تحقیقات تولیدات دامی
سال چهارم/شماره سوم/پاییز ۱۳۹۴ (۲۴-۱۳)

ارزیابی جیره‌های نشخوارکنندگان حاوی پَر هیدرولیز شده با هیدروکسید کلسیم جایگزین شده با کنجاله سویا در روش تولید گاز

عباس رجائی راد[۱]، فرهاد احمدی[۲]، محمد جواد ضمیری[۳*]، محسن ساری[۴]

۱- دانش آموخته گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین، ملاثانی، خوزستان و دانشجوی دکتری تغذیه دام، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، بخش علوم دامی،دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز
۳- استاد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز
۴- استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین، ملاثانی، خوزستان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۲۱)

چکیده

هدف این پژوهش بررسی اثر جایگزینی پروتین پَر ماکیان هیدرولیز شده در هیدروکسید کلسیم با کنجاله سویا در جیره نشخوارکنندگان با روش تولید گاز بود. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: جیره ۱ یا جیره کنترل (۷۰ درصد کنسانتره و ۳۰ درصد یونجه)، در جیره ۲، پَر فرآوری نشده جایگزین کنجاله سویا شد و در جیره‌های ۳، ۴ و ۵ پَر هیدرولیز شده با هیدروکسید کلسیم (در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و دور همزن ۱۴۰۰ بار در دقیقه) به‌ترتیب به مدت ۱۰۰ (تیمار ۳) ، ۲۰۰ (تیمار۴) و ۳۰۰ دقیقه (تیمار۵) جایگزین کامل کنجاله سویا شد. نتایج نشان داد که با افزایش زمان فرآوری از ۱۰۰ به ۳۰۰ دقیقه، درجه محلول شدن پَر از ۵۰/۸ به ۹۰/۷ درصد افزایش یافت. جیره‌های دارای پَر هیدرولیز شده در هر سه زمان، گوارش‌پذیری شکمبه‌ای بیشتری (۷۲/۲، ۷۹/۰ و ۶۹/۳ درصد) در مقایسه با جیره دارای پَر فرآوری نشده (۵۵/۲ درصد) داشتند، ولی این افزایش گوارش‌پذیری با زمان فرآوری رابطه مستقیم نداشت. تفاوت معنی‌داری در غلظت نیتروژن آمونیاکی بین تیمار کنترل (۷/۸۲ mg/100 mL) و تیمار دارای پَر فرآوری شده در ۲۰۰ (۷/۶۴ mg/100 mL) دقیقه مشاهده نشد، ولی تیمار دارای پَر فرآوری نشده کاهش معنی‌داری (۴/۱۷ mg/100 mL) نسبت به تیمار کنترل نشان داد ($P<۰/۰۵$). ارزیابی میکروبیولوژیک نمونه‌های پَر فرآوری شده نشان داد که شرایط هیدرولیز در کنترل کامل آلودگی میکروبی کارآمد بود. یافته‌ها نشان دادند که پَر فرآوری شده با هیدروکسید کلسیم به مدت۲۰۰ دقیقه می‌تواند جایگزین امیدبخشی برای بخشی از پروتئین در جیره نشخوارکنندگان باشد، هر چند نتیجه‌گیری قطعی نیازمند انجام آزمایش‌های درون‌تنی است.

واژه‌های کلیدی: پَر هیدرولیز شده، تولید گاز، کنجاله سویا، نشخوارکننده، هیدروکسید کلسیم

* نویسندهٔ مسئول: mjzamiri@gmail.com و Zamiri@shirazu.ac.ir

مقدمه

استفاده از پسماندهای زیستی در تغذیه دام فزون بر کمک به کاهش قیمت جیره، سبب کاهش مشکلات زیست محیطی نیز می‌شود (Poel, 2000). سالانه $۷/۷ \times ۱۰^{۸}$ تن مواد کراتینی، مانند پَر، مو، شاخ و سم تولید می‌شود که می‌تواند آلودگی‌های زیست محیطی بسیاری را در پی داشته باشد (Grazziotin *et al.*, 2006). پَر، ۱۰٪ وزن پرنده را تشکیل می‌دهد و ۹۰٪ وزن پَر دارای کراتین است (Grazziotin *et al.*, 2006). بخش بیشتر کراتین پَر از نوع بتا کراتین است (Sawyer *et al.*, 2000) که سرشار از اسیدآمینه‌های سرین، سیستئین، گلایسین، آلانین و ترئونین است؛ اما به نسبت، متیونین، لایزین و تریپتوفان کمتری دارد (Cherry *et al.*, 1975). محکم بودن پروتئین فیبری کراتین ناشی از بالا بودن شمار پیوندهای دای‌سولفیدی، پیوندهای هیدروژنی و خاصیت آب‌دوستی پایین است که سبب نامحلول شدن کراتین و پایداری آن در برابر تجزیه به وسیله آنزیم‌هایی مانند پپسین و تریپسین می‌شود (Cohlberg, 1993). وجود این ساختارهای پایدار در پَر سبب شده است که بدون فرآوری، ارزش تغذیه‌ای این منبع پروتئینی بسیار اندک باشد (Latshaw, 1990)؛ برای نمونه گوارش‌پذیری شکمبه‌ای پَر کمتر از ۱۸ درصد گزارش شده است (Henderickx and Martin, 1963). با توجه به گستردگی صنعت پرورش طیور در کشور، روزانه مقدار بسیار زیادی پَر تولید می‌شود، اما برنامه ویژه‌ای برای بازیافت این منبع ارزشمند پروتئینی وجود ندارد. استفاده کارآمد و اقتصادی پَر در تغذیه حیوانات نیازمند نوعی پیش‌فرآوری است که سبب افزایش گوارش‌پذیری، بدون کاهش کیفیت اسیدآمینه‌ای پَر شود و از سویی ارزان و اقتصادی باشد. دما و فشار دو عامل کلیدی برای افزایش گوارش‌پذیری پَر شناخته شده‌اند، ولی در بسیاری از موارد تأمین دما و فشار بالا، هزینه‌بَر و با اتلاف انرژی همراه است و از سویی، کیفیت پَر هیدرولیز شده را کاهش می‌دهد (Grazziotin *et al.*, 2006). همچنین هنگام فرآوری با اسید، شرایط فرآوری به اندازه‌ای شدید است که باعث تخریب بسیاری از اسیدهای آمینه پَر می‌شود؛ فرآوری با اسید می‌تواند به تشکیل پیوندهای دای‌سولفیدی منجر شود که بر گوارش‌پذیری تاثیر منفی می‌گذارد (Holtzapple *et al.*, 2013). یافته‌های بررسی تاثیر همزمان pH، دما، نوع مواد شیمیایی، فشار و زمان بر افزایش گوارش‌پذیری پَر ناهماهنگ هستند؛ در برخی موارد باعث افزایش ارزش تغذیه‌ای، و در مواردی موجب تخریب شدید اسیدآمینه‌ای و کاهش گوارش‌پذیری می‌شوند (Papadopoulos *et al.*, 1986; Wang and Parsons, 1997; Moritz and Latshaw, 2001).

