فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری پروتئین کنجاله‌ی سویا و کنجاله‌ی کلزا در شرایط برون‌تنی

جواد فلاحتی زو، محسن دانش مسگران، علیرضا وکیلی، عبدالمنصور طهماسبی، محمد رضا نظری
دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده ی کشاورزی، گروه علوم دامی
نویسنده ی مسئول: جواد فلاحتی زو، کد پستی ۱۱۶۳-۹۱۷۷۵، javad.falahati@yahoo.com

چکیده

هدف از انجام این آزمایش بررسی تجزیه‌پذیری پروتئین کنجاله‌ی سویا و کنجاله‌ی کلزا در شکمبه با استفاده از یک روش تولیدگاز اصلاح شده و ارزیابی این روش بود. مایع شکمبه قبل از غذادهی صبح و از چهار رأس گوسفند نر دارای فیستولای شکمبه‌ای که روزانه ۲۰ گرم یونجه،۳۰۰ گرم کاه گندم و ۲۵۰ گرم کنسانتره مصرف می‌کردند به‌دست می‌آمد و بلافاصله با چهار لایه پارچه‌ی متقال صاف شده و با افزودن کربوهیدرات‌های آسان تخمیر شونده به مدت ۳ ساعت کشت می‌شد تا سطح نیتروژن آمونیاکی کاهش و فعالیت میکروبی آن بهبود یابد. سپس به هر بطری ٤۰۰ میلی‌گرم نمونه‌ی خوراک، ۹۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه‌ی بافری شده و کربوهیدرات‌های آسان تخمیر شونده (چهار سطح ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی‌گرم) افزوده می‌شد. تولیدگاز و غلظت نیتروژن آمونیاکی تا ۳۰ ساعت پس از شروع کشت و در ٦ نقطه‌ی زمانی اندازه‌گیری شد. پروتئین تجزیه‌پذیر در شرایط برون‌تنی(IVDP) با استفاده از برون‌یابی رگرسیون خطی میان تولیدگاز(متغیر اصلی) و نیتروژن آمونیاکی(متغیر وابسته) تخمین زده شد. تأثیر عوامل زمان، خوراک و اثر متقابل زمان×خوراک بر ارزش‌هایIVDP معنی‌دار بود($p<۰/۰۰۱$). میزان تجزیه‌پذیری مؤثرEPD برای کنجاله‌ی سویا و کنجاله‌ی کلزا نیز به ترتیب ۰/۷۷ و ۰/٤٥ بود. نتایج نشان داد که این تکنیک تخمین‌های مناسبی از فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه ارائه می‌دهد و برای کاهش حساسیت این روش به سطوح نیتروژن آمونیاکی و نرخ تولیدگاز تحقیقات بیشتری لازم است.

واژه‌های کلیدی: پروتئین، تجزیه‌پذیری، تولیدگاز، نیتروژن آمونیاکی

مقدمه:

امروزه در اکثر سیستم‌های تغذیه‌ای از روش درون‌کیسه‌ای و روش‌های درون‌تنی برای اندازه‌گیری تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه استفاده می‌شود. اما این دو روش پر هزینه و وقت گیر هستند و نیازمند کار فراوان بوده و هم اکنون ایرادات فراوانی به آن هااز لحاظ صحت نتایج حاصل وارد شده است. تعریف دستورالعملی که انجام آن ساده، نسبتا سریع، تکرارپذیر و از نظر هزینه‌ها مناسب باشد، برای تخمین تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین مواد خوراکی درآنالیزهای آزمایشگاهی تجاری سودمند خواهد بود(۷). لذا تلاش زیادی برای یافتن روش‌های برون‌تنی با دقت بالاتر و هزینه‌های مالی و زمانی کمتر درحال انجام است. کارلسون و همکاران(۲) روشی را با عنوان «روش تولیدگاز نوین برای اندازه‌گیری تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین» براساس روش رآب و همکاران(٦) معرفی کردند که در آن اصلاحاتی برای افزایش دقت و سهولت کار و امکان محاسبه ی فراسنجه های تجزیه پذیری پروتئین انجام شده است.

هدف از انجام این آزمایش بررسی تجزیه‌پذیری پروتئین کنجاله‌ی سویا و کنجاله‌ی کلزا در شکمبه با استفاده از روش کارلسون و همکاران(۲) و ارزیابی این تکنیک جدید بود.

مواد و روش‌ها:

کنجاله‌ی سویا وکنجاله‌ی کلزای مورد استفاده از نوع تجاری بودند که با توری ۱ میلی متر آسیاب شدند. مقدار نیتروژن خوراک‌ها با استفاده از روش کجلدال اندازه‌گیری شد. مقدار چربی با استفاده از دستگاه سوکسوله و ماده‌ی خشک نمونه‌ها نیز پس از ٤۸ ساعت قرار گرفتن در آون۵۵درجه‌ی سلسیوس اندازه‌گیری شد.

