تأثير أنزيم البروتيز في درجة تحلل البروتين ومعامل الهضم المختبري لمسحوق السمك في علائق المجترات

جمال عبد الرحمن توفيق* وطاهر عبد اللطيف شجع ** وأمل عبداللطيف مناف[1]

* أستاذ مساعد دكتور، كلية الزراعة، جامعة بغداد، قسم الانتاج الحيواني **أستاذ دكتور، كلية الزراعة، جامعة تكريت، قسم الانتاج الحيواني

الخلاصة

أُجريت هذه الدراسة في المختبرات التابعة لكلية الزراعة / جامعة بغداد، بهدف زيادة درجة التحلل وذائبية بروتين مسحوق السمك وتأثيرها على معامل الهضم المختبري بهدف التأكد من امكانية اضافتها في علائق المجترات. شملت الدراسة ثلاثة معاملات رئيسية هي: معاملة مسحوق السمك الطازج (معاملة المقارنة)، معاملة مسحوق السمك مع انزيم البروتيز Protease 70000 وحدة دولية \غم المحلل للبروتينات بنسبة 1و 2 و3% بواقع 1: 1 (وزن : حجم) والمعاملة الثالثة هي معاملة كسبة فول الصويا المستخدمة في تجربة الهضم لمقارنة معامل هضم المادة الجافة والعضوية. تم استخدام السمك الرخيص الثمن المجهز من الاسواق المحلية والمعروف باسم الزوري، ابو خريزة او الخشني. اظهرت نتائج المعاملة الانزيمية بنسبة 1 و2 % زيادة معنوية ($P<0.05$) في نسبة مستخلص الايثر، وزيادة عالية المعنوية ($P<0.01$) في النتروجين الذائب ذو الأصل البروتيني في مسحوق السمك المعامل انزيميا بنسبة 3% وعدم تأثر النتروجين غير البروتيني الاصلnon-protein nitrogen (NPN). كما تبين من تجربة الهضم المختبري عند اضافة مسحوق السمك المعامل انزيميا او غير المعامل عند استبداله بكسبة فول الصويا في علائق المجترات، ارتفاع معامل الهضم المختبري للمادة العضوية عند إضافة مسحوق السمك المعامل او كسبة فول الصويا ($P<0.01$) مقارنة باضافة مسحوق السمك غير المعامل. في حين لم يتأثر معامل هضم المادة الجافة مختبريا في العلائق المختلفة. نستنتج من الدراسة امكانية استخدام انزيم البروتيز بنسبة 3% في زيادة البروتين المتحلل البروتيني الاصل.

الكلمات المفتاحية:
انزيم البروتيز، مسحوق السمك، معامل الهضم المختبري، النتروجين الذائب، البروتين المتحلل.

للمراسلة:
جمال عبدالرحمن توفيق
البريد الالكتروني:
drjamalani@Yahoo.com

الاستلام: 5 / 3 / 2017
القبول: 11 / 9 / 2017

Impact of Protease Enzyme on Degradation Degree and Coefficient of Laboratory Digestion for Fish Meal in The Ruminant's Diets

Jamal Abdulrahman Tawfeeq*; Tahir A. Shjaa and Amal A. Manaf**
*Assist. Prof. Dr.- Animals Production Dept.- College of Agric.- Baghdad University
**Prof. Dr.- Animals Production Dept.- College of Agric.- Tikrit University

ABSTRACT

This study was conducted in the laboratories of Agriculture College / University of Baghdad, in order to increase the solubility of fish protein meal and *in-vitro* digestibility. There were three treatments: fresh fish powder (comparison treatment), the second was fish powder treated with protease enzyme 70000U/gm using different concentrate 1%, 2% and 3% (w: v). The third treatment is soybean meal used in digestion experiment to compare the degree of digestibility of dry matter and organic matter in the treatments that use soy protein or fish powder treated or without treated protease. We used cheap fish supplied from local markets known as Zori, Abu Chrizh or Khushani. Treated with 1% and 2% protease enzyme leads to increase ether extract content ($P<0.05$) and soluble nitrogen ($P<0.01$) with 3% conc. as true protein without effected on non-protein nitrogen.

As it is shown by the experience of in-vitro digestibility for fish meal treated with or without protease enzyme when substituted with soybean in ruminant diets, high in vitro digestion of organic matter ($P<0.01$) without any effect on dry matter digestibility. It concluded that 3% of protease enzyme increase degraded true protein.

