نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱٤، بهـــار ۱۳۹٦
ص‌ص: ۲۰۷~۲۱۸

تاثیر سطوح مختلف مولتی‌آنزیم ناتوزایم پلاس بر قابلیت هضم، تخمیرپذیری و تجزیه‌پذیری یونجه خشک

- **مرتضی رضائی** (نویسنده مسئول)
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،کرج
- **مجتبی زاهدیفر**
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،کرج.
- **علی مصطفی تهرانی**
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،کرج
- **حسین غلامی**
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،کرج

تاریخ دریافت : اسفند ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش : اردیبهشت ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۸۸۶۷۰۷
Email: Amirsaleh1380@yahoo.com

چکیده

این پژوهش به منظور تعیین تاثیر سطوح مختلف مولتی‌آنزیم ناتوزایم پلاس شامل مقادیر صفر، ۰/۵ و ۰/۷۵ گرم آنزیم در هر کیلوگرم علوفه خشک یونجه به عنوان سه گروه آزمایشی بر تخمیرپذیری، قابلیت هضم و تجزیه‌پذیری علوفه یونجه در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی انجام شد. تخمیرپذیری نمونه‌ها با اندازه‌گیری آزمایشگاهی گاز با روش استاندارد انجام شد. برای اندازه‌گیری تجزیه‌پذیری ماده خشک ، فیبر نامحلول در شوینده خنثی(NDF) و فیبر نامحلول در شوینده اسیدی(ADF) یونجه در شکمبه از طریق روش کیسه‌های نایلونی (*in situ*) از ۳ راس گاو نر اخته فیستولا شده نژاد تالشی استفاده شد. قابلیت هضم ماده آلی، ماده خشک، NDF و ADF در تیمارهای مختلف با روش جمع‌آوری کل مدفوع بر روی ٤ راس گوسفند نر بالغ نژاد شال اندازه‌گیری شد. نتایج آزمایشات تخمیرپذیری نشان داد که استفاده از آنزیم اثری بر میانگین تولید گاز در تیمارهای آزمایشی نداشت. میزان تجریه‌پذیری ماده خشک، NDF وADF در بین تیمارهای آزمایشی در تمام زمان های انکوباسیون دارای اختلاف معنی داری بود به طوریکه با افزایش مقدار مصرف آنزیم، تجزیه-پذیری ماده خشک و NDFوADF نیز افزایش یافت (P<۰/۰۵). نتایج آزمایشات قابلیت هضم نشان داد که استفاده از آنزیم در سطح ۰/۷۵ گرم آنزیم در هر کیلوگرم علوفه خشک یونجه سبب افزایش معنی دار قابلیت هضم ماده آلی، ماده خشک، NDF و ADF شد(P< ۰/۰۵). درمجموع نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از مولتی‌آنزیم مورد آزمایش در سطح ۰/۷۵ گرم آنزیم به ازای هر کیلوگرم یونجه مصرفی سبب بهبود قابلیت تجزیه‌پذیری و قابلیت هضم علف خشک یونجه شده است.

واژه‌های کلیدی: یونجه، مولتی‌آنزیم ناتوزایم، تجزیه‌پذیری، قابلیت هضم

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 114 pp: 207-218

Effect of a Natuzyme Plus multi-enzyme levels on digestibility, fermentibility and degradability of alfalfa hay.

By: Rezaei[1*], M., Zahedifar[1], M., Mostafa Tehrani[1], A., and Gholami[1], H.
1: Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), karaj , Iran

Received: February 2017 **Accepted: April 2017**

This experiment was conducted to investigate the effects of Natuzyme plus multi enzyme at different inclusions on fermentibility, degradability and digestibility of alfalfa hay. The treatments consisted of 1) control group, 2) 0.5 g enzyme per Kg of alfalfa hay and 3) 0.75 g enzyme per Kg of alfalfa hay. A completely randomized design (CRD) was used for analyzing data. *In Vitro* gas production and *In Situ* nylon bag techniques were used for measuring of fermentibility and degradability. Three fistulated cows (mature Taleshi steers) were used for degradability measurement of DM, NDF and ADF. Digestibility of alfalfa hay was performed by total collection of feces method on 4 heads of *Shal* mature ram. No significant difference was obtained in gas test results. The effect of enzyme levels on degradability of DM, NDF and ADF at all incubation times were significantly different ($p<0.05$).The digestibility of DM, OM, NDF and ADF in 0.75 g/Kg of alfalfa hay group were higher than other treatments significantly ($p<0.05$). Results of this research indicated that using 0.75 g/Kg DM Enzyme significantly improved *in situ* degradability and *in vivo* digestibility of alfalfa hay.

Key words: Alfalfa hay, Multi-enzyme Natuzyme, Degradability, Digestibility

مقدمه

با توجه به توسعه کاربرد بیوتکنولوژی در تغذیه دام‌ها و تولید انواع آنزیم‌های میکروبی در سال های اخیر، تحقیقات در رابطه با استفاده از آنزیم‌ها در تغذیه نشخوارکنندگان شروع شده است(Jalilvand و همکاران، ۲۰۰۸b). در ایران تحقیقات بسیار محدودی در این زمینه انجام شده است که بیش‌تر آنها مربوط به استفاده از آنزیم‌ها در تغذیه پرندگان می باشد. Jalilvand و همکاران (۲۰۰۸a) گزارش کردند که افزودن آنزیم به جیره باعث افزایش تخمیرپذیری و میزان تولید گاز می‌شود. این افزایش در ساعت های ۶ الی ۱۲ بعد از تخمیر، بیش‌تر به چشم می‌خورد. به نظر می‌رسد آنزیم‌ها به دلیل کاهش زمان اتصال باکتری‌ها به علوفه سبب افزایش سرعت تولید گاز در بیست و چهار ساعت بعد از تخمیر می‌شوند. میزان تاثیرآنزیم‌ها بستگی به عوامل مختلفی از قبیل منشا آنزیم، مقدار مصرف، نحوه مصرف، نوع مواد خوراکی و میزان فعالیت آنها بستگی دارد(Muhammad Abubakar و همکاران، ۲۰۱۶). Kung و همکاران (۲۰۰۰) گزارش نمودند که افزودن آنزیم به قسمت علوفه جیره گاوهای شیری در اواسط دوره شیردهی، میزان تولید شیر را تا ۱/۸ کیلوگرم در روز افزایش می‌دهد. Yang و همکاران (۱۹۹۹)گزارش کردند که کاربرد آنزیم فیبرولایتیک در جیره گاوهای شیرده سبب افزایش معنی-داری در قابلیت هضم ماده خشک می‌شود. در همین پژوهش آنها نشان دادند که اضافه کردن آنزیم به قسمت کنسانتره نیز سبب افزایش تولید شیر می شود. اضافه کردن آنزیم به علوفه هر چند سبب افزایش تولید شیر می‌گردد، اما این افزایش در مقایسه با اضافه کردن آنزیم به قسمت کنسانتره اندک بوده است. Sutton و همکاران (۲۰۰۳) در آزمایشی بر روی گاوهای در اوائل شیردهی، مشخص کردند که علاوه بر بهبود قابلیت هضم ماده