روش تولید گاز مطابق با مقاله‌ی کارلسون و همکاران(۲) انجام شد. مایع شکمبه‌ی مورد استفاده از ٤ رأس گوسفند نر دارای فیستولای شکمبه‌ای و قبل از غذادهی صبح به‌دست آمد که روزانه ۳۰۰گرم کاه‌گندم،۲۰۰ گرم یونجه‌ی خشک و ۲۵۰گرم کنسانتره مصرف می‌کردند. سپس با چهار لایه متقال صاف می‌شد و تحت جریان مداوم گاز دی‌اکسید کربن و با افزودن کربوهیدرات‌های آسان تخمیر شونده(به ازای هر لیتر مایع شکمبه ۳/۵ گرم مالتوز، ۱/۸ گرم نشاسته، ۱/۸ گرم زایلوز، ۱/۸ گرم پکتین و ۳/۱ گرم جوش شیرین که پکتین در۵۵ و جوش شیرین در ٦۳ میلی لیتر محلول بافر مک دوگال(۳) حل می‌شدند و سپس افزوده می‌گشتند) به مدت ۳ ساعت کشت می‌گردید. در گام بعدی این مایع شکمبه با افزودن بافر مینرال(٤) با نسبت ۱:۲ رقیق و تبدیل به مایع شکمبه‌ی بافری شده می‌گشت. آن‌گاه به هریک از فلاسک‌های کشت که در داخل کشور و مطابق امکانات آزمایشگاهی ما طراحی گردیده بود٤۰۰میلی گرم ماده‌ی خوراکی و ۹۰ میلی لیتر مایع شکمبه‌ی بافری شده افزوده می‌شد و چهار سطح مختلف ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، و ٤۰۰ میلی گرم کربوهیدرات آسان تخمیر شونده شامل: مالتوز، نشاسته و زایلوز با نسبت۲:۱:۱ به ترتیب، نیز به شیشه‌ها افزوده می‌شدند. میزان تولید گاز و نیتروژن آمونیاکی در بازه‌ی زمانی ۳۰ ساعت پس از آغاز کشت و در ٦ نقطه اندازه‌گیری می‌شد.

پروتئین تجزیه‌پذیر در شرایط برون‌تنی(IVDP) در هر نقطه‌ی زمانی با استفاده از برون یابی رگرسیون خطی میان تولید گاز(متغیر اصلی) و غلظت نیتروژن آمونیاکی (متغر وابسته) و با استفاده از رابطه‌ی(٦) زیر تخمین زده می‌شد:

$$IVDP = \frac{\left(\text{(نیتروژن آمونیاکی بلنک)} - \left(\text{نیتروژن آمونیاکی هنگامی که تولید گاز صفر است(عرض از مبدأ)}\right)\right)}{\text{کل نیتروژن موجود در خوراک کشت شده}}$$

در اینجا منظور از بلنک همان نمونه‌های شاهد است که فقط محتوی مایع شکمبه‌ی بافری شده هستند. عرض از مبدأ نیز از معادله‌ی رگرسیون به دست می‌آید. فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری پروتئین از طریق رابطه‌ی(۵) زیر و با نرم افزار تیبل کاروD۲ محاسبه شدند:

$$Y = a + b * (1 - e^{-ct})$$

در اینجا؛Yبخشی از پروتئین است که در زمان t تجزیه شده، a بخشی از پروتئین خام است که در زمان صفر تجزیه شده، b بخش قابل تجزیه‌ی پروتئین خام و c نرخ تجزیه بخش b است. برای محاسبه‌ی تجزیه‌پذیری مؤثر مواد خوراکی(EPD) از رابطه‌ی(۵) زیر استفاده شد:

$$EPD = a + \frac{b*c}{k+c}$$

در اینجاa ، b و c همان‌هایی هستند که در بالا توضیح داده شد و k نرخ خروج است که ٦٪ در ساعت فرض شده است.

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث:

ترکیب شیمیایی مواد خوراکی مورد استفاده در جدول شماره‌ی (۱) ارائه شده است. عمل کشت مایع شکمبه قبل از استفاده برای تلقیح میکروبی محیط کشت(پرانکوباسیون) سبب کاهش غلظت اولیه‌ی نیتروژن آمونیاکی موجود و افزایش فعالیت میکروبی می‌شود که می‌تواند سبب افزایش دقت آزمایش گردد(۲). در این آزمایش با انجام عمل فوق غلظت نیتروژن آمونیاکی به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت و به ۲۳ درصد مقدار اولیه رسید(P<۰/۰۰۱).