Keywords:
Protease, fish meal, In-vitro digestibility, soluble N, degraded protein.
Corresponding Author:
Jamal A. Tawfeeq
E-mail:
drjamalani@Yahoo.com
Received: 5/3/2017
Accepted: 11/9/2017

[1] البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثالث

المقدمة:

ان البحث عن البدائل العلفية لتقليل كلف الانتاج من اهم الاسباب الرئيسية لزيادة واردات مشاريع تسمين المجترات. وتشكل المصادر البروتينية الجانب الاكثر كلفة في علائق الحيوانات عموما، مما دفع الى ايجاد بدائل للمركزات البروتينة غالية الثمن بمركزات بروتينية مصنعة محليا مثل انتاج المركزات البروتينية المصنّعة من الاسماك الرخيصة الثمن والصغيرة (الشماع،1986؛ MAFF، 1998؛ NRC، 2001). ان بروتين السمك ذو درجة تحلل منخفضة جدا وبنسبة لا تتجاوز 35% في كرش المجترات (Ørskov ، 1982)، مما يقلل من كفاءة استخدامه في علائق تسمين المجترات او يحدد نسبة استخدامه في العلف اضافة الى زيادة سرعة مرور العلف نتيجة لزيادة كميات العلف المتناول من قبل حيوانات التسمين. استخدم مسحوق السمك منذ القدم في علائق الحيوان وخاصة الحيوانات وحيدة المعدة بأعتباره مصدر بروتيني جيد النوعية وعالي القيمة الغذائية لما يحتويه من احماض امينية ودهنية (الدهام،1977). كما ان الاسماك الصغيرة تمتاز برخص اسعارها ويمكن استخدامها كمصدر بروتيني محلي بعد تجفيفه تحت اشعة الشمس ومن ثم جرشه، إلا انه بطئ التحلل في كرش المجترات مقارنة مع المصادر البروتينية الاخرى مثل كسبة فول الصويا، مما يستلزم اجراء بعض المعاملات لجعله اكثر تحللاً في الكرش واستبداله بدلاً من كسبة فول الصويا الباهضة الثمن. ولغرض زيادة تحلل مسحوق السمك، يتم استخدام انزيم البروتيز التجاري لرفع ذائبية البروتين والذي ينعكس ايجابا على معامل الهضم. ولذلك فان الهدف من الدراسة الحالية هو زيادة درجة تحلل مسحوق السمك المتوفر والرخيص الثمن واستخدامه في تغذية المجترات بعد معاملته مع انزيم البروتيز التجاري وقياس نسبة البروتين الذائب وتأثيره على معامل هضم المادة العضوية مختبرياً.

مواد وطرق العمل:

اجريت هذه الدراسة في المختبر المركزي لقسم الانتاج الحيواني التابعة لكلية الزراعة في جامعة بغداد. تم شراء السمك الطازج المحلي المعروف محليا بالزوري، ابو خريزة، خشني، (Heckel) *Liza abu* من الاسواق المحلية في محافظة بغداد– العراق. وتم الحصول على أنزيم البروتيز التجاري (70000 وحدة \ غم) من شركة الخليج للتجهيزات الزراعية في بغداد \ السنك وتمت المعاملة وفقاً للحجوم كما يلي:

تم معاملة مسحوق السمك مع انزيم البروتيز بتركيز 1 و 2 و 3% (وزن \ حجم) بواقع 1غم : 1 لتر (سمك :محلول الانزيم) (Nicharee وآخرون، 2015) والحضن درجة حرارة 25 °م لمدة 15 دقيقة ثم جففت على حرارة 65 درجة مئوية لحين ثبات الوزن وتم خلط العلائق وفقاً للجدول 1. والحصول على العلائق التالية:

1- عليقة اضافة مسحوق السمك غير المعامل انزيمياً.

2- عليقة اضافة مسحوق السمك المعامل بانزيم البروتيز التجاري 3%.

3- عليقة اضافة كسبة فول الصويا.

تهيئة العلائق لتجربة الهضم المختبري:

تم تجهيز المواد الأولية للعلائق التجريبية من الأسواق المحلية، وشملت الشعير وكسبة فول الصويا ونخالة الحنطة فضلاً عن مسحوق السمك غير المعامل والمعامل كما في الفقرات اعلاه واخذت نماذج للتحليل الكيميائي (جدول 1).