آلی، میزان شیر تولیدی نیز در اثر اضافه کردن آنزیم فیبرولایتیک به قسمت کنسانتره جیره ۱۰ درصد افزایش نشان داده است. Beauchemin و همکاران(۱۹۹۹،۲۰۰۳) عنوان نمودند که استفاده از آنزیم در خوراک نشخوارکنندگان قابلیت هضم وجذب مواد مغذی جیره به خصوص علوفه را بهبود بخشیده و موجب افزایش تولید شیر خواهد شد، البته استفاده از سطوح مختلف آنزیم پاسخ های متغیری را از سوی حیوانات داشته است. هدف از این پژوهش تعیین اثرات استفاده از مقادیر مختلف آنزیم تجاری ناتوزایم پلاس بر فراسنجه‌های تخمیرپذیری، تجزیه‌پذیری و قابلیت هضم یونجه خشک بود.

مواد و روش‌ها

مکان و زمان آزمایش: این تحقیق در آزمایشگاه فیزیولوژی تغذیه دام موسسه تحقیقات علوم دامی کشور و در بهار ۱۳۹۰ انجام شد.تیمارهای آزمایشی: این تحقیق با ۳ تیمار (سه سطح مختلف آنزیم) شامل گروه‌های زیر، انجام شد: علوفه یونجه بدون استفاده ازآنزیم(جیره شاهد یا علوفه یونجه بدون آنزیم)، علوفه یونجه به همراه استفاده از ۰/۵ گرم آنزیم به ازای هر کیلوگرم یونجه(به اختصار یونجه+آنزیم۰/۵۰)، علوفه یونجه به همراه استفاده از ۰/۷۵ گرم آنزیم به ازای هر کیلوگرم یونجه(به اختصار یونجه+آنزیم۰/۷۵). مولتی‌آنزیم مورد استفاده از شرکت Bioproton Pty. Ltd., Brisbane, Queensland, Australia تهیه شد که حاوی آنزیم‌های سلولاز ۴.۲۰۰.۰۰۰ واحد در کیلوگرم، زایلاناز ۵.۰۰۰.۰۰ واحد در کیلوگرم، بتا-گلوکوناز ۱.۰۰۰.۰۰۰ واحد در کیلوگرم، آلفا-آمیلاز ۷۵۰.۰۰۰ واحد در کیلوگرم، پکتیناز ۷۰.۰۰۰ واحد در کیلوگرم، فیتاز ۳۰۰.۰۰۰ واحد در کیلوگرم، پروتئاز ۳.۰۰۰.۰۰۰ واحد در کیلوگرم و لیپاز(نامعلوم) بود. این آنزیم با نام تجاری ناتوزایم پلاس از طریق شرکت وارد کننده در اختیار موسسه قرار گرفت.

آماده‌سازی نمونه‌های یونجه: برای آسیاب کردن علوفه در آزمایش‌های مختلف، ابتدا از آسیاب یک میلی‌متر و سپس از الک یک میلی‌متراستفاده شد. همچنین برای آزمایش تجزیه‌پذیری از آسیاب ۴ میلی‌متر و برای تغذیه دام‌ها در آزمایش قابلیت هضم، نمونه‌ها به قطعات ۱۰ الی ۱۲ سانتی‌متر خرد شدند. در مرحله بعد عملیات آزمایشگاهی(تجزیه تقریبی) بر روی نمونه ها و طبق روش های استاندارد انجام پذیرفت (AOAC ، ۲۰۱۲).

تعیین ترکیبات شیمیایی: علوفه یونجه مورد آزمایش طبق روش استاندارد مورد آزمایش قرار گرفت و ترکیبات شیمیایی آن از نظر ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام، چربی خام ، خاکستر خام و نیز عناصر معدنی (شامل کلسیم و فسفر) اندازه گیری شد (AOAC ، ۲۰۱۲).

آماده سازی دام های فیستوله شده: ابتدا ۳ راس گاو نر تالشی با میانگین وزن زنده ۵±۳۵۰ کیلوگرم انتخاب شده و به روش دو مرحله‌ای، مورد عملیات فیستول‌گذاری شکمبه قرار گرفتند (Doupherty ، ۱۹۸۱ و صفایی و فتاح‌نیا، ۱۳۹۵).

اندازه‌گیری تجزیه‌پذیری: مقادیر تجزیه‌پذیری ماده خشک، فیبر نامحلول در شوینده خنثی[1] و فیبر نامحلول در شوینده اسیدی[2] با استفاده از ۳ راس گاو نر تالشی فیستول‌گذاری شده با متوسط وزن زنده ۵±۳۵۰کیلوگرم به روش کیسه‌های نایلونی اندازه‌گیری شد(AFRC ،۱۹۹۳).

