استخدام تقانة الإنزيمات المعزولة مختبرياً من البكتريا الخيطية *Streptomyces* sp. لاختزال التانينات في الذرة البيضاء *Sorghum bicolor* بديلاً عن الذرة الصفراء *Zea mays* في علائق صغار اسماك الكارب الشائع *Cyprinus carpio* L.

مهند حباس الاشعب أشواق موحان محسن مصطفى طالب الخطيب
علي عباس فاضل صادق جعفر جاسم سليمان داود محمد
عبدالله سيد حبيب

الملخص

هدفت الدراسة إلى استخدام أنزيم **Lignin peroxidase** المعزول مختبرياً ومحلياً من البكتريا الخيطية **(*Streptomyces* sp.) Filamentous bacteria** باستخدام الوسط التخميري الصلب لإنتاج الإنزيم المتحمل لدرجات الحرارة العالية ودرجة الحامضية لغرض اختزال التانينات في الذرة البيضاء ***Sorghum bicolor*** واستعمالها بديلاً عن الذرة الصفراء***Zea mays*** في تغذية صغار أسماك الكارب الشائع ***Cyprinus carpio* L.**. أجريت الدراسة في مختبرات مركز الثروة الحيوانية والسمكية–دائرة البحوث الزراعية والبايولوجية– وزارة العلوم والتكنولوجيا لمدة **80** يوماً ابتداءً من **2016/5/25–2016/3/7**. قُدر نشاط الإنزيم باستخدام مركب **2,4-dichlorophenol** كمادة أساس، أظهرت نتائج التحليلات الكيميائية للذرة البيضاء بعد معاملتها بالإنزيم قبل الطحن وبعده انخفاضاً في مستوى التانينات والألياف وارتفاعاً في نسبة البروتين. غُذيت الأسماك (معدل وزن **25.12 ±3.75** غم/سمكة) على سبع علائق تجريبية تحوي مستويين إحلال الذرة البيضاء بدل الذرة الصفراء، المعاملتان الأولى والثانية استخدام الذرة البيضاء بدون معاملة بإحلالين **50** و**100%** عن الذرة الصفراء، المعاملتان الثالثة والرابعة استخدام الذرة البيضاء معاملة بالإنزيم المستخلص قبل طحنها (**80** مل/كغم) بمستوى الإحلال نفسه المذكور انفاً، المعاملتان الخامسة والسادسة استخدام الذرة البيضاء معاملة بالإنزيم المستخلص بعد طحنها (**80** مل/كغم) بمستوى الإحلال نفسه المذكور انفاً ، المعاملة السابعة للمقارنة بدون ذرة بيضاء. أظهرت النتائج أفضلية المعاملتين الخامسة والسادسة، إذ تفوقتا على المعاملات جميعها في دلائل النمو (معدل الزيادة الوزنية الكلية واليومية ومعدل النمو النسبي%) ومعامل وكفاءة تحويل الغذاء ومعامل الهضم الظاهري.

المقدمة

تُعَد كل من التغذية ونوعية الغذاء المستعمل في تربية الأسماك من المسببات الرئيسة في زيادة كلفة الإنتاج في مزارع تربية الأسماك. فهناكَ العديد من المحاولات لتقليل كلفة صناعة علائق الأسماك بواسطة خفض نسبة البروتين الحيواني في العليقة أو استبدال أحد عناصرها بمواد علفية أو غذائية غير تقليدية ومنها مخلفات الصناعات الغذائية والمحاصيل الزراعية الأخرى كالذرة البيضاء ***Sorghum bicolor*** التي تعد من المحاصيل التي تستخدم مصدراً للطاقة في تغذية الأسماك والدواجن، فضلاً عن استخدامها غذاءً للإنسان في مناطق مختلفة من العالم، مما أدى ذلك إلى زيادة الطلب عليها وبالتالي زيادة أهميتها (**11**). ويعد محصول الذرة البيضاء البديل الرئيس للذرة الصفراء في علائق الدواجن وذلك بسبب التقارب في محتواهما من الطاقة والأحماض الأمينية والعناصر الغذائية الأُخرى (**4**).

وزارة العلوم والتكنولوجيا ، بغداد، العراق.

إن احتواء الذرة البيضاء على بعض المركبات المضادة للتغذية وهي التانينات **Tannin** التي تعد من المركبات الفينولية لها وزن جزيئي اكبر من **500** دالتون مقاومة للحرارة ولها القدرة على تكوين معقدات مع كل من البروتين والكربوهيدرات وذلك بواسطة الروابط الهيدروجينية ويكون ميلها للارتباط بالبروتين اكبر بعض الشيء ويتوقف هذا على درجة الأس الهيدروجيني وترتبط التاتينات ببروتينات إنزيمية فتثبطها كما يحدث مع إنزيمي **amylase** و**Trypsine** (**10**)، وهذه المركبات قد تتداخل مع وظائف الهضم الطبيعية وهذا يعود إلى قدرتها على الارتباط مع البروتينات وترسبها أوتخثرها وبضمنها الأنزيمات الهاضمة (**9**، **15**) وبذلك تقلل من هضم وامتصاص العناصر الغذائية داخل القناة الهضمية ذات الهضم الإنزيمي (**13**). أن حبيباتَ النشأ في الذرة البيضاء تكون محاطة بقالب بروتيني يجعل تأثير الأنزيمات الهاضمة فيها صعباً مع وجود قنوات أو مسامات على حبيبات النشأ التي تكون مواقع لدخول الإنزيمات الهاضمة (**7**)، تسبب استخدام الذرة البيضاء ذات المحتوى العالي من التانين في تغذية الأسماك تأثيرات سلبية في أداء الإنتاج إذ تؤدي إلى انخفاض وزن الجسم الحي (**19** و**22**) وكذلك انخفاض معدل الزيادة الوزنية (**18**) . وقد أجرت العديد من الدراسات لإيجاد طرائق للتخلص أو التقليل من الآثار السلبية التي يسببها التانين ومنها المعاملة الحرارية والكيميائية والإنزيمية أو إجراء عملية الإنبات (**2**). تكون عملية استخلاص الإنزيمات المعزولة من البكتريا واستخدامها في تثبيط عمل التانينات أكفأ من عمليات الإنبات والمعاملات الحرارية والنقع بالماء لأنها تمتلك تأثيرات بيولوجية وحيوية في تقليل تأثير التانينات فضلاً عن خفض مستوى الألياف وزيادة مستوى البروتين مما يزيد من القيمة الغذائية للذرة البيضاء. يهدف البحث إلى استخدام تقانة الإنزيمات المعزولة مختبرياً من البكتريا الخيطية ***Streptomyces* sp.** لاختزال التانينات في الذرة البيضاء وزيادة قيمتها الغذائية ودراسة تأثير استخدام الذرة البيضاء المعاملة بالإنزيم وغير المعاملة في دلائل نمو ومعامل وكفاءة تحويل الغذاء ومعامل الهضم في أسماك الكارب الشائع من خلال إجراء تجربتي تغذية وهضم.

