Archive of SID

مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1389، دوره دوم، شماره ششم، صفحه 18-13

تعیین قابلیت هضم آزمایشگاهی(*In-vitro*) تفاله لیمو ترش عمل آوری شده با مخمر *ساکارومایسز سرویسیا*

پوریا دادور[1]، امید دیانی[1]، ملیحه مروت[1]، جواد غلامی[1]

1- دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه علوم دامی

نویسنده مسئول: پوریا دادور، دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه مهندسی علوم دامی pooryadadvar@yahoo.com

دریافت: 89/6/4 پذیرش: 89/8/25

چکیده

زمینه و هدف: یکی از راه کار های جبران کمبود مواد مغذی در خوراک دام استفاده از پروبیوتیک ها جهت فرآوری خوراک می باشد. از آنجایی که ضایعات مرکبات از ارزش پروتئینی پایینی برخوردار هستند لذا می توان با فرآوری آن ها توسط مخمر ها و قارچ ها به نحو بهتری از آنها در تغذیه دام استفاده نمود.

روش بررسی: در این آزمایش از ضایعات میوه لیموترش حاصل از کارخانه آبلیموگیری استفاده گردید و از مخمر *ساکارومایسز سرویسیا* به منظور عمل آوری و افزایش غلظت مواد مغذی آنها استفاده شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که عمل آوری تفاله لیمو با مخمر باعث افزایش معنی داری در محتوای پروتئین خام (P<0/01) و دیواره سلولی بدون همی سلولز (P<0/05) تفاله لیمو گردید ولی درصد دیواره سلولی (P<0/01) و ماده آلی (P<0/05) آن کاهش یافت. نتایج حاصل از تجزیه پذیری آزمایشگاهی نشان داد که در طی عمل آوری قابلیت هضم ماده آلی قابل هضم در ماده خشک به طور معنی داری (P< 0/05) کاهش یافت در حالی که قابلیت هضم ماده خشک و همچنین قابلیت هضم ماده آلی تغییر معنی داری نداشت. علاوه بر این انرژی قابل متابولیسم نیز به طور معنی داری (P<0/05) کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: می توان نتیجه گرفت که عمل آوری تفاله لیمو با مخمر *ساکارومایسزسرویسیا* باعث افزایش بهره وری این محصول می شود.