گاوهای مذکور، به میزان ۱۰درصد بالاتر از سطح نگهداری با علوفه یونجه خشک و نیز مقادیر مختلف مولتی‌آنزیم (متناسب با تیمارهای آزمایشی) تغذیه شدند (McDonald و همکاران، ۱۹۹۵). در ابتدا کیسه های نایلونی غیرقابل تجزیه، خشک و وزن شده و سپس ۵ گرم از نمونه آزمایشی آسیاب شده را در هر یک از کیسه ریخته و از طریق فیستول گاوها، وارد شکمبه شدند و پس از گذشت زمان های مختلف صفر، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸،۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون، از شکمبه خارج شده و با آب سرد شسته شدند. سپس کیسه های شسته شده خشک و وزن شدند و از اختلاف وزن آنها میزان تجزیه پذیری ماده خشک بدست آمد. همچنین از نمونه اولیه و نمونه بعد از انکوباسیون NDF و ADF آنها اندازه گیری شده و در تجزیه پذیری NDF و ADF بدست آمد.

با استفاده از رابطه:

$$P = a + b\,(1-e^{-ct})$$

مقادیر فراسنجه‌های تجزیه پذیری شامل بخش محلول در آب(a)، بخش نامحلول در آب و کند تخمیر (b) و نیز نرخ

[1] Neutral Detergent Fiber(NDF)

[2] Acid Detergent Fiber(ADF)

تجزیـه‌پـذیری(c)، توسـط نـرم‌افـزار NEWY (Fitcurve) برازش شدند (Ørskov و McDonald ، ۱۹۷۹).

اندازه‌گیری تولید گاز (تخمیرپذیری): تولید گاز در زمان‌هـای مختلف ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بر روی نمونـه‌هـای آزمایشی، با استفاده از شیرابه شکمبه سه راس گاو تالشـی فیسـتوله شده انجام شد(Menke و Steingass، ۱۹۸۸).

ابتدا مایع شکمبه از گاوهای تالشـی فیسـتولاگـذاری شـده، کـه بـا توجه به نوع تیمارهای آزمایشی (به مـدت ۱۰ روز) فقـط از علوفـه یونجه و نیز با سطوح مختلف مولتی‌آنزیم تغذیه شده بودند،گرفتـه شد. اندازه‌گیری تولید گـاز در آزمایشـگاه فیزیولـوژی تغذیـه دام موسسه تحقیقات علوم دامی کشورانجام شد.

مولفه‌های تولید گاز(فراسنجه‌ها) از رابطه های ذیل محاسبه شدند (Ørskov و McDonald ، ۱۹۷۹).

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

Y = حجم تولید گاز از ماده خوراکی در زمان t

b= تولیدگاز از بخش کند تخمیر و نامحلول در آب (میلی‌لیتر)

C = نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)

t = زمان‌های انکوباسیون(ساعت)

سپس با استفاده از نرم‌افـزار کمکـی NEWY (Fit curve) ایـن مولفه، برازش شدند.

اندازه‌گیری قابلیت هضم: قابلیت هضم ماده خشک، NDF وADF به روش جمع‌آوری کل مدفوع در قفس‌های متابولیکی و با استفاده از ۴ راس گوسفند نر اخته شده شال (به وزن زنده ۵ ±۶۰ کیلوگرم) انجام شد. خوراک حیوانات در حد نگهداری و بر اساس جداول استاندارد غذایی در اختیار آنها قرار گرفت (NRC ، ۲۰۰۷).

طرح آمـاری مـورد اسـتفاده: داده‌هـای بدسـت آمـده در ترکیبـات شیمیایی، تولیدگاز، تجزیه پذیری و قابلیـت هضـم در قالـب طـرح کاملاً تصادفی (CRD) تجزیه و تحلیل شد. مدل آماری طرح بـه صـورت $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$ بـود کـه در آن Y_{ij} مقـدار هـر مشاهده، μ میانگین پارامتر مورد نظر، T_i اثر تیمار و e_{ij} اثر خطای آزمایش می باشد.

تعـداد تکرارهـا، در آزمایشـات تعیـین ترکیبـات شـیمیایی، تجزیـه پـذیری، تولیـدگاز و قابلیـت هضـم بـه‌ترتیـب ۳، ۳، ۳ و ۴ بودنـد. میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکـن در سـطح خطـای ۵ درصد، با هم مقایسه شده و در نهایت داده های آزمایشی با استفاده از رویه ANOVA در نرم افـزار SAS (۱۹۹۸) تجزیـه و تحلیـل شدند.

نتایج

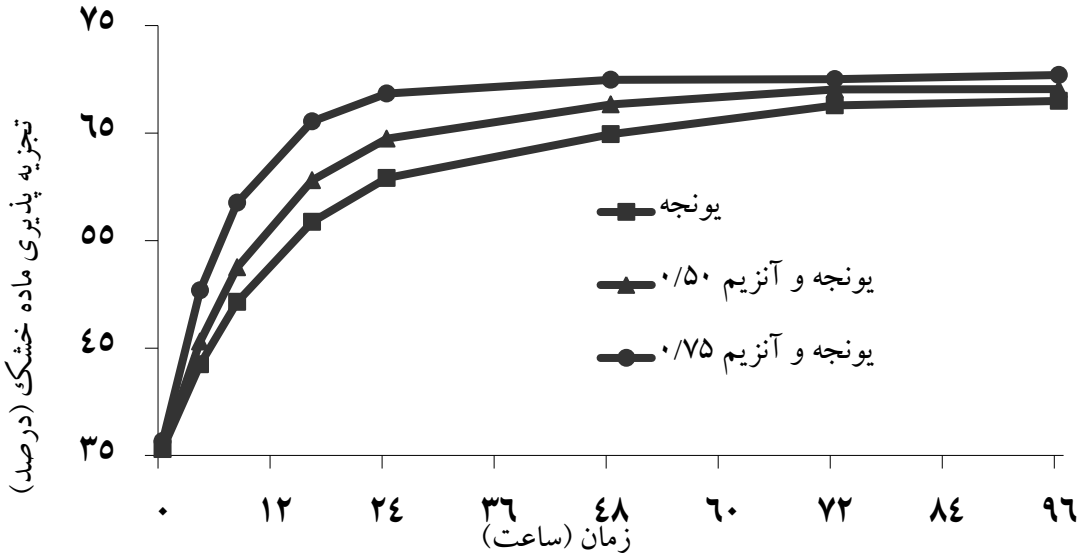
ترکیبات شیمیایی: میزان مـاده آلـی، پـروتئین خـام، چربـی خـام، خاکستر خام، کلسیم، فسفر، دیواره سلولی(NDF) و فیبرنـامحلول در شوینده اسیدی(ADF) علف خشک یونجه‌های آزمایشـی بـه‌ترتیـب ۹۰/۴، ۱۲/۳، ۱/۲، ۹/۶، ۱/۲، ۰/۲، ۵۳/۸ و ۳۸/۸ درصـد در ماده خشک بود. همچنین میزان انرژی خام برابـر ۴۲۵۷ کـالری در گرم ماده خشک، اندازه‌گیری شد.

