

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

Zahra Salehian¹, Hamed Khalilvandi Behroozyar^{2*}, Rasoul Pirmohammadi³,
Nasrolah Ahmadifard⁴, Hadi Almasi⁵

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, B₁, B₂, B₃, 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

تعیین ارزش غذایی پروتئین دو گونه ریز جلبک آیزوکرایسیس گالبانا (*Isochrysis galbana*) و نانوکلوپسیس 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	چکیده
نوع مقاله:	سابقه و هدف: امروزه ارزش تغذیه‌ای ریز جلبک‌ها بر کسی پوشیده نیست و تحقیقات
مقاله کامل علمی - پژوهشی	گسترده‌ای در زمینه افزایش ظرفیت تولید آن‌ها و ارزش تغذیه‌ای آن‌ها انجام می‌گیرد. با توجه
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۳	به بالا بودن هزینه بخش پروتئینی جیره دام‌ها، ریز جلبک‌ها می‌توانند از نظر اقتصادی
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۱	جایگزین‌های طبیعی برای مکمل‌های پروتئینی همچون کنجاله سویا در جیره‌هایی با قیمت
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳	رقابتی باشند. در میان تمام اسیدآمینه‌های خوراک، لیزین و متیونین اولین و دومین اسیدهای
واژه‌های کلیدی:	آمینو محدودکننده هستند. اغلب گونه‌های ریز جلبکی حاوی مقادیر نسبتاً بالایی از لیزین
الگوی اسیدهای آمینه	هستند، اما تا حدودی از لحاظ اسیدآمینه‌های گوگرددار مانند سیستئین و متیونین کمبود دارند.
تجزیه پذیری پروتئین	هدف از آزمایش حاضر، بررسی میزان پروتئین و ترکیبات شیمیایی دو گونه ریز جلبک
ریز جلبک	آیزوکرایسیس گالبانا و نانوکلوپسیس اکولاتا، میزان تجزیه‌پذیری نیتروژن به روش <i>Invitro</i> و
نیتروژن آمونیاکی	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
	نانوکلوپسیس 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
	هلهشتاین فیستولا دار با میانگین وزن 40 ± 80 کیلوگرم و سن ۲ سال استفاده شد.
	یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان‌دهنده این بود که دو گونه ریز جلبکی از نظر درصد پروتئین
	خام، چربی و NSC باهم تفاوت داشتند ($P < 0.05$). نتایج حاصل نشان داد نانوکلوپسیس

اکولاتا دارای ۳۷ درصد و آیزوکرایسیس گالبانا دارای ۳۲ درصد پروتئین خام هستند. نسبت درصد اسید آمینه ضروری به غیر ضروری در ریز جلبک آیزوکرایسیس گالبانا ۱۸/۷۹ و در نانوکلوپسیس اکولاتا ۲۸/۸ درصد بود ($P < 0.05$). درصد تجزیه پذیری 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 نانوکلوپسیس 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 نانوکلوپسیس اکولاتا ۶۵، ۶۰ و ۶۲ درصد بود. بخش های A, B₁, B₂, B₃ و C در آیزوکرایسیس گالبانا به ترتیب ۱۰/۰۷، ۱۹/۹، ۵۵/۱۳، ۶/۱ و ۸/۸ و در نانوکلوپسیس اکولاتا به ترتیب ۱۵/۱۶، ۱۶/۶۴، ۵۴/۹۸، ۵/۶۵ و ۸/۸ درصد پروتئین خام بود و بخش های A و C بین دو گونه ریز جلبکی معنی دار شد ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر بیانگر این بود که با توجه به میزان چربی خام، پروتئین خام، درصد نیتروژن تجزیه شده در شرایط *Invitro* و پروتئین عبوری در گونه های ریز جلبکی نانوکلوپسیس اکولاتا و آیزوکرایسیس گالبانا به نظر می رسد این ریز جلبک ها دارای ارزش تغذیه ای مناسب برای استفاده در خوراک دام هستند.

