Iranian Journal of Animal Science
Vol 48, No 4, Winter 2018 (549-558)
DOI: 10.22059/ijas.2018.246708.653590

علوم دامی ایران
دورۀ ۴۸، شمارۀ ۴، زمستان ۱۳۹۶ (ص ۵۵۸-۵۴۹)

بررسی تأثیر استفاده از مکمل حاوی پپتیدهای کوچک کنجالۀ پنبه‌دانه در جیرۀ برۀ پرواری بر گوارش و تخمیر مواد مغذی در شرایط آزمایشگاهی

الهام کریمی[۱]، آرش آذرفر[۲*] و ایوب عزیزی[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکدۀ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۸)

چکیده

هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر مکمل کردن جیرۀ برۀ پرواری با سطوح مختلف مکمل تجاری فورتیدC (به‌دست‌آمده از هیدرولیز کنجالۀ پنبه‌دانه به‌عنوان منبع پپتیدهای کوچک زنجیر) بر فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیر، گوارش‌پذیری مواد مغذی جیره و فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه با استفاده از شیرابۀ شکمبۀ گوسفند در شرایط آزمایشگاهی بود. تیمارهای آزمایشی شامل جیرۀ شاهد (بدون فورتیدC) و مکمل کردن جیرۀ شاهد به ترتیب با سطوح ۲/۳۵، ۴/۷۰ و ۷/۰۵ گرم فورتید به ازای هر کیلوگرم مادۀ خشک جیره به‌عنوان منبع پپتیدهای کوچک بود. نتایج بررسی‌ها نشان داد، در زمان‌های ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از نگهداری (انکوباسیون)، بیشترین و کمترین حجم گاز تولیدی به ترتیب در جیرۀ حاوی بیشترین میزان فورتیدC و جیرۀ شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). بیشترین میزان ساخت (سنتز) پروتئین میکروبی و انرژی قابل سوخت‌وساز (متابولیسم) در جیرۀ حاوی بیشترین سطح فورتیدC نسبت به تیمار شاهد به دست آمد (P<۰/۰۵). دیگر فراسنجه‌های تخمیر و قابلیت هضم دومرحله‌ای مواد مغذی تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفتند (P>۰/۰۵). فعالیت آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز و آلفا آمیلاز شکمبه‌ای در جیرۀ حاوی بیشترین میزان فورتیدC نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵)، اما فعالیت دیگر آنزیم‌های مورد بررسی شامل میکروکریستالین سلولاز و فعالیت تجزیۀ کاغذ صافی تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵). در کل، نتایج این پژوهش نشان داد، مکمل کردن جیرۀ برۀ پرواری با سطح ۷/۰۵ گرم فورتیدC در کیلوگرم مادۀ خشک برۀ پرواری سبب بهبود ساخت پروتئین میکروبی و انرژی قابل سوخت‌وساز در شرایط برون‌تنی شد.

واژه‌های کلیدی: آزمون تولید گاز، فراسنجه‌های تخمیر، فعالیت آنزیمی، فورتید C، گوارش‌پذیری.

Investigating the effects of supplementing fattening lamb diet with small peptides of cottonseed meal on the digestibility and fermentation of nutrients *in vitro*

Elham Karini[1], Arash Azarfar[2*] and Ayoub Azizi[3]
1, 2, 3. M.Sc. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran
(Received: Dec. 10, 2017 - Accepted: Feb. 27, 2018)

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects of supplementing fattening lamb diet with various levels of commercial supplement Fortide C, produced from enzymatic hydrolysis of cottonseed meal as a source of small chain peptides, on *in vitro* gas production and fermentation parameters, nutrients digestibility and activity of rumen microbial enzymes *in vitro* using rumen liquor of sheep. Dietary treatments were control diet (without Fortide C) and supplementing control diet with Fortide C at the levels of 2.35, 4.70 and 7.70 g/kg of diet on dry matter basis. Results showed that at 16, 24 and 48 h of incubation, the highest and the lowest volume of gas production (GP) was observed in the diet containing the highest level of Fortide C and control diet, respectively (P <0.05). The highest microbial protein production and estimated metabolizable energy (ME) was observed in the diet supplemented with the highest level of Fortide C compared to the control diet (P <0.05). However, other fermentation parameters and two-stage nutrients digestibility were not affected by dietary treatments (P >0.05). Activity of carboxymethyl cellulase and alpha-amylase increased as the level of Fortide C increased in the diet compared to the control diet (P <0.05), while activity of microcrystalline cellulase and filter paper degrading activity were not affected by the experimental diets (P <0.05). In conclusion, the results of present study showed that dietary supplementation of fattening lambs with 7.05 g Fortide C per kilogram dry matter of diet improved microbial protein synthesis and ME *in vitro*.

Keywords: Digestibility, enzyme activity, fermentation parameters, fortide C, gas production.