واژه‌های کلیدی: تفاله لیموترش، پروبیوتیک، *ساکارومایسز سرویسیا*، تجزیه پذیری، انرژی قابل متابولیسم.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یکی از عمده ترین مشکلات در صنعت دام و طیور کشور کمبود خوراک دام است. آمارهای گوناگون وضعیت تولیدی دام های کشور، نشان می دهد که خوراک های موجود از نظر کمی و کیفی حتی با وجود واردات در حد تامین نیازهای دام های کشور نمی باشد (1). یکی از راه های جبران این کمبود استفاده از ضایعات صنایع غذایی در تغذیه دام می باشد. بقایای لیمو در برخی از نقاط ایران به میزان زیادی یافت می شود. ضایعات مرکبات محتوی انرژی بالا برای نشخوارکنندگان هستند، به نحوی که میزان انرژی قابل متابولیسم تفاله خشک و تفاله مرطوب آن به ترتیب برابر با 10/3 و 2/4 مگاکالری در کیلوگرم بوده و می تواند به عنوان یک ماده خوراکی با انرژی بالا در تغذیه نشخوارکنندگان به کار رود (2). با این وجود استفاده از تفاله مرطوب مرکبات ممکن است مشکلاتی نظیر کپک زدگی و در نتیجه مسمومیت دام را سبب شود (3). اگرچه سیلو کردن تفاله های مرطوب یکی از راه های نگهداری آنهاست، اما سیلو کردن علاوه بر هزینه زیاد ساخت سیلو، مسائلی همچون تبدیل پروتئین حقیقی به نیتروژن آمونیاکی و آلودگی محیط زیست به دلیل تراوش سیلو را به همراه دارد (4). از طرف دیگر خشک کردن تفاله های مرطوب در دماهای بالا مستلزم صرف هزینه زیاد بوده و ضمنا می تواند باعث بروز واکنش میلارد و کاهش کیفیت پروتئین شود (4). استفاده موثر از محصولات فرعی صنایع غذایی به عنوان خوراک دام به برخی از عوامل از جمله ترکیب مواد مغذی محصول فرعی در مقایسه با نیازهای دام بستگی دارد. عامل مهم دیگر مقرون به صرفه بودن عمل آوری محصول فرعی برای استفاده از آن به عنوان خوراک دام است (5). از آنجایی که ضایعات مرکبات از ارزش اقتصادی پایینی برخوردار بوده و دور ریختن آن باعث آلودگی محیط زیست می شود لذا می توان از آن ها در تغذیه دام استفاده نمود. عمل آوری این ضایعات در جهت افزایش محتوای پروتئین باعث افزایش کارایی آن ها در تغذیه دام می گردد. به منظور تولید مواد خوراکی پروتئینی از ضایعات مرکبات و افزایش محتوای مواد مغذی آن ها روش های مختلفی به کار گرفته شده است. افزودن موادی مثل اوره به ضایعات مرکبات (6)، سیلو کردن همراه با مواد با پروتئین بالا مثل سبوس گندم (7) و یا عمل آوری آن با استفاده از قارچ یا مخمر (8) از جمله این روش ها می باشد. تحقیقات زیادی به منظور افزایش پروتئین تفاله مرکبات با استفاده از قارچ و مخمر صورت گرفته است (8-13). نتایج این تحقیقات نشان داده که عمل آوری تفاله مرکبات با استفاده از قارچ و مخمر منجر به افزایش پروتئین خام در آن ها گردیده است. به منظور تعیین خصوصیات ضایعات مرکبات عمل آوری نشده و ضایعات عمل آوری شده با مخمر لازم است که ترکیبات شیمیایی آن ها تعیین شده و کیفیت مواد غذایی موجود در آن ها بررسی شود. در این تحقیق از مخمر *ساکارومایسز سرویسیا* (مخمر نانوایی) به منظور عمل آوری و افزایش غلظت مواد مغذی ضایعات کارخانجات آبلیموگیری استفاده شده است.

روش بررسی

در این آزمایش از ضایعات میوه لیمو حاصل از کارخانه آبلیموگیری واقع در شهر کرمان استفاده گردید. نمونه ها بعد از جمع آوری در برابر آفتاب خشک شدند و یک نمونه از آن ها جهت تعیین ترکیب شیمیایی تفاله مورد بررسی قرار گرفت. میزان پروتئین خام نمونه ها با استفاده از دستگاه کلدال، خاکستر خام با سوزاندن هر نمونه در کوره الکتریکی و عصاره اتری طبق روش های استاندارد (AOAC) تعیین گردید (14). مقدار دیواره سلولی با استفاده از شوینده خنثی و دیواره سلولی بدون همی سلولز با استفاده از محلول شوینده اسیدی بر اساس روش ون سوست (15) تعیین گردید.

عمل آوری نمونه: در ابتدا به منظور آماده سازی شرایط بهینه رشد مخمر می بایست رطوبت و اسیدیته تفاله لیمو مناسب می شد. تفاله ها پس از خشک شدن به نسبت 1 به 2 با آب مخلوط شدند (1 تفاله:2 آب) تا رطوبت نسبی معادل 85 درصد برای رشد مخمر فراهم گردد. pH نمونه بوسیله دستگاه pH متر اندازه گیری شد که برابر با 3/6 بود. از آنجا که pH مناسب برای رشد مخمر حدود 6-5 است، برای افزایش pH تفاله لیمو از 6/4 درصد جوش شیرین استفاده گردید تا pH به 5 افزایش یافت. برای تلقیح مخمر و عمل آوری ضایعات لیمو یک پیش آزمایش انجام گرفت که طی آن ساعت های مختلف عمل آوری و سطوح متفاوت مخمر مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول 1 آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1. نتایج مربوط به تعیین مدت زمان و سطح استفاده از مخمر برای تولید بیشترین سطح پروتئین خام

