تغذية الحيوان والدّواجن –الجلسة العملية الرابعة

(الطّرق التقريبية لتحليل مكونات مواد العلف)

تقدير (البروتين الخام – الألياف الخام- المستخلصات الخالية من الآزوت)

1- تقدير البروتين الخام (Crud Protein Determination):

البروتين الخام هو تعبير يقصد به جميع مكونات العلف التي يدخل الآزوت في تكوينها فهو يشمل مجموعتين من المركبات الآزوتية:

a. البروتينات الحقيقية: البروتينات، الببتيدات المعقّدة.
b. المركبات الآزوتية غير البروتينية (Non-Protein Nitrogen) NPN: مثل الأحماض الأمينية الحرة، النوكليوتيدات، كرياتين (Creatine)، كولين (Choline)، بعض الببتيدات البسيطة، الأميدات، أملاح الأمونيا، اليوريا والنترات والبيوريت (Biuret) وغيرها.

وتحسب كمية البروتين الخام بتقدير الآزوت الكلي في العلف بطريقة كلداهل (Kjeldahl)، ثم تحسب النسبة المئوية % للبروتين الخام بضرب كمية الآزوت الكلية في العلف بـ 6.25 (عامل جونز Jones) على أساس أن كل 100 غ بروتين خام يحتوي على 16غ آزوت (وذلك لأن معظم البروتينات في هذه المواد تحتوي على 16% نتروجين 100÷16=6.25)، وبالتالي كل 1غ آزوت يوجد في 6.25غ بروتين، وذلك بالنسبة للبروتين الحيواني مثل اللحم والبيض، وكذلك لمعظم المحاصيل والأعلاف الحيوانية.(1941) Jones.

- **المبدأ النظري في تقدير الآزوت الكلي:**

عند غلي العينة العلفية في حمض الكبريت المركز (H_2SO_4) تتفكك الدهون والكربوهيدرات إلى غاز ثاني أكسيد الكربون وماء أما البروتينات فتتحلل إلى أحماض أمينية حرة. وباستمرار الغليان مع حمض الكبريت المركز تتحلل الأحماض الأمينية كما يلي:

$$NH_2CH_2COOH + 3H_2SO_4 \rightarrow NH_3 + 2CO_2 + 3SO_2 + 4H_2O$$

<u>حيث أنَّ:</u> NH_2CH_2COOH الحمض الأميني غليسين (Glycine)، NH_3 النشادر أو الأمونيا (Ammonia).

وبوجود حمض الكبريت يتحول النشادر إلى كبريتات الأمونيوم:

$$2NH_3 + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2\ SO_4$$

وبإضافة كمية كافية من محلول ماءات الصوديوم (هيدروكسيد الصوديوم، الصودا الكاوية) NaOH تركيز 33% لمعادلة حمض الكبريت تتحول كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$ إلى كبريتات الصوديوم وينطلق النشادر:

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \rightarrow Na_2SO_4 + 2NH_3 + 2H_2O$$

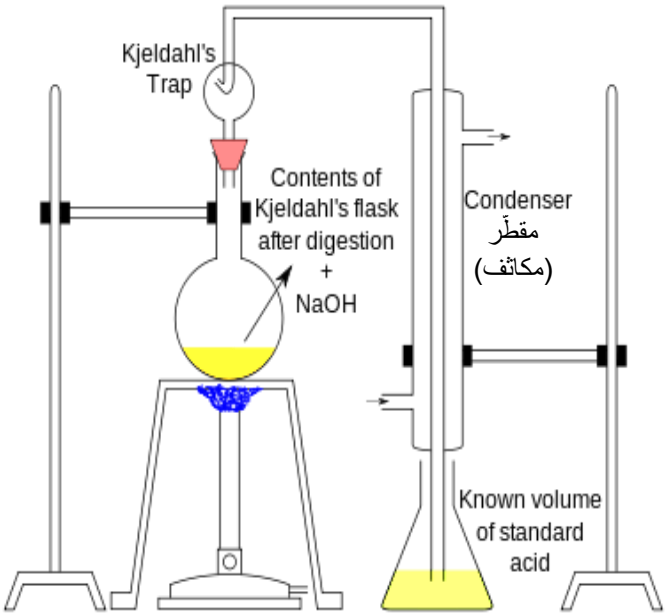
وباستقبال النشادر في دورق يحتوي على كمّية معلومة من حمض البوريك (Boric Acid) H_3BO_3 تركيز 2% يتفاعل النشادر مع الحمض ويتشكل ملح بورات الأمونيوم $(NH_4)_3BO_3$:

