مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۴ شماره ۱/ سال۱۴۰۳/ صفحات ۶۳ تا ۷۶
DOI: 10.22034/as.2023.55746.1698

تاثیر سطوح مختلف نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش بر تبدیل زیستی ضایعات سیب‌زمینی توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای

سعید نریمانی قراجه[۱]، جمال سیف‌دواتی*[۲]، حسین عبدی بنمار[۲]، رضا سید شریفی[۲]، شهرام شیرمحمدی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۲۲

[۱] دانش‌آموخته دکترای تغذیه دام گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی
[۲] استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی
[۳] دانش‌آموخته دکترای تغذیه دام گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: jseifdavati@uma.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: روزانه مقادیر زیادی محتویات شکمبه به‌عنوان ضایعات در کشتارگاه‌ها تولید شده و بی‌استفاده به محیط رها می‌شود که باعث بروز مشکلات زیست محیطی می‌شوند. تبدیل زیستی نسبت به سایر روش‌های فرآوری، روش جدید و مطلوب برای مدیریت ضایعات کشاورزی است. مایع شکمبه به‌عنوان منبع غنی از آنزیم‌ها، می‌تواند در تبدیل زیستی ضایعات کشاورزی استفاده شود. هدف: بررسی تاثیر سطوح مختلف نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش بر تبدیل زیستی ضایعات سیب‌زمینی توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای بود. **مواد و روشها**: ضایعات سیب زمینی از انبارهای نگهداری سیب زمینی جمع آوری شد و پس از پاک‌سازی مواد زائد، آب‌پز و بعد آن رنده گردید. مایع شکمبه موردنیاز از کشتارگاه تهیه و پس از صاف کردن با پارچه کتان چهارلایه، به داخل مخزن‌های شیشه‌ای دستگاه هضم شکمبه‌ای اضافه شد و سریعاً به دستگاه انتقال و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۹ درجه سلسیوس انکوبه شدند. گروه‌های آزمایشی شامل: ۱) ٤۰۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه + ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی ضایعاتی (N0)، ۲) ٤۰۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه + ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی ضایعاتی+ ۱/٥ گرم نیتروژن از منبع نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش (N1.5)، ۳) ٤۰۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه + ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی ضایعاتی+ ۳ گرم نیتروژن از منبع نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش (N3) و ٤) ٤۰۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه + ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی ضایعاتی+ ٤/٥ گرم نیتروژن از منبع نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش (N4.5) بودند. بعد از اتمام انکوباسیون، نمونه‌ها از دستگاه خارج و پس از صاف و جدا کردن بخش‌های جامد و مایع از یکدیگر جهت آزمایش‌های بعدی استفاده شد. **نتایج**: بالاترین میزان اسیدهای چرب فرار مایع حاصل از انکوباسیون در سطح ۳ گرم نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش بود. میزان فعالیت آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز، آلفا آمیلاز، میکروکریستالین سلولاز، تجزیه کننده کاغذ صافی، اوره آز و پروتئاز متأثر از سطوح مکمل سازی از منبع نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش شد. بیشترین فعالیت آنزیمی مربوط به آنزیم‌های پروتئاز و اوره‌آز در سطح ٤/٥ گرم نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش بر تبدیل زیستی ضایعات سیب‌زمینی توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای مشاهده گردید. بالاترین غلظت نیتروژن آمونیاکی فاز مایع حاصل از سطح ٤/٥ گرم نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش بر تبدیل زیستی ضایعات سیب‌زمینی توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای مشاهده شده بود. **نتیجه‌گیری نهایی**: بر اساس نتایج مطالعه حاضر، افزودن ۳ گرم نیتروژن از منبع نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش به محیط انکوباسیون

ضایعات سیب زمینی با میکروارگانیسم‌های مایع شکمبه می‌توانند در تبدیل زیستی ضایعات سیب‌زمینی جهت افزایش ارزش غذایی و تولید مایع غنی از اسیدهای چرب فرار و همچنین منبعی با فعالیت آنزیمی مطلوب استفاده شوند.

واژگان کلیدی: ضایعات سیب‌زمینی، مایع شکمبه، نیتروژن آهسته رهش، تبدیل زیستی

مقدمه

روزانه مقادیر زیادی محتویات شکمبه به‌عنوان ضایعات در کشتارگاه‌ها تولید می‌شوند که مورداستفاده قرار نگرفته و در محیط رها می‌شوندو باعث بروز مسائل و مشکلات زیست محیطی و آلودگی آب‌های سطحی و زیرزمینی و همچنین ایجاد بوی بد در محیط اطراف می‌شود (رضایی و همکاران ۲۰۱۸) که مدیریت صحیح جهت حذف این ضایعات نیاز به تجدیدنظر در فرآیند مدیریت محصولات جانبی کشتارگاهی دارد (ریکون و همکاران ۲۰۱۰). جمعیت میکروبی حاضر در شکمبه منبع غنی از آنزیم‌های جدید است که پتانسیل بسیار بالایی برای کاربرد صنعتی دارند (سلینجر و همکاران ۱۹۹۶). البته، بیشتر میکروارگانیسم‌های شکمبه غیرقابل کشت هستند و کشت خالص در یک مقیاس وسیع با توجه به شرایط رشد منحصر به فرد آنها به خوبی تثبیت نشده است. مایع شکمبه حاوی آنزیم‌های جدیدی می‌باشد که تقریبا بدون استفاده واقع شده اند. در مقایسه با دیگر انکوباسیون‌های میکروبی، زمانی که از ضایعات کشاورزی همانند ترکیبات لیگنوسلولزی به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود، میکروارگانیسم‌های شکمبه فعالیت هیدرولیزی و اسیدوژنیک بیشتری را نشان داده‌اند (یوای و همکاران ۲۰۱۳). بنابراین، مایع شکمبه به‌عنوان یک منبع غنی از آنزیم‌ها، می‌تواند نقشی مهمی در تبدیل زیستی ضایعات کشاورزی ایفاء نماید (پوربایرامیان و همکاران ۲۰۲۱).

کمبود مواد خوراکی یکی از چالش‌های مهم بخش پرورش و نگهداری دام در مناطق خشک و نیمه‌خشک دنیا است؛ بنابراین روش‌های جایگزین غیرمتعارف از قبیل ضایعات یا پس‌مانده‌های صنعت غذایی، کشاورزی با پتانسیل و توان به کار بردن آن‌ها در تغذیه دام‌ها بسیار مهم هستند (مالکی و همکاران ۲۰۱۷).

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) یکی از محصولات زراعی پر تولید است که طبق گزارش‌ها میزان تولید این محصول نسبت به سال ۲۰۰۶ بیش از ۲۵ درصد افزایش‌یافته و به مقدار حدود ۳۷۶ میلیون تن رسیده است (فائو ۲۰۱۹). این در حالی است که حدود ۳۵ درصد از کل سیب‌زمینی طی مراحل مختلف به‌صورت ضایعات از چرخه مصرف خارج شده و در صورت عدم استفاده صحیح می‌تواند موجب آلودگی‌های زیست محیطی گردد. مقدار ضایعات سیب‌زمینی کل دنیا دوازده میلیون تن به ازای هرسال تخمین زده شده است (درورویوراک و همکاران ۲۰۱۵). روش اصلی کاربرد ضایعات سیب زمینی استفاده از آن به صورت تازه یا خشک شده در تغذیه دام‌های اهلی است. اگرچه، خشک کردن سیب-زمینی ضایعاتی برای استفاده در تغذیه دام ایده مناسبی به نظر می رسد، اما هزینه بالای آن، این‌کار را غیر اقتصادی نموده است. بنا براین، تبدیل ضایعات سیب-زمینی به یک محصول پایدار که ارزش اقتصادی بالاتری دارد، ضروری است (هاس و همکاران ۲۰۰۸).

