تعیین قابلیت هضم علوفه با استفاده از روش‌های In vivo و In vitro و یک روش جدید آنزیمی

مترجم: مهندس احمد اکبری نیا

خلاصه: قابلیت هضم مواد آلی موجود در ماده خشک (D) پنج نوع علوفه، یونجه، Sudax، نخود و ماشک و کاه جو از طریق روشهای invivo با استفاده از پنج قوچ نر نژاد کیوز (Chios) برای هرعلوفه، و بطریق invitro با استفاده از روش دو مرحله‌ای و بالاخره روش پپسین - سلولاز تعیین گردید. شیرابه شکمبه ۸ ساعت قبل از تغذیه حیوانات، توسط یك فیستوله شکمبه‌ای یا لوله معده‌ای از دو قوچ نر نژاد کیوز (Chios) که مقدار یك کیلوگرم در روز علوفه یونجه را مصرف کرده بودند جمع اوری شد. بدون توجه به نوع روش تعیین قابلیت هضم، بین علوفه‌ها از نظر قابلیت هضم اختلاف وجود داشت. روش جمع‌آوری شیرابه شکمبه اثری بر روی (S, 168 VR, 140 mg / LIT) NH3-N، پروتئین ترسیب شده توسط اسید Tungstic و یا ارزش هضمی (D) علوفه نداشت.

ارزش هضمی بدست آمده در روش invivo همبستگی زیادی با ارزش هضمی بدست آمده توسط روش invitro یا پپسین - سلولاز داشت ($r= 0.96, P<0.01$). ارزش هضمی تعیین شده توسط روشهای invitro پپسین - سلولاز نیز از همبستگی بالائی برخوردار بودند ($r = 0.96, P<0.01$). علوفه‌های با کیفیت خوب تکرار پذیرتر از علوفه‌های با کیفیت پائین بودند. ارزش هضمی تعیین شده با روش پپسین - سلولاز زمانیکه از محلول پپسین ۰/۱ نرمال استفاده شد کمتر از مقدار واقعی بود. این تحقیق نشان داد که محلول پپسین ۰/۷۵، ۰/۵ - ۰/۱ و ۰/۵ نرمال بترتیب جهت گرامینه‌ها، لگومها و کاه جو برای حصول نتایج نزدیك به آنچه که از روش invivo بدست می‌آید، لازم است. نتایج نشان داد که شیرابه شکمبه‌ای که از طریق لوله معده‌ای جمع‌آوری می‌گردد می‌تواند بعنوان یك ماده تلقیحی (عمل‌آوری) در مطالعات تعیین قابلیت هضم به روش invitro مورد استفاده قرار گیرد.

از آنجائیکه مقدار ارزش هضمی (D) در روشهای invitro و پپسین - سلولاز با روش invivo نزدیك به هم می‌باشد لذا روش پپسین - سلولاز بدلیل سریع بودن و سادگی انجام آن پیشنهاد می‌گردد.

مقدمه:

بدلیل اینکه تعیین قابلیت هضم با استفاده از روش in-vivo (استفاده مستقیم از حیوان) به هزینه زیادی نیاز دارد، به روشهای ازمایشگاهی توجه بیشتری شده است.

از بین روشهای مختلف آزمایشگاهی از جمله سیستم‌های dacron، معادلات جمع شونده، سیستم‌های اندازه‌گیری نسبت لیگنین، شاخص نیتروژن مدفوع، روش دو مرحله‌ای استفاده از محلول شکمبه و آنزیم پپسین بدلیل همبستگی بالای نتایج آن با روش invivo بصورت گسترده‌ای استفاده می‌گردد. اما استفاده از شیره شکمبه مشکلاتی از قبیل: نیاز به حیواناتی که در داخل شکمبه آنها لوله‌ای تعبیه شده باشد، جمع‌آوری شیره شکمبه و بالاخره تغییرات در شیرهٔ شکمبه دارد. در صورتیکه در روشهای جدید آنزیمی از آنزیم سلولاز بجای شیرابهٔ شکمبه استفاده می‌شود و بدلیل ساده بودن کاربرد آن و احتمالاً حصول نتایج آن با تغییرات کمتر، استفاده از این روش رایج گردیده است. در این تحقیق تعدادی از نمونه‌های غذایی که قابلیت هضم آنها با روش Invivo مشخص بود، با استفاده از روش Invitro که در آن از شیرابهٔ شکمبه توسط فیستوله شکمبه‌ای یا لوله‌ای معده‌ای جمع‌آوری شد نیز تعیین گردید. بعلاوه در تعیین قابلیت هضم علوفه با روش پپسین - سلولاز، از غلظت‌های متفاوت اسیدکلریدیك در محلول پپسین ۰/۲ درصد استفاده گردید.

مواد و روش‌ها:

قابلیت هضم مواد آلی موجود در ماده خشك (درصد مواد آلی ماده خشك x درصد قابلیت هضم مواد آلی) (D) پنج نوع علوفه، جو (Hordeum Vulgare)، Sudax (کراس بین سورگوم و سورگوم سودان گراس)، ماشك معمولی (Vicia Sativa)، نخود علوفه‌ای (Pisum arvense) و کاه جو با استفاده از پنج قوچ بالغ به وزن تقریبی ۶۵ Kg تعیین گردید. قوچها در قفس‌های متابولیکی جهت جمع‌آوری و جداسازی مدفوع و ادرار قرار داده شدند و روزانه ۱/۱ تا ۱/۲ برابر احتیاجات لازم برای انرژی نگهداری تغذیه گردیدند. غذا دو نوبت در روز بمقدار مساوی داده شد. پس از گذراندن دو هفته دوره سازگاری، جمع‌آوری مدفوع به مدت ۷ روز ادامه یافت. ترکیب شیمیائی علوفه‌ها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

از هرعلوفه روزانه نمونه‌ای جمع‌آوری و در پایان دوره (۷ روز) این نمونه‌ها مخلوط و آسیاب شدند و از الك ۱ mm عبور داده شدند و در داخل لوله‌های شیشه‌ای بزرگ دهانه گشاده نگهداری شدند. از نمونه‌های آسیاب شده جهت تعیین قابلیت هضم با استفاده از روش دو مرحله‌ای Terry و Tilley که توسط Wilson و Oshea اصلاح گردیده استفاده شد. در این روش شیرابهٔ شکمبه در صبح هرروز ساعت ۸ قبل از تغذیه با استفاده از فیستوله شکمبه‌ای یا لوله معده‌ای از دو قوچ نژاد کیوز (Chios) که هریك بمقدار یك کیلوگرم در روز با علوفه یونجه تغذیه شده بودند جمع‌آوری گردید.

شیرابهٔ شکمبه‌ای که از طریق لوله معده‌ای و یا فیستوله از هردو حیوان بدست آمد برای کاهش دادن تغییرات با یکدیگر مخلوط گردیدند. نمونه‌های هرعلوفه در داخل ۱۰ لوله (۵ لوله برای شیره شکمبه بدست آمده توسط فیستوله و ۵ لوله جهت شیرابه شکمبه بدست آمده توسط لوله معده‌ای) ریخته شدند و در داخل انکوباتور قرار داده شدند.

ارزش هضمی (D) علوفه‌هایی که با روشهای invivo و in-vitro تعیین گردیده بودند با استفاده از روش پپسین - سلولاز مشخص گردید. جهت اینکار در داخل لوله‌های ۲۵ میلی‌لیتری ۲۰۰ mg از علوفه‌های آسیاب شده با ۲۰ میلی‌لیتر محلول پپسین (۰/۲ درصد W/V در ۰/۱ نرمال HCL و PePsin 2000FIP - u/g و Merck) مخلوط شدند و در داخل انکوباتور در حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد بمدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. سپس لوله‌ها به داخل بن ماری با درجه حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد بمدت نیم ساعت انتقال داده شدند. سپس مدتی در داخل آب سرد جهت سرد شدن قرار داده شدند، پس از سرد شدن بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند (۳۰۰۰ دور دقیقه). مواد معلق لوله‌ها پس از سانتریفوژ شدن توسط پمپ خلاء جدا گردیدند و بعد ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر به رسوب باقیمانده اضافه شد. سپس به آرامی لوله‌ها تکان داده شدند و دوباره سانتریفوژ گردیدند. سپس دوباره همان روش قبل با استفاده از پمپ خلاء صاف گردیدند. در صورتیکه از محلول پپسین با غلظت بالای اسیدکلریدریك استفاده شود، جهت خنثی کردن PH محتوای لوله‌ها لازم است که از مقداری آب مقطر استفاده شود (چند بار با آب مقطر توسط پمپ خلاء صاف گردیدند). سپس رسوب باقیمانده در لوله‌ها با ۲۰ میلی‌لیتر محلول سلولاز (۱ گرم سلولاز نوع R10 Onozuka از شرکت Yakult Honsha ژاپن در ۱ لیتر آب با فراستات سدیم ۰/۰۵ مولار با PH = ۴/۶) مخلوط گردیدند و داخل انکوباتور با حرارت ۴۰ درجه سانتی گراد بمدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. در زمانیکه لوله‌ها در داخل انکوباتور قرار داشتند روزی دوبار به آرامی تکان داده شدند. همچنین پس از ۲۴ ساعت مواد داخل لوله‌ها با استفاده از پمپ خلاء به کروزه‌ها انتقال داده شدند و

رسوبات حاصله توسط آب مقطر شسته شدند. سپس بداخل اتو ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد بمدت ۲۴ ساعت جهت خشك شدن انتقال داده شدند و پس از خشك شدن توزین گردیدند سپس در کوره با حرارت ۵۵۰ درجه سوزانده شدند و خاکسترهای حاصله برای تعیین مواد آلی موجود در نمونه‌ها علوفه توزین شدند. جهت حصول نتایج نزدیك به روش invivo ، برای یونجه و ماشك از محلول پپسین در اسیدکلریدریك ۰/۲۵ ، ۰/۵۰ ، ۰/۷۵۰ نرمال و برای کاه و نخود از محلول پپسین در اسیدکلریدریك ۰/۲۵ و ۰/۵ نرمال استفاده گردید.

تفاوت‌هایی در ارزیابی میان روشهای جمع‌آوری شیرهٔ شکمبه به طریق آنالیز و اریانس دو طرفه (Two way) (نوع علوفه و روش جمع‌آوری شیره شکمبه) وجود داشت.

همچنین ضرایب همبستگی بین روش Terry و Tilley با محلولهای مختلف اسید پپسین (پپسین + Hcl) محاسبه گردید. تفاوتهای نیز در ارزیابی نتایج بدست آمده از روشهای invivo، invitro روش دو مرحله‌ای و پپسین ـ سلولاز به طریق آنالیز واریانس دو طرفه (نوع علوفه، روش تعیین) وجود داشت.

تکرار پذیری هرروش بعنوان انحراف معیار بین تکرارها بیان شد.

بحث و نتایج :

روش جمع‌آوری شیره شکمبه بر روی پروتئین ترسیب شده توسط اسید Tungstic (g/l ۰/۴۴ و Vs ۰/۴۳ و R) یا NH3 N - شکمبه (m/l ۱۶۸ V ۱۴۰ و R) تأثیری نداشت در صورتیکه شیرابه شکمبه‌ای که توسط لوله معده‌ای بدست آمده بود نسبت به شیرابه شکمبه‌ای که توسط فیستوله شکمبه‌ای بدست آمده بود PH بالاتری داشت. (۷/۸ در مقابل ۷/۶ و R) مقادیر بدست آمده از این تحقیق با آنچه که Wiedmeier و همکاران با توجه به NH3 – N شکمبه بدست آورد اختلاف وجود داشت. در صورتیکه شیرابه شکمبه‌ای که توسط وید مایر بوسیله لوله معده‌ای جمع‌آوری شده بود غلظت پائین‌تری داشت.

بعلاوه در این تحقیق مقدار PH بین روشهای مختلف جمع‌آوری شیرابه‌شکمبه نسبت به‌نتایج آنهاتفاوت کمتری داشت.

Wiedmeier و همکاران علت این تفاوت‌ها را آلودگی شیرابه شکمبه به بزاق دانسته‌اند اما لازم است اشاره شود که نسبتاً مقدار زیادی از شیرابه شکمبه (تقریباً ۱ لیتر) که در این تحقیق بدست آمده بود، از نظر آلودگی به بزاق پائین بود.

در روش دو مرحله‌ای، شیره شکمبه‌ای که از طریق فیستوله شکمبه‌ای و یا لوله معده‌ای جمع‌آوری شده بود تأثیری بر روی مقادیر مواد آلی موجود در مادهٔ خشك (D) هیچکدام از علوفه‌ها نداشت. (جدول شماره ۲) مقادیر D در روش Invivo (Y) با مقادیر D در روش Invitro (X) همبستگی نسبتاً بالائی داشتند (r = %97,P<0.01) (×Y=۰/۳۰۳+۰/۹۹۲) بدون توجه به روش جمع‌آوری شیرابه شکمبه، بین علوفه‌ها از نظر مقدار D تفاوت معنی داری وجود داشت (P<0.01) (جدول شماره ۲).

مقدار D لگومها از گرامینه‌ها بالاتر بود. در تأیید تحقیقات رابلس و همکاران Robles et al لگومها مقدار لیگنین بیشتری از گرامینه‌ها داشتند. بعلاوه مقدار D در روش Invivo (Y) با مقدار D بدست آمده از روش پپسین ـ سلولاز همبستگی بالائی داشتند (r = 0.97) (X Y=-۲/۶۷۳+۱/۱۱۶) همچنین بین مقدار D در روش In-vi tro (دو مرحله‌ای) و مقدار D در روش پپسن سلولاز همبستگی وجود داشت (r = 0.97,P<0.01) (X Y=-۲/۴۶+۱/۱۰۷) .

تکرارپذیری (که بعنوان انحراف استاندارد بیان شده است) در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

علوفه‌های با کیفیت بالا تکرارپذیرتر از ارقام باکیفیت پائین بودند. Pace و همکاران نیز تکرارپذیری بیشتر لگومها نسبت به گراس‌ها را گزارش کرده‌اند. اما همین محققین تکرارپذیری بیشتر کاه گندم از علوفه یونجه را گزارش کرده‌اند.

در غلظت‌های پائین Hcl (۰/۱ نرمال اسیدکلریدریك در محلول پپسین ۰/۲ W/V درصد) روش پپسین ـ سلولاز مقادیر D کاه و علوفه‌های با کیفیت متوسط مثل Sudax نسبت به علوفه‌های با کیفیت خوب کمتر از مقدار واقعی بدست آمد. همچنین افزایش غلظت Hcl در روش پپسین ـ سلولاز سبب افزایش مقدار D گردید.

براساس نتایج بدست آمده در این تحقیق پیشنهاد می‌شود که از غلظت‌های Hcl بالاتری از ۰/۱ نرمال جهت رسیدن به مقدار D مشابه به آنچه که از طریق invivo بدست می‌آید استفاده می‌شود. اما تاکید می‌شود که برای لگومهای با کیفیت خوب، Hcl با غلظت ۰/۱ تا ۰/۵ نرمال کافی است. نتیجه اینکه شیرابه شکمبه جمع‌آوری شده توسط لوله معده‌ای می‌تواند در مطالعات invitro نیز استفاده شود. بدلیل اینکه در این روش نگهداری حیواناتی که فیستوله گذاری شده‌اند بخصوص در آزمایشگاههای کوچك با نمونه‌های زیاد لازم نمی‌باشند. سرانجام روش دو مرحله‌ای Invivo و روش پپسین ـ سلولاز مقادیر D نزدیك به آنچه که در روش Invivo بدست می‌آید نشان می‌دهد. استفاده از روش پپسین ـ سلولاز بدلیل سریعتر بودن و سادگی روش در آزمایشگاهها افزایش یافته است. ✡

جدول شماره ۱ : ترکیب شیمیائی (g/kg ماده خشك) علوفه‌ها :

نوع علوفه	پروتئین خام	خاکستر	فیبرخام	دیواره سلول NDF	لیگنوسلولز ADF	لیگنین
علوفه‌یونجه	۲۳۳	۱۱۴	۲۳۵	۳۷۴	۳۰۸	۵۸
علوفه‌ماشك‌معمولی	۱۹۹	۱۰۹	۲۳۶	۳۹۱	۳۱۶	۶۹
علوفه‌نخود	۱۹۵	۹۶	۲۵۴	۳۸۱	۳۱۷	۴۷
علوفه‌جو	۸۸	۱۰۷	۳۳۱	۶۱۴	۳۷۴	۳۶
علوفه Sudax	۸۴	۹۸	۳۲۸	۶۱۹	۴۰۸	۳۵
کاه‌جو	۳۹	۹۵	۴۱۰	۵۱۰	۷۷۰	۵۲

جدول شماره ۲ : قابلیت هضم ماده آلی در ماده خشك ۵ علوفه با استفاده از روشهای مختلف

نمونه‌ها	روش تعیین: استفاده از حیوان Invivo	روش آزمایشگاهی Invitro از طریق: فیستوله	لوله	پپسین سلولاز: ۰/۱N	۰/۲۵N	۰/۵N	۰/۷۵N
علوفه یونجه	۶۲(۰/۱)	۶۱(۰/۷)	۶۱(۰/۶)	۵۹(۱/۴)	۶۰(۱/۵)	۶۱(۱/۴)	۶۲(۱/۰)
علوفه Sudax	۵۴(۱/۳)	۵۶(۰/۷)	۵۵(۱/۶)	۴۱(۱/۳)	۴۵(۱/۱)	۴۹(۱/۲)	۵۳(۱/۰)
علوفه ماشك	۶۱(۱/۱)	۶۲(۰/۵)	۶۰(۱/۳)	۵۸(۱/۴)	۵۹(۰/۹)	۶۰(۱/۵)	۶۱(۱/۱)
کاه‌جو	۳۹(۴/۱)	۳۹(۲/۴)	۳۸(۲/۴)	۲۸(۲/۳)	۳۴(۱/۹)	۴۹(۱/۸)	–
علوفه‌نخود	۶۰(۰/۹)	۵۸(۰/۸)	۵۸(۰/۸)	۵۵(۲/۱)	۵۷(۱/۶)	۵۸(۱/۳)	–

a : انحراف استاندارد برای مقایسات invitro = ۱/۳۳۹

b : انحراف استاندارد برای مقایسات invivo (علوفه/n=۵) invitro (علوفه/n=۱۰) یا سلولاز (n=۲۰ یونجه، ۳۰ علوفه sudax ، ۲۱ علوفه ماشك، ۲۱ کاه جو و ۱۷ علوفه نخود)=۱/۴۴۷

c = انحراف استاندارد بین تکرارها