المواد وطرائق البحث

تحضير الانزيم

حضرَ إنزيم **Lignin peroxidase** المعزول مختبرياً ومحلياً من البكتريا الخيطية ***Streptomyces sp*** في مختبرات دائرة البحوث الزراعية–مركز التقانات الإحيائية باستخدام الوسط التخميري الصلب لإنتاج الإنزيم المتحمل لدرجات الحرارة العالية، أضيفَ **20** غم من تبن الحنطة المطحون إلى دورق حجمي **1000**مل وأضيف له ماء مقطر يحتوي **0.5**% من مستخلص الخميرة مصدراً للنتروجين ورطوبة **65**% وتعقم بواسطة الموصدة **Autoclave**. يبرد المزيج ثم أضيفت العزلة المنشطة بعمر**7**أيام بنسبة**10:1** إلى المخلف الزراعي ومزجت بواسطة قضيب زجاجي وحضنت على درجة حرارة **40**مْ لمدة **5** أيام، حصد الزرع بعد الحضن وأضيف له **100** مل ماء لاأيوني معقم يحتوي على **0.05** مولاري دارئ الفوسفات (**pH=7**)، يمزج جيداً في التجميد لمدة **30**دقيقة ورشح بورق ترشيح ثم أجريت له طرد مركزي **4000** د/د لمدة **15** دقيقة في التبريد، اخذ الراشح واستخدم كإنزيم خام محلي وحفظ بالتجميد بدرجة– **20** مْ. تمت معاملة الذرة البيضاء (قبل الطحن وبعده) بالإنزيم المحلي المنتج قبل الإستعمال بمدة **24** ساعة بنسبة **8**% ثم يمزج جيداً ويترك لمدة **24** ساعة على درجة حرارة **40** مْ في الظلام (**5**). وتم التحري عن قدرة البكتريا لإنتاج الإنزيم اللازم لتحليل التانينات بطريقة فحص الأطباق **Plate assay** ونقلت بواسطة **loopful** من المستعمرات النقية ولقحت في وسط بتري بوسط تحلل التانينات وحضنت ولوحظ تحلل التانينات دلالة على قدرتها على تشخيص إنزيم **Lignin peroxidase**.

فحص نشاط وفعاليةالإنزيم المستخلص

قدر نشاط إنزيم **Lignin peroxidase** في مختبرات دائرة البحوث الزراعية – مركز التقانات الإحيائية باستخدام مركب **2,4-dichlorophenol** كمادة أساس، الحجم النهائي للمواد المتفاعلة **1** مل (**200** مايكروليتر **0.1** مولاري دارئ **phosphate potassium** (**7.0pH**) والراشح الزرعي. يبدأ التفاعل بإضافة **200** مايكروليتر من **50** مايكرومول من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ثم يقرأ كل دقيقة على امتصاصية **510** نانومتر، الرقم المحسوب يستخدم معاملاً للكفاءة (**21cmM*647**) (**20**).حُسبَ نشاط الإنزيم حسب المعادلة التالية:

$$1\ \text{Unit} = \frac{AE / At \times V}{S \times V \times t}$$

AE/ At = الزيادة بالامتصاصية ، **V** = حجم المحلول بالخلية الضوئية

S = معامل الكفاءة ، **V** = حجم الأنموذج ، **t** = الوقت بالدقيقة

تصميم التجربة

أجريت تجربة التغذية في مختبرات مركز الثروة الحيوانية والسمكية (مختبر تغذية الأسماك)– دائرة البحوث الزراعية والبايولوجية – وزارة العلوم والتكنولوجيا لمدة **80** يوماً ابتداءً من **2016/3/7–2016/5/25**، جلبت الأسماك من احدى المزارع الأهلية في قضاء المحاويل (محافظة بابل) ووضعت في أحواض كبيرة سعة **2.5** $م^3$ مجهزة بالأوكسجين بصورة مستمرة واستخدمت منها **98** سمكة للكارب شائع ***Cyprinus carpio* L.** وأُقلِمت في ظروف المختبر لمدة **15** يوماً قبل بدء إجراء التجارب عليها باستعمال الأحواض الزجاجية (نظام التربية والتغذية بعليقة التجربة وعدد الوجبات مع وقت التغذية فضلاً عن نسبة الغذاء المقدم)، بلغ معدل وزن الأسماك **25.12** غم/سمكة **±3.75** التي وزعت عشوائياً على **14** حوضاً زجاجياً سعة **75** لتراً ماءً وبأبعاد (**30**سم×**35**سم×**80** سم) وبواقع سبع أسماك/حوض وعلى مكررين/معاملة. قيست تراكيز الأوكسجين المُذاب ودرجات الحرارة ودرجة الحامضية في أحواض التجربة للسيطرة على جودة المياه باستخدام جهاز قياس تركيز الأوكسجين المُذاب في الماء نوع **YSI Model SIB** أمريكي المنشأ، وجهاز قياس درجة الحامضية للماء نوع **SaffronWalden C16t WPA** إنكليزي المنشأ. صُنْعِتْ سبع علائق تجريبية مختبرية لتغذية الأسماك (جدول **1**) كما يأتي:

