشاورزان می‌توان از برگ گردو فرآوری شده، در شرایطی که دامدار با محدودیت تامین خوراک مواجه است، به عنوان یک خوراک فیبری برای تامین نیاز نگهداری استفاده نمود. با استفاده از روش خیساندن، اثرات منفی تانن موجود در آن خنثی شده و تا حدی ارزش غذایی آن اضافه می‌شود. برای کسب اطلاعات بیشتر لازم است تا پژوهش‌های بیشتری در مورد اثر فرآوری‌های مختلف و تانن موجود در آن بر عملکرد دام زنده مانند گوسفند پروری و یا گاو شیری انجام گیرد تا نتایج با اطمینان بیشتری به کار برده شود.

## منابع

- Alipour, D. and Rouzbehan Y. (2007) Effect of ensiling grape pomace and addition of polyethylene glycol on in vitro gas production and microbial biomass yield. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 138-149.
- Alipour, D., Tabatabaei, M. M., Zamani, P., Aliarabi, H. A., Saki, A. A. and Zamani Z. (2010) Determination of chemical composition and Gas production parameters of Raisin by- product. *Journal of Animal Science Research*, 4(20): 109-118 (In Persian).
- Amaral, J. S., Seabra, R. S., Andrade, P. B., Valentão, P., Pereira, J. A., Ferreres, F. (2004) Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglansregia L.*) leaves. *Food Chemistry*, 88:373-379.
- AOAC. (2005) Official Methods of Analysis of AOAC International, 18<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlinton, VA.
- Asghari, J. and Mazaheritehrani, M. (2010) Extraction of tannin from *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. and trimyristin from *Myristica fragrans* Houtt by using microwave irradiation. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 26 (2): 185-195 (In Persian).
- Blumenthal, M., Goldberg, A., Brinckmann, J. (2000) *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs*. Copyright American Botanical Council. Publ. by Integrative Medicine Communications, 1029 Chestnut Street, Newton, MA 02464, 401-403.
- Blummel, M. K. and Orskov, E. (1993) Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 40:109-119.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J. and Mantecón, A. R. (2004) Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2: 191-202.
- Hagerman, A. E. and Butler, L. G. (1978) Protein precipitation methods for the quantitative determination of tannin. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 26: 809-812.
- Handa, S. S. and Kapoor, V. K. (2003) *Textbook of Pharmacognosy*. 2nd Edn., VallabhPrakshan, Delhi.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Ozay, O. and Akbas, S. (2004) Nutritive value of oak (*Quercus sp.*) leaves. *Small Ruminant Research*. 53: 161-165.
- Lamy, E., Pinheiro, C., Rodrigues, L., Capela-Silva, F., Lopes, O. S., Moreira, P., Tavares, S. and Gaspar, R. (2016) Determinants of tannin-rich food and beverage consumption: oral perception vs. psychosocial aspects. In *Tannins: Biochemistry, Food Sources and Nutritional Properties* (29-58). NY: Nova Publishers.
- Makkar, H. (2005) In vitro gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Animal Feed Science and Technology*, 123: 291-302.
- Makkar, H. P. S., Blummel, M. and Becker, K. (1995) Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and truedigestibility in *in vitro* techniques. *British Journal of Nutrition*, 73: 897-913.
- Maldar, S.M., Roozbehan, Y., Alipour, D. (2010) The effect of adaptation to oak leaves on digestibility (in vitro) and ruminal parameters in alamout goat. *Iranian Journal of Animal Science*, 41: 243-252 (In Persian).
- McSweeney, C. S., Palmer, B., McNeill, D. M. and Krause, D. O. (2001) Microbial interactions with tannins: Nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 83-93.