تولید گاز (تخمیرپذیری): نتایج آزمایشات تخمیرپذیری (تولید گاز) در جدول ۱ نشان دادکه حجم گاز تولیدی بین تیمارهای آزمایشی دارای تفاوت معنی‌داری نیستند(P>۰/۰۵). با این وجود با افزایش زمان انکوباسیون، مقدار گاز تولیدی افزایش یافته است.

جدول ۱: میزان تولید گاز برحسب میلی‌لیتر درتیمارهای آزمایشی در طی زمان‌های متوالی انکوباسیون

تیمارها	زمان انکوباسیون (ساعت)								
	۲	۴	۶	۸	۱۶	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
یونجه	۸/۱	۱۸/۷	۲۶/۷	۳۰/۳	۳۶/۰	۴۲/۷	۴۷/۶	۴۹/۹	۵۰/۳
یونجه + آنزیم ۰/۵۰	۸/۱	۱۸/۶	۲۶/۸	۳۰/۶	۳۶/۲	۴۲/۸	۴۷/۸	۴۸/۵	۵۰/۴
یونجه + آنزیم۰/۷۵	۸/۵	۱۹/۲	۲۷/۲	۳۱/۶	۳۷/۱	۴۳/۴	۴۷/۶	۴۷/۷	۵۱/۲
خطای استاندارد	۰/۱۳۲	۰/۲۱۲	۰/۱۵۸	۰/۲۶	۰/۲۲۴	۰/۳۰۴	۰/۴	۰/۳۷۷	۰/۱۸۰

تجزیه‌پذیری: نتایج آزمایشات تجزیه‌پذیری ماده خشک،NDF وADF به‌ترتیب در جدول‌های ۲، ۳ و ۴ و نیز به‌ترتیب در شکل-های ۱، ۲ و ۳ گزارش شده است. میزان تجزیه‌پذیری ماده خشک در بین تیمارهای آزمایشی در تمام زمان‌های انکوباسیون دارای اختلاف معنی‌داری شد(P<۰/۰۵). با افزایش مقدار آنزیم، تجزیه-پذیری ماده خشک نیز افزایش یافت. البته سرعت تجزیه‌پذیری ماده خشک، در بیست و چهار ساعت اول انکوباسیون بیش‌تر از ساعات بعدی بود.



شکل۱: نمودار تجزیه پذیری ماده خشک (DM) تیمارهای آزمایشی در طی زمان‌های مختلف انکوباسیون شکمبه‌ای

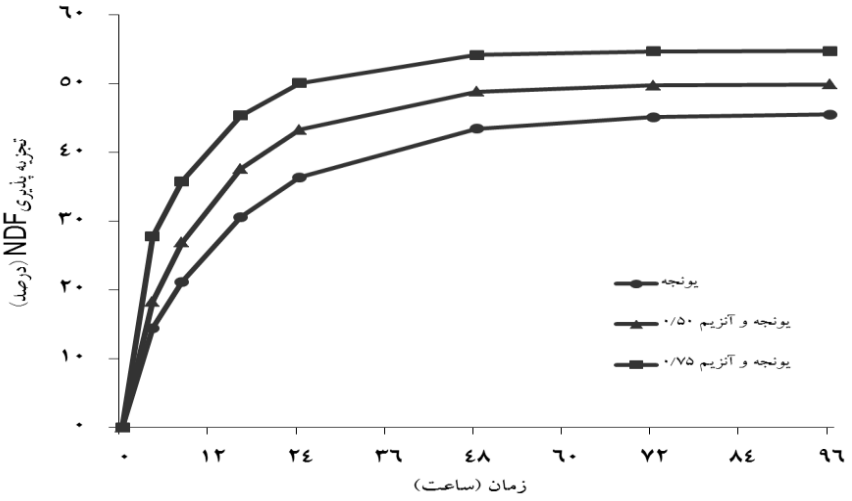
در جدول ۲، فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری ماده خشک و تجزیه‌پذیری موثر یونجه در تیمارهای آزمایشی برای سرعت‌های مختلف عبور از شکمبه ۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۰۸ که به ترتیب برای شرایط نگهداری، تولید شیر و پرواربندی می باشد، نشان داده شده است. تجزیه‌پذیری موثر در هر سه شرایط مذکور دارای تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) بوده و استفاده از آنزیم در جیره‌های غذایی اثر معنی‌داری روی تجزیه‌پذیری موثر ماده خشک (در شرایط مختلف) داشت که مؤید اثر آنزیم بر افزایش فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری یونجه بوده است.