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

DOI: 10.22069/ejrr.2022.19617.1810



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

جلبک‌ها گروهی متفاوت از موجودات زنده هستند که به دو گروه ریز جلبک‌ها (میکروالگ‌ها)^۱ و ماکرو جلبک‌ها^۲ تقسیم می‌شوند. آن‌ها منابع مهم ویتامین، مواد معدنی، پروتئین، اسید چرب غیراشباع و آنتی‌اکسیدان هستند (۳۱). امروزه استفاده از آبی‌پروری و بخصوص کشت ریز جلبک‌ها به سرعت در حال افزایش بوده و افزایش شناخت از ترکیبات شیمیایی ریز جلبک‌ها، از جمله پروتئین‌ها و الگوی اسیدهای چرب و اسیدآمینه‌های آن‌ها، می‌تواند امکان غربالگری مؤثر به منظور توسعه کشت گونه‌های مناسب از نظر 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 با ارزش پروتئین و اسیدهای چرب غیراشباع زنجیر بلند می‌توان استفاده کرد (۱۳، ۳۶ و ۴۰).

پروتئین گران‌ترین ماده مغذی در خوراک دام محسوب می‌شود و ریز جلبک‌ها می‌توانند از نظر 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 به عنوان منابع مکمل پروتئینی نیز استفاده می‌شود. نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهد استفاده از برخی منابع جلبکی دارای سطح پروتئین بالا مانند جلبک کلرلا^۳ و سندسموس^۴ 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 به صورت کامل، می‌توان از زیست‌توده بدون چربی گونه‌های ریز جلبک حاصل از فرآیند تولید سوخت‌های زیستی، به عنوان 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 به عنوان منبع اصلی انرژی و پروتئین در جیره دام، به طور مستقیم با مصرف انسان رقابت می‌کنند (۲۴، ۳۵ و 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 در این بین زیست‌توده جلبکی غنی از لیپید یکی از موارد در نظر گرفته شده توسط کارشناسان تغذیه دام و آبزیان مواد جایگزین در آینده است (۲۶ و ۴۱). ریز جلبک‌ها به عنوان موجودات یوکاریوت تک سلولی فتوسنتز کننده، حاوی اسیدهای نوکلئیک هستند و مقدار پروتئین آن‌ها در گونه‌های مختلف ریز جلبکی از ۱۰ تا بیش از ۶۰ درصد (مانند اسپیرولینا) گزارش شده است (۲، ۳۰). مطالعات گذشته نشان می‌دهد که گونه ریز جلبک آیزوکرایسیس گالابانا دارای رشد بالایی است و از نظر ترکیبات شیمیایی دارای دامنه ۶۶/۸۱-۴۱/۵۳ 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.

کبات ۴، سولفات مس ۴، ویتامین B₁ ۲، ویتامین B₁₂ ۰/۲ و بیوتین ۰/۰۰۲ گرم بر لیتر بود. سیستم نوردی و هوادهی نیز به صورت مداوم و ۲۴ ساعته انجام شد. برداشت ریز جلبک‌ها پس از رسیدن آن‌ها به مرحله فاز رشد لگاریتمی انجام گرفت و پس از خشک کردن ریز جلبک‌ها ترکیب شیمیایی آن‌ها اندازه‌گیری شد.

تعیین ترکیب شیمیایی ریز جلبک‌ها: پس از برداشت ریز جلبک‌ها با دستگاه سانتیفریوژ، در آن 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 یا معادله (۱) محاسبه شد:

معادله (۱)

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

اندازه‌گیری تجزیه‌پذیری نیتروژن: با توجه به اینکه در این آزمایش اندازه ذرات ریز جلبک‌های آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکلوپسیس 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 40 ± 80 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

نانوکلوپسیس 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 و 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 گالابانا و نانوکلوپسیس اکولاتا از نظر ارزش پروتئینی و بررسی الگوی اسیدآمین، 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 گالابانا و نانوکلوپسیس اکولاتا از نظر مواد مغذی موردنیاز، دما، نور و درجه شوری (۲۴ گرم در لیتر) یکسان بود. محیط کشت Conway مورد استفاده برای تغذیه ریز جلبک‌ها شامل: ترکیبات کلرید آهن ۱/۳، کلرید منگنز ۰/۳۶، اسید بوریک ۳۳/۶، EDTA ۴۵، ارتوفسفات سدیم ۲۰، نترات سدیم ۲۰، کلرید روی ۴/۲، کلرید

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 ۳ محاسبه شد (۳۴).