1. العليقة الأولى (T_1) استخدام الذرة البيضاء بدون معاملة بإحلال **50%** عن الذرة الصفراء.
2. العليقة الثانية (T_2) استخدام الذرة البيضاء بدون معاملة بإحلال **100%** عن الذرة الصفراء.
3. العليقة الثالثة (T_3) استخدام الذرة البيضاء (معاملة الذرة البيضاء حبوباً كاملة قبل الطحن بالإنزيم المستخلص(**80**مل/كغم ثم طحنها) بنسبة إحلال **50%** عن الذرة الصفراء.
4. العليقة الرابعة (T_4) استخدام الذرة البيضاء (معاملة الذرة البيضاء كحبوب كاملة قبل الطحن بالإنزيم المستخلص (**80**مل/كغم ثم طحنها) بنسبة إحلال **100%** عن الذرة الصفراء.
5. العليقة الخامسة (T_5) استخدام الذرة البيضاء (معاملة الذرة البيضاء بعد الطحن بالإنزيم المستخلص (**80**مل/كغم) بنسبة إحلال **50%** عن الذرة الصفراء.
6. العليقة السادسة (T_6) استخدام الذرة البيضاء (معاملة الذرة البيضاء بعد الطحن بالإنزيم المستخلص **80**مل/كغم) بنسبة إحلال **100%** عن الذرة الصفراء.
7. العليقة السابعة (T_7) عليقة المقارنة بدون ذرة بيضاء.

المعايير المدروسة

الزيادة الوزنية الكلية غم/سمكة= الوزن النهائي غم/سمكة – الوزن الإبتدائي غم/سمك.
الزيادة الوزنية اليومية غم/سمكة/يوم= الزيادة الوزنية غم/سمكة/عدد أيام التجربة
معدل النمو النسبي%= (الزيادة الوزنية غم/سمكة ÷ الوزن الابتدائي غم/سمكة) ×100
معامل التحويل الغذائي= الغذاء المقدم للأسماك غم/سمكة ÷ الزيادة الوزنية الرطبة غم/سمكة.
(28).
كفاءة التحويل الغذائي%= الزيادة الوزنية الرطبة غم/سمكة÷ الغذاء المقدم غم/سمكة(21).
معامل الهضم الظاهري%= 100–(100×Cr_2O_3 في الغذاء÷Cr_2O_3 في الفضلات) (8).

التحليلات الكيميائية

أخذت نماذج من الذرة البيضاء المعاملة إنزيمياً وغير المعاملة والعلائق التجريبية المختبرية لإجراء التحليلات المختلفة في مختبرات دائرة البحوث الزراعية لمعرفة التركيب الكيميائي للعلائق (جدول 1). قدّرت الرطوبة والبروتين الخام ومستخلص الأيثر والرماد والألياف بالاعتماد على الطرائق القياسية المعتمدة في (6)، وحسبت الكربوهيدرات الذائبة **Nitrogen Free Extract(NFE)** رياضياً بطريقة الفرق (29)، كما يأتي:

الكربوهيدرات الذائبة =100– (البروتين% مستخلص الأيثر%+الرماد%+الألياف%) في جدول (1).

جدول 1 : مكونات العلائق التجريبية المستخدمة والتحليل الكيميائي محسوباً على المادة الجافة%

المواد العلفية	ذرة بيضاء غير معاملة		ذرة بيضاء كاملة معاملة بالإنزيمات قبل طحنها		ذرة بيضاء معاملة بالإنزيمات بعد طحنها		المقارنة
	T1 50% إحلال عن الذرة الصفراء	T2 100% إحلال عن الذرة الصفراء	T3 50% عن الذرة الصفراء	T4 100% إحلال عن الذرة الصفراء	T5 50% إحلال عن الذرة الصفراء	T6 100% عن الذرة الصفراء	T7 بدون ذرة بيضاء
بروتين حيواني[1]	10	10	10	10	10	10	10
كسبة الصويا	25	25	25	25	25	25	25
ذرة صفراء	8	0	8	0	8	0	16
ذرة بيضاء	8	16	8	16	8	16	0
شعير محلي	22	22	22	22	22	22	22
نخالة ناعمة	25	25	25	25	25	25	25
فيتامينات وأملاح[2]	2	2	2	2	2	2	2
التركيب الكيميائي للعلائق المختبرية محسوبة على المادة الجافة %							
بروتين خام	28.38	29.04	28.34	28.74	28.22	28.51	28.14
مستخلص الأيثر	6.81	6.75	6.66	6.29	6.88	6.57	6.73
الألياف	6.12	6.22	6.35	6.65	6.47	6.19	7.66
الرماد	7.21	7.48	7.19	7.32	7.58	7.49	7.41
الكربوهيدرات الذائبة	51.48	50.51	51.46	51.00	50.85	51.24	50.06
الطاقة الأيضية[3]	1472.11	1469.12	1466.05	1454.83	1462.75	1463.19	1445.61

[1] مركز بروتيني من إنتاج شركة بروفيمي الأردنية ، طاقة أيضية 2200 كيلو سعره ، بروتين 50% ، دهن 6% ، ألياف 2.5% ، كالسيوم 7% ، فسفور 3% ، لايسين 3% ، ميثايونين + سستين 2.5% .