یکی از مواد مناسب برای فرآوری، به ویژه در ایران، هیدروکسید کلسیم است که به مقدار زیاد و با هزینه بسیار کم تولید می‌شود. هیدروکسید کلسیم، در میان ترکیبات بازی، ارزان‌تر، ایمن و دوستدار محیط زیست است و به آسانی در واکنش با دی‌اکسیدکربن بازیافت می‌شود (Holtzapple and Davison, 1999). از سویی، حلالیت پایین هیدروکسید کلسیم موجب می‌شود تا pH در خلال دوره فرآوری ترموشیمیایی در شرایط نسبتاً ضعیف‌تر قلیایی (در مقایسه با هیدروکسیدسدیم و دیگر بازهای قوی) ثابت باشد که به کاهش تخریب اسید آمینه‌های حساس به فرآوری کمک می‌کند (Coward-Kelly *et al.*, 2006). همچنین، هیدروکسید کلسیم برای نشخوارکنندگان سمی نیست (Sierra *et al.*, 2009) و کلسیم به جا مانده در پَر هیدرولیز شده نیز برای آنها قابل استفاده است. هیدروکسید کلسیم در دمای پایین کارآیی اندکی دارد و در خلال فرآوری باید به شیوه کارآمدی با پَر آمیخته شود (Xu *et al.*, 2010). به این منظور و نیز برای افزایش تماس پَر با آب و هیدروکسید کلسیم، یک راکتور دوجداره مجهز به همزن پَره‌دار، طراحی و ساخته شد. بنابراین، هدف از انجام این پژوهش بررسی ارزش جیره‌های پرکنسانتره دارای پَر ماکیان هیدرولیز شده با هیدروکسید کلسیم در پی جایگزینی با کنجاله سویا در جیره نشخوارکنندگان، با فناوری تولید گاز بود.

مواد و روش‌ها

با توجه به نبود رآکتور مورد نیاز برای فرآوری، یک راکتور برای این هدف، طراحی و ساخته شد (Rajaee Rad *et al.*, 2013). راکتور فرآوری‌کننده از یک مخزن دو جداره استیل به گنجایش ۲ لیتر ساخته شد. برای افزایش سطح تماس، پَر با شیرابه هیدروکسید کلسیم، با استفاده از یک الکتروموتور با دور ۱۴۰۰ در دقیقه ساخت شرکت موتوژن تبریز (الکتروموتور تک فاز صنعتی خازن دائم، کلاس حرارتی اف، فرکانس کار ۵۰ هرتز و ولتاژ نامی ۲۲۰) و یک همزن (متشکل از یک شافت ۶۰ سانتی‌متر پوله با

قطر اولیه ۳۵ میلی‌متر، لوله مانسمان گازی یک اینچی به طول ۵۰ سانتی‌متر و ۶ پره به ابعاد ۱۷ × ۸۰ میلی‌متر) مواد داخل رآکتور آمیخته شدند. از آنجایی که پس از فرآوری، شیرابه تولیدی پودر پَر تجزیه می‌شود، به کمک طراحی تلسکوپی، شافت همزنی طراحی شد که بتوان آن را از رآکتور بیرون آورد. دمای مورد نظر به کمک یک المنت گرمایی و حسگر دیجیتال تأمین شد. دمای یکنواخت در فضای بین دو دیواره رآکتور، با یک پمپ تأمین شد که سر راه ورودی مخزن قرار داشت. برای کاهش شدت فرسودگی، به کمک یک مولتی تایمر دیجیتال، الکتروموتور برای ۵ دقیقه کار می‌کرد و یک دقیقه استراحت داشت (شکل ۱).

.