معادله (۳)

$$IVDN = \frac{(A - (A - B) / (C - D)) \times C - (NH_3 - N \text{ of blank})}{\text{total N of feeding stuff incubated}}$$

IVDN: نیتروژن تجزیه‌شده در شرایط *In vitro* A:

میلی گرم نیتروژن آمونیاکی بعد از ساعت انکوباسیون وقتی منبع کربوهیدراتی به آن اضافه نشده است؛ B: میلی گرم نیتروژن آمونیاکی بعد از ساعت انکوباسیون همراه با منبع کربوهیدراتی؛ C: میلی لیتر گاز تولیدی در ساعت انکوباسیون زمانی که فاقد منبع کربوهیدراتی است؛ D: میلی لیتر 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 نانوکلوپسیس 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 نانوکلوپسیس اکولاتا و از هر نمونه سه زیر نمونه و از هر زیر نمونه سه تکرار برای آزمایش در نظر گرفته شد. بخش B₁ جزء با تجزیه‌پذیری سریع است و به همراه بخش A در بافر بورات-فسفات، محلول است. بخش B₂ 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 B₃ نیز ترکیبات نامحلول در شوینده خنثی و محلول در شوینده اسیدی است که تجزیه‌پذیری کمی در شکمبه دارد. در نهایت بخش C که در شوینده اسیدی نامحلول است و بخشی است که

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 و 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 معادله (۲) استفاده شد.

$$P = b(1 - e^{-ct}) \quad \text{معادله (۲)}$$

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 نانوکلوپسیس اکولاتا و $y = 0.1654 + 1.2621$ با ضریب $R^2 = 99.24$ برای ریز جلبک آیزوکرایسیس

فرآوری بر تولید گاز، علاوه بر اثر 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) به عنوان 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 به عنوان بهترین ساختار مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز آماری معادله ۴ با استفاده از رویه مدل خطی تعمیم یافته و معادله شماره ۵ با استفاده از رویه MIXED نرم افزار 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 به صورت میانگین حداقل مربعات و خطای استاندارد مربوطه در جداول گزارش شدند.

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

$$\text{معادله (۵)}$$

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

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.

به منظور مقایسه ترکیبات شیمیایی، الگوی اسید آمینه و بخش‌های مختلف پروتئین بر اساس روش CNCPS در دو گونه‌ی ریز جلبکی آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکلوپسیس اکولاتا از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد (معادله ۶).

$$Y_i = \mu + T_i + e_i \quad \text{معادله (۶)}$$

به طور 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 گالابانا و نانوکلوپسیس 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 Sonawane et Huesgen (1999) و روش تصحیح شده al. (2015) انجام شد (۱۷، ۴۲). ابتدا ۰/۳ گرم نمونه با ۶ میلی لیتر 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 مورد استفاده در این آزمایش Amino acid mix17 (sigma Aldrich) بود. پس از تعیین الگوی اسید آمینه ریز جلبک‌ها اسکور آن‌ها نیز بر اساس نسبت یک اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه‌های ضروری محاسبه شد.

محاسبات و مدل آماری

در طرح آماری مورد استفاده به منظور ارزیابی اثر

کشت داده شدند میزان پروتئین گزارش شده ۲/۵ و ۲۱ درصد برای آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکلوپسیس اکولاتا گزارش شده است (۴). درصد چربی تولیدی گزارش شده برای گونه‌های آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکلوپسیس اکولاتا در دامنه ۲۵-۳۳ و ۶۰-۳۷ درصد از ماده خشک گزارش شده است (۲۷). درصد کربوهیدرات ریز جلبک آیزوکرایسیس گالابانا در شرایط کشت با بیشترین غلظت فسفر ۲۳/۵ درصد وزن خشک گزارش شده است (۴۸). درصد کربوهیدرات موجود در ساختار ریز جلبک‌های آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکلوپسیس اکولاتا به ترتیب ۱۲/۹ و ۷/۸ (درصد ماده خشک) گزارش شده 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 اسیدآمین آن‌ها تأثیرگذار است (۶). در مطالعه حاضر نیز درصد پروتئین خام، چربی و کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی بین دو گونه آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکلوپسیس اکولاتا متفاوت بود و با توجه به اینکه شرایط کشت برای هر دو ریز جلبک یکسان بود بنابراین می‌توان گفت تفاوت‌های بین گونه‌ای بین آن‌ها سبب تفاوت ترکیبات داخل سلولی شده است. از طرفی ریز جلبک نانوکلوپسیس اکولاتا نسبت به آیزوکرایسیس گالابانا دارای درصد بیشتری پروتئین و چربی بود در نتیجه دور از انتظار نبود که مقدار کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی کمتری نسبت به آیزوکرایسیس گالابانا داشته باشد.