* Corresponding author E-mail: arash.azarfar@gmail.com

مقدمه

پروتئین یکی از گران‌ترین مواد مغذی در جیرۀ دام و طیور است که بخش عمده‌ای از قیمت تمام‌شدۀ جیرۀ غذایی را شامل می‌شود. مکمل‌های پروتئینی مورد استفاده در تغذیۀ دام مشتمل بر دو منشأ حیوانی و گیاهی هستند و انتخاب آن‌ها تابعی از کیفیت و قیمت است (Nikkhah & Amanlou, 1990). مکمل‌های با منشأ حیوانی به علت قیمت بالا و مسائل بهداشتی، به میزان کمتری در جیرۀ نشخوارکنندگان استفاده می‌شوند (Nikkhah & Amanlou, 1990). در نتایج بررسی‌هایی نشان داده شده است، باکتری‌های شکمبه برای ساخت (سنتز) پروتئین میکروبی قابلیت استفاده از هر دو منبع نیتروژن آمونیاکی و نیتروژن غیر آمونیاکی را دارند. همچنین، برخی از گونه‌های باکتریایی شکمبه منابع نیتروژن غیر اسیدآمینه‌ای را به نیتروژن با منشأ اسیدهای آمینه ترجیح می‌دهند (Russel *et al*., 1992; Cruz Soto *et al*., 1994; Griswold *et al*., 1996). در گذشته بررسی‌های زیادی در مورد کاربرد منابع پروتئینی در جیرۀ نشخوارکنندگان صورت گرفته است. نتایج تحقیقات اخیر نشان داده است، با تغذیۀ منابع مختلف پروتئین، تفاوت چشمگیری در پروتئین میکروبی ساخت‌شده در شکمبه و نیز جذب روده‌ای اسیدهای آمینه جیره مشاهده خواهد شد. یکی از منابع پروتئینی قابل استفاده در تغذیۀ نشخوارکنندگان برای بهبود تخمیر شکمبه منابع پپتیدی است. پپتیدهای کوچک که با نام پپتیدهای فعال نیز شناخته می‌شوند، به‌عنوان منابع پروتئینی ویژه با ساختار و فعالیت پپتیدهای شبه هورمون و با توالی فعال در دامنۀ ۲ تا ۲۰ اسیدآمینه هستند. این پپتیدها تأثیر هم‌افزایی بر اعمال هضم و جذب مواد مغذی، سامانۀ قلبی عروقی، ایمنی و عصبی داشته و کاهش‌دهندۀ تنش (استرس) گرمایی در نشخوارکنندگان نیز هستند (Kadzere *et al*., 2002). Lindemann *et al*. (2000) و Dabrowski *et al*. (2003) در بررسی‌های خود دریافتند، فراهمی پپتیدها در جیرۀ غذایی برتری و سودمندی‌هایی نسبت به تأمین اسیدآمینۀ آزاد، که به‌آسانی در شکمبه دآمینه و تجزیه می‌شوند، دارند. نشان داده شده است که پپتیدهای کوچکی که از آبکافت (هیدرولیز) پروتئین‌های گیاهی به دست می‌آیند خواص متنوع زیستی (بیولوژیکی) و داروشناختی (فارماکولوژیکی) شامل افزایش عملکرد رشد و وضعیت ایمنی‌شناختی (ایمونولوژیکی)، بهبوددهندۀ ابقاء نیتروژن و افزایش‌دهندۀ هضم فیبر دارند (Kotzamanis *et al*., 2007; Adibi *et al*., 1993; Puchala *et al*., 2002). نتایج برخی بررسی‌ها نشان داده‌اند، رشد میکروبی شکمبه، هضم فیبر و تخمیر شکمبه با مکمل‌سازی جیره با منابع پپتید بهبود یافته است (Griswold *et al*., 1996; Carro & Miller, 1999; Russi *et al*., 2002). همچنین، هزینۀ مصرف انرژی حین استفاده از پپتیدها برای ساخت پروتئین میکروبی در مقایسه با اسیدهای آمینه و آمونیاک کمتر است (Payne, 1983). اگر جذب اسیدهای آمینه به‌صورت پپتیدها باشد (نه به‌صورت اسیدهای آمینۀ آزاد)، قابلیت جذب اسیدآمینه منابع پروتئینی بسیار بالاتر خواهد بود (Feng & Ji, 2002; Pan & Webb, 1998). ازآنجایی‌که پروتئین میکروبی مهم‌ترین منبع پروتئینی مورد استفادۀ نشخوارکنندگان است، لذا پیش‌بینی بازدهی تولید نیتروژن میکروبی در تغذیۀ نشخوارکنندگان اهمیت بسیاری دارد. محصول تجاری فورتیدC یکی از منابع پپتیدهای کوچک (به‌طور عمده دی و تری پپتیدها) است که از آبکافت آنزیمی پروتئین‌های پنبه‌دانه به دست آمده و الگوی اسیدآمینه‌ای به‌کلی مشخصی دارد و به‌طور عمده اسید گلوتامیک در ساختار پپتیدهای آن وجود دارد. درزمینۀ استفاده از فورتید در تغذیۀ نشخوارکنندگان و به‌ویژه تأثیر آن بر بوم‌نظام (اکوسیستم) شکمبۀ نشخوارکنندگان شامل فراسنجه‌های هضم و تخمیر شکمبه و ساخت پروتئین میکروبی اطلاعات اندکی در دست است. لذا، هدف از این تحقیق بررسی تأثیر مکمل کردن جیرۀ برۀ پرواری با سطوح مختلف فورتید C بر فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیر، هضم‌پذیری و فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش آزمایش

دام‌ها، تیمارهای آزمایشی و مکمل تجاری فورتید مورد استفاده

آزمایش‌ها با استفاده از دو رأس گوسفند نر نژاد لری

مجهز به فیستولای شکمبه‌ای با میانگین وزن ۵±۵۵ کیلوگرم به‌عنوان دهندهٔ مایع شکمبه صورت گرفت. بررسی‌های آزمایشگاهی روی جیرهٔ برهٔ پرواری با نسبت ۳۰ به ۷۰ علوفه به کنسانتره به‌عنوان جیرهٔ پایه (جدول ۱) که با سطح مختلف فورتید C به‌عنوان منبع پپتیدهای کوچک مکمل شده بود، صورت گرفت. مکمل تجاری فورتید توسط کارخانهٔ سازنده (Mytech Biotech Co, Chengdu, China) از آبکافت کنجالهٔ پنبه‌دانه به دست آمد و در این آزمایش استفاده شد. جیره‌های آزمایشی مورد آزمون برای نگهداری (انکوباسیون) آزمایشگاهی شامل جیرهٔ شاهد (بدون فورتیدC، جدول ۱)، و مکمل کردن جیرهٔ شاهد به ترتیب با سطوح ۲/۵۳، ۴/۷۰ و ۷/۰۵ گرم فورتید در کیلوگرم مادهٔ خشک جیره بود. ترکیب شیمیایی فورتید در جدول ۲ نشان داده شده است. مقادیر مورد نظر محدودهٔ توصیه‌شدهٔ فورتیدC در نشخوارکنندگان کوچک مانند بره‌های پرواری بود.

جدول ۱. اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی جیرهٔ برهٔ پرواری نگهداری‌شده در شرایط آزمایشگاهی (درصد مادهٔ خشک)

Table 1. Ingredients and chemical composition fattening lamb incubated *in vitro* (% of dry matter)

Items	% of diet
Alfalfa hay (dried)	25
Wheat straw	5
Barley grain, ground	28
Corn grain, ground	14
Wheat bran	12.5
Soybean meal	10
Vitamin-mineral premix[1]	2.0
Dicalcium phosphate	1.0
Salt	0.50
Sodium bicarbonate	2.0
Chemical composition	
Dry matter (fresh weight)	89.8
Organic matter	94.5
Crude protein	14.6
Neutral Detergent Fiber (NDF)	31.2
Acid Detergent Fiber (ADF)	15.9
Calcium	0.57
Metabolizable energy (Mcal/kg DM)	2.21

۱. ۱ کیلوگرم مکمل مواد کانی-ویتامینی حاوی ۹۹/۲ میلی‌گرم منگنز، ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۸۴/۷ میلی‌گرم روی، ۱۰ میلی‌گرم مس، ۰/۲ میلی‌گرم سلنیوم، ۹۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D و ۱۸ واحد بین‌المللی ویتامین E بود (رشد دانه، کرج، ایران).