$$H_3BO_3 + 3NH_4OH \rightarrow (NH_4)_3BO_3 + 3H_2O$$

وبمعايرة محتوى الدورق بحمض كلور الماء HCL أو حمض الكبريت العُشر نظامي (0.1 عياري) يتفاعل الحمض مكوناً ملح كلور الأمونيوم أو كبريتات الأمونيوم:

$$2\ (NH_4)_3BO_3 + 3H_2SO_4 \rightarrow 3(NH_4)_2SO_4 + 2H_3BO_3$$

ومن كمية الحمض المستخدمة في المعايرة يمكن معرفة حجم الآزوت في العلف، ومن المعلوم أن كل 1 مل من حمض كلور الماء أو حمض الكبريت العُشر نظامي يستخدم في المعايرة يساوي 0.0014 غ آزوت.



- **الأدوات والمواد المطلوبة:**

1-جهاز كلداهل للهضم والتقطير ومعدات معايرة.

2-دورق استقبال مخروطي (Flask).

3-ميزان كهربائي حساس مع أدوات الوزن.

4-حمض كبريت مركز.

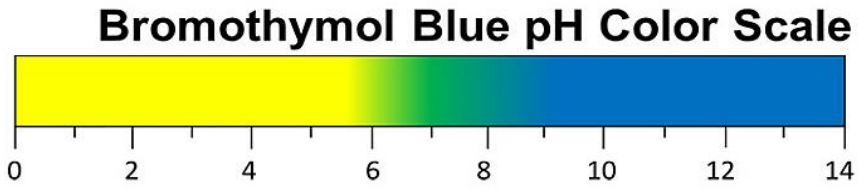
5-محلول ماءات صوديوم تركيز 33%.

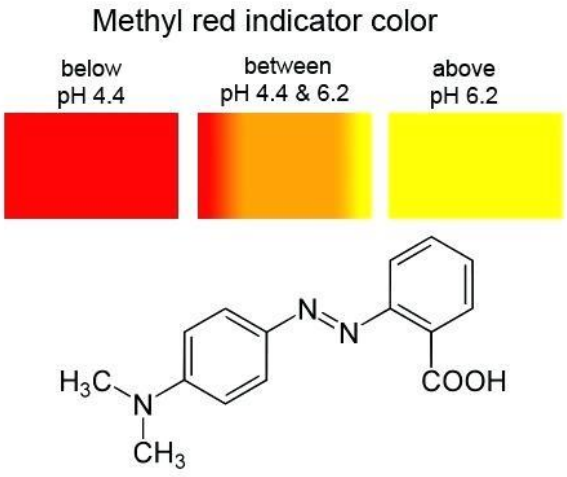
يُحضَّر بوزن 400 من بلورات ماءات الصوديوم، ويتم وضعها في دورق زجاجي مقاوم للحرارة ويضاف إليها 600 مل ماء مقطر، ويُرجّ المحلول حتى تمام الذوبان.

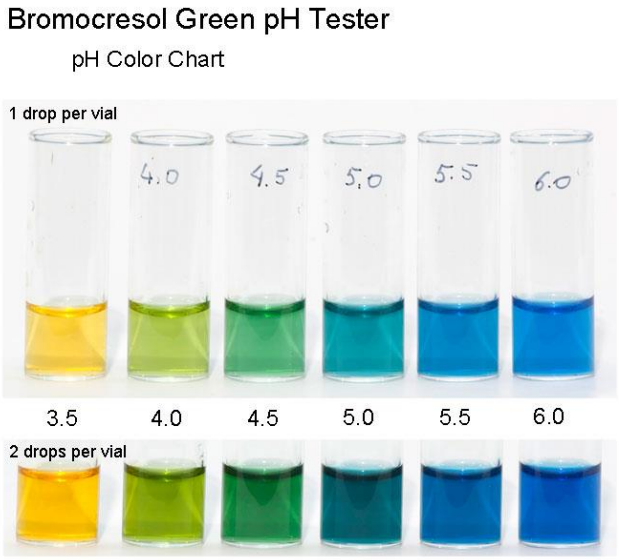
6-حمض كلور الماء 0.1 نظامي (HCL) أو حمض كبريت 0.1 نظامي H_2so_4