نمونه	مدت زمان (ساعت)	مقدار مخمر (درصد)	پروتئین خام
1 (شاهد)	0	0	8/19
2	6	1	9/2
3	12	2	10/9
4	12	4	11/3
5	24	4	13/8

با توجه به این نتایج تصمیم گرفته شد که از نمونه شماره 5 در این آزمایش استفاده شود. بعد از عمل آوری، نمونه ها در آون قرار داده شده و خشک شدند. سپس نمونه ها آسیاب شدند و همراه با نمونه عمل آوری نشده به آزمایشگاه منتقل گردیدند تا مرحله اصلی آزمایش یعنی تعیین تجزیه پذیری با روش آزمایشگاهی (In-vitro) انجام شود.

مراحل انجام روش In-vitro: این روش که در آزمایشگاه و بر طبق روش دو مرحله ای تیلی و تری (17) انجام گرفت، که به شرح زیر بود: مقدار 0/5 گرم از نمونه های آسیاب شده با الک یک میلیمتری هر یک از تفاله لیمو فراوری شده و تفاله لیمو فراوری نشده داخل لوله های آزمایش ریخته شد. برای هر یک از نمونه ها چهار تکرار در نظر گرفته شد.

تهیه شیرابه شکمبه: برای تهیه شیرابه از سه رأس گوسفند نر کرمانی فیستولا گذاری شده استفاده شد. به این ترتیب که در یک زمان مشخص از روز (ساعت 8 صبح) و قبل از دادن خوراک به گوسفندها شیرابه از طریق فیستولا تهیه گردید. شیرابه را در ارلن 250 میلی لیتری ریخته و کاملاً پر نموده و درب آنها محکم بسته شد (جهت حفظ شرایط بی هوازی). ضمن حمل به آزمایشگاه، در یک فلاسک آب 39 درجه سانتی گراد نگهداری گردید. در آزمایشگاه شیرابه شکمبه بوسیله دو لایه پارچه مخصوص (تنظیف) صاف و در یک ارلن درب دار ریخته، پس از وارد نمودن گاز دی اکسید کربن برای چند ثانیه درب آن محکم بسته و در حمام بن ماری 39 درجه سانتی گراد قرار داده شد.

تهیه بزاق مصنوعی: مقدار 9/8 گرم بی کربنات سدیم، 3/71 گرم فسفات هیدروژن دی سدیم دهیدرات (بدون آب)، 0/57 گرم کلرید پتاسیم ، 0/47 گرم کلرید کلسیم و0/12 گرم سولفات منیزیوم در آب مقطر دو بار تقطیر شده حل گردید و در یک بالن یک لیتری به حجم رسانده شد.

هضم بی هوازی: حدود نیم ساعت قبل از هضم بی هوازی، یک میلی لیتر محلول 4 درصد کلریدکلسیم به هر لیتر بزاق مصنوعی (بافر) اضافه شد و با وارد کردن گاز دی اکسید کربن به مدت 10 تا 15 دقیقه pH محلول به 6/9 تا 7 کاهش داده شد. سپس بزاق مصنوعی و شیرابه شکمبه به نسبت 4 به 1 (4 حجم بزاق با 1 حجم شیرابه) با هم مخلوط و در بن ماری به محلول بدست آمده به مدت 4 تا 5 دقیقه گاز دی اکسید کربن وارد گردید. سپس 50 میلی لیتر مخلوط تهیه شده از بزاق مصنوعی و شیرابه شکمبه به هر یک از ارلن های شاهد و نمونه اضافه و به مدت 15 ثانیه گاز دی اکسید کربن وارد کرده و درب آنها را محکم بسته و به مدت 48 ساعت در گرمخانه در دمای 39 درجه سانتی گراد قرار داده شد. روز اول 2 بار و روز دوم 3 بار به فواصل زمانی مساوی ارلن ها تکان داده شدند.

هضم پپسین اسیدی: در پایان 48 ساعت هضم بی هوازی، ارلن ها را از گرمخانه خارج و به هر یک از آنها 6 میلی لیتر اسید کلریدریک 20 درصد اضافه شد و سپس 2 میلی لیتر محلول پپسین 20 درصد اضافه کرده و به مدت 46 ساعت در گرمخانه نگهداری شدند. در این مرحله نیز مانند مرحله قبل روز اول دو بار و روز دوم سه بار محتویات ظروف هم زده شد.