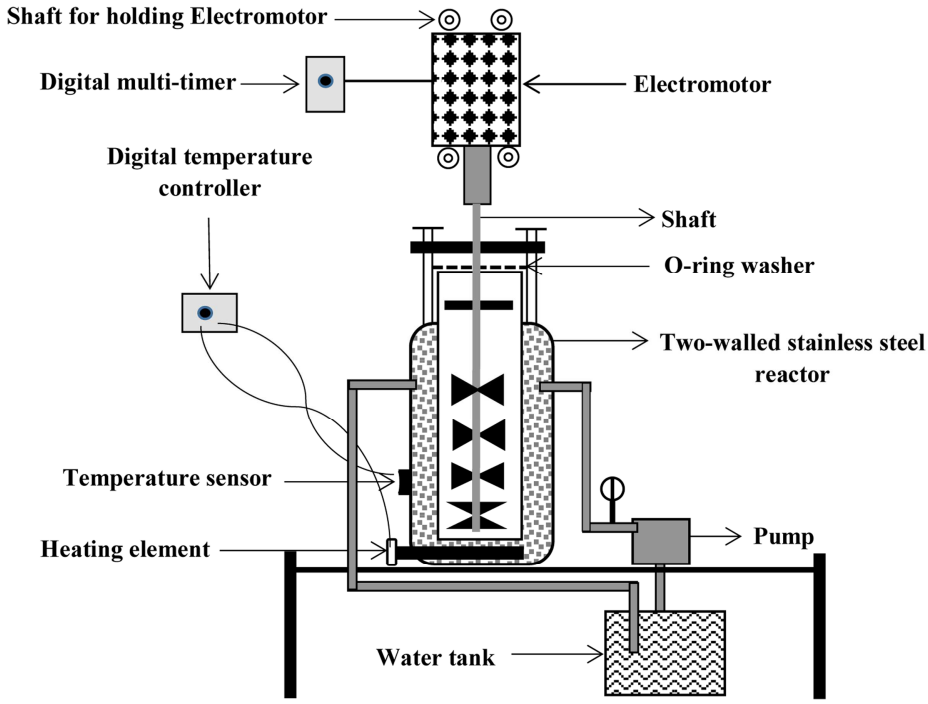

Fig. 1. Schematic of two-walled reactor for hydrolysis of feather

شکل ۱- شماتیکی از راکتور دوجداره برای هیدرولیز پَر

نمونه‌های پَر جوجه‌های گوشتی (Cobb 500) در پایان دوره پرورش شسته، خشک، آسیا و سپس از الک یک میلی‌متری عبور داده شدند. نمونه های پَر ۹۲ درصد ماده خشک،۸۲ درصد پروتئین خام، ۳ درصد چربی، ۱/۵ درصد فیبر خام و ۳/۸ درصد خاکستر داشتند. در آغاز، ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر به درون رآکتور ریخته شد و پس از رسیدن دمای آب به نزدیک ۱۰۰ درجه سانتی-گراد، ۶ گرم هیدروکسید کلسیم و ۶۰ گرم پَر (بر پایه ماده خشک) به رآکتور افزوده و برای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ دقیقه در ۱۴۰۰ دور در دقیقه فرآوری شد. در پایان زمان فرآوری، نمونه‌ای برای آزمون میکروبی گرفته شد و بقیه محلول هیدرولیز شده پَر (شکل ۲) از رآکتور خارج شد و pH آن با دمیدن دای اکسید کربن به ۹ رسانده شد. سپس، pH با افزودن اسید هیدروکلریک ۱ نرمال به ۷ رسید؛ شیرابه هیدرولیز شده در pH ~۷ و در دور ۳۰۰۰ برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی برای تجزیه پی‌آیند در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (Coward-Kelly *et al.*, 2006).

پروتئین نمونه‌ها با روش کلدال (نیتروژن × ۶/۲۵) اندازه‌گیری (AOAC, 2000) و میزان محلول شدن پَر در (پروتئین محلول شده در فاز مایع) نمونه سانتریفیوژ شده بر اساس درصد اولیه نیتروژن کل به‌صورت زیر محاسبه شد (Coward-Kelly *et al.*, 2006):

$$\text{میزان تبدیل} = \frac{V \times TK_L}{m \times TK_D} \times 100$$

در این معادله:

V= حجم کل مایع درون رآکتور (لیتر)

TK_L= کل نیتروژن کلدالی در مایع سانتریفیوژ شده (درصد)

TK_D= کل نیتروژن کلدالی در پَر خشک فرآوری نشده (درصد)

m= وزن پَر خشک فرآوری شده (گرم).

شمارش میکروبی روی پَرهای محلول شده که در دمای اتاق نگه‌داری شده بودند، انجام شد. در آغاز، ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه و ۹۰ سی‌سی محلول ۰/۹ درصد سدیم کلراید، یکنواخت آمیخته شدند و آمیزه آنها به سه نسبت رقیق شد. نمونه‌های رقیق شده با روش اختلاطی[1] کشت داده شدند و هر پلیت برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پلیت‌هایی که بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی باکتری داشتند برای محاسبه تعداد کل باکتری به کار برده شدند (Bauer *et al.*, 1966).

پس از محاسبه غلظت پروتئین پر فرآوری شده، حجمی (میلی‌لیتر) از محلول پروتینی پَر که معادل پروتئین سویا بود، برداشته و جایگزین کامل کنجاله سویا شد. در تیمار دارای پَر خام، آن مقدار (میلی‌گرم) پَر برداشته شد که برابر پروتئین تأمین شده از سویا باشد. بنابراین، تیمارها عبارت بودند از ۱- تیمار شاهد (۷۰ درصد کنسانتره و ۳۰ درصد یونجه، جدول ۱)؛ ۲- پَر خام جایگزین کنجاله سویا؛ ۳- پَر محلول شده در ۱۰۰ دقیقه جایگزین کنجاله سویا؛ ۴- پَر محلول شده در ۲۰۰ دقیقه جایگزین کنجاله سویا و ۵- پَر محلول شده در ۳۰۰ دقیقه جایگزین کنجاله سویا.

محیط کشت، محیط کشت پیشنهادی Tilley and Terry (1963) و Van Soest *et al.* (1966) بود. پیش از افزودن مایع شکمبه، جریان گرمی از گاز دای اکسید کربن، دست‌کم برای ۶ ساعت، در محیط کشت برقرار شد. مایع شکمبه از دو گاو ۲ ساله و دارای فیستولای شکمبه‌ای و ۳ ساعت پس از خوراک‌دهی صبح با جیره دارای ۷۰ درصد کنسانتره و ۳۰ درصد یونجه گرفته شد و با پارچه ململ ۲ لایه، صاف و به محلول بی‌هوازی شده (دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد) افزوده شد. آمیزه محیط کشت و مایع شکمبه در دمای ۳۹/۰±۰/۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه زیر جریان پیوسته‌ای از دای‌اکسیدکربن گرم قرار داده شد. سپس، ۳۰ میلی‌لیتر این آمیزه به درون ویال‌های دارای ۳۰۰ میلی‌گرم نمونه که برای یک شبانه‌روز در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده بودند، ریخته شد و برای ۲۰ ثانیه فضای بالای ویال‌ها در جریان دای‌اکسیدکربن گرم قرار داده شد. آنگاه ویال‌ها در بن‌ماری دارای دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. ویال‌ها با درپوشی از جنس بوتیل (14 mm butyl rubber stopper) بسته شدند و یک درپوش آلومینیومی روی آنها پرس شد. حجم گاز با فرو کردن سر سوزن (طول: ۲/۵۴ سانتی متر، شماره ۲۲) مجهز به سنسور فشار دیجیتال روی درپوش بوتیلی، در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون با ۳ تکرار به ازای هر تیمار اندازه‌گیری شد. حجم گاز تولیدی هر نمونه، بر پایه میانگین حجم گاز تولیدی در ویال‌های شاهد (فقط دارای محیط کشت و مایع شکمبه) (۵ ویال)، تصحیح شد. در پایان ۷۲ ساعت انکوباسیون، محتویات هر ویال به درون بشری منتقل و پس از افزودن ۲۰ میلی‌لیتر محلول شوینده خنثی به آن، برای یک ساعت جوشانیده شد. سپس، ماده خشک و خاکستر ماده باقیمانده محاسبه و گوارش‌پذیری واقعی ماده آلی به‌صورت وزنی تعیین شد.