7-عامل مساعد يستخدم لهذا الغرض هو مخلوط مكون من (100غ كبريتات البوتاسيوم و10غ كبريتات النحاس و2غ سيلينوم). وهناك عوامل مساعدة أخرى يمكن استخدامها وتباع جاهزة بشكل أقراص.

8-الدليل ويحضر من 0.66غ أحمر الميثيل (Methyl red) و0.33 غ أخضر بروموكريزول (Bromocresol green) توزن بدقة، وتوضع في دورق معياري سعة 1 ليتر. يضاف 700 مل إيثانول لإذابة الصبغات، ثم يكمل حتى 1 ليتر بالماء المقطر، يخلط جيداً، ثم يحفظ في وعاء بلاستيكي، ويمكن تحضير الدليل من أحمر الميثيل وأزرق الميثيلين، يحل 0.02 غ من أحمر الميثيلين في 60 مل كحول إيثيلي وبعدها يضاف 40 مل ماء، بعدها يحل 0.1 غ من أزرق الميثيلين في 100 مل ماء، قبل الاستعمال يخلط 25 مل من أحمر الميثيل و3 مل من محلول أزرق الميثيلين.







9-محلول حمض بوريك تركيز 2% (H_3Bo_4): يوزن 20غ من حمض البوريك وتوضع في دورق سعة 1 ليتر، يضاف إليها 800 مل ماء مقطر تقريباً، وترج جيداً حتى تمام ذوبان الحمض وبعدها تكمل حتى 1 ليتر بالماء المقطر ويرج المزيج جيداً.

- **طريقة العمل:**

أولاً: الهضم:

1-يوزن 1غ من العينة تقريباً، على ورقة ترشيح خالية من مركبات الآزوت معروفة الوزن، وتُلف المادة العلفية بها، ثم توضع في دورق الهضم، ويسجل وزن العينة بالضبط.

2-يضاف إلى العينة 0.3-0.5 غ من مخلوط العامل المساعد (مزيج 100غ كبريتات البوتاسيوم و10غ كبريتات النحاس و2غ سيلينوم).

3-بعد ذلك يضاف 10-15 مل من حمض الكبريت المركز مع مراعاة سكب الحمض على جدران الأنبوب بهدوء وبحذر.

4-يوضع دورق الهضم في مكانه في جهاز كلداهل ويجرى التسخين ببطء حتى نتجنب ضياع الآزوت، ويوضع الدورق بشكل مائل، ويجرى تحريك محتوى الدورق بين الحين والآخر بحيث لا يبقى على حوافه الداخلية أي أجزاء من المادة.

5–يكون محتوى الدورق بنياً أو أسود اللون عند بدء الغليان، ويتحول بالتدريج نتيجة تحطيم المواد العضوية وانطلاق غاز (So_2) إلى اللون الشفاف.

6–يتم معرفة انتهاء عملية الهضم من خلال زوال اللون، فيصبح محتوى الدورق شفافاً أو مائلاً إلى الصفرة قليلاً، وعند تمام عملية الهضم تقفل مفاتيح الحرارة في جهاز الهضم، ويترك الدورق ليبرد.

ثانياً: التقطير (Distillation):

1–يضاف إلى دورق الهضم بحذر 100–150 مل ماء مقطر تقريباً وذلك على دفعات (20–25 مل) حيث يعمل الماء المقطر على غسل حواف الدورق وعلى رفع درجة الحرارة، ويترك بعدها الدورق حتى يبرد بحرارة الغرفة وعند إضافة الماء المقطر إلى دورق الهضم يصبح لون محلول الهضم أخضر مزرقّاً (لأن كبريتات النحاس تتشرب الماء ونتيجة لذلك يظهر اللون الأزرق).