جداسازی محتویات هضم نشده: در پایان هضم مواد خوراکی با پپسین، نمونه ها را با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره 41 بدون خاکستر، قیف بوخنر و پمپ خلاء صاف کرده و محتویات هضم نشده از فاز مایع جدا گردید.

تعیین باقیمانده هضم وخاکستر: کاغذ صافی ها که حاوی مواد صاف نشده بود به آرامی از قیف بوخنر جدا و پس از تا نمودن برای مدت 24 ساعت در آون با حرارت 105 درجه سانتی گراد خشک شده و پس از انتقال به دسیکاتور و سرد شدن کاغذ صافی و محتویاتشان دقیقاً توزین شدند. سپس جهت تعیین خاکستر آنها، در داخل کوره 560 درجه سانتی گراد به مدت 4 ساعت قرار داده شدند. بعد از جمع آوری داده ها با استفاده از فرمول، قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، ماده آلی در ماده خشک و انرژی قابل متابولیسم کلیه نمونه ها محاسبه گردید (16 و 17).

www.SID.ir

Archive of SID

یافته ها

ترکیب شیمیایی تفاله لیموترش عمل آوری نشده و تفاله لیموترش عمل آوری شده با مخمر *ساکارومایسز سرویسیا* در جدول 2 آورده شده است. طبق این نتایج در طی عمل آوری تفاله لیموترش ترکیب شیمیایی آن تغییر یافت به گونه ای که پروتئین خام آن افزایش و دیواره سلولی کاهش معنی داری را نشان داد (P<0/01). دیواره سلولی بدون همی سلولز به طور معنی داری (P< 0/05) در طی عمل آوری تفاله افزایش یافت. درصد ماده آلی (P< 0/05) و همچنین درصد عصاره اتری (P<0/01) به طور معنی داری کاهش یافت.

جدول 2. ترکیب شیمیایی تفاله لیمو فراوری نشده و تفاله لیمو فراوری شده با مخمر

ترکیب شیمیایی (درصد)	تفاله لیمو فراوری نشده	تفاله لیمو فراوری شده	سطح معنی دار
پروتئین خام	8/3 ±0/8[b]	14/3 ±0/8[a]	0/006
دیواره سلولی	74/2 ±1/81[b]	48/2 ±1/81[a]	0/0001
دیواره سلولی بدون همی سلولز	19/4 ±1/06[a]	24/3 ±1/06[b]	0/0311
خاکستر خام	6/5 ±2/54[a]	18/8 ±2/54[b]	0/0269
ماده آلی	93/4 ±0/56[a]	81/1 ±0/56[b]	0/0269
عصاره اتری	7/06 ±0/42[a]	3/6 ±0/42[b]	0/005

اعدادی که با حروف غیر مشترک در هر ردیف نشان داده شده اند دارای اختلاف معنی دار هستند (P<0/05).

نتایج حاصل از قابلیت هضم تفاله های عمل آوری نشده و عمل آوری شده با مخمر *ساکارومایسزسرویسیا* مشخص کرد که با عمل آوری تفاله لیمو بوسیله مخمر، ماده آلی قابل هضم در ماده خشک به طور معنی داری (P<0/05) کاهش یافت (جدول3)، در حالی که عمل آوری تأثیر معنی داری بر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی تفاله ها نداشت. انرژی قابل متابولیسم تفاله لیمو با عمل آوری به طور معنی داری (P<0/05) کاهش یافت (جدول 3)، که علت آن کاهش ماده آلی قابل هضم در ماده خشک بود.