تبدیل زیستی ضایعات و پسمانده‌های کشاورزی نسبت به سایر روش‌های فرآوری، میزان ارزش غذایی ترکیبات را افزایش داده و کمترین آلودگی را برای انسان، دام و محیط زیست به همراه دارد. از سوی دیگر هزینه کمتری نسبت به سایر روش‌ها برخوردار است (پوربایرامیان و همکاران ۲۰۲۱). مطالعات مختلفی با استفاده از روش-های متفاوت همانند استفاده از مخمرهای ساکارومایسیس و باکتری‌های گونه لاکتوباسیل برای تبدیل زیستی ضایعات سیب‌زمینی به اتانول (موزا و

همکاران ۲۰۱۷)، تولید بیوگاز از ضایعات جامد سیب-زمینی طی فرآیند دو مرحله‌ای هضم بی‌هوازی (پاراویرا و همکاران ۲۰۰۵)، تخمیر ضایعات سیب‌زمینی بوسیله کشت مخلوط برای تولید اسید لاکتیک (لیانگ و همکاران ۲۰۱٤)، هیدرولیز آنزیمی تفاله سیب‌زمینی برای تولید گلوکز و اتانول (لیسی ایسکی و همکاران ۲۰۱۲) و استفاده از گونه‌های مختلف باکتریایی برای تبدیل زیستی تفاله سیب‌زمینی به سلولز (شیگماتسو و همکاران ۲۰۰۵) صورت گرفته است.

هدف از اجرای تحقیق حاضر، بررسی تاثیر سطوح مختلف نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش بر تبدیل زیستی ضایعات سیب‌زمینی توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای در راستای حذف این ضایعات و استفاده بهینه و تبدیل زیستی آن‌ها به یک ماده با ارزش و معرفی آن برای استفاده در تغذیه دام و طیور بود.

مواد و روش‌ها

تهیه ضایعات سیب‌زمینی و گروه‌های آزمایشی

ضایعات سیب‌زمینی از شرکت بزرگ مجتمع فرآوری سیب‌زمینی فرنچ فرایز اردبیل سه بار در فاصله سه ماه مراجعه و هر ماه یک‌بار جمع آوری نمونه انجام گرفت در هر بار ۱۰ کیلوگرم نمونه برداری صورت گرفت. محل انجام تمام آزمایش‌های مقدماتی و اصلی در آزمایشگاه تغذیه گروه علوم دامی دانشگاه محقق اردبیلی بود. پس از جمع‌آوری سیب‌زمینی ضایعاتی تازه (غیرقابل‌استفاده برای مصرف انسانی) و پاک‌سازی مواد زائد (گل و سنگریزه) موجود در میان آن‌ها، ضایعات سیب‌زمینی جمع‌آوری‌شده آب‌پز و بعد از آب‌پزشدن رنده گردید. تجزیه و ترکیبات شیمیایی ضایعات سیب‌زمینی مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ گزارش شده است. مایع شکمبه موردنیاز از کشتارگاه دام اردبیل تهیه و در فلاسک آب گرم در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به آزمایشگاه منتقل شد. بعد از صاف نمودن مایع شکمبه، مایع حاصل بر روی مقدار ثابت (۲۰۰ گرم به همان صورتی تهیه شد) ضایعات سیب‌زمینی و سطوح مختلف نیتروزا که قبلاً داخل مخزن‌های ۲ لیتر شیشه‌ای ریخته شده بودند اضافه گردید و به کمک CO_2 با ایجاد محیط کاملاً بی‌هوازی در مخزن‌های دستگاه شبیه ساز هضم شکمبه‌ای(Incubator DAISY^{II}) (مدل دستگاه D200I ساخت شرکت انکوم آمریکا) سریعاً به دستگاه انتقال و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۹ درجه سلسیوس با چرخش هر دقیقه یک دور انکوبه شد. قابل‌ذکر است که مایع شکمبه کشتارگاهی بدون ترکیب با بافر مورداستفاده قرار گرفت (رضایی سرتشنیزی و همکاران ۲۰۱۸ آ و ب؛ پوربایرامیان و همکاران ۲۰۲۱).

گروه‌های آزمایشی شامل:

۱) ٤۰۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه + ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی ضایعاتی (N0)

۲) ٤۰۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه + ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی ضایعاتی+ ۱/۵ گرم نیتروژن از منبع نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش (N1.5)

۳) ٤۰۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه + ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی ضایعاتی+ ۳ گرم نیتروژن از منبع نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش (N3)

٤) ٤۰۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه + ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی ضایعاتی+ ٤/۵ گرم نیتروژن از منبع نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش (N4.5)

غلظت نیتروژن در ضایعات سیب‌زمینی (۱/٦۹ درصد) مطابق نتایج نریمانی و همکاران (۲۰۲۲) بود که حدود ۳/٤ گرم نیتروژن در هر مخزن هضمی (محتوی ۲۰۰ گرم ضایعات سیب زمینی) وجود داشت. بر این اساس سطوح منبع نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش تیمارها برای تامین ۱/۵، ۳ و ٤/۵ گرم نیتروژن در هر مخزن یا بطری هضمی انتخاب شدند.

پژوهش‌های علوم دامی
Animal Science Research
مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۴ شماره ۱/ سال۱۴۰۳/ صفحات ۶۳ تا ۷۶
DOI: 10.22034/as.2023.55746.1698

Table 1- Proximate analysis, metabolizable energy of initial potato waste

Parameters	Dry Matter (%)	Crude protein (%)	Ether extract (%)	Crude Ash (%)	Neutral detergent fiber (%)	Acid detergent fiber (%)	Metabolizable energy (MJ/Kg DM)
Nutrient content	80.65	9.00	1.67	5.33	15.23	5.66	9.03

نسبت ثابت مایع شکمبه به سیب زمینی ضایعاتی (۲ به ۱) بر اساس نتایج پوربایرامیان و همکاران (۲۰۲۱) انتخاب گردید.

منبع نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش مورداستفاده در این آزمایش با نام تجاری نیتروزا (ساخته شده توسط شرکت دانش بهاور شایا- اصفهان) حاوی ٤٠ درصد ازت معادل ۲۵۰ درصد پروتئین خام بود. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، نمونه‌ها از دستگاه خارج و پس از صاف کردن نمونه‌ها توسط توری چهار لایه و جدا کردن بخش‌های جامد و مایع از یکدیگر جهت آزمایش‌های بعدی مورداستفاده قرار گرفت.

اسیدهای چرب فرار فاز مایع

جهت ارزیابی پروفیل اسیدهای چرب فرار، یک میلی‌لیتر از محلول اسیدسولفوریک ۵۰ درصد (v/v) به مایع شکمبه صاف‌شده (۱ به ۵۰) اضافه‌شده و تحت دمای ۲۰- تا زمان آنالیز نگهداری شدند. جهت اندازه‌گیری میزان اسیدهای چرب فرار فاز مایع گروه‌های آزمایشی پس از یخ گشایی به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰g جهت جدا شدن ذرات جامد سانتریفیوژ گردید. سپس ۱ میلی لیتر از سوپرناتانت (مایع رویی) حاصل را برداشته و ۰/۱ میلی از استاندارد داخلی (۲ گرم بر لیتر ۲-اتیل بوتیریک اسید) را به آن اضافه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. سپس ۱ میکرولیتر از این محلول جهت ارزیابی پروفیل اسیدهای چرب فرار به دستگاه گاز کروماتوگرافی به روش اوتن استئین و بارتلی (۱۹۷۱) با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق گردید. کروماتوگرافی گازی مدل (GC-PU4410-PHILIPS) با ستون نوع 10PEG (۲/۰ متر طول و قطر ٤٥ میلیمتر) بود. میزان تزریق نمونه‌ها به ستون ۲ میکرو لیتر بود. نوع استاندارد ٤-متیل والریک اسید با مقدار مصرف ۱۰۰ میکرو لیتر بود. دمای محل تزریق و محل آشکارساز (از نوع FID) ۲۲۰ درجه سلسیوس بود. دمای آون کروماتوگراف گازی در ۱۳۵ درجه سلسیوس حفظ شد. نرخ جریان گاز نیتروژن، ۳۳ میلی لیتر در دقیقه و هوا فشرده ۳۰۰ میلی لیتر در دقیقه بود که در آزمایشگاه علوم دامی دانشکده کشاورزی کرج دانشگاه تهران انجام گرفت (اوتن استئین و بارتلی ۱۹۷۱).

پروتوزوآی فاز مایع

شمارش پروتوزوآ بر اساس روش ایوان و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. در این روش پس از تهیه نمونه مایع شکمبه و صاف کردن آن، با محلول فرمالین (۱۰۰ میلی‌لیتر فرمالدئید ٤٠ درصد و ۸/۵ گرم نمک طعام (NaCl مرک آلمان) را ۱ لیتر آب مقطر) به نسبت ۱ به ۵ (۱ قسمت مایع شکمبه و ٤ قسمت فرمالین) تثبیت و نگهداری شدند. در زمان شمارش، از هر نمونه یک قطره روی لام مدرج قرار داده و با گذاشتن لامل بر روی آن، در زیر میکروسکوپ نوری با درشت‌نمایی ۱۰ برابر تک‌یاخته‌ها در سلول‌های چهارگوشه شمارش شدند. نتایج شمارش به صورت غلظت (تعداد در هر میلی‌لیتر از پروتوزوآهای مایع شکمبه) گزارش شدند.

نیتروژن آمونیاکی فاز مایع

بعد از اتمام زمان انکوباسیون، قسمتی از مایع صاف‌شده جهت اندازه‌گیری میزان نیتروژن آمونیاکی با

روش اصلاح‌شده برودریک و کانگ (۱۹۸۰) مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه، ۳ میلی‌لیتر از فاز مایع نمونه‌های آزمایشی که تحت ۲٤ ساعت انکوباسیون قرارگرفته بودند برداشته و ۱۰ دقیقه با ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس از قسمت بالایی آن ٤۰ میکرو لیتر برداشته و به آن ٤۰ میکرو لیتر آب مقطر اضافه شد و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول فنول و ۲ میلی‌لیتر محلول هیپوکلوریت اضافه شد. کل نمونه‌ها را ۱ دقیقه ورتکس کرده و ۱۰ دقیقه در آون با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. به میزان ۳۰۰ میکرولیتر از هر نمونه برداشته و با دستگاه اسپکتروفتومتر (یونیکو سری S2150، با محدوده طول موج ۳۲۵-۱۰۰۰، عرض شکاف ٤ نانومتر، سیستم نوری تک پرتو، سیستم گریتینگ ۱۲۰۰ خط در میلی متر، دقت طول موج ۲± نانومتر، تکرار طول موج ۱± نانومتر، دقت فتومتریک ۰.۰۰٤±) در طول‌موج ۵۵۰ نانومتر اعداد قرائت شدند.

فعالیت آنزیمی فاز مایع

فعالیت آنزیم های هیدرولیتیک شامل کربوکسی متیل سلولاز (CMCase- اندو ۱ و ٤ بتا گلوکوزیداز، EC 3.3.1.4)، میکروکریستالین سلولاز (آویسلاز- اگزو ۱ و ٤ بتا گلوکوزیداز، EC 3.2.1.91) و آلفا آمیلاز (EC 3.2.1.1) در مایع شکمبه‌ای جمع‌آوری‌شده به‌وسیله روش آگاروال (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد. همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های پروتئاز (EC 3.4.23.18) (کولمباتو و همکاران ۲۰۰۳ الف) و اوره‌آز (کوک ۱۹۷٦) و ارزیابی فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده کاغذ صافی (کولمباتو و همکاران ۲۰۰۳ب) در بخش مایع حاصل از انکوباسیون ۲٤ ساعته مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این پژوهش با پنج تیمار برای هر کدام چهار تکرار در مخزن هضمی به عنوان یک واحد آزمایشی در سه اجرا (ران) انجام گرفت. داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی با رویه مدل خطی عمومی (GLM) به همراه مقایسه‌های متعامد چندجمله‌ای (اثرات خطی و درجه دوم) با استفاده از نرم‌افزار SAS (۲۰۰۳) مورد بررسی قرار گرفت. میانگین‌ها به‌صورت حداقل مربعات (LSMEAN) به همراه خطای استاندارد و مقایسات میانگین در سطح معنی‌داری پنج درصد نمایش داده شدند. مدل‌های آماری به‌صورت زیر:

$Y_i = \mu + \alpha_i + e_{ij}$

می‌باشد که در آن μ = میانگین، α_i = اثر تیمار iام و e_{ij} خطای باقیمانده بود.

نتایج و بحث

تعداد پروتوزوآ و میزان نیتروژن آمونیاکی در بخش مایع حاصل از انکوباسیون در جدول ۲ گزارش شده است. تعداد پروتوزوآ تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت. به‌طوری که مایع شکمبه (گروه شاهد) دارای بیشترین تعداد پروتوزوآ بود و مکمل سازی محیط کشت با منبع نیتروژن غیر پروتئینی جمعیت پروتوزوآ را کاهش داد لیکن رابطه کاهشی به طور خطی و درجه دوم معنی‌داری داشت ($P< ۰/۰۵$). سطح ٤/۵ گرم نیتروژن از منبع نیتروزا کمترین تعداد پروتوزوآ را نشان داد ولی بین سطوح مختلف نیتروژن غیر پروتئینی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در مورد کاهش تعداد پروتوزوآ در تیمار بدون افزودن نیتروژن اضافی نسبت به تعداد پروتوزوآی موجود در مایع شکمبه شاید بتوان تأثیرپذیری جمعیت پروتوزوآ از pH پایین را دخیل دانست. همچنین با افزایش سطح نیتروژن از منبع نیتروژن غیر پروتئینی احتمال می‌رود درنتیجه بیش‌بود نیتروژن غیر پروتئینی بیش از سطح تحمل میکروارگانیسم‌ها و آزادسازی آمونیاک بیش از حد در محیط، کاهش جمعیت پروتوزوآیی اتفاق افتاده است (لی یو و همکاران ۲۰۱۹؛ ینی گان و دمیرال ۲۰۱۳؛ چن و همکاران ۲۰۱٤؛ وانگ و همکاران ۲۰۱۸ب؛ ویلسون و همکاران ۲۰۰۸).

در مورد نیتروژن آمونیاکی نتایج حاکی از تحت تأثیر قرار گرفتن داده‌ها توسط میزان منبع نیتروژن غیر پروتئینی مکمل شده بود و سطح ٤/۵ گرم نیتروژن از

منبع نیتروژن غیر پروتئینی مورداستفاده بیشترین میزان نیتروژن آمونیاکی را نشان داد و مایع شکمبه (گروه شاهد) کمترین مقدار از نیتروژن آمونیاکی را نشان داد ($P < ۰/۰۵$).

غلظت آمونیاک شکمبه به مقدار و کیفیت پروتئین و نیتروژن غیر پروتئینی موجود در خوراک وابسته است. ترکیبات با محتوای پروتئین بیشتر و آسیب‌پذیر بودن آن‌ها در مقابل آنزیم‌های پروتئاز شکمبه و همچنین حضور ترکیبات نیتروژن دار غیر پروتئینی در جیره زمینه‌ساز تولید بیشتر آمونیاک در محیط تخمیری می‌باشد (علیپور و همکاران ۲۰۲۰). با تجزیه منبع نیتروژن غیر پروتئینی در شکمبه به مولکول‌های آمونیاک، یون‌های هیدروژن جهت تولید یون آمونیوم به مولکول آمونیاک جذب‌شده و تجمع آمونیاک در شکمبه اتفاق می‌افتد (اسپنگرو و همکاران ۲۰۱۸) که توجیه‌کننده نتایج نیتروژن آمونیاکی می‌باشد.

Table 2-Protozoa count, ammonia nitrogen and pH of the liquid phase.

	RF	N0	N1.5	N3	N4.5	SEM	P- value		
							O	L	Q
Protozoa ($\times 10^{-5}$)	3.75^{a}	1.95^{b}	1.4^{bc}	1.1^{c}	0.95^{c}	0.26	<0.01	<0.01	<0.01
N-NH3 (mg/dl)	0.074^{e}	0.109^{d}	0.233^{c}	0.354^{b}	0.395^{a}	0.003	<0.01	<0.01	<0.01
pH	6.9^{b}	4.6^{e}	5.1^{d}	6.5^{c}	7.4^{a}	0.101	<0.01	<0.09	<0.01

1) Ruminal fluid (RF)
2) 400 ml of ruminal fluid + 200 g of potato waste (N0)
3) 400 ml of ruminal fluid + 200 g of potato waste + 1.5 g of nitrogen from a slow release non-protein nitrogen source (N1.5)
4) 400 ml of ruminal fluid + 200 g of potato waste + 3 g of nitrogen from a slow release non-protein nitrogen source (N3)
5) 400 ml of ruminal fluid + 200 g of potato waste + 4.5 g of nitrogen from a slow release non-protein nitrogen source (N4.5)
^{a,b,c} Means in a same row with different superscripts are significantly different (P <0.05).
O = orthogonal contrast between the control group and nitrogen from a slow release non-protein nitrogen source receiving groups, L = linear effect of nitrogen from a slow release non-protein nitrogen source, Q = quadratic effect of nitrogen from a slow release non-protein nitrogen source.

میزان فعالیت آنزیم‌های هیدرولایتیک در مایع شکمبه و بخش مایع محیط انکوباسیون ضایعات سیب زمینی با مایع شکمبه در جدول ۳ گزارش شده است. میزان فعالیت آنزیمی کربوکسی متیل سلولاز، آلفا آمیلاز، میکروکریستالین سلولاز و تجزیه‌کننده کاغذ صافی تحت تأثیر مقدار نیتروژن مکمل شده از منابع نیتروژن غیر پروتئینی قرار گرفت و سطح ۱/۵ گرم نیتروژن از نیتروزا بیشترین میزان فعالیت را نشان داد و روند افزایش فعالیت آنزیمی به صورت خطی و درجه دوم بود ($P < ۰/۰۵$). سطوح مختلف از منبع نیتروژن غیر پروتئینی بر میزان فعالیت آنزیم پروتئاز تأثیر گذاشته و سطح ٤/٥ گرم نیتروژن از نیتروزا بیشترین میزان فعالیت را نشان داد و این افزایش معنی دار هم خطی و هم درجه دوم را نشان داد ($P < ۰/۰۵$). علت افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز به عنوان شاخصی از تجزیه پروتئین احتمالا به دلیل پویایی و رشد بیشتر جمعیت میکروبی در جیره‌های حاوی نیتروژن غیر پروتئینی آهسته باشد چرا که هضم بیشتر تولید اسیدهای چرب بیشتر و پروتئین میکروبی بیشتر (چامبرلیئن و همکاران ۱۹۹۳) و همه این‌ها نشان از رشد جمعیتی بالاتر میکروب‌های شکمبه هستند (عزیزی و همکاران ۲۰۱۹). میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز هم تحت تأثیر سطوح مختلف از منبع نیتروژن غیر پروتئینی قرار گرفت و میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز در گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری نشان داده و سطح ٤/٥ گرم نیتروژن از منبع نیتروزا بیشترین میزان فعالیت را نشان داد. البته لازم به ذکر است که گروه شاهد (مایع شکمبه) در تمامی آنزیم‌ها دارای کمترین میزان فعالیت بود لیکن رابطه افزایشی خطی و درجه دوم معنی‌داری را بین مقدار

نیتروژن مکمل شده از منبع نیتروژن غیر پروتئینی داشت ($P < ۰/۰۵$).

با افزایش سطح نیتروژن غیر پروتئینی میزان فعالیت آنزیم‌های سلولاز، آلفا آمیلاز، آوسیلاز و هضم کننده کاغذ صافی کاهش را نشان داد که همخوان با روند ناپدید شدن آزمایشگاهی صورت گرفته در تحقیق مطابق نتایج نریمانی و همکاران (۲۰۲۲) می‌باشد. احتمال می‌رود روند کاهشی میزان فعالیت آنزیم‌های مذکور به سبب وجود آمونیاک آزاد در محیط کشت باشد که در سطوح بالاتر تجمع آمونیاک در محیط از فعالیت آنزیم‌ها ممانعت می کند (ژائو و همکاران ۲۰۱۹). مکانیسم تاثیر افزایش غلظت آمونیاک آزاد بر کاهش فعالیت آنزیمی احتمال دارد به علت اثرات قلیایی آمونیاک زیادی باشد که باعث افزایش pH (جدول ۲) محیط به بالاتر از محدوده pH بهینه برای فعالیت آنزیمی گردد. به‌طوری‌که افزایش سطح منابع نیتروژن غیرپروتئینی باعث افزایش غلظت آمونیاک در محیط شده و موجب افزایش pH محیط به ۷/٤ شد. با توجه به این‌که pH مطلوب برای فعالیت طبیعی شکمبه در بازه ٦-۷ صورت می‌گیرد (چنگ و همکاران ۱۹۹۵)، لذا ممکن است کاهش رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای و به تبع آن کاهش فعالیت آنزیمی را باعث شود. بنابر این وجود آمونیاک بیشتر در سطوح بالاتر نیتروژن غیر پروتئینی خود توجیه‌کننده روند فعالیتی بالاتر صرفا آنزیم‌های اوره‌آز و پروتئاز می‌باشد.

Table 3-Activity of hydrolytic enzymes of liquid portion (U/mL)

	Rf	N0	N1.5	N3	N4.5	SEM	P –value		
							O	L	Q
Carboxymethylcellulase	74.1^{d}	129.7^{c}	146.1^{a}	142.1^{b}	131.3^{c}	1.033	<0.01	<0.01	<0.01
Amylase	643.2^{e}	913.0^{d}	1179.1^{a}	1051.5^{b}	932.5^{c}	4.660	<0.01	<0.01	<0.01
Avicellase	90.0^{d}	120.7^{c}	141.9^{a}	133.5^{b}	121.3^{c}	0.550	<0.01	<0.01	<0.01
Filter-paper	180.1^{d}	222.8^{c}	264.7^{a}	239.4^{b}	224.5^{c}	1.102	<0.01	<0.01	<0.01
Protease	1.46^{e}	1.74^{d}	2.34^{c}	2.75^{b}	2.78^{a}	0.006	<0.01	<0.01	<0.01
Urease	1.28^{e}	1.37^{d}	1.64^{c}	1.87^{b}	2.06^{a}	0.018	<0.01	<0.01	<0.01

1) Ruminal fluid (RF)
2) 400 ml of ruminal fluid + 200 g of potato waste (N0)
3) 400 ml of ruminal fluid + 200 g of potato waste + 1.5 g of nitrogen from nitrogen source (N1.5)
4) 400 ml of ruminal fluid + 200 g of potato waste + 3 g of nitrogen from nitrogen source (N3)
5) 400 ml of ruminal fluid + 200 g of potato waste + 4.5 g of nitrogen from nitrogen source (N4.5)
^{a,b,c} Means in a same row with different superscripts are significantly different (P <0.05).
O = orthogonal contrast between the control group and nitrogen from a slow release non-protein nitrogen source receiving groups, L = linear effect of nitrogen from a slow release non-protein nitrogen source, Q = quadratic effect of nitrogen from a slow release non-protein nitrogen source.

انواع آنزیم‌ها جهت شکستن محتویات و ساختمان پیچیده دیواره سلولی گیاهان و تبدیل به مولکول‌های ساده مورداستفاده قرار می‌گیرند تا سبب در دسترس قرار گرفتن و آزاد شدن بخش‌های محلول سلول شوند (مورگاوی و همکاران ۲۰۱۲). مایع شکمبه حاوی آنزیم‌های میکروبی از قبیل زایلاناز، گالاکتوزیداز، سلولاز، همی سلولاز و آلفا-آمیلاز که سبب شکستن کربوهیدرات‌های پیچیده می‌شوند (یوای و همکاران ۲۰۱۳). بنابراین، مایع شکمبه می‌تواند به‌عنوان منبع خوب آنزیمی مورداستفاده قرار گیرد به‌طوری‌که رضایی و همکاران (۲۰۱۸ آ و ب) با بررسی پتانسیل مایع شکمبه تازه کشتارگاهی به‌عنوان یک منبع آنزیمی برای فرآوری برخی مواد خوراکی نشان دادند که مایع شکمبه اثر معنی‌داری برافزایش قابلیت هضم ماده خشک خوراک‌ها داشت.

با توجه به نتایج حاصل‌شده از میزان فعالیت آنزیم‌های بخش مایع حاصل از ٢٤ ساعت انکوباسیون ضایعات سیب زمینی با مایع شکمبه می‌توان عنوان کرد که افزودن نیتروژن غیر پروتئینی به محیط انکوباسیون موجب افزایش پتانسیل میکروارگانیسم‌های شکمبه در ناپدید نمودن ماده خشک ضایعات سیب زمینی و تبدیل زیستی آن به محصولات تخمیری شده است که این عملکرد بازتابی از افزایش فعالیت آنزیم‌هاست که با نتایج محققین پیشین همخوانی دارد (رضائی و همکاران، ۲۰۱۸ و پوربایرامیان و همکاران، ۲۰۲۱).

نتایج حاصل از افزودن نیتروژن آهسته رهش بر میزان اسیدهای چرب فرار فاز مایع حاصل از انکوباسیون ضایعات سیب‌زمینی با مایع شکمبه در جدول ٤ گزارش شده است. تولید اسیدهای چرب فرار تحت تأثیر مکمل سازی با سطوح نیتروژن غیر پروتئینی قرار گرفت. سطح ۳ گرم نیتروژن از منبع نیتروزا بیشترین مقدار تولید اسیدهای چرب فرار را نشان داد لیکن این افزایش در تمامی اسیدهای چرب فرار حاصل از انکوباسیون ضایعات سیب‌زمینی با مایع شکمبه با افزوده شدن نیتروژن آهسته رهش به مخزن تخمیر ارتباط خطی و درجه دوم بین سطوح تیمارها را نشان داد ($P < ۰/۰۵$). کمترین میزان اسیدهای چرب فرار در گروه شاهد مایع شکمبه اولیه مشاهده گردید ($P < ۰/۰۵$). علت عدم همخوانی مقادیر اسیدهای چرب فرار تولیدی در سطوح افزایشی نیتروژن غیر پروتئینی با نتایج روند کاهشی میزان فعالیت آنزیم‌ها احتمال می‌رود ناشی از آمونیاک آزاد در محیط کشت باشد که در سطوح بالاتر فعالیت آنزیم‌ها مهار می‌شود (ژائو و همکاران ۲۰۱۹). در راستای نتایج تحقیق حاضر، در تحقیقی که توسط پوربایرامیان و همکاران (۲۰۲۱) صورت گرفت مشاهده کردند که با انکوباسیون ضایعات سیب‌زمینی، اسیدهای چرب فرار کل تولیدی در بخش مایع حاصل از ٢٤ ساعت انکوباسیون در گروه‌های آزمایشی نسبت به مایع شکمبه اولیه افزایش حدود ۳ برابری داشت.

نشاسته در شکمبه توسط آنزیم‌های میکروبی شکمبه به قندهای ساده تر (گلوکز، مالتوز و سلوبیوز) هیدرولیز می‌شود که سوبستراهای اصلی مرحله اسیدوژنز هستند و نهایتاً به اسیدهای چرب فرار از قبیل استات، پروپیونات، بوتیرات تبدیل می‌شوند (پوآستوتی و همکاران ۲۰۱۲). اسیدهای چرب فرار، اسیدهای آلی با طیف وسیعی از کاربردها در صنعت خوراک، دارو و تولید استرها، پلاستیک‌های زیستی و انرژی زیستی هستند (فانگ و همکاران ۲۰۲۰). اسیدهای چرب فرار کاربرد گسترده‌ای در تغذیه دام و طیور به‌عنوان افزودنی به‌منظور تأثیر مثبت آن‌ها روی بهبود رشد دام، وضعیت سلامتی دام و بازده غذایی بهتر دارند (خان و اقبال ٢٠١٦). مایع شکمبه حاوی باکتری‌های اسیدوژنیک است که توانایی تولید اسیدهای چرب فرار به‌وسیله تخریب و تجزیه مواد گیاهی را دارند (یوای و همکاران ۲۰۱۳). ضایعات کشاورزی به‌عنوان بهترین سوبسترا برای میکروارگانیسم‌های اسیدوژنیک جهت تولید بیشترین میزان اسیدهای چرب فرار می‌باشد (پاراویرا و همکاران ۲۰۰۵). بالاتر بودن نسبت استات به پروپیونات احتمال می رود به دلیل رشد و تکثیر مضاعف میکروارگانیسم‌های استوژنیک باشند که در اثر همزمانی فراهمی منبع نیتروژن غیر پروتئینی از اوره آهسته رهش و نشاسته یا کربوهیدرات سهل الهضم از منبع ضایعات سیب زمینی غنی از نشاسته حاصل می‌شود. رشد و تکثیر مضاعف میکروارگانیسم‌های استوژنیک و فیبرولتیک محتوی مایع شکمبه منجر به افزایش استات شده است (جدول ٤) و یا دلیل ممکن است این باشد که میزان تغییر کربوهیدرات غیر فیبری NFC نظیر نشاسته برای ایجاد تغییر در ساختار میکروارگانیسم‌های مربوطه به دلیل افزونگی عملکرد میکروبی شکمبه و خاصیت ارتجاعی و انعطاف‌پذیری قوی میکروارگانیسم‌های شکمبه کافی نبود (ویمر ۲۰۱۵). اسیدهای چرب فرار به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان اسیدی‌کننده جیره غذایی در جیره دام و طیور مورد

استفاده قرار می‌گیرند. اسید استیک و اسید پروپیونیک به دلیل اثرات کاهشی بر pH دستگاه گوارش به‌عنوان اسیدی‌کننده‌های تجاری محسوب می‌شوند که از استقرار و رشد میکروارگانیسمهای بیماری‌زا در دستگاه جلوگیری می‌کنند (خان و اقبال ۲۰۱۶).

اسید بوتیریک در صورت استفاده در تغذیه نشخوارکنندگان شیرخوار تازه متولدشده اثرات مفیدی بر رشد شکمبه و سلامتی آنها دارد (گورکا و همکاران ۲۰۱۱). مکمل سازی خوراک با والریک و ایزو والریک اسید رشد باکتری‌های سلولایتیک در شکمبه را بهبود بخشیده و درنتیجه هضم بهتر فیبر توسط حیوان را موجب می‌شود (اندرایز و همکاران ۱۹۸۷).

لازم به توضیح هست که با توجه به افزایش غلظت اسیدبوتیریک و دیگر اسیدهای چرب در محیط تخمیر در طی فرآیند تبدیل زیستی، محیط مایع حاصل پتانسیل جداسازی و استفاده صنعتی اسیدبوتیریک را می تواند داشته باشد که نیاز به بررسی و تحقیقات بیشتری جهت توسعه روش‌های تغلیظ و جداسازی خواهد بود. بنابر این نظر به کاربردهای اسیدهای چرب مختلف موجود در مایع شکمبه و افزایش قابل توجه غلظت آن‌ها در محیط انکوباسیون ضایعات سیب زمینی با مایع شکمبه، میتوان آن را به عنوان یک منبع اسیدهای چرب فرار جهت استخراج و تغلیظ و استفاده در مصارف مختلف در مقیاس صنعتی معرفی کرد.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، نظر به حداکثر تولید اسیدهای چرب فرار به‌عنوان محصول فرایند تخمیر، افزودن ۳ گرم نیتروژن از منبع نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش به محیط انکوباسیون ضایعات سیب زمینی با میکروارگانیسم‌های مایع شکمبه موجب افزایش معنی دار توان آن‌ها در تبدیل زیستی ضایعات سیب‌زمینی می‌شود. همچنین بخش مایع محیط کشت به علت افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و اسیدهای چرب فرار که محصول فرایند تخمیر هستند به عنوان یک منبع آنزیم و اسید برای استفاده در مقیاس صنعتی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. کابرد مایع شکمبه فرآوری شده حاصل از این انکوباسیون به‌عنوان منبع آنزیمی و مواد مغذی در تغذیه دام و طیور یک روش دوستدار محیط‌زیست خواهد بود که از این طریق مایع شکمبه کشتارگاه‌هی و ضایعات سیب زمینی با یک روش مدیریت صحیح مورد کاربرد قرار خواهند گرفت.

Table 4-VFAs concentration of the liquid phase (mM/L).

	Rf	N0	N1.5	N3	N4.5	SEM	P- value		
							O	L	Q
Acetic acid	45.9^{e}	139.1^{d}	175.8^{c}	197.4^{a}	186.4^{b}	0.68	<0.01	<0.01	<0.01
Propionic acid	16.4^{d}	36.7^{c}	46.9^{a}	37.3^{c}	41.3^{b}	0.41	<0.01	<0.01	<0.01
iso-Butyric acid	1.42^{d}	2.26^{c}	2.44^{bc}	2.85^{a}	2.65^{ab}	0.08	<0.01	<0.01	<0.02
Butyric acid	9.4^{d}	21.5^{b}	24.3^{a}	18.4^{c}	20.8^{b}	0.35	<0.01	<0.01	<0.01
iso-Valeric acid	1.33^{b}	2.88^{a}	2.89^{a}	3.07^{a}	2.94^{a}	0.06	<0.01	<0.01	<0.01
Valeric acid	1.06^{d}	3.98^{b}	4.3^{a}	3.69^{c}	3.79^{bc}	0.06	<0.01	<0.01	<0.01
Total VFA	75.6^{d}	206.5^{c}	256.7^{b}	262.8^{a}	257.9^{b}	0.84	<0.01	<0.01	<0.01

1) Ruminal fluid (RF)
2) 400 ml of ruminal fluid + 200 g of potato waste (N0)
3) 400 ml of ruminal fluid + 200 g of potato waste + 1.5 g of nitrogen from nitrogen source (N1.5)
4) 400 ml of ruminal fluid + 200 g of potato waste + 3 g of nitrogen from nitrogen source (N3)
5) 400 ml of ruminal fluid + 200 g of potato waste + 4.5 g of nitrogen from nitrogen source (N4.5)
^{a,b,c} Means in a same row with different superscripts are significantly different (P <0.05).
O = orthogonal contrast between the control group and nitrogen from a slow release non-protein nitrogen source receiving groups, L = linear effect of nitrogen from a slow release non-protein nitrogen source, Q = quadratic effect of nitrogen from a slow release non-protein nitrogen source.

پژوهش‌های علوم دامی
Animal Science Research
مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۴ شماره ۱/ سال۱۴۰۳/ صفحات ۶۳ تا ۷۶
DOI: 10.22034/as.2023.55746.1698

منابع مورد استفاده

Agarwal I, Amra DN and Chaudhary LC, 2000. Diurnal variations in the activities of hydrolytic enzymes in different fractions of rumen contents of Murrah buffaloes. Journal of Applied Animal Research 18: 73–80.

Alipour D, Mohamed Saleem A, Sanderson H, Brand T, Santos LV, Mahmoudi-Abyane M, Marami MR and McAllister TA, 2020. Effect of combinations of feed-grade urea and slow-release urea in a finishing beef diet on fermentation in an artificial rumen system. Translational Animal Science 4: 837-849.

Andries JI, Buysse FX, De Brabander DL and Cottyn BG, 1987. Isoacids in ruminant nutrition: their role in ruminal and intermediary metabolism and possible influences on performances- A review. Animal Feed Science Technology 18: 169-180.

Azizi A, Sharifi A and Fazaeli H, 2019. Effect of one produced slow-release urea component on gas production, fermentation, nutrient disappearance and activity of microbial enzymes using rumen liquor of sheep. Animal Sciences Journal 32: 279-290.

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

Chamberlain DG, Robertson S and Choung JJ, 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 Science of Food and Agriculture 63:189–194.

Chen JL, Ortiz R, Steele TWJ and Stuckey DC, 2014. Toxicants inhibiting anaerobic digestion: a review. Biotechnology Advance 32: 1523–1534.

Cheng KJ, Forsberg CW, Minato H and Costerton JW, 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen, Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants, Tsuda *T*, Sasaki YK and awashima R, (eds.), Academic Press, New York.

Colombatto D, Morgavi DP, Furtado AF and Beauchemin KA, 2003a. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. Journal of Animal Science 81: 2628-2638.

Colombatto D, Mould FL, Bhat MK, Owen E, 2003b. Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets a biochemical and in vitro rumen degradation assessment. Animal Feed Science and Technology 107: 201-209.

Cook AR, 1976. Urease activity in the rumen of sheep and the isolation of ureolytic bacteria. Journal of Genetic Microblog 92: 32-48.

Duruyurek M, Dusgun C, Fuat G, Mehmet and Zeliha S, 2015. Production of bioethanol from waste potato. Turkish Journal of Agriculture Food Science and Technology 3: 331- 334.

FAO. The state of food and agriculture, 2019. Moving forward on food loss and waste reduction. 2–13. https://www.fao.org/3/ca6030en/ca6030en.pdf

Fang W, Zhang X, Zhang P, Wan J, Guo H, Ghasimi DSM, Morera XC and Zhang T, 2020. Overview of key operation factors and strategies for improving fermentative volatile fatty acid. Journal of Environment Science 87: 93-111.

Haas R, Jin B and Zepf FT, 2008. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. Bioscience Biotechnology Biochemistry 72: 253–256.

Ivan M, Neill L and Entz T, 2000. Ruminal fermentation and duodenal flow following progressive inoculations of fauna-free withers with major individual species of ciliate protozoa or total fauna. Journal of Dairy science 78: 750–759.

Khan SH and Iqbal J, 2016. Recent advances in the role of organic acids in poultry nutrition. Journal Applied Animal Research 44: 359-369.

Lesiecki M, Białas W and Lewandowicz G, 2012. Enzymatic hydrolysis of potato pulp. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria 11: 53–59.

Liang S, McDonald A G and Coats E R, 2014. Lactic acid production with undefined mixed culture fermentation of potato peel waste. Waste Management 34: 2022-2027.

Liu WW, Zhang KX, Chen CZ, Li JQ, Tan YH, Warren A, Lin XF and Song WB, 2019. Overview of the biodiversity and geographic distribution of aloricate oligotrich ciliates (Protozoa, Ciliophora, Spirotrichea) in coastal waters of southern China. System Biodivers 8:787–800.

Malecky M, Ghadbeigi M, Aliarabi H, Bahari AA and Zaboli K, 2017. Effect of replacing alfalfa with processed potato vines on growth performance, ruminal and total tract digestibility and blood metabolites in fattening lambs. Small Ruminant Research 146: 13-22.

Moza A, Ram NR, Srivastava NK and Nikhil GN, 2022. Bioprocessing of low-value food waste to high value volatile fatty acids for applications in energy and materials: a review on process-flow. Bioresource Technology Reports 19: 101123.

Morgavi DP, Martin C, Jouany JP and Ranilla MJ, 2012. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause–effect relationship. British Journal Nutrition 107: 388-397.

Narimani Garajeh S, Seifdavati J, Abdi benemar H, Salem A and seyedsharifi R, 2022. Measurement of chemical composition, degradability parameters and gas production of material resulting from bioconversion of potato waste by ruminal microorganisms by supplementation of different levels of slow-release non-protein. Journal of Animal Science Research 32: 45-56.

Ottenstein DM and Bartley DA, 1971. Separation of free acids C2–C5 in dilute aqueous solution column technology. Journal of Chromatographic Science 9: 673- 681.

Parawira W, Murto M, Read JS and Mattiasson B, 2005. Profile of hydrolases and biogas production during two-stage mesophilic anaerobic digestion of solid potato waste. Process Biochemistry 40: 2945-2952.

Pourbayramian R, Abid-Benemar H, Seifdavati J, Greiner R, Elghndour MMMY and Salem AZM, 2021. Bioconversion of potato waste by rumen fluid from slaughterhourses to produce a potential feed additive rich in volatile fatty acids for farm animals. Journal of cleaner production 280:1, 124411.

Puastuti W, Yulistiani D and Mathius IW, 2012. Ruminal fermentation response and nitrogen retention from sheep fed rumen undegradable protein. Indonesia Journal Animal Veterinary Science 17: 67-72.

Rezai Sarteshnizi F, Abdi Benemar H, Seifdavati J, Greiner R, Salem AZM and Khalilvandi Behroozyar H, 2018. Production of an environmentally friendly enzymatic feed additive for agriculture animals by spray drying abattoir's rumen fluid in the presence of different hydrocolloids. Journal Cleaner Production 197: 870-874.

Rezai Sarteshnizi F, Seifdavati J, Abdi-Benemar H, Salem AZM, Seyed Sharifi R and Mlambo V, 2018. The potential of rumen fluid waste from slaughterhouses as an environmentally friendly source of enzyme additives for ruminant feedstuffs. Journal of Cleaner Production 195:1026-1031.

Rincon FR, Bermudez-Hurtado RM, Estrada-Angulo A, Juarez-Reyes AS and Pujol-Manriquez C, 2010. Dried ruminal contents as a substitute for alfalfa hay in growing-finishing diets for feedlot cattle. Journal of Animal and Veterinary Advances 9(10): 1526-1530.

SAS, 2003. SAS/STAT Software: Changes and Enhances Through Release 9.1.3. SAS Institute Inc Cary, North Carolina. USA.

Selinger LB, Forsberg CW and Cheng KJ, 1996. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. Anaerobe 2: 263-284.

Shigematsu T, Takamine K, Kitazato M, Morita T, Naritomi T, Morimura S and Kida K, 2005. Cellulose production from glucose using a glucose dehydrogenase gene (gdh)-eficient mutant of Gluconacetobacter xylinus and its use for bioconversion of sweet potato pulp. Journal of Bioscience and Bioengineering 99: 415–422.

Spanghero M, Nikulina A and Mason F, 2018. Use of an in vitro gas production procedure to evaluate rumen slow-release urea products. Animal Feed Science and Technology 237: 19-26.

Wang P, Zhao S, Nan X, Jin D and Wang J, 2018. Influence of hydrolysis rate of urea on ruminal bacterial diversity level and cellulolytic bacteria abundance in vitro. Peer Journal 6: 05475.

Wang S, Zhang G, Zhang P, Ma X, Li F, Zhang H, Tao X, Ye J and Nabi M, 2018. Rumen fluid fermentation for enhancement of hydrolysis and acidification of grass clipping. Journal of Environment Management 220: 142-148.

Weimer PJ, 2015. Redundancy, Resilience, and Host Specificity of the Ruminal Microbiota: Implications for Engineering Improved Ruminal Fermentations. Frontiers in Microbiology 6: 296.

Wilson KR, Abney CS, Vasconcelos JT, Vàzquez-Añon M, McMeniman JP and Galyean ML, 2008. Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid on performance and carcass characteristics of finishing beef cattle and on fermentation in continuous culture. Journal Animal Science 86:1951-1962.

Yenigün O and Demirel B, 2013. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: a review. Process Biochemistry 48 (5–6): 901–911.

Yue ZB, Li WW and Yu HQ, 2013. Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology 12: 738-744.

Zhao L, Cheng L, Deng Y, Zhaofeng L, Hong Y, Li C, Ban X and Gu Z, 2019. Study on rapid drying and spoilage prevention of potato pulp using solid-state fermentation with *Aspergillus aculeatus*. Bioresource Technology 296: 122323.

Effects of different levels of slow-release non-protein nitrogen on bioconversion of potato waste by rumen microorganisms

S Narimani[1*], J Seifdavati[2], H Abdi-benemar[2], R. Seyedsharifi[2] and SH Shirmohammadi

Received: March 7, 2023 Accepted: November 13, 2023

[1] Ph.D. in Animal Nutrition, Department of Animal Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[2] Professors, Department of Animal Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[3] Ph.D. in Animal Nutrition, Department of Animal Science, University of Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: E mail: jseifdavati@uma.ac.ir

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research

Journal of Animal Science/vol.34 No.1/ 2024/pp 63-76
https://animalscience.tabrizu.ac.ir

OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)
DOI: 10.22034/as.2023.55746.1698

Introduction: Daily, large amounts of rumen contents are produced as waste in slaughterhouses, which are not used and released into the environment, which causes environmental issues and problems (Rezai et al 2018). Potato (*Solanum tuberosum*) is one of the crops with high production throughout the world a large amount of which is removed from the consumption cycle as waste during different stages, and if not used correctly, it can cause environmental pollution (FAO 2019). The main method of using potato waste is to use it in fresh or dried form to feed domestic animals. Although drying waste potatoes for use in animal feed seems like a good idea, but its high cost has made this uneconomical. Therefore, it is necessary to transform potato waste into a sustainable product that has a higher economic value (Haas et al 2008). Compared to other processing methods, bioconversion is a new and desirable method for agricultural waste management. Ruminal fluid, as a rich source of enzymes, can be used in the bioconversion of agricultural waste. The microbial population present in the rumen is a rich source of new enzymes that have a high potential for industrial use (Pourbayramian et al 2021). Various studies using different methods, such as the use of *Saccharomyces yeasts* and *Lactobacillus* species for the biological conversion of potato waste to ethanol (Moza et al 2022), producing biogas from solid potato waste in a two-step process anaerobic digestion (Parawira et al 2005), fermentation of potato waste by mixed culture to produce lactic acid (Liang et al 2014), enzymatic hydrolysis of potato pulp to produce glucose and ethanol (Lesiecki et al 2012) and using various bacterial species have been used for the biological conversion of potato pulp into cellulose (Shigematsu et al 2005). The objective of this study was to investigate the effect of different levels of slow-release non-protein nitrogen on the bioconversion of potato waste by ruminal microorganisms.

Materials and methods: Potato waste was collected from potato storage stocks and after cleaning the waste materials, it was boiled and then grated before incubation. The required rumen fluid was obtained from the slaughterhouse and after being filtered with a four-layer cheesecloth, it was added to the glass bottles of the rumen digestion simulator apparatus (DaisyII) and immediately transferred to the apparatus and incubated at 39 degrees Celsius for 24 hours. Experimental groups were: 1) 400 ml of rumen fluid + 200 g of waste potato (N0), 2) 400 ml of rumen fluid + 200 g of waste potato + 1.5 g of nitrogen from a slow-release nitrogen source (N1.5), 3) 400 ml of rumen fluid + 200 grams of waste potatoes + 3 grams of nitrogen from a slow release nitrogen source (N3)

and 4) 400 ml of rumen fluid + 200 grams of waste potatoes + 4.5 grams of nitrogen from a slow release nitrogen source (N4.5). After the end of the incubation time, the samples were removed from incubation bottles, and after filtering and separating the solid and liquid parts from each other for further tests. The liquid portion of the incubation medium was analyzed for protozoa count, volatile fatty acids, ammonia nitrogen, and hydrolytic enzymes and compared to the fresh initial rumen fluid used for the incubation. The resulting data were analyzed in the form of a completely randomized design using SAS software (2003). Means were shown as Least Squares (LSMEAN) along with standard error and mean comparisons at a significance level of five percent.

Results and discussion: Protozoa count in the liquid portion of the incubation medium was affected by the experimental groups. Rumen fluid had the highest number of protozoa and supplementing the culture medium with a non-protein nitrogen source had a decreasing effect on the protozoa population. The activities of carboxy-methyl cellulase, alpha-amylase, microcrystalline cellulose, and filter-papers enzymes were affected by the levels of supplementation from slow-release non-protein nitrogen sources and the highest carbohydrate-degrading activities were recorded at 1.5 gr nitrogen supplementation per 100 gr potato waste ($P<0.05$). The level of urease and protease enzyme activity was also affected by different levels of non-protein nitrogen sources and 4.5 grams of nitrogen from non-protein nitrogen sources showed the highest level of activity. Supplementing the incubation medium increased its ammonia concentration and the highest value was observed at 4.5 grams of slow-release non-protein nitrogen level ($P<0.05$). For all enzyme activities, initial fresh rumen fluid had the lowest activities. Volatile fatty acid production was affected by supplementation with non-protein nitrogen levels and the amount of volatile fatty acids in the liquid phase of the incubation medium showed the highest values with 3 grams of non-protein slow-release nitrogen supplementation.

Conclusion: Based on the results of the present study, the addition of slow-release non-protein nitrogen to the incubation medium of potato waste with rumen liquid microorganisms significantly increases their power in the biotransformation of potato waste. Also, the liquid part of the culture medium can be considered as a source of enzymes and acids for use on an industrial scale due to the increased activity of hydrolytic enzymes and volatile fatty acids that are the product of the fermentation process. The use of the processed rumen fluid resulting from this incubation as a source of enzymes and nutrients in feeding livestock and poultry will be an environmentally friendly method, in this way, the rumen fluid of slaughterhouses and potato waste will be used with a proper management methods. According to the results of the present study, rumen liquid microorganisms with a non-protein nitrogen source can be used more effectively in the bioconversion of potato waste to increase its nutritional value and produce a liquid rich in volatile fatty acids as well as a source of favorable enzyme activities.

Keywords: Potato wastes, Rumen fluid, Slow release urea, Bioconversion.