[2] خليط فيتاميناتأملاح من إنتاج شركة سوبرافيت الأردنية. (3) حسبت الطاقة الممثلة إعتماداً على المعادلة التي ذكرها (26) وكما يأتي: **ME (MJ) = protein × 18.8 + fat × 33.5 + NFE × 13.8**

تجربة الهضم

اجريت تجربة الهضم بإضافة أوكسيد الكروم Cr_2O_3 بنسبة 1% إلى المواد العلفية وصنعت على شكل حبيبات مع وقف تقديم الغذاء للأسماك لمدة يومينثم غذيت الأسماك في آخر أسبوعين وفقَ النظام المتبع في تجربة التغذية مع المراقبة في اثناء التغذية لغرض جمع الفضلات حال خروجها من الأسماك (8). جمعت الفضلات وجففت

وخلطت فضلات أيام عديدة للمعاملة نفسها وهي جافة وخزنت في المجمدة (-20مْ) لحين إجراء التحليلات الكيميائية لها (30)، أجري حساب المنحني القياسي لقياس تركيز أوكسيد الكروم Cr_2O_3 (14).

الكشف عن وجود التانينات

يغلى 5 غم من مسحوق الذرة البيضاء مع 50 مل من الماء المقطر ثم يرشح المحلول الناتج ويترك يبرد. يقسم الراشح إلى قسمين، أضيفَ للقسم الأول1 % من خلات الرصاص ويظهر راسب هلامي القوام يدل على أنَ الكشف سالب. بينما أضيف للقسم الثاني1 % كلوريد الحديديك ($FeCl_2$) ويظهر لون اخضر مزرق يدل على أنَ الكشف موجب ووجود المواد القابضة Tannins(25).

تقدير التانينات

يؤخذ 0.5 غم من مسحوق الذرة البيضاء في 25 مل ماء مقطر وعلى حمام مائي يغلى لمدة 30 دقيقة، ثم يجرى للخليط طرد مركزي بسرعة 2000 د/د لمدة 20 دقيقة وينقل الرائق منه إلى دورق حجمي سعة 100 مل، يكمل الحجم إلى العلامة بالماء المقطر. يضاف للمحلول 20 مل من خلات الرصاص 4%مع الرج المستمر لمدة ساعة واحدة، رشح المحلول بواسطة ورق ترشيح نوع داتمان رقم واحد، نقل المتبقي على ورق الترشيح إلى جفنة خزفية وجففت في فرنـ105مْ لمدة ساعة،توزن الجفنة (T1) ويحرق الأنموذج في المحرقة على حرارة 500مْ ثم توزن الجفنة مرة أخرى(T2) وحسبت للتانينات على الوزن الجاف (1 و 23) كما المعادلة في أدناه:

$$\text{نسبة للتانينات (\%)} = \frac{T1 - T2}{\text{وزن الأنموذج}} \times 100$$

التحليل الاحصائي

استخدم التصميم تام التعشية Complete Randomized Design(CRD) في تحليل تأثير المعاملات في الصفات المدروسة واختبرت الفروق المعنوية بين متوسطات الصفات وفق اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى معنوية $p\leq0.05$ (12) وحسب برنامج الإحصاء الجاهز Statistical Analysis System (24) في تحليل البيانات.

النتائج والمناقشة

تحليل الذرة البيضاء ومستوى التانينات

يتضح من خلال جدول (2) اختلاف قيم العناصر الغذائية للذرة البيضاء باختلاف المعاملات المختلفة مقارنةً بالذرة الصفراء، إذ ارتفعت قيم البروتين للمعاملات جميعها وكانت أفضلها الذرة البيضاء المعاملة بالإنزيم قبل وبعد الطحن فبلغتا 12.82 و 13.74% على التوالي مقارنةً للذرة غير المعاملة وكانت 10.25%. ولوحظ وجود اختلافات طفيفة بين قيم الدهن وكانت الأفضل الذرة البيضاء غير المعاملة وبلغت 2.8% والأقل كانت للذرة البيضاء المنبتة لمدة 72 ساعة وكانت 2.1%، فيما أظهرت انخفاضاً في قيم الألياف للذرة البيضاء المعاملة بالإنزيم قبل وبعد الطحن وكانتا 1.5 و0.9% على التوالي وكانت أعلى قيمة للذرة البيضاء غير المعاملة وكانت 2.5%. كما أظهر الجدول وضوح تأثير المعاملات المختلفة في تراكيز التانينات، إذ انخفضت للمعاملات جميعها وكانت أقل قيمة للذرة البيضاء المعاملة بالإنزيم قبل وبعد الطحن 0.112 و0.102%، فيما كانت 0.133، 0.122 و0.131% للذرة البيضاء المنبتة لمدد 24، 48 و72 ساعة على التوالي، في حين كانت0.152% للذرة البيضاء المعاملة بالموصدة. يتبين من خلال النتائج بأن استخدام إنزيم Lignin peroxidase المستخلص مختبرياً من البكتريا الخيطية كان

أكثر كفاءة في اختزال مركبات التانينات من معاملات الإنبات فضلاً عن تحسين القيمة الغذائية للذرة البيضاء، إذ ارتفعت نسبة البروتين وخفضت نسبة الألياف. وقد يعود السبب إلى أن الإنزيم المستخلص يتميز بخصائص تسريع التفاعل الكيميائي دون أن تستهلك أثناء التفاعل وتعود الى حالتها الطبيعية بعد الإنتهاء من عملها، فالكمية المطلوبة من المستحضر الإنزيمي تختص بالدرجة الأولى بتركيز المادة المستعملة في التغذية، وهذا ما يجب أخذه بعين الاعتبار عند استخدام المعاملة بالإنزيمات لتحسين القيمة الغذائية للمادة العلفية (4)، ويبدو أن المعاملة الحرارية بالموصدة للذرة البيضاء لم تكن مناسبة في اختزال التانينات وتحسين القيمة الغذائية.