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

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی ریز جلبک‌های آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکلوپسیس اکولاتا: در مطالعه حاضر بررسی ترکیب شیمیایی دو گونه ریز جلبک آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکلوپسیس 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 از نظر آماری باهم معنی‌دار شد ($P < 0/05$). در ریز جلبک نانوکلوپسیس اکولاتا درصد پروتئین خام و عصاره اتری بیشتر از آیزوکرایسیس گالابانا بود و درصد NSC در ریز جلبک نانوکلوپسیس اکولاتا کمتر از ریز جلبک آیزوکرایسیس گالابانا بود ($P < 0/05$) (جدول ۱). زرین مهر و همکاران (۲۰۲۰) مشاهده کردند که درصد پروتئین ریز جلبک آیزوکرایسیس گالابانا که با محیط کشت والنه (conway) رشد داده شده 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 به کاررفته در محیط کشت والنه ۲۰ گرم در لیتر بود و پروتئین ریز جلبک آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکلوپسیس اکولاتا به ترتیب ۳۲ و ۳۷ درصد بود. در تحقیقی که روی ریز جلبک‌های آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکلوپسیس اکولاتا با محیط کشت F/2

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

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

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

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار است ($P < 0.05$).

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

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

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

جلبک نانوکلروپسیس اکولاتا بیشتر از آیزوکرایسیس گالابانا بود ($P < 0.05$) (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 گالابانا بود ($P < 0.05$)؛ اما اسکور اسیدآمینه برای سایر اسیدآمینه‌های ضروری بین دو گونه ریز جلبکی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۳).

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

الگوی اسیدهای آمینه: نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد دو گونه ریز جلبکی آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکلروپسیس اکولاتا از نظر غلظت اسیدآمینه‌های آرژنین، هیستیدین، لوسین، متیونین، اسید آسپارتیک، اسید گلوتامیک و پرولین باهم تفاوت دارند ($P < 0.05$). اسیدآمینه‌های آرژنین و لوسین در ریز جلبک آیزوکرایسیس گالابانا بیشتر از نانوکلروپسیس اکولاتا بود. هیستیدین، متیونین، اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک نیز در ریز جلبک نانوکلروپسیس اکولاتا با تفاوت معنی‌داری بیشتر از آیزوکرایسیس گالابانا بود ($P < 0.05$). درصد اسیدآمینه‌های ضروری و نسبت درصد اسیدآمینه‌های ضروری به غیر ضروری در ریز جلبک آیزوکرایسیس گالابانا بیشتر از نانوکلروپسیس اکولاتا شد. همچنین درصد اسیدآمینه‌های غیر ضروری به ضروری در ریز

تعیین ارزش غذایی پروتئین دو گونه ریز جلبک... / زهرا صالحیان و همکاران

جدول ۲- بررسی الگوی اسیدآمینهای ریز جلبکهای مورد مطالعه

Table 2- Amino acid profiles of the studied microalgae

p-Value	SEM	نانوکلروپسیس اکولاتا	آیزوکرایسیس گالباننا	
		<i>N. oculata</i>	<i>I. galbana</i>	
درصد اسیدآمینهای 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 اسیدآمینهای 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	پروлін Pro
0.008	0.051	89.23 ^b	94.94 ^a	TEAA% ^۱
0.007	0.06	10.77 ^a	5.06 ^b	TNEAA% ^۲
0.015	0.176	8.28 ^b	18.79 ^a	TEAA/TNEAA%

حروف نامشابه در هر ردیف نشاندهنده اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$).