اجريت كافة التحاليل الكيميائية في المختبر المركزي لكلية الزراعة / جامعة بغداد وذلك بعد طحن النماذج في مطحنة مختبرية قياس 1 ملم.

جدول 1. التركيب الكيميائي ونسب المواد الاولية للعلائق المركزة على اساس المادة الجافة %

التركيب الكيميائي	مسحوق السمك	كسبة فول الصويا	شعير	نخالة الحنطة	املاح وفيتامينات
المادة الجافة (غم مادة جافة \ 100 غم)	35.79	93.67	93.12	94.88	----
المادة العضوية	83.96	94.35	95.06	94.44	----
البروتين الخام	45.68	44.23	11.33	13.48	----
مستخلص الأيثر	20.49	2.45	1.99	1.22	----
الألياف الخام	0000	4.14	4.18	8.01	----
الكربوهيدرات الذائبة	17.79	43.53	77.56	71.73	----
الرماد	16.04	5.65	4.94	5.56	----
*الطاقة المتأيضه (ميكاجول/كغم مادة جافة)	14.3241	12.3683	13.0439	12.4385	----
العلائق	نسب المكونات الأولية للعلائق التجريبية المركزة (%)				
عليقة اضافة مسحوق السمك غير المعامل	14	00	42	42	2
عليقة اضافة مسحوق السمك المعامل مع انزيم البروتيز 3%	14	00	42	42	2
عليقة اضافة كسبة فول الصويا	00	14	42	42	2

*الطاقة المتأيضه (ميكاجول/كغم مادة جافة) = 0.012× البروتين الخام + 0.031× مستخلص الأيثر + 0.005× الألياف الخام + 0.014× الكربوهيدرات الذائبة .....(MAFF، 1975)

تم استبدال المصدر النتروجيني الرئيسي للعليقة والمتمثل بكسبة فول الصويا بمسحوق السمك غير المعامل والمعامل لإنتاج علائق متوازنة على أساس الطاقة والبروتين التالية:

العليقة الأولى = عليقة مركزة (100% مسحوق السمك غير المعامل).

العليقة الثانية = عليقة مركزة (100% مسحوق السمك المعامل مع 3% انزيم البروتيز).

العليقة الثالثة = عليقة مركزة 0% مسحوق السمك (100% كسبة فول الصويا) استخدمت فقط في تجربة الهضم المختبري. أخذت نماذج ممثلة للعلائق لغرض التحليل الكيميائي كما جاء في A.O.A.C. (2005) (الجدول2) ومزجت معاملات مسحوق السمك جميعا للحصول على عينة ممثلة لكون مكونات العلائق هي نفسها في معاملات التجربة والاختلاف يكون بالنسبة لطبيعة المعاملة الكيمائية المطبقة والتي لا تظهر فروقات في التحليل الكيمائي وتعطي نتائج داخل جسم الحيوان.

تقدير النتروجين الذائب الكلي والنتروجين البروتيني و غير البروتيني الأصل:

قدر النتروجين الذائب الكلي والنتروجين البروتيني و غير البروتيني الأصل كما في الطريقة الموصوفة من Kline وStewart (1949).

التحليل الكيميائي:

تم تقدير التركيب الكيميائي التقريبي باستعمال الطرائق القياسية المذكورة في A.O.A.C. (2005).

تقدير معامل هضم المختبري:

تم تقدير معامل الهضم المختبري للمادة الجافة والعضوية للمعاملات وفقاً لطريقة Tilleyو Terry (1963).

التحليل الإحصائي:

أُستخدم التصميم العشوائي الكامل(CRD)Completely Randomized Disgen ، ومعرفة الفروق المعنوية بين متوسطات المعاملات باختبار Duncan متعدد الحدود (Duncan، 1955) وباستخدام البرنامج الإحصائي الجاهز(SAS،2010).

جدول2. التركيب الكيميائي لعليقة اضافة فول الصويا او مسحوق السمك على اساس المادة الجافة (%)

الصفات المدروسة	عليقة فول الصويا	عليقة مسحوق السمك
المادة الجافة (غم مادة جافة\ 100 غم عليقة)	94.32	92.11
المادة العضوية	94.70	92.37
البروتين الخام	14.90	15.22
مستخلص الأيثر	4.36	6.41
الألياف الخام	5.12	4.87
الرماد	5.30	7.63
الكربوهيدرات الذائبة	70.00	66.19
*الطاقة المتأيضه (ميكاجول\كغم مادة جافة)	13.234	13.2852
*الطاقة المتأيضه (ميكاجول/كغم مادة جافة) = 0.012× البروتين الخام + 0.031× مستخلص الايثر + 0.005× الالياف الخام + 0.014× الكربوهيدرات الذائبة .....(MAFF، 1975).		