جدول ۱: ترکیب شیمیایی مواد خوراکی

ماده ی خوراکی	DM%	CP%	EE%
کنجاله ی سویا	۹۲/۲	٤۲/٥	۳/٤
کنجاله ی کلزا	۹۳/٥	۳۸/٤	۱/۱

EE: چربی خام ، CP: پروتئین خام ، DM: ماده ی خشک.

مقادیر تجزیه‌پذیری پروتئین در شرایط برون‌تنی(IVDP) در جدول شماره‌ی(۲) ارائه شده است. مقدار IVDP به‌دست آمده برای کنجاله سویا در زمان ۱٦ ساعت کمتر از ۱۲ ساعت می‌باشد و نیز تجزیه‌پذیری آن در زمان۳۰ ساعت بیشتر از یک شده است که قابل پذیرش نمی‌باشد. در مورد کنجاله‌ی کلزا نیز مقادیر IVDP در زمان‌های ۱٦ و ۲٤ساعت کمتر از زمان ۱۲ ساعت محاسبه شده است.

جدول ۲: تجزیه‌پذیری پروتئین در شرایط برون‌تنی(IVDP)

	تجزیه‌پذیری						معنی داری			SEM	
زمان/ساعت	٤	۸	۱۲	۱٦	۲٤	۳۰	اثر خوراک	اثر زمان	اثر متقابل	زمان	خوراک
کنجاله ی سویا	۰/۰۹	۰/٤٦	۰/۸۹	۰/۷۷	۰/۹٦	۱/۱۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۲	۰/۰۲
کنجاله ی کلزا	۰/۳٤	۰/۳٦	۰/٥٦	۰/٤٤	۰/٥٤	۰/٥۷					

SEM: میانگین خطای استاندارد

علت حاصل شدن چنین مقادیری می‌تواند با اتمام منابع انرژی در کشت‌های شاهد در ارتباط باشد. کان و همکاران(۱) در مطالعات خود نتیجه گرفتند دگرساخت نیتروژن میکروبی که سبب افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت می‌شود در نمونه‌های شاهد(بلنک) پس از ۱ ساعت از آغاز کشت شروع می‌شود و این در حالی است که در نمونه‌های حاوی ماده‌ی خوراکی، بسته یه نوع خوراک کشت شده دگرساخت نیتروژن میکروبی بین ۱۵ تا ۳۰ ساعت پس از شروع کشت، یعنی زمانی که ماده‌ی خوراکی تقریباً تمام شده است شروع می‌شود. اتمام منابع انرژی در کشت‌های حاوی نمونه ی سویا در زمان ۳۰ ساعت نیز می‌تواند سبب افزایش بسیار زیاد غلظت نیتروژن آمونیاکی و در نتیجه تخمین بزرگ تر از یک میزان تجزیه پذیری بشود. چراکه ظرفیت آن‌ها برای تولید آمونیاک بسیار بالاتر از نمونه‌های شاهد(بلنک) می‌باشد.

فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری و تجزیه‌پذیری مؤثر(EPD) کنجاله‌ی سویا و کنجاله‌ی کلزا در جدول شماره‌ی(۳) نشان داده شده است. در آزمایشی که توسط وودز و همکاران(۸) با استفاده از روش درون‌کیسه‌ای انجام شد، مقدار EDP برای کنجاله‌ی سویا ۷۰/۸۰ و برای کنجاله‌ی کلزا ٦٤/۲۲ به دست آمد. در روش درون‌کیسه‌ای خروج ذرات تجزیه نشده از کیسه‌ها به عنوان بخشی از فراسنجه ی a در نظر گرفته می‌شود که سبب تخمین‌های بالاتری از آن می‌شود.

جدول ۳: فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری پروتئین در شرایط برون‌تنی

	فراسنجه‌ی a	فراسنجه‌ی b	فراسنجه‌ی c	تجزیه‌پذیری مؤثرEDP
کنجاله‌ی سویا	۰/۱۷	۰/۹۱	۰/۱۲	۰/۷۷
کنجاله‌ی کلزا	۰/۱۰	۰/٦٦	۰/۰۷	۰/٤٥