جدول 3. میانگین قابلیت هضم تفاله لیمو فراوری نشده و تفاله لیمو فراوری شده با مخمر (بر اساس ماده خشک)

قابلیت هضم (درصد)	تفاله لیمو فراوری نشده	تفاله لیمو فراوری شده	سطح معنی دار
ماده خشک	52/3 ±6/11	68/1 ±6/11	0/142
ماده آلی	57/4 ±4/07	50/0 ±4/07	0/267
ماده آلی در ماده خشک	54/9 ±3/49[a]	37/1 ±3/49[b]	0/022
انرژی متابولیسمی (MJ/Kg_{DM})	8/4 ±0/55[a]	5/9 ±0/55[b]	0/034

اعدادی که با حروف غیر مشترک در هر ردیف نشان داده شده اند دارای اختلاف معنی دار هستند (P<0/05).

بحث

افزایش پروتئین خام تفاله لیمو عمل آوری شده با مخمر می تواند در نتیجه تکثیر پروتئین سلولی توسط مخمر *ساکارومایسز سرویسیا* باشد. مخمر با مصرف قندهای موجود در تفاله لیمو و تثبیت ازت هوا تکثیر پیدا می کند و افزایش تعداد سلول های مخمر منجر به افزایش بار پروتئینی تفاله عمل آوری شده می شود. درصد دیواره سلولی در طی عمل آوری کاهش یافت و این می تواند به علت استفاده مخمر از کربوهیدرات های موجود در دیواره سلولی تفاله لیمو باشد. مدرید و همکاران (18 و 19) اختلاف قابلیت هضم ظاهری میوه خشک لیمو و انرژی متابولیسیمی را در بزهایی که با علف یونجه به نسبت 50:50 در ماده خشک تغذیه شدند بررسی کرد. مقادیر قابلیت هضم سلولز و همی سلولز به ترتیب برابر با 0/768 و 0/606 بود و انرژی متابولیسمی 12/7 مگاژول بر کیلوگرم در ماده خشک لیمو تخمین زده شد. قابلیت هضم بالای دیواره سلولی و سلولز برای لیموی خشک نشان داده شد.

عدم تغییر در قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی تفاله ها با وجود افزایش دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی سلولز، می تواند افزایش مواد محلول، از جمله پروتئین خام باشد. طبق نظر اکثر پژوهشگران، اصولاً بین مقادیر دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی سلولز با قابلیت هضم یک ماده خوراکی رابطه معکوس وجود دارد. به عبارت دیگر، هرچقدر این ترکیبات در ماده خوراکی کاهش یابد، قابلیت هضم آن ماده خوراکی افزایش خواهد یافت(20 و 21). انرژی

www.SID.ir

Archive of SID

قابل متابولیسم تفاله لیمو با عمل آوری کاهش یافت (جدول 3)، که علت آن کاهش ماده آلی قابل هضم در ماده خشک بود. استفاده مخمر از کربوهیدرات های سهل الهضم باعث کاهش ماده آلی و سوبسترای میکروب های شکمبه خواهد شد که به دنبال آن، میزان تخمیر کاسته شده و هضم کاهش می یابد. در بحث عمل آوری مواد خوراکی با میکروارگانیسم ها موضوعی که معمولاً مطرح می گردد، سمی بودن این موجودات یا فرآورده های آنهاست (22). نتایج آزمایش ضرایب هضمی نشان داد که مخمر *ساکارومایسز سرویسیا* هیچ گونه اثر سمیت زایی بر میکروارگانیسم های شکمبه نداشت.

نتیجه گیری

استفاده از تفاله لیمو ترش در تغذیه دام علاوه بر کاهش هزینه دفع ضایعات کارخانه آبلیموگیری منجر به جلوگیری از آلودگی محیط زیست و همچنین افزایش تولیدات دامی از جمله گوشت و شیر می شود. فرآوری این محصول ضایعاتی می تواند تا حدودی ترکیب شیمیایی آن را غنی تر کند که این قضیه منجر به بهره وری بهتر و مفیدتر از این محصول می شود. لذا توصیه می شود در صورت استفاده از ضایعات لیمو ترش و مرکبات در تغذیه دام با عمل آوری این مواد توسط مخمرها و قارچ ها کیفیت این خوراک را تا اندازه ای افزایش دهند که این منجر به تولید بهینه دام ها خواهد شد.