نسبت گوارش‌پذیری آزمایشگاهی ماده آلی (۷۲ ساعت) به میلی‌لیتر گاز تولیدی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون به عنوان شاخصی از بازدهی پروتئین میکروبی (فاکتور جزءبندی ۲) در نظر گرفته شد (Blümmel *et al.*, 1997). غلظت نیتروژن آمونیاکی پس از ۴ ساعت انکوباسیون با ۳ تکرار به ازای هر تیمار با اسپکتروفوتومتر (طول موج ۶۳۰ نانومتر) اندازه‌گیری شد (Broderick and Kang, 1980).

واکاوی داده‌ها، در قالب طرح کاملاً تصادفی، و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام شد (SAS, 2009).

1. Pour plate

2. Partitioning Factor

Fig. 2. Untreated (raw) feather (right); and feather hydrolyzed for 200 min (left)

شکل ۲- پَر خام (فرآوری نشده) (سمت راست)؛ و پَر محلول شده در ۲۰۰ دقیقه (سمت چپ)

جدول ۱- اجزای خوراکی جیره آزمایشی (جیره کنترل) و جیره تغذیه شده به گاو فیستوله‌دار برای تهیه مایع شکمبه

Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diet (control diet) and the diet fed to a fistulated cow for rumen fluid collection

Ingredients (% DM)	Value
Alfalfa hay	30.00
Corn grain	21.43
Barley grain	35.08
Soybean meal	12.35
Calcium carbonate	0.41
Vitamin-mineral premix	0.49
Common salt (NaCl)	0.24
Total	100.00
Concentrate-to-forage ratio	70:30
Chemical composition(DM basis)	
Crude protein (%)	16.5
Organic matter (%)	94.2
NFC (%)	56.2
NDF (%)	24.3
ADF (%)	13.5
Forage NDF (%)	14.8
Metabolizable energy (Mcal/kg)	2.48

[1] Calculated, based on tabulated data (NRC, 1996)

نتایج و بحث

اثر شرایط فرآوری بر حلالیت پروتین پَر

اثر زمان فرآوری بر محلول شدن پروتین پَر در شکل ۳ نشان داده شده است. با افزایش زمان فرآوری به ۳۰۰ دقیقه، درجه محلول شدن پروتئین پَر به ۹۰/۷ درصد رسید، در حالی که فرآوری پَر به مدت ۱۰۰ دقیقه فقط ۵۰/۸ درصد از پروتین پَر را حل کرد که نشان‌دهنده تاثیر قابل توجه زمان فرآوری بر هیدرولیز شدن پروتئین پَر است. فرآوری پَر با هیدروکسید کلسیم سبب تولید مخلوطی از پپتیدهای کوچک، پلی‌پتید و اسیدهای آمینه می‌شود (Coward-Kelly *et al.*, 2006) و کاهش پیوندهای دای‌سولفیدی حل شدن پَر را افزایش می‌دهد (Goddard and Michaelis, 1934). همچنین، با کاهش تیوگلیکولات، پیوندهای محکم پَر از هم پاشیده می‌شوند و حلالیت پروتئین پَر افزایش می‌یابد (Goddard and Michaelis, 1934). فرآوری کوتاه‌مدت در دمای پایین برای محلول کردن پروتئین پَر ارزشمندتر است (Papadopoulos *et al.*, 1986)، زیرا این شرایط، اثر کمتری بر تخریب پروتئین دارد در حالی‌که دمای بالا و زمان طولانی (دمای بیشتر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و زمان بیشتر از۲۰۰ دقیقه) می‌تواند تخریب پروتئین و کاهش انتخابی سیستئین، سرین و ترئونین را در پی داشته باشد (Coward-Kelly *et al.*, 2006). در آزمایشی در دمای ۱۵۰ درجه برای ۲۵ دقیقه، ۸۰ درصد پروتئین پَر حل شد (Coward-Kelly *et al.*, 2006)، اما ایجاد چنین دمایی از لحاظ ایمنی شرایط ویژه‌ای را می‌طلبد و همچنین نیاز به رآکتورهای با طراحی ویژه دارد که بسیار پرهزینه و غیراقتصادی است؛ از این رو، در تمام دامنه‌های زمانی، دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد بکار برده شد. در پژوهش کنونی فرآوری پَر در pH بالای هیدروکسید کلسیم و دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، فرآورده‌ای بدون جرم میکروبی تولید کرد که می‌تواند سبب برتری این فرآورده در مقایسه با مصرف پودر گوشت در جیره باشد (Wilesmith *et al.*, 1991).