1. Contained (per kg): 99.2 mg Mn, 50 mg Fe, 84.7 mg Zn, 1 mg Cu, 1 mg I, 0.2 mg Se2, 9000 IU vitamin A, 2000 IU vitamin D and 18 IU vitamin E (Roshd-Daneh, Karaj, Iran).

جدول ۲. ترکیب شیمیایی مکمل فورتید مورد استفاده (درصد مادهٔ خشک)

Table 2. Chemical composition of used Fortide C (% of dry matter)

Items	Fortide C
Dry matter (fresh weight)	97.5
Organic matter	93.9
Crude protein (CP)	48.6
True protein (% of total CP)	82.5
Non-protein Nitrogen (% of total N)	17.5
Neutral Detergent Fiber (NDF)	1.18
Acid Detergent Fiber (ADF)	0.40
Ether extract	0.05

آزمون تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیر

از دو رأس گوسفند فیستولاگذاری شده به‌عنوان دهندهٔ مایع شکمبه برای انجام آزمون تولید گاز استفاده شد. محتویات شکمبه از دام‌های یادشده که دست‌کم به مدت دو هفته با جیرهٔ غذایی حاوی ۶۰ درصد علوفه و ۴۰ درصد کنسانتره تغذیه شده بودند، پیش از خوراک‌دهی وعدهٔ صبح توسط پمپ خلأ گردآوری شد. محتویات شکمبهٔ هر دو رأس گوسفند در هر مرحله در یک فلاسک عایق که از پیش توسط گاز دی‌اکسید کربن بی‌هوازی شده بود، در دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس کامل مخلوط شد و به‌سرعت (در کمتر از ۲۰ دقیقه) به آزمایشگاه منتقل شد. پیش از تزریق به درون ویال‌های آزمایشی، محتویات شکمبه توسط چهار لایهٔ پارچهٔ پنیر صاف شد. دو آزمون تولید گاز به‌طور همزمان و در سه دورهٔ (Run) جداگانه انجام شد. در آزمون اول، در آغاز میزان ۲۵۰ میلی‌گرم نمونهٔ جیرهٔ کامل خشک آسیاب با اندازهٔ ذرات ۱ میلی‌متر به درون هر ویال برای تعیین فراسنجه‌های آزمون تولید گاز قرار داده شد (۵ تکرار به ازای هر تیمار). آنگاه، هر ویال که از پیش دمای آن با قرار دادن در بن‌ماری به ۳۹ درجهٔ سلسیوس رسیده بود، با ۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه صاف و ۲۵ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی تلقیح شد (Marten & Barnes, 1980). برای دستیابی به اطمینان از شرایط بی‌هوازی، گاز دی‌اکسید کربن به شیرابهٔ شکمبهٔ صاف‌شده و بزاق مصنوعی پیش و پس از تزریق به درون ویال‌ها نیز تزریق شد. میزان سه ویال نیز به‌عنوان شاهد یا بلانک (حاوی تنها مایع شکمبه و بزاق مصنوعی) در نظر گرفته شد. سپس درپوش ویال‌ها بسته و در بن‌ماری

با دمای حدود ۳۹ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. میزان گاز تولیدی در ویال‌ها توسط دستگاه فشارسنج در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون اندازه‌گیری شد. برای تعیین فراسنجه‌های تولید گاز از معادلهٔ $P = b\ (1 - e^{-ct})$ استفاده شد (Blümmel *et al.*, 2003). در معادلهٔ یادشده b میزان گاز تولیدی از بخش تخمیرپذیر (میلی‌لیتر)، c سرعت تولید گاز در ساعت، t زمان نگهداری برحسب ساعت و P میزان گاز تولیدی (میلی‌لیتر) در زمان مورد نظر است. آزمون تولید گاز در سه دوره تکرار شد.

آزمون دوم تولید گاز با چهار تکرار به ازای هر تیمار و سه دوره به‌منظور تعیین قابلیت هضم شکمبه‌ای مادهٔ خشک و مادهٔ آلی و انرژی قابل سوخت‌وساز (متابولیسم) جیره‌های آزمایشی و نیز فراسنجه‌های تخمیر شامل pH، نیتروژن آمونیاکی، ساخت پروتئین میکروبی، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و فعالیت آنزیمی شکمبه طراحی شد. پس از ۱۶ ساعت نگهداری (Vercoe *et al.*, 2010)، در آغاز میزان گاز تولیدی هر ویال ثبت شد. پس از آن درپوش ویال‌ها باز شده و pH آن‌ها با دستگاه pH متر (مدل 744؛ شرکت Metrohm سوئیس) ثبت شد. محتوای هر ویال با ۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس سانتریفیوژ شد. بقایای هر ویال گردآوری و خشک شد. میزان قابلیت هضم شکمبه‌ای مادهٔ خشک از اختلاف وزن بسترهٔ (سوبسترای) اولیه و وزن بقایا پس از نگهداری محاسبه شد. برای تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی، نمونه‌های رونشین یا سوپرناتانت (۵ میلی‌لیتر) به‌سرعت با ۱ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط شده و در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. میزان قابلیت هضم شکمبه‌ای مادهٔ آلی (Menke & Steingass, 1988) و انرژی قابل سوخت‌وساز (AFRC, 1992) جیره‌های آزمایشی به ترتیب با رابطه‌های زیر برآورد شد:

IVOMD (g/kg OM) =
148.8 + 8.89 GAS + 4.50 CP + 6.51 XA

ME (MJ/kg DM) = DOMD × 0.0157

که در این رابطه‌ها IVOMD[1] میزان قابلیت هضم مادهٔ آلی؛ GAS میزان گاز خالص تولیدی برای ۲۰۰ میلی‌گرم بستره پس از ۱۶ ساعت نگهداری (Menke & Steingass, 1988)؛ CP میزان پروتئین خام به‌صورت گرم در ۱۰۰ گرم مادهٔ خشک؛ XA خاکستر به‌صورت گرم در ۱۰۰ گرم مادهٔ خشک؛ ME انرژی قابل سوخت‌وساز و DOMD مادهٔ آلی قابل‌هضم در مادهٔ خشک است.

تولید پروتئین میکروبی (MPS) به‌صورت زیر محاسبه شد (Blümmel *et al.*, 1997):

MP (mg/g DM) =
mg ADS - (ml gas × 2.2 mg/ml)

که ADS[2] بسترهٔ هضم‌شدهٔ ظاهری و ۲/۲ عامل استوکیومتری برحسب میلی‌گرم کربن، هیدروژن و اکسیژن مورد نیاز برای ساخت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر است.

اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از معادلهٔ Getachew *et al.*(2002) به‌صورت زیر محاسبه شد:

SCFA (mmol/200 mg DM) =
0.0222GP - 0.0042

که در این معادله SCFA[3] اسیدهای چرب فرار تولیدی و GP حجم گاز تولیدی در زمان ۱۶ ساعت نگهداری است.

فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیهٔ کاغذ صافی و آلفا آمیلاز موجود در بخش میکروبی چسبیده به ذرات خوراکی (پلت‌های گردآوری‌شده) با روش Agarwal (2000) برآورد شد. روش کار به این صورت بود که پس از ۱۶ ساعت نگهداری، در آغاز محتوای هر ویال سانتریفیوژ شده و بقایا گردآوری شد. پس از آن بقایا با کربن تتراکلرید و آنزیم لیزوزیم فرآیند شدند و مخلوط آنزیم‌های مایع شکمبه در بافر فسفات در سانتریفیوژ با دور ۲۷۰۰۰×g در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه به دست آمد. برای برآورد فعالیت کربوکسی متیل سلولاز، مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۵ میلی‌لیتر

1. *In vitro* Organic Matter Disappearance
2. Apparently Digested Substrate
3. Short Chain Fatty Acid

شیرابهٔ شکمبه و ۰/۵ میلی‌لیتر کربوکسی متیل سلولز ۱ درصد (به‌عنوان بستره) بود که در دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱ ساعت نگهداری شد. مخلوط واکنش برای آنزیم میکروکریستالین سلولاز که شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۱ میلی‌لیتر شیرابهٔ شکمبه و ۱ میلی‌لیتر میکروکریستالین سلولز ۱ درصد (به‌عنوان بستره) بود در دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱ ساعت نگهداری شد. به‌منظور محاسبهٔ فعالیت کاغذ صافی، مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۱ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه و ۰/۵ گرم کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (به‌عنوان بستره)، در دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱ ساعت نگهداری شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آلفا آمیلاز، مخلوط واکنش محتوی ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۵ میلی‌لیتر شیرابهٔ شکمبه و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نشاستهٔ ۱ درصد (به‌عنوان بستره) در دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. در همهٔ آزمون‌های یادشده، واکنش با افزودن ۳ میلی‌لیتر محلول دی‌نیتروسالیسیلیک اسید متوقف شد. گلوکز آزادشده در اثر فعالیت هر یک از آنزیم‌های مورد آزمون با روش Miller (1959) برآورد شد. فعالیت‌های آنزیمی بر پایهٔ این فرض که یک واحد آنزیمی توانایی تولید ۱ میکرومول گلوکز در هر ساعت در هر میلی‌لیتر را در شرایط مخلوط واکنش دارد محاسبه شد.

گوارش‌پذیری دومرحله‌ای مواد مغذی

گوارش‌پذیری آزمایشگاهی مواد مغذی جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف فورتید به روش هضم دومرحله‌ای Terry & Tilly (1963) صورت گرفت. در این آزمایش برای هر تیمار میزان شش تکرار در نظر گرفته شد. بدین‌صورت که در آغاز ۵۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خوراکی در هر ویال به مدت ۴۸ ساعت با مخلوط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی (به نسبت ۱ به ۴ و درمجموع ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت) با روش Marten & Barnes (1980) نگهداری شد. طی ۱۲ ساعت آغازین نگهداری در شرایط بی‌هوازی هر ۳ ساعت یک‌بار و پس‌ازآن هر ۱۲ ساعت یک‌بار عمل تکان دادن ویال‌ها انجام پذیرفت. سپس، لوله‌ها با دور ۲۰۰۰×g در سانتریفیوژ با دمای ۴ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوز شدند. مایع شفاف رویی دور ریخته شد و به مواد باقیماندهٔ هر ویال میزان ۳۵ میلی‌لیتر محلول پپسین اسیدی اضافه شد. برای تهیهٔ محلول پپسین اسیدی ۶/۶ گرم پپسین (با درجهٔ فعالیت ۱:۳۰۰۰ در حدود ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۱ نرمال به آن اضافه و حجم محلول با آب مقطر به ۱ لیتر رسانده شد. ویال‌ها دوباره به مدت ۴۸ ساعت دیگر در دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. آنگاه بقایای هر ویال با استفاده از کاغذ صافی پالایش و توزین شد. درنهایت، گوارش‌پذیری مادهٔ خشک، مادهٔ آلی، لیف نامحلول در شویندهٔ خنثی و لیف نامحلول در شویندهٔ اسیدی تعیین شد.

تجزیهٔ شیمیایی نمونه‌ها

میزان مادهٔ خشک نمونه‌ها در آون با دمای ۶۰ درجهٔ سلسیوس و به مدت ۴۸ ساعت تعیین شد (AOAC, 1990). میزان خاکستر خام در کورهٔ الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجهٔ سلسیوس تعیین شد و میزان مادهٔ آلی از اختلاف بین وزن مادهٔ خشک نمونهٔ اولیه با وزن خاکستر محاسبه شد (AOAC, 1990). میزان ADF و NDF به ترتیب با روش‌های AOAC (1990) و Van Soest *et al.* (1994) محاسبه شد. میزان نیتروژن آمونیاکی با استفاده از معرف‌های فنول و هیپوکلریت و با روش Broderick & Kang (1980) اندازه‌گیری شد.

تجزیهٔ آماری

تجزیهٔ واریانس داده‌های مربوط به تولید گاز، گوارش‌پذیری مواد مغذی، فراسنجه‌های تخمیر و فعالیت آنزیمی با استفاده از رویهٔ MIXED و توسط نرم‌افزار SAS (2001) و با استفاده از مدل آماری زیر انجام شد:

$$Y_{ijk}= \mu + T_i + Run_j + e_{ijk}$$

در این مدل Y_{ijk}، μ، T_i، Run_j و e_{ijk} به ترتیب رکورد مشاهده شده، میانگین کل، اثر ثابت تیمار آزمایشی iام، اثر تصادفی دورهٔ jام و اثر خطای

آزمایشی بود. مقایسهٔ چند دامنه‌ای میانگین حداقل مربعات با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار محافظت‌شدهٔ فیشر انجام شد. برای همهٔ مقایسه‌های معنی‌داری در سطح P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

تولید گاز

تأثیر جیره‌های آزمایشی مکمل شده با سطوح مختلف فورتیدC طی ۹۶ ساعت انکوباسیون توسط مخلوط میکروبی شکمبه در شرایط برون‌تنی بر آزمون تولید گاز در زمان‌های مختلف انکوباسیون (۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت)، پتانسیل (b) و سرعت تولید گاز (c) در جدول ۳ ارائه شده است. بیشترین میزان تولید گاز در زمان‌های ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از نگهداری روند همسانی داشتند، به‌طوری‌که بیشترین حجم گاز تولیدی در سه زمان یادشده در جیرهٔ حاوی بیشترین سطح فورتید (۷/۰۵ گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک) و کمترین میزان آن مربوط به جیرهٔ شاهد بود (P<۰/۰۵). در دیگر زمان‌های نگهداری یعنی ۷۲ ساعت و همین‌طور کل حجم گاز تولیدی (۹۶ ساعت نگهداری) اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد (P>۰/۰۵). همچنین، دیگر فراسنجه‌ها شامل پتانسیل تولید گاز و نرخ تولید گاز تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفتند (P>۰/۰۵). اطلاعات اندکی روی تأثیر پپتیدهای کوچک به‌ویژه پپتیدهای با منشأ مکمل تجاری فورتیدC بر فراسنجه‌های تخمیر و تولید گاز وجود دارد. بهبود تولید گاز در زمان‌های آغازین نگهداری (در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت) احتمال دارد به دلیل استفادهٔ سریع از بخشی از پپتیدهای فورتیدC به‌عنوان منبع نیتروژنی توسط میکروب‌های شکمبه برای افزایش جمعیت میکروبی بوده باشد، زیرا میکروب‌های شکمبه افزون بر نیتروژن آمونیاکی، از نوع غیر آمونیاکی نیز برای رشد و افزونش خود استفاده می‌کنند و حتی برخی از باکتری‌های شکمبه نیتروژن غیر آمونیاکی را به نیتروژن آمونیاکی ترجیح می‌دهند (Russell *et al*., 1992; Cruz Soto *et al*., 1996). Lindemann *et al.* (2000) و Dabrowski *et al.* (2003) در نتایج بررسی‌های خود دریافتند، فراهمی پپتیدها برتری و سودمندی‌هایی نسبت به تأمین اسیدآمینهٔ آزاد دارد که به‌آسانی در شکمبه دآمینه می‌شوند. فراهمی پپتیدهای فورتیدC در کنار دیگر منابع پروتئینی جیره به‌احتمال از دیگر دلایل بهبود تولید گاز در زمان‌های اولیهٔ نگهداری بوده است، زیرا نشان داده شده است که به‌منظور بهینه کردن تخمیر شکمبه فراهمی مخلوطی از پروتئین‌ها و پپتیدها تأثیر مطلوبی دارد. باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی در شکمبه مانند نشاسته و پکتین پپتیدها و اسیدهای آمینه را به آمونیاک ترجیح می‌دهند و در صورت کمبود آن‌ها از آمونیاک استفاده می‌کنند (Russell *et al*., 1992).

جدول ۳. تأثیر سطوح مختلف فورتید بر فراسنجه‌های تولید گاز جیره‌های آزمایشی توسط مخلوط ریزجانداران شکمبهٔ گوسفند

Table 3. Effect of different levels of Fortide C on *in vitro* gas production parameters of experimental diets using mixed ruminal microorganisms of sheep

Treatments	*In vitro* gas production parameters						
	GP_{16}[1]	GP_{24}[2]	GP_{48}[3]	GP_{72}[4]	TGP[5]	B[6]	C[7]
Control diet	27.9[b]	46.6[ab]	55.9[ab]	46.2	67.5	66.2	0.054
Control + Fortide C (2.53 g/kg DM)	38.6[a]	47.1[ab]	56.4[ab]	68.2	73.4	70.5	0.05
Control + Fortide C (4.70 g/kg DM)	33.2[ab]	48.1[b]	57.1[b]	71.4	78.7	69	0.049
Control + Fortide C (7.05 g/kg DM)	39.7[a]	52.0[a]	61.4[a]	71.4	73.6	69.7	0.062
SEM[8]	1.21	2.31	1.52	5.15	5.71	4.32	0.006
P-value[9]	0.02	0.04	0.04	0.56	0.86	0.09	0.08

۱. حجم گاز تولیدی پس از ۱۶ ساعت نگهداری (میلی‌لیتر)، ۲. حجم گاز تولیدی پس از ۲۴ ساعت نگهداری (میلی‌لیتر)، ۳. حجم گاز تولیدی پس از ۴۸ ساعت نگهداری (میلی‌لیتر)، ۴. حجم گاز تولیدی پس از ۷۲ ساعت نگهداری (میلی‌لیتر)، ۵. کل حجم گاز تولیدی پس از ۹۶ ساعت نگهداری (میلی‌لیتر)، ۶. پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر)، ۷. سرعت تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)، ۸. خطای استاندارد میانگین‌ها، ۹. احتمال معنی‌داری، حرف‌های غیر همسان در هر ستون نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است (P < ۰/۰۵).

1. *In vitro* gas production (IVGP) for 16 h (ml); 2. IVGP for 24 h (ml); 3. IVGP for 48 h (ml); 4. IVGP for 72 h (ml); 5. Total gas production for 96 h (ml); 6. Gas production from the insoluble but fermentable fractions for 96 h (ml); 7. Rate constant of gas production during incubation (/h); 8. Standard error of the means; 9. Means within a column with different superscript letters are different (P<0.05).

فراسنجه‌های تخمیر

نتایج مربوط به تأثیر مکمل‌سازی با فورتیدC بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه در شرایط آزمایشگاهی در جدول ۴ نشان داده شده است. بیشترین میزان برآورد انرژی قابل سوخت‌وساز در جیرهٔ حاوی بیشترین سطح فورتیدC به دست آمد (P<۰/۰۵)، هرچند بین دیگر سطوح فورتیدC با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). ساخت پروتئین میکروبی تحت تأثیر سطوح مختلف فورتیدC قرار گرفت، به‌طوری‌که بیشترین (۴۳۲ میلی‌گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک جیره) و کمترین (۳۰۶ میلی‌گرم در کیلوگرم مادهٔ خشک جیره) میزان آن به ترتیب در جیرهٔ شاهد و جیرهٔ حاوی بیشترین سطح فورتیدC به دست آمد (P<۰/۰۵). هرچند، تیمارهای حاوی سطوح کمتر فورتیدC یعنی ۲/۳۵ و ۴/۷۰ گرم در کیلوگرم تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد در این زمینه نشان ندادند (P>۰/۰۵).

دیگر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه شامل ناپدید شدن آزمایشگاهی مادهٔ آلی، تولید اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر، ناپدید شدن شکمبه‌ای مادهٔ خشک، pH و غلظت نیتروژن آمونیاکی تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵). همانند با نتایج این پژوهش، نتایج بررسی‌های Wang *et al.* (2013) نشان داد، تزریق پپتیدهای کوچک سویا به میزان ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ گرم در روز به درون شکمبهٔ گاو تأثیری بر pH شکمبه نداشت. در این تحقیق با افزایش سطح فورتیدC در جیره و فراهمی پروتئین محلول بیشتر برای میکروب‌های شکمبه، انتظار بر این بود که غلظت آمونیاک شکمبه افزایش یابد که چنین نشد. دلیل این امر به‌احتمال این بوده است که در ساعت‌های اولیهٔ نگهداری بخشی از پپتیدهای حاصل از فورتیدC در مایع شکمبه به‌جای اینکه تجزیه شده و به آمونیاک تبدیل شود، به‌طور مستقیم توسط برخی باکتری‌های شکمبه به‌عنوان منبع نیتروژنی استفاده شده است. زیرا مشخص شده است که باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی در آغاز پپتیدها و اسیدآمینه را به‌عنوان منبع نیتروژنی ترجیح می‌دهند و در صورت نبود این منابع، از آمونیاک استفاده می‌کنند (Russell *et al.*, 1992). باوجوداینکه عمده فراسنجه‌های تخمیر تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت، اما در بررسی‌های دیگری با استفاده از مکمل‌های پروتئینی مختلف نتایج متفاوتی به‌دست‌آمده است. همانند با نتایج مربوط به ناپدید شدن مادهٔ آلی در این بررسی، نتایج برخی از بررسی‌های نشان داده است که رشد باکتری‌های شکمبه، هضم فیبر و تخمیر شکمبه‌ای با مکمل‌سازی جیره با پپتیدهای کوچک بهبود یافته است (Griswold *et al.*, 1996; Carro & Miller, 1999; Russi *et al.*, 2002).

جدول ۴. تأثیر سطوح مختلف فورتید بر فراسنجه‌های تخمیر جیره‌های آزمایشگاهی توسط مخلوط ریزجانداران شکمبهٔ گوسفند

Table 4. Effect of different levels of Fortide C on fermentation parameters of experimental diets using mixed ruminal microorganisms of sheep

Treatments	Fermentation parameters						
	SCFA[1]	IVDMD[2]	IVOMD[3]	ME[4]	pH	NH_3-N[5]	MPS[6]
Control diet	0.63	58.7	49.9	7.34[b]	6.5	14.6	306[b]
Control + Fortide C (2.53 g/kg DM)	0.64	57.2	52.7	7.84[a]	6.47	14.7	341[b]
Control + Fortide C (4.70 g/kg DM)	0.58	59.8	47.9	7.10[b]	6.54	15.5	328[b]
Control +Fortide C (7.05 g/kg DM)	0.75	60.2	53.3	7.95[a]	6.51	16.1	432[a]
SEM[7]	0.07	2.16	1.88	0.17	0.24	1.07	18.1
P-value[8]	0.13	0.15	0.09	0.04	0.91	0.11	0.01

۱. اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک)، ۲. ناپدید شدن مادهٔ خشک (درصد)، ۳. ناپدید شدن مادهٔ آلی (درصد)، ۴. برآورد انرژی قابل سوخت‌وساز (مگاژول در کیلوگرم مادهٔ خشک)، ۵. نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)، ۶. ساخت پروتئین میکروبی (میلی‌گرم در هر گرم مادهٔ خشک)، ۷. خطای استاندارد میانگین‌ها، ۸. احتمال معنی‌داری، حرف‌های غیر همسان در هر ستون نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است (P < ۰/۰۵).

1. Short chain fatty acids (mmol/200 mg DM); 2. *In vitro* Dry matter disappearance (%); 3. *In vitro* Organic matter disappearance (%); 4. Estimated metabolizable energy (MJ/kg DM); 5. Ammonia nitrogen (mg/dl); 6. Microbial protein synthesis (mg/g DM); 7. Standard error of means; 8. Means within a column with different superscript letters are different (P<0.05).

در این بررسی با اینکه ساخت پروتئین میکروبی در تیمار حاوی ۷/۰۵ گرم فورتیدC افزایش یافت، اما غلظت آمونیاک شکمبه تحت تأثیر قرار نگرفت. به‌طورمعمول در بررسی‌هایی که تأثیر انرژی و پروتئین در شکمبه مد نظر است، غلظت آمونیاک شکمبه به‌عنوان یک شاخص برای رشد میکروبی در نظر گرفته می‌شود (Chamberlain *et al*., 1993). Chamberlain *et al*. (1993) بیان کردند که در بررسی‌های همزمانی بین انرژی و پروتئین، کاهش غلظت آمونیاک مایع شکمبه نشان‌دهندۀ افزایش ساخت پروتئین میکروبی است.

گوارش‌پذیری دومرحله‌ای مواد مغذی

همان‌طوری که در جدول ۵ نشان داده شده است گوارش‌پذیری ظاهری دومرحله‌ای مادۀ خشک، مادۀ آلی، الیاف نامحلول در شویندۀ خنثی (NDF) و الیاف نامحلول در شویندۀ اسیدی (ADF) تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفتند (P>۰/۰۵). نتایج به دست آمده در برخی بررسی‌ها، درزمینۀ تأثیر پپتیدهای کوچک بر گوارش‌پذیری مواد مغذی متناقض است. در بررسی برون‌تنی صورت گرفته توسط Cruz Soto *et al*. (1994)، نگهداری جیره‌های حاوی پپتید با مایع شکمبۀ گوسفند تأثیری بر گوارش‌پذیری مواد مغذی نداشت که مطابق با نتایج این تحقیق است. این در حالی است که نشان داده شده که فراهمی پپتید در جیره سبب تحریک رشد باکتری‌های شکمبه و به‌تبع افزایش هضم لیف‌ها می‌شود (McAllan,1991; Griswold *et al*., 1996). Zang *et al*. (2007) نیز گزارش دادند که تزریق پپیتدهای کوچک سویا به دوازدهۀ بزها گوارش‌پذیری لیف را افزایش داد.

فعالیت آنزیمی

بنابر نتایج جدول ۶، مکمل کردن جیره با سطوح مختلف فورتیدC فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز و آلفا آمیلاز شکمبه‌ای (به‌عنوان شاخصی برای فعالیت باکتری‌های آمیلولایتیک و تجزیه‌کنندۀ نشاسته) را تحت تأثیر قرار داد و جیرۀ حاوی بیشترین سطح فورتیدC بیشترین میزان فعالیت در آن‌ها را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). فعالیت دیگر آنزیم‌های تجزیه‌کنندۀ لیف‌ها شامل آنزیم‌های تجزیه‌کنندۀ کاغذ صافی و میکروکریستالین سلولاز تحت تأثیر سطح فورتیدC در جیره قرار نگرفتند (P>۰/۰۵).

جدول ۵. تأثیر سطوح مختلف فورتید بر گوارش‌پذیری دومرحله‌ای آزمایشگاهی مواد مغذی جیره‌های آزمایشی توسط مخلوط ریزجانداران شکمبۀ گوسفند

Table 5. Effect of different levels of Fortide C on two-stage nutrient digestibility of experimental diets using mixed ruminal microorganisms of sheep

Treatments	Nutrient digestibility			
	DM[1]	OM[2]	NDF[3]	ADF[4]
Control diet	69.7	70.6	49.6	37.4
Control + Fortide C (2.53 g/kg DM)	67.7	69.4	51.6	37.2
Control + Fortide C (4.70 g/kg DM)	70.9	71.1	52.1	38.0
Control + Fortide C (7.05 g/kg DM)	71.6	71.9	52.9	38.8
SEM[5]	1.94	1.64	1.53	1.01
P-value[6]	0.17	0.11	0.15	0.11

۱. مادۀ خشک، ۲. مادۀ آلی، ۳. الیاف نامحلول در شویندۀ خنثی، ۴. الیاف نامحلول در شویندۀ اسیدی، ۵. خطای استاندارد میانگین‌ها، ۶. احتمال معنی‌داری، حرف‌های غیر همسان در هر ستون نشان‌دهندۀ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است (P < ۰/۰۵).

1. Dry matter; 2. Organic matter; 3. Neutral detergent fibre; 4. Acid detergent fibre; 5. Standard error of means; 6. Means within a column with different superscript letters are different (P<0.05).

جدول ۶. تأثیر سطوح مختلف فورتید بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک (واحد در دقیقه در میلی‌لیتر مایع شکمبه) جیره‌های آزمایشی توسط مخلوط ریزجانداران شکمبۀ گوسفند

Table 6. Effect of different levels of fortid on the activity of hydrolytic enzymes (units per minute in ml of ruminal fluid) of experimental diets using mixed ruminal microorganisms of sheep

Treatments	CMCase[1]	MCCase[2]	FPD[3] activity	Alpha amylase
Control diet	2.54[b]	0.97	0.73	6.19[b]
Control + Fortid (2.53 g/kg DM)	2.71[b]	1.02	0.81	6.76[ab]
Control + Fortid (4.70 g/kg DM)	2.70[b]	1.11	0.82	7.01[a]
Control + Fortid (7.05 g/kg DM)	2.98[a]	1.21	0.86	7.24[a]
SEM[4]	0.054	0.144	0.055	0.177
P-value[5]	0.011	0.67	0.47	0.015

۱. کربوکسی متیل سلولاز، ۲. میکروکریستالین سلولاز، ۳. فعالیت تجزیۀ کاغذ صافی، ۴. خطای استاندارد میانگین‌ها، ۵. احتمال معنی‌داری، حرف‌های غیر همسان در هر ستون نشان‌دهندۀ اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است (P<۰/۰۵).

1. Carboxymethyl cellulase; 2. Microcrystalline cellulase; 3. Filter paper-degrading activity; 4. Standard error of means; 5. Means within a column with different superscript letters are different (P<0.05).

در این بررسی افزایش فعالیت کربوکسی متیل سلولاز نسبت به میکروکریستالین سلولاز احتمال دارد به دلیل وجود بسترهٔ بیشتر برای آن بوده باشد و همانند با یافته‌های دیگر محققان است (Raghuvansi *et al*., 2007). هرچند جیره‌های آزمایشی تأثیری بر گوارش‌پذیری مواد مغذی نداشتند، اما فعالیت کربوکسی متیل سلولاز در جیره‌های حاوی فورتید افزایش یافت. دلیل این امر این است که تجزیهٔ مواد مغذی به‌ویژه لیف در شکمبه توسط مجموعه‌ای از آنزیم‌های مختلف صورت می‌گیرد و این افزایش در فعالیت کربوکسی متیل سلولاز به‌احتمال نتوانسته است اثر خود را بر بهبود گوارش‌پذیری مواد مغذی نشان دهد.، زیرا فعالیت دیگر آنزیم‌های فیبرولایتیک شکمبه تحت تأثیر نوع جیرهٔ غذایی قرار نگرفته است. در این آزمایش افزایش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز افزایش سطح فورتید در جیره احتمال دارد به دلیل استفادهٔ بیشتر باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ کربوهیدارت‌های غیر لیفی از پپیتدهای مکمل شده بوده باشد. زیرا نشان داده شده است که باکتری‌های آمیلولایتیک شکمبه بیشتر از اسیدآمینه و پپتید در مقایسه با آمونیاک به‌عنوان منبع نیتروژنی خود استفاده می‌کنند (Russell *et al*., 1992).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد، مکمل کردن جیرهٔ برهٔ پرواری حاوی نسبت ۳۰ به ۷۰ علوفه به کنسانتره با مکمل پروتئینی تجاری فورتیدC به‌عنوان منبع پپتیدهای ساخت پروتئین میکروبی و انرژی قابل سوخت‌وساز را در شرایط آزمایشگاهی بهبود داد، هرچند تأثیری روی گوارش‌پذیری مواد مغذی و فعالیت عمدهٔ آنزیم‌های شکمبه‌ای نداشت. به‌هرحال انجام بررسی‌های بیشتر به‌ویژه در شرایط دام زنده برای بررسی اثر این مکمل تجاری بر تخمیر شکمبه و عملکرد نشخوارکنندگان ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه لرستان به خاطر تأمین مالی این پژوهش و مسئولان شرکت پیشگام دامپرور سپاهان به خاطر در اختیار قرار دادن محصول فورتیدC، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Adibi, S. A., Lochs, H., Abumrad, N. N., Daniel, H. & Vazquez, J. A. (1993). Removal of glycylglutamine from plasma by individual tissues: mechanism and impact on amino acid fluxes in postabsorption and starvation. *Journal of Nutrition*, 123, 325-331.
2. Agarwal, N., Agarwal, I., Kamra, D. N. & Chaudhary, L. C. (2000). Diurnal variations in the activities of hydrolytic enzymes in different fractions of rumen contents of Murrah buffalo. *Journal of Applied Animal Research*, 18, 73-80.
3. Agricultural and Food Research Council. (1992). *Technical committee on responses of nutrients*, Report No 9. Nutritive requirements of ruminant animal: Protein. Nutrition Abstract and Review., Series b, 62(12), 787-835, CAB International, Wallingford, Oxon.
4. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
5. Blümmel, M., Karsli, A. & Russell, J. R. (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.
6. Blümmel, M., Steingss, H. & Becker, K. (1997). The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, 77, 911-921.
7. Broderick, G. & Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, 63, 64-75.
8. Carro, M. D. & Miller, E. L. (1999). Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an in vitro semi-continuous culture system (RUSITEC). *British Journal of Nutrition*, 82, 149-157.
9. Chamberlain, D. G., Robertson, S. & Choung, J. J. (1993). Sugars versus starch as supplements to grass silage: effects on ruminal fermentation and the supply of microbial protein to the small intestine, estimated from the urinary excretion of purine derivatives in sheep. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63, 189-194.
10. Cruz Soto, R., Muhammed, S. A., Newbold, C. J., Stewart, C. S. & Wallace, R. J. (1994). Influence of peptides, amino acids and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay and on the growth of rumen bacteria in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 49, 151-161.

11. Dabrowski, K., Lee, K. & Rinchard, J. (2003). The smallest vertebrate, teleost FSH, can utilize synthetic dipeptide based diets. *Journal of Nutrition*, 133, 4225-4229.
12. Feng, X. Y. & Ji, C. (2002). Relationship between peptide concentration and digestibility in chicken. *Acta Agricultural University China*, 7, 107-113. (in Chinese)
13. Getachew, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (2002). Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *Journal of Agricultural Science*, 139, 341-352.
14. Griswold, K. E., Hoover, W. H., Miller, T. K. & Thayne, W. V. (1996). Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. *Journal of Animal Science*, 74, 483-491.
15. Kadzere, C. T., Murphy, M. R., Silanikove, N. & Maltz, E. (2002). Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science*, 77, 59-91.
16. Kotzamanis, Y. P., Gisbert, E., Gatesoupe, F. J., Zambonino, I. J. & Cahu, C. (2007). Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147, 205-214.
17. Li, L. L., Chen, Y. G., Tan, Z. L., Huang, R. L., Li, T. J. & Zhang, B. (2004). The effect of small peptide on nutrient digestibility in goats. *Acta Pratacult. Sin*, 13, 73-78. (in Chinese, with English abstract)
18. Lindemann, M. D., Cromwell, G. L., Monegue, H. J., Cook, H., Soltwedel, K. T., Thomas, S. & Easter, R. A. (2000). Feeding value of an enzymatically digested protein for early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 78, 318-327.
19. Marten, G. C. & Barnes, R. F. (1980). Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzymes systems. In: Pidgen, W. J., Balch, C. C. & Graham, M. (Eds), *Standardization of analytical methodology for feeds*. (pp 61-71.) International Development Research Center, Ottawa.
20. McAllan, A. B. (1991). Carbohydrate and nitrogen metabolism in the forestomach of steers given untreated or ammonia treated barley straw diets supplemented with urea or urea plus fishmeal. *Animal Feed Science and Technology*, 33, 195-208.
21. Menke, K. H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
22. Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *Journal of Agricultural Science*, 93, 217-222.
23. Miller, J. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31, 426-429.
24. Nikkhah, A. & Amanlou, V. (1990). *The importance of dietary protein for ruminants and its use in diets*. Zanjan University Press. 223p. (in Farsi)
25. Pan, Y. L., Webb Jr., K. E. (1998). Peptide-bound methionine sources for protein accretion and cell proliferation in primary cultures of ovine skeletal muscle. *Journal of Nutrition*, 128, 251-256.
26. Payne, J. (1983). Peptide transport in bacteria: methods, mutants and energy coupling. *Biochemical Society Transactions*, 11, 794-798.
27. Puchala, R., Pierzynowski, S. G., Wuliji, T., Goetsch, A. L., Sahlu, T., Lachica, M. & Soto-Navarro, S. A. (2002). Effects of small peptides or amino acids infused to a perfused area of the skin of Angora goats on mohair growth. *Journal of Animal Science*, 80, 1097-1104.
28. Raghuvansi, S. K. S., Prasad, R., Tripathi, M. K. & Mishra, A. S. (2007). Effect of complete feed blocks or grazing and supplementation of lambs on performance, nutrient utilization, rumen fermentation, and rumen microbial enzymes. *Animal*, 1, 221-226.
29. Russell, J. B., O'Connor, J. D., Fox, D. G., Van Soest, P. J. & Sniffen, C. J. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. ruminal fermentation. *Journal of Animal Science*, 70, 3551-3561.
30. Russi, J. P., Wallace, R. J. & Newbold, C. J. (2002). Influence of the pattern of peptide supply on microbial activity in the rumen simulating fermenter (RUSITEC). *British Journal of Nutrition*, 88, 73-80.
31. Tilly, J. M. A. & Terry, R. A. (1963). A two stage technique for in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*, 18, 104-111 .
32. Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press.
33. Vercoe, P. E., Makkar, H. P. S. & Schlink, A. C. (2010). *In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies*. Springer Verlag Gmbh.
34. Wang W. J., Yang, W. R., Wang, Y., Song, E. L., Liu, X. M. & Wan, F. C. (2013). Effects of Soybean Small Peptides on Rumen Fermentation and on Intestinal and Total Tract Digestion of Luxi Yellow Cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26, 72-81.
35. Zhang, B., Xue, L. Q., Li, L. L., Chen, Y. G., Wen, G. H. & Hou, D. X. (2007). Effects of soybean small peptides on nitrogen balance, nutrient digestibility and several indices in the portal veinous plasma of goats. *Small Ruminant Research*, 72, 1-10.