جدول 2: التحليل الكيميائي ونسب التانينات للذرة البيضاء المعاملة بمعاملات مختلفة ونسب الذرة الصفراء

العناصر الغذائية	ذرة بيضاء خام بدون معاملة	ذرة بيضاء معاملة بالأنزيم قبل الطحن	ذرة بيضاء معاملة بالأنزيم بعد الطحن	ذرة بيضاء منبتة لـ 24 ساعة	ذرة بيضاء منبتة لـ 48 ساعة	ذرة بيضاء منبتة لـ 72 ساعة	ذرة بيضاء معاملة حرارياً بالموصدة	ذرة صفراء
بروتين خام	10.25	12.82	13.74	10.85	11.87	10.78	10.11	9.02
مستخلص الايثر	2.8	2.9	2.7	2.4	2.4	2.1	2.3	2.6
الألياف	2.5	1.5	0.9	2.3	2.1	2.0	2.2	2.7
الرماد	2	1.7	1.8	1.9	1.9	1.8	2	1.9
* التانينات	0.159	0.112	0.102	0.133	0.122	0.131	0.152	0.0179

الصفات المدروسة

دلائل النمو (الزيادة الوزنية الكلية واليومية ومعدل النمو النسبي)

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي للزيادة الوزنية الكلية تفوقاً غير معنوياً للمعاملتين بالإنزيم بعد الطحن 5 و6 مع معاملة المقارنة 7ومعاملة بالإنزيم قبل الطحن الإحلال 100% (T4) وكانت 18.16 و20.64 و17.21 و16.6غم/سمكة على التوالي، فيما ارتفعت معنوياً ($p\leq0.05$) عن بقية المعاملات 1 و2 و3 وسجلت 13.04، 13.41 و15.23 غم/سمكة. وكانت نتيجتي الزيادة الوزنية اليومية ومعدل النمو النسبي متوافقتين مع نتائج الزيادة الوزنية، إذ أوضحتا تفوقاً غير معنوياً للمعاملتين بالإنزيم بعد الطحن T_5 وT_6 وكانتا 0.227 و0.258 غم/سمكة/يوم على التوالي عن المعاملتين 4 و7 وكانتا 0.207 و0.215غم/سمكة/يوم على التوالي للزيادة الوزنية اليومية، في حين أظهرت النتائج تفوقاً معنوياً ($p\leq0.05$) للمعاملات 4، 5، 6 و7 عن المعاملات 1، 2 و3. أما معايير معدل النمو النسبي فسجلت عدم وجود فروق معنوية ما بين المعاملات 4، 5، 6 و7 وكانت 65.15، 74.09، 82.26 و67.55% على التوالي والتي تفوقت معنوياً ($p\leq0.05$) جميعاً على المعاملات 1، 2 و3 وكانت 51.99، 53.26 و59.77% على التوالي (جدول 3).

معامل التحويل وكفاءة الغذاء ومعامل الهضم

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي لمعياري التحويل الغذائي أفضلية المعاملة بالإنزيم بعد الطحن لمستوى الإحلال للمعاملتين 5 و6 والمقارنة 7 وكانت 3.09، 2.91 و3.01 على التوالي وتفوقت معنوياً ($p\leq0.05$) عن باقي المعاملات 1، 2، 3 و4 وكانت 3.83، 3.68، 3.43 و3.10 على التوالي (جدول 3). أما قيم كفاء التحويل الغذائي فقد اظهرت عدم وجود فروق معنوية ما بين المعاملات 4، 5، 6 و7 وكانت 32.29، 32.31، 34.48 و33.21% على التوالي، فيما كانت المعاملات الـ 1، 2 و3 قد سجلت 26.13، 27.18 و29.16% على التوالي أقل القيم، والأخيرة لم تختلف معنوياً عن المعاملتين 4 و5، واظهرت معايير معامل الهضم ارتفاعاً غير معنوياً

للمعاملتين 5 و6 مع المعاملتين 4 و7 وكانت 73.65، 77.19، 69.28 و70.09% على التوالي، فيما سجلت تفوقاً معنوياً ($p\leq0.05$) مع المعاملات 1، 2 و3 وكانت 62.21، 57.71 و64.81% على التوالي (جدول 3).