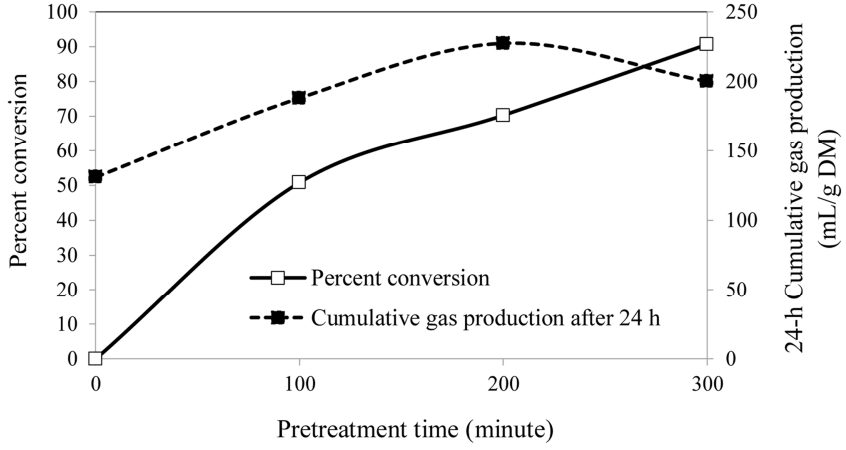

Fig. 3. The effect of pretreatment duration (minutes) on percent solubilization of feather, and gas production (mL) after 24 h incubation

شکل ۳- اثر زمان فرآوری (دقیقه) بر درصد محلول شدن پَر و تولید گاز (میلی‌لیتر) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون

تجزیه‌پذیری و تولید گاز

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های تولید گاز در جدول ۲ نشان داده شده است. تغییر در پتانسیل تولید گاز بین تیمارهای مختلف ($P<۰/۰۵$) نشان داد که زمان فرآوری پَر می‌تواند تغییرات گسترده‌ای در پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر، ایجاد کند. نرخ تولید گاز بین نمونه‌های پَر فرآوری شده و شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. بیشترین نرخ گوارش‌پذیری ماده آلی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون مربوط به تیمار شاهد و نمونه‌ای از پَر بود که برای ۲۰۰ دقیقه فرآوری شده بود. در پژوهشی، با جایگزین کردن نسبت مساوی پودر پَر و خون در جیره با ۵۰ درصد پروتین سویا، افزایش معنی‌داری در گوارش-پذیری ماده خشک و آلی گزارش شد که پژوهشگران آن را به افزایش بهره‌وری نیتروژن و فیبر در دیگر اجزای جیره نسبت دادند و چنین نتیجه‌گیری کردند که پودر پَر تأثیر منفی بر فعالیت میکروبی نداشت (Cozzi *et al.*, 1995). به‌طور کلی، محلول شدن پروتئین، معادل افزایش تجزیه‌پذیری آن در شکمبه است (Henderickx and Martin, 1963) و از آنجایی که پروتئین پَر فرآوری شده در رآکتور هیدرولیزکننده به میزان بالایی به‌صورت محلول درآمده بود، افزایش تجزیه‌پذیری آن دور از انتظار نبود. با شکسته شدن کراتین نامحلول و تبدیل آن به مخلوطی از پلی‌پپتید، پپتید و آمینو اسید ممکن است کارآیی استفاده از نیتروژن بهبود یافته و سبب افزایش گوارش‌پذیری جیره دارای پَر محلول شده باشد (Korniłowicz-Kowalska and Bohacz, 2011)، زیرا برخی باکتری‌ها مانند *Bacteroides ruminicola* به‌طور مستقیم از پپتید استفاده می‌کنند (Pittman and Bryant, 1964). همچنین، گزارش شده است که با افزودن اسید آمینه و پپتید، گوارش‌پذیری فیبر و بازدهی استفاده از نیتروژن بهبود یافت (Yang, 2002). در پژوهش کنونی، هر چند با افزایش زمان فرآوری مقدار پروتئین محلول شده (شکل ۳) افزایش یافت ولی افزایش گوارش‌پذیری خطی نبود، بگونه‌ای که نمونه فرآوری شده برای ۲۰۰ دقیقه بالاترین گوارش‌پذیری را داشت (جدول ۲). این یافته را می‌توان چنین توجیه کرد که افزایش بیش از اندازه زمان فرآوری و نیز دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، موجب تغییر ساختار و کاهش فراهمی پپتیدها و اسیدهای‌آمینه و سرانجام کاهش گوارش‌پذیری شده است. از سویی، حجم گاز تولیدی محلول پَر فرآوری شده در ۲۰۰ دقیقه افزایش معنی‌داری نسبت به دیگر تیمارهای فرآوری داشت (جدول ۲) که این نیز می‌تواند شاهدی دیگر بر نبود رابطه خطی بین افزایش زمان فرآوری و افزایش گوارش‌پذیری پَر باشد.

فاکتور جزءبندی (PF)، یعنی نسبت تجزیه واقعی سوبسترا به حجم گاز تولیدی، نمایانگر تغییر در بازدهی پروتئین میکروبی است (Blümmel *et al.*, 1997)؛ ارزش‌های بالای PF نشان‌دهنده آن است که بخش زیادی از ماده آلی حقیقی گوارش‌پذیر برای تولید پروتئین میکروبی استفاده شده است (Jackson *et al.*, 2010). بازدهی استفاده از نیتروژن در تیمار پَر فرآوری شده، با توجه به جیره کنسانتره‌ای در آزمایش، باید سبب افزایش سهم پروتئین میکروبی نسبت به پَر خام شود که این نیز با یافته‌های جدول ۳ هماهنگ است. ولی تیمار شاهد، PF کمتری نسبت به پَر فرآوری شده در ۲۰۰ و ۳۰۰ دقیقه داشت. افزایش PF در تیمارهای دارای پَر محلول شده اینگونه توجیه می‌شود که پپتیدهای کوچک در محلول پروتئینی به‌طور مستقیم قابل انتقال به برخی میکروارگانیزم‌های شکمبه هستند (Broderick and Clayton, 1997). از سویی، هزینه انرژتیک مصرف پپتیدها برای سنتز پروتئین میکروبی در مقایسه با اسیدهای آمینه و آمونیاک کمتر است (Payne, 1983).