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

۱ مجموعه اسیدآمینهای ضروری ۲ مجموعه اسیدآمینهای غیرضروری

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

غیرضروری استفاده می‌شوند. اسیدآمینهای ضروری شامل: آرژنین، لوسین، ایزولوسین، والین، لیزین، ترئونین، تریپتوفان، متیونین، فنیل آلانین و هیستیدین هستند (۴۷). افزایش میزان اسیدآمینهای ضروری موجود در پروتئین موجب بالا رفتن ارزش بیولوژیکی یا کیفیت آن خواهد شد. در این مطالعه نیز بررسی ۷ اسیدآمین ضروری بین دو گونه ریز جلبکی نشان داد که نسبت کل اسیدآمینهای ضروری به غیرضروری در آیزوکرایسیس گالباننا بیشتر از نانوکلروپسیس

احتمالاً تفاوت در شناسایی برخی از اسیدآمینها در تحقیق حاضر با گزارش پاتیل و همکاران (۲۰۰۷) به علت روش به کار برده شده در بررسی شناسایی و الگوی اسیدآمین است (۳۲). کیفیت پروتئین با روشهای متفاوت سنجیده می‌شود. از جمله آنها می‌توان به ارزش بیولوژیکی و اسکور اسیدهای آمینه اشاره کرد که هر دو تحت تأثیر اسیدآمینهای ضروری هستند. این اسیدهای آمینه ضروری به عنوان منبع نیتروژن برای تولید و ساخت اسیدآمینهای

اکولاتا بود. با توجه به نتایج این آزمایش در بررسی تعدادی از اسیدآمین‌های ریز جلبک‌های آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکلوپسیس اکولاتا این نتیجه نشان‌دهنده ارزش کیفیت پروتئین بیشتر در آیزوکرایسیس گالابانا نسبت به نانوکلوپسیس اکولاتا است.

جدول ۳- اسکور اسیدآمین ریز جلبک‌ها
Table 3- Amino acid score of microalgae

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

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

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

۱: نسبت یک اسیدآمین ضروری به کل اسیدآمین‌های ضروری

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

قابل تجزیه در شکمبه توسط میکروارگانیزم‌ها مصرف و به پروتئین میکروبی تبدیل می‌شود سپس با ورود به روده کوچک مورد استفاده دام قرار می‌گیرد. پروتئین غیر قابل تجزیه 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 نانوکلوپسیس اکولاتا نزدیک به مقادیر گزارش شده 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

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 گالابانا و نانوکلوپسیس اکولاتا در ساعات مختلف آنکوباسیون باهم معنی‌دار شد ($P < 0.05$). درصد نیتروژن تجزیه‌شده در ریز جلبک آیزوکرایسیس گالابانا در تمامی ساعات آنکوباسیون بیشتر از نانوکلوپسیس اکولاتا بود. پروتئین عبوری نیز در تمامی ساعات آنکوباسیون در ریز جلبک نانوکلوپسیس اکولاتا بیشتر از آیزوکرایسیس گالابانا نشان داده شد ($P < 0.05$) (جدول ۴).

پروتئین مورد مصرف دام شامل دو بخش قابل تجزیه و غیرقابل تجزیه است (۳۶). پروتئین

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 پوشاندگی یا تأثیر بر فعالیت و زنده‌مانی میکروارگانیسم‌های هضم‌کننده پروتئین، تجزیه‌پذیری را تحت تأثیر قرار داده است. در این تحقیق نیز ریز جلبک نانوکروپسیس اکولاتا که دارای درصد چربی بیشتری نسبت به ریز جلبک آیزوکرایسیس گالابانا بود احتمالاً پدیده پوشاندگی 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 گالابانا گردد.