جدول ۲: فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری (DM) و تجزیه‌پذیری موثر ماده خشک در سرعت‌های مختلف عبور در تیمارهای آزمایشی

تیمارها	فراسنجه‌ها(درصد در ماده خشک)			برآورد تجزیه پذیری موثر در سرعت‌های مختلف عبور(درصد ماده خشک در ساعت)		
	بخش محلول در آب(a)	بخش نامحلول در آب و کند تجزیه(b)	نرخ تجزیه‌پذیری (درصد در ساعت)	k_p =۰/۰۲	k_p = ۰/۰۵	k_p = ۰/۰۸
یونجه	۳۵/۶	۳۰/۱ a	۰/۰۸ a	۵۹/۴ a	۵۳/۷ a	۵۰/۳ a
یونجه + آنزیم ۰/۵۰	۳۵/۶	۳۲/۵ b	۰/۰۹ a	۶۲/۳ b	۵۶/۶ b	۵۳/۰ b
یونجه + آنزیم ۰/۷۵	۳۶/۳	۳۳/۷ c	۰/۱۳ b	۶۵/۶ c	۶۰/۹ c	۵۷/۴ c
خطای استاندارد	۰/۲۷۴	۰/۴۷۳	۰/۰۱۳	۰/۵۲۴	۰/۶۱۲	۰/۶۳۲

a ,b و c: وجود حرف یا حروف مختلف بر روی میانگین‌ها در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بودن بین میانگین‌ها می‌باشد (P < ۰/۰۵).

مقایسه تجزیه‌پذیری NDF در ساعت‌های مختلف انکوباسیون شکمبه (شکل۲) نشان داد که استفاده از آنزیم اثر معنی‌داری بر تجزیه‌پذیری NDF دارد (P< ۰/۰۵) و دامنه تغییرات آن از تیمار(یونجه بدون آنزیم) در ساعت ۴ (کم‌ترین) شروع و برای تیمار(یونجه و آنزیم ۰/۷۵) در ساعت ۹۶ (بیش‌ترین) بوده است، البته چون NDF بخشی از ماده خشک خوراک است، مقادیر تجزیه‌پذیری NDF از تجزیه‌پذیری ماده خشک کمتر است.



شکل۲: نمودار تجزیه پذیری (NDF) تیمارهای آزمایشی در طی زمان‌های مختلف انکوباسیون شکمبه‌ای

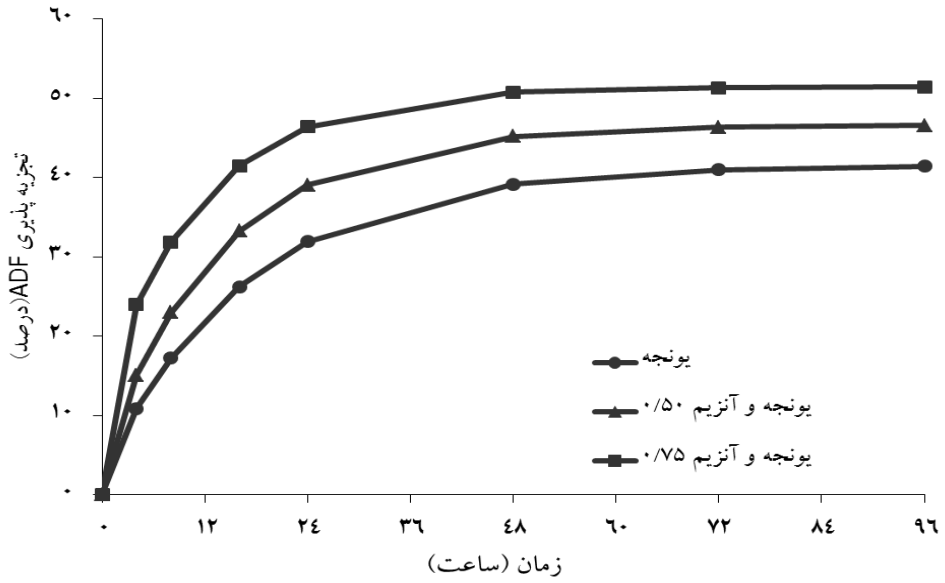
جدول۳: تجزیه‌پذیری موثر NDF در تیمارهای آزمایشی و سرعت‌های عبور مختلف

تیمارها	سرعت عبور(درصد در ماده خشک)		
	k_p = ۰/۰۲	k_p = ۰/۰۵	k_p = ۰/۰۸
یونجه	۳۵/۸ a	۲۷/۷ a	۲۳/۰ a
یونجه + آنزیم ۰/۵۰	۴۱/۱ D	۳۳/۱ D	۲۸/۱ D
یونجه + آنزیم ۰/۷۵	۴۷/۶ c	۴۰/۸ c	۳۶/۵ c
خطای استاندارد	۱/۰۶۱	۱/۱۶۲	۱/۲۲۵

a, b و c: وجود حرف یا حروف مختلف بر روی میانگین‌ها در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بودن بین میانگین‌ها می باشد (P < ۰/۰۵) و K_p سرعت عبور می باشد.

با توجه به جدول ۳، تجزیه‌پذیری موثر NDF در تمام شرایط، دارای اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای آزمایشی شد(P < ۰/۰۵) که نشانگر تاثیر آنزیم بر تجزیه‌پذیری یونجه بوده است.

مقایسه تجزیه‌پذیری ADF (در زمان‌های مختلف انکوباسیون شکمبه) نشا ن داد(شکل ۳) که در بین تیمارهای آزمایشی، مقادیر تجزیه‌پذیری ADF (در تمام زمان‌ها) اختلاف معنی داری (P< ۰/۰۵) وجود دارد. در تیمار یونجه+ آنزیم(۰/۷۵)، بیشترین میزان تجزیه پذیری ADF مربوط به زمان ۹۶ ساعت است.



شکل۳: نمودار تجزیه پذیری(ADF) تیمارهای آزمایشی در طی زمان‌های مختلف انکوباسیون شکمبه‌ای

جدول ٤: تجزیه‌پذیری موثر ADF در تیمارهای آزمایشی

تیمارها	سرعت عبور(درصد در ماده خشک)		
	k =۰/۰۲	k = ۰/۰۵	k = ۰/۰۸
یونجه	۳۱/۶ a	۲۳/۶ a	۱۹/۱ a
یونجه + آنزیم ۰/۵۰	۳۷/۴ b	۲۹/۳ b	۲۴/۴ b
یونجه + آنزیم ۰/۷۵	۴۴/۱ c	۳۷/۲ c	۳۲/۷ c
SE	۱/۰۶۱	۱/۱۰۷	۱/۰۸۳

a, b و c: وجود حرف یا حروف مختلف بر روی میانگین‌ها در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بودن بین میانگین‌ها می‌باشد (P < ۰/۰۵). K سرعت عبور می باشد.