ويمكن بعد ذلك تغليف فوهة الدورق بورق ألمنيوم ويمكن حفظه لليوم التالي.

2–يوضع في دورق الاستقبال 20–30 مل من محلول حمض البوريك و 6–8 نقاط من الدليل، ويوضع في المكان المخصص له في جهاز التقطير وتغطس نهاية أنبوب جهاز التقطير في حمض البوريك في دورق الاستقبال ويفتح صنبور الماء البارد الخاص بمكثف جهاز التقطير حتى تبدأ دورة الماء البارد بالعمل داخل المكثف.

3–يضاف إلى دورق التقطير قطعة من الخزف، تعمل على تنظيم غليان محتوى الدورق.

4–يضاف إلى محتويات دورق التقطير 60–70 مل من محلول ماءات الصوديوم تركيز 33% (حتى يتغير لون ورقة عباد الشمس الحمراء إلى الأزرق) ببطء وحذر على جدار الدورق، وبسرعة يوضع دورق كلداهل في مكانه على جهاز التقطير، ويثبت غطاؤه، ويرج الدورق لمزج محتوياته، عند ذلك ينطلق النشادر الذي يتساقط في دورق الاستقبال ويثبت في محلول حمض البوريك.

5– يبدأ تسخين محتويات الدورق ، فينطلق النشادر مع بخار الماء إلى دورق الاستقبال الحاوي 2% البوريك ، وتستمر عملية التقطير حتى ينتقل تقريباً 150 مل منه إلى دورق الاستقبال وتستغرق هذه العملية 30 دقيقة إلى ساعة، ويمكن التأكد من انتهاء عملية التقطير باستخدام ورق عباد الشمس

الحمراء، وذلك بوضع نقطة من الأنبوبة القادمة إلى المكثف على ورقة عباد الشمس الحمراء فإذا لم يتغير لونها تكون عملية التقطير قد انتهت، بعدها ترفع الأنبوبة القادمة من المكثف من دورق الاستقبال، وتغسل جيداً بالماء المقطر في الدورق نفسه، ويستمر بعدها التقطير مدة عدة دقائق لغسل الأنبوبة من الداخل وبعد انتهاء عملية التقطير يوقف عمل الجهاز.

ثالثاً: المعايرة:

يُعاير محتوى دورق الاستقبال المكون من حمض البوريك والآزوت (يكون لونه أزرق إذا كان الكاشف المستخدم مخلوطاً من أحمر الميثيل + أزرق الميثيلين أو أخضر زمردي إذا كان مخلوطاً من أحمر الميثيل وأخضر بروم كريزول) بمحلول عياري من حمض كلور الماء 0.1 نظامي أو حمض الكبريت، ونقطة التعادل هي التي يتحول عندها لون المحلول من أزرق في استعمال الكاشف الأول، أو أخضر في الكاشف الثاني إلى اللون البنفسجي الخفيف.

رابعاً: حساب النتيجة:

1–وزن ورقة الترشيح بالضبط.

2–وزن ورقة الترشيح + العينة العلفية.

3–وزن العينة العلفية.

4–حجم حمض الكبريت أو كلور الماء المستخدم في المعايرة.

5–كمية الآزوت = حجم الحمض × 0.0014 = (.....)

6–كمية البروتين الخام = كمية الآزوت × 6.25 = (.....)

7–النسبة المئوية للبروتين الخام = $\frac{\text{كمية البروتين}}{\text{وزن العينة الجافة هوائياً}} \times 100$

4-تقدير الألياف الخام (Crud Fiber Determination):

الألياف الخام هي الجزء المتبقي من الكربوهيدرات بعد معاملة المادة العلفية بالحموض والقلويات المخففة. وتسمى بالألياف الخام لأنها تشمل بالإضافة إلى السلولوز، الهيميسيلولوز والليجنين والبنتوزونات. وتعتمد طرق تقدير الألياف الخام على مبدأ معاملة العينة العلفية بالحموض والقلويات والكحول والإيثر، التي لها خاصية إذابة جميع مكونات العينة عدا الألياف الخام وبعض المركبات المعدنية التي تعرف كميتها بحرق المتبقي من العينة في المرمدة وبحساب الفرق يُعرف وزن الألياف.