النتائج والمناقشة:

التأثير الرئيسي لمعاملة مسحوق السمك في التركيب الكيميائي:

تبين من دراسة التأثير الرئيسي للمعاملة في محتوى مسحوق السمك من المادة الجافة ومستخلص الايثر والنتروجين الكلي والرماد بالمقارنة مع مسحوق السمك غير المعامل (معاملة المقارنة)، زيادة نسبة مستخلص الايثر في المعاملة الأنزيمية الهاضمة للبروتينات ($P< 0.05$) والذي قد يكون نتيجة التأثير الانزيمي في تحليل وفصل البروتينات المرتبطة مع الدهون في الأغشية البلازمية للخلايا (جدول 3). لم تظهر زيادة معنوية في نسبة الرماد ونسبة النتروجين الكلي نتيجة للمعاملة الانزيمية الذي هو بالأساس مادة بروتينية الاصل (الدليمي، 2002).

جدول3. تأثير المعاملات في التحليل الكيميائي للسمك (% على اساس المادة الجافة) ± الخطأ القياسي

اسم العينة		المادة الجافة	مستخلص الايثر	النتروجين الكلي	الرماد
مسحوق السمك غير المعامل		35.79±0.66b	19.49±3.34b	7.30±0.36a	20.04±1.66a
مسحوق السمك المعامل		19.00±1.05a	23.82±1.79a	7.94±1.08a	20.61±1.29a
مستوى المعنوية		**	*	غ.م.	غ.م.
مسحوق السمك غير المعامل		$35.79±0.66^{a}$	$19.49±3.34^{bc}$	$7.30±0.36^{a}$	$20.04±1.66^{a}$
معاملات انزيم البروتيز	%1	$18.05±1.01^{bc}$	$27.76±1.65^{a}$	$7.03±0.49^{a}$	$20.46±0.40^{a}$
	%2	$22.69±0.66^{e}$	$25.68±2.77^{a}$	$8.47±0.27^{a}$	$20.99±1.50^{a}$
	%3	$16.25±0.90^{c}$	$18.04±1.46^{c}$	$8.31±1.82^{a}$	$20.39±3.22^{a}$
مستوى المعنوية		**	*	غ.م.	غ.م.

غ.م. = عدم وجود اختلافات معنوية، الاحرف المختلفة ضمن نفس العمود تعني وجود اختلافات معنوية

* وجود اختلاف معنوي عند مستوى 0.05 ** وجود اختلاف معنوي عند مستوى 0.01

ويلاحظ انخفاض المادة الجافة ($P<0.01$) بزيادة تركيز المعاملة لمسحوق السمك ولم يتاثر المحتوى النتروجيني والرماد بسبب المعاملة مع محاليل المعاملات. فيما ازدادت نسبة مستخلص الايثر ($P<0.05$) وبلغت اقصاها عند المعاملة مع انزيم البروتيز 1 و2%، ان زيادة نسبة مستخلص الايثر في المعاملة الانزيمية الهاضمة للبروتينات قد يكون نتيجة التأثير الانزيمي في تحليل وفصل البروتينات المرتبط مع الدهون في الاغشية البلازمية للخلايا (Mckee و Mckee، 1996) في حين لم يتأثر معنويا

تركيز 3% للانزيم مقارنة مع معاملة المقارنة والذي قد يكون بسبب زيادة التأثير التحللي للدهون الى مكوناتها من الاحماض الدهنية واستقلابها كمصادر للطاقة (الدليمي، 2002). ولم تؤثر المعاملة أو تراكيزها المختلفة على محتوى مسحوق السمك من الرماد.