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 گالابانا درصد کربوهیدرات غیر ساختمانی بیشتر از نانوکروپسیس اکولاتا بود، احتمالاً همین عامل سبب محدودیت رشد میکروارگانیسم‌ها و کاهش فعالیت آن‌ها و در نتیجه کاهش تجزیه‌پذیری پروتئین نانوکروپسیس اکولاتا در زمان انکوباسیون نسبت به آیزوکرایسیس گالابانا شده است. گزارش سایر محققان بیانگر این است که برخی از اسیدآمینه‌های موجود در ساختار پروتئین سبب استحکام پیوندهای پروتئینی می‌شوند (۳۳) که از جمله 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 نانوکروپسیس اکولاتا بیشتر از آیزوکرایسیس گالابانا بود. به نظر می‌رسد الگوی اسیدآمینه و ترکیب آن‌ها بر تجزیه‌پذیری پروتئین آن

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

Table 4 - IVDN and RUP content of microalgae strains					
p-Value	SEM	نانوکروپسیس اکولاتا	آیزوکرایسیس گالابانا	زمان انکوباسیون (ساعت)	
		<i>N. oculata</i>	<i>I. galbana</i>	Incubation time (h)	
0.0231	1.968	35 ^b	44 ^a	8	
0.0467	3.365	40 ^b	53 ^a	12	نیتروژن تجزیه‌شده در شرایط
0.0064	1.573	38 ^b	48 ^a	24	<i>In vitro</i>
					(% از کل نیتروژن)
					IVDN (%N)
0.0301	2.12	65 ^a	56 ^b	8	
0.0411	3.632	60 ^a	47 ^b	12	پروتئین عبوری (%CP)
0.0232	2.079	62 ^a	52 ^b	24	Rumen Undegradable protein (%CP)

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<0/05).

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

نتایج به دست آمده از میزان پروتئین عبوری ریز جلبک نانوکروپسیس اکولاتا در ساعت ۸ انکوباسیون مشابه با نتایج ویلد و همکاران (۲۰۱۸) بود (۴۶). در آن مطالعه میزان پروتئین عبوری در ریز جلبک نانوکروپسیس ۶۹ درصد گزارش شده است و در مطالعه حاضر نیز در ساعت ۸ انکوباسیون پروتئین عبوری ۶۵ درصد مشاهده شد. تحقیق علاوه بر این میزان تجزیه پذیری نیتروژن و پروتئین عبوری یک ماده خوراکی به درصد پروتئین آن ماده خوراکی نیز بستگی دارد. به طوری که با افزایش مقدار پروتئین، بخش قابل توجهی 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 نانوکروپسیس اکولاتا بیشتر از آیزوکرایسیس گالابانا بود بنابراین در ساعات مختلف انکوباسیون نیز درصد پروتئین عبوری این گونه ریز جلبکی بیشتر بوده است. در نهایت می‌توان این گونه عنوان نمود که با توجه به این که روش مورد استفاده در این پژوهش از غلظت نیتروژن آمونیاکی برای برآورد میزان تجزیه پذیری نیتروژن استفاده شده است، باگذشت زمان بخشی از نیتروژن آمونیاکی تولیدی در فرآیند ساخت پروتئین میکروبی مورد استفاده فرار گرفته و این امر می‌تواند یکی از عوامل توجیه کننده بیشتر بودن میزان تجزیه پذیری 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 تجزیه پذیری باگذشت زمان انکوباسیون شده است (۴۶). با توجه به معنی دار بودن تفاوت درصد تجزیه پذیری نیتروژن بین دو گونه ریز جلبکی نانوکروپسیس اکولاتا و آیزوکرایسیس گالابانا با توجه

به نتایج جدول ۱ و کمتر بودن میزان کربوهیدرات‌های ساختمانی در ریز جلبک نانوکروپسیس اکولاتا نسبت به آیزوکرایسیس گالابانا احتمالاً این عامل نیز یکی از دلایل کاهش مقادیر برآورد شده تجزیه پذیری بوده است.