در نشخوارکنندگان، جیره‌های دارای PF بالا، کارآیی بالاتری دارند که فزون بر بهبود پروتئین میکروبی، سبب کاهش تولید متان و مشکلات زیست محیطی نیز می‌شوند (Blummel *et al.*, 2003; Darshan *et al.*, 2007; Sudha *et al.*, 2009). افزایش PF جیره با محلول کردن پروتئین پَر نشان‌دهنده بهبود ارزش تغذیه‌ای پَر با این فرآوری است.

اختلاف معنی‌داری بین تولید گاز تیمار شاهد و پَر فرآوری شده برای ۲۰۰ دقیقه تا ساعت ۲۴ مشاهده نشد ولی با افزایش زمان انکوباسیون حجم گاز تولیدی در پی ۲۰۰ دقیقه فرآوری، کاهش معنی‌داری یافت ($P<۰/۰۵$). شاید محلول شدن پروتئین پَر در تیمارهای فرآوری شده سبب تولید پپتید و اسیدهای‌آمینه آزاد شده است که در کنار قندهای محلول جیره، سوخت و ساز مناسبی در ابتدای انکوباسیون برای توده میکروبی فراهم کرده‌اند و با افزایش

توده میکروبی تولید گاز افزایش یافته است. افزودن منبع پپتیدی (کازئنات سدیم) در جیره گاوهای شیری، سبب افزایش گوارش‌پذیری فیبر و بهبود بازدهی نیتروژن شد (Reynal and Broderick, 2005)، ولی به علت کم شدن ماده آلی جیره در پی حذف کنجاله سویا، با افزایش زمان انکوباسیون، حجم گاز تولیدی کاهش یافته است. حجم گاز تیمار پَر فرآوری نشده در تمام زمان‌های انکوباسیون نسبت به تیمار شاهد و پَر فرآوری شده، کاهش معنی‌داری یافت ($P<۰/۰۵$).

نیتروژن آمونیاکی

غلظت نیتروژن آمونیاکی تیمار شاهد و تیمارهای دارای محلول پَر فرآوری شده و پَر خام در جدول ۳ نشان داده شده است. تأثیر معنی‌داری در غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه‌ای پَر محلول شده در ۲۰۰ دقیقه با تیمار شاهد مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$). هیدرولیز کردن پَر، با افزایش پپتیدها و اسیدهای آمینه همراه است (Coward-Kelly *et al.*, 2006) که تجزیه آنها نیتروژن آمونیاکی را افزایش می‌دهد. در یک پژوهش، جایگزینی ۵۰ درصد از پروتئین سویا با نسبت مساوی پودر پَر و خون در روش کیسه-گذاری در شکمبه، تولید نیتروژن آمونیاکی را افزایش داد (Cozzi *et al.*, 1995). غلظت نیتروژن آمونیاکی در نمونه-های پَر محلول شده برای ۱۰۰ و ۳۰۰ دقیقه کمتر از تیمار شاهد و پَر محلول شده در ۲۰۰ دقیقه بود ($P<۰/۰۵$). شاید طولانی‌شدن زمان فرآوری سبب تخریب پپتیدها و اسیدهای‌آمینه حساس در تیمار ۳۰۰ دقیقه فرآوری شده باشد که در نتیجه سبب کاهش تولید نیتروژن آمونیاکی شده است. گزارش شده که پروتئین پَر نسبت به اوره موجب مسمومیت آمونیاکی نمی‌شود (Coward-Kelly *et al.*, 2006) و این می‌تواند توجیهی برای استفاده بیشتر آن در جیره در مقایسه با اوره باشد.

چشم انداز صنعتی فرآوری پَر با هیدروکسید کلسیم

در مقیاس صنعتی، فرآوری پَر نیازمند طراحی رآکتوری است که هیچ‌گونه تبادل گرمایی با محیط بیرون نداشته باشد؛ زیرا پُرهزینه‌ترین گامه این فرآوری، تامین دمای موردنیاز است. یکی از برتری‌های فرآوری پَر با هیدروکسید کلسیم برای گنجاندن در جیره نشخوارکنندگان کم‌خطر بودن کلسیم موجود در شیرابه فرآوری است که می‌تواند کمبود کلسیم در جیره‌های بر پایه غلات و علوفه بالغ را جبران کند (Gandi *et al.*, 1997). افزودن مکمل پروتئینی دارای نسبت بالایی از کلسیم، می‌تواند به تأمین کلسیم این جیره‌ها کمک کند. زمانی که نیاز به تولید فرآورده‌ای با غلظت پایین کلسیم باشد، امکان بازیافت نسبتاً آسان آن وجود دارد. از آنجا که برخی نمک‌های کلسیمی حلالیت پایینی دارند، می‌توان کلسیم را با رسوب دادن آن به کربنات کلسیم، بازیافت کرد. در مقیاس صنعتی به آسانی می‌توان کلسیم موجود در شیرابه را به کربنات کلسیم رسوب (به علت حلالیت پایین، ۰/۰۰۹۳ گرم در لیتر؛ حاصل‌ضرب حلالیت (K_{sp}) $۸/۷ \times ۱۰^{-۹}$) داد و سپس آن را با فرآیند کیلن[1]، به هیدروکسید کلسیم بازیافت کرد (Coward-Kelly *et al.*, 2006). دی‌اکسید مورد نیاز برای دمیدن به داخل شیرابه را می‌توان با سوزاندن بخش اندکی از پَر در دستگاه تولید-کننده دای اکسید کربن[2] تولید کرد. روش دیگر برای کاهش pH شیرابه و بازیافت کلسیم، استفاده از اسیدهای آلی مانند کربوکسیلیک اسید و یا لاکتیک اسید برای رسوب دادن کلسیم اضافی است؛ اسیدهای آلی از این نظر مطلوب هستند که در فرآورده پایانی به عنوان منبع انرژی نیز می‌توانند مصرف شوند (Holtzapple *et al.*, 2013). در گامه پایانی، شیرابه هیدرولیز شده را می‌توان با خشک‌کن پاششی، خشک و با اجزای جیره مخلوط کرد. هم‌چنین، می‌توان شیرابه را با گرمادهی تغلیظ و شیرابه تغلیظ شده را با اجزای جیره پلت کرد.