توضح النتائج المذكورة آنفاً ارتفاعاً لقيم المعاملات المعرضة بالإنزيم بعد الطحن لمستويي الإحلال 50 و100% عن الذرة الصفراء، ولعل السبب في ذلك إلى التأثيرات الواضحة في الإنزيم المستخلص مختبرياً من البكتريا ***Streptomyces* sp.** قد خفضت من نسبة تأثير التانينات في الذرة البيضّاء فضلاً عن إنها قللت من تأثير الطعم المر اللاذع وبالتالي أدت إلى زيادّة استساغة العلف والاستفادة منها من قبل الأسماك، هذا ما تمت ملاحظته من خلال ارتفاع قيمتي الزيادة الوزنية الكلية واليومية اللتين كانتا متوافقتين مع قيم معدلات النمو النسبي. ولوحظَ قيمتي المعاملتين 3 و4 (معاملة الذرة البيضاء بالإنزيم قبل الطحن) كانتا منخفضتين قياساً بقيمتي المعاملتين 5 و6 (معاملة الذرة البيضاء بالإنزيم بعد الطحن) والمقارنة (المعاملة 7)، وقد يعود السبب إلى أن الذرة البيضاء الكاملة غير المطحونة لم تتأثر في الإنزيم مقارنةً بالذرة البيضاء المطحونة، أي أن عملية الطحن للذرة البيضاء قد أسهمت في تسهيل تأثير فعالية الإنزيم المستخلص في خفض نسب وتأثير مركبات التانينات في الذرة البيضاء فضلاً عن زيادة مستوى البروتين وخفض مستوى الألياف، وهذا يتبين من خلال تقدير مستويي التانينات في الذرة البيضاء قبل وبعد الطحن (جدول 2). ويبدو أن إنزيم **Lignin peroxidase** المستخلص من البكتريا الخيطية المضاف كان له تأثير في تفكيك البنية الخلوية المعقدة لمركبات التانينات التي لا تتفكك عادةً بواسطة الإنزيمات الهاضمة للأسماك، وبهذا قد تم تحرير العناصر الغذائية وزيادة المتاح من السكريات والبروتينات المخزنة إضافةً إلى زيادة القيمة الغذائية للذرة البيضاء المعاملة (جدول 2)، وهذا يتبين من خلال التحسن الحاصل في دلائل النمو وكفاءة تحويل الغذاء ومعامل الهضم (جدول 3)، وهي تتفق مع ما ذكرهُ **Acamovic** (4) بأن الإنزيمات الطبيعية المضافة إلى علائق الحيوانات تسهم في تفكيك العوامل المضادة للتغذية. ويبدو أن إنزيم **Lignin peroxidase** المعزول من البكتريا الخيطية كان له تأثير في الخواص البايولوجية للتانينات مما تفقد خاصيتها في تكوين الروابط الهيدروجينية وبالتالي لا تتمكن من تكوين معقدات البروتين والكربوهيدرات وتكون حرة في تحللها إلى مركبات بسيطة جاهزة للامتصاص مما انعكس إيجابياً على دلائل النمو ومعامل وكفاءة الغذاء، وأشار **Hamid** (16) إمكان ارتباط التانينات بالنشأ مما يقلل من هضمها لها بدرجة كبيرة، ونظراً لتمركز هذه المركبات في القشرة فان إزالة الأخيرة مع النقع قد لا تخفض من محتواها. أن تقليل نسبة التانينات في الذرة البيضاء يؤدي إلى تحسنٌ في قيمّة البروتينٌ المجهز للأسماك في العليقّة وجاهزيةٌ الأحماض الأساس إضافة إلى التحسن الحاصل في العليقّة نتيجة لزيادة هضم البروتينٌ والنشأ من خلال تقليل التأثير السلبي للتانينات في الإنزيمّات الهاضمة لان عملية إضافة الإنزيمات قد أدت إلى تحفزٌ وزيادّة نشاط الإنزيمّات التي تعمل على فك إرتباط التانينات مع البروتينٌ والنشأ (19). ويبدو أن الإنزيم المستخلص مختبرياً إضافة إلى خفض نسبة التانين كان لهُ ايضاً تأثير في تحرير وتحطيم السكريات العديدة غير المهضومة داخل الجهاز الهضمي الموجودة داخل خلايا أغلفة الحبوب من العائلة النجيلية كالبيتا–كلوكانيز **β-Glucanes** وسكر البنتوز **Pentose** والسليلوز والبكتين **Pectin** (17)، إذْ إنَ هذه الإنزيمات تسمح بتحطيم وتجزئة المواد الأولية وبذلك تساعد على امتصاص هذه الأغذية التي ينتج عنها في النهاية تحسين فعالية هذه المواد الأولية مما أدى إلى تحسن قيم معامل التحويل وكفاءة الغذاء ومعامل الهضم (27). والإنزيمات التي من أصل بكتيري تكون أكثر ثباتاً للحرارة إذ تتحمل حتى درجة 80°م ويجب إيجاد المعيار والكمية المثلى التي يمكن أن تستعمل، وبذلك أنها قد تحملت الحرارة العالية الناتجة من عملية تصنيع العلائق، مع الأخذ بنظر الاعتبار بأن الزيادة في كمية الإنزيم كثيراً قد لا تكون مناسبة وقد تعطي نتائجاً عكسية

جدول 3: تأثير استخدام الذرة البيضاء بالإنزيم في المعايير المدروسة (المتوسط ±الخطأ القياسي)