بخش بندی پروتئین آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکروپسیس 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 گالابانا و نانوکروپسیس اکولاتا باهم تفاوت معنی داری داشتند ($P < 0/05$) (جدول ۵). بخش A در ریز جلبک نانوکروپسیس اکولاتا بیشتر از آیزوکرایسیس گالابانا و بخش C نیز در ریز جلبک آیزوکرایسیس گالابانا بیشتر از نانوکروپسیس اکولاتا بود. سایر بخش‌های B_3 , B_2 , B_1 در این آزمایش بین دو گونه ریز جلبکی با هم اختلاف معنی داری نداشتند. نتایج سایر تحقیقات نشان می‌دهد که کنجاله سویا یکی از منابع پروتئینی مهم با تجزیه پذیری بالا در خوراک دام محسوب می‌شود و عواملی مانند نحوه فرآوری و درجه حرارت آن بر تجزیه پذیری پروتئین و بخش‌های مختلف آن تأثیرگذار است (۱۹). نتایج فتاح نیا و همکاران (۲۰۱۴) در مورد تجزیه پذیری بخش‌های مختلف پروتئین دانه سویا خام نشان دهنده این بود که بخش‌های A , B_1 , B_2 , B_3 و C به ترتیب دارای ۳/۲۲، ۵۱/۶۸، ۲۴/۰۸، ۱۴/۴۲ و ۶/۵۸ درصد تجزیه پذیری است (۱۱). مقایسه این نتایج با مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تجزیه پذیری بخش‌های مختلف پروتئین در دانه سویا با ریز جلبک‌های آیزوکرایسیس گالابانا و نانوکروپسیس 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.

تعیین ارزش غذایی پروتئین دو گونه ریز جلبک... / زهرا صالحیان و همکاران

شد و مقدار پروتئین این بخش همانند بخش B₃ کمتر از بخش‌های A، B₁ و B₂ بود. غلظت پروتئین و ساختار چهارگانه آن بر میزان تجزیه پذیری 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.

بالا بودن میزان پروتئین عبوری ماده خوراکی نشان‌دهنده ارزش پروتئینی بالای آن است (۱۶). در این تحقیق نیز بخش B₂ در هر دو نمونه ریز جلبکی بیشتر از ۵۰ درصد بود. بخش B₃ 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 نانوکلوپسیس اکولاتا کمتر از آیزوکرایسیس گالباننا

جدول ۵- بررسی الگوی پروتئین بر اساس CNCPS در نمونه‌های ریز جلبک آیزوکرایسیس گالباننا و نانوکلوپسیس اکولاتا

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

p-Value	SEM	نانوکلوپسیس اکولاتا <i>N. oculata</i>	آیزوکرایسیس گالباننا <i>I. galbana</i>	بخش‌بندی پروتئین بر اساس درصدی از پروتئین خام (%CP) fractions of protein (%CP)
0.009	0.053	15.16 ^a	10.07 ^b	A%
0.763	0.463	16.64	19.90	B ₁ %
0.323	0.615	54.98	55.13	B ₂ %
0.625	0.212	5.65	6.10	B ₃ %
0.005	0.007	7.57 ^b	8.80 ^a	C%

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<0.05).

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

A: نیتروژن غیر پروتئینی؛ B₁: پروتئین سریع تجزیه شونده در محلول بافر بورات؛ B₂: ترکیبات نیتروژنی محلول در شوینده خنثی؛ B₃: بخش نامحلول در شوینده خنثی و محلول در شوینده اسیدی؛ C: بخش نامحلول در شوینده اسیدی

A: Non-protein nitrogen; B₁: Rapidly degradable protein in borate buffer solution; B₂: 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; B₁% = B₁/CP * 100; B₃% = B₃/CP * 100; C% = C/CP * 100; B₂ = 100 - (A+B₁+B₃+C).

مکمل خوراک در تغذیه دام و طیور بسیار مناسب و ارزشمند باشد.

نتیجه‌گیری کلی

بررسی نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق ما نشان می‌دهد که دو گونه ریز جلبکی آیزوکرایسیس گالباننا و نانوکلوپسیس اکولاتا دارای درصد پروتئین خام، چربی زیاد و الگوی اسیدآمینه ضروری مناسبی هستند و از نظر اینکه تقریباً بیش از ۵۰ درصد پروتئین این گونه‌های ریز جلبکی به‌صورت عبوری و غیرقابل تجزیه در شکمبه است. بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از این منابع ریز جلبکی به‌عنوان

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 *Nannochloropsis 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, Cornell 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., Salewski, 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. I. 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., and 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. Ryckeboesch, 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 Rodehutschord, 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.