1. Kiln Process
2. Carbon dioxide generator

جدول ۲- تولید تجمعی گاز با جیره‌های آزمایشی (میلی‌لیتر به ازای هر گرم ماده خشک)

Table 2. Cumulative gas production (mL per g DM) of the experimental diets

Time after incubation (h)	Diets					*P*-value
	1	2	3	4	5	
12	156[b]	89[d]	173[a]	155[b]	127[c]	0.001
24	230[a]	130[c]	200[b]	227[a]	188[b]	0.001
48	254[a]	163[d]	215[c]	230[b]	204[c]	0.004
72	271[a]	169[d]	228[c]	245[b]	218[c]	0.002

[1] Control treatment (70% concentrate + 30% alfalfa hay); 2: raw feather substituting soybean meal protein (SBM); 3: feather hydrolyzed for 100 min substituting SBM; 4: feather hydrolyzed for 200 min substituting SBM; 5: feather hydrolyzed for 300 min substituting SBM.

[a,b]: Within rows, means with a common superscript are not different (P>0.05).

جدول ۳- غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه و برخی فراسنجه‌های تولید گاز جیره‌های آزمایشی

Table 3. Ruminal NH_3-N concentration and selected gas production parameters of the experimental diets

Diets[1]		Gas production parameters			
	NH_3-N[2]	$a + b$	C	$IVOMD_{24}$	PF_{72}
1	7.82[a]	84.0[a]	0.047[ab]	77.6[a]	13.7[a]
2	4.17[d]	52.7[c]	0.042[c]	55.2[c]	12.2[b]
3	5.44[c]	70.4[b]	0.045[b]	72.2[b]	13.8[a]
4	7.64[a]	80.2[a]	0.048[a]	79.0[a]	14.2[a]
5	5.99[b]	68.9[b]	0.045[ab]	69.3[b]	13.5[a]
SEM	0.632	3.33	0.001	1.84	0.58
P-value	0.003	0.001	0.002	0.004	0.008

[1]1: Control treatment (70% concentrate + 30% alfalfa hay); 2: raw feather substituting soybean meal protein (SBM); 3: feather hydrolyzed for 100 min substituting SBM; 4: feather hydrolyzed for 200 min substituting SBM; 5: feather hydrolyzed for 300 min substituting SBM.

[a–c]: Within columns, means with common superscript (s) are not different (P>0.05).

[2]Ruminal fluid NH_3-N concentration (mg/100 mL) at the end of 4 h incubation

c: Gas production rate constant (h^{-1}); $a + b$: gas production potential (mL per 300 mg DM); $IVOMD_{24}$: *in vitro* organic matter digestibility (%) after 24 h incubation

PF_{72}: partitioning factor after 72 incubation

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این پژوهش نشان داد که هیدروکسید کلسیم می‌تواند به خوبی کراتین پَر را محلول کند، ولی نیازمند توجه ویژه به دما و زمان فرآوری است. در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، بهترین زمان فرآوری ۲۰۰ دقیقه، و ضریب گوارش‌پذیری آن همانند تیمار شاهد بود. به دلیل ارزانی، ایمنی، امکان بازیافت و فراهمی هیدروکسید کلسیم به یاری این شیوه فرآوری می‌توان به تولید پروتئین پَر محلول ارزان و عاری از آلودگی امیدوار بود. با این وجود، ضروری است پژوهش‌های بیشتری درباره فراهمی اسیدهای آمینه و ارزیابی فرآورده در دام‌های زنده انجام شود.

سپاسگزاری

از انجمن علمی دانشجویی بخش علوم دامی دانشگاه شیراز برای تامین بخشی از هزینه‌های مالی این پژوهش سپاسگزاری می شود.

فهرست منابع

AOAC 2000. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists.

Bauer A., Kirby W., Sherris J. C. and Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, 45: 493–496.

Blummel M., Karsli A. and Russell J. 2003. Influence of diet on growth yields of rumen micro-organisms in vitro and in vivo: influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. British Journal of Nutrition, 90: 625–634.

Blümmel M., Makkar H. P. S., Chisanga G., Mtimuni J. and Becker K. 1997. The prediction of dry matter intake of temperate and tropical roughages from in vitro digestibility/gas-production data, and the dry matter intake and in vitro digestibility of African roughages in relation to ruminant liveweight gain. Animal Feed Science and Technology, 69: 131–141.

Broderick G. and Kang J. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. Journal of Dairy Science, 63: 64–75.

Broderick G. A. and Clayton M. K. 1997. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. Journal of Dairy Science, 80: 2964–2971.

Cherry J., Young C. and Shewfelt A. 1975. Characterization of protein isolates from keratinous material of poultry feathers. Journal of Food Scienc, e 40: 331–335.

Cohlberg J. A. 1993. The structure of α-keratin. Trends in Biochemical Sciences, 18: 360–362.

Coward-Kelly G., Chang V. S., Agbogbo F. K. and Holtzapple M. T. 2006. Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 1. Chicken feathers. Bioresource Technology, 97: 1337–1343.

Cozzi G., Andrighetto I., Berzaghi P. and Andreoli D. 1995. Feather and blood meal as partial replacer of soybean meal in protein supplements for sheep. Small Ruminant Research, 15: 239–245.

Darshan K., Krishnamoorthy U., Kiran D., Bhaskaran R. and Manjunath V. 2007. Effect of supplementing finger millet straw with two concentrates differing in their partitioning factor on dry matter intake, organic matter digestibility and nitrogen metabolism in Karan Friesian crossbred heifers. Animal Feed Science and Technology, 137: 35–45.

Gandi J., Holtzapple M. T., Ferrer A., Byers F. M., Turner N. D., Nagwani M. and Chang S. 1997. Lime treatment of agricultural residues to improve rumen digestibility. Animal Feed Science and Technology, 68: 195–211.

Goddard D. R. and Michaelis L. 1934. A study on keratin. Journal of Biological Chemistry, 106: 605–614.