علاوه بر نیتروژن‌آمونیاکی در مایع شکمبه و دگرساخت پروتئین میکروبی، روند تولید گاز نیز می‌تواند نتایج تجزیه‌پذیری پروتئین در شرایط برون‌تنی را تحت تأثیر قرار دهد. رآب و همکاران(٦) نتیجه گرفتند هرگاه میزان تولید گاز در ٢٤ ساعت اول از ۹۰ میلی لیتر فراتر می‌رفت رابطه‌ی خطی میان تخمیر نشاسته و تولید گاز در ۳۰ میلی لیتر محیط کشت کاهش می‌یافت. نرخ بالای تولید گاز در زمان‌های ابتدای کشت موجب کاهش ضرایب تابعیت و کاهش تخمین‌های تجزیه‌پذیری پروتئین در این زمان‌ها می‌شود و بالعکس کاهش تولید گاز در زمان‌های پایانی کشت و افزایش غلظت نیتروژن‌آمونیاکی موجب تخمین‌های بالاتری از تجزیه‌پذیری پروتئین می‌شود. در مطالعه‌ی پیش رو نیز در سطح کربوهیدرات ٤٠٠ میلی گرم میزان تولیدگاز در ٢٤ ساعت اول از ۹۰ میلی لیتر فراتر می‌رفت و حتی گاهی ۹۰ درصد تولیدگاز در ۱۲ ساعت ابتدای کشت تولید می‌شد که این خود می‌تواند تخمین‌های تجزیه‌پذیری پروتئین را تحت تأثیر قرار دهد.

با وجود اینکه این روش می‌تواند تخمین‌های مناسبی از تجزیه‌پذیری پروتئین و فراسنجه‌های کنتیکی آن در اختیار قرار دهد، اما باید تحقیقات بیشتری در زمینه‌ی کاهش حساسیت این روش به سطوح نیتروژن آمونیاکی و تفاوت در مایع شکمبه‌ی مورد استفاده صورت گیرد. همچنین بررسی اثر استفاده از منابع مختلف کربوهیدرات آسان تخمیر شونده بر نتایج حاصل از این روش سودمند خواهد بود.

منابع:

1. Cone, J.W., Van Gelder, A.H., Driehuis, F., 1997. Description of gas production profiles with a three-phasic model. Anim. Feed Sci.Technol. 66, 31–45.
2. Karlsson, L., Hetta, M., Udén, P. & Martinsson, K. 2009.New methodology for estimating rumen protein degradation using the in vitro gas production technique. Animal Feed Science and Technology, 153, 193-202.
3. McDougall, E.I., 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 43, 99–109.
4. 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. 28:7-55.
5. orskov, E.R., McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci. Camb. 92, 499–503.
6. Raab, L., Cafantaris, B., Jilg, T.,Menke, K.H., 1983. Rumen protein degradation and biosynthesis.1.Anewmethod for determination of protein degradation in rumen fluid in vitro. Br. J. Nutr. 50, 569–582.
7. Roe, M. B., Chase, L. E. & Sniffen, C. J. 1991.Comparison of in vitro techniques to the in situ technique for estimation of ruminal degradation of protein.Journal of dairy science, 74, 1632-1640.
8. Woods, V.B.; O'Mara, F.P.; Moloney, A.P. 2003. The nutritive value of concentrate feedstuffs for ruminant animals. Part II: In situ ruminal degradability of crude protein. Animal Feed Science and Technology 110: 131-143.

In vitro kinetic parameters of protein degradability of soybean meal and rapeseed meal

Falahatizowe, J., M. Danesh Mesgaran, A. R. Vakili, A. M. Tahmasbi, M. R. Nazari
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Corresponding author: P O Box 91775-1163, javad.falahati@yahoo.com

Abstract

Rumen degradation kinetic parameters of soybean meal and rapeseed meal crude protein (CP) were studied using a new modified gas production technique to evaluate this new method.

Rumen fluid was collected manually prior to morning feeding from four rumen cannulated rams fed on a diet containing 300g wheat straw, 200g alfalfa hay, and 250g concentrate. The Rumen fluid was filtered through four layers of cheese cloth and incubated with readily fermentable carbohydrates for 3 h. Then 90 ml of buffered rumen fluid (BRF), 400 mg of feed samples, and carbohydrates at four concentrations (100, 200, 300, and 400 mg) were added to special bottles and incubations performed at 39º C. Gas production and ammonia nitrogen concentration were recorded during 30 h post incubation at 6 time points. In vitro degradable crude protein (IVDP) was estimated via linear regression between ml of gas production (as main variable, x) and mg of ammonia nitrogen (as dependent variable, y). Results indicated that feed, time and feed×time interaction have significant effects on IVDP estimations ($p< 0.001$). Effective CP degradation (EPD) values of soybean meal and rapeseed meal were 0.77 and 0.45, respectively. We conclude that this new method provides valuable estimations of IVDP and EPD; however, more studies should be done about reducing the sensitivity of this method to ammonia nitrogen levels and gas production rate.

Key words: Ammonia nitrogen-degradability-gas production-protein