تأثير المعاملة في نسبة النتروجين الذائب البروتيني وغير البروتيني الاصل لمسحوق السمك:

تبين من التأثير الرئيسي لمعاملة مسحوق السمك مع أنزيم البروتيز وجود زيادة عالية المعنوية ($P<0.01$) في نسبة النتروجين الذائب الكلي(0.26 %) مقارنة مع 0.18% لغير المعامل (جدول 4)، في حين لم توجد فروق معنوية في محتوى مسحوق السمك المعامل وغير المعامل من النتروجين الذائب غير البروتيني الاصل (Non protein nitrogen (NPN. وظهرت النتائج زيادة عالية المعنوية ($P<0.01$) في محتوى مسحوق السمك من النتروجين الذائب ذي الأصل البروتيني بسبب المعاملة مقارنة مع غير المعامل مما يدل على كفاءة تاثير المعاملة في تحلل بروتينات مسحوق السمك حيث كانت 0.12 % و 0.04% لكل من معاملة انزيم البروتيز ومعاملة المقارنة على التوالي. وأشارت المصادر الى ان معظم البروتين الذائب ذو الاصل البروتيني المتحلل في الكرش بنسبة لا تقل عن 12.2% يسبب زيادة في انتاج الحليب مع زيادة نسبة بروتين الحليب علما ان بروتين مسحوق السمك يتكون من 60% بروتين غير مهضوم في الكرش مقابل 40%مهضوم(NRC،2001؛ توفيق والعطار، 2014). واظهرت نتائج معاملة مسحوق السمك مع أنزيم البروتيز الهاضم للبروتينات الموضحة في الجدول 4. زيادة في محتوى المسحوق المعامل من النتروجين الذائب الكلي مقارنة مع غير المعامل وكان تفوق نسبة المعاملة مع أنزيم البروتيز 3% على المعاملات الاخرى ومعاملة المقارنة عالي المعنوية ($P<0.01$). فيما لم توجد فروق معنوية بين محتوى المسحوق المعامل وغير المعامل من النتروجين الذائب غير البروتيني الأصل(NPN) %، واثرت المعاملات بشكل ايجابي وعالي المعنوية ($P<0.01$) في محتوى مسحوق السمك من النتروجين الذائب البروتيني الاصل مقارنة مع المسحوق غير المعامل وكانت اعلاها في 3% انزيم تلتها 1% ثم 2% مقارنة مع معاملة السيطرة.

جدول4. تأثير المعاملة في نسبة النتروجين الذائب البروتيني وغير البروتيني الاصل (%) ± الخطأ القياسي

المعاملات		النتروجين الذائب الكلي	النتروجين الذائب غير البروتيني الاصل	النتروجين الذائب البروتيني الاصل
مسحوق السمك غير المعامل		0.18±0.01b	0.14±0.01a	0.04±0.01b
مسحوق السمك المعامل		0.26±0.02a	0.13±0.01a	0.12±0.02a
مستوى المعنوية		**	غ. م.	**
مسحوق السمك غير المعامل		0.18±0.01c	0.14±0.01a	0.04±0.01c
معاملات انزيم البروتيز	%1	0.24±0.02b	0.12±0.01b	0.12±0.01b
	%2	0.20±0.02b	0.14±0.01a	0.06±0.02c
	%3	0.33±0.03a	0.14±0.01a	0.19±0.03a
مستوى المعنوية		**	*	**

غ.م. = عدم وجود اختلافات معنوية، الاحرف المختلفة ضمن نفس العمود تعني وجود اختلافات معنوية

* وجود اختلاف معنوي عند مستوى 0.05 ** وجود اختلاف معنوي عند مستوى 0.01

معامل الهضم المختبري لمسحوق السمك المعامل بانزيم البروتيز Protease enzyme:

نتيجة للزيادة عالية المعنوية ($P<0.01$) في النتروجين الذائب الكلي لمعاملة مسحوق السمك مع انزيم البروتيز بتركيز 3%، تم متابعة هذا التحسّن ودراسة تاثيره في معامل الهضم المختبري مقارنة مع المسحوق غير المعامل او كسبة فول الصويا (جدول 5.). أشارت نتائج الهضم المختبري في علائق مسحوق السمك المعامل انزيميا فضلاً عن مسحوق السمك غير المعامل وكسبة فول الصويا إلى أنّ معاملة مسحوق السمك لم تؤدي زيادة معنوية في معامل الهضم المختبري للمادة الجافة وزيادة عالية المعنوية