Grazziotin A., Pimentel F., De Jong E. and Brandelli A. 2006. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. Animal Feed Science and Technology, 126: 135–144.

Henderickx H. and Martin J. 1963. In vitro study of the nitrogen metabolism in the rumen. Comptes Rendus de Recherches, 31: 7–117.

Holtzapple M. T. and Davison R. R. 1999. Methods of biomass pretreatment. US Patent, 5,865,898.

Holtzapple M. T., Noyes G. P., Davison R. and Granda C. B. 2013. Method and system for solubilizing protein. US Patent, 13,771,688.

Jackson W., Krishnamoorthy U., Robinson P. H. and Fadel J. G. 2010. Effect of changing partitioning factor (PF) and in vitro rate of gas production (k) of diets on intake and digestibility, microbial N production, as well as milk production and composition, of lactating crossbred dairy cows. Animal Feed Science and Technology, 160: 128–136.

Kornikłowicz-Kowalska T. and Bohacz J. 2011. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. Waste Management, 31: 1689–1701.

Latshaw J. 1990. Quality of feather meal as affected by feather processing conditions. Poultry Science, 69: 953–958.

Moritz J. and Latshaw J. 2001. Indicators of nutritional value of hydrolyzed feather meal. Poultry Science, 80: 79–86.

NRC. 1996. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th ed. Natl. Acad. Press. Washington. DC.

Papadopoulos M., El Boushy A., Roodbeen A. and Ketelaars E. 1986. Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal. Animal Feed Science and Technology, 14: 279–290.

Payne J. 1983. Peptide transport in bacteria: methods, mutants and energy coupling. Biochemical Society Transactions, 11: 794–798.

Pittman K. and Bryant M. 1964. Peptides and other nitrogen sources for growth of Bacteroides ruminicola. Journal of Bacteriology, 88: 401–410.

Poel A. F. B. 2000. Handbook of Poultry Feed from Waste: Processing and Use, Springer.

Rajaee Rad A., Ahmadi F. and Zamiri M. J. 2013. A reactor for pretreatment of keratinous waste products of animal and poultry processing plants for production of a proteinous concentrate and biomethane. Iran Patent No. 80,916.
Reynal S. and Broderick G. 2005. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science, 88: 4045–4064.
SAS. 2009. Statistical Analysis System (SAS) User's Guide, Rev. 04, SAS Institue, Cary, North Carolina, USA.
Sawyer R. H., Glenn T., French J. O., Mays B., Shames R. B., Barnes G. L., Rhodes W. and Ishikawa Y. 2000. The expression of beta (β) keratins in the epidermal appendages of reptiles and birds. American Zoologist, 40: 530–539.
Sierra R., Granda C. and Holtzapple M. T. 2009. Lime Pretreatment. In Biofuels (ed. JR Mielenz), pp. 115–124, Humana Press.
Sudha S., Krishnamoorthy U., Bhaskaran R. and Robinson P. 2009. Effect of diets differing in rate of gas production on intake, digestibility and nitrogen metabolism in crossbred lactating cows. Animal Nutrition and Feed Technology, 9: 145–154.
Tilley J. and Terry R. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. Grass and Forage Science, 18: 104–111.
Van Soest P., Wine R. and Moore L. 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the *in vitro* digestion of cell walls. In 10th International Grassland Congress, Helsinki, Finland.
Wang X. and Parsons C. 1997. Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals. Poultry Science, 76: 491–496.
Wilesmith J. W., Ryan J. and Atkinson M. 1991. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. Veterinary Record, 128: 199–203.
Xu J., Cheng J. J., Sharma-Shivappa R. R. and Burns J. C. 2010. Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production, Bioresource Technology, 101: 2900–2903.
Yang C. M. 2002. Response of forage fiber degradation by ruminal microorganisms to branched-chain volatile fatty acids, amino acids, and dipeptides. Journal of Dairy Science, 85: 1183–1190.

Animal Production Research
Vol. 4, No. 3, 2015 (13-24)

University of Guilan

Evaluation of ruminant diets containing lime-hydrolyzed feather meal substituted with soybean meal using *in vitro* gas production technique

A. Rajaee Rad[1], F. Ahmadi[2], M. J. Zamiri[3*], M. Sari[1]

1. Department of Animal Science, Ramin Agricultural and Natural Resources University, Molasani, Ahvaz, Iran
2. Graduated Student, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University, 71441-65186, Shiraz, Iran
3. Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University, 71441-65186, Shiraz, Iran

(Received: 1-11-2014 – Accepted: 12-9-2015)

Abstract

This study was performed aimed at evaluating the effect of substitution of calcium hydroxide-hydrolyzed feather with soybean meal (SBM) in ruminant diet using the *in vitro* gas production technique. Treatment 1 (control) consisted of 70% concentrate + 30% alfalfa hay. In treatment 2, untreated (raw) feather was substituted with SBM. In treatments 3, 4, and 5, feather hydrolysate obtained following hydrolysis with calcium hydroxide in a reactor at 1400 rpm and 100ºC for 100, 200, or 300 min was replaced with SBM. By increasing the reaction time from 100 to 300 min, the feather solubility increased from 50.8 to 90.7%. Diets containing solubilized feather had greater *in vitro* digestibility (72.9, 79.0 and 69.3%) compared to the diet containing untreated feather (59.2%), but the increase was not directly correlated with pretreatment duration. No significant difference was recorded in ruminal NH_3-N between control treatment (7.82 mg/100 mL) and the treatment containing feather pretreated for 200 min (7.64 mg/100 mL), but significant differences were found between untreated feather (4.17 mg/100 mL) and the control treatment. Microbiological evaluation of the pretreated feather samples showed that hydrolysis conditions were effective in controlling microbial contamination. The results showed that feather pretreated for 200 min could be a promising alternative for replacing a portion of proteins in the ruminant diet; however, the actual value of the hydrolyzed feather for ruminants must be determined in *in vivo* studies.

Keywords: Calcium hydroxide, Hydrolyzed feather, Gas production, Soybean meal, Ruminant

*Corresponding author: mjzamiri@gmail.com; Zamiri@shirazu.ac.ir