المعايير المدروسة	ذرة بيضاء خام غير معاملة		ذرة بيضاء كاملة معاملة بالإنزيمات قبل طحنها		ذرة بيضاء معاملة بالإنزيمات بعد طحنها		المقارنة بدون ذرة بيضاء
	T1 إحلال 50% عن الذرة الصفراء	T2 إحلال 100% عن الذرة الصفراء	T3 إحلال 50% عن الذرة الصفراء	T4 إحلال 100% عن الذرة الصفراء	T5 إحلال 50% عن الذرة الصفراء	T6 إحلال 100% عن الذرة الصفراء	T7 معاملة المقارنة بدون ذرة بيضاء
الوزن الابتدائي (غم/سمكة)	25.08 2.14 ± a	25.08 1.34 ± a	25.48 2.42 ± a	25.14 2.33 ± a	24.51 3.85 ± a	25.09 2.06 ± a	25.48 1.51 ± a
الوزن النهائي (غم/سمكة)	38.12 3.24 ± b	38.49 2.13 ± b	40.71 1.05 ± ab	41.74 1.11 ± ab	42.67 1.58 ± ab	45.73 1.12 ± a	42.69 2.28. ± ab
الزيادة الوزنية (غم/سمكة)	13.04 1.82 ± c	13.41 2.19 ± c	15.23 2.51 ± b	16.6 2.41 ± ab	18.16 3.17 ± a	20.64 2.47 ± a	17.21 3.19 ± ab
الزيادة الوزنية اليومية (غم/سمكة/يوم)	0.163 0.54 ± c	0.169 0.58 ± c	0.192 0.34 ± b	0.207 0.48 ± a	0.227 0.22 ± a	0.258 0.37 ± a	0.215 0.25 ± a
معدل النمو النسبي (%)	51.99 2.91 ± c	53.26 3.04 ± c	59.77 2.71 ± c	65.15 1.44 ±ab	74.09 1.08 ± a	82.26 3.11 ± a	67.55 2.71 ± ab
العلف المتناول (غم/سمكة)	49.91 3.41 ± b	49.33 2.61 ± b	52.19 2.31 ± b	51.41 1.08 ± b	56.21 3.51 ± a	59.87 2.28 ± a	51.85 3.31 ± b
معامل التحويل الغذائي	3.83 2.02 ± c	3.68 1.58 ± c	3.43 1.42 ± c	3.10 1.04 ± b	3.09 1.11 ± ab	2.91 1.24 ± a	3.01 2.34 ± a
كفاءة التحويل الغذائي (%)	26.13 1.51 ± c	27.18 2.44 ± c	29.19 2.79 ± bc	32.29 2.81 ± ab	32.31 2.09 ± ab	34.48 1.87 ± a	33.21 2.76 ± ab
معامل الهضم (%)	62.21 3.24 ± c	57.71 3.08 ± c	64.81 2.47 ± bc	69.28 2.82 ± a	73.65 2.34 ± a	77.19 1.85 ± a	70.09 2.34 ± a

المتوسطات التي لها حروف متشابهة في الصفوف لا تختلف فيما بينها معنوياً عندَ مستوى احتمالية $p \leq 0.05$.

وبالتالي تضر بالعملية الإنتاجية (3)،إن الهدف من إضافة الإنزيمات إضافة إلى ثبيط التانينات هو زيادة نسبة هضم السكريات والبروتينات والدهون وبالتالي الزيادة في الطاقة المتمثلة، وبالتالي زيادة في الوزن والنمو هذا ما تمت ملاحظته في اثناء تجربة التغذية من خلال نتائج المعايير المدروسة المستحصلة وتجربة الهضم لمعرفة معامل الهضم. إلا أن إضافة هذه الإنزيمات بكميات كبيرة قد تزيد من سرعة مرور الغذاء داخل الجهاز الهضمي وبالتالي تقل الاستفادة منه وهذا ما يؤدي إلى ارتفاع معدل استهلاك العليقة. تسمح الأنزيمات بتحطيم وتجزئة المواد الأولية في الحبوب وبذلك تساعد على امتصاص هذه الأغذية التي ينتج عنها في النهاية تحسين فعالية هذه المواد الأولية (7).

نستنتج من البحث نجاح تقانة فعالية الإنزيمLignin peroxidase المعزول محلياً ومختبرياً من البكتريا الخيطية *Streptomyces* p. في اختزال مركبات التانينات المثبطة وتحسين القيمة الغذائية للذرة البيضاء بكفاءة مما انعكست على الصفات الإنتاجية للأسماك بديلاً عن الذرة الصفراء وبالإمكان استخدامها في علائق فروج اللحم والبياض لتشابه فسلجة الهضم بينهما.

المصادر

1- دلالي، باسل كامل وصادق حسن الحكيم (1987). تحليل الأغذية. مطبعة دار الكتب جامعة الموصل، 273. صفحة.

2- يونس، دريد ذنون؛ عبدالله فتحي عبدالمجيد وصائب يونس عبدالرحمن (2012). تأثير استخدام الذرة البيضاء المنبتة بديلا عن الذرة الصفراء في الأداء الإنتاجي والفسلجي لسلالتين من طائر السمان. مجلة زراعة وادي الرافدين، 40 (4):141 – 150.

3- Abbas ,T.E. and N.A. Musharaf (2008). The effects of germination of low tannin sorghum grains on its nutrient and broiler chick's performance. Pakistan Journal of Nutrition, 7 (3) :470-474.

4- Acamovic, T. (2001). Enzymes for poultry. World's Poultry Science Journal, 57: 225-242

5- Al-Khateeb, M. T. (2015). Using ligninolytic bacteria to improve the in vitro digestibility of some roughage. A Thesis Submitted, College of Agriculture – University of Baghdad, p: 100.

6- AOAC, (1990). Official methods of Analysis, 15th edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC

7- Benmousa, M.; B. Suhendra; B. Adam and B. R. Hamaker (2006). Sorghum starch granule morphologies appear to improve raw starch. Starke, 58:92-99.

8- Bolin, D.W.; P.K. Richard and K.W. Erale (1952). A simplified method for the determination of chromic oxide (Cr_2O_3) when used as an index substance. Science, 116: 634-635.

9- Butler, L.G. and J.C. Rogler (1992).Biochemical mechanisms of the antinutritional effects of tannins. In: Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health, Occurrence and Chemistry. ACS Symposium Series, 506: 298-304.

10- Douglas, J.H.; T.W. Sullivan; P.L. Bond and F.J. Struwe (1990). Nutrient composition and metabolizable energy values of selected sorghum varieties and yellow corn. Poult. Sci., 69: 1147-1155.

11- Drinah, B.C.; N. Banda and V. Pran (1990). Nutritional Improvement of Tanin- Containing Sorghums (*Sorghum bicolor*) by Sodium Bicarbonate. Cereal Chem., 67: 533-537.