(P<0.01) لمعامل هضم المادة العضوية لعليقتي كسبة فول الصويا ومسحوق السمك المعامل انزيميا بنسبة 3% مقارنة مع عليقة مسحوق السمك غير المعامل. أن انخفاض معامل هضم مسحوق السمك غير المعامل انزيميا يعود الى عدم حصول تهدم في البروتين الذي مصدره مسحوق السمك في الكرش وعدم اعطاء فرصة كافية لاحياء الكرش المجهرية للاستفادة منه للنمو والتكاثر مما ادى الى انخفاض معامل الهضم (Castillo وآخرون، 2014) مقارنة مع عليقتي كسبة فول الصويا او مسحوق السمك المعامل انزيميا، وهذا نراه واضحاً عند تقدير معامل الهضم المختبري للمادة العضوية التي بلغت 76.33% لعليقة مسحوق السمك غير المعامل مقارنة مع الزيادة العالية المعنوية (P<0.01) 87.89% لعليقة اضافة كسبة فول الصويا و 87.12% لعليقة اضافة مسحوق السمك المعامل بانزيم البروتيز 3% على التوالي.

جدول5. معامل الهضم المختبري للمادة الجافة والعضوية للعلائق التجريبية المركزة (%)± الخطأ القياسي

العلائق	معامل الهضم المختبري للمادة الجافة	معامل الهضم المختبري للمادة العضوية
عليقة اضافة كسبة فول الصويا	74.45 ±1.30a	87.89±1.11a
عليقة اضافة مسحوق السمك غير المعامل	70.00±1.52a	76.33±6.33b
عليقة اضافة مسحوق السمك المعامل مع انزيم البروتيز 3%	81.23±5.05a	87.12±3.67a
مستوى المعنوية	غ. م.	**

غ.م. = عدم وجود اختلافات معنوية الاحرف المختلفة ضمن نفس العمود تعني وجود اختلافات معنوية
** وجود اختلاف معنوي عند مستوى 0.01

المصادر :

الدهام، نجم قمر.1977. اسماك العراق والخليج العربي . الجزء الاول، منشورات مركز دراسات الخليج. جامعة البصرة. 546 ص.

الشماع، سميرة كاظم .1986 . تقييم امكانية تطوير الصناعات السمكية في الوطن العربي. الاتحاد العربي لمنتجي الاسماك. في وقائع المؤتمر الاول حول تطوير الصناعات الغذائية في الوطن العربي الكويت– 13– 16تشرين الاول 1986.

توفيق، جمال عبد الرحمن والعطار، شاكر عبد الامير حسن. 2014. علم التغذية. الدار الجامعية للطباعة والنشر والترجمة، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، الطبعة الاولى.

الدليمي، خلف صوفي داود . 2002. الانزيمات الميكروبية والتقنيات الحيوية. مطابع جامعة فيلادلفيا، الاردن.

A.O.A.C. 2005. Association of Official Chemists, Official Methods of Analysis, 14th Edn. Washington, D.C., U.S.A. 57-102.

Castillo, A.R., Burrola-Barrazab, M.E., Domínguez-Viverosb, J. and Chávez-Martínezb, A. 2014. Rumen microorganisms and fermentation. Arch Med Vet 46, 349-361.

Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test . Biometrics 11 : 1- 42

Kline, R.W., and Stewart, G.F. .1949. Glucose protein re-action dried egg albumin. Ind Eng. Chem.,40: 919-924.

MAFF. 1998. UK Tables of Nutritive Value and Chemical Composition of Feed Ingredients. Rowett Research Services Ltd., Aberdeen, AB2 9SB, UK.

MAFF. 1975. Ministry of Agric., Fisheries and Food Dept., of Agric. and Fisheries for Scotland Energy allowances and Feed systems for ruminants, Technical Bulletin, 33. First published.

Mckee, T. and J.R. Mckee . 1996 . Biochemistry , WCB , WM.C. Brown Publishers, U.S.A.

Nicharee, W., Sasithorn K. and Chalinee, C.2015. Production of Fish Protein Hydrolysates by Acid and Enzymatic Hydrolysis. J. of Medical and Bioengineering, 4(6): 466-470.

NRC, .2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.

Ørskov , E.R. 1982. Protein Nutrition in Ruminants . Academic Press Inc. London. England.

SAS. 2010. Statistical Analysis System for Windows V .6.13.

Tilley, J. M. A. and Terry, R. A. 1963. A two stage technique for in- vitro digestion of forage crops. J. Br. Grassld. Sci., 18: 104-111.