Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

Determining the nutritional value of protein in two microalgae species *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata* used in animal nutrition

Zahra Salehian[1], Hamed Khalilvandi Behroozyar[2]*, Rasoul Pirmohammadi[3], Nasrolah Ahmadifard[4], Hadi Almasi[5]

[1] Ph.D.Student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran, Email: H.Khalilvandi@urmia.ac.ir
[3] Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[4] Associate Professor, Department of Fishery, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran
[5] Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 10/25/2021
Revised: 02/10/2022
Accepted: 02/12/2022

Keywords:
Amino Acid Profile
Ammonia Nitrogen
Microalgae
Protein Degradability

ABSTRACT

Background and objectives: Today, the nutritional value of microalgae is not hidden from anyone, and extensive research is being done to increase their production capacity and nutritional value. Due to the high cost of protein in livestock diets, microalgae can be economically viable natural alternatives to protein supplements such as soybean meal in competitively priced diets. Among dietary amino acids, lysine and methionine are the first and second limiting amino acids. Most microalgae species contain relatively high levels of lysine. But they are somewhat deficient in sulfur-containing amino acids such as cysteine and methionine. The present experiment aimed to investigate the protein content and chemical composition of two species of microalgae, *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata*, the rate nitrogen degradability by *in vitro* method (IVDN), and their different partitions of protein in the Cornell Net Carbohydrate and Protein (CNCPS) system.

Materials and methods: For this purpose, after culturing and harvesting the two microalgae species in the laboratory and conducting experiments, the amount of dry matter (DM) composition, ash, crude protein (CP) and determination of amino acid profile, evaluation of IVDN and determination of different parts of the protein of two species of microalgae *I. galbana* and *N. oculata* was made by CNCPS system. In this study, to estimate the IVDN, the ruminal fluid of three male Holeshtine castrated fistula calves with an average weight of 480 ± 40 kg and age of 2 years was used.

Results: The results showed that the two microalgae species were different in terms of CP, fat, and NSC percentages (P<0.05). The *N. oculata* and *I. galbana* had 37 and 32% CP, respectively. The ratio of essential to non-essential amino acids was 18.79% in *I. galbana* and 28.8% in *N. oculata* (P<0.05). The percentage of IVDN at 8, 12, and 24 h of incubation in *I. galbana* was 44%, 53%, and 48%, respectively, and in *N. oculata* was 35%, 40%, and 38%, respectively (P<0.05). The percentage of RUP at 8, 12, and 24 h of incubation was 56%, 47%, and 42% in *I. galbana* and 65%, 60%, and 62% in *N. oculata*, respectively. Sections A, B_1, B_2,B_3, and C in *I. galbana* 10.07, 19.9, 55.13, 6.1, 8.8, and in *N. oculata* 15.16, 16.64, 54.98, 5.65, and 7.57, respectively and the sections A and C became

significant (P<0.05).

Conclusion: The results of the present study indicated that considering to the amount of fat%, CP%, IVDN, and RUP in *N. oculata* and *I. galbana*, it seems that these microalgae are suitable for use in animal feed.

Cite this article: Salehian, Z., Khalilvandi Behroozyar, H., Pirmohammadi, R., Ahmadifard, N., Almasi, H. (2022). Determining the nutritional value of protein of two microalgae species used in animal nutrition. *Journal of Ruminant Research*, 10 (2), 1-18.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/ejrr.2022.19617.1810
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش در نشخواکنندگان
شاپا چاپی: ۲۳۴۵-۴۲۶۱
شاپا الکترونیکی: ۲۳۴۵-۴۲۵۳

تعیین ارزش غذایی پروتئین دو گونه ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* (*Isochrysis galbana*) و *نانوکلروپسیس اکولاتا* (*Nannochloropsis oculata*) مورد استفاده در تغذیه دام

زهرا صالحیان[۱]، حامد خلیل وندی بهروز یار[۲*]، رسول پیرمحمدی[۳]، نصراله احمدی فرد[۴]، هادی الماسی[۵]

۱.دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، رایانامه: h.khalilvandi@urmia.ac.ir
۳. استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴. دانشیار، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۵. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۳
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳

واژه‌های کلیدی:
الگوی اسیدهای آمینه
تجزیه‌پذیری پروتئین
ریز جلبک
نیتروژن آمونیاکی

چکیده

سابقه و هدف: امروزه ارزش تغذیه‌ای ریز جلبک‌ها بر کسی پوشیده نیست و تحقیقات گسترده‌ای در زمینه افزایش ظرفیت تولید آن‌ها و ارزش تغذیه‌ای آن‌ها انجام می‌گیرد. با توجه به بالا بودن هزینه بخش پروتئینی جیره دام‌ها، ریز جلبک‌ها می‌توانند ازنظر اقتصادی جایگزین‌های طبیعی برای مکمل‌های پروتئینی همچون کنجاله سویا در جیره‌هایی با قیمت رقابتی باشند. در میان تمام اسیدآمینه‌های خوراک، لیزین و متیونین اولین و دومین اسیدهای آمینه محدودکننده هستند. اغلب گونه‌های ریز جلبکی حاوی مقادیر نسبتاً بالایی از لیزین هستند، اما تا حدودی از لحاظ اسیدآمینه‌های گوگرددار مانند سیستئین و متیونین کمبود دارند. هدف از آزمایش حاضر، بررسی میزان پروتئین و ترکیبات شیمیایی دو گونه ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا*، میزان تجزیه‌پذیری نیتروژن به روش *Invitro* و بخش‌های مختلف پروتئین آن‌ها در سیستم کرنل (CNCPS) بود.

مواد و روش‌ها: بدین منظور، پس از کشت و برداشت دو گونه ریز جلبکی مذکور در آزمایشگاه و انجام آزمایش‌های بررسی میزان ترکیبات ماده خشک، خاکستر، پروتئین خام و تعیین الگوی اسیدآمینه، ارزیابی تجزیه‌پذیری نیتروژن و پروتئین عبوری در ساعات ۸، ۱۲ و ۲۴ انکوباسیون و تعیین بخش‌های مختلف پروتئین دو گونه ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* به روش سیستم کربوهیدرات و پروتئین خالص کرنل انجام گرفت. در این تحقیق برای برآورد ضرایب تجزیه‌پذیری نیتروژن از مایع شکمبه سه رأس گوساله نر اخته هلشتاین فیستولا دار با میانگین وزن ۴۰±۴۸۰ کیلوگرم و سن ۲ سال استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده این بود که دو گونه ریز جلبکی ازنظر درصد پروتئین خام، چربی و NSC باهم تفاوت داشتند ($P<0.05$). نتایج حاصل نشان داد *نانوکلروپسیس اکولاتا* دارای ۳۷ درصد و *آیزوکرایسیس گالبانا* دارای ۳۲ درصد پروتئین خام هستند. نسبت درصد اسیدآمینه ضروری به غیرضروری در ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* ۱۸/۷۹ و در *نانوکلروپسیس اکولاتا* ۲۸/۸ درصد بود ($P<0.05$). درصد تجزیه‌پذیری نیتروژن در شرایط *Invitro* در ساعات ۸، ۱۲ و ۲۴ انکوباسیون بین دو

ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* به ترتیب ۴۴، ۵۳ و ۴۸ درصد و در *نانوکلروپسیس اکولاتا* ۳۵، ۴۰ و ۳۸ درصد بود ($P<0.05$). درصد پروتئین عبوری در ساعات ۸، ۱۲ و ۲۴ انکوباسیون در ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* به ترتیب ۵۶، ۴۷ و ۴۲ درصد و در ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* ۶۵، ۶۰ و ۶۲ درصد بود. بخش‌های A ,B_1, B_2, B_3 و C در *آیزوکرایسیس گالبانا* به‌ترتیب ۱۰/۰۷، ۱۹/۹، ۵۵/۱۳، ۶/۱ و ۸/۸ و در *نانوکلروپسیس اکولاتا* به‌ترتیب ۱۵/۱۶، ۱۶/۶۴، ۵۴/۹۸، ۵/۶۵ و ۸/۸ و درصد پروتئین خام بود و بخش‌های A و C بین دو گونه ریز جلبکی معنی‌دار شد ($P<0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر بیانگر این بود که با توجه به میزان چربی خام، پروتئین خام، درصد نیتروژن تجزیه‌شده در شرایط *Invitro* و پروتئین عبوری در گونه‌های ریز جلبکی *نانوکلروپسیس اکولاتا* و *آیزوکرایسیس گالبانا* به نظر می‌رسد این ریز جلبک‌ها دارای ارزش تغذیه‌ای مناسب برای استفاده در خوراک دام هستند.

استناد: صالحیان، ز.، خلیل وندی بهروزیار، ح.، پیرمحمدی، ر.، احمدی فرد، ن.، الماسی، هـ (۱۴۰۱). تعیین ارزش غذایی پروتئین دو گونه ریز جلبک آیزوکرایسیس گالبانا (*Isochrysis galbana*) و نانوکلروپسیس اکولاتا (*Nannochloropsis oculata*) مورداستفاده در تغذیه دام. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۰ (۲)، ۱۸-۱.

DOI: 10.22069/ejrr.2022.19617.1810

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

جلبک‌ها گروهی متفاوت از موجودات زنده هستند که به دو گروه ریز جلبک‌ها (میکروالگ‌ها)[1] و ماکرو جلبک‌ها[2] تقسیم می‌شوند. آن‌ها منابع مهم ویتامین، مواد معدنی، پروتئین، اسید چرب غیراشباع و آنتی‌اکسیدان هستند (۳۱). امروزه استفاده از آبزی‌پروری و بخصوص کشت ریز جلبک‌ها به‌سرعت در حال افزایش بوده و افزایش شناخت از ترکیبات شیمیایی ریز جلبک‌ها، ازجمله پروتئین‌ها و الگوی اسیدهای چرب و اسیدآمینه‌های آن‌ها، می‌تواند امکان غربالگری مؤثر به‌منظور توسعه کشت گونه‌های مناسب ازنظر تغذیه‌ای و اقتصادی را فراهم نماید. از سویه‌های مناسب ریز جلبک‌ها می‌توان پس از بهینه‌سازی شرایط کشت در مقیاس بزرگ و همچنین روش‌های مناسب استحصال و استخراج، برای تولید منابع باارزش پروتئین و اسیدهای چرب غیراشباع زنجیر بلند می‌توان استفاده کرد (۱۳، ۳۶، ۴۰).

پروتئین گران‌ترین ماده مغذی در خوراک دام محسوب می‌شود و ریز جلبک‌ها می‌توانند ازنظر اقتصادی جایگزین‌های مناسبی برای کنجاله سویا در جیره غذایی باشند (۲). در میان تمام اسیدآمینه‌های خوراک، لیزین و متیونین اولین و دومین اسیدهای آمینه محدودکننده هستند. اغلب گونه‌های ریز جلبکی حاوی مقادیر نسبتاً بالایی از لیزین هستند، اما تا حدودی از لحاظ اسیدآمینه‌های گوگرددار مانند سیستئین و متیونین کمبود دارند (۳). از جلبک‌ها به‌عنوان منابع مکمل پروتئینی نیز استفاده می‌شود. نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهد استفاده از برخی منابع جلبکی دارای سطح پروتئین بالا مانند جلبک *کلرلا*[3] و *سندسموس*[4] در بسیاری از موارد سبب بهبود افزایش وزن روزانه در جوجه‌ها و خوک شده است (۹، ۱۲). علاوه بر امکان استفاده از گونه‌های ریز جلبکی به‌صورت کامل، می‌توان از زیست‌توده بدون چربی گونه‌های ریز جلبک حاصل از فرآیند تولید سوخت‌های زیستی، به‌عنوان جایگزین دانه ذرت و کنجاله سویا در جیره‌های خوراک طیور، خوک و گاو استفاده کرد (۱۸، ۲۵). افزایش جمعیت جهانی منجر به توسعه روش‌های کشف منابع جایگزین انرژی و غذا شده است؛ زیرا دانه ذرت و کنجاله سویا محصولات اصلی غذایی برای انسان هستند و استفاده از آن‌ها به‌عنوان منبع اصلی انرژی و پروتئین در جیره دام، به‌طور مستقیم با مصرف انسان رقابت می‌کنند (۲۴،۳۵، ۴۷).

با افزایش قیمت پودر و روغن ماهی، تمایل بیشتری به جایگزینی جزئی یا کامل پودر ماهی توسط دیگر منابع پروتئینی با منشأ حیوانی یا گیاهی وجود دارد. مواد اولیه غیر از پودر ماهی به دلیل ارزش غذایی، تعادل اسیدهای آمینه، قابلیت هضم پروتئین‌ها، لیپیدها و کیفیت اسیدهای چرب، عدم وجود فاکتورهای ضد تغذیه‌ای، در دسترس بودن و هزینه انتخاب شده‌اند و دراین بین زیست‌توده جلبکی غنی از لیپید یکی از موارد در نظر گرفته‌شده توسط کارشناسان تغذیه دام و آبزیان مواد جایگزین در آینده است (۲۶،۴۱). ریز جلبک‌ها به‌عنوان موجودات یوکاریوت تک‌سلولی فتوسنتز کننده، حاوی اسیدهای نوکلئیک هستند و مقدار پروتئین آن‌ها در گونه‌های مختلف ریز جلبکی از ۱۰ تا بیش از ۶۰ درصد (مانند *اسپیرولینا*) گزارش‌شده است (۲،۳۰). مطالعات گذشته نشان می‌دهد که گونه ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* دارای رشد بالایی است و ازنظر ترکیبات شیمیایی دارای دامنه ۴۶/۸۱-۴۱/۵۳ درصد پروتئین، ۲۲/۵۴ درصد چربی، ۲۲/۵۴ درصد کربوهیدرات و ۸/۴ درصد خاکستر است. ریز جلبک

1. Microalgae
2. Macroalgae
3. *Chlorella*
4. *Scenedesmus sp.*

نانوکلروپسیس اکولاتا نیز دارای ۳۱/۲ درصد وزن خشک پروتئین، ۳۶ درصد چربی، ۴ درصد NDF و ۴/۱ درصد ADF و نیز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است (۴، ۱۵،۳۰).

در حال حاضر مطالعات تغذیه‌ای که جلبک‌ها را به‌عنوان ماده اصلی خوراک دام‌های پرورش‌یافته ارزیابی می‌کنند، بسیار محدود است. از طرفی با توجه به شرایط اقتصادی کشور و میزان واردات مواد پروتئینی مورد مصرف در تغذیه دام و هزینه‌بر بودن آن‌ها برای دامداران، به نظر می‌رسد بررسی استفاده از گونه‌های ریز جلبکی که دارای قابلیت تولید پروتئین با قیمت تمام‌شده مناسب برای مصرف در بخش خوراک دام باشد ضروری به نظر می‌رسد. لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی ترکیب شیمیایی دو گونه ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* ازنظر ارزش پروتئینی و بررسی الگوی اسیدآمینه، قابلیت هضم پروتئین آن به روش‌های مختلف و معرفی این گونه‌های ریز جلبکی به کارشناسان تغذیه دام و استفاده از آن‌ها در صنعت خوراک دام بود.

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش و تهیه جلبک: تحقیق حاضر در ایستگاه دام‌پروری، آزمایشگاه کشت جلبک و آزمایشگاه تغذیه دام گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، انجام گرفت. آزمایش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. شرایط کشت ریز جلبک‌های *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* ازنظر مواد مغذی موردنیاز، دما، نور و درجه شوری (۲۴ گرم در لیتر) یکسان بود. محیط کشت Conway مورداستفاده برای تغذیه ریز جلبک‌ها شامل: ترکیبات کلرید آهن ۱/۳، کلرید منگنز ۰/۳۶، اسید بوریک ۳۳/۶، EDTA ۴۵، ارتوفسفات سدیم ۲۰، نیترات سدیم ۲۰، کلرید روی ۴/۲، کلرید کبالت ۴، سولفات مس ۴، ویتامین B_1 ۲، ویتامین B_{12} ۰/۲ و بیوتین ۰/۰۰۲ گرم بر لیتر بود. سیستم نوردهی و هوادهی نیز به‌صورت مداوم و ۲۴ ساعته انجام شد. برداشت ریز جلبک‌ها پس از رسیدن آن‌ها به مرحله فاز رشد لگاریتمی انجام گرفت و پس از خشک‌کردن ریز جلبک‌ها ترکیب شیمیایی آن‌ها اندازه‌گیری شد.

تعیین ترکیب شیمیایی ریز جلبک‌ها: پس از برداشت ریز جلبک‌ها با دستگاه سانتریفیوژ، در آون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند (۳۸). مقدار ماده خشک، خاکستر (با استفاده از اسید نیتریک ۵۰ درصد)، پروتئین (کلدال) به روش AOAC (2000) ، عصاره اتری با استفاده روش تصحیح‌شده (۵) و مقدار NDF نیز به روش ون سوست (۱۹۹۱) اندازه‌گیری شد (۱، ۵، ۴۵). مقدار کربوهیدرات‌های غیر الیافی (بر اساس درصدی از ماده خشک) نیز مطابق با معادله شماره (۱) محاسبه شد:

$$NSC = 100 - (CP\% + EE\% + NDF\% + Ash\%)$$

معادله شماره (۱)

اندازه‌گیری تجزیه‌پذیری نیتروژن: با توجه به اینکه در این آزمایش اندازه ذرات ریز جلبک‌های *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* در حد ۶-۴ میکرومتر بود لذا استفاده از روش کیسه گذاری و بررسی تجزیه‌پذیری پروتئین با روش مذکور، مقدور نبود. برای این منظور اندازه‌گیری تجزیه‌پذیری نیتروژن مطابق با روش راب و همکاران (۱۹۸۳) انجام گرفت (۳۴). در این تحقیق برای بررسی تجزیه‌پذیری نیتروژن، از مایع شکمبه سه رأس گوساله نر اخته هلشتاین با میانگین وزن ۴۰±۴۸۰ کیلوگرم و سن ۲ سال استفاده شد. در این روش از ۰/۲ گرم نشاسته (به‌عنوان منبع کربوهیدراتی)، نمونه ریز جلبک (به‌اندازه‌ای انتخاب شد که ۲۶ میلی‌گرم پروتئین خام داشته باشد) به‌عنوان ماده خوراکی و ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه استفاده شد. میزان گاز تولیدی در ساعات ۸،

۱۲ و ۲۴ انکوباسیون اندازه‌گیری، ثبت و در ساعات مذکور، نمونه جهت اندازه‌گیری میزان نیتروژن آمونیاکی برداشته شد. مایع شکمبه قبل از مصرف وعده غذایی صبح گوساله‌های نر، جمع‌آوری و در فلاکس محتوی گازکربنیک سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد. پس از صاف نمودن شیرابه شکمبه، شیرابه و بافر (محلول‌های ماکرومینرال، میکرومینرال، احیاکننده، بافر و ریسوزارین) مطابق روش (منک و همکاران،۱۹۷۹) و روش تصحیح‌شده (منک و اسینگاس، ۱۹۸۸) استفاده شد (۲۸، ۲۹). به‌منظور تعیین میزان گاز تولیدی در آزمایشگاه از روش تعیین فشار گاز تولیدی بر اساس روش (منک و اسینگاس، ۱۹۸۸) با استفاده از فشارسنج دیجیتالی (تئودورو و همکاران، ۱۹۹۴) در دو دور مجزا و سه تکرار به ازای هر نمونه در هر دوره استفاده شد (۲۸،۴۳). فشار گاز تولیدی در ساعات ۸، ۱۲ و ۲۴ انکوباسیون قرائت و ثبت شد. حجم گاز تولیدی در شیشه‌های حاوی نمونه ماده خوراکی در هر زمان توسط رابطه‌ی رگرسیونی بین حجم و فشار گاز محاسبه و از بسته نرم‌افزار آماری SAS ۹/۴ و رویه NLIN به‌منظور محاسبه داده از معادله‌ی (۲) استفاده شد.

معادله شماره (۲) $P= b (1-e^{-ct})$

میزان تولید گاز در زمان t، b میزان تولید گاز بخش غیرمحلول، c: نرخ تولید گاز و t: زمان انکوباسیون بود.

برای اندازه‌گیری میزان نیتروژن آمونیاکی در تمامی ساعات انکوباسیون پس از برداشت، نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری در فریزر قرار داده شدند. نیتروژن آمونیاکی به روش (برودریک و کانگ،۱۹۸۰) و پروتئین عبوری (RUP)، با استفاده از رگرسیون خطی (معادله y=0.1818x+2.6336 با ضریب R^2=0.9756 برای *نانوکلروپسیس اکولاتا* و y=0.1654+1.2621 با ضریب R^2=99.24 برای ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا*) بر اساس مقادیر تولید گاز و نیتروژن آمونیاکی نمونه‌ها با و بدون افزودن مخلوط کربوهیدرات محاسبه شد (۷، ۳۴، ۴۶). نیتروژن تجزیه‌شده نیز با استفاده از روش راب و همکاران (۱۹۸۳) طبق معادله شماره ۳ محاسبه شد (۳۴).

معادله شماره (۳)

IVDN=(A-(A-B)/(C-D) ×C –(NH_3-N of blank))/ total N of feeding stuff incubated

IVDN: نیتروژن تجزیه‌شده در شرایط *Invitro*: A: میلی‌گرم نیتروژن آمونیاکی بعد از ساعت انکوباسیون وقتی منبع کربوهیدراتی به آن اضافه نشده است؛ B: میلی‌گرم نیتروژن آمونیاکی بعد از ساعت انکوباسیون همراه با منبع کربوهیدراتی؛ C: میلی‌لیتر گاز تولیدی در ساعت انکوباسیون زمانی که فاقد منبع کربوهیدراتی است؛ D: میلی‌لیتر گاز تولیدی در ساعت انکوباسیون همراه با منبع کربوهیدراتی

بخش‌های مختلف پروتئین بر اساس روش CNCPS:

برای تعیین بخش‌های متفاوت قسمت‌های پروتئین هر دو گونه ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* بر اساس روش کرنل (CNCPS) از روش توصیه‌شده لیسترا و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد (۲۳). در این آزمایش از هر دو نمونه ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* و از هر نمونه سه زیر نمونه و از هر زیر نمونه سه تکرار برای آزمایش در نظر گرفته شد. بخش B_1 جزء با تجزیه‌پذیری سریع است و به همراه بخش A در بافر بورات–فسفات، محلول است. بخش B_2 ترکیبات نیتروژن دار محلول در شوینده خنثی است که بخشی از آن عبور کرده و بخشی نیز در شکمبه تجزیه می‌شود که این پدیده بستگی به نرخ عبور از شکمبه دارد. بخش B_3 نیز ترکیبات نامحلول در شوینده خنثی و محلول در شوینده اسیدی است که تجزیه‌پذیری کمی در شکمبه دارد. درنهایت بخش C که در شوینده اسیدی نامحلول است و بخشی است که

به‌طور کامل از شکمبه عبور می‌کند (۲۳). بر همین اساس با استفاده از بافرهای بورات–فسفات، شوینده خنثی و شوینده اسیدی بخش‌های متفاوت پروتئین بر اساس سیستم کرنل اندازه‌گیری شد. در مطالعه حاضر بخش‌های مختلف پروتئین در سیستم کرنل بر اساس درصدی از پروتئین خام محاسبه شدند (۱۴).

تعیین الگوی اسیدهای آمینه: تعیین الگوی اسیدهای آمینه ریز جلبک‌های *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* در مجتمع آزمایشگاهی سهند آزما در شهرستان مراغه، استان آذربایجان شرقی با استفاده از دستگاه HPLC مدل Shimadzu 20A ساخت کشور ژاپن با مشخصات ستون ZORBAX Eli ZORBAX Eclipse-AAA; Lxi.d= 150×4.5m; 3Lid 15046[USXH0011289]3.5um انجام شد. آماده‌سازی نمونه‌ها با استفاده از روش پایه Huesgen (1999) و روش تصحیح‌شده Sonawane et al. (2015) انجام شد (۱۷، ۴۲). ابتدا ۰/۳ گرم نمونه با ۶ میلی‌لیتر HCL ۶ مولار به مدت ۲۴ ساعت در بن ماری به مدت ۱۱۰ دقیقه هیدرولیز شد. بعد از هیدرولیز شدن، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ و فاز بالایی برداشته و فیلتر شد. عصاره نهایی با NaOH ۱ نرمال خنثی و سپس محلول فوق با آب HPLC با نسبت ۱ به ۱ رقیق شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول فوق به دستگاه تزریق شد. استاندارد مورداستفاده در این آزمایش Amino acid mix17 (sigma Aldrich) بود. پس از تعیین الگوی اسیدآمینه ریز جلبک‌ها اسکور آن‌ها نیز بر اساس نسبت یک اسیدآمینه ضروری به‌کل اسیدآمینه‌های ضروری محاسبه شد.

محاسبات و مدل آماری

در طرح آماری مورداستفاده به‌منظور ارزیابی اثر فرآوری بر تولید گاز، علاوه براثر اصلی تیمار، اثر دور انجام آزمون (Run) نیز مورد ارزیابی قرار گرفت (معادله شماره ۴). در این طرح در تعیین میزان تولید گاز اثر روزهای مختلف انجام آزمون و اثر زمان انکوباسیون (ساعت) به‌عنوان عامل تکرارشونده و اثر متقابل زمان انکوباسیون و نوع فرآوری در مدل آماری در نظر گرفته شد (معادله شماره ۵) و در آنالیز آماری با توجه به داده‌های خروجی، ساختار واریانس–کوواریانس نوع اول به‌عنوان بهترین ساختار مورداستفاده قرار گرفت. آنالیز آماری معادله ۴ با استفاده از رویه مدل خطی تعمیم‌یافته و معادله شماره ۵ با استفاده از رویه MIXED نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۴) انجام شد (۳۹). در ارتباط با تمامی معادلات مدل، تصحیح میانگین حداقل مربعات با استفاده از آزمون توکی و مقایسه میانگین‌ها با گزینه PDIFF انجام گرفت و داده‌ها به‌صورت میانگین حداقل مربعات و خطای استاندارد مربوطه در جداول گزارش شدند.

معادله شماره (۴): $Y_{ij}=\mu+T_i+R_j+e_{ij}$

معادله شماره (۵):

$$T_i+It_j+ R_k+ (T\times It)_{ij\ j}+ e_{ij}+ Yij= \mu$$

در این رابطه‌ها Y_i: مشاهده i، μ: میانگین کل مشاهدات، T_i: اثر تیمار، A_j اثر حیوان؛R: اثر نوبت اجرا (روز انجام آزمون)؛ It_j: اثر زمان انکوباسیون؛ TIt_{ij}: اثر متقابل زمان انکوباسیون و نوع فرآوری و e_{ij}: اثر اشتباه آزمایشی بودند.

به‌منظور مقایسه ترکیبات شیمیایی، الگوی اسیدآمینه و بخش‌های مختلف پروتئین بر اساس روش CNCPS در دو گونه‌ی ریز جلبکی *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد (معادله شماره ۶).

معادله شماره (۶): $Y_i = \mu + T_i+ e_i$

در این رابطه Y_i: مشاهده i، μ: میانگین کل مشاهدات، T_i: اثر تیمار و e_i: اثر اشتباه آزمایشی هستند.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی ریز جلبک‌های آیزوکرایسیس گالبانا و نانوکلروپسیس اکولاتا: در مطالعه حاضر بررسی ترکیب شیمیایی دو گونه ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* نشان داد که ماده خشک، خاکستر و NDF بین آن‌ها باهم تفاوت ندارد؛ اما درصد پروتئین خام، عصاره اتری و کربوهیدرات غیر الیافی (NSC) آن‌ها ازنظر آماری باهم معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). در ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* درصد پروتئین خام و عصاره اتری بیشتر از *آیزوکرایسیس گالبانا* بود و درصد NSC در ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* کمتر از ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* بود (P<۰/۰۵) (جدول ۱). زرین‌مهر و همکاران (۲۰۲۰) مشاهده کردند که درصد پروتئین ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* که با محیط کشت والنه (conway) رشد داده‌شده است در تیماری که حاوی ۳۶ گرم نیترات سدیم در ترکیب محیط کشت بوده است در مقایسه با تیمار بدون نیترات سدیم به ترتیب ۳۶/۳ و ۱۷/۱ درصد بوده است (۴۹). در آزمایش حاضر نیز میزان نیترات سدیم به‌کاررفته در محیط کشت والنه ۲۰ گرم در لیتر بود و پروتئین ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* به ترتیب ۳۲ و ۳۷ درصد بود. در تحقیقی که روی ریز جلبک‌های *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* با محیط کشت F/2 کشت داده شدند میزان پروتئین گزارش‌شده ۲/۵ و ۲۱ درصد برای *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* گزارش‌شده است (۴). درصد چربی تولیدی گزارش‌شده برای گونه‌های *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* در دامنه ۳۳-۲۵ و ۶۰-۳۷ درصد از ماده خشک گزارش‌شده است (۲۷). درصد کربوهیدرات ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* در شرایط کشت با بیشترین غلظت فسفر ۲۳/۵ درصد وزن خشک گزارش‌شده است (۴۸). درصد کربوهیدرات موجود در ساختار ریز جلبک‌های *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* به‌ترتیب ۱۲/۹ و ۷/۸ (درصد ماده خشک) گزارش‌شده است (۱۶). یکی از عوامل تأثیرگذار بر ترکیبات ریز جلبک‌ها شرایط کشت آن‌ها مانند درجه شوری، نوردهی، دما، pH و ترکیبات محیط کشت است که بر میزان زیست‌توده ریز جلبک، چربی، پروتئین و الگوی اسید چرب و اسیدآمینه آن‌ها تأثیرگذار است (۶). در مطالعه حاضر نیز درصد پروتئین خام، چربی و کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی بین دو گونه *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* متفاوت بود و با توجه به اینکه شرایط کشت برای هر دو ریز جلبک یکسان بود بنابراین می‌توان گفت تفاوت‌های بین‌گونه‌ای بین آن‌ها سبب تفاوت ترکیبات داخل سلولی شده است. از طرفی ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* نسبت به *آیزوکرایسیس گالبانا* دارای درصد بیشتری پروتئین و چربی بود درنتیجه دور از انتظار نبود که مقدار کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی کمتری نسبت به *آیزوکرایسیس گالبانا* داشته باشد.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی گونه‌های ریز جلبکی مورداستفاده در این آزمایش (درصد ماده خشک)

Table 1 - Chemical composition of the tested microalgae species in this experiment (%DM)

	آیزوکرایسیس گالبانا *I.galbana*	*نانوکلروپسیس اکولاتا* *N.oculata*	SEM	p-Value
ماده خشک Dry matter	96	97	0.0353	0.2000
خاکستر Ash	12	12	0.141	0.5000
پروتئین خام Crude protein	32[b]	37[a]	0.07	0.0130
عصاره اتری Ether extract	36.3[b]	39.05[a]	0.035	0.0116
NDF[۱]	3.50	4.30	0.353	0.3000
NSC[۲]	16.20[a]	7.65[b]	0.311	0.0317

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

Different superscripts within a row indicate a significant difference (P<0.05).

۱: الیاف نامحلول در شوینده خنثی؛ ۲: کربوهیدرات غیر ساختمانی

1: Neutral detergent fibers; 2: Non-structural carbohydrates

الگوی اسیدهای آمینه: نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر نشان داد دو گونه ریز جلبکی *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* ازنظر غلظت اسیدآمینه‌های آرژنین، هیستیدین، لوسین، متیونین، اسید آسپارتیک، اسید گلوتامیک و پرولین باهم تفاوت دارند (P<۰/۰۵). اسیدآمینه‌های آرژنین و لوسین در ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* بیشتر از *نانوکلروپسیس اکولاتا* بود. هیستیدین، متیونین، اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک نیز در ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* با تفاوت معنی‌داری بیشتر از *آیزوکرایسیس گالبانا* بود (P<۰/۰۵). درصد اسیدآمینه‌های ضروری و نسبت درصد اسیدآمینه‌های ضروری به غیرضروری در ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* بیشتر از *نانوکلروپسیس اکولاتا* شد. همچنین درصد اسیدآمینه‌های غیرضروری به ضروری در ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* بیشتر از *آیزوکرایسیس گالبانا* بود (P<۰/۰۵) (جدول ۲). علاوه بر این در مطالعه حاضر اسکور اسیدآمینه بر اساس نسبت یک اسیدآمینه ضروری به مجموع کل اسیدآمینه‌های ضروری محاسبه شد. اسکور اسیدآمینه آرژنین در ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* با تفاوت معنی‌داری بیشتر از ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* بود (P<۰/۰۵)؛ اما اسکور اسیدآمینه برای سایر اسیدآمینه‌های ضروری بین دو گونه ریز جلبکی ازنظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۳).

در گزارش پاتیل و همکاران (۲۰۰۷) ترکیبات اسیدآمینه‌های ضروری ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* شامل آرژنین، هیستیدین، والین، لیزین، تریپتوفان، ایزولوسین، لوسین، ترئونین، فنیل آلانین و متیونین بیان شده است (۳۲).

جدول ۲- بررسی الگوی اسیدآمینه‌های ریز جلبک‌های موردمطالعه

Table 2- Amino acid profiles of the studied microalgaes

p-Value	SEM	*نانوکلروپسیس اکولاتا* *N.oculata*	*آیزوکرایسیس گالبانا* *I.galbana*	
				درصد اسیدآمینه‌های ضروری (EAA) essential amino acids
0.03	0.053	71.82[b]	73.34[a]	آرژنین Arg
0.0008	0.003	5.17[a]	1.26[b]	هیستیدین His
0. 5	0.035	ND	5.35	ایزولوسین Iso
0.006	0.028	3.37[b]	7.47[a]	لوسین Leu
0.0005	0.0035	7.85[a]	1.38[b]	متیونین Met
0.1	0.007	ND	6.13	ترئونین Thr
0.5	0.003	1.05	ND	والین Val
				درصد اسیدآمینه‌های غیرضروری (NEAA) non-essential amino acids
0.01	0.056	6.07[a]	1.24[b]	اسید آسپارتیک Asp
0.002	0.007	4.7[a]	2.46[b]	اسید گلوتامیک Glu
0.5	0.014	ND	1.35	پرولین Pro
0.008	0.051	89.23[b]	94.94[a]	TEAA%[1]
0.007	0.06	10.77[a]	5.06[b]	TNEAA%[2]
0.015	0.176	8.28[b]	18.79[a]	TEAA/TNEAA%

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

Different superscripts within a row indicate a significant difference (P<0.05).

۱ مجموعه اسیدآمینه‌های ضروری ۲ مجموعه اسیدآمینه‌های غیرضروری

1:Total essential amino acids. 2:Total non-essential amino acid

احتمالاً تفاوت در شناسایی برخی از اسیدآمینه‌ها در تحقیق حاضر با گزارش پاتیل و همکاران (۲۰۰۷) به علت روش به‌کاربرده شده در بررسی شناسایی و الگوی اسیدآمینه است (۳۲). کیفیت پروتئین با روش‌های متفاوت سنجیده می‌شود. ازجمله آن‌ها می‌توان به ارزش بیولوژیکی و اسکور اسیدهای آمینه اشاره کرد که هردو تحت تأثیر اسیدآمینه‌های ضروری هستند. این اسیدهای آمینه ضروری به‌عنوان منبع نیتروژن برای تولید و ساخت اسیدآمینه‌های غیرضروری استفاده می‌شوند. اسیدآمینه‌های ضروری شامل: آرژنین، لوسین، ایزولوسین، والین، لیزین، ترئونین، تریپتوفان، متیونین، فنیل آلانین و هیستیدین هستند (۴۷). افزایش میزان اسیدآمینه‌های ضروری موجود در پروتئین موجب بالا رفتن ارزش بیولوژیکی یا کیفیت آن خواهد شد. در این مطالعه نیز بررسی ۷ اسیدآمینه ضروری بین دو گونه ریز جلبکی نشان داد که نسبت کل اسیدآمینه‌های ضروری به غیرضروری در *آیزوکرایسیس گالبانا* بیشتر از *نانوکلروپسیس*

اکولاتا بود. با توجه به نتایج این آزمایش در بررسی تعدادی از اسیدآمینه‌های ریز جلبک‌های *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* این نتیجه نشان‌دهنده ارزش کیفیت پروتئین بیشتر در *آیزوکرایسیس گالبانا* نسبت به *نانوکلروپسیس اکولاتا* است.

جدول ۳- اسکور اسیدآمینه ریز جلبک‌ها

Table 3- Amino acid score of microalgaes

اسکور اسیدآمینه Amino acid score[1]	*آیزوکرایسیس گالبانا* *I.galbana*	*نانوکلروپسیس اکولاتا* *N.oculata*	SEM	p-Value
آرژنین Arg	0.51[b]	0.55[a]	0.0007	<0.0001
هیستیدین His	0.025	0.13	0.042	0.317
ایزولوسین Iso	0.125	ND	0.045	0.305
لوسین Leu	0.165	0.09	0.0247	0.278
متیونین Met	0.030	0.20	0.0671	0.316
ترئونین Thr	0.135	ND	0.053	0.322
والین Val	ND	0.025	0.01	0.344

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

Different superscripts within a row indicate a significant difference (P<0.05).

۱: نسبت یک اسیدآمینه ضروری به‌کل اسیدآمینه‌های ضروری

1:Ratio of one essential amino acid to the total of essential amino acids

تجزیه‌پذیری نیتروژن در شرایط *In vitro* و پروتئین عبوری: در مطالعه حاضر نیتروژن تجزیه‌شده در شرایط *Invitro* (IVDN) و عبوری بین دو گونه مختلف ریز جلبکی *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* در ساعات مختلف انکوباسیون باهم معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). درصد نیتروژن تجزیه‌شده در ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* در تمامی ساعات انکوباسیون بیشتر از *نانوکلروپسیس اکولاتا* بود. پروتئین عبوری نیز در تمامی ساعات انکوباسیون در ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* بیشتر از *آیزوکرایسیس گالبانا* نشان داده شد (P<۰/۰۵) (جدول ۴).

پروتئین مورد مصرف دام شامل دو بخش قابل‌تجزیه و غیرقابل‌تجزیه است (۳۶). پروتئین قابل‌تجزیه در شکمبه توسط میکروارگانیسم‌ها مصرف و به پروتئین میکروبی تبدیل می‌شود سپس با ورود به روده کوچک مورداستفاده دام قرار می‌گیرد. پروتئین غیر قابل‌تجزیه نیز با عبور از تجزیه شکمبه‌ای می‌تواند وارد روده شده و بعد از هضم آنزیمی روده‌ای مورد مصرف حیوان قرار گیرد (۳۷). پودر ماهی یکی از منابع پروتئینی مورد استفاده در خوراک دام است که درصد تجزیه‌پذیری پروتئین آن بین ۳۰ تا ۴۰ درصد در شکمبه است (۸). در این مطالعه نیز درصد تجزیه‌پذیری نیتروژن در ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* نزدیک به مقادیر گزارش‌شده برای پودر ماهی بود. از کنجاله سویا به‌عنوان منبع پروتئینی و انرژی در خوراک دام استفاده می‌شود که بیشترین بخش پروتئین آن در شکمبه تجزیه می‌شود (۲۲). یکی از اصلی‌ترین

عوامل تأثیرگذار بر تجزیه پروتئین در محیط شکمبه تأمین میزان انرژی (کربوهیدرات) و نیتروژن موردنیاز برای رشد میکروارگانیسم‌ها و مخصوصاً باکتری‌های پروتئولیتیک در شکمبه است. با توجه به اینکه در ساختار ریز جلبک‌های *آیزوکرایسیس گالبانا* درصد کربوهیدرات غیر ساختمانی بیشتر از *نانوکلروپسیس اکولاتا* بود، احتمالاً همین عامل سبب محدودیت رشد میکروارگانیسم‌ها و کاهش فعالیت آن‌ها و درنتیجه کاهش تجزیه‌پذیری پروتئین *نانوکلروپسیس اکولاتا* در زمان انکوباسیون نسبت به *آیزوکرایسیس گالبانا* شده است. گزارش سایر محققان بیانگر این است که برخی از اسیدآمینه‌های موجود در ساختار پروتئین سبب استحکام پیوندهای پروتئینی می‌شوند (۳۳) که ازجمله آن‌ها می‌توان به متیونین، اسید گلوتامیک و پرولین اشاره کرد (۲۱). در مطالعه حاضر نیز در الگوی اسیدآمینه هر دو گونه ریز جلبکی اسیدآمینه‌های متیونین و اسید گلوتامیک وجود داشتند اما درصد آن‌ها در ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* بیشتر از *آیزوکرایسیس گالبانا* بود. به نظر می‌رسد الگوی اسیدآمینه و ترکیب آن‌ها بر تجزیه‌پذیری پروتئین آن تأثیرگذار بوده است.

یکی دیگر از عوامل تأثیرگذار بر میزان قابلیت هضم پروتئین خوراک، میزان چربی و ترکیب اسیدهای چرب آن ماده خوراکی است (۱۰). هر دو گونه ریز جلبکی مورد آزمایش در این تحقیق دارای بیش از ۳۰ درصد چربی هستند. گزارش‌های سایر محققان نیز بیانگر این است که میزان قابل‌توجهی از چربی این گونه‌های ریز جلبکی از نوع غیراشباع است؛ بنابراین احتمالاً چربی موجود در ساختار ریز جلبک‌ها نیز بر فعالیت میکروارگانیسم‌ها تأثیرگذار بوده و با ایجاد خاصیت پوشانندگی یا تأثیر بر فعالیت و زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های هضم‌کننده پروتئین، تجزیه‌پذیری را تحت تأثیر قرار داده است. در این تحقیق نیز ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* که دارای درصد چربی بیشتری نسبت به ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* بود احتمالاً پدیده پوشانندگی توسط اسیدهای چرب (۱۰) این ریز جلبک سبب شده است که نیتروژن بیشتری از دسترس میکروارگانیسم‌ها خارج شوند و میزان پروتئین عبوری آن بیشتر از ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* گردد.

جدول ۴- بررسی میزان نیتروژن تجزیه‌شده و پروتئین عبوری در گونه‌های ریز جلبکی مورداستفاده

Table 4 - IVDN and RUP content of microalgae strains

	زمان انکوباسیون (ساعت) Incubation time (h)	*آیزوکرایسیس گالبانا* *I.galbana*	*نانوکلروپسیس اکولاتا* *N.oculata*	SEM	p-Value
نیتروژن تجزیه‌شده در شرایط *In vitro* (٪ از کل نیتروژن) IVDN (%N)	8	44^{a}	35^{b}	1.968	0. 0231
	12	53^{a}	40^{b}	3.365	0.0467
	24	48^{a}	38^{b}	1.573	0.0064
پروتئین عبوری (%CP) Rumen Undegradable protein (%CP)	8	56^{b}	65^{a}	2.12	0.0301
	12	47^{b}	60^{a}	3.632	0.0411
	24	52^{b}	62^{a}	2.079	0.0232

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

Different superscripts within a row indicate a significant difference (P<0.05)

نتایج به‌دست‌آمده از میزان پروتئین عبوری ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* در ساعت ۸ انکوباسیون مشابه با نتایج ویلد و همکاران (۲۰۱۸) بود (۴۶). در آن مطالعه میزان پروتئین عبوری در ریز جلبک نانوکلروپسیس ۶۹ درصد گزارش‌شده است و در مطالعه حاضر نیز در ساعت ۸ انکوباسیون پروتئین عبوری ۶۵ درصد مشاهده شد. تحقیق علاوه بر این میزان تجزیه‌پذیری نیتروژن و پروتئین عبوری یک ماده خوراکی به درصد پروتئین آن ماده خوراکی نیز بستگی دارد. به‌طوری‌که با افزایش مقدار پروتئین، بخش قابل‌توجهی از آن از دسترس میکروارگانیسم‌ها فرار می‌کند و به شکل پروتئین عبوری از شکمبه خارج می‌شود. در این تحقیق نیز با توجه به اینکه درصد پروتئین ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* بیشتر از *آیزوکرایسیس گالبانا* بود بنابراین در ساعات مختلف انکوباسیون نیز درصد پروتئین عبوری این‌گونه ریز جلبکی بیشتر بوده است. درنهایت می‌توان این‌گونه عنوان نمود که با توجه به این‌که روش مورداستفاده در این پژوهش از غلظت نیتروژن آمونیاکی برای برآورد میزان تجزیه‌پذیری نیتروژن استفاده‌شده است، باگذشت زمان بخشی از نیتروژن آمونیاکی تولیدی در فرآیند ساخت پروتئین میکروبی مورداستفاده قرارگرفته و این امر می‌تواند یکی از عوامل توجیه‌کننده بیشتر بودن میزان تجزیه‌پذیری در ساعت ۱۲ پس از آغاز انکوباسیون نسبت به ساعت ۲۴ باشد. با ادامه یافتن زمان انکوباسیون تا ۲۴ ساعت، علاوه بر ادامه فعالیت تجزیه پروتئین میکروارگانیسم‌ها، محدودیت منابع کربوهیدراتی موجود در ساختار ریز جلبک‌ها سبب کاهش میزان تجزیه‌پذیری باگذشت زمان انکوباسیون شده است (۴۶). با توجه به معنی‌دار بودن تفاوت درصد تجزیه‌پذیری نیتروژن بین دو گونه ریز جلبکی *نانوکلروپسیس اکولاتا* و *آیزوکرایسیس گالبانا* با توجه به نتایج جدول ۱ و کمتر بودن میزان کربوهیدرات‌های ساختمانی در ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* نسبت به *آیزوکرایسیس گالبانا* احتمالاً این عامل نیز یکی از دلایل کاهش مقادیر برآورد شده تجزیه‌پذیری بوده است.

بخش‌بندی پروتئین *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* بر اساس روش کربوهیدرات و پروتئین خالص کرنل CNCPS : بخش‌های نیتروژن غیر پروتئینی (A) و بخش نامحلول در شوینده اسیدی (C) بین دو گونه ریز جلبکی *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* باهم تفاوت معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵) (جدول ۵). بخش A در ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* بیشتر از *آیزوکرایسیس گالبانا* و بخش C نیز در ریزجلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* بیشتر از *نانوکلروپسیس اکولاتا* بود. سایر بخش‌های B_3, B_2, B_1 در این آزمایش بین دو گونه ریزجلبکی با هم اختلاف معنی داری نداشتند. نتایج سایر تحقیقات نشان می‌دهد که کنجاله سویا یکی از منابع پروتئینی مهم با تجزیه‌پذیری بالا در خوراک دام محسوب می‌شود و عواملی مانند نحوه فرآوری و درجه حرارت آن بر تجزیه‌پذیری پروتئین و بخش‌های مختلف آن تأثیرگذار است (۱۹). نتایج فتاح نیا و همکاران (۲۰۱۴) در مورد تجزیه‌پذیری بخش‌های مختلف پروتئین دانه سویا خام نشان‌دهنده این بود که بخش‌های A, B_1, B_2, B_3 و C به‌ترتیب دارای ۳/۲۲، ۵۱/۶۸، ۲۴/۰۸، ۱۴/۴۲ و ۶/۵۸ درصد تجزیه‌پذیری است (۱۱). مقایسه این نتایج بامطالعه حاضر نشان می‌دهد که تجزیه‌پذیری بخش‌های مختلف پروتئین در دانه سویا با ریز جلبک‌های *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* باهم متفاوت هستند. اما بخش B_2 در هر دو گونه ریز جلبکی مشابه کنجاله سویا و بیش از ۵۰ درصد پروتئین خام است.

بالا بودن میزان پروتئین عبوری ماده خوراکی نشان‌دهنده ارزش پروتئینی بالای آن است (۱۶). در این تحقیق نیز بخش B_2 در هر دو نمونه ریز جلبکی بیشتر از ۵۰ درصد بود. بخش B_3 پروتئین، در اکثر مواد خوراکی به‌ویژه پروتئین‌های گیاهی بسیار کم است زیرا این بخش پروتئین به دیواره سلولی متصل شده و در شوینده خنثی نامحلول است (۴۴). علاوه بر این، بخش C یا نامحلول در شوینده اسیدی در *نانوکلروپسیس اکولاتا* کمتر از *آیزوکرایسیس گالبانا* شد و مقدار پروتئین این بخش همانند بخش B_3 کمتر از بخش‌های A, B_1 و B_2 بود. غلظت پروتئین و ساختار چهارگانه آن بر میزان تجزیه‌پذیری پروتئین تأثیرگذار است. احتمالاً تفاوت به وجود آمده در میزان قابلیت هضم پروتئین سریع و متوسط تجزیه شونده بین دو گونه ریز جلبکی در این آزمایش با توجه به شرایط کشت و برداشت یکسان آن‌ها، به تفاوت گونه‌ای، ساختار و ترکیب شیمیایی این ریز جلبک‌ها مرتبط است.

جدول ۵- بررسی الگوی پروتئین بر اساس CNCPS در نمونه‌های ریز جلبک *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا*

Table 5- Study of protein fractions based on CNCPS in samples of *I. galbana* and *N. oculata* microalgae

بخش‌بندی پروتئین براساس درصدی از پروتئین خام (%CP) fractions of protein (%CP)	*آیزوکرایسیس گالبانا* *I. galbana*	*نانوکلروپسیس اکولاتا* *N. oculata*	SEM	p-Value
A%	10.07^b	15.16^a	0.053	0.009
B_1%	19.90	16.64	0.463	0.763
B_2%	55.13	54.98	0.615	0.323
B_3%	6.10	5.65	0.212	0.625
C%	8.80^a	7.57^b	0.007	0.005

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

Different superscripts within a row indicate a significant difference (P<0.05)

A: نیتروژن غیر پروتئینی؛ B_1: پروتئین سریع تجزیه شونده در محلول بافر بورات؛ B_2: ترکیبات نیتروژنی محلول در شوینده خنثی؛ B_3: بخش نامحلول در شوینده خنثی و محلول در شوینده اسیدی؛C : بخش نامحلول در شوینده اسیدی

A: Non-protein nitrogen; B_1: Rapidly degradable protein in borate buffer solution; B_2: Neutral detergent-soluble nitrogenous compounds; B3: Insoluble part in neutral detergent and soluble in acidic detergent; C: Insoluble part in acidic detergent.

A% = A/CP *100; B_1% = B_1/CP*100; B3% = B_3/CP *100; C% = C/CP *100; B_2= 100- (A+B_1+B_3+C).

نتیجه‌گیری کلی

بررسی نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق ما نشان می‌دهد که دو گونه ریز جلبکی *آیزوکرایسیس گالبانا* و *نانوکلروپسیس اکولاتا* دارای درصد پروتئین خام، چربی زیاد و الگوی اسیدآمینه ضروری مناسبی هستند و ازنظر اینکه تقریباً بیش از ۵۰ درصد پروتئین این گونه‌های ریز جلبکی به‌صورت عبوری و غیرقابل‌تجزیه در شکمبه است. بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از این منابع ریز جلبکی به‌عنوان مکمل خوراک در تغذیه دام و طیور بسیار مناسب و ارزشمند باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه بابت تأمین بخشی از هزینه‌های این پژوهش بر اساس طرح پژوهشی دوره دکتری نگارنده اول و از شرکت دانش‌بنیان کیمیا دانش الوند بابت تأمین بخشی از هزینه‌ها بر اساس طرح ارتباط با صنعت مصوب

دانشگاه ارومیه تشکر و قدردانی می‌نمایند. به‌علاوه نویسندگان مراتب کمال تشکر خود را بابت همکاری‌های همه‌جانبه جناب آقای دکتر بهزاد اسد نژاد در مراحل مختلف انجام فرآیند تحقیقاتی عنوان می‌نمایند.

منابع

1. AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. (17th ed.) Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C.
2. Becker, E.W. 2007. Microalgae as a source of protein. Biotechnology Advances, 25: 207-210.
3. Becker, W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition. In Handbook of Microalgal Culture. Edited by Richmond A. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. 312–351.
4. Ben Hafsa, M., Ben Ismail, M., Garrab, M., Aly, R., Gagnon, J. and Naghmouchi, K. 2017. Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and anticholinesterase activities of water-soluble polysaccharides extracted from microalgae *Isochrysis galbana* and N*annochloropsis oculata*. Journal of the Serbian Chemical Society, 82: 509-522.
5. Bligh, E. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37: 911-917.
6. Bos'hagh, F., Rostami, Kh. And Moazemi N. 2019. Biofuel Production from Microalgae. Modares Journal of Biotechnology, 10: 109-123.
7. Broderick, G. A. and 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. Chase, L.E., Pell, A.N., Overton, T.R. and Russel, J.B. 2003. The net carbohydrate and protein system for evaluation herd nutrition and nutrient excretion, Cornel University. USA. 236 pp.
9. Combs, G.F. 1952. Algae (*chlorella*) as a source of nutrients for the chick. Science, 116: 453–454.
10. Devendra, C. and Lewis, D. 1974. The interaction between dietary lipids and fiber in the sheep. Animal Production, 19: 67-76.
11. Fatahnia, F., Mosavi, S. Gh., Abdi, E. and Shokri, A. 2014. Effect of Roasting and Extruding on Nitrogen Fractions and Ruminal Degradability of Soybean Seed Protein. Research on Animal Production, 5: 84-97.
12. Fink, H. Herold, E. 1956. Biological value of the protein of unicellular algae. On the protein value of unicellular algae and of young green leaves of higher plants/A contribution on alimentary liver necrosis of the rat and the treatment of protein deficiency in the tropics. Naturewissenschaften, 42: 516–517.
13. Ghasemi Naghdi, F., Thomas-Hall, S. R., Durairatnam, R., Pratt, S. and Schenk, P.M. 2012. Comparative effects of biomass pre-treatments for direct and indirect transesterification to enhance microalgal lipid recovery. Energy Research, 2: 1-10.
14. Ghoorchi,T. and Arbabi, S. 2010. Study of protein characteristic of five feeds by CNCPS model. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 5: 584-591.
15. Hafezieh, M. 2015. Fatty acids nutritional value of two microalgae *Nannochloropsis oculata and Isochrysis galbana*. Iranian Scientific Fisheries Journal, 24: 135-142.
16. Hafezieh, M. 2017. Utilization of algae in the production of biofuels. Journal of Caspian Sea Aquatic, 2: 11-19. (In Persian).
17. Huesgen, A.G. 1999. Sensitive and reliable amino acid analysis in protein hydrolysates using the HP 1100 Series HPLC, Hewlett-Packard, Technical Note.
18. Isaacs, R., Roneker, K.R., Huntley, M. and Lei, X.G. 2011. A partial replacement of soybean meal by whole or defatted algal meal in diet for weanling pigs does not affect their plasma biochemical indicators [abstract]. Journal of Animal Science, 89: 723-729.

19.Jahani Moghadam, M. and Amanlou, H. 2013. Rumen degradability of xylose-treated soybean meal determined with nylon bag Technique (*in situ*). Animal Production Research, 1: 53- 61.
20.Kamalak. A., Canbolat, O., Gurbuz, Y. and Ozay, O. 2005. *In situ* ruminal dry matter and crude protein degradability of plant- and animal- derived protein sources in Southern Turkey. Small Ruminant Research, 58: 135-141.
21.Klemesrud, M.J., Klopfenstein, T.J. and Lewis, A.J. 1998. Complementary responses between feather meal and poultry by-product meal with or without ruminally protected methionine and lysine in growing calves. Journal of Animal Science, 76: 1970-1975.
22. Krishnamoorthy, U., Muscato,V., Sniffen, C. and Van Soest, P. 1982. Nitrogen fractions in selected feedstuffs. Journal of Dairy Science, 65: 217-225.
23.Licitra, C., Hernandez, T.N. and Van Soest, P.J. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 57: 347-358.
24.Lum, K.K., Kim, J. and Lei, X.G. 2013. Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. Journal of Animal Science and Biotechnology, 4: 1-7.
25.Lum, K.K., Roneker, K.R. and Lei, X.G.2012. Effects of various replacements of corn and soy by defatted microalgal meal on growth performance and biochemical status of weanling pigs . Journal of Animal Science, 90: 701.
26. Lupatsch, I. 2009. Quantifying Nutritional Requirements in Aquaculture – The Factorial Approach. In: Burnell, G. Allan, G. (eds.): New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental Management. Cambridge, pp. 417–439.
27.Ma, X-N., Chen, T-P., Yang, B., Liu, J. and Chen, F. 2016. Lipid Production from *Nannochloropsis*: A Review. Marine Drugs, 14: 1-18.
28.Menke, K.H. and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research Development, 28: 7-55.
29.Menke, K.H., Rabb, L., Saleweski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schnider, W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feed stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *In vitro*. Journal of Agriculture Science (Cambridge), 93: 217-222.
30.Mishra, N. and Mishra, N. 2018. Exploring biologically active metabolites of *Isochrysis galbana* in pharmaceutical interest: An overview. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 9: 2162-2174.
31.Pareek, R. 2016. Algae: The future food supplement: Review. International Journal of Food Agriculture and Veterinary Sciences, 6: 74-77.
32.Patil, V., Ka¨llqvist, T., Olsen, E., Vogt, G. and Gislerød, H.R. 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. Aquaculture International, 15: 1-9.
33.Patterson, P.H., Acar, N. and Coleman, W.C. 1994. Feeding value of poultry by-products extruded with cassava, barley, and wheat middlings for broiler chicks: the effect of ensiling poultry by products as a preservation method prior to extrusion. Poultry Science, 73: 1107-1115.
34.Raab, L., Cafantaris, B., Jilg, T. and Menke, K.H. 1983. Rumen protein degradation and biosynthesis. 1. A new method for determination of protein degradation in rumen fluid *in vitro*. British Journal of Nutrition, 50: 569-582.
35.Renaud, S.M., Parry, D.L., Luong-Van, T. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. Journal of Applied Phycology, 6: 337–345.
36.Reynal, S,M. 2004. Nitrogen utilization by dairy cows. Ph.D. Dissertation. University of Wisconsin, Madison.
37.Roffler, R.E. and Satter, L.D. 1975. Relationship between ruminal ammonia and nonprotein nitrogen utilization by ruminants. II. Application of published evidence to the development

of a theoretical model for predicting non protein nitrogen utilization. Journal of Dairy Science, 58:1889-1898.

38. Ryckebosch, E., Muylaert, K. and Foubert, I. 2012. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. Journal of the American Oil Chemists' Society, 89:189-198.
39. SAS Institute Inc. 2002. Statistical Analysis System (SAS) User's Guide. SAS Institute. Cary. N.C. USA.
40. Sharma, K.K., Schuhmann, H. and Schenk, P.M. 2012. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. Energies, 5: 1532-1553.
41. Shields, R.J. and Lupatsch, I. 2012. Algae for Aquaculture and Animal Feeds. In book: Microalgal Biotechnology: Integration and Economy. Chapter: Algae for aquaculture and animal feeds. Publisher: De Gruyter. Editors: Posten C, Walter C. Swansea University, UK.
42. Sonawane, S.K., Bagul, M.B., LeBlanc, J.G. and Arya, S.S. 2015. Nutritional, functional, thermal and structural characteristics of *Citrullus lanatus* and *Limonia acidissima* seed flours. Journal of Food Measurement and Characterization, 10: 72-79.
43. Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. and France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 48: 185-197.
44. Van Soest, P.J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd Edition, Cornell University Press, Ithaca, 476.
45. Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science, 74: 3583-3597.
46. Wild, K.J., Steingass, H. and Rodehutscord, M. 2018. Variability of *in vitro* ruminal fermentation and nutritional value of cell-disrupted and nondisrupted microalgae for ruminants. Global Change Biol Bioenergy, 00:1–15.
47. World health report (WHO). 2002. Reducing risks, promoting healthy life. Geneva, World Health Organization, 2002.
48. Zarrinmehr, M.J., Farhadian, O., Paykan Heyrati, F. and Keramat, J. 2019. Effect of different phosphorus concentrations on the growth rate and biochemical composition of golden-brown alga *Isochrysis galbana.* Plant Process and Function, 9: 413-424.
49. Zarrinmehr, M.J., Farhadian, O., Paykan Heyrati, F., Keramat, J., Koutra, E., Kornaros, M. and Daneshvar, E. 2020. Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. Egyptian Journal of Aquatic Research, 46: 153–158.