- Menke, K. H. and Steingass, H. (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. **Animal research and development**, 28: 6-55.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneide, W. (1979) The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. **Journal of Agricultural Science**, 92: 217 -222.
- Min, B. R. and Attwood, G.T. (2003) The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, 106: 3-19
- Mlambo, V., Sikosana, J. L. N., Mould, F. L., Smith, T., Owen, E. and Mueller-Harvey, I. (2007) The effectiveness of adapted rumen fluid versus PEG to ferment tannin-containing substrates in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, 136: 128-136.
- Mokhtarpour, A., Naserian, A. A., Valizadeh, R., Tahmasbi, A. (2012) Effect of Polyethylene Glycol and Urea Treated Pistachio by-products Silage on Phenolic Compounds, in vitro Gas Production and Holstein Dairy Cow's Performance. **Iranian Journal of Animal Science Research**, 4(1): 55-62 (In Persian).
- Pansera, M. R., Iob, G. A., Atti-Santos, A. C., Rossato, M., Atti-Serafini, L., Cassel, E. (2004) Extraction of Tannin by *Acacia mearnsii* with supercritical fluids. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 47(6): 995-998.
- Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P. B., Ferreira, I. C., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L. (2007) Walnut (*Juglans regia L.*) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, 45(11): 2287-95.
- Pourshafi Zanganeh, H. (1993) Usable oak galls in Kermanshah province. M. Sc. Thesis, Faculty of Natural Resource, University of Tehran, Karaj, 112 Pp (In Persian).
- Reed, J. D. (1995) Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in foage legumes. **Journal of Animal Science**, 73: 1516–1528.
- Robber, J. E., Speedie, M.K., and Tyler, V.E. (1996) *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. williams and wilkins 337 Pp, Baltimore.
- SAS Institute Inc. (2004) *SAS/STAT User's Guide*, Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- Silanikove, N., Gilboa, N., Nir, I., Perevolotsky, A. and Nitsan, Z. (1996) Effect of daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin containing leaves (*Quercus calliprinos*, *Pistacialentiscus*, and *Ceratoniasiliqua*) by goats. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, 44: 199–205.
- Singh, B., Sahoo, A., Sharma, R., Bhat, T. K. (2005) Effect of poethylene glycol on gas production parameters and nitrogen disappearance of some tree forages. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 123-124: 351–364.
- Tiemann, T. T., Avila, P., Ramírez, G., Lascano, C., Kreuzer, M. and Hess, H. D. (2008) *In vitro* ruminal fermentation of tannin ifrous tropical plants: plant specific tannin effects. **Animal Feed Science and Technology**, 146: 222-241.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. and Lewis, B. A. (1991) Methods for dietary fiber, neutral-detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, 74: 3583-3597.
- Vijayakumari, K., Pugalenthi, M. and Vadivel, V. (2007) Effect of soaking and hydrothermal processing methods on the levels of antinutrients and in vitro protein digestibility of *Bauhinia purpurea L.* seeds. **Food Chemistry**, 103: 968-975.

---

Yildirim, I. and Kutlu, T. (2015) Anticancer Agents: Saponin and Tannin. International Journal of Biological Chemistry, 9: 332-340.

Yousef Elahi, M. and Rouzbehan, Y. (2007) **Characterization of Quercus persica, Quercus infectoria, Quercus libani as ruminant feeds**. Animal Feed Science and Technology, 140 (1-2): 78-89.

---

**Comparison of different methods of tannin extraction from the leaves of Iranian walnut (*Juglans regia L.*) and their effects on chemical composition and fermentative parameters *in vitro***

B. Amir<sup>1</sup>, S. Sobhanirad<sup>2\*</sup>

**Received:**  
**Accepted:**

**Abstract**

The aim of this study was to determine the chemical composition and evaluation of extraction methods of tannin from leaves of Iranian walnut (*Juglans regia L.*) and estimation of fermentative parameters by gas production technique. These methods included maceration, boiling, percolation, and Soxhlet method. The results showed that the amount of tannins in all the processing methods was reduced significantly compared to the control treatment ( $p < 0.05$ ). The soaking method also significantly increased crude protein, crude energy, neutral detergent fiber and acid detergent fiber compared to other treatments ( $p < 0.05$ ). Soaking Process compared to other treatments increased significantly cumulative gas production, the fermentable fraction (b) of gas production and also increased insignificantly the parameters of rate (c) of gas production, metabolizable energy, and digestibility of organic matter. The results of this study indicated that maceration method and use distilled water compared to ethanol, is a suitable method for the extraction of tannin and its use in ruminants' feedstuff.

**Keywords:** *fermentation characteristics, gas production, tannin removal methods, walnut*

---

1-Msc graduate, Department of Agricultural Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran  
2-Assistant Professor, Department of Agricultural Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran  
\*(Corresponding Author:sobhanirad@gmail.com)