- **الأدوات والمواد المطلوبة:**

عند تقدير الألياف الخام يجب استخدام العينة العلفية بعد استخلاص الدهن منها، لأن الدهن يعيق عمليات الهضم والترشيح. فعند معاملة المادة بحمض الكبريت تتحلل المواد الكربوهيدراتية غير الذائبة في الماء (النشاء وجزء من الهيموسيلولوز) والأمينات والأميدات وبعض القلويات والأملاح المعدنية وعند معاملة العينة بالصودا الكاوية تتحلل البروتينات وجزء كبير من الهيموسلولوز وجزء بسيط من الليجنين وبمعاملة المادة العلفية بالكحول والإثير يستخلص بقايا الدهن والشموع والمواد الملونة.

- **الأدوات والمواد المطلوبة:**

1-ميزان حساس (Sensitive Balance).
2-بيشر زجاجي مدرّجة (Graduated Glass Beakers) سعة 400-500 مل (عدد 2).
3-قمع بوخنر (Buchner Funnel).
4-جهاز تفريغ مائي (Water Discharge).
5-ورقة ترشيح (Filtration Paper) معروفة الوزن خالية من الرماد.
6-فرن تجفيف (Oven).
7-مرمدة (Furnace).
8-سخان كهربائي أو غازي.
9-ناقوس زجاجي(Desiccator).
10-بوتقة خزفية معروفة الوزن.
11-قضيب زجاجي.
12-اسطوانة (سلندر) مدرجة سعة 250 مل.

13–محلول حمض كبريت تركيز 1.25%. لتحضير محلول حمض الكبريت تركيز 1.25% يوضع 7 مل حمض كبريت مركز في دورق سعته 1 ليتر، ولكن بعد التبريد، ويجب التذكر أن حمض الكبريت يسكب على جدار الدورق في الماء وليس العكس.

14–محلول الصودا الكاوية تركيزه 5%، لتحضير محلول الصودا الكاوية تركيز 5% يوزن 50غ بلورات الصودا الكاوية، وتحل في كمية قليلة من الماء المقطر، ويترك المحلول حتى يبرد، ثم يضاف إليه الماء المقطر حتى يصل حجمه إلى واحد ليتر.

15–كحول.

16–مذيب عضوي (إيثر).

- **طريقة العمل:**

1–تؤخذ عينة وزنها 1.5غ ويسجل وزنها بالضبط، ويجب أن تكون جافة هوائياً ومطحونة بشكل ناعم، وتوضع في كأس سعة 400–500 مل فيها علامة إلى حجم 200 مل.

2–يضاف إلى الكأس 200 مل محلول ساخن من حمض الكبريت تركيزه 1.25 ويجري التسخين بسخان كهربائي أو غازي، ويعلم مستوى سطح المحلول في الكأس، ويترك المحلول يغلي مدة نصف ساعة من بدء الغليان مع إضافة الماء الساخن أثناء الغليان لإبقاء حجم المحلول في الكأس ثابتاً، أما في حال استخدام الجهاز الخاص بتحليل الألياف فلا داعي لهذه العملية لأنه يحوي مكثفاً للماء المتبخر، ويجب تحريك المحلول بقضيب زجاجي له نهاية مطاطية بين الحين والآخر حتى لا تبقى أجزاء العينة في قاع الكأس.

3–يترك الكأس حتى يترسب الراسب إلى القاع ثم يرشح محتوى الكأس، والمحلول ساخن، باستخدام قمع بوخز وورقة ترشيح، وجهاز تفريغ مائي، ثم يغسل الكأس ومحتواه من الراسب وكذلك الراسب في قمع بوخز عدة مرات بالماء الساخن حتى الغليان لإزالة كل آثار حمض الكبريت.

