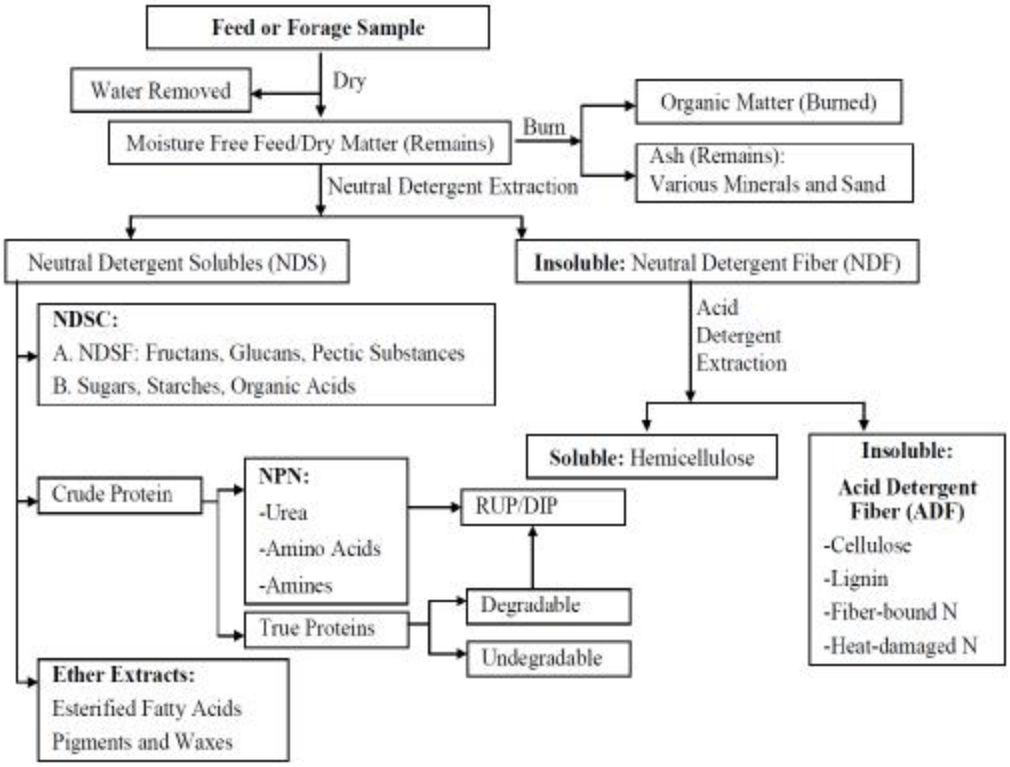
بسمه تعالی

دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

روش های آزمایشگاهی

ابراهیم قاسمی



فهرست

عنوان صفحه

1. **آماده سازی نمونه برای تجزیه فیزیکو شیمیایی** 4

نمونه گیری 4

نگهداری نمونه 4

نمونه جهت آنالیز فیزیکی 4

نمونه جهت تجزیه پذیری شکمبه 4

نمونه جهت تجزیه شیمیایی (پروتئین، چربی، الیاف، و ....) 4

2. **ماده خشک** 5

خشک کردن خوراک های معمول غیرتخمیری با آون 5

خشک کردن خوراک های تخمیر شده و فرار 6

خشک کردن نمونه های IN SITU 6

3. **ماده آلی و خاکستر** 7

4. **اندازه گیری پروتئین خام** 9

مرحله اول: هضم 9

مرحله دوم: تقطیر توسط دستگاه کلدال 9

مرحله سوم: تیتراسیون توسط دستگاه کلدال 9

محاسبات 10

5. **اندازه گیری الیاف (NDF, ADF, ADL)** 11

اندازه گیری NDF 11

اندازه گیری ADF 12

اندازه گیری ADL 12

6. **اندازه گیری عصاره اتری** 14

7. **اندازه گیری بخش بندی پروتئین به روش CNCPS** 15

1. اندازه گیری پروتئین محلول (SP) خوراک 15

2. اندازه گیری بخش پروتئین حقیقی 16

3. اندازه گیری بخش پروتئینی همراه با دیواره سلولی یا B3 و C (NDICP) 16

4. اندازه گیری بخش پروتئینی غیرقابل هضم (C) یا همراه با ADF (ADICP) 17
5. تعیین بخش B2..... 17
8. تعیین قابلیت هضم کل دستگاه گوارش 18
1. اندازه گیری خاکستر نامحلول در اسید 18
2. اندازه گیری خاکستر نامحلول در ADF بعنوان مارکر داخلی 18
9. اندازه گیری تجزیه پذیری شکمبه و هضم پس شکمبه ای 19
تجزیه پذیری شکمبه ایی 19
هضم شکمبه و پس شکمبه ای پروتئین 20

1. آماده سازی نمونه برای تجزیه فیزیکو شیمیایی

نمونه گیری

نمونه گیری بایستی از تمامی مخزن خوراک انجام پذیرد برای اینکار بین 20-10 نمونه از نواحی مختلف به وزن حدود 2-1 کیلوگرم برداشته می شود برای نمونه های تر وزن بیشتری به نسبت در نظر می گیرند.

نگهداری نمونه

نمون های خوراک با رطوبت بیش از 15 درصد بایستی در فریزر نگهداری شوند

نمونه جهت آنالیز فیزیکی

در تجزیه فیزیکی نمونه‌ها بدون فرآیند جهت سنجش بکار می‌روند ولی در تجزیه شیمیایی خوراک‌ها جهت سهولت کار در تعیین سنجه اولین قدم آسیاب نمودن نمونه‌هاست. نمونه جهت تعیین تجزیه فیزیکی (اندازه قطعات و فعالیت انتخاب) بدون خشک کردن و یا آسیاب کردن الک می شوند. همچنین قابل ذکر است جهت تعیین ماده خشک خوراک‌ها بصورت طبیعی (As-fed) نبایستی آنها را آسیاب کرد چرا که مقداری رطوبت با آسیاب کردن از دست می‌رود.

نمونه جهت تجزیه پذیری شکمبه

نمونه های تر بایستی ابتدا در دمای محیط به مدت 2 تا 3 روز با زیرورو کردن خشک شوند. سپس نمونه ها بایستی با توری 2 میلی متری آسیاب شوند و برای تجزیه پذیری شکمبه بکار روند.

نمونه جهت تجزیه شیمیایی (پروتئین، چربی، الیاف، و ....)

نمونه های تر (مانند مدفوع) بایستی در آون جریان دار (Air circulation) در دمای 60 درجه به مدت حداقل 48 ساعت خشک شوند. نمونه سیلاژ ذرت در دمای 50 درجه به مدت حدود 12 ساعت خشک می شود. نمونه خوراکی معمول یا نمونه های تهیه شده بالا سپس با توری 1 میلی متری آسیاب (Wiley mill) شده و برای تجزیه شیمیایی بکار می روند.

جهت تعیین تانن نمونه ها با توری 0/5 میلی متر آسیاب شود.

2. ماده خشک

میزان ماده خشک یا به عبارت دیگر میزان رطوبت یکی سنجه‌های معمول ارزیابی خوراک‌ها در آزمایشگاه تغذیه دام است. مرحله بعد از آماده سازی نمونه‌ها در تجزیه شیمیایی تعیین ماده خشک است. اندازه‌گیری ماده خشک در آزمایشگاه تغذیه عمدتا به منظور تعیین غلظت مواد مغذی بر اساس ماده‌ی خشک صورت می‌گیرد. از مهمترین روش های خشک کردن خوراک ها 1) خشک کردن در آون، 2) خشک کردن با انجماد (Freeze drying)، 3) خشک کردن با خلاء (Vacuum drying) 4) صابونی کردن می توان نام برد. استفاده از آون برای خشکاندن بسیاری از خوراک‌ها کارآمد است ولی برای خوراک‌های حاوی مواد فرار مناسب نیست. مواد فرار معمولا اسیدهای چرب فرار (استات، پروپیونات، بوتیرات و ...) و روغن‌های معطر (منتول، کامفور و ...) می‌باشند و خشک نمودن چنین خوراک‌های به روش‌های معمول باعث اتلاف این مواد و تخمین بالاتر رطوبت می‌شود.

خشک کردن خوراک های معمول غیرتخمیری با آون

از این روش برای تعیین ماده خشک خوراک‌های با ماده خشک بالاتر از 85% استفاده می‌شود

مراحل اندازه گیری ماده خشک با آون

1- وزن ظرف (Wdish)

- تمیز کردن ظروف
- شماره زنی
- خشک کردن در دمای 70-80 درجه سانتیگراد به مدت 0/5 تا 1 ساعت آون گذاری برای ظروف غیر فلزی و در دمای 105 درجه برای ظروف فلزی یا چینی
- توزین ظرف

2- توزین نمونه حدود نصف حجم ظرف (Wsample)، (برای هر خوراک یا تیمار 2 نمونه)

1. خشک کردن در آون در دمای و زمان های

جدول مدت زمان، و درجه حرارت‌های مختلف آون برای خشک نمودن خوراک‌ها				
شماره	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ساعت)	نوع خوراک	رفرنس
1	55	72	نمونه مدفوع	
2	60	48	نمونه‌های با ماده خشک کم ولی بدون مواد فرار کیسه‌های انکوبه شده در شکمبه (In situ)	
2	100	18	خوراک‌های با ماده خشک بالاتر از 85%	MAFF-1, 1986
3	105	16	خوراک‌های با ماده خشک بالاتر از 85%	AOAC, 967.03, 1990
4	105	16	نمونه شیر به میزان 2 میلی لیتر در کروسیبل چینی	AOAC, 967.03, 1990
4	125	3	خوراک‌های با ماده خشک بالاتر از 85%	
5	135	2	خوراک‌های با ماده خشک بالاتر از 85%	AOAC, 930.15, 1990

2. توزین وزن خشک شده نمونه با ظرف پس از سرد شدن در دسیکاتور (Wdry)
3. محاسبه ماده خشک نمونه

$$DM, \% = 100 \times \frac{(Wdry - Wdish)}{Wsample}$$

در زیر نمونه‌ای از محاسبه ماده خشک و غلظت یک ماده مغذی آورده شده است

تکرار	وزن ظرف (Wdish، گرم)	وزن نمونه (Wsample، گرم)	وزن نمونه+ظرف پس از خشکاندن (Wdry)
1	36/14	10/03	45/09
2	28/68	10/44	38/20

درصد ماده خشک تکرار 1 $= \frac{45.09 - 36.14}{10.03} \times 100 = 89/23\%$

درصد ماده خشک تکرار 2 $= \frac{38.2 - 28.68}{10.44} \times 100 = 91/19\%$

میانگین ماده خشک $= \frac{89.23 + 91.19}{2} = 90.21$

انحراف معیار $= 1.39$

ضریب تغییر (CV) $= \left(\frac{1.39}{89.65}\right) \times 100 = 1.54$

خشک کردن خوراک های تخمیر شده و فرار

خشک کردن با خلاء

این روش برای خشکاندن موادی چون گوشت و نمونه‌ی بافت کاربرد دارد

خشک کردن نمونه های In situ

کیسه های انکوبه شده در شکمبه بایستی در دمای 60 درجه به مدت 48 ساعت خشک شوند.

3. ماده آلی و خاکستر

اندازه‌گیری خاکستر با سوزاندن نمونه در دمای 550 تا 600 درجه سانتیگراد بدست می‌آید. از معایب این روش فراریت برخی عناصر مانند سلنیوم، کادمیوم و سرب در چنین دمایی است؛ در چنین شرایطی از روش خاکستر مرطوب برای تعیین عناصر فرار استفاده می‌کنند که از اسید نیتریک و پرکلریک جهت هضم ماده آلی استفاده می‌کنند (اسید پرکلریک خطرناک، نیاز به هود). در برخی موارد هدف از خاکستر نمودن نمونه، تعیین عناصر خاصی است که در مراحل بعد توسط اسپکتروفتومتر یا جذب اتمی تعیین می‌شود. از تفاوت خاکستر از ماده خشک، ماده آلی بدست می‌آید.

1- وزن ظرف (Wdish)

- تمیز کردن ظروف کروسیبل چینی
- شماره زنی
- خشک کردن در دمای 105 درجه به مدت 30 دقیقه و سپس قرار دادن در دسیکاتور
- توزین ظرف

2- توزین نمونه حدود نصف حجم ظرف (Wsample)، (برای هر خوراک یا تیمار 2 نمونه)

4. سوزاندن نمونه در دمای 550 درجه در طول شب (Overnight) در اجاق الکتریکی
5. توزین وزن خشک شده نمونه با ظرف پس از سرد شدن در دسیکاتور (Wash)
6. محاسبه خاکستر و ماده آلی نمونه

$$Ash, \% = 100 \times \frac{(Wash - Wdish)}{Wsample})$$

$$OM, \% = 100 - Ash$$

مثال

تکرار	وزن ظرف (W1، گرم)	وزن نمونه (W2، گرم)	وزن نمونه پس از خاکستر شدن+ظرف (W3)
1	38/73	5/44	39/54
2	28/05	5/82	28/81

درصد خاکستر تکرار 1 $= \frac{39.54-38.73}{5.44} \times 100 = 14/89\%$

درصد خاکستر تکرار 2 $= \frac{28.81 - 28.05}{5.82} \times 100 = 13/06\%$

میانگین خاکستر $= \frac{14.89 + 13.06}{2} = 13.97$

انحراف معیار $= 1.30$

ضریب تغییر (CV) $= \left(\frac{1.30}{13.97}\right) \times 100 = 9.31$

4. اندازه گیری پروتئین خام

اندازه گیری پروتئین خام با استفاده از دستگاه کجلدال طی مراحل هضم، تقطیر و تیتراسیون صورت می گیرد. نمونه با اسید سولفوریک هضم شده و آمونیاک آزاد شده سپس با تقطیر خارج و توسط اسید بوریک جمع آوری می شود و سپس با تیتراسیون میزان آن مشخص می شود.

مرحله اولیه هضم: $Protein+H_2SO_4 \rightarrow CO_2+(NH_4)_2SO_4+SO_2$

مرحله دوم تقطیر: $(NH_4)_2SO_4+2NaOH \rightarrow Na_2SO_4+NH_4OH$

مرحله سوم تیتراسیون: $2NH_4OH+H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4+2H_2O$

مواد مورد نیاز

Catalyst tablet composition: 7 g K_2SO_4, 0.8 g $CuSO_4$

Concentrated sulfuric acid H2SO4 (96-98%).

40% sodium hydroxide solution: • 400 g of NaOH (99%) in 1 L distilled water.

مرحله اول: هضم

کمتر از 0/5 گرم نمونه در کاغذ مخصوص پیچیده و در لوله های هضم قرار داده و دو کاغذ نیز بعنوان بلنک استفاده می شود. یک نمونه استاندارد نیز در کنار کار جهت ارزیابی کار دستگاه در کنار نمونه ها قرار می دهیم. حدود یک قاشق کوچک کاتالیزور به شیشه های هضم اضافه می کنیم و سپس به هر شیشه به مقدار 6/5 میلی اسید سولوفوریک غلیظ اضافه می کنیم. شیشه ها سپس در رک (Rack) مخصوص روی اجاق قرار داده روی آن سرپوش مخصوص قرار داده و پس از روش کردن هود عملیت هضم شروع می شود. نمونه ها بر روی اجاق (420 درجه سانتیگراد) مانده تا رنگ نمونه ها شفاف شوند. سپس دستگاه اجاق خاموش شده و نمونه ها سرد می شوند.

مرحله دوم: تقطیر توسط دستگاه کلدال

با اضافه کردن مقدار 20 میلی لیتر آب مقطر به نمونه آمونیاک با اضافه شدن سود 40 درصد تقطیر شده و در ظرف حاوی اسید بوریک حاوی متیل رد و بروموکروزول گرین جمع آوری می شود.

مرحله سوم: تیتراسیون توسط دستگاه کلدال

هیدروکسید آمونیوم جمع آوری شده توسط اسید سولفوریک 0/01 نرمال تیتر می شود و مقدار N و یا CP خوانده می شود.

محاسبات

Calculations
%N = [1.4007×(Va–Vb)×N]/W
Va: volume of acid used for sample titration
Vb: volume of acid used for the blank
N: Normality of acid
W: sample weight in grams
1.4007: conversion factor milliequivalent weight of nitrogen and N percent
Calculation: Percent Crude Protein (CP)
%CP = %N × F
F = 6.25 for all forages
F = 5.70 for wheat grains
F = 6.38 for milk

5. اندازه گیری الیاف (NDF, ADF, ADL)

اندازه گیری الیاف شوینده خنثی (Neutral detergent fiber) با استفاده از دستگاه آنکوم تعیین می شود. نمونه پس از استخراج مواد محلول (ترکیبات داخل سلولی) بعنوان الیاف شوینده خنثی در نظر گرفته می شود.

اندازه گیری NDF

Neutral Detergent Fiber in Feeds Filter Bag Technique (For A200, A200I)
APPARATUS
1. Analytical Balance—capable of weighing down to 0.1 mg.
2. Oven—capable of maintaining a temperature of 102±2°C.
3. Digestion instrument (ANKOM200, 65 rpm agitation, ANKOM Technology).
4. Filter bags—capable of being heat sealed closed and able to retain 25 micron particles while permitting rapid solution penetration (F57, ANKOM Technology).
5. Heat sealer
6. Desiccator
REAGENTS
1. Neutral Detergent Solution—Add 30.0 g Sodium dodecyl sulfate, USP; 18.61g Ethylenediaminetetraacetic disodium salt, dihydrate; 6.81 g Sodium borate; 4.56 g Sodium phosphate dibasic, anhydrous; and 10.0 ml Triethylene glycol, in 1 L distilled H_2O. Check pH range to 6.9 to 7.1. Agitate and heat to aid solution.
2. Alpha-amylase—Heat-stable bacterial alphaamylase: activity = 17,400 Liquefon Units / ml
3. Sodium sulfite—Na_2SO_3, anhydrous (FSS, ANKOM Technology).
PREPARATION OF SAMPLE
Grind samples in a cutter type (Wiley) mill with a 1 mm screen.
PROCEDURE
1. Weigh filter bag (W1).
2. Weigh 0.45-0.55 g of prepared sample (W2) directly in filter bag. Avoid placing the sample on the upper
4 mm of the bag. Spread the sample uniformly inside the filter bag by shaking and flicking the bag to eliminate clumping.
3. Using a heat sealer, completely seal the upper edge of the filter bag within 4 mm of the top.
Note—Use sufficient heat to completely seal the filter bag and allow enough cool time (2 sec) before removing the bag from the heat sealer.
4. Weigh one blank bag and include in run to determine blank bag correction
5. Pre-extract only samples containing soybean products or >5% fat: Extract samples by placing 24 bags with samples into a container with a top. Pour enough acetone into container to cover bags and secure top. Shake the container 10 times and allow bags to soak for 10 minutes. Repeat with fresh acetone. Pour out acetone and place bags on a wire screen to air-dry. Exception – Roasted soybean: Due to the processing of roasted soy a modification to the extraction is required. Place roasted soy samples into a container with a top. Pour enough acetone into container to cover bags and secure top. Shake the container 10 times and pour off acetone. Add fresh acetone and allow samples to soak for twelve hours. After soak time, pour out acetone and place bags on a wire screen to air-dry.
6. Place a maximum of 24 bags into the Bag Suspender. All nine trays should be used regardless of the number of bags being processed. Place three bags per tray and then stack trays on center post with each level rotated 120 degrees. Insert the Bag Suspender with bags into the fiber analyzer vessel and place the weight on top to keep it submerged.
Note—Prior to inserting the Bag Suspender, if the vessel temperature is warm from a previous run, add cold water and exhaust.
7. When processing 24 sample bags, add 1900- 2000mL of ambient ND solution to the fiber analyzer vessel. If processing less than 20 bags, add 100 ml/bag of ND solution (use minimum of 1500 mL to ensure Bag Suspender is covered). Add 20 g (0.5 g/50mL of ND solution) of sodium sulfite and 4.0 mL of alpha-amylase to the solution in the vessel.
8. Turn Agitate and Heat on and confirm agitation. Set timer for 75 min and close lid.
9. At end of extraction, turn Heat and Agitate off. Open the drain valve (slowly at first) and exhaust hot solution before opening lid.
Note—The solution in the vessel is under pressure. The exhaust valve needs to be opened to release the pressure and solution prior to opening the lid.
10. After the solution has been exhausted, close the exhaust valve and open the lid. Add 1900mL of (70-90°C) rinse water and 4.0 mL of alpha-amylase to the first and second rinses. Turn Agitate on and rinse for 5 min. The lid may be sealed with the Heat on or left open with the Heat off. Repeat hot water rinses a total of three times.
11. When the rinsing process is complete remove the samples. Gently press out excess water from bags. Place bags in a 250 mL beaker and add enough acetone to cover bags and soak for 3-5 min.
12. Remove bags from acetone and place on a wire screen to air-dry. Completely dry in oven at 102±2°C (most ovens will complete drying within 2-4 hrs).
Note—Do not place bags in the oven until acetone has completely evaporated.

13. Remove bags from oven, place directly into a collapsible desiccant pouch and flatten to remove air. Cool to ambient temperature and weigh bags (W3).
Note—Do not use conventional desiccator container.
CALCULATIONS
% NDF =
Where: W1 = Bag tare weight
W2 = Sample weight
W3 = Dried weight of bag with fiber after extraction process
C1 = Blank bag correction (final ovendried weight divided by the original blank bag weight)

اندازه گیری ADF

Acid Detergent Fiber (ADF) in Feeds using Filter Bag Technique
REAGENTS
1. Acid Detergent Solution—add 20g cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) to 1 L 1.00N H2SO4 previously standardized

PROCEDURE

The steps from 1 through 7 are similar as for NDF except for step 8, 10

8. Turn Agitate and Heat ON and confirm agitation. Set timer for 60 min and close lid.
10. After the solution has been exhausted, close the exhaust valve and open the lid. Add 1900-2000mL of (70-90°C) rinse water. Turn Agitate on and rinse for 5 min. The lid may be sealed with the Heat on or left open with the Heat off. Repeat 5 min. hot water rinses a total of three times or until water is neutral pH.
CALCULATIONS
% ADF (as-received basis) =
Where: W1 = Bag tare weight
W2 = Sample weight
W3 = Dried weight of bag with fiber after extraction process
C1 = Blank bag correction factor (final oven-dried weight divided by original weight)

اندازه گیری ADL

Determining Acid Detergent Lignin in DaisyII Incubator
Reagents
Sulfuric acid (72% by weight) – ANKOM Technology FSA72 or dilute reagent grade H2SO4 to a specific gravity of 1634 g/L at 20°C (24.00N) by adding 1200 g H2SO4 to 350 ml H2O in a 1 L MCA volumetric flask with cooling. Standardize this solution to 1634 g/L at 20°C specific gravity by removing solution and adding H2O or H2SO4 as required.

اسید سولفویک 72% (665 میلی لیتر اسید سولفوریک 96% به 300 میلی لیتر آب مقطر اضافه و بعد از سرد شدن به حجم 1 لیتر رسانده شد، وزن مخصوص 1/634)

Apparatus

a) Filtration device – ANKOM Technology – F57 Filter Bags

b) Impulse bag sealer

c) Desiccator

d) ANKOM Technology – DaisyII Incubator

Procedure
1) Grind the sample to pass through a 1 mm screen.

2) Weigh each Filter Bag (W1), record the weight, and tare the balance.

3) Add 0.5 g (±0.05 g) of air-dried sample (W2) directly into each Filter Bag.

4) Weigh and seal one (1) blank bag and include it in the digestion to determine the blank bag correction (C1).

5) Seal the bags closed 4 mm from the open edge using the heat sealer.

6) Spread the sample uniformly inside each filter bag by flicking the bag to eliminate clumping.

7) Perform ADF determinations using Fiber Analyzer (See ADF Procedure).

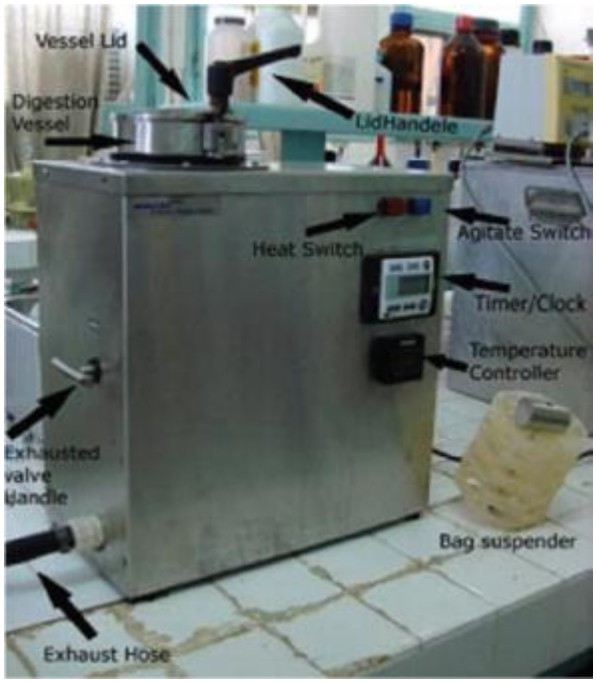
8) After performing ADF determinations, place up to 24 dried bags with samples into a DaisyII Incubator jar, placing half of the samples on one side of the plastic divider and half on the other side.

9) Add 500 ml of 72% H2SO4 to cover the bags.
10) Place jars into the DaisyII Incubator. Turn on only the Rotation switch (do NOT turn the Heat switch on). Leave the door of the DaisyII Incubator open and allow the jars with bags to rotate for 3 hours.

11) After 3 hours pour off the H2SO4 and rinse with tap water to remove all acid.
12) Repeat rinses until pH paper shows neutral color when touching the bags. Rinse with approximately 250 ml of acetone for 3 minutes to remove the water. Handle the bags gently during rinsing. Fine lignin particles can exit the filter if not handled carefully.

13) Dry the bags in an oven at 105C for 2-4 hours.
14) Remove the bags from the oven and place them directly into Desiccant/MoistureStop pouches and flatten to remove air. Cool to ambient temperature and weigh the bags (W3).
15) Prepare each bag for the ash procedure at 525C for 3 hours or until C-free

Calculations
Cellulose = ADF – (ADL + Ash),

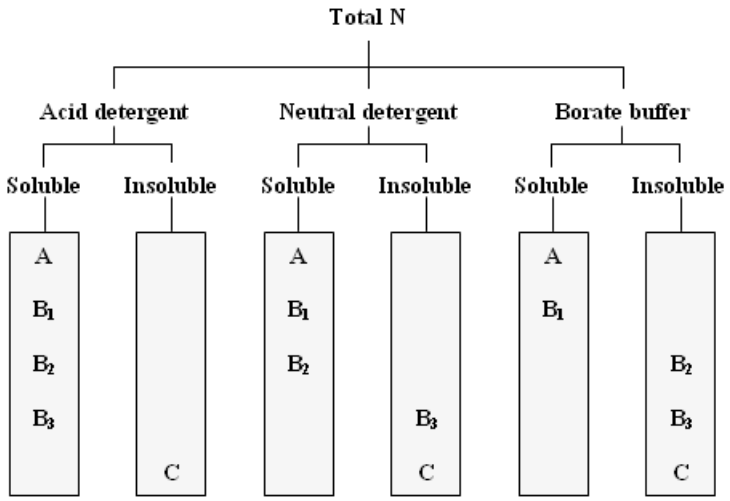


6. اندازه گیری عصاره اتری

چربی خام توسط دستگاه سوکسله توسط اتر استخراج شده و پس از خارج سازی اتر ماده باقیمانده عصاره اتری خواهد بود.

7. اندازه گیری بخش بندی پروتئین به روش CNCPS

در این روش پروتئین خام بر اساس محلولیت در محلول های مختلف (بافر بورات فسفات-تری کلرواستیک اسید-محلول شوینده خنثی و محلول شوینده اسیدی) به پنج بخش تقسیم می شود:



Fractionation of SB protein according to the Cornell net carbohydrate and protein system[a].

Fraction	Protein-fraction	Estimation
SP	Soluble protein	Soluble in borate phosphate buffer
A	NPN (Non-protein N) × 6.25	Soluble in trichloroacetic acid (TCA)
B1	Cell soluble true protein	SP-A
B2	Cell soluble true protein	CP-(A+B1+B3+C)
B3	Cell wall associated true protein	Protein insoluble in neutral detergent but soluble in acid detergent (NDICP-ADICP)
C	Includes heat-damaged protein and nitrogen associated with lignin	Protein insoluble in acid detergent (ADICP)

[a] From Licitra et al. (1996).

1. اندازه گیری پروتئین محلول (SP) خوراک

جهت تعیین بخش محلول از بافر بورات فسفات استفاده می شود، بخش محلول بر اساس این دستورالعمل حاوی بخش های **A** (ازت غیرپروتئینی یا **NPN**) و **B1** یا پروتئین محلول (**soluble protein**) می باشد و بخش نامحلول حاوی بخش های **B2, B3, C** البته بعد از صاف کردن نمونه **CP** بخش نامحلول اندازه گیری می شود و با کم کردن از **CP** کل بخش های **A** و **B1** بدست می آیند.

Recommended procedure for soluble protein (buffer-soluble nitrogen)

Apparatus.

1. Erlenmeyer flask (125 ml>, Whatman #54 or 541 filter paper, analytical balance, waterbath, vacuum source, filter manifold fitted with conical funnels (50 ml), Kjeldahl apparatus.

Reagents.

1. Borate-phosphate buffer, pH 6.7-6.8 including
   - monosodium phosphate (NaI-I,PO,.H,O) 12.20 g/L
   - sodium tetraborate (Na,B,O,.lOH,O) 8.91 g/L
   - tertiary butyl alcohol 100 ml/L

2. Sodium azide 10% solution freshly prepared.

Procedure.

1. Weigh 0.5 g ground dry sample into a 125 ml Erlenmeyer flask.
2. Add 50 ml borate-phosphate buffer.
3. Add 1 ml of sodium azide solution.
4. Let stand at room temperature for 3 h.
5. Filter through Whatman #54 or #541 filter paper using mild vacuum.
6. Wash the residue with 250 ml cold distilled water.
7. Estimate N in residue by Kjeldahl. This gives the insoluble protein fraction. Soluble protein is calculated by difference from total crude protein. The soluble true proteincan be obtained by subtracting the NPN by tungstic acid procedure, Section lc. Note that when tungstic acid is used the soluble protein will include the shorter peptides.

2. اندازه گیری بخش پروتئین حقیقی

استفاده از محلول تری کلرواستیک اسید باعث رسوب تمامی پروتئین ها از جمله پروتئین های رسوب یافته مرحله قبل بعلاوه پروتئینی حقیقی (B1) محلول در بافر بورات فسفات می شود. پس از تعیین CP (کلدال) بخش باقیمانده، از کسر کردن آن از بخش CP کل بخش A یا همان ازت غیرپروتئینی (NPN) بدست می آید. همچنین با کسر کردن بخش پروتئین محلول (SP) بدست آمده از مرحله قبل از بخش A، بخش B1 بدست می آید.

Apparatus.

1. Erlenmeyer flask (125 ml), Whatman #54 or 541 filter paper, analytical balance, filter funnels, Kjeldabl apparatus

Reagents.

1. Trichloroacetic acid 10% w/v in water. Keep refrigerated!

Procedure.

8. 1. Weigh 0.5 g ground dry sample into a 125 Erlenmeyer flask.
9. 2. Add 50 ml of distilled water. Allow to stand 30 min.
10. 3. Add 10 ml 10% trichloroacetic acid. Let stand 20-30 min.
11. 4. Filter on Whatman #54 or 541 paper by gravity.
12. 5. Wash twice with trichloroacetic acid solution.
13. 6. Transfer paper to Kjeldahl flask and determine residual nitrogen.
14. 7. Calculate NPN as in the tungstic acid procedure.

3. اندازه گیری بخش پروتئینی همراه با دیواره سلولی یا B3 و C (NDICP)

جهت تعیین پروتئین همراه با دیواره سلولی (B3, C) ابتدا NDF نمونه ها در دستگاه آنکوم تعیین شده و سپس بعد از خشک شدن در آون و تعیین میزان NDF میزان پروتئین متصل شده به آن یا همان NDICP توسط دستگاه کلدال تعیین می شود. تعداد 4 یا 6 تکرار (دو برابر) برای هر نمونه جهت تعیین NDF استفاده می شود نیمی از این تکرارها سپس برای تعیین NDICP و نیم دیگر پس از استخراج با ADF جهت تعیین ADICP بکار می روند.

4. اندازه گیری بخش پروتئینی غیرقابل هضم (C) یا همراه با ADF (ADICP)

جهت تعیین پروتئین همراه با ADF یا همراه لیگنین (C) از محلول شوینده اسیدی در دستگاه آنکوم استفاده می شود و سپس بعد از خشک شدن در آون و تعیین میزان ADF میزان پروتئین متصل شده به آن یا همان ADICP توسط دستگاه کلدال تعیین می شود. پس از تعیین ADICP یا بخش C و کسر کردن آن از بخش NDICP که حاوی هر دو بخش B3 و C می باشد، مطابق زیر بخش B3 بدست می آید:

C=ADICP

B3=NDICP-ADICP

5. تعیین بخش B2

پس از تعیین CP کل و همچنین بخش های A, B1, B3, C بخش B2 از تفاضل اعداد بدست می آید

B2=CP-(A+B1+B3+C)

نکات:

به علت واریانس در انجام کار داده ها ممکن است واریانس بالایی داشته باشند بنابراین بهتر است بجای 2 تکرار برای هر نمونه از 3 تکرار استفاده شود.

برای نمونه های A, B1 دو کاغذ صافی بعنوان بلنک (Blank) برای تصحیح نیتروژن کاغذ صافی استفاده شود.

برای نمونه های NDICP و ADICP دو کیسه خالی (Blank) برای تصحیح نیتروژن کیسه ها استفاده شود.

Dry filter paper overnight at 100 °C and weigh (W0)

8. تعیین قابلیت هضم کل دستگاه گوارش

1. اندازه گیری خاکستر نامحلول در اسید

I. Reagent:

A. 2 N Hydrochloric Acid (HCl)

1. Add 166.7 ml of concentrated HCl to approximately 700 ml of dH2O
2. Stir and q.s. to 1 L

II. Procedure:

A. Weigh a 5.0 ± 0.0040 g sample in duplicate into a tared 50 ml ashing crucible.
B. Dry overnight at 100oC. Allow crucibles to cool in desiccator and reweigh.
C. Ash 6 hours at 600oC.
D. Transfer ash to 600 ml Berzelius beaker adding 100 ml of 2 N HCl.
E. Boil 5 minutes on fiber rack.
F. Filter hot hydrolysate through Whatman 541 filter paper and wash with hot distilled water.
G. Transfer filter paper back into crucible and ash 6 hours at 600oC.
H. Place crucible in 100oC oven to re-dry. Cool in desiccator and weigh.

III. Calculation:

$$\text{قابلیت هضم ظاهری ماده خشک} = ۱۰۰ - ۱۰۰ \times \left(\frac{\text{درصد نشانگر درخوراک}}{\text{درصد نشانگر در مدفوع}}\right)$$

$$\text{قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی} = ۱۰۰ - ۱۰۰ \times \left(\frac{\text{درصد نشانگر در خوراک}}{\text{درصد نشانگر در مدفوع}}\right) \times \left(\frac{\text{درصد ماده مغذی در مدفوع}}{\text{درصد ماده مغذی در خوراک}}\right)$$

IV. References:

Van Keulen, J.V. and B.A. Young. 1977. Evaluation of acid insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. J. Animal. Sci. 44:282.

2. اندازه گیری خاکستر نامحلول در ADF بعنوان مارکر داخلی

Van Soest recommends measurement of AIA as the residue from ADF after ashing at 525oC (Van Soest et al., 1991. J. Dairy Sci. 74:3583). Acid detergent quantitatively recovers all silica. This procedure is shorter than the Van Keulen and Young technique, which is also liable to incomplete recovery of silica due to lack of sufficient acid dehydration. The AIA after lignin determination by either K MnO4 or Klason procedures is identical to that of the original ADF residue.

9. اندازه گیری تجزیه پذیری شکمبه و هضم پس شکمبه ای

تجزیه پذیری شکمبه ایی

جهت تعیین تجزیه‌پذیری شکمبه‌ایی از 2 راس گاو هلشتاین استفاده شود. برای تعیین تجزیه‌پذیری شکمبه‌ایی ماده خشک و ترکیبات الیافی (الیاف شوینده خنثی و الیاف شوینده اسیدی، سلولز و همی‌سلولز) و یا پروتئین خام از مراحل زیر استفاده می کنیم:

1. خشک کردن، شماره گذاری کیسه‌های آنکوم و وتوزین آنها (Wbag)
2. حدود 0/5 گرم نمونه (Wsample) درکیسه اف 57 (قطر منفذ 35 میکرومتر، شرکت آنکوم) قرار داده و سپس توسط دستگاه سیلد می شوند کیسه‌های ذکر شده در کیسه توری مانند بزرگ (ابعاد 50×50 سانتیمتر و منافذ با قطر 2 میلی متر) قرار داده و در شکمبه گاوها در زمان‌های صفر،3، 6، 12، 24، 48 و 72 (برای علوفه) ساعت انکوبه شوند. زمان 24 ساعت به منظور تعیین تجزیه‌پذیری علوفه و 12 ساعت برای هضم اقلام کنسانتره در مدت زمان طبیعی ماندگاریش در شکمبه گاو شیرده در نظر گرفته می شود. گاوها با یک جیره کاملا مخلوط متوازن شده حاوی خوراک مورد آزمایش تغذیه شوند. پس از اتمام انکوباسیون، کیسه‌ها خارج شده و جهت توقف سریع تخمیر میکروبی کیسه‌ها، بلافاصله در آب سرد قرار داده و شستشو می شوند و بعد از انتقال به آزمایشگاه به مدت 14 دقیقه در ماشین لباسشویی شستشو داده شود
3. خشک کردن کیسه های انکوبه شده در دمای 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت و توزین آنها پس از سرد شدن در دسیکاتور (Wrumen).

ماده خشک نمونه های اولیه نیز باید مطابق دستورالعمل بخش ماده خشک تعیین شود (Sample DM)

نکات

میزان اتلاف در کیسه (washing loss) نمونه در زمان صفر بدون انکوباسیون تنها شستشو داده شده و به عنوان washing loss در نظر گرفته می شوند.

نسبت وزن به سطح نمونه باید در دامنه 20-10 میلی گرم به ازای سانتیمتر مربع باشد:

$$\text{اندازه نمونه به سطح کیسه} = \frac{\left(\text{مقدار نمونه(میلی گرم)}\right)}{2 \times \left(\text{عرض کیسه (سانتیمتر)}\right) \times \left(\text{طول کیسه (سانتیمتر)}\right)}$$

محاسبات

درصد تجزیه پذیری در شکمبه

$$\text{درصد تجزیه پذیری شکمبه} = \frac{\left((Wsample \times Sample\ DM) - (Wrumen - Wbag)\right)}{Wsample \times Sample\ DM}$$

درصد تجزیه پذیری موثر ماده خشک و پروتئین تجزیه پذیری و عبوری در شکمبه

$$Effective\ degradability = a + \frac{b \times kd}{b \times kp}$$

$$Rumen\ degradble\ protein\ (RDP), \% = a + \frac{b \times kd}{b \times kp}$$

$$Rumen\ undegradble\ protein\ (RUP), \% = c + \frac{b \times kp}{b \times kd}$$

فراسنجه های a، b، c و Kd نرخ تجزیه پذیری که با استفاده از برنامه NEWAY بدست می آید و Kp بسته به نوع گاو از 0/03 تا 0/08 در نظر گرفته می شود. پردازش داده های آزمایشی با نرم افزار تحلیل گر آماری SAS[1] با رویه (Proc NLIN) آنالیز می شوند.

هضم شکمبه و پس شکمبه ای پروتئین

برای اندازه گیری هضم پس شکمبه‌ای پروتئین ماده خوراکی از روش 3 مرحله ای اصلاح شده کالسامیگلیا و استرن سال 1995 (Gargallo et al., 2006; Modified Three-Step In Situ/In Vitro Procedure using An in vitro batch incubator (DaisyII)) استفاده می‌شود. در این روش نمونه های مواد خوراکی به مدت 12 ساعت در شکمبه انکوبه شده و سپس نمونه ها در آزمایشگاه در دستگاه آنکوم (دیزی-2) توسط هضم شیردانی و روده ای هضم می شوند.

مرحله اول انکوباسیون شکمبه

مطابق قبل کیسه ها در شکمبه ولی فقط 12 ساعت انکوبه می شوند وپس از شستشو، خشک و توزین می شوند. تعدادی از تکرارهای هر نمونه جهت آنالیز CP و بقیه جهت هضم پس شکمبه بکار می روند

مرحله دوم هضم شیردانی

نمونه های هضم نشده شکمبه در 12 ساعت در یک محلول اسیدکلریدریک (0/1 نرمال)- حاوی پپسین (1گرم در لیتر) به مدت 1 ساعت در 39 درجه سانتی گراد انکوباسیون می شوند pH محلول در مقدار عددی 2 تنظیم شود. 24 کیسه به ازای 2 لیتر محلول HCL-PEPSIN در دستگاه دیزی-2 قرار داده می شود. پس از اتمام کیسه ها با آب شستشو داده می شوند و برای مرحله سوم آماده می شوند.

مرحله روده ای

پس از اتمام مرحله شیردانی کیسه ها با جارهای شیشیه ای دیگر حاوی محلول پانکراتین (0/5 مولار KH2PO4، در pH برابر 7/8 حاوی PPM 50 تیمول و 3 گرم در لیتر پانکراتین) داخل می شوند. نمونه ها به مدت 24 ساعت در دمای 39 درجه سانتیگراد در دستگاه دیزی-2 انکوبه می شوند. به ازای هر 24 کیسه از 2 لیتر محلول استفاده شد. پس از اتمام انکوباسیون نمونه ها شستشو و سپس خشک شده و جهت CP آنالیز می شوند

نکات

3 بلنک برای هر اجرای آزمایش

References

Calsamiglia and Stern. 1995. A Three-Step in Vitro Procedure for Estimating Intestinal Digestion of Protein in Ruminants. J. Anim. Sci. 1995. 73:1459-1465.

Gargallo, S. Calsamiglia,1 and A. Ferret. 2006. Technical note: A modified three-step in vitro procedure to determine intestinal digestion of proteins. J. Anim. Sci. 2006. 84:2163–2167

[1]- SAS System Analyst (v. 9.1.3 Service Pack 4)