The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http:// ijas.ut.ac.ir/

Effect of Organic Supplementation of Zinc and Copper Stabilized in the Rumen on Gas Production, Performance, Nutrient Digestibility, and Antioxidant Enzyme Activities in Fattening Lambs

Yaser Feizdar Barabady[1], Seyyed Ehsan Ghiasi[2]✉, Rassoul Kadkhodaee[3], Mohsen Mojtahedi[4]

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. E-mail: y.fazdar.brabadi@birjand.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. E-mail: s.e.ghiasi@birjand.ac.ir
3. Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran. E-mail: r.kadkhodaee@rifst.ac.ir
4. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. E-mail: mojtahedi@birjand.ac.ir

Feizdar Barabady, Y.,

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 29 May 2024

Received in revised form: 1 July 2024

Accepted: 10 July 2024

Published online: Summer 2025

Keywords:

protein nanofibrils, Ruminal fermentation, stabilized supplement, trace minerals.

ABSTRACT

The aim of this research was to investigate the effects of chelate made based on whey protein isolate nanofibrils and the inorganic form of copper and zinc elements on production performance, blood indices, antioxidant enzyme activity, and rumen fermentation of fattening lambs in vivo and in vitro. For this purpose, stabilized copper and zinc chelate was made in the rumen with the phenolic extract of pomegranate peel. In the next step, the effect of the supplements on ruminal gas production was investigated. Then, a total of 18 Kurdish male lambs of Khorasan with an average initial weight of 30.60 ± 2.27 kg were randomly assigned to one of the experimental diets including: 1) control diet, 2) control diet plus sulfate copper and zinc supplements, and 3) control diet plus stabilized copper and zinc chelate supplement. The trial period was 84 days. The results showed that supplementing the diet with stabilized chelate in the rumen increased the gas production potential and gas production rate constant (P<0.05). Daily feed consumption, average daily weight gain, and final weight of lambs increased with zinc and copper supplementation (P<0.05), but food conversion ratio was not affected by the level and type of supplementation in the diet. The use of zinc supplement increased the apparent digestibility of dry matter, organic matter, and neutral detergent insoluble fiber (P<0.05), but the digestibility of fat, crude protein, and acidic detergent insoluble fiber of the feed was influenced by feeding with surface and the type of zinc supplement was not placed. In this study, the addition of organic and mineral zinc and copper supplements to the diet of fattening lambs increased the concentration of total protein, albumin, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase (P<0.05), but had no significant effect on the concentration of glucose, triglyceride, cholesterol, and serum alkaline phosphatase enzyme activity. In general, the results of this study showed that the use of zinc and copper supplements, regardless of the type of source, can lead to an increase in gas production potential, an improvement in growth performance in fattening lambs, and an increase in liver and antioxidant enzyme activity related to these elements. On the other hand, the stable chelate supplement made in this study had better effects compared to the mineral form, which indicates its higher bioavailability.

Cite this article: Ghoorchi, T., Piyadeh Kouhsar, M., Hosseinabadi, M. & Toghdory, A. (2025). Effect of Organic Supplementation of Zinc and Copper Stabilized in the Rumen on Gas Production, Performance, Nutrient Digestibility, and Antioxidant Enzyme Activities in Fattening Lambs. *Iranian Journal of Animal Science*, 56 **(2),** 255-275. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2024.375804.654012

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2024.375804.654012

Extended Abstract

Introduction

Zinc and copper are essential trace minerals that are crucial for maintaining the health and optimal production of animals. In animal feed, mineral supplements are commonly used, both in organic and inorganic forms. However, during the digestion process, these mineral forms can dissociate and interact with other

molecules, resulting in reduced absorption and bioavailability, particularly for trace minerals. Thus, the objective of this research was to examine the effects of a chelate composed of whey protein isolate nanofibrils, as well as inorganic copper and zinc, on the production performance, blood indices, antioxidant enzyme activity, and rumen fermentation of fattening lambs, both in vivo and in vitro.

Materials and methods

To facilitate the formation of stable chelates of copper and zinc in the rumen, whey protein was initially utilized to generate nanofibrils. During the nanofibril formation process, copper and zinc elements in the form of sulfate, along with 1% phenolic extract of pomegranate peel, were incorporated into the target solution. The resulting solution was subsequently subjected to centrifugation and freeze-drying to produce a stable chelate supplement. In a completely randomized design, eighteen male Kurdish lambs with an average initial weight of 30.60 ± 2.27 kg were assigned to one of three experimental diets. These diets consisted of: 1) control diet (containing zinc: 28.14 mg/kg of DM, copper: 4.164 mg/kg of DM), 2) control diet supplemented with copper and zinc in the form of sulfate (containing zinc: 58.33 mg/kg of DM, copper: 9 mg/kg of DM), and 3) control diet supplemented with stabilized copper and zinc chelate (chelate made from whey protein isolate nanofibrils with polyphenol of pomegranate peel extract, containing zinc: 58.33 mg/kg of DM, copper: 9 mg/kg of DM). These diets were administered to the lambs for a period of 12 weeks. Throughout the experimental period, the animals were weighed every two weeks, and measurements were taken for feed consumption, daily weight gain, food conversion ratio, and nutrient digestibility. Blood samples were collected on days 0, 28, 56, and 84, to assess blood parameters and liver enzymes. For the in vitro test, the semi-automatic gas production technique was employed, with 21 repetitions and 2 runs for each test. Measurements of pH, ammonia nitrogen concentration, and in vitro dry matter digestibility were recorded at 8, 12, 24, and 48 hours. Statistical analyses were conducted using the MIXED procedure for repeated data over time, and the GLM procedure of SAS software for data that were only repeated once over time. Averages were compared using the Tukey-Kramer test.

Results and discussion

The results indicated that supplementing the diet with stabilized chelate in the rumen significantly increased the gas production potential and gas production rate constant ($P<0.05$). However, the lag phase, pH, ammonia nitrogen concentration, and in vitro digestibility of dry matter were not affected by the treatments. Additionally, zinc and copper supplementation led to an increase in daily feed intake, average daily weight gain, and final weight of lambs ($P<0.05$). However, the food conversion ratio was not influenced by the level and type of supplement in the diet. The use of zinc supplement resulted in improved apparent digestibility of dry matter, organic matter, and neutral detergent insoluble fiber ($P<0.05$). On the other hand, the digestibility of fat, crude protein, and acidic detergent insoluble fiber of the feed was influenced by the feeding surface, but not by the type of zinc supplement used. Furthermore, in this study, the addition of organic and mineral zinc supplements to the diet of fattening lambs increased the concentration of total protein, albumin, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase ($P<0.05$). However, it had no significant effect on the concentration of glucose, triglyceride, cholesterol, and serum alkaline phosphatase enzyme activity.

Conclusion

Overall, this study's findings show that using zinc and copper supplements, regardless of where they come from, can increase gas production potential and enhance the growth performance of fattening lambs. These supplements also lead to increased liver and antioxidant enzyme activity associated with these elements. In contrast, the stable chelate supplement developed in this study had even better effects compared to the mineral form, indicating that it is more easily absorbed by the body.

Author Contributions

For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used “Conceptualization, X.X. and Y.Y.; methodology, X.X.; software, X.X.; validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; formal analysis, X.X.; investigation, X.X.; resources, X.X.; data curation, X.X.; writing—original draft preparation, X.X.; writing—review and editing, X.X.; visualization, X.X.; supervision, X.X.; project administration, X.X.; funding acquisition, Y.Y. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.” Please turn to the CRediT taxonomy for the term explanation. Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work re-ported.

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data Availability Statement

In this section, please provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study (see **examples**). Data available on request from the authors.

If the study did not report any data, you might add "Not applicable" here.

Acknowledgements

The *Acknowledgments* section should be a few sentences at the end, but it is important to recognize those people (organizations and individuals) who made considerable impact on the research, provided *significant* help to the author to formulate and complete the experiment, and improved the research at any stage (from providing access to equipment or field sites to editing the manuscript). However, this is an optional section.

In this section, you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

The authors would like to thank all participants of the present study.

Ethical considerations

The study was approved by the Ethics Committee of the University of ABCD (Ethical code: IR.UT.RES.2024.500). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۶، شماره ۲

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

تأثیر مکمل آلی روی و مس پایدار شده در شکمبه بر فراسنجه¬های تولید گاز، عملکرد، قابلیت هضم مواد مغذی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی بره های پرواری

یاسر فیض‌دار برآبادی[۱] | سید احسان غیاثی[۲]✉ | رسول کدخدایی[۳] | محسن مجتهدی[۴]

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. رایانامه: y.fazdar.brabadi@birjand.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. رایانامه: s.e.ghiasi@birjand.ac.ir

۳. گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: r.kadkhodaee@rifst.ac.ir

۴. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. رایانامه: mojtahedi@birjand.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۱۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۴/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۲۰

تاریخ انتشار: تابستان ۱۴۰۴

کلیدواژه‌ها:

تخمیر شکمبه، مکمل پایدار شده، مواد معدنی کم‌مصرف، نانوفیبریل پروتئینی.

چکیده

هدف از انجام این آزمایش بررسی اثرات کیلات عناصر مس و روی ساخته شده بر پایه نانوفیبریل ایزوله پروتئین آب پنیر به همراه پلی‌فنول پوست انار بر عملکرد تولیدی، شاخص‌های خونی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی خون بره‌های پرواری و تخمیر شکمبه در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی بود. برای این منظور ابتدا کیلات پایدار شده مس و روی در شکمبه با عصاره فنولی پوست انار ساخته شد. در مرحله بعد اثر مکمل ساخته شده بر تولید گاز شکمبه‌ای بررسی گردید. سپس تعداد ۱۸رأس بره نر نژاد کردی خراسان با میانگین وزن اولیه ۲/۲۷±۳۰/۶۰ کیلوگرم به‌طور تصادفی با یکی از جیره‌های آزمایشی شامل: ۱) جیره پایه، ۲)جیره پایه به علاوه مکمل مس و روی به شکل سولفات و ۳) جیره پایه به علاوه مکمل کیلات پایدار شده مس و روی تغذیه شدند. دوره آزمایشی ۸۴ روز بود. نتایج نشان داد که مکمل کردن جیره با کیلات پایدار شده در شکمبه، پتانسیل تولید گاز و ثابت نرخ تولید گاز را افزایش داد (P<۰/۰۵). مصرف خوراک روزانه، میانگین افزایش وزن روزانه و وزن پایانی بره‌ها با مصرف مکمل روی و مس بهبود یافت (P<۰/۰۵) ولی ضریب تبدیل غذایی تحت تأثیر سطح و نوع مکمل در جیره قرار نگرفت. استفاده از مکمل مس و روی سبب افزایش قابلیت هضم ظاهری ماده خشک، ماده آلی و فیبر نامحلول در شوینده خنثی شد (P<۰/۰۵)، اما قابلیت هضم چربی، پروتئین خام و فیبر نامحلول در شوینده اسیدی تحت تأثیر قرار نگرفت. افزودن مکمل‌های آلی و معدنی روی به جیره بره‌های پرواری بر غلظت پروتئین تام، آلبومین، آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز را افزایش داد (P<۰/۰۵)، اما تأثیر معنی‌داری بر غلظت گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول و فعالیت آلکالین فسفاتاز سرم نداشت. به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از مکمل روی و مس صرف نظر از نوع منبع آن می‌تواند منجر به افزایش پتانسیل تولید گاز، بهبود عملکرد رشد در بره‌های پرواری و افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی و آنتی‌اکسیدانی مرتبط با این عناصر شود. از طرفی مکمل کیلات پایدار ساخته شده در این پژوهش در مقایسه با شکل معدنی اثرات بهتری داشته که نشان دهنده زیست فراهمی بالاتر آن می‌باشد.

استناد: فیض¬دار برآبادی، یاسر؛ غیاثی، سید احسان؛ کدخدایی، رسول و مجتهدی، محسن (۱۴۰۴). تأثیر مکمل آلی روی و مس پایدار شده در شکمبه بر فراسنجه¬های تولید گاز، عملکرد، قابلیت هضم مواد مغذی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی بره های پرواری. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۶ (۲)، ۲۷۵-۲۵۵. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2024.375804.654012

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2024.375804.654012

مقدمه

علاوه بر اهمیت تأمین انرژی و پروتئین، تأمین مقادیر کافی عناصر معدنی برای ایجاد حداکثر سلامتی و عملکرد بهینه تولید مثلی در دام‌های اهلی حیاتی است (Schlegel *et al*., 2016). کمبود مواد معدنی به دلیل دریافت کم و از دست دادن یا جذب ناکافی در بدن رخ می‌دهد (Neyestani *et al*., 2020). پژوهش‌های قبلی گزارش کردند که روی، مس و آهن از مهم‌ترین مواد معدنی کم‌مصرف هستند که باید برای حفظ سلامتی و تولید بهینه به مقدار کافی در جیره حیوانات قرار بگیرند (Antonyuk *et al*., 2009). عناصر کم‌مصرف مانند روی، مس و منگنز به دلیل حضور در ساختمان آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون ردوکتاز که باعث کاهش رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از آسیب به سلول‌ها و متابولیت ها می‌شوند، جزء لاینفک سامانه پاداکسنده بدن هستند. بنابراین استفاده از مکمل‌های مواد معدنی در جیره به‌منظور تأمین احتیاجات دام‌ها ضروری می‌باشد (Stewart *et al*., 2021). در نشخوارکنندگان، علاوه بر عملکرد متابولیک متمرکز بر حیوان میزبان، عناصر کم‌مصرف از طریق تأثیر مستقیم بر فعالیت آنزیم‌های میکروبی بر تخمیر شکمبه نیز تأثیر می‌گذارند (Vigh *et al*., 2023).

مکمل‌های مواد معدنی به دو شکل آلی و غیرآلی در تغذیه حیوانات استفاده می‌شود. شکل غیرآلی اغلب در طول عبور از دستگاه گوارش از هم گسسته می‌شود و امکان برهمکنش با مولکول‌های دیگر را فراهم می‌کند که در نهایت میزان جذب و زیست فراهمی مواد معدنی به ویژه عناصر کم مصرف در بدن را کاهش می‌دهد. در دهه‌های اخیر با ظهور مکمل‌های آلی مواد معدنی، تمایل به استفاده از آن‌ها افزایش یافته است. کمپلکس‌ها، کیلات‌ها و پروتئینات‌ها از جمله مواد معدنی آلی هستند که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرند (Goff *et al*., 2018). اعتقاد بر این است که پیوندهای کووالانسی و ساختار حلقه مانند بین یون‌های فلزی و لیگاندهای آلی در مکمل‌های آلی، از آن‌ها در برابر اکثر واکنش‌های شیمیایی ناخواسته در دستگاه گوارش، به‌ویژه در شکمبه محافظت می‌کند و زیست فراهمی آن‌ها را افزایش می‌دهد (Mion *et al*, 2022). مواد معدنی آلی در مقایسه با شکل معدنی، زیست‌فراهمی بیشتری دارند، اما هزینه تولید آن‌ها در مقایسه با منابع معدنی زیادتر می‌باشد (Sun *et al*., 2020). استفاده از مواد معدنی به شکل آلی در جیره نشخوارکنندگان، مقادیر کافی عناصر کم‌مصرف به منظور استفاده توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه را فراهم می‌کند و بنابراین به هضم فیبر و تخمیر شکمبه کمک می‌کند (Guimaraes *et al*., 2020).

فناوری نانو در حال حاضر پیشرفته‌ترین و جدیدترین فناوری بشر است. مواد نانو اساساً دارای اندازه ذرات یک تا ۱۰۰ نانومتر هستند. کاهش اندازه ترکیبات نانو سبب شده تا فعل و انفعالات شیمیایی این مواد با مولکول‌های آلی و غیر آلی در بدن به طور متفاوتی صورت می‌گیرد. نانوفیبریل‌های پروتئینی یکی دیگر از لیگاندهای آلی هستند، که در ساخت مکمل‌های آلی مواد معدنی می‌تواند استفاده شود (Hernández-Sierra *et al*., 2008). نانوفیبریل‌های پروتئینی در واقع یک گروه جدید از مواد نانوفیبریل با عملکرد سطحی منحصر به فرد و نسبت سطح به حجم فوق‌العاده بالا هستند. آن‌ها متشکل از توالی‌های هسته‌ای تکراری، مانند بخش‌های اسید آمینه آبدوست و آبگریز هستند که قطر آن‌ها معمولاً بین ۵ تا ۱۰ نانومتر و طول آن‌ها تا چندین میکرومتر است. گزارش شده است که نانوفیبریل‌های پروتئینی بر اساس ساختار منحصر به فرد خود می‌توانند به یون‌های فلزی متصل شوند و میزان جذب و زیست فراهمی آن‌ها را در بدن افزایش دهند (Ye *et al*., 2019). تانن‌ها مانند عصاره فنولی پوست انار به دلیل وجود تعداد زیادی گروه هیدروکسیل فنلی، میل پیوندی قوی برای تشکیل کمپلکس با پروتئین‌های جیره، مواد معدنی و سایر مولکول‌های غذایی دارند (Adejoro, 2019). سطوح بالای تانن‌ها در شکمبه می‌توانند کمپلکس‌های نامحلول با بسیاری از یون‌های فلزی دو ظرفیتی از طریق گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل تشکیل دهند (Patra & Saxena., 2011). به طور کلی اثر مفید یا منفی کمپلکس مواد معدنی با تانن‌ها با مقدار، نوع، ساختار، وزن مولکولی و خواص فیزیکی و شیمیایی و بیولوژیکی تانن‌ها تعیین می‌شود (Naumann *et al*., 2017).

علیرغم اینکه در مطالعات قبلی انواع مکمل‌های آلی عناصر مس و روی در تغذیه نشخوارکنندگان مورد بررسی قرار گرفته است، تاکنون پژوهشی در زمینه استفاده از نانوفیبریل‌های پروتئینی در تشکیل کیلات پایدار شکمبه‌ای با عناصر مس و روی و بررسی اثرات آن‌ها در حیوانات انجام نشده است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف مقایسه تأثیر کیلات عناصر مس و روی ساخته شده بر پایه نانوفیبریل ایزوله پروتئین آب پنیر به همراه پلی فنول عصاره پوست انار بر عملکرد تولیدی، شاخص‌های خونی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی خون بره‌های پرواری و تخمیر شکمبه در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی انجام گرفت. انتظار می‌رود پژوهش حاضر بتواند ضمن تکمیل یافته‌های قبلی، به شناسایی نسل جدیدی از مکمل‌های آلی پایدار عناصر مس و روی به منظور بهبود عملکرد رشد، شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های تخمیر شکمبه بره‌های پرواری و همچنین کاهش آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از دفع مواد معدنی کمک کند.

روش‌شناسی پژوهش

این آزمایش در پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد و واحد دامپروری دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند انجام شد. برای ساخت مکمل کیلات پایدار شده مس و روی، ابتدا نانوفیبریل‌های پروتئینی ساخته شد. بدین منظور پروتئین آب پنیر در غلظت ۷ درصد وزنی به آب دیونیزه اضافه گردید. سپس به مدت ۲ ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد. برای جذب حداکثر آب، محلول پروتئینی فوق به مدت یک شب در یخچال قرار گرفت. سپس pH با افزودن محلول هیدروکلریک اسید ۳ مولار به ۲ رسید. در مرحله بعد به مدت ۳ ساعت در دمای ۸۵ C^o حرارت داده شد تا نانوفیبریل‌های پروتئینی تشکیل شود (Mohammadian & Madadlou, 2016., Mantovani *et al*, 2018). بعد از ۳ ساعت در طی تشکیل نانوفیبریل، عناصر مس و روی به شکل سولفات به همراه ۱ درصد عصاره فنولی پوست انار (به منظور افزایش پایداری مکمل ساخته شده در شکمبه) به سرعت به نانوفیبریل‌های پروتئین که در حال شکل‌گیری بودند، اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت مجدد در همان دما ۸۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. محلول‌های نهایی به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۲۱۰۰۰g سانتریفیوژ (مدلZ36HK type) شدند. رسوب حاصله به روش خشک انجمادی خشک گردید. در انتهای ساخت کیلات نانوفیبریل پایدار شده با عصاره فنولی پوست انار، جهت تعیین ویژگی‌های مکمل ساخته شده، از انکسار اشعه x (XRD)، عکس برداری با میکروسکوپ الکترونی (SEM) و طیف‌سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR) استفاده گردید (ثبت اختراع ایران به شماره، ۱۰۹۴۲۴). هر کیلوگرم مکمل کیلات پایدار ساخته شده در این پژوهش حاوی ۱۲/۲ گرم در کیلوگرم مس و ۵۲/۶ گرم در کیلوگرم روی می‌باشد. برای انجام آزمایش برون‌تنی تعداد ۱۸رأس بره نر نژاد کردی خراسان با میانگین وزن اولیه ۲/۲۷±۳۰/۶۰ کیلوگرم به‌طور تصادفی در جایگاه‌های انفرادی به ابعاد ۲× ۱/۵ متر قرار گرفتند. قبل از شروع آزمایش ویتامین‌های B کمپلکس (۱میلی‌لیتر) و AD_3E (۳ میلی‌لیتر) به هر بره تزریق و شربت آلبندازول جهت جلوگیری از بروز عفونت‌های انگلی به آن‌ها خورانده و مایه‌کوبی علیه آنتروتوکسمی انجام گرفت. ترکیب جیره پایه حاوی ۳۰ درصد علوفه و ۷۰ درصد کنسانتره با مقدار انرژی قابل متابولیسم و پروتئین خام یکسان بود و خوراک به صورت کاملاً مخلوط و در حد اشتها به صورت آزاد دو بار در روز در دو نوبت صبح (۷:۰۰) و عصر (۱۷:۰۰) در اختیار دام‌ها قرار گرفت. در طول مدت آزمایش بره‌ها به آب سالم به صورت آزاد دسترسی داشتند.

پس از ۱۴روز دوره عادت‌دهی، تعداد ۶ رأس بره در هر تیمار به طور تصادفی با یکی از سه جیره‌ی آزمایشی شامل: ۱) جیره پایه (شاهد؛ حاوی روی: ۲۸/۱۴ ، مس: ۴/۱۶۴ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک)، ۲)جیره پایه به علاوه مکمل مس و روی به شکل سولفات (حاوی روی: ۵۸/۳۳ ، مس: ۹ میلی‌گرم درکیلوگرم ماده خشک) و ۳) جیره پایه به علاوه مکمل کیلات پایدار شده مس و روی (کیلات ساخته شده بر پایه نانوفیبریل ایزوله پروتئین آب پنیر به همراه پلی فنول عصاره پوست انار حاوی روی: ۵۸/۳۳ ، مس: ۹ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک) به مدت ۱۲هفته تغذیه شدند. جیره‌های آزمایشی مطابق با جدول احتیاجات مواد مغذی (NRC, 2007) تنظیم و در جدول ۱ نشان داده شده است.

با توجه به اینکه در ارتباط با کافی یا ناکافی بودن بودن سطوح توصیه NRC برای نیاز عناصر مس و روی اختلاف نظر وجود دارد و برخی پژوهشگران سطوح بالاتر را توصیه می‌کنند، در تیمارهای ۲ و ۳ علاوه بر محتوای جیره پایه، میزان مس و روی تا رسیدن به سطح ۱/۵ برابر توصیه شده (NRC, 2007) از منبع مکمل در نظر گرفته شد. خوراک مصرفی و باقیمانده خوراک به‌طور روزانه ثبت شد. در طول مدت آزمایش هر چهار هفته یک بار وزن کشی بره‌ها با رعایت ۱۲ الی ۱۶ ساعت گرسنگی و قبل از تغذیه صبح انجام شد. ضریب تبدیل خوراک در پایان دوره آزمایش با تقسیم مقدار مصرف خوراک در طول مدت ۸۴ روز دوره پرورش بر افزایش وزن در طول دوره پروار محاسبه شد. خونگیری از بره‌ها قبل از تغذیه صبح در روزهای صفر، ۲۸، ۵۶ و ۸۴ دوره در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA برای تهیه پلاسما و بدون EDTA برای تهیه سرم از محل سیاهرگ گردن هر بره (۱۰ میلی‌لیتر) انجام شد. لوله‌های حاوی خون در داخل فلاسک بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و پس از انعقاد به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانترفیوژ شدند و سپس سرم و پلاسمای جدا شده به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و تا زمان آنالیز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (GPX، SOD) نمونه خون کامل از هر بره گرفته و بدون سانتریفیوژ بلافاصله به فریزر منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان تجزیه نگهداری شد. قابلیت هضم مواد مغذی در کل دستگاه گوارش با استفاده از نشانگر داخلی خاکستر نامحلول در اسید اندازه‌گیری شد (Van Keulen & Young., 1977). برای این منظور در ۷ روز آخر آزمایش هر روز صبح از مدفوع بره‌ها نمونه‌برداری شد.

نمونه‌های خوراک اولیه، باقیمانده خوراک و مدفوع با آسیاب چکشی با قطر منافذ ۱ میلی‌لیتر آسیاب شد و درصد ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام، خاکستر خام مطابق با روش (AOAC, 2012) و فیبر نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی با روش ون سوست (Van Soest *et al*., 1991) اندازه‌گیری شد. غلظت گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، آلبومین، پروتئین کل و آنزیم‌های کبدی در پلاسما با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی (شرکت درمان کاو، اصفهان، ایران) با دستگاه اتوآنالیزر (Geasan Chem 2000, Italy) اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم GPX و SOD در خون با استفاده از کیت شرکت رندوکس اندازه‌گیری شد (Paglia & Valentine, 1967). میزان فعالیت این دو آنزیم برحسب واحد بر گرم هموگلوبین بیان شد. غلظت مس و روی در سرم خون با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر (Alcyon 300) و کیت‌های رندوکس انگلستان (Randox، Cu: Cu2340 و Zn: Zn2341، Ardmore، انگلستان) و طبق دستورالعمل کیت تعیین شد (Eren *et al*., 2013).

برای انجام آزمایش برون‌تنی از تکنیک تولید گاز به روش نیمه اتوماتیک با ۲۱ تکرار و ۲ ران برای هر آزمایش استفاده شد (Blümmel *et al*., 1997). در این روش ابتدا مایع شکبه قبل از تغذیه صبح از ۲ رأس گاو هلشتاین دارای فیستولای شکمبه واقع در واحد دامپروری دانشکده کشاورزی بیرجند با میانگین وزن ۲۰±۶۰۰ کیلوگرم به وسیله پمپ خلاء از طریق فیستولای شکمبه جمع‌آوری و صاف شد. در مرحله بعد ۵۰۰ میلی‌گرم از ترکیب جیره و مکمل به همراه ۵۰ میلی‌لیتر مخلوط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی به نسبت ۱ قسمت مایع شکمبه و ۲ قسمت بزاق مصنوعی در شیشه‌های ۱۲۰ میلی لیتری بی‌هوازی ریخته شد (Blümmel *et al*., 1997) و در دستگاه انکوباتور قرار گرفت. به منظور تصحیح گاز تولیدی با منشاء مایع شکمبه تعداد ۳ عدد شیشه بدون ماده غذایی و فقط دارای مخلوط مایع شکمبه و بافر برای هر زمان در نظر گرفته شد. گاز تولیدی در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت از آغاز انکوباسیون بر اساس کیلو پاسکال اندازه‌گیری شد و به معادل حجمی در شرایط فشار و دمای استاندارد (فشار یک اتمسفر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) تبدیل شد. داده‌های حاصل در برابر زمان پلات شد و با استفاده از مدل نمایی ارسکوف با فاز تأخیر (رابطه ۱) (Ørskov & McDonald, 1979) و رویه NLIN نرم آفزار آماری SAS (2010) برازش شد. فراسنجه های محاسبه شده بر اساس برازش داده ها بر مدل غیر خطی با استفاده از طرح بلوک کاملا تصادفی (رابطه ۷) با رویه GLM نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نرخ تولید گاز (RGP) در ۴، ۶ و ۸ ساعت بر اساس حجم گاز تولید شده قبل و بعد از این زمان‌ها رابطه (۱)، انرژی قابل سوخت و ساز در ۲۴ ساعت انکوباسیون رابطه (۳) و مقدار اسیدهای چرب کوتاه زنجیر رابطه (۴) برآورد گردید (Vázquez-Armijo *et al*., 2011).

رابطه ۱ $P=b\ (1-e^{-c(t-l)})$

رابطه ۲ RGP_{4h} = (volume of gas produced at 6 h) – (volume of gas produced at 2 h)/ 4 sample weight (in grams)

رابطه ۳ $ME=2.20+0.136IVGP_{24}$ (ml/0.5 g DM) + 0.057 CP (% DM)

رابطه ۴ SCFA=-0.00425 + 0.0222 (ml gas / 24 h)

در این رابطه‌ها P گاز تولیدی، b تولید گاز مرتبط با سوبسترای دارای پتانسیل تخمیر (میلی‌لیتر در ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)، c ثابت نرخ تولید گاز در زمان (ساعت)، l فاز تأخیر (ساعت)، RGP_{4h} نرخ تولید گاز در ساعت ۴ (میلی‌لیتر در ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک در ساعت ۴ و ۶)، ME انرژی قابل سوخت و ساز (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک جیره)، $IVGP_{24}$ حجم گاز تولیدی در زمان ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر در ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)، CP پروتئین خام (درصد ماده خشک) و SCFA مقدار اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول در ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) می‌باشد. در زمان‌های ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت از انکوباسیون، pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) و قابلیت هضم برون‌تنی ماده خشک (IVDMD) (درصد ماده خشک) تعیین گردید. به منظور اندازه‌گیری pH، ابتدا مایع شکمبه به‌دست آمده توسط پارچه صافی و پمپ خلاء صاف شد و بلافاصله اسیدیته به کمک pH متر دیجیتال (Bels. Italy) تعیین گردید. غلظت نیتروژن آمونیاکی مطابق روش فنل–هیپوکلریت (Broderick & Kang, 1980) اندازه‌گیری شد. قابلیت هضم آزمایشگاهی ماده خشک نیز تعیین شد (Azizi-Shotorkhoft *et al*., 2014). تجزیه آماری و مقایسه میانگین داده‌های تکراردار (مصرف خوراک، افزایش وزن روزانه، متابولیت-های خونی، قابلیت هضم مواد مغذی) در زمان با استفاده از رویه آماری MIXED و با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ (2010) و براساس مدل آماری زیر تجزیه و تحلیل گردید.

رابطه ۵ $$Y_{ijm}= \mu+T_i +Q_j +(T\times Q)_{ij}+W_m +e_{ijm}$$

در این مدل Y_{ijm} متغیر وابسته، μ میانگین کل مشاهدات، T_i اثر تیمار i، Wm کوارایانس (اختلاف وزن اولیه)، Q_j اثر زمان، $(T\times Q)_{ij}$ اثر متقابل تیمار و زمان و e_{ijm} : خطای آزمایش در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌های بدون تکرار در زمان (فراسنجه‌های تولید گاز، وزن اولیه و نهایی) با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ (2010) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی–کرامر انجام شد. مدل آماری مربوط به طرح به‌صورت ذیل می‌باشد :

رابطه ۶ $$Y_{ij}= \mu+T_i +e_{ij}$$

در این مدل Y_{ij} متغیر وابسته، μ میانگین کل مشاهدات، T_i اثر تیمار و e_{ij} : خطای آزمایش در نظر گرفته شد.

رابطه ۷ $$Y_{ij}= \mu+T_i+B_j +e_{ijk}$$

در این مدل Y_{ij} متغیر وابسته، μ میانگین کل مشاهدات، T_i اثر تیمار، B_j اثر ران و e_{ijk} : خطای آزمایش در نظر گرفته شد.

جدول ۱. اجزای تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره پایه

اجزای جیره غذایی	درصد ماده خشک
یونجه خشک	۱۰/۰۲
سیلاژ ذرت	۶/۰۱
خارشتر	۶/۰۷
برگ زرشک	۸/۰۸
جو	۳۳/۱۹
ذرت	۱۵/۹۶
پودر گوشت	۴/۶۹
کنجاله سویا	۲/۵۰
سبوس گندم	۸/۵۱
سنگ آهک	۱/۰۰
مکمل معدنی ویتامینه گوسفندی[۱]	۱/۰۰
نمک	۱/۰۰
سدیم بی‌کربنات	۰/۵۳
چربی	۱/۰۰
اوره	۰/۴۴
ترکیب مواد مغذی جیره‌های آزمایشی	
انرژی قابل سوخت و ساز (مگا کالری بر کیلوگرم ماده خشک)	۲/۵۳
پروتئین خام (٪)	۱۶/۵
چربی خام (٪)	۴
خاکستر (٪)	۹/۱
فیبر نامحلول در شوینده خنثی (٪)	۲۶/۴
کربوهیدرات غیر الیافی (٪)	۴۷/۳
فنول کل (٪)	۱/۳۹
تانن کل (٪)	۰/۶۵
کلسیم (٪)	۱/۱۲
فسفر (٪)	۰/۶
مس (میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۴/۱۶۲
روی (میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک)	۲۸/۱۴

*[۱]هر کیلوگرم مکمل معدنی- ویتامینی حاوی ۷۰ هزار واحد بین المللی ویتامین A، ۱۰هزار واحد بین المللی ویتامین D_3، ۶ هزار واحد بین المللی ویتامین E، ۱۰۰۰ میلی‌گرم آنتی اکسیدانت، ۱۸۰ هزار میلی‌گرم کلسیم، ۳۰ هزارمیلی‌گرم فسفر، ۱۰ هزار میلی‌گرم منیزیم، ۲ هزار میلی‌گرم منگنز، ۳ هزار میلی‌گرم آهن، ۷۵۰ میلی‌گرم مس، ۳ هزار میلی‌گرم روی، ۵۰ میلی‌گرم ید و ۲۰ میلی‌گرم سلنیوم. عناصر مورد استفاده در ترکیب مکمل به شکل معدنی می‌باشد.

یافته‌های پژوهش و بحث

میزان گاز تولیدی جیره‌های آزمایشی در زمان‌های مختلف انکوباسیون در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده از زمان ۱۲ انکوباسیون به بعد، میزان گاز تولیدی بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌دار آماری داشتند ($P<0/05$). به‌طوریکه بیشترین میزان تولید گاز در کل زمان انکوباسیون در تیمار ۳ و کمترین میزان تولید گاز در تیمار شاهد مشاهده گردید. در زمان ۱۲ انکوباسیون، تولید گاز بین جیره‌های حاوی کیلات پایدار شده و شکل سولفات عناصر اختلاف معنی دار آماری نداشت ($P>0/05$). این در حالی است که از زمان ۱۲ انکوباسیون به بعد روند تولید گاز در جیره‌های حاوی شکل معدنی

عناصر مشابه با تیمار شاهد بود. در کل زمان انکوباسیون نیز میزان گاز تولیدی در جیره حاوی مکمل کیلات پایدار شده مس و روی به صورت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بالاتر می‌باشد.

مطالعات نشان داده که سطح مناسبی از روی در جیره غذایی برای عملکرد طبیعی میکروارگانیسم‌های شکمبه مورد نیاز می‌باشد. اگر چه مواد معدنی برای تخمیر میکروبی و قابلیت هضم مورد نیاز می‌باشند، غلظت بیش از حد یا کمتر آن‌ها می‌تواند باعث تغییراتی در شکمبه شود که ممکن است بر جمعیت میکروبی شکمبه تأثیر منفی بگذارد و رشد آنها، قابلیت هضم مواد مغذی و محصولات تخمیر را کاهش دهد (Katulski, 2017). در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که افزودن مکمل مس و روی به جیره پایه، منجر به تأمین سطح مناسبی از این عناصر جهت بهبود فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه، بهبود فرآیند تخمیر و در نهایت افزایش تولید گاز نسبت به تیمار شاهد گردیده است. غلظت مس و روی در جیره‌های حاوی مکمل کیلات پایدار شده، علی‌رغم اینکه ۱/۵ برابر توصیه NRC بود، نه تنها اثر منفی بر فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه نداشت بلکه منجر به بهبود تخمیر و افزایش تولید گاز گردید. از طرفی به نظر می‌رسد در زمان‌های اولیه انکوباسیون میزان مس و روی محلول قابل دسترس برای میکروارگانیسم‌ها شکمبه در همه تیمارها مشابه بوده و به همین دلیل تولید گاز در در این تیمارها با شاهد تفاوتی نداشتند. اما با پیشرفت زمان انکوباسیون احتمالاً میزان مس و روی محلول قابل دسترس برای میکروارگانیسم‌ها در جیره حاوی مکمل کیلات پایدار شده عناصر نسبت به شکل سولفات افزیش یافته که در نهایت از طریق بهبود شرایط تخمیر، تولید گاز نیز افزایش یافته است. این امر می‌تواند نشان دهنده این باشد که استفاده از منابع آلی عناصر مس و روی در جیره بره‌های پرواری در محیط شکمبه محلول‌تر هستند و احتمالاً روی کمتری از منابع آلی به کمپلکس‌های نامحلول در شکمبه تبدیل می‌شوند. این در حالی است که بخش زیادی از سولفات و اکسید به شکل کمپلکس‌های نامحلول در شکمبه تبدیل می‌گردد. از سوی دیگر، در زمان اولیه انکوباسیون، میزان مس و روی در جیره پایه احتمالاً با نیازهای میکروارگانیسم‌ها مطابقت داشته و بنابراین همه تیمارها تولید گاز مشابهی داشتند. اما با پیشرفت زمان انکوباسیون تیمارهای ۲ و ۳ که حاوی سطوح بیشتری از این عناصر نسبت به گروه کنترل بودند، تولید گاز بیشتری را نسبت به تیمار شاهد نشان داده‌اند (Vigh *et al*., 2023). در توافق با نتایج این تحقیق در پژوهش‌های قبلی نیز گزارش شده است که گوساله‌های دریافت کننده روی پروتئینات (Spears & Kegley, 2002)، روی متیونین (Spears *et al*., 2004) و روی پلی‌ساکارید (Kennedy *et al*., 1993) ، میزان روی محلول قابل دسترس برای میکروارگانیسم‌ها شکمبه بالاتری نسبت به اکسید و سولفات روی دارند و بنابراین فعالیت تخمیر شکمبه در حیوانات دریافت کننده منابع آلی بیشتر می‌باشد. در تحقیقی، استفاده از روی گلایسین در جیره گوسفندان، تولید گاز را به طور معنی‌داری نسبت به اکسید و نانواکسید روی افزایش داد (Bakhshizadeh *et al*., 2021). بر خلاف نتایج مطالعه حاضر، استفاده از فرم هیدروکسی و سولفات روی تأثیر بر میزان گاز تولیدی شکمبه نداشته است. این نویسندگان علت عدم تأثیر فرم هیدروکسی بر میزان گاز تولیدی را به حلالیت پایین روی در شکمبه و بنابراین کاهش تعامل بین روی و میکروب‌های شکمبه نسبت دادند (Pal *et al*., 2020).

جدول ۳ تأثیر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های تولید گاز را نشان می‌دهد. پتانسیل تولید گاز، ثابت نرخ تولید گاز، نرخ تولید گاز در زمان ۸ ساعت از شروع انکوباسیون، انرژی قابل سوخت و ساز و مقدار اسیدهای چرب کوتاه زنجیر بین تیمارهای مختلف آزمایشی اختلاف معنی‌دار آماری داشتند (P>۰/۰۵). بیشترین پتانسیل تولید گاز در جیره حاوی کیلات مس و روی پایدار شده مشاهده گردید. بین تیمار شاهد با جیره حاوی سولفات مس و روی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). بیشترین و کمترین ثابت نرخ تولید گاز به ترتیب مربوط به جیره حاوی کیلات پایدار شده، و شاهد بود. تفاوت قابل توجهی از نظر فاز تأخیر، نرخ تولید گاز در زمان‌های ۴ و ۶ ساعت، pH، سطح زیر منحنی pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی و IVDMD بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). پتانسیل تولید گاز بخش قابل تخمیر به ترتیب در تیمارهای ۳ و ۱ بیشترین و کمترین مقدار بود، اما تیمار شاهد با شکل معدنی اختلاف معنی‌داری نداشتند. نرخ تولید گاز فقط در زمان ۸ ساعت از انکوباسیون اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی داشت و به طور معنی‌داری در جیره حاوی مکمل کیلات پایدار شده مس و روی

بیشتر بود. احتمالاً تأثیر مثبت جیره حاوی مکمل آلی پایدار شده د بر فعالیت تخمیر شکمبه منجر به نرخ تولید گاز شده است. ثابت نرخ تولید گاز نیز در تیمار ۳ بیشترین مقدار و در تیمار شاهد کمترین مقدار را دارا بود. نتایج نشان داد که علاوه بر افزایش مقادیر مس و روی، نوع مکمل آلی سنتز شده در این پژوهش ثابت نرخ تولید گاز را به طور معنی‌داری نسبت به شکل سولفاته افزایش می‌دهد. افزودن مکمل مس می‌تواند برتخمیر میکرروبی تأثیر مثبت داشته باشد (Váradyová *et al*., 2006). برخی محققین بیان کردند که افزودن مکمل از طریق کاهش تعداد پروتوزوآها در شکمبه، کارایی تخمیر را افزایش می‌دهد (Solaiman *et al*., 2007). همچنین، محققان افزایش تولید گاز برون‌تنی ۹۶ ساعته در مایع شکمبه گرفته شده از بزهایی که با ۲۱/۷ میلی‌گرم مس به ازای هر کیلوگرم ماده خشک جیره غذایی در مقایسه با بزهایی که با ۱۰/۳ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم ماده خشک جیره تغذیه شده بودند را گزارش کردند (Vázquez-Armijo *et al*., 2011). علاوه بر این، در تحقیقی، مکمل کردن جیره گوسفندان با گلایسین –روی، منجر به افزایش پتانسیل تولید گاز و کاهش ثابت نرخ تولید گاز نسبت به تیمار شاهد و اکسید روی گردید (Bakhshizadeh *et al*., 2021).

جدول۲. تأثیر مکمل مس و روی در جیره غذایی بر میزان گاز تولیدی در زمان‌های مختلف انکوباسیون (میلی‌لیتر در ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)

تیمار	زمان انکوباسیون (ساعت)										
	۲	٤	٦	۸	۱۲	۲٤	۳٦	٤۸	۷۲	۹٦	۱۲۰
۱	۷/۳۵	۱۳/۶۲	۲۲/۳۶	۳۱/۷۳	۴۷/۶۸^{b}	۶۷/۰۷^{b}	۸۳/۹۴^{b}	۹۲/۴۹^{b}	۹۸/۴۱^{b}	۱۰۱/۰۳^{b}	۱۰۱/۵۵^{b}
۲	۷/۷۴	۱۴/۳۱	۲۳/۶۸	۳۲/۶۶	۴۸/۰۹^{ab}	۷۰/۰۶^{b}	۸۵/۴۴^{b}	۹۳/۶۱^{b}	۹۹/۸۶^{ab}	۱۰۲/۲۶^{b}	۱۰۲/۸۳^{b}
۳	۸/۸۳	۱۵/۳۰	۲۴/۸۹	۳۴/۰۸	۵۱/۶۵^{a}	۷۶/۹۷^{a}	۹۰/۳۶^{a}	۹۸/۷۰^{a}	۱۰۴/۸۴^{a}	۱۰۷/۹۵^{a}	۱۰۸/۳۰^{a}
SEM	۰/۵۹	۰/۶۳	۰/۸۰	۰/۹۳	۲/۰۵۹	۱/۲۰	۱/۲۷	۱/۴۱	۱/۵۱	۱/۵۷	۱/۵۷
P value	۰/۲۰۴	۰/۱۸۲	۰/۱۰۱	۰/۲۱۶	۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۹	۰/۰۱۳	۰/۰۰۸	۰/۰۱۱

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

P value: سطح احتمال معنی‌داری

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

تیمار (۱): جیره پایه (شاهد)، تیمار (۲) جیره پایه + سولفات مس و روی، تیمار (۳) جیره پایه + مکمل کیلات پایدار شده مس و روی

مقدار pH محیط کشت هر چند که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی نداشت، ولی از نظر عددی در تیمار ۳ کمتر بود. برای ارائه تصویر دقیق‌تری از وضعیت pH شکمبه، سطح زیر منحنی pH در زمان‌های مختلف بررسی شد. افزودن مکمل آلی پایدار شده در جیره پرواری سطح زیر منحنی pH را به صورت عددی کاهش داد. مقدار pH شکمبه تحت تأثیر عوامل مختلفی از قبیل میزان اسیدها چرب فرار و آمونیاک به علت برداشتن یون هیدروژن برای ساخت آمونیوم قرار دارد (McDonald *et al*., 2011). ارتباط نزدیکی بین pH مواد هضمی، حلالیت یک ماده معدنی و جذب بالقوه یک ماده معدنی وجود دارد. بسته به ماهیت اتصال آن‌ها، مواد معدنی در محیط شکمبه می‌توانند به شکل محلول یا نامحلول وجود داشته باشند (Caldera *et al*., 2019). به طور کلی، حلالیت میکرومینرال‌ها با کاهش pH افزایش می‌یابد (Serra *et al*., 1997). در شرایط اسیدی شیردان، کمپلکس سولفید روی نامحلول می‌تواند با اسیدهیدروکلریک واکنش داده و روی محلول و یونیزه شده را برای جذب در روده کوچک آزاد کند (Goff, 2018). برخی محققین گزارش کردند که استفاده از منابع مختلف مکمل روی در جیره گوسفندان تأثیری بر pH محیط کشت ندارد (Bakhshizadeh *et al*., 2021).

غلظت نیتروژن آمونیاکی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی نداشت، ولی با افزودن مکمل مس و روی به جیره پایه، کاهش عددی نشان داد. از طرفی مکمل آلی پایدار ساخته شده در مطالعه حاضر به صورت عددی غلظت نیتروژن آمونیاکی کمتری نسبت به تیمار شاهد و تیمار حاوی شکل سولفات داشت. افزودن عناصر مس و روی به شکل کیلات پایدار شده در مطالعه حاضر با ممانعت از تجزیه پروتئین در شکمبه، از تمجع آمونیاک جلوگیری می‌کند. برخی محققین بیان کردند که غلظت مناسب نیتروژن آمونیاکی برای تولید بهینه پروتئین میکروبی ۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر می‌باشد (Wu *et al*., 2018). که در مطالعه

حاضر این مقدار در همه جیره‌های آزمایشی تأمین گردیده است. غلظت نیتروژن آمونیاکی بین ۸/۵ تا ۳۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، به منظور تأمین احتیاجات میکروارگانیسم‌ها مناسب می‌باشد (McDonald *et al*., 2011). همسو با نتایج مطالعه حاضر اسپیر و همکاران گزارش کردند که استفاده از سطح ۶۰۰ میلی گرم اکسید روی به ازای هر کیلو گرم ماده خشک جیره گوساله پرواری، سبب کاهش تولید نیتروژن آمونیاکی و افزایش سنتز پروتئین میکروبی می‌گردد (Spears *et al*., 2004). در تضاد با نتایج مطالعه حاضر بخشی زاده و همکاران گزارش کردند که تیمار حاوی ۴۰ پی‌پی‌ام روی به شکل روی–گلایسین غلظت نیتروژن آمونیاکی را به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کاهش می‌دهد (Bakhshizadeh *et al*., 2021).

قابلیت هضم برون‌تنی ماده خشک اگرچه بین تیمارها معنی‌دار نبود، ولی در جیره حاوی مکمل کیلات پایدار شده به صورت عددی بیشتر بود. بر خلاف نتایج مطالعه حاضر نتایج برخی مطالعات نشان داد که استفاده از روی – گلایسین در جیره، تجزیه‌پذیری مؤثر بیشتر و معنی‌داری برای ماده خشک نسبت به تیمار شاهد دارد (Bakhshizadeh *et al*., 2021). مکمل کردن جیره تلیسه ها با ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم ماده خشک به شکل سولفات روی نسبت به تیمار شاهد، تأثیری بر IVDMD ندارد (Engle & Spears, 2000). نتایج مطالعات نشان داد که افزودن ۲۵ پی‌پی‌ام روی– پروتئینات در جیره بزهای شیر نسبت به تیمار شاهد و ۱۲/۵ پی‌پی‌ام روی– پروتئینات، IVDMD را افزایش می‌دهد (Nathaniel *et al*., 2021). علاوه بر این گزارش کردند که IVDMD در تیمارهایی که روی به جیره بزها اضافه شده بود در مقایسه با شاهد بالاتر می‌باشد (Vázquez-Armijo *et al*., 2011). از اطلاعات موجود در جدول ۳ چنین بر می‌آید که افزودن مکمل مس و روی نسبت به تیمار شاهد، موجب افزایش انرژی قابل سوخت و ساز و مقدار اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در محتویات شکمبه گوسفند می‌شود. این نتایج با یافته‌های حاصل از برخی مطالعات پیشین مطابقت نشان می‌دهد (Bakhshizadeh *et al*., 2021). بین گاز تولیدی و تولید اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر ارتباط بسیار نزدیکی گزارش کردند (Getachew *et al*., 2002). نتایج جدول ۳ نشان داد که تیمار حاوی مکمل کیلات پایدار شده، بیشترین پتانسیل تولید گاز و مقدار اسیدهای چرب کوتاه زنجیر را دارد. با توجه به اینکه در پژوهش حاضر میزان اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر و انرژی قابل سوخت و ساز محاسباتی می‌باشند، بنابریان احتمالاً با افزایش گاز تولیدی در تیمار حاوی کیلات پایدار شده نسبت به تیمار شاهد، این فراسنجه‌ها نیز افزایش داشته است. این درحالی است که IVDMD در پژوهش حاضر اندازه‌گیری شده و بنظر می‌رسد اثر منفی مس و روی بر هضم فیبر تا حدودی مانع از افزایش معنی IVDMD شده است. مطالعات قبلی اثر منبع و سطح مس بر تخمیر شکمبه در شرایط آزمایشگاهی در گاومیش در حال رشد را بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که منبع مس متیونین نسبت به کلرید مس، دارای بیشترین IVDMD و تولید گاز و محتوای پروپیونات بالا بود که نشان‌دهنده بازده انرژی قابل سوخت و ساز بالا و تخمیر جهت تولید پروپیونات می‌باشد (Zhao *et al*., 2022). با افزایش تولید گاز، قابلیت هضم ماده خشک افزایش می‌یابد و این موضوع نشان دهنده آن است که تولید گاز یک بخش جدا نشدنی تخمیر و هضم مواد خوراکی است (Zhang *et al*., 2020).

بر اساس جدول ۴، میانگین وزن اولیه بره‌ها در کلیه تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت. مصرف مکمل روی و مس سبب افزایش معنی‌دار وزن پایانی پروار، میانگین افزایش وزن روزانه و مصرف خوراک شد، اما ضریب تبدیل غذایی تحت تأثیر مصرف مکمل مس و روی در جیره قرار نگرفت. از نظر صفات عملکردی بین مکمل آلی پایدار شده مس و روی و فرم سولفاته تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. از آنجایی که افزایش وزن روزانه تابعی از خوراک مصرفی است، در تیمار ۳ که مصرف خوراک بالاتر بوده، افزایش وزن روزانه نیز بیشتر شد. براساس تحقیقات مختلف انجام شده درباره تأثیر مصرف مکمل مس و روی بر عملکرد دام و ماده خشک مصرفی، برخی مطالعات تأثیر مثبت و برخی نیز عدم تأثیر را گزارش کرده‌اند. غلظت روی در جیره بر بیان هورمون‌ها کنترل کننده اشتها (کوله‌سیستوکینین) نقش دارد و بنابراین کمبود آن باعث کاهش اشتها در حیوانات می‌شود (Nakajima *et al*., 2016).

جدول۳. تأثیر تأثیر مکمل مس و روی در جیره غذایی بر فراسنجه‌های تولید گاز شکمبه‌ای

فراسنجه‌های تولید گاز	تیمار			SEM	*P value*
	۱	۲	۳		
پتانسیل تولید گاز (b)	۱۰۱/۶۵^{b}	۱۰۲/۷۸^{b}	۱۰۷/۹۹^{a}	۰/۴۵	<۰/۰۰۰۱
ثابت نرخ تولید گاز (c)	۰/۰۴۹^{c}	۰/۰۵۱^{b}	۰/۰۵۳^{a}	۰/۰۰۰۲	<۰/۰۰۰۱
فاز تأخیر (l)	۰/۶۸	۰/۶۳	۰/۷۴	۰/۰۳	۰/۰۸۹
نرخ تولید گاز در ساعت ۴	۳/۷۵	۳/۹۸	۴/۰۱	۰/۱۶	۰/۴۷۵
نرخ تولید گاز در ساعت ۶	۴/۵۲	۴/۵۸	۴/۶۹	۰/۱۵	۰/۷۵۲
نرخ تولید گاز در ساعت ۸	۶/۳۲^{ab}	۶/۱۰^{b}	۶/۶۹^{a}	۰/۱۴	۰/۰۲۷
pH	۶/۶۷۲	۶/۶۷۰	۶/۶۳۶	۰/۰۳	۰/۶۵۷
سطح زیر منحنی pH	۵/۰۲۲	۵/۰۳۳	۵/۰۱۶	۰/۰۲	۰/۹۰۷
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۱۶/۳۷	۱۵/۱۹	۱۴/۶۵	۰/۶۰	۰/۱۳۱
قابلیت هضم ماده خشک (درصد ماده خشک)	۶۹/۶۰	۷۲/۶۳	۷۳/۸۶	۱/۴۹	۰/۱۵۱
انرژی قابل سوخت و ساز (MJ/kgDM)	۱۲/۷۰^{b}	۱۲/۶۴^{b}	۱۴/۱۳^{a}	۰/۱۲	<۰/۰۰۰۱
اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (mmol/kgDM)	۱/۵۶^{b}	۱/۵۵^{b}	۱/۷۹^{a}	۰/۰۲	<۰/۰۰۰۱

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

P value: سطح احتمال معنی‌داری

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

تیمار (۱): جیره پایه (شاهد)، تیمار (۲) جیره پایه + سولفات مس و روی، تیمار (۳) جیره پایه + مکمل کیلات پایدار شده مس و روی

افزایش وزن نهایی بره‌ها در تیمار حاوی کیلات مس و روی پایدار شده در مقایسه با شاهد، نشان دهنده این است که احتمالاً مقدار روی در جیره شاهد، برای تأمین نیاز دام کافی نبوده است و مکمل کردن جیره با کیلات مس و روی پایدار شده، علاوه بر تأمین احتیاجات دام‌ها، منجر به بهبود عملکرد حیوان می‌شود. در همین راستا افزودن مکمل روی ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره پایه حاوی ۲۲ میلی‌گرم روی در کیلوگرم ماده خشک، بهبود در افزایش وزن روزانه را بدنبال داشته است (Fadayifar *et al*., 2012). Jia *et al*., (2008) گزارش کردند که با افزودن روی به صورت سولفات روی در سطوح ۱۵، ۳۰ و ۴۵ به جیره پایه حاوی ۲۲ پی پی‌ام روی در بزهای کشمیر، میانگین افزایش وزن روزانه به طور معنی‌داری بهبود داشت و بیشترین افزایش مربوط به بزهای دریافت‌کننده سطوح بالای روی بود. احتمالاً بهبود عملکرد بره‌هایی که مکمل آلی روی دریافت کردند علاوه بر کمبود آن در جیره پایه، ناشی از افزایش زیست فراهمی آن در مقایسه با سایر منابع است (Mandal *et al*., 2008). در راستای مطالعه حاضر، بره‌هایی که ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی اضافی به شکل سولفات یا پپتید دریافت کردند، مصرف ماده خشک بیشتری نسبت به تیمار شاهد داشتند (Mallaki *et al*., 2015). مکمل کردن جیره بره‌های پرواری با اشکال نانو، آلی و معدنی عنصر روی تأثیری بر عملکرد بره‌های در حال رشد سنجابی نداشت که همسو با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد (Soufi *et al*.,2022).

جدول٤. تأثیر مکمل مس و روی در جیره غذایی بر صفات عملکردی بره‌های پرواری

پارامتر	تیمار			SEM	*P value*
	۱	۲	۳		
مصرف ماده خشک (گرم در روز)	۱۶۰۵/۰۵^{b}	۱۶۵۱/۸۶^{ab}	۱۶۹۲/۸۷^{a}	۲۲/۳۳۷	۰/۰۴۴۱
افزایش وزن روزانه (گرم در روز)	۲۶۷/۰۰^{b}	۲۹۰/۵۳^{ab}	۳۰۷/۵۶^{a}	۱۰/۴۴۰	۰/۰۲۵۹
ضریب تبدیل خوراک	۵/۸۶۹	۵/۶۹۲	۵/۲۵۸	۰/۲۱۰	۰/۱۱۱۷
وزن ابتدایی (کیلوگرم)	۳۳/۵۸	۳۳/۷۵	۳۳/۷۶	۰/۵۸۷	۰/۹۷۰۷
وزن نهایی (کیلوگرم)	۵۶/۰۰^{b}	۵۸/۱۵^{ab}	۵۹/۶۰^{a}	۰/۹۳۰	۰/۰۴۶۵

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

P value: سطح احتمال معنی‌داری

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

تیمار (۱): جیره پایه (شاهد)، تیمار (۲) جیره پایه + سولفات مس و روی، تیمار (۳) جیره پایه + مکمل کیلات پایدار شده مس و روی

نتایج قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی خوراک بره‌ها در طول دوره آزمایش در جدول ۵ آورده شده است. قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و فیبر نامحلول در شوینده خنثی در تیمار حاوی مکمل به هر دو شکل سولفات و کیلات نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). در مقابل قابلیت هضم پروتئین خام ، چربی خام و فیبر نامحلول در شوینده اسیدی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵). بیشترین قابلیت هضم مواد مغذی در تیمار مکمل شده با کیلات پایدار شده مس و روی با عصاره فنولی پوست انار مشاهده گردید. بین تیمار شاهد و مکمل سولفاته مس و روی تفاوتی از نظر قابلیت هضم فیبر نامحلول در شوینده خنثی وجود نداشت. ولی استفاده از مکمل کیلاته پایدار باعث بهبود قابلیت هضم فیبر نامحلول در شوینده خنثی نیز گردید. در مطالعه حاضر مکمل کیلات پایدار شده بر اساس ساختار منحصر به فرد خود نه تنها قابلیت هضم فیبر را کاهش نداده بلکه افزایش داده است. در همین راستا Genther and Hansen, (2015)بیان کردند که استفاده از مکمل آلی بر اساس حلالیت و پایداری در شکمبه می‌توانند بر میزان استفاده از عناصر توسط میکروارگانیسم‌ها تأثیر گذاشته و بنابراین سرعت تخمیر شکمبه و هضم فیبر را افزایش دهند. در رابطه با تأثیر منابع مختلف مواد معدنی بر قابلیت هضم مواد مغذی گوسفند (Mallaki *et al*, 2015., Nagalakshmi & Himabindu, 2013) و بز (Jia *et al*., 2008) در مطالعات قبلی نتایج متناقضی گزارش شده است. بسیاری از عوامل ممکن است در ایجاد اختلاف بین گزارش‌های فوق نقش داشته باشند، که شامل ویژگی‌های شیمیایی منابع روی آلی مورد استفاده، سطوح روی در جیره غذایی، نوع حیوان و عوامل مؤثر بر حلالیت و پایداری روی در دستگاه گوارش می‌باشد.

نتایج علیمحمدی و همکاران، (Alimohamady *et al*., 2019) نشان می‌دهد که سه منبع روی آلی نسبت به سولفات روی معدنی در بهبود قابلیت هضم پروتئین خام و ماده آلی مؤثر بودند. کاهش قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی در گاوهای دریافت کننده بلوس حاوی مس را به اثرات سمی ناشی از آزاد سازی بیش از حد مس و تأثیر آن بر میکروارگانیسم‌های شکمبه را نسبت دادند (Arthington, 2005). پژوهش‌ها نشان داده است که افزایش غلظت روی در مایع شکمبه از صفر به ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سبب افزایش قابلیت هضم ماده خشک می‌شود، اما هنگامی‌که مقدار روی مایع شکمبه به ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر افزایش یافت، قابلیت هضم ماده خشک به طور قابل‌توجهی کاهش می‌یابد و حتی به کمتر از گروه شاهد در برخی از منابع روی می‌رسد (Wang, 2013). همچنین استفاده از مکمل روی در دامنه ۲۰ تا ۱۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک تأثیری بر قابلیت هضم ماده خشک، پروتئین و NDF نداشته است (Jadhav, 2005). ملاکی و همکاران (Mallaki *et al*., 2015) نیز افزایش قابلیت هضم ماده خشک، پروتئین خام و NDF را هنگام استفاده از مکمل روی پروتئینات به جیره گوسفند گزارش کردند. مکمل کردن جیره با مس و روی می‌تواند فعالیت و رشد میکروارگانیسم‌های شکمبه و فعالیت آنزیم‌های گوارشی را بهبود بخشد (Suttle, 2010). برخی