4–بعد انتهاء عملية الغسيل ينقل الراسب مع ورقة الترشيح (باستخدام ملقط) إلى الكأس مرة أخرى، ويغسل الراسب لإزالته عن ورقة الترشيح باستخدام الماء المقطر الساخن بحيث يتم تنظيف ورقة الترشيح من الراسب داخل الكأس.

5–يضاف إلى محتويات الكأس 50 مل ماءات الصوديوم 5% ثم يضاف ماء مقطر حتى يكتمل الحجم إلى 200 مل (حتى العلامة) بذلك يصبح تركيز المحلول 1.25 % ماءات الصوديوم.

6–تكرر عملية التسخين والغليان مدة 30 دقيقة ثم الترشيح بنفس الطريقة مع استخدام ورقة ترشيح جافة معروفة الوزن خالية من الرماد، ويغسل الراسب جيداً بعد نقله بالكامل من الكأس إلى ورقة الترشيح، وذلك باستخدام ماء ساخن حتى الغليان، ثم يغسل بـ (15) مل كحول وبعدها يغسل بـ (15) مل أثير للمساعدة في إذابة الصبغات.

7–تنقل ورقة الترشيح مع الراسب إلى بوتقة نظيفة جافة معروفة الوزن ثم توضع البوتقة في فرن التجفيف على 105م° وتترك مدة 3 ساعات، ثم تؤخذ بعد ذلك وتوضع في الناقوس الزجاجي وبعدها تبرد ثم توزن.

8–توضع البوتقة في المرمدة بدرجة 600 م° حتى تمام الترميد، ثم تبرد البوتقة وتوزن.

(وهذا الوزن = وزن الرماد + وزن البوتقة فارغة). حيث أن الفرق بين وزن البوتقة (بما فيها) قبل الحرق ووزنها بعد الحرق هو مقدار الألياف الخام في العينة.

9–نحسب نسبة الألياف الخام % في العينة كما يلي: $\frac{\text{وزن الراسب الجاف تماماً – وزن الرماد}}{\text{وزن العينة}} \times 100$

حيث أنَّ: وزن الرماد = (وزن البوتقة بعد الترميد – وزن البوتقة فارغة)

وزن الراسب الجاف تماماً (الألياف + الرماد) = وزن البوتقة مع الراسب الجاف – وزن البوتقة مع ورقة الترشيح

$$\textbf{\% للألياف الخام} = \frac{\textbf{وزن البوتقة مع الراسب الجاف تماماً – وزن البوتقة مع الرماد}}{\textbf{وزن العينة}} \times \textbf{100}$$

تحتوي الألياف الخام المقدرة بهذه الطريقة على 70–90 % من السليللوز الموجود في العينة و5–10 % من الهيموسليللوز و5–10 % من اللجنين و1–3 % من المركبات الآزوتية غير البروتينية. وهناك ارتباط كبير بين نسبة الألياف الخام في الأعلاف ونسبة اللجنين. فمع تقدم النباتات بالعمر تزداد نسبة الألياف ويرافق ذلك زيادة نسبة اللجنين أيضاً. لذلك فإن نسبة الألياف الخام في مواد العلف تعتبر معياراً للدلالة على القيمة الغذائية.

6–تقدير المستخلص الخالي من الآزوت (Nitrogen Free Extract Determination) أو الكربوهيدرات الذوابة (Soluble Carbohydrates):

يشمل المستخلص الخالي من الآزوت جميع المواد الكربوهيدراتية القابلة للذوبان في الماء وفي محاليل الأحماض المخففة مثل السكريات والصموغ والنشاء وجزء من الهميسيليولوز (Hemicellulose) الموجودة في المادة العلفية. ويحسب المستخلص الخالي من الآزوت بعد تقدير كل من الرطوبة، البروتين الخام، الدهن الخام، الألياف الخام والرماد الخام كما ذكرنا سابقاً، وحساب نسب هذه المكونات في العينة العلفية، وتشكل هذه المواد مع المستخلص الخالي من الآزوت جميع مكونات العلف أي (100%) لذلك فإن:

المستخلص الخالي من الآزوت =

100– [% رطوبة + % بروتين خام + % دهن خام + % ألياف خام + % رماد خام]

(نهاية الجلسة الرابعة)