همچنین محاسبات آماری نشان داد که تجزیه‌پذیری موثر ADF(جدول ۴) در سرعت‌های مختلف عبور از شکمبه و شرایط مختلف فیزیولوژیک دارای تفاوت‌معنی‌داری (P < ۰/۰۵) بوده است.

قابلیت هضم: جدول ۵ نشان دهنده نتایج آزمایشات قابلیت هضم تیمارهای آزمایشی می‌باشد. در بین تیمارهای آزمایشی، مقادیر قابلیت هضم ماده آلی، ماده خشک، ماده خشک در ماده آلی، NDF و ADF دارای اختلاف معنی‌داری (P< ۰/۰۵) می‌باشد. در هر ستون و برای تمام شاخص‌ها، تیمار شاهد کم‌ترین و تیمار (یونجه +آنزیم۰/۷۵) بیش‌ترین میزان عددی را نشان می دهد.

بطورکلی نتایج آزمایشات قابلیت هضم مشابه نتایج تجزیه‌پذیری (ماده خشک، ADF وNDF) دارای روند یکسانی بود.

جدول ۵: میزان قابلیت هضم به روش جمع‌آوری کل مدفوع در تیمارهای آزمایشی

تیمارها	قابلیت هضم(درصد در ماده خشک)				
	ماده آلی	ماده خشک	ماده آلی در ماده خشک	NDF	ADF
یونجه	۷۵/۱ a	۷۳/۹ a	۵۵/۸ a	۶۷/۶ a	۵۹/۹ a
یونجه + آنزیم ۰/۵۰	۷۷/۰ b	۷۵/۱ a	۵۷/۹ b	۶۸/۶ a	۶۱/۲ ab
یونجه + آنزیم ۰/۷۵	۸۴/۷ c	۸۱/۵ b	۶۸/۷ c	۷۹/۴ b	۷۳/۰ b
SE	۰/۵	۱/۱۴۰	۰/۸۰۶	۱/۴۷۵	۰/۷۰۷

b,a و c: وجود حرف یا حروف مختلف بر روی میانگین‌ها در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بودن بین میانگین‌ها می باشد (P < ۰/۰۵).

بحث

نتایج آزمایشات ترکیبات شیمیایی با نتایج عباسی و همکاران(۱۳۸۶)، فضائلی(۱۳۷۱)، علوی (۱۳۷۹)، و عزیزی(۱۳۷۵) در یک دامنه می‌باشد و تفاوت‌های مشاهده شده می‌تواند احتمالاً ناشی از تفاوت در واریته یونجه، شرایط اقلیمی، عملیات زراعی، مرحله برداشت و نحوه نگهداری یونجه باشد(Givens و همکاران، ۲۰۰۰). نتایج آزمایش تولید گاز (تخمیرپذیری) نشان داد که این یافته ها با گزارشات Olivera (۱۹۹۸)، و Rode و Beauchemin(۱۹۹۸) مطابقت داشته و دارای روند صعودی می باشد. سرعت تولید گاز در ۲۴ ساعت اولیه بسیار چشمگیر می‌باشد و پس از آن بصورت یکنواخت ادامه می‌یابد. این روند صعودی درتمامی آزمایشات تولید گاز گزارش شده است.

تولید گاز به میزان پروتئین، دیواره سلولی و ماده آلی خوراک و نیز به عدم نوسانات pH شکمبه و شرایط تخمیر شکمبه ارتباط دارد. شاید دلیل عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایشی در این تحقیق به دلیل عوامل مختلفی از قبیل منشا آنزیم، مقدار مصرف، نحوه مصرف، میزان فعالیت آنزیم‌ها و نوع مواد خوراکی باشد(Muhammad Abubakar و همکاران، ۲۰۱۶).

همانطور که از جدول ۲ استنباط می گردد، بخش محلول در آب (a) تجزیه‌پذیری ماده خشک ، از تیمار شاهد تا تیماری که از ۰/۷۵ گرم آنزیم در هر کیلوگرم یونجه استفاده شده بود(یونجه + آنزیم۰/۷۵) تفاوت معنی‌داری نداشته است که مؤید تاثیر ناچیز آنزیم به دلیل عدم زمان کافی جهت تاثیرگذاری بر یونجه بوده است. همچنین از مقایسه بخش نا محلول در آب (b) تجزیه‌پذیری ماده خشک تیمارهای آزمایشی نشان می‌دهد که این فراسنجه در تیمار شاهد کم‌ترین و در تیمار(یونجه+آنزیم ۰/۷۵) بیش‌ترین بوده است که نشانگر تاثیر افزایش مقدار آنزیم بر تجزیه‌پذیری ماده خشک می‌باشد (P< ۰/۰۵). سرعت تجزیه پذیری(c) در تیمار (یونجه +آنزیم ۰/۷۵) بصورت معنی‌داری (P< ۰/۰۵) بالاتر از سایر تیمارها بود که نشانگر اثر آنزیم بر افزایش سرعت تجزیه‌پذیری یونجه می باشد.

احتمالاً دلیل این پدیده همکوشی[3] اثر هیدرولایتیک مولتی‌آنزیم با آنزیم‌های شکمبه در تجزیه یونجه بوده است(Eun و همکاران، ۲۰۰۷) .