12- **Duncan, D.B. (1955). Multiple Range and multiple F- test. Biometrics.11:1-42.**

13- **Farrell, D.J.; R.A. Perez-Maldonado and J.D. Brooker (1999). Tannins in feedstuffs used in the diets of pigs and poultry in Australia In Tannins In Livestock and Human Nutrition, Proceedings of An International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May – 2 June. pp. 24-29**

14- **Furnkawa, H. and H. Tsukahara (1966). On the acid digestion method for determination of chromic oxide an index substance in the study of digestibility of fish feed, Bull Jap. Soc. Sci. Fish. 32 (6): 502-506.**

15- **Hagerman, A.E. and L.G. Butler (1981). Specificity of proanthocyanid in-protein interactions. J. Biol. Chem, 256, 4494.**

16- **Hamid, F.H. (2001). The effects of germination and fermentation processes on chemical composition and nutritional value of low - tannin grain sorghum.M. Sc. Thesis, Faculty of Animal Production, University of Khartoum.**

17- **Hassan, I.A., E.A. Elzubeir and A.H. ElTinay (2003). Growth and apparent absorption of minerals in broiler chicks fed diets with low or high tannin contents. Trop. Anim. Health Prod., 35: 189-196.**

18- **Issa, S. ; J.D. Hancock, ; M.R. Tuinstra, ; I. Kapran and S. Kaka (2007). Effects of sorghum variety on growth and carcass characteristics in broiler chicks reared in West Africa. Poult. Sci., 86: 69-76.**

19- **Kumar, V.; A.V. Elaugova and A.B. Maudal (2004). Utilization of reconstituted high- tannin sorghum in the diets of broiler chickens. Asian-Aust .J. Anim. Sci, 18(4): 538-544.**

20- **Litvinchuk, A.; M. Savenkova and D. Metelitsa (1991). Kinetics of the coupled peroxidase oxidation of phenol with 4-aminoantipyrnes. Kinetics and catalysis 32:474 – 478**

21- **McCormic, S.D.; R.L. Saunders and A.D. Maclutyre (1989). The effects of salinity and ration level on growth rate and conversion efficiency of Atlantic salmon *Salmo salar*, Aquaculture,82: 173-180.**

22- **Okoye, F.C. Im.; C.U. Gmneue and L.C. Ubaeduoun (2006). Effect of the replacement of maize with graded Levels of sorghum malt (*Sorghum bicolor*) on the performance of broiler chicks. Agr‹ J, 1(2): 77-80.**

23- **Price, M.L.; S. Van Scoyoc and L.G. Butler (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. J. Agr. Food Chem, 26:1214-1218.**

24- **SAS, Institute (1996). SAS Users Guide:Statistics,1986ed.SAS Inst. Inc. Cary, NC.**

25- **Shihata, I.M. (1951). Pharmacology study of *Anagallis arvensis* M.D. vet. Thesis Cairo University.**

26- **Smith, R.R. (1971). A method for measuring digestibility and mebaolizable energy of feeds. Proc. Fish Cult., 33: 132-134.**

27- **Swain, T. (1979).Tannins and lignins. P. 657-682. In: G.A. Rosenthal and D.H. Janzen, eds. Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites. Academic Press, New York.**

28- **Utne, F. (1978). Standard methods and terminology in fin-fish nutrition from: proc. World symp. on finfish nutrition and fish feed Technology, Hamburg. 20-23.June 1978. Vol. 2.**

29- Wee, K.L. andS.W. Shu (1989). The nutritive value of boiled full-fat soybean meal in Pelleted feed for nile tilapia *Oreochromis niloticus*, Aquaculture, 81: 303-314.

30- Windell, T.; W.J. Foltz, and A.J. Sarokon, (1978), Methods of facal collection and nutrient leaching in digestibility studie s, Prog. Fish. Cult., 40 (2): 51-55.

USING OF LABORATORIAL ISOLATED ENZYME TECHIQUE FROM FILAMENTOUS BACTERIA (*Streptomyces* sp.) for Reduction OF TANNIN IN WHITE *Corn Sorghum bicolor* AND SUBSTITUTE FROM CORN IN DIETS OF SMALL COMMON CARP *Cyprinus carpio* L.

M.H. Al-Ashaab **A.M. Mahsen** **M.T. Al-Khateeb**
A.S. Habeb **S.J. Jasim** **S.D. Mohammad**

ABSTRACT

The aim of study was to use the enzyme Lignin peroxidase which locality isolate from bacteria *Streptomyces* sp.by using solid fermentation for enzyme porduction product which is characterized to be durable, stand high temperature and neutral pH to reduction reduce the tannin in white corn *Sorghum bicolor* and used as substitute to yellow corn *Zea mays* in feeding common carp fingerling *Cyprinus carpio* L. This study was carried out in the laboratories of fish and Animal Resource Center-Agricultural Research Directorate for 80 days from 7/3/2016 to 25/5/2016.The enzyme activity evaluate by using 2,4-dichlorophenol as substrate. The results of chemical analysis for white corn after treatment by enzyme before and after grind reduce the tannin and fiber levels and increase protein ratio. The fished average weight was (25.12±3.75gm/fish) fed on seven experimenal diets contain two substitution levels of white corn for yellow corn, T_1 and T_2 used white corn without treatment substitution 50% and 100% for yellow corn, T_3 and T_4 used white corn treatment before grinded by enzyme (80 ml/kg) at same substitution level, T_5 and T_6used white corn treatment after grinded by enzyme (80 ml/kg) at same substitution and T_7 without white corn for control. The results showed T_5 and T_6 were the best treatments in growth indices (total and daily weight gain and relative growth rate%), feed and efficiency conversion ratio and apparent digestibility rate.

*** Ministry of Scie. and Tech., Baghdad, Iraq.**