Iranian Journal of Animal Science
Vol 48, No 4, Winter 2018 (505-521)
DOI: 10.22059/ijas.2018.242888.653563

علوم دامی ایران
دورۀ ۴۸، شمارۀ ۴، زمستان ۱۳۹۶ (ص ۵۲۱-۵۰۵)

بررسی کارایی تغذیه‌ای نمک‌های کلسیمی پوشش‌دار روغن ماهی در شرایط برون و درون‌تنی

حامد خلیل‌وندی بهروزیار[1*]، مهدی دهقان بنادکی[2]، رسول پیرمحمدی[3] و بهزاد اسدنژاد[4]
۱، ۳ و ٤. استادیار، استاد و دانشجوی دورۀ دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۲. استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۷/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۱۰/۲۱)

چکیده

در این پژوهش، ارزیابی میزان مواد مغذی و الگوی اسیدهای چرب، میزان مقاومت در برابر هیدروژنه شدن زیستی (بیوهیدروژناسیون) شکمبه‌ای، میزان آزادسازی روغن در نمک‌های کلسیمی پوشش‌دار روغن ماهی در شرایط آزمایشگاهی اثر این نمک‌ها در شرایط درون تنی بر میزان گوارش‌پذیری مواد مغذی و فراسنجه‌های مایع شکمبه در مقایسه با روغن ماهی و نمک‌های کلسیمی بدون پوشش با استفاده از دام‌های فیستولادار مطالعه شد. پوشش‌دار کردن منابع کلسیمی سبب افزایش کارایی محافظتی اسیدهای چرب غیراشباع در شکمبه شد (P<۰/۰۵). پوشش‌دار کردن مکمل‌های کلسیمی تفاوت معنی‌داری در میزان آزادسازی شکمبه‌ای مکمل‌ها ایجاد کرد ولی تفاوتی در میزان آزادسازی روغن از ترکیب مکمل‌ها در دیگر بخش‌های دستگاه گوارش و میزان آزادسازی در کل دستگاه گوارش وجود نداشت (P<۰/۰۵). مکمل‌های محافظت‌شده در مقایسه با روغن آزاد، سبب افزایش گوارش‌پذیری مواد مغذی مختلف شدند (P<۰/۰۵). استفاده از روغن ماهی به‌صورت محافظت نشده موجب کاهش میزان تولید استات و افزایش پروپیونات و کاهش میزان نیتروژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوآ شکمبه شد. بود یا نبود پوشش روی نمک‌های کلسیمی تأثیری در ارتباط با فراسنجه‌های شکمبه نداشت (P>۰/۰۵). پوشش‌دهی مکمل‌های کلسیمی سبب افزایش محافظت اسیدهای چرب غیراشباع در برابر هیدروژنه شدن زیستی شکمبه‌ای شده و تأثیر نامطلوبی بر شاخصه‌های مختلف تغذیه‌ای حیوانات نداشت. استفاده از میزان پوشش ۱۰ درصد وزنی را می‌توان بهترین میزان پوشش با توجه به داده‌های مربوط به ترکیب شیمیایی، الگوی اسیدهای چرب، هیدروژنه شدن زیستی و آزادسازی در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش دانست.

واژه‌های کلیدی: اسیدهای چرب غیراشباع، امگا-۳، پوشش‌دهی، محافظت شکمبه‌ای.

Evaluation of Nutritional efficiency of encapsulated fish oil ca-salts *in vitro* and *in vivo*

Hamed Khalilvandi-Behroozyar[1*], Mehdi Dehghan-Banadaky[2], Rasoul Pirmohammadi[3] and Behzad AsadNejad[4]
1, 3, 4. Assistant Professor, Professor and Ph.D. Candidate, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2. Professor, University College of Agriculture & Natural Recouces, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Oct. 3, 2017 - Accepted: Jan. 11, 2018)

ABSTRACT

In this research encapsulated fish oil Ca-salts were produced by using a saturated FA containing material and evaluated. Nutrient content and FA profiles of produced supplements were determined and ruminal biohydrogenation and oil releasing were examined *in vitro*. Additionally, in a complementary *in vivo* experiment, effects of dietary inclusion of fish oil, ca-salts and encapsulated ca-salts on nutrient digestibility and ruminal paramerters were evaluated using three rumen fistulated Holstein cows. Encapsulation of Ca-Salts increased protection efficiency of PUFA against ruminal biohydrogenation. Encapsulated ca-salts with 10 % of wall material (weight basis) had lower biohydrogenation afer 48-h *in vitro* incubation (P< 0.05). Encapsulation of ca-salts decreased rumen oil release but oil release in other simulated media or total tract oil release were not affected by encapsulation (P> 0.05). Protected supplements increased nutrient digestibility compared with fish oil (P< 0.05). Non-encapsulated fish oil decreased acetate and rumen N-NH3 concentration as well as protozoa `population, but increased propionic acid concentration (P<0.05). Encapsulation of Ca-Salt did not change rumen parameters (P> 0.05). According to the results, it can be concluded that encapsulation of ca-salts increased protection of PUFA against ruminal biohydrogenation without worse effects on rumen parameters. Encapsulation with 10 % of wall material (weight basis) can be presented as the best treatment according to chemical composition, fatty acid profiles, rumen biohydrogenation and oil release results.

Keywords: Encapsulation, Omega-3, PUFA, Ruminal protection.

* Corresponding author E-mail: h.khalilvandi@urmia.ac.ir

مقدمه

به دلیل توازن منفی انرژی، منابع مختلف چربی همواره به‌عنوان منبعی ارزشمند در جهت افزایش غلظت انرژی در جیره‌های غذایی گاوهای شیری پرتولید در آغاز دورهٔ شیردهی مطرح بوده‌اند. بااین‌حال، کاربرد منابع چربی محدود به تأمین انرژی نبوده و اهمیت فیزیولوژیکی برخی از اسیدهای چرب غیراشباع، زمینه را برای استفادهٔ هدفمند از آن‌ها فراهم کرده است (Reynolds *et al*., 2003; Santos *et al*., 2008). در این میان توجه ویژه‌ای به روغن ماهی به‌عنوان منبع ارزشمند اسیدهای چرب غیراشباع امگا-۳ (ایکوزاپنتانوئیک اسید[1] (EPA) و دکوزاهگزانوئیک اسید[2] (DHA)) در جیره‌های غذایی دام‌های مزرعه‌ای پر تولید، به‌منظور بهبود کارایی تولیدمثلی و سوخت‌وسازی (متابولیسمی)، معطوف شده است. حساسیت فوق‌العاده بالای اسیدهای چرب غیراشباع به اُکسایش و مشکلات موجود در ارتباط با نگهداری و مصرف آن‌ها به شکل مایع، هیدروژنه شدن زیستی (بیوهیدروژناسیون) گسترده در شکمبه و تأثیر نامطلوب بر عملکرد طبیعی شکمبه، ازجمله مهم‌ترین بازدارنده‌ها در استفادهٔ گسترده از آن‌هاست (Chouinard *et al*., 1998). اسیدهای چرب غیراشباع برای ریزجانداران (میکروارگانیسم‌های) شکمبه سمی بوده و فرایند هیدروژنه شدن زیستی سبب کاهش سمیت آن‌ها می‌شود (Maia *et al*., 2007 & 2010). میزان هیدروژنه شدن اسیدهای چرب در شکمبه به ویژگی‌های چربی، زمان ماندگاری در شکمبه و جمعیت میکروبی شکمبه بستگی دارد. توانایی باکتری‌های شکمبه برای هیدروژنه شدن زیستیاسیدهای چرب، به گونه و شمار آن‌ها بستگی دارد (Harfoot & Hazlewood, 1997). سرعت هیدروژنه شدن زیستی اسیدهای چرب با افزایش میزان غیراشباع بودن آن‌ها، افزایش می‌یابد (Bauman *et al*., 2003). بالاتر بودن میانگین میزان هیدروژنه شدن زیستی اسید لینولئیک و لینولنیک نسبت به اسید اولئیک می‌تواند به‌نوعی تأییدکنندهٔ این مطلب باشد. بااین‌حال بررسی‌های چندی نشان داده‌اند، میزان هیدروژنه شدن زیستی اسیدهای چرب غیراشباع زنجیر بلند در منابع دریایی ازجمله روغن ماهی و جلبک‌های دریایی کمتر از میزان هیدروژنه شدن زیستی اسیدهای چرب ۱۸ کربنه است. Doreau & Chilliard (1997) در آزمون تزریق مقادیر مختلف روغن ماهی به شکمبه گزارش کردند، باوجود افزایش میزان DHA جریان یافته به دوازدهه با افزایش میزان تزریق شکمبه‌ای، بخش اعظم اسیدهای چرب موردنظر در شکمبه زیست هیدروژنه‌شده و مقادیر جریان یافته به رودهٔ باریک بسیار کمتر از مقادیر تزریقی به شکمبه است. افزون بر این در این آزمایش مقادیر افزایندهٔ اسیدهای چرب ناشناخته ۲۰ و ۲۲ کربنه با درجهٔ اشباع متفاوت در محتویات دوازدهه مشاهده شد که این محققان عنوان کردند این امر می‌تواند نشان‌دهندهٔ هیدروژنه شدن زیستی اسیدهای چرب روغن ماهی از طریق این اسیدهای چرب باشد. Wachira *et al*. (2000) میزان هیدروژنه شدن زیستی DHA و EPA را به ترتیب ۷۲ و ۷۸ درصد محاسبه کردند.

صرف‌نظر از تخم پنبهٔ کامل و دانه‌های روغنی کامل فرآوری‌شده همانند دانهٔ کامل سویا، نمک‌های کلسیمی تنها منبع‌های تجاری محافظت‌شدهٔ اسیدهای چرب غیراشباع بدون تأثیر نامطلوب بر سوخت‌وساز شکمبه‌ای هستند (Block *et al*., 2005; Fotouhi & Jenkins, 1992; Jenkins & Palmquist, 1984). چربی‌های کلسیمی موجود در بازار به‌طورمعمول شامل اسیدهای چرب کلسیمی روغن پالم،تحت عناوین مختلف تجاری هستند. پیوند شیمیایی گروه کربوکسیل اسید چرب و کلسیم در این محصولات باعث می‌شود که این چربی‌ها در شکمبه فعال نبوده و دگرگشت شکمبه را تحت تأثیر قرار ندهند. لذا ادعا بر این است که این نوع چربی‌ها در شکمبه، پوششی روی الیاف ایجاد نکرده و درنتیجه در عملکرد ریزجانداران شکمبه، تداخلی ایجاد نمی‌کنند. با عبور از شکمبه، اسیدهای چرب متصل به کلسیم، تحت عمل اسیدی شیردان، از هم جداشده و جذب اسیدهای چرب در دوازدهه به‌آسانی صورت می‌گیرد.

1. Ecosapentanoic acid
2. Decosahexanoic acid

Wu *et al.* (1991) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، هیدروژنه شدن زیستی شکمبه‌ای اسیدهای چرب غیراشباع کلسیمی‌شده ۴۹ درصد است. Klusmeyer *et al.* (1991) میزان محافظت پایینی را برای این اسیدهای چرب کلسیمی روغن پالم شده گزارش کردند.

در آزمایش‌های پیشین نتیجهٔ استفاده از فناوری نمک‌های کلسیمی در محافظت اسیدهای چرب غیراشباع وابسته به الگوی اسیدهای چرب مورد استفاده در تولید محصول عنوان شده است. برای مثال کلسیمی کردن روغن سویا (به‌عنوان منبع لینولئیک اسید) و روغن بذرک (به‌عنوان منبع لینولنیک اسید) تأثیر کمی بر الگوی اسیدهای چرب شیر داشت (Chouinard *et al.*, 1998). Fotouhi & Jenkins (1992) در نتایج بررسی‌های خود پیشنهاد کردند، نمک‌های کلسیمی اسیدهای چرب غیراشباع، هنگامی محافظت‌شده به شمار می‌آیند که از یک پوشش ماتریکسی نمک کلسیمی اسیدهای چرب اشباع دارند. Enjalbert *et al.* (2003) در نتایج بررسی‌های خود نشان دادند، جریان دوازده‌ای لینولئیک اسید در نمک‌های کلسیمی اسیدهای چرب پالم بیشتر از نمک‌های کلسیمی اسیدهای چرب کانولا بود، درحالی‌که مصرف لینولئیک اسید در گروه مصرف‌کنندهٔ نمک‌های کلسیمی کانولا بیشتر بود. با افزایش درجهٔ غیراشباع بودن اسیدهای چرب در ترکیب نمک‌های کلسیمی و اسیدی‌تر شدن شکمبه، میزان محافظت در برابر هیدروژنه شدن زیستی و بی‌تأثیر بودن نمک‌های کلسیمی اسیدهای چرب غیراشباع، کاهش می‌یابد (Relling & Reynolds, 2007; Jenkins & Bridges, 2007).

بااین‌حال، محققان آزادسازی آهستهٔ اسیدهای چرب از ساختار نمکی در کنار عامل‌هایی همانند وجود محدودهٔ عادی اسیدیتهٔ شکمبه و نرخ خروج شکمبه‌ای مناسب در گاوهای شیرده را ازجمله عامل‌هایی می‌دانند که می‌توان به‌واسطهٔ آن‌ها نمک‌های کلسیمی اسیدهای چرب غیراشباع را به‌عنوان منبع‌های بی‌تأثیر شکمبه‌ای با سطوح متفاوت محافظت شکمبه‌ای قلمداد کرد (Block *et al.*, 2005; Fotouhi & Jenkins, 1992). در مقابل، برخی گزارش‌ها بیانگر کارایی کم آن‌ها در محافظت مناسب از اسیدهای چرب غیراشباع به‌ویژه در شرایط افت pH مایع شکمبه است (Bridges, 2007; Jenkins & Van Nevel & Demeyer, 1996). لذا جستجو برای یافتن روش‌هایی به‌منظور محافظت مطلوب اسیدهای چرب غیراشباع در شکمبه، اهمیت زیادی در دستیابی به هدف‌های اشاره‌شده دارد (Jenkins & Bridges, 2007). با توجه به کمیاب بودن اطلاعات درزمینهٔ کارایی مکمل‌های کلسیمی بر پایهٔ روغن ماهی، هدف این پژوهش بررسی تأثیر تولید نمک‌های کلسیمی و مکمل‌های کلسیمی پوشش‌دار روغن ماهی بر ترکیب شیمیایی مکمل‌های تولیدی و بررسی تأثیر فرایند پوشش‌دهی بر میزان گوارش‌پذیری مواد مغذی و فراسنجه‌های شکمبه‌ای در گاوهای هلشتاین فیستولادار بود.

مواد و روش‌ها

دام‌های مورد استفاده در آزمایش بر پایهٔ راهنمای نگهداری و استفاده از دام‌های مزرعه‌ای در تحقیقات علوم دامی نگهداری شدند (FASS, 2010). نمک‌های کلسیمی موردنیاز (پرشیافت- امگا ۳ ®) توسط شرکت تعاونی دانش‌بنیان کیمیا دانش الوند در اتمسفر خنثی ایجادشده توسط گاز آرگون، تولید شدند. میانگین توزیع قطر اندازهٔ ذرات مکمل مورد استفاده ۲-۱ میلی‌متر بود. دیگر مشخصات محصول مورد استفاده ازنظر میزان مادهٔ خشک (گرم بر کیلوگرم)، چربی (گرم بر کیلوگرم مادهٔ خشک)، کلسیم (گرم بر کیلوگرم مادهٔ خشک)، خاکستر (گرم بر کیلوگرم مادهٔ خشک) و انرژی خالص شیردهی به ترتیب ۹۷۲/۲۰، ۸۷۳/۵۶، ۱۱۳/۵۳، ۱۲۶/۴۴ و ۵/۸۴ مگا کالری بر کیلوگرم مادهٔ خشک بود. نمک‌های کلسیمی تولیدی درنهایت با استفاده از مادهٔ پوشاننده شامل ترکیبی از اسیدهای چرب اشباع (اسید استئاریک، پالمتیک و لوریک)، ترکیب‌های پایدارکننده و امولسیفایر، ترکیب‌های کانی همانند سدیم آلژینات و تالک و با استفاده از روش غوطه‌وری[1] پوشش‌دار شدند. در این

1. Deep-coating

روش مادهٔ پوشاننده تا رسیدن به دمای ذوب گرما داده شده و پس از قرار دادن در سامانه حلال مناسب برای پوشش‌دهی نمک‌های کلسیمی استفاده شدند. مکمل‌های تولیدی در دمای اتاق خنک و خشک شدند. فرایند پوشش‌دهی تا رسیدن وزن پوشش مورد استفاده به ۵، ۱۰ و ۱۵درصد وزنی نمک‌های کلسیمی ادامه یافت.

برای تعیین چربی کل مکمل‌های تولیدی از روش AOAC 954.02 (2000) (هضم اسیدی و استخراج با حلال) استفاده شد. برای محاسبهٔ میزان مادهٔ خشک محصولات تولیدی از آون با دمای ۱۰۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت (۲۰۰۰) AOAC 930.15 استفاده شد و میزان خاکستر با قرار دادن نمونه‌ها در کوره با دمای ۶۰۰ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت تعیین شد ((AOAC ID #942.05). پیش از قراردهی نمونه‌ها در کوره از اسید نیتریک ۶۵ درصد استفاده شد. میزان کلسیم موجود در نمونه‌ها با استفاده از دستگاه جذب اتمی (Atomic absorption, flame emission spectrophotometer, AA-670, Shimadzu) تعیین شد. الگوی اسیدهای چرب پس از استخراج چربی از نمونه‌های پوشش‌دار شده و نشده مطابق روش توصیف‌شده در بخش تعیین میزان هیدروژنه شدن زیستی تعیین شد.

ارزیابی آزادسازی روغن در محیط‌های شبیه‌سازی‌شدهٔ دستگاه گوارش و مقاومت در برابر هیدروژنه شدن زیستی

به‌منظور ارزیابی آزادسازی روغن، محیط‌های شبیه‌سازی‌شدهٔ معده، رودهٔ باریک و کولون به ترتیب با مقادیر اسیدیته ۱/۲، ۶/۸ و ۷/۰ به ترتیب با استفاده از پپسین، پانکراتین و بتاگلوکوزیداز (سیگما- آلدریچ) تهیه شدند. میزان پانکراتین مورد استفاده ده برابر بیشتر از میزان توصیه‌شده انتخاب شد تا با میزان مادهٔ خشک مورد استفاده همخوانی داشته باشد (Kosaraju *et al*., 2009). برای تعیین میزان آزادسازی روغن در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش از چهار حالت مختلف استفاده شد (Kosaraju *et al*., 2009). در حالت اول مواد محافظت‌شده به‌صورت جداگانه تحت تأثیر مایع شکمبه و محیط‌های مختلف شبیه‌سازی‌شدهٔ دستگاه گوارش و در حالت دوم بدون قرارگیری در معرض مایع شکمبه به‌طور متوالی تحت تأثیر محیط‌های مختلف شبیه‌سازی‌شده قرار گرفتند. در حالت سوم و چهارم میزان آزادسازی نهایی پس از قرارگیری متوالی در معرض مایع شکمبه و همهٔ محیط‌های شبیه‌سازی‌شده محاسبه شد. در حالت چهارم پیش‌تیمار با بزاق مصنوعی انجام شد (Khalilvandi-Behroozyar *et al*., 2015).

مایع شکمبهٔ مورد استفاده از سه رأس گوسالهٔ نر بالغ هلشتاین مجهز به فیستولای شکمبه‌ای با میانگین وزنی ۲۰ ± ۵۰۰ کیلوگرم تهیه شد. خوراک دام‌های مورد آزمایش با نسبت علوفه به کنسانتره برابر با ۶۰:۴۰ با نرم‌افزار CNCPS V5، با استفاده از دستگاه خوراک ساز خودکار تهیه شد. خوراک به میزان ۱۰ درصد بالاتر از سطح نگهداری در دو وعدهٔ برابر در ساعت‌های ۸ صبح و ۱۶ عصر به دام‌های داده شد (جدول ۱). دام‌ها در جایگاه‌های انفرادی نگهداری شده و همواره به آب و بلوک‌های لیسیدنی مواد کانی دسترسی داشتند. پانزده روز پیش از آغاز آزمایش به‌عنوان دورهٔ عادت‌دهی در نظر گرفته شد مایع شکمبه صبح روز آزمایش، پیش از خوراک‌دهی صبح از بخش‌های مختلف شکمبه و با استفاده از پمپ خلأ از دام‌های گرفته و بی‌درنگ به نسبت یکسان باهم مخلوط و درون فلاسک‌های با دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس ریخته شد. پس از انتقال به آزمایشگاه مایع شکمبه به‌منظور جدا شدن باکتری‌های متصل به الیاف و اطمینان از حضور همهٔ ریزجانداران شکمبه در محیط کشت، در آغاز با استفاده از مخلوط‌کن با سرعت‌بالا به مدت دو دقیقه مخلوط شده و آنگاه با استفاده از پارچهٔ توری چهار لایه صاف و بخش مایع درون حمام آبی با دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس، تحت جریان پیوستهٔ گاز دی‌اکسید کربن قرار گرفت. مایع شکمبهٔ پالایه‌شده با حجم برابر از بافر مک دوگال (بزاق مصنوعی) مخلوط شده و دوباره تحت جریان پیوستهٔ گاز دی‌اکسید کربن قرار گرفت. بافر مک دوگال بر پایهٔ روش مک‌دوگال (۱۹۴۸) با مخلوط کردن ۹/۸ گرم سدیم بیکربنات، ۲/۷۷ گرم فسفات

هیدروژن سدیم، ۰/۵۷ گرم پتاسیم کلرید، ۰/۴۷ گرم سدیم کلرید، ۰/۱۲ گرم منیزیم سولفات-۷ آبه و ۰/۱۶ گرم کلسیم کلرید-۲ آبه در آب و رساندن حجم محلول نهایی به ۱ لیتر تهیه شد. بافر پیش از مخلوط شدن با مایع شکمبه در حمام آبی ۳۹ درجهٔ سلسیوس و با گاز دی‌اکسید کربن نگهداری شد.

نگهداری (انکوباسیون) منبع‌های مختلف روغن بر پایهٔ Van Nevel & Demeyer (1996) و با اندکی تغییر صورت گرفت (Khalilvandi-Behroozyar *et al*., 2015). به‌منظور از بین بردن تأثیر روز و زمان نگهداری و تأثیر زمان بر کیفیت مایع شکمبهٔ دام‌ها، نگهداری در سه دوره (سه روز متفاوت) بافاصلهٔ یک‌روزه بین پایان یک دوره و آغاز دورهٔ بعد انجام شده و در هر دوره شش فلاسک (با ظرفیت ۱۰۰ میلی‌لیتر) برای هرکدام از مکمل‌ها در هر زمان (۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، به‌منظور بررسی تأثیر زمان و سرعت‌های مختلف عبور از شکمبه) اختصاص یافت (Dohme *et al*., 2003; Fievez *et al*., 2007). به‌علاوه در هر دورهٔ نگهداری، شش فلاسک حاوی مخلوط مایع شکمبه و بافر، مکمل‌های خوراکی و بدون مکمل چربی به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد (Enjalbert *et al*., 2003). ۳۵ میلی‌گرم روغن از هرکدام از مکمل‌ها (Van Nevel & Demeyer, 1996)، ۵۰۰ میلی‌گرم خوراک کامل (همانند با خوراک تغذیه‌شده، آسیاب‌شده با الک ۱ میلی‌متری و ۱۰ میلی‌گرم کربنات هیدروژن آمونیوم درون هر فلاسک ریخته (Van Nevel & Demeyer, 1996; AbuGhazaleh & Jenkins, 2004) و درنهایت ۵۰ میلی‌لیتر از مخلوط مایع شکمبه و بافر تحت جریان مداوم دی‌اکسید کربن درون هرکدام از فلاسک‌ها افزوده و درپوش فلاسک‌ها پلمپ شد. نگهداری در آون با دمای ۳۹ درجهٔ سلسیوس انجام شد. اسیدیتهٔ فلاسک‌ها پیش و پس از پایان دورهٔ نگهداری با استفاده از دستگاه pHمتر اندازه‌گیری شده و درنهایت ۱ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۱۰ نرمال به‌منظور پایان فرایندهای میکروبی به هر فلاسک اضافه شد. استخراج چربی از مایع شکمبه با استفاده از متانول- کلروفرم با نسبت حجمی ۲:۱ (Folch *et al*., 1957)، انجام شد. در هر دوره، چربی استخراج‌شده از دو فلاسک باهم مخلوط و درمجموع سه نمونه از هر دوره به ازای هر مکمل و هر ساعت نگهداری برای تجزیه‌وتحلیل استفاده شد. متیل استر اسیدهای چرب با استفاده از اسیدکلریدریک متانولی تهیه و از مارگاریک اسید (هپتادکانوئیک اسید، Sigma, H3500) به‌عنوان استاندارد داخلی استفاده شد (Ichihara & Fukubayashi, 2010). شرح کامل چگونگی انجام آزمون و اندازه‌گیری الگوی اسیدهای چرب پیشتر گزارش‌شده است (Khalilvandi-Behroozyar *et al*., 2015). درنهایت از تغییرپذیری میزان هرکدام از اسیدهای چرب غیراشباع (ایکوزاپنتانوئیک اسید، دکوزاهگزانوئیک اسید، دوکوزاپنتانوئیک اسید، لینولنیک اسید، لینولئیک اسید، اولئیک اسید و استئاریدونیک اسید) در هر زمان نگهداری نسبت به زمان صفر و پس از تصحیح نسبت به مقادیر بلانک برای محاسبهٔ میزان استفاده شد.

جدول ۱. ترکیب جیرهٔ غذایی دام‌های فیستولادار مورد استفاده برای تهیهٔ مایع شکمبه (گرم بر کیلوگرم مادهٔ خشک)

Table 1. Composition of diet fed to fistulated animals to produce rumen fluid donors (g/kg DM)

Feed Ingredient	Quantity	Feed Ingredient	Quantity
Alfalfa Hay	217.8	Wheat bran	45.3
Corn Silage	249.9	Rice bran	29.5
Wheat straw	132.3	Na-Bicarbonate	3.2
Beet pulp	28.4	CaCO3	4.9
Barley grain	99.8	Calcium, Phosphate-Di	0.8
Corn grain	28.4	Min-Vit Mix*	3.9
Wheat grain	48.8	White Salt	1.6
Canola meal	69.2		
Soybean meal	36.3		

* هر کیلوگرم مکمل شامل: ۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۱۹۰۰۰۰میلی‌گرم Ca، ۹۰۰۰۰ میلی‌گرم P، ۵۰۰۰۰ میلی‌گرم Na؛ ۱۹۰۰۰میلی‌گرم؛ ۳۰۰۰میلی‌گرم Fe ، ۳۰۰میلی‌گرم Cu، ۲۰۰۰میلی‌گرم Mn، ۳۰۰۰میلی‌گرم Zn ، ۱۰۰میلی‌گرم Co، ۱۰۰ میلی‌گرم I، ۱میلی‌گرم Se و ۳۰۰۰ میلی‌گرم پاداکسنده (B.H.T)

* Each kg contained: Vit A, 500000IU; Vit D3, 100000 IU; Vit E, 100mg; Ca, 190000mg; P, 90000mg; Na, 50000mg; Mg, 19000mg; Fe, 3000mg; Cu, 300mg; Mn, 2000mg; Zn, 3000mg; Co, 100mg; I 100mg; Se, 1mg; Antioxidant (B.H.T) 3000mg.

ارزیابی مقادیر گوارش‌پذیری مواد مغذی و فراسنجه‌های شکمبه‌ای در شرایط درون‌تنی

مکمل پوشش‌دار مورد استفاده در این بخش از پژوهش، مکمل پوشش‌دارشده به میزان ۱۰ درصد وزنی نمک‌های کلسیمی بود. در این آزمایش، سه رأس گاو هلشتاین فیستولادار در یک طرح چرخشی با سه دورهٔ ۲۱ روزه (۱۴ روز عادت‌پذیری و ۷ روز نمونه‌گیری) استفاده شدند. تیمارهای آزمایشی شامل روغن ماهی، نمک‌های کلسیمی روغن ماهی و نمک‌های کلسیمی پوشش‌دار بود. خوراک دام‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای CPM-Dairy v3.0.7 و AminoCow® بر پایهٔ نیازهای نگهداری تنظیم و مکمل‌های چربی موردنظر به میزان ۲/۲۵ درصد مادهٔ خشک مصرفی در نظر گرفته شدند (جدول ۲). خوراک در دو وعدهٔ کامل برابر در ساعت‌های ۸ و ۱۶ به میزان ۲۰درصد بالاتر از نیاز نگهداری برای انرژی سوخت‌وسازی به مصرف دام‌ها رسید. دام‌ها در جایگاه‌های انفرادی نگهداری شده و آب در همهٔ ساعت‌های شبانه‌روز در اختیار آن‌ها قرار داشت. مکمل‌های چربی بی‌درنگ در آخور با خوراک پایه مخلوط شدند. دام‌ها در همهٔ ساعت‌های شبانه‌روز به سنگ نمک دسترسی داشتند. وزن‌کشی دام‌ها به‌منظور تعیین میزان خوراک مصرفی در آغاز هر دوره در دو روز متوالی بی‌درنگ پیش از خوراک‌دهی صبح انجام و میانگین وزن در دو روز به‌عنوان وزن دام در نظر گرفته شد. همهٔ موارد به‌استثنای نوع مکمل‌های مورد استفاده یکسان بودند (جدول ۲). جدول‌های ۲ و ۳ به ترتیب نشان‌دهندهٔ ترکیب شیمیایی و الگوی اسیدهای چرب جیره‌های آزمایشی است.

گوارش‌پذیری مواد مغذی

ضریب‌های گوارش‌پذیری مواد مغذی با استفاده از خاکستر نامحلول در اسید به‌عنوان استاندارد داخلی تعیین شد (Van Keulen & Young, 1977). تهیهٔ نمونهٔ مدفوع از ناحیهٔ رکتوم در فاصل‌های زمانی شش ساعته به مدت یک هفته (هفت روز) از صبح روز ۱۵ هر دوره آغاز تا صبح روز ۲۲ دوره‌ها انجام شد. نمونه‌های مربوط به هر دام باهم مخلوط و زیرنمونه‌ها پس از خشک شدن در آون با حرارت ۱۰۵ درجهٔ سلسیوس، به مدت ۲۴ ساعت، برای انجام تجزیه‌های شیمیایی با آسیاب دارای غربال ۱ میلی‌متری آسیاب شدند. دو نمونه برای هر حیوان در هر دوره از مخلوط نمونه‌ها برداشته و برای انجام تجزیه‌های شیمیایی استفاده شد. شمارهٔ شناسایی هرکدام از دستورکارهای مورد استفاده برای ارزیابی مقادیر مواد مغذی در بخش‌های پیشین آورده شده است.

جدول ۲. ترکیب جیرهٔ غذایی دام‌های فیستولادار مورد استفاده در آزمایش درون‌تنی (گرم بر کیلوگرم مادهٔ خشک)

Table 2. Composition of diet fed to fistulated cows which used in in vivo study (g/kg DM)

	Fish oil	Fish Ca-Salts	Fish Ca-SaltsEncasulated
Alfalfa Hay	223.6	223.6	223.6
Corn Silage	186.3	186.3	186.3
Beet pulp	37.7	37.7	37.7
Corn grain	112.9	112.9	112.9
Barley grain	131.2	131.2	131.2
Wheat grain	40.5	40.5	40.5
Soybean meal	105.8	105.8	105.8
Canola meal	67.1	67.1	67.1
Corn Gluten meal	26.9	26.9	26.9
CaCO3	1.2	1.2	1.2
Magnesium Oxide	2.9	2.9	2.9
White Salt	2.1	2.1	2.1
Na-Bicarbonate	9.1	9.1	9.1
Calcium, Phosphate-Di	4.9	4.9	4.9
Min-Vit Mix*	7.9	7.9	7.9
Fish Oil	40	NA	NA
Ca-Salts of fish oil	NA	47	NA
Coated Ca-Salts of fish oil	NA	NA	47
DM (%)	60.74	60.74	60.74
NEl (Mcal/kg)	1.66	1.66	1.66
CP (%)	17.1	17.1	17.1
NDF (%)	18.98	18.98	18.98
NFC (%)	24.24	24.24	24.24
CF (%)	6.34	6.34	6.34
Ca (%)	0.76	0.85	0.83
P (%)	0.55	0.51	0.51

جدول ۳. ترکیب اسیدهای چرب (g/100 g اسیدهای چرب) موجود در جیره‌های آزمایشی مورد استفاده در آزمایش درون‌تنی

Table 3. Dietary fatty acid profile (g/100g fatty acids) for feeding fistulated cows used in in vivo study

Fatty acids	*Fish oil*	*Fish Ca-Salts*	*Fish Ca-Salts Encasulated*
16:0	14.76	14.83	15.03
16:1 cis-9	6.31	6.21	5.95
18:0	7.16	7.11	8.02
18:1- trans	1.57	1.72	1.73
18:1 cis-9	17.53	17.31	17.23
18:2n-6	22.65	22.58	22.35
18:3n-3	2.98	3.11	3.08
20:00	2.17	2.17	2.17
20:1cis	0.62	0.62	0.62
20:4n-3	0.36	0.36	0.33
20:5n-3	7.42	7.38	7.39
22:0	0.78	0.78	0.78
22:1 cis	0.34	0.33	0.34
22:5n-3	1.17	1.23	1.18
22:6n-3	7.25	7.05	6.87
Other	6.78	1.38	1.38
SFA	24.87	24.89	26
MUFA	26.37	26.19	25.87
PUFA	41.83	41.52	40.96
N-3 fatty acids	19.18	19.13	18.85
N-6 fatty acids	22.65	22.58	22.35
N6/N3 ratio	1.18	1.18	1.18

اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی

به‌منظور ارزیابی تأثیر منبع‌های مختلف چربی بر فراسنجه‌های شکمبه‌ای، مایع شکمبه در روزهای ۱۸ و ۱۹ هر دوره ۴ ساعت پس از زمان مصرف خوراک صبح با استفاده از پمپ مکش دریافت و pH بی‌درنگ با استفاده از دستگاه pHمتر اندازه‌گیری شد. سپس مایع شکمبه با استفاده از پارچهٔ چهار لایه صاف و دو نمونهٔ ۵۰ میلی‌لیتری از آن با ۱ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۵۰ درصد (نسبت ۱ به ۵۰ اسیدسولفوریک به مایع شکمبه) برای تجزیهٔ میزان نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه و الگوی اسیدهای چرب فرار شکمبه مخلوط و بی‌درنگ در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس تا انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار در مایع شکمبه (نمونه‌های ۴ ساعت پس از مصرف خوراک) از دستگاه فام‌نگار گازی (کروماتوگرافی گازی GC-PU4410-PHILIPS) با ستون شیشه‌ای (۱/۶۵ متر× ۴/۶ میلی‌متر) فیلیپس استفاده شد (Ottenstein & Batler, 1971). میزان تزریق نمونه‌ها به ستون ۱ میکرو لیتر بود. دمای محل تزریق و محل تشخیص ۲۳۰ درجهٔ سلسیوس بود. دمای اولیهٔ ستون برابر با ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس بود که پس از به میزان ۵ درجهٔ سلسیوس در دقیقه تا دمای ۱۳۰ درجهٔ سلسیوس افزایش‌یافته و به مدت ۱ دقیقه در این دما باقی ماند. درنهایت دمای ستون به میزان ۹ درجهٔ سلسیوس در دقیقه تا دمای ۲۱۰ درجهٔ سلسیوس افزایش یافت و این دما به مدت ده دقیقه به‌منظور خارج شدن همهٔ نقطه‌های اوج (پیک‌ها) و اطمینان از تمیز شدن ستون حفظ شد. برای تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه از روش نورسنجی با استفاده شد (Broderick & Kang, 1980). در این واکنش از سدیم نیتروپروسید، فنول و بر پایهٔ واکنش برت هولت استفاده شد. غلظت‌های مختلف محلول استاندارد با استفاده از محلول ۱۰۰ میلی‌مولار آمونیاک (۰/۶۶۰۷ گرم سولفات آمونیوم خشک در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال) تهیه شد و درنهایت جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از سیستم الایزا (Garni, DANA, DA-3200) خوانده شد.

شمارش پروتوزوآ

به‌منظور شمارش شمار پروتوزوآ در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه از لام هماتوسیتومتر و میکروسکوپ نوری معمولی استفاده شد. نمونه‌های مایع شکمبه در روزهای نمونه‌گیری از مایع شکمبه اخذشده و بدون افزودن اسید بی‌درنگ به آزمایشگاه منتقل و شمارش شدند. بدین منظور پس از باز کردن درپوش بطری‌های محتوی مایع شکمبه صاف‌شده از چهار لایهٔ صافی و پس از مخلوط کردن کامل آن، درون سه لولهٔ آزمایش، سه نمونهٔ کوچک‌تر به حجم ۵ میلی‌لیتر تهیه شد. به‌منظور تثبیت، رنگ‌آمیزی و شمارش پروتوزوآ از محلول ثابت‌کنندهٔ فرمالدئید ۵۰ درصد در محلول کلرور سدیم ۰/۹ درصد (هم‌حجم با نمونه) و محلول متیل گرین استفاده شد (Dehority, 2003). به دلیل شمار زیاد پروتوزوآ، برای آسانگری در امر شمارش، مایع شکمبه به میزان ۱:۱ با سرم فیزیولوژیک رقیق و ۱۰۰ میکرولیتر از آن روی لام هماتوسیتومتر ریخته و توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر شمارش شد.

تجزیهٔ آماری

از طرح کامل تصادفی در تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌های مربوط به ترکیب شیمیایی، الگوی اسیدهای چرب و میزان آزادسازی روغن از منبع‌های محافظت‌شده استفاده شد. در تعیین میزان، تأثیر زمان نگهداری (ساعت) به‌عنوان عامل تکرارشونده و اثر متقابل زمان نگهداری و نوع مکمل در مدل آماری قرار گرفت. تجزیهٔ آماری با استفاده از PROC MIXED نرم‌افزار آماری SAS 9.1 (2002) انجام و از ساختار کوواریانس First order autoregressive استفاده شد. داده‌ها به‌صورت میانگین حداقل مربعات و SEM در جدول‌های مربوطه گزارش و تصحیح داده‌ها با استفاده از آزمون توکی و مقایسهٔ میانگین‌ها با گزینهٔ PDIFF در سطح احتمال آماری ۰/۰۵ انجام شد.

آزمون درون‌تنی به‌منظور ارزیابی اثر مکمل‌ها بر گوارش‌پذیری و فراسنجه‌های شکمبه‌ای در قالب طرح چرخشی متوازن با سه دام، سه تیمار و سه دوره انجام شد. تجزیهٔ داده‌ها با استفاده از PROC MIXED نرم‌افزار آماری SAS 9.1 با اثر دوره، اثر باقی‌مانده از دورهٔ پیش، اثر تصادفی حیوان و اثر ثابت تیمار انجام شد. اثر باقی‌مانده از دورهٔ پیش به دلیل نداشتن معنی‌داری تا ۰/۲۵ از مدل آماری حذف شد. به‌منظور تجزیهٔ آماری داده‌های مربوط به فراسنجه‌های شکمبه‌ای، خونی و دیگر داده‌هایی که در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شده بود از گزینهٔ داده‌های تکرار شده در واحد زمان استفاده شده و اثر زمان اندازه‌گیری و اثر متقابل زمان و تیمار نیز وارد مدل شد. داده‌ها به‌صورت میانگین حداقل مربعات و SEM در جدول‌های مربوطه گزارش و مقایسهٔ میانگین‌ها با گزینهٔ PDIFF نرم‌افزار آماری SAS 9.1 (2002) با استفاده از تست توکی در سطح آماری ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی و الگوی اسیدهای چرب

میانگین حداقل مربعات مربوط به ترکیب شیمیایی و الگوی اسیدهای چرب مکمل‌های با و بدون پوشش به ترتیب در جدول‌های ۴ و ۵ گزارش‌شده است. عدم‌تغییر الگوی اسیدهای چرب غیراشباع در حین تهیهٔ نمک‌های کلسیمی نشان‌دهندهٔ مناسب بودن روند ساخت مورد استفاده به‌منظور حفظ الگوی اسیدهای چرب غیراشباع بود. مقادیر ارائه‌شده قابل‌مقایسه با مقادیر ارائه‌شده برای نمک‌های کلسیمی در بررسی‌های پیشین و جدول‌های مواد خوراکی در نرم‌افزارهای ارزیابی مواد خوراکی است (NRC, 2001).

پوشش‌دار کردن نمک‌های کلسیمی با استفاده از اسیدهای چرب اشباع به میزان ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد وزنی به‌صورت معنی‌داری سبب افزایش میزان عصارهٔ اتری و کاهش میزان خاکستر و کلسیم موجود در ترکیب نمک‌های کلسیمی شد. پوشش‌دار کردن نمک‌های کلسیمی روغن ماهی با استفاده از اسیدهای چرب اشباع سبب افزایش میزان اسیدهای چرب کل و نیز افزایش نسبت اسیدهای چرب اشباع به اسیدهای چرب غیراشباع شد. افزایش مقادیر اسید پالمتیک و اسید استیک به دلیل استفاده از آن‌ها در ترکیب پوشش مورد استفاده منطقی به نظر می‌رسد. بااین‌حال با توجه به راهبرد (استراتژی) مورد استفاده می‌توان از نسبت‌های مختلف ترکیب اسیدهای چرب اشباع به‌عنوان پوشش ثانویه استفاده کرد. عدم‌تغییر در ترکیب اسیدهای چرب در فرایند تولید نمک‌های کلسیمی باوجود استفاده از دماهای بالاتر در مقایسه با فرایند ریزپوشانی را می‌توان در نتیجهٔ به‌کارگیری محیط خنثی با استفاده از گاز آرگون دانست.

جدول ۴. ترکیب شیمیایی نمک‌های کلسیمی با و بدون پوشش اسیدهای چرب اشباع (g/kg DM)

Table 4. Chemical composition of Ca-salts (g/kg DM)

	DM	CF	Ca	Ash	TDN (%)†	DE (Mcal/kg DM)¥	NE_l (Mcal/kg DM)¥
Fish Ca-Salts	972.2	873.56	113.53	126.44	181.52	7.58	6.07
Fish Ca-Salts Encasulated (5 %)	974.85	878.64	87.12	96.21	187.809	7.846	6.277
Fish Ca-Salts Encasulated (10 %)	973.82	882.32	78.64	91.5	188.596	7.879	6.303
Fish Ca-Salts Encasulated (15 %)	974.88	891.13	69.86	83.75	190.479	7.958	6.366
SEM	5.718	15.49	14.272	15.49	2.551	0.107	0.085

† میانگین و انحراف معیارهای گزارش‌شده مربوط به ۵ تکرار است.

¥ بر پایهٔ معادلات نیازهای مواد مغذی گاوهای شیری NRC (2001) محاسبه شده است.

† Presented Data was LS-Means and corresponding SEM from 5 replications for each of supplements.

¥ Calculated from NRC 2001.

جدول ۵. ترکیب اسیدهای چرب (g/100 g اسیدهای چرب) موجود در نمک‌های کلسیمی پیش و پس از پوشش‌دار کردن

Table 5. Fatty acid profile of fish oil Ca-salts and encapsulated Ca-salts (g/100g FA)

Fatty acids	*Ca-Salts*	*Ca-Salts Encasulated (5 %)*	*Fish Ca-Salts Encasulated (10 %)*	*Fish Ca-Salts Encasulated (15 %)*	S.E.M
12:0	0.129	0.126	0.123	0.12	0.0038
14:0	1.117	1.092	1.073	1.045	0.034
15:0	2.106	2.154	2.131	2.089	0.064
16:0	3.094[d]	5.142 [c]	6.735 [b]	8.033 [a]	0.094
16:1 cis-9	4.083	4.133	4.063	3.974	0.124
16:2	5.072	5.149	5.088	4.982	0.155
16:4n-3	6.06	5.925	5.823	5.668	0.185
17:0	7.049	6.892	6.773	6.592	0.215
18:0	8.378 [c]	9.857 [b]	10.252 [b]	11.562 [a]	0.365
18:1 cis-9	25.952	25.238	24.882	23.209	0.655
18:1 trans	1.404	1.363	1.338	1.301	0.06
18:2n-4	0.366	0.355	0.349	0.339	0.015
18:2n-6	2.055	1.965	1.929	1.871	0.092
18:3n-3	2.718[a]	2.485 [a]	2.444 [a]	2.356 [a]	0.097
18:4n-3	3.114	3.024	2.969	2.886	0.134
20:00	0.168	0.163	0.16	0.156	0.017
20:1cis	1.296	1.211	1.191	1.152	0.053
20:4n-3	0.88	0.854	0.839	0.815	0.038
20:4n-6	0.781	0.758	0.744	0.723	0.033
20:5n-3	9.944[a]	9.587 [ab]	9.411 [ab]	9.139 [b]	0.378
22:1 cis	0.237	0.23	0.226	0.22	0.01
22:5n-3	1.721[a]	1.660 [ab]	1.628 [ab]	1.581 [b]	0.072
22:6n-3	10.220[a]	9.771 [ab]	9.598 [ab]	9.310 [b]	0.346
Other	2.028	0.864	0.227	0.877	0.334
SFA	22.041	25.426	27.248	29.596	0.694
MUFA	32.972[a]	32.176 [a]	31.701 [a]	29.855 [b]	0.739
PUFA	41.943[a]	41.534 [a]	40.824 [ab]	39.672 [b]	0.854

اعداد گزارش‌شده میانگین حداقل مربعات و SEM ۳ اندازه‌گیری جداگانه برای هرکدام از فرآوری‌ها هستند.

اعداد هر ردیف با علامت بالانویس متفاوت تفاوت آماری دارند (P ≤۰/۰۵).

Presented Data was LSMeans and corresponding SEM from 3 replications for each of supplements.

Means with different superscript in each row are significantly different (P<0.05).

میزان هیدروژنه شدن زیستی شکمبه‌ای اسیدهای چرب غیراشباع و میزان آزادسازی در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش

جدول‌های ۶ و ۷ به ترتیب میزان اسیدهای چرب غیراشباع با یک و چند پیوند دوگانهٔ مکمل‌های تولیدی با روش‌های مختلف در مقایسه با روغن ماهی و اسیدهای چرب روغن ماهی را در ساعت‌های مختلف نگهداری شکمبه‌ای و میزان آزادسازی روغن از ترکیب مکمل‌های محافظت‌شده نشان می‌دهند. حجم بالای هیدروژنه شدن زیستی اسیدهای چرب غیراشباع روغن ماهی محافظت‌نشده در این آزمایش با نتایج دیگر محققان همخوانی دارد (Chilliard *et al*., 2000; Scollan *et al*., 2001; Wachira *et al*., 2000). با توجه به متفاوت بودن مقادیر گزارش‌شده در منبع‌های درزمینهٔ تجزیهٔ چربی (لیپولیز) اسیدهای چرب از منبع‌های مختلف در این ارتباط، انجام آزمایش‌های همانند با دیگر منبع‌های اسیدهای چرب غیراشباع توصیه می‌شود.

جدول ۶. میانگین درصد هیدروژنه شدن زیستی مجموع اسیدهای چرب امگا-۳ و ۶ †و اسیداولئیک در ساعت‌های مختلف نگهداری

Table 6. Biohydrogenation of Omega-3, Omega-6 and Omega-9 fatty acids in different incubation times

	Omega 3& Omega-6			C18:1		
	12	24	48	12	24	48
Fish Oil	51.973[b]	76.845[bx]	88.416[bx]	47.871[b]	61.396[by]	80.371[ay]
Fish Fatty acids	64.797[a]	88.843[ax]	92.322[ax]	64.802[a]	74.407[ay]	82.374[ay]
Fish Ca-Salts	25.749[e]	39.767[e]	63.094[e]	21.749[d]	35.765[d]	59.22[d]
Encapsulated (5 %) Fish Ca-Salts	20.148[d]	29.618[dx]	39.268[e]	17.394[f]	21.161[f]	34.351[f]
Encapsulated (10 %) Fish Ca-Salts	16.337[g]	27.274[fx]	31.749[f]	13.58[ef]	24.782[ey]	29.913[g]
Encapsulated (15 %) Fish Ca-Salts	17.628[f]	26.415[cx]	32.328[dx]	16.802[e]	26.899[ey]	31.184[ey]
SEM	1.0086	1.0086	1.0086	1.2535	1.2535	1.2535

a، b، c علامت بالانویس متفاوت در هر ستون نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار آماری بین انواع مکمل‌ها یک‌زمان نگهداری است.

x، y در هر ردیف نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت معنی‌دار آماری در هر زمان نگهداری بین دو دسته اسید چرب مورد بررسی در هر مکمل است.

a,b,c Means with different superscript in each column resemble significant difference between different supplements x,y, Means with different superscript in each row resemble significant difference between FA groups in each of incubation times.

استفاده از نمک‌های کلسیمی اسیدهای چرب ماهی سبب کاهش معنی‌دار میزان هیدروژنه شدن زیستی اسیدهای چب غیراشباع نسبت به منبع‌های غیر محافظت‌شده شد. مقایسهٔ میزان‌های هیدروژنه شدن زیستی نشان‌دهندهٔ کارایی مناسب نمک‌های کلسیمی در کاهش میزان هیدروژنه شدن زیستی اسیدهای چرب غیراشباع روغن ماهی است. بااین‌حال، پوشش‌دار کردن سبب افزایش کارایی محافظتی نمک‌های کلسیمی شد. افزون بر این اختلاف معنی‌داری بین میزان هیدروژنه شدن زیستی مکمل‌های پوشش‌دارشده با مقادیر متفاوت مادهٔ پوشاننده وجود داشت. کمترین میزان محافظت بین مکمل‌های پوشش‌دارشده مربوط به نمک‌های کلسیمی پوشش‌دارشده با ۵ درصد مادهٔ پوشاننده بر پایهٔ وزن بود ولی اختلاف معنی‌داری بین سطوح دیگر وجود نداشت. میزان هیدروژنه شدن زیستی اسیدهای چرب تک غیراشباع کمتر از اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه بود. افزایش ساعت‌های نگهداری سبب افزایش میزان هیدروژنه شدن زیستی ظاهری و کاهش کارایی پوشش‌دهی مکمل‌های کلسیمی در کاهش میزان هیدروژنه شدن زیستی شکمبه‌ای شد. با افزایش زمان نگهداری از ۱۲ به ۲۴ و ۴۸ ساعت میزان هیدروژنه شدن زیستی اسیدهای چرب در ترکیب روغن ماهی افزایش یافت که این امر را می‌توان با افزایش لیپولیز و فراهمی اسیدهای چرب غیراستریفه باگذشت زمان توجیه کرد. افزون بر این پایین‌تر بودن نرخ تجزیهٔ چربی دکوزاهگزانوئیک اسید و ایکوزاپنتانوئیک اسید در مقایسه با لینولئیک اسید از دیگر عامل‌های احتمالی دراین‌ارتباط عنوان شده است (Dohme *et al*., 2003). مجموع این عامل‌ها را می‌توان دلیل افزایش میزان هیدروژنه شدن زیستی با افزایش زمان نگهداری از ۲۴ به ۴۸ ساعت در این بررسی دانست که به‌طورمعمول در بررسی‌های مربوط به اسیدهای چرب غیراشباع کوتاه زنجیرتر مشاهده نمی‌شود (Gulati *et al*., 1997). میزان‌های بالای هیدروژنه شدن زیستی ظاهری اسیدهای چرب غیراشباع روغن ماهی و اسیدهای چرب آزاد محافظت‌نشده در این آزمایش با نتایج دیگر محققان همخوانی دارد (Chilliard *et al*., 2000; Scollan *et al*., 2001; Wachira *et al*., 2000). افزایش زمان نگهداری از ۱۲ به ۲۴ و ۴۸ ساعت سبب افزایش میزان هیدروژنه شدن زیستی در نمک‌های کلسیمی شد که با افزایش آزاد شدن اسیدهای چرب از ساختار نمکی با کاهش اسیدیتهٔ مایع شکمبه در نتیجهٔ تخمیر مواد در محیط کشت قابل توجیه است (Sukhija & Palmquist, 1990; Van Nevel & Demeyer, 1996). با افزایش زمان نگهداری، اسیدیتهٔ محیط کاهش یافت (جدول ۸) که این امر با نتایج تحقیقات دیگر محققان همخوانی دارد (Van Nevel & Demeyer, 1996). محققان مختلفی در نتایج بررسی‌های خود کاهش قابلیت محافظتی نمک‌های کلسیمی اسیدهای چرب را در نتیجهٔ کاهش pH گزارش کرده‌اند (Castaneda-Gutierrez *et al*., 2007; Demeyer, 1999; Ferlay *et al*., 1992; Sukhija & Palmquist, 1990; Van Nevel & Demeyer, 1996). بااین‌حال تفاوت‌هایی بین میزان کاهش محافظت در نتیجهٔ افزایش اسیدیته بین نمک‌های کلسیمی اسیدهای چرب مختلف گزارش شده است. افزایش میزان غیراشباع بودن سبب کاهش مقاومت در برابر هیدروژنه شدن زیستی می‌شود (Sukhija & Palmquist, 1990).

جدول ۷. درصد آزادسازی روغن از مکمل‌های محافظت‌شده در مایع شکمبه و محیط‌های شبیه‌سازی‌شدهٔ دستگاه گوارش

Table 7. Oil release percentage from protected fatty acid supplements in rumen fluid and simulated GI fluids

	Rumen Fluid	Abomasum	Small intestine	Large Intestine	SEM
Fish Ca-Salts	31.345^{ay}	87.426^{x}	3.863^{z}	4.114^{az}	0.391
Encapsulated (5 %) Fish Ca-Salts	24.211^{by}	86.216^{x}	4.546^{z}	3.418^{bz}	0.3139
Encapsulated (10 %) Fish Ca-Salts	18.341^{cy}	87.115^{x}	3.846^{z}	3.259^{bz}	0.2485
Encapsulated (15 %) Fish Ca-Salts	20.395^{cy}	86.654^{x}	4.258^{z}	3.518^{bz}	0.5621
SEM	0.6501	0.3021	0..5877	0.1385	

a، b، c علامت بالانویس متفاوت در هر ستون نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار آماری بین انواع مکمل‌های محافظت‌شده است (P≤۰/۰۵).

x، y، z، در هر ردیف نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت معنی‌دار آماری بین محیط‌های مختلف دستگاه گوارش در هر مورد از مکمل‌های مورد بررسی است (P≤۰/۰۵).

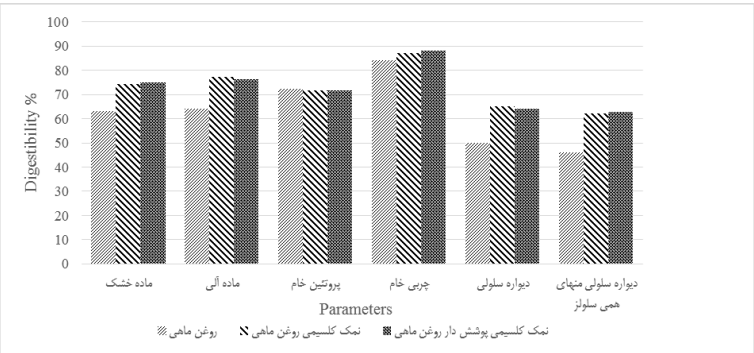
a,b,c Means with different superscript in each column resemble significant difference between different supplements x,y, Means with different superscript in each row resemble significant difference between different simulated GI fluids.

کاهش میزان آزادسازی روغن در شکمبه (جدول۷) از مکمل‌های کلسیمی در نتیجهٔ ایجاد پوشش ثانویه را می‌توان دلیل اصلی کاهش میزان هیدروژنه شدن زیستی دانست (جدول۶). بااین‌حال پوشش‌دار کردن با نسبت‌های مختلف اسیدهای چرب اشباع تأثیری بر میزان آزادسازی در شیردان به‌عنوان محل اصلی آزادسازی روغن از منشأ نمک‌های کلسیمی نداشت. بیشترین میزان آزادسازی روغن از ترکیب نمک‌های کلسیمی و نمک‌های کلسیمی پوشش‌دار در محیط شبیه‌سازی‌شدهٔ شیردان بوده و تفاوت معنی‌داری دراین‌ارتباط وجود نداشت؛ بنابراین پوشش‌دار کردن با ترکیب مورد استفاده تأثیری منفی بر آزادسازی روغن در شیردان و آزادسازی در کل دستگاه گوارش نداشت (جدول ۷).

گوارش‌پذیری مواد مغذی

شکل ۱ نشان‌دهندهٔ ضریب‌های گوارش‌پذیری مواد مغذی در نتیجهٔ مصرف مکمل‌های کلسیمی، کلسیمی پوشش‌دار و روغن ماهی است. نتایج نشان‌دهندهٔ نبود تفاوت معنی‌دار در گوارش‌پذیری چربی، مادهٔ خشک، مادهٔ آلی و دیوارهٔ یاخته‌ای در بین منبع‌های کلسیمی و کلسیمی پوشش‌دار بود. روش‌های محافظت اسیدهای چرب با استفاده از روش ساخت نمک‌های کلسیمی و نمک‌های کلسیمی پوشش‌دار سبب از بین رفتن تأثیر منفی اسیدهای چرب غیراشباع بر فراسنجه‌های گوارش‌پذیری دیوارهٔ یاخته‌ای، مادهٔ خشک و مادهٔ آلی شده و تأثیر منفی بر گوارش‌پذیری چربی و مکمل‌های چربی نداشت. این امر نشان‌دهندهٔ مناسب بودن نوع پوشش مورد استفاده بود. تفاوتی در گوارش‌پذیری نمک‌های کلسیمی اسیدهای چرب روغن ماهی با و بدون پوشش اسیدهای چرب اشباع وجود نداشت. افزون بر این مصرف نمک‌های کلسیمی در مقایسه با روغن محافظت‌نشده تأثیری بر گوارش‌پذیری چربی نداشت. نداشتن تأثیر منفی نمک‌های کلسیمی بر گوارش‌پذیری دیوارهٔ یاخته‌ای در تحقیقات چندی به اثبات رسیده است (Jenkins, 1993; Jenkins & Palmquist, 1984; Tamminga 1991, Doreau).

Chouinard *et al.* (1998)، اثر نمک‌های کلسیمی سه نوع روغن کانولا، سویا و کتان را روی گوارش‌پذیری مواد مغذی بررسی و مشاهده کردند که هیچیک از این موارد، تأثیر معنی‌داری روی گوارش‌پذیری دیوارهٔ یاخته‌ای و دیوارهٔ یاخته‌ای منهای همی سلولز نداشته و گوارش‌پذیری مادهٔ خشک، مادهٔ آلی و پروتئین را افزایش دادند. Jenkins & Palmquist (1984) در بررسی تأثیر روغن سویا و پیه که به‌ترتیب منبع‌های اسید لینولئیک و اولئیک هستند به این نتیجه رسیدند که این دو منبع روغن سبب کاهش گوارش‌پذیری الیاف می‌شوند. مصرف نمک‌های کلسیمی این منبع‌های سبب بهبود گوارش‌پذیری نسبت به مصرف منبع‌های روغن بدون فرآوری شد. محققان در نتایج بررسی تأثیر منبع‌های مختلف اسیدهای چرب امگا-۳ بر گوارش‌پذیری شکمبه‌ای و پس شکمبه‌ای مواد مغذی به این نتیجه رسیدند که روغن ماهی سبب کاهش گوارش‌پذیری شکمبه‌ای الیاف و مادهٔ آلی می‌شود ولی درعین‌حال تأثیری بر گوارش‌پذیری در کل دستگاه گوارش ندارد (Fievez *et al*., 2003; Wachira *et al*., 2000).



شکل ۱. اثر انواع مکمل های روغن ماهی بر قابلیت هضم ظاهری درون تنی مواد مغذی

Figure 1. Effects of different fish oil sulements on in vivo apearant nutrient digestibility

تأثیر متفاوت انواع اسیدهای چرب غیراشباع بر گوارش‌پذیری را می‌توان تحت تأثیر میزان غیراشباع بودن آن‌ها و تأثیر پیامد هرکدام از آن‌ها بر جمعیت میکروبی دستگاه گوارش دانست. افزون بر این سرعت و وسعت متفاوت انواع اسیدهای چرب در شکمبه هم می‌تواند توجیه‌کنندهٔ بخشی از این اثرگذاری‌ها باشد. Huws *et al.* (2010) تأثیر سطوح مختلف روغن ماهی بر باکتری‌های سلولولتیک در حضور گراس و شبدر قرمز در حالت (فاز) مایع و جامد محتویات شکمبه بررسی شدند. در این آزمایش بالاترین سطح روغن ماهی در حضور شبدر قرمز سبب کاهش *Ruminococcus albus* در حالت مایع محتویات شکمبه شد، ولی تأثیری بر جمعیت دیگر گونه‌های سلولولتیک نداشت. بااین‌حال در حالت جامد جمعیت *Ruminococcus flavefaciens* و *Ruminococcus albus* تحت تأثیر قرار نگرفته و جمعیت *Fibrobacter succinogenes* تنها در حضور گراس‌ها کاهش یافت. افزون بر مطالب بالا دیگر محققان بر سمی بودن اسیدهای چرب زنجیر بلند و به‌ویژه اسیدهای چرب غیراشباع برای جمعیت میکروبی شکمبه تأکید کرده‌اند (Kepler *et al.*, 1966; Maczulak *et al.*, 1981). تأثیر مهارکنندگی بیشتر اسیدهای چرب ماهی را می‌توان بازتابی از افزایش سمیت با افزایش طول زنجیر و شمار پیوندهای دوگانه و حضور طولانی‌تر آن‌ها در محیط شکمبه به دلیل کندتر بودن روند هیدروژن‌دار شدن در مقایسه با اسیدهای چرب کوتاه زنجیرتر همانند اسیدهای چرب ۱۸ کربنه دانست.

فراسنجه‌های شکمبه‌ای

جدول‌های ۸ و ۹ نشان‌دهندهٔ اثر استفاده از مکمل‌های محافظت‌شده و نشدهٔ روغن ماهی بر فراسنجه‌های شکمبه‌ای در ساعت‌های مختلف پس از مصرف خوراک و غلظت اسیدهای چرب فرار در مایع شکمبه ۴ ساعت پس از مصرف خوراک است. نتایج این بررسی نشان‌دهندهٔ نداشتن تأثیر منفی مکمل‌های پوشش‌دار در مقایسه با مکمل‌های بدون پوشش بر فراسنجه‌های مختلف شکمبه‌ای است. استفاده از پوشش‌دار کردن با استفاده از اسیدهای چرب اشباع هیچ تأثیر منفی بر روند سوخت‌وساز شکمبه‌ای در مقایسه بانمک‌های کلسیمی بدون پوشش نداشت. در همهٔ ساعت‌های نمونه‌گیری مکمل‌های روغنی محافظت‌نشده سبب کاهش میزان کل اسیدهای چرب فرار، استات و بوتیرات و افزایش نسبت مولی پروپیونات شدند. تأثیر منفی منبع‌های اسیدهای چرب غیراشباع به‌صورت محافظت‌نشده در محیط شکمبه توسط محققان مختلفی گزارش شده است (Doreau & Chilliard, 1997; Doreau & Ferlay, 1995). بالاترین میزان pH شکمبه مربوط به گروه دریافت‌کنندهٔ روغن ماهی بود که می‌تواند به دلیل کاهش زیاد تولید اسیدهای چرب فرار در اثر کاهش گوارش‌پذیری و تأثیر سمی اسیدهای چرب روغن ماهی بر ریزجانداران شکمبه باشد. نتایج همانندی مبنی بر افزایش pH شکمبه همزمان با افزایش سطوح روغن ماهی در جیره گزارش شده است (Shingfield *et al.*, 2012). بااین‌حال در برخی بررسی‌ها، تفاوت معنی‌داری در میزان pH در نظام کشت پیوسته در نتیجهٔ افزودن روغن ماهی، سویا و یا روغن اشباع در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نشده ولی روغن ماهی برخلاف روغن سویا و روغن اشباع سبب افزایش فراوان جمعیت شکمبه‌ای *Selenomonas ruminantium* شده است (Potu *et al.*, 2011). روغن ماهی و اسیدهای آزاد سبب کاهش معنی‌دار جمعیت پروتوزوآ در مقایسه با گروه شاهد (کنترل) و مکمل‌های محافظت‌شده شدند. بررسی‌های مختلفی تأثیر انواع اسیدهای چرب بر جمعیت پروتوزوآ و باکتری‌های شکمبه را گزارش کرده‌اند (Maia *et al.*, 2007; Doreau & Ferlay, 1995). در اغلب موارد روغن ماهی سبب کاهش جمعیت پروتوزوآ شده (Hristov *et al.*, 2003) و برخی آن را یکی از سازوکارهای کاهش تولید متان عنوان کرده‌اند (Fievez *et al.*, 2003; Whitelawa *et al.*, 1984). Hristov *et al* (2004) اسید کاپریک، لوریک و میریستیک را به‌عنوان سمی‌ترین اسیدهای چرب برای پروتوزوآی شکمبه عنوان کردند. بااین‌حال در یکی از بررسی‌های اخیر با استفاده از گاوهای شیری، سطوح مختلف روغن ماهی تأثیری بر جمعیت پروتوزوآی شکمبه نداشت (Shingfield *et al.*, 2012). باوجود کاهش جمعیت پروتوزوآ، غلظت نیتروژن آمونیاکی در گروه دریافت‌کنندهٔ روغن ماهی و اسیدهای

چرب محافظت‌نشده افزایش یافت که با نتایج برخی از محققان همخوانی داشت (Hristov *et al*., 2003; Shingfield *et al*., 2012). Ganjkhanlou (2010) در بررسی تأثیر مکمل‌های چربی پریل و نمک‌های کلسیمی روغن پالم تفاوتی بین این دو نوع منبع چربی بر انواع فراسنجه‌های شکمبه‌ای مشاهده نکرد.

با کاهش جمعیت پروتوزوآ انتظار می‌رود به‌واسطهٔ کاهش روی گرد (Turnover) پروتئین باکتریایی و کاهش آزادسازی خالص آمونیاک از منشأ پروتوزوآ، غلظت نیتروژن آمونیاکی کاهش یابد (Doreau & Ferlay 1995). بااین‌حال می‌توان این پدیده را با افزایش باکتری‌های پروتئولتیک در پاسخ به کاهش پروتوزوآ و یا کاهش ساخت پروتئین میکروبی در نتیجهٔ کاهش فعالیت‌های باکتریایی توجیه کرد (Maia *et al*., 2007; Yang *et al*., 2009). گزارش‌های متناقضی درزمینهٔ نتیجهٔ روغن ماهی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی و میزان و کارایی ساخت (سنتز) پروتئین میکروبی وجود دارد (Wachira *et al*., 2000; Doreau & Ferlay 1995). بااین‌حال توجه به این مطلب ضروری است که بخشی از اثرگذاری‌های روغن ماهی در بالاتر بودن غلظت نیتروژن آمونیاکی می‌تواند به دلیل کاهش بیشتر فعالیت‌های ساخت پروتئین میکروبی در نتیجهٔ جلوگیری از رشد دیگر باکتری‌ها و موجود (ارگانیسم)های شکمبه و درنتیجه کاهش استفاده شدن نیتروژن آمونیاکی در مسیر ساختی باشد. افزون بر این اطلاعاتی درزمینهٔ تغییر در فعالیت آنزیم‌های پروتئولتیک مختلف در شکمبه در نتیجهٔ افزودن منبع‌های مختلف روغن وجود ندارد. کاهش میزان کل اسیدهای چرب فرار تولیدی در گروه روغن محافظت‌نشده را می‌توان نتیجهٔ کاهش گوارش‌پذیری دیوارهٔ یاخته‌ای به‌واسطهٔ تأثیر منفی روغن بر باکتری‌های سلولولتیک دانست (Fievez *et al*., 2003; Toral *et al*., 2010; Vlaeminck *et al*., 2008; Wachira *et al*., 2000). برخی از محققان در نتایج بررسی‌های خود عدم تأثیر و یا افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار در نتیجهٔ افزودن روغن ماهی در محیط را گزارش کرده‌اند، به نظر می‌رسد زمان نمونه‌برداری، غلظت روغن افزوده‌شده به محیط، الگوی اسیدهای چرب در منبع‌های روغن، نوع مادهٔ تخمیرشده و عادت‌پذیری یا نبود عادت‌پذیری به روغن ماهی در دام‌ها منشأ مایع شکمبه اهمیت فراوانی داشته باشد (Hristov *et al*., 2003). افزایش غلظت مولی پروپیونات و کاهش استات در مکمل‌های محافظت‌نشده نسبت به مکمل‌های بی‌تأثیر بر محیط، نشان‌دهندهٔ کاهش هضم الیاف بوده و نیز می‌تواند نشانه‌ای از کاهش تولید متان توسط روغن ماهی باشد (Vlaeminck *et al*., 2008; Toral *et al*., 2010). میزان بوتیرات در گروه دریافت‌کنندهٔ مکمل محافظت‌نشده نسبت به مکمل‌های محافظت‌شده کاهش یافت. افزون بر این نسبت اسیدهای چرب فرار گلوکوژنیک به غیرگلوکوژنیک با افزودن مکمل‌های محافظت‌نشده افزایش یافت (Vlaeminck *et al*., 2008). کاهش جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی در شکمبه و همچنین کاهش جمعیت باکتری‌های گروه *Butyrivibrio* را می‌توان ازجمله دلایل کاهش غلظت بوتیرات دانست. افزودن روغن سویا، ماهی یا منبع‌های روغن اشباع در بررسی Potu *et al*. (2011) تأثیری بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار نداشت. بااین‌حال روغن ماهی سبب کاهش استات و افزایش غلظت مولی پروپیونات و روغن ماهی و سویا سبب کاهش غلظت بوتیرات شدند. در بررسی افزودن اسیدهای لینولنیک، لینولئیک و اولئیک سبب افزایش غلظت پروپیونات نسبت به گروه شاهد شدند. بااین‌حال تنها اسید لینولنیک و اسید لینولئیک سبب کاهش استات و بوتیرات نسبت به گروه کنترل شدند و اسید اولئیک در این دو مورد تأثیری نداشت (Hristov *et al*., 2004).

جدول ۸. تأثیر افزودن منبع‌های مختلف روغن ماهی بر فراسنجه‌های مختلف شکمبه‌ای چهار ساعت پس از خوراک‌دهی

Table 8. Effects of different fish oil supplements on rumen fluid parameters 4 hours after morning meal

	Fish oil	Fish Ca-Salts	Fish Ca-Salts Encapsulated	S.E.M
pH	6.74^{a}	6.62^{b}	6.68^{b}	0.022
N-NH3 (mM/L)	88.69^{a}	79.57^{b}	78.33^{b}	0.161
Protozoa ($*10^{5}$ ml^{-1})	8.35^{b}	12.16^{a}	13.12^{a}	1.397

علامت بالانویس متفاوت در هر ردیف نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار آماری بین مکمل‌ها است (P ≤۰/۰۵) .

Means with different superscript in each row are significantly different (P<0.05).

جدول ۹. اثر افزودن منبع‌های مختلف روغن ماهی بر غلظت مجموع (میلی‌مول در لیتر) و الگوی (مول در ۱۰۰ مول) اسیدهای چرب فرار در مایع شکمبه، چهار ساعت پس از خوراک‌دهی

Table 8. Effects of different fish oil supplements on total VFA and VFA profile in rumen fluid 4 hours after morning meal

	Fish oil	*Fish Ca-Salts*	*Fish Ca-Salts Encasulated*	S.E.M
Acetate	58.66[b]	77.21[a]	77.03[a]	0.571
Propionate + IsoButyrate	32.62[a]	13.67[b]	13.87[b]	0.725
Butyrate	6.93	7.92	7.67	0.571
Valerate	0.98	0.78	0.87	0.084
IsoValerte	0.81	0.42	0.47	0.087
Total VFA	77.76[b]	110.71[a]	113.73[a]	7.499

علامت بالانویس متفاوت در هر ردیف نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی است (P ≤۰/۰۵).

* Means with different superscript in each row are significantly different (P≤0.05).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج گزارش‌شده در این آزمایش می‌توان گفت محافظت روغن ماهی در برابر محیط شکمبه‌ای با استفاده از روش نمک‌های کلسیمی قادر به بهبود عملکرد شکمبه‌ای و از میان بردن تأثیر زیانبار روغن ماهی بر سوخت‌وساز شکمبه‌ای بود. افزون بر این، نمک‌های کلسیمی قادر به کاهش میزان هیدروژنه شدن زیستی شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی در ساعت‌های مختلف پس از نگهداری شکمبه‌ای بوده و پوشش‌دار کردن نمک‌های کلسیمی قادر به بهبود عملکرد محافظتی نمک‌های کلسیمی بود. پوشش‌دار کردن نمک‌های کلسیمی تأثیر منفی بر فراسنجه‌های شکمبه‌ای در شرایط درون‌تنی نداشت. بااین‌حال، انجام آزمایش‌های بیشتر در کارایی محافظت هیدروژنه شدن زیستی در شرایط متفاوت اسیدیتهٔ مایع شکمبه و انجام آزمایش‌های درون‌تنی در حمایت از تولید شیر و کارایی انتقال اسیدهای چرب غیراشباع به محصولات دامی ضروری است.

سپاسگزاری

این پژوهش تحت پوشش حمایت مالی شرکت دانش‌بنیان کیمیا دانش الوند انجام‌شده است. از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه برای تأمین بخشی از هزینه‌های این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. AbuGhazaleh, A. A. & Jenkins, T. C. (2004). Short communication: Docosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 1047-1050.
2. AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*. (17th ed.) Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C.
3. Bauman, D. E., Perfield, J. W., De Veth, M. J. & Lock, A. L. (2003). New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. *Proc. Cornell Nutrition Conference*. pp. 175-189.
4. Block, E., Chalupa, W., Evans, E., Jenkins, T., Moate, P., Palmiquist, D. & Sniffen, C. (2005). Calcium salts are highly digestible. *Feedstuffs*, 77(1), 55-71.
5. Broderick, G. A. & 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(1), 64-75.
6. Castaneda-Gutierrez, E., DeVeth, M. J., Lock, A. L., Dwyer, D. A., Murphy, K. D. & Bauman, D. E. (2007). Effect of supplementation with calcium salts of fish oil on n-3 fatty acids in milk fat. *Journal of Dairy Science*, 90(9), 4149-4156.
7. Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R. M. & Doreau, M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, Trans and conjugated fatty acids. *Annals De Zootechnica*, 49(1), 181-205.
8. Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J. & Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Europian Journal of Lipid Science and Technology*, 109(8), 828-855.
9. Chouinard, P. Y., Girard, V. & Brisson, G. J. (1998). Fatty acid profile and physical properties of milk fat from cows fed Ca-SFA with varying unsaturation. *Journal of Dairy Science*, 81(2), 471-481.
10. Christensen, R. A., Clark, J. H., Drackley, J. K. & Blum, S. A. (1998). Fatty acid flow to the duodenum and in milk from cows fed diets that contained fat and nicotinic acid. *Journal of Dairy Science*, 81(4), 1078-1088.

11. Dehority, B. A. (2003). *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
12. Demeyer, D. I. (1999). Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proceedings of Nutrition Society*, 58(3), 593-607.
13. Dohme, F., Fievez, V., Raes, K. & Demeyer, D. I. (2003). Increasing levels of two different fish oils lower ruminal biohydrogenation of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic acid *in vitro*. *Animal Research*, 52(4), 309-320
14. Doreau, M. & Chilliard, Y. (1997). Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. *Reproduction Nutrition Development*, 37(1), 113-124.
15. Doreau, M. & Ferlay, A. (1995). Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. *Livestock Production Science*, 43(1), 97-110.
16. Doreau, M., Demeyer, D. I. & VanNevel, C. J. (1997). Transformation and effects of unsaturated fatty acids in the rumen: consequences on milk fat secretion. In: Welch, R.A.S., Burns, D.J.W., Davis, S.R., Popay, A.I. and Prosser, C.G. (Eds.) *Milk Composition, Production and Biotechnology*. CAB International. Wallingford, Oxford shire, UK. pp: 73-92.
17. Elliott, J. P., Drackley, J. K. & Weigel, D. J. (1996). Digestibility and effects of hydrogenated palm fatty acid distillate in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 79(6), 1031-1039.
18. Enjalbert, F., Eynard, P., Nicot, M. C., Troegeler-Meynadier, A., Bayourthe, C. & Moncoulon, R. (2003). *In Vitro* versus *in Situ* ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids from a aaw or extruded mixture of ground canola seed/canola meal. *Journal of Dairy Science*, 86(2), 351-359.
19. FASS. (2010). *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*. 3rd rev. ed. Federation of Animal Sciences Societies Savoy, IL.
20. Ferlay, A., Chilliard, Y. & Doreau, M. (1992). Effects of calcium salts differing in fatty acid composition on duodenal and milk fatty acid profiles in dairy cows. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 60(1), 31-37.
21. Fievez, V., Dohme, F., Danneels, M., Raes, K. & Demeyer, D. (2003). Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. *Animal Feed Science and Technology*, 104(1), 41–58.
22. Fievez, V., Vlaeminck, B., Jenkins, T., Enjalbert, F. & Doreau, M. (2007). Assessing rumen biohydrogenation and its manipulation *in vivo*, *in vitro* and *in situ*. *Europian Journal of Lipid Science and Technology*, 109(8), 740-756.
23. Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S. (1957). A simplified method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
24. Fotouhi, N. & Jenkins, T. C. (1992). Resistance of fatty acyl amides to degradation and hydrogenation by ruminal microorganisms. *Journal of Dairy Science*, 75(6), 1527-1532.
25. Ganjkhanlou, M. (2010). PhD dissertation. Department of Animal Science. University of Tehran.
26. Gulati, S. K., Scott, T. W. & Ashes, J. R. (1997). *In-vitro* assessment of fat supplements for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 64(1), 127-132.
27. Harfoot, C. G. & Hazlewood G. P. (1997). Lipid metabolism in the rumen. Pages 382-426.In: *The rumen Microbial Ecosystem*. London, UK.
28. Hristov, A. N., Ivan, M. & McAllister, T. A. (2004). In vitro effects of individual fatty acids on protozoal numbers and on fermentation products in ruminal fluid from cattle fed a high-concentrate, barley-based diet. *Journal of Animal Science*, 82(9), 2693-2704.
29. Hristov, A. N., Ivan, M., Neill, L. & McAllister, T. A. (2003). Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 105(1), 163-184.
30. Huws, S. A., Lee, M. R. F., Muetzel, S. M., Scott, M. B., Wallace, R. J. & Scollan, N. D. (2010). Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiological Ecology*, 73(2), 396-407.
31. Ichihara, K. I. & Fukubayashi, Y. (2010). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, 51(3), 635-640.
32. Jenkins, T. C. (1993). Lipid Metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science*, 76(12), 3851-3863.
33. Jenkins, T. C. & Bridges, W. C. (2007). Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle. *Europian Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 778-789.
34. Jenkins, T. C. & Palmquist, D. L. (1984). Effect of fatty acids or calcium salts on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *Journal of Dairy Science*, 67(5), 978-986.
35. Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J. & Mosley, E. E. (2008). Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86(2), 397-412.

36. Kepler, C. R., Hirons, K. P., McNeill, J. J. & Tove, S. B. (1966). Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens. Journal of Biological Chemistry,* 241(6), 1350-1354.
37. Khalilvandi-Behroozyar, H., Dehghan-Banadaky, M, Ghaffarzadeh, M., Rezayazdi, K., Kohram, H. & Asad Nejad, B. (2015). Production and in vitro evaluation of microencapsulated fish oil: Nutritive value and biohydrogenation resistance compared with fish oil ca-salts. *Journal of Ruminants Research,* 2(1), 81-108. (in Farsi)
38. Klein, C. M. & Jenkins, T. C. (2011). Docosahexaenoic acid elevates trans-18:1 isomer but is not directly converted into trans-18:1 isomer in ruminal batch cultures. *Journal of Dairy Science,* 94(9), 4676-4683.
39. Klusmeyer, T. H., Lynch, G. L., Clark, J. H. & Nelson, D. R. (1991). Effects of calcium salts of fatty acids and proportion of forage in diet on ruminal fermentation and nutrient flow to duodenum of cows. *Journal of Dairy Science,* 74(7), 2220-2232.
40. Kosaraju, S. L., Weerakkody, R. & Augustin, M. A. (2009). *In-vitro* evaluation of hydrocolloid-based encapsulated fish oil. *Food Hydrocolloids,* 23(5), 1413-1419.
41. Lee, M. R. F., Tweed, J. K. S., Moloney, A. P. & Scollan, N. D. (2005). The effects of fish oil supplementation on rumen metabolism and the biohydrogenation of unsaturated fatty acids in beef steers given diets containing sunflower oil. *Journal of Animal Science,* 80(3), 361-367.
42. Lourenco, M., Ramos-Morales, E. & Wallace, R. J. (2010). The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal,* 4(7), 1008-1023.
43. Maczulak, A. E., Dehority, B. A. & Palmquist, D. L. (1981). Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology,* 42(5), 856-862.
44. Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Bestwick, C. S., Richardson, A. J., McKain, N., Larson, T. R., Graham, I. A. & Wallace, R. J. (2010). Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, Butyrivibrio fibrisolvens. *BMC Microbiology,* 10(1), 52-62.
45. Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Figueres, L. & Wallace, R. J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek,* 91(4), 303-314.
46. McDougall, E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemistry Journal,* 43(1), 99-109.
47. NRC (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. (7th Ed.), National Academy Press, Washington, DC. USA.
48. Ottenstein, D. M. & Batler, D. A. (1971). Improved gas chromatography separation of free acids C2-C5 in dilute solution. *Analls of Chemistry,* 43(7), 952-955.
49. Palmquist, D. L. & Conrad, H. R. (1980). High fat rations for dairy cows. Tallow and hydrolyzed blended fat at two intakes. *Journal of Dairy Science,* 63(2), 391-395.
50. Potu, R. B., AbuGhazaleh, A. A., Hastings, D., Jones, K. & Ibrahim, S. A. (2011). The effect of lipid supplements on ruminal bacteria in continuous culture fermenters varies with the fatty acid composition. Journal of Microbiology, 49(2), 216-223.
51. Relling, A. E. & Reynolds, C. K. (2007). Feeding rumen-inert fats differing in their degree of saturation decreases intake and increases plasma concentrations of gut peptides in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science,* 90(3), 1506-1515.
52. Reynolds, C. K., Aikman, P. C., Lupoli, B., Humphries, D. J. & Beever, D. E. (2003). Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *Journal of Dairy Science,* 86(4), 1201-1217.
53. Santos, J. E. P., Bilby, T. R., Thatcher, W. W., Staples, C. R. and Silvestre, F. T. (2008). Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. *Reproduction in Domestic Animals,* 43(Suppl 2), 23-30.
54. SAS Institute Inc. (2002). *Statistical Analysis System (SAS) User's Guide*. SAS Institute. Cary. N.C. USA.
55. Schauff, D. J., Elliott, J. P., Clark, J. H. and Drackley, J. K. (1992). Effects of feeding lactating dairy cows diets containing whole soybeans and tallow. *Journal of Dairy Science,* 75(7), 1923-1935.
56. Scollan, N. D., Dhanoa, M. S., Choi, N. J., Maeng, W. J., Enser, M. & Wood, J. D. (2001). Biohydrogenation and digestion of long chain fatty acids in steers fed on different sources of lipid. *Journal of Agricultural Science, Cambridge,* 136(3), 345-355.
57. Shingfield, K. J., Kairenius, P., Arölä, A., Paillard, D., Muetzel, S., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Toivonen, V., Griinari, J. M. & Wallace, R. J. (2012). Dietary fish oil supplements modify ruminal biohydrogenation, alter the flow of fatty acids at the omasum, and induce changes in the ruminal Butyrivibrio population in lactating cows. *Journal of Nutrition,* 142(8), 1437-1448.
58. Sukhija, P. S. & Palmquist, D. L. (1990). Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. *Journal of Dairy Science,* 73(7), 1784-1787.

59. Tamminga, S. & Doreau, M. (1991). Lipids and rumen digestion. 151–160. In: Jouany J.P. (ed.): Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion. INRA, Paris.
60. Toral, P. G., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V. & Frutos, P. (2010). Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4804-4817.
61. Van Keulen, J. V. & Young B. A. (1977). Evaluation of acid insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science*, 44(2), 282-287.
62. Van Nevel, C. J. & Demeyer, D. I. (1996). Effect of pH on biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids and their Ca-salts by microorganisms in vitro. *Archives of Animal Nutrition*, 49(2), 151-158.
63. Vlaeminck, B., Mengistu, G., Fievez, V., Jonge, L. D. & Dijkstra, J. (2008). Effect of *in Vitro* Docosahexaenoic Acid Supplementation to Marine Algae-Adapted and Unadapted Rumen Inoculum on the Biohydrogenation of Unsaturated Fatty Acids in Freeze-Dried Grass. *Journal of Dairy Science*, 91(8), 1122-1132.
64. Wachira, A. M., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G., Hallett, K., Enser, M. & Wood, J. D. (2000). Rumen biohydrogenation of n-3 polyunsaturated fatty acids and their effects on microbial efficiency and nutrient digestibility in sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 135(4), 419-428.
65. Whitelawa, F. G., Eadiea, J. M., Brucea, L. A. & Shand, W. J. (1984). Methane formation in faunated and ciliate-free cattle and its relationship with rumen volatile fatty acid proportions. *British Journal of Nutrition*, 52(2), 261-275.
66. Wu, Z., Ohajuruka, O. A. & Palmquist, D. L. (1991). Ruminal synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty-acids by dairy-cows. *Journal of Dairy Science*, 74(9), 3025-3034.
67. Yang, S. L., Bu, D. P., Wang, J. Q., Hu, Z. Y., Li, D., Wei, H. Y., Zhou, L. Y. and Loor, J. J. (2009). Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal*, 3(11), 1562-1569.