تجزیه‌پذیری NDF یکی از معیارهای اساسی در تعیین قدرت اثر آنزیم‌های تجاری به خصوص آنزیم‌های تجزیه‌کننده فیبر در نشخوارکنندگان می‌باشد (Goering و VanSoest،۱۹۷۰ ؛ VanSoest ، ۱۹۹۴). نتایج ارائه شده در جدول ۳ نشان می‌دهد که آنزیم در ۲۴ ساعت اول انکوباسیون بیشترین تاثیر را داشته است و به تدریج با افزایش زمان انکوباسیون این اثر کمتر شده

[3] synergism

است. می‌توان نتیجه گرفت که اگر زمان کافی در اختیار میکروب‌های شکمبه باشد آنها می‌توانند بخش قابل تجزیه یونجه را به خوبی تجزیه کنند(McDonald و همکاران،۱۹۹۵ و VanSoest، ۱۹۹۴).

مزیت اصلی استفاده از آنزیم‌های تجاری می‌تواند افزایش سرعت و قابلیت تجزیه فیبر و NDF در مدت زمان کمتر باشد که این به نوبه خود می‌تواند سبب افزایش جریان مواد مغذی در دسترس حیوان و افزایش مصرف علوفه به دلیل کاهش اثر پرکنندگی علوفه در شکمبه باشد(Beauchemin و همکاران، ۲۰۰۳ ؛ Jalilvand و همکاران a، ۲۰۰۸ و جعفری،۱۳۸۴).

از نظر عددی مقادیر تجزیه‌پذیری ADF از تجزیه پذیری NDF کمتر است و دلیل آن این است که ADF بخشی از NDF می‌باشد. با توجه به شکل ۳، سطح تجزیه‌پذیری ADF در تیمار آزمایشی سوم(یونجه +آنزیم ۰/۷۵) از بقیه تیمارها، بصورت معنی‌داری بیشتر بوده است. همچنین در این تیمار تجزیه‌پذیری ADF در ۲۴ ساعت اول پس از انکوباسیون زیاد بوده و بعد از آن شیب خط بصورت یکنواخت در آمده است که نشان می‌دهد استفاده از آنزیم احتمالاً سبب تسریع در شروع تجزیه ADF در شکمبه شده است. این نتایج با یافته‌های سایر محققین مطابقت دارد(Elwakeel و همکاران،۲۰۰۷، Coblentz و همکاران، ۱۹۹۹). Rode و Beauchemin (۱۹۹۸)عنوان نمودند دلیل اصلی بالا بودن تجزیه‌پذیری الیاف در ۲۴ ساعت اول انکوباسیون و سپس کاهش سرعت آن، می‌تواند به دلیل توان بالای آنزیم در شروع تجزیه الیاف در شکمبه باشد در حالیکه در گروه شاهد مدت زمان نسبتاً زیادی(حدود ۴ تا ۶ ساعت بسته به گونه گیاه و فرم فیزیکی آن) لازم است تا میکروارگانیسم‌های شکمبه به قطعات فیبری در شکمبه متصل شده تا بتوانند تجزیه آنرا شروع نمایند. در شرایط تغذیه در سطح نگهداری و برای تیمار (یونجه +آنزیم۰/۷۵)، بدلیل اینکه شدت تجزیه پذیری ADF با استفاده از آنزیم بالاتر و از طرف دیگر سرعت عبور مواد از شکمبه پایین تر بوده است، میکروارگانیسم‌ها فرصت کافی برای تجزیه بیشتر ADF را داشته اند وبدین لحاظ تجزیه‌پذیری موثر ADF در این تیمار نسبت به تمام گروه‌های آزمایشی بیشتر بوده و تفاوت معنی‌داری با آنها دارد ($P < ۰/۰۵$).

روند نتایج آزمایشات مربوط به قابلیت هضم با نتایج آزمایشات Yang و همکاران (۱۹۹۹) و Sutton و همکاران(۲۰۰۳) روند مشابهی داشته و تغییرات مشاهده شده می‌تواند به دلیل تفاوت در روش استفاده از آنزیم، نوع آنزیم و یا تفاوت در واریته علوفه مصرفی باشد(Akin و همکاران،۱۹۸۹). در گزارشات محققین یاد شده، خوراک های آزمایشی آنها حاوی رطوبت بوده و یا بصورت سیلو مصرف شده است و آنزیم بصورت محلول بر روی خوراک اسپری شده است و سپس مخلوط یکنواخت بدست آمده به مصرف دام رسیده است. بنا به گزارشات محققین یاد شده، مقدار و روش کابرد آنزیم، میزان رطوبت جیره غذایی و نوع آنزیم می‌تواند اثرات چشمگیری روی تیمارهای آزمایشی داشته باشد. بی‌شک کاربرد آنزیم‌ها در آینده می‌تواند نقش مهمی را در تولیدات نشخوارکنندگان بازی نماید(Beauchemin و همکاران، ۲۰۰۳ ؛ Elwakeel و همکاران، ۲۰۰۷).

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از مولتی‌آنزیم مورد آزمایش به نسبت ۰/۷۵ گرم آنزیم به ازای هر کیلوگرم یونجه مصرفی، سبب بهبود قابلیت تجزیه‌پذیری و قابلیت هضم علف خشک یونجه شده و در نهایت ارزش غذایی این علوفه گران‌قیمت را افزایش می‌دهد.

منابع

جعفری، علی. (۱۳۸۴). تاثیر آنزیم های خوراکی فیبرولیتیک بر فراسنجه های هضمی کاه گندم در تغذیه گوسفند. پایان نامه دکترا، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان.

صفایی، ا.م. و فتاح‌نیا، ف.(۱۳۹۵). بیوتکنیک فیستول‌گذاری شکمبه درگاو هلشتاین. مجموعه مقالات پنجمین همایش ملی انجمن هلشتاین ایران. موسسه تحقیقات علوم دامی کشور. کرج. ایران.ص۲۸۸

عباسی، ا.، فضائلی، ح.، زاهدی‌فر، م.، میرهادی، س.ا.، گرامی، ع.، تیمورنژاد، ن.، علوی، س.م.(۱۳۸۴). جداول ترکیبات شیمیایی منابع خوراک دام و طیور ایران. انتشارات مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. کرج. ایران. ص۳۶.

عزیزی، ع. (۱۳۷۵). ترکیبات شیمیایی و انرژی خام منابع خوراکی دام و طیوراستان کردستان. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی. دانشگاه تهران. ص ۴۷.

علوی، م.(۱۳۷۹). ارزیابی داده‌های مربوط به ارزش غذایی منابع خوراک دام کشور(مواد خشبی)، معاونت آموزش و تحقیقات. مرکز آموزش عالی امام خمینی. ص ۱۰۰.

فضائلی، ح.(۱۳۷۱). تعیین ترکیبات شیمیایی و انرژی خام منابع خوراک دام استان گیلان. پایان نامه کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس. ص ۲۲۵.

AFRC(1993). Energy and protein requirements of ruminants. An advisory manual prepared by the technical committee on responses to nutrients, CAB International, Walingford, UK. p.159.

Akin, D. E.(1989). Histological and physical factor affecting digestibility of forages. *Agronomy Journal*., 81, 17-25.

AOAC,(2012). Official methods of analysis,15th Edition, Association of Official Analytical Chemists Inc, Arlington, Virginia 22201, U.S.A. p. 37-84.

Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, P. and Yang, W.Z.(2003). Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminant. *Journal of Animal Science*. 81(E. Suppl. 2): E37-e47.

Beauchemin, K.A., Rode L.M. and Karren, D.(1999). Use of feed enzymes in feedlot finishing diets. *Journal of Animal Science*. 79:243-246.

Coblentz, W.K., Abdelgadir, I.E.O., Cochran, R.C., Fritz, J.O., Fick, W.H., Olson, K.C. and Turner, J.E.(1999). Degradability of forage protein by *in situ* and *in vitro* enzymatic methods. *Journal of Dairy Science*. 82:343-354

Doupherty, R.W.(1981). Experimental surgery in farm animals.(2 ed.). Iowa State University Press .Ames. Pp.1-29

Elwakeel, E.A.Titgemeyer, E.C. Johnson, B.J. Armendariz, C.K. and Shirley, J.E.(2007). Fibrolytic enzymes to increase the nutritive value of dairy feedstuffs. *Journal of Dairy Science*. 90(11):5226-5236.

Eun, J. S. and Beauchemin K. A.(2007). Enhancing *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. *Journal of Dairy Science*.90:2839-2851.

Givens, D.I., Owen, E., Oxford, R.F.E. and Omed, H.M.(2000). Forage evalution ruminant nutrition.CAB International, Wallingford, U.K. Pp. 282-286.

Goering, H.K., Van Soest. Peter.J.(1970). Forage fiber analysis (Apparatus,Reagents, procedures and some application).,Agriculture handbook.No.379. Washingtone D.C. U.S. Departement of Agriculture.

Jalilvand, G., A. Naserian, E. Kebreab, N.E. Odongo, R. Valizadeh, F. Eftekhar-Shahroodi, S., Lopez, S. and France, J. (2008a). Rumen degradation kinetics of Alfaalfa hay, maize silage and wheat straw treated with fibrolytic enzymes. *Archivos de Zootecnia*, 57 (218): 155-164.

Jalilvand, G., Odongo, N.E., Lopez, S., Naserian, A., Valizadeh, R., Eftekhar-Shahrodi, F., Kabreab, E. and France, J.(2008b). Effects of different levels of an enzyme mixture on in vitro gas production parameters of contrasting forages. *Animal Feed Science and Technology*. 146:289-301.

Kung, L., Treacher, R.J., Nauman, G.A., Smagala, A.M., Endres, K.M. and Cohen, M.A.(2000). The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 83: 115-122.

Mirzaei-Aghsaghali, A., Maheri-Sis, N., Mirza-Aghazadeh, A., Safaei, A.R., Houshangi, A.F. and Aghajanzadeh-Golshani, A.(2008). Use of nylon bag technique to determine nutritive value and degradation kinetics of Iranian alfalfa varieties. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3: 214-221

McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D. and Morgan, C.A.(1995). Animal Nutrition. Longman Scientific and Technical, Harlow(4 ed.) Pp. 232-233.

Menke, K.H. and Steingass, H.(1988). Estimation of energetic feed value obtained From chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*. 28: 7-55.

Muhammad Abubakar, M., Saeed, A. and Kul, O.(2016). The role of biotechnology in improvement of livestock: Animal health and biotechnology illustrated, reprint Springer Berlin Heidelberg,Pp.146-147.

[NRC] National Research Council. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Committee on the Nutrient Requirements of Small Ruminants. Washington, DC: The National Academies Press.

Olivera, R.M.P.(1998). Use of *in vitro* production technique to assess the contribution of both soluble and insoluble fraction on the nutritive value of forages. A thesis submitted to the University of Aberdeen, Scotland, in partial fulfillment of the degree of Master of science in animal nutrition.

Orskov, E.R., Hovel, F., Deb, D. and Mould, F.(1980). The use of nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Tropical Animal Production*. 5:3 195-213.

Orskov. E.R., and McDonald, P.(1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)*, 92, 499-503

Rode, L.M. and Beauchemin, K.A.(1998). Enzymes to enhance utilization of feed in dairy cows. *Journal of Animal Science*.75:641.648.

SAS. (2001). SAS Users Guide. Version 8.2. Cary, NC:SAS Institute Inc.

Steel, R. G. D. and Torrie, J. H.(1980). Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. 2nd ed. McGraw – Hill book company, singapore.

Sutton, J.D., Phipps, R.H., Beever, D.E., Humphries, D.J., Hartnell, G.F., Vicini, J.L. and Hard, D.L.(2003). Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*. 86: 546-556.

Van Soest, P.J.(1994). Nutritional Ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, New York. (6 ed.) p. 476.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A.(1991). Methods for dietary neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Scienc*e. 74: 3583-3597.

Yang, W.Z., Beauchemin, K.A. and Rode, L.M.(1999). Effect of enzyme feed additives on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 72: 391-403.

▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