تشکر و قدردانی

این آزمایش با پشتوانه انجمن پژوهشگران جوان دانشگاه شهید باهنر کرمان به انجام رسید که در اینجا از حمایت و همکاری ایشان تشکر و قدردانی می شود.

References

1- Dabiri N. *Development method of animal production by using of agricultural residues and by-products of agriculture industry factories*. Educational workshop. Ferdosi university of Mashhad. 2008.
2- Kayouli C, Stephen L. *Silage from by-products for small holders. In: Silage Making in the Tropics with Particular Emphasis on Small holders*. FAO Plant Production and Protection.2000; Paper 161.
3- Griffiths B, Done SH. *Citrinin as a possible cause of the purities, pyrexia, hemorrhagic syndrome in cattle*. Vet. Record. 1991; 129:113-117.
4- McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA. *Animal Nutrition*. Addison Wesley Longman. 1995.
5- Ammerman CB, Henry PR. *Citrus and vegetable products for ruminant animals. In*: Proceedings, Alternative Feeds for Dairy and Beef Cattle. St Louis, MO; 1991.
6- Wing JM. *Citrus feedstuffs for dairy cattle*. Florida Agricultural Express State Bull. 1982; Page 829.
7- Raihani N, Garrett WN, Zinn RA. *Effects of source of supplemental nitrogen on the utilization of citrus pulp based diets by sheep*. J Anim Sci. 1993; 71: 2310-2321.
8- Shojaosadati SA, Faraidouni R, Madadi-Nouei A, Mohamadpour I. *Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using Neurospora sitophila*. Resourc Conserv and Recycl. 1999.
9- Barreto de Menezes TJ, de JG, Salva T, Baldini VL, Papini RS, Sales AM. *Protein enrichment of citrus wastes by solid substrate fermentation*. Process Biochem. 1989; 167-171.
10- Forage AJ, Richelato RC. *Microbial Biomass*. Academic Press, London. 1979.
11- Grewal HS, Kalra KL, Kahlon SS. *Citrus (Kinnow-mandarin) residue as potential substrate for single cell protein*. J Res Punjab Agric. Univ. 1990; 27:90-96.
12- Labaneiah MEO, Abou-Donia SA, Mohamed MS, EL-Zalaki EM. *Utilization of citrus wastes for the production of fungal protein*. J Food Technol. 1979; 14: 95-100.
13- Lequerica JL, Lafuente B. *Citrus by-products utilization; II. Semisolid fermentation of orange peels by candida utilities*. Rev Agroquim Technol Aliment; 1977;17:77.
14- AOAC. *Association of Official Analytical Chemists*. Official methods of analysis, Fourteenth Edition. AOAC, Washington, DC; 1990.
15- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. *Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition*. J Dairy Sci. 1991; 74: 3583-3597.
16- Tilly JM, Terry RA. *A two-stage technique for the in-vitro digestion of forage crops*. J B Grassl Soc. 1963; 18: 104-111.
17- AFRC. *Energy and Protein Requirements of Ruminants*. CAB International, Wallingford, UK. 1993.
18- Madrid J, Hern´andez F, Pulgar MA, Cid JM. *Dried lemon as energetic supplement of diet based on urea-treated barley straw: effects on intake and digestibility in goats*. Anim Feed Sci Technol. 1996; 63: 89–98.
19- Madrid J, Hern´andez F, Pulgar MA, Cid JM. *Urea and citrus by-product supplementation of strawbased diets for goats: effect on barley straw digestibility*. Small Rum. Res. 1997; 24: 149–155.
20- Nazem K, Rouzbehan Y, Shojaosadati SA. *The nutritive value of citrus pulp (lemon and orange) treated with Neurospora sitophila*. J. of Sci. and Tech. of Agric. and Natu. Res.2008; 12, 495-506.
21- Durand A, Chereau D. *A new pilot reactor for solid state fermentation: Application to the protein enrichment of sugar beet pulp*. Biotechnology and Bioengineering. 1988; 13: 467-486.
22- Moo-Young M, Chisti Y, Vlach D. *Fermentation of cellulosic materials to mycoprotein foods*. Biotechnology Advances. 1993; 11: 469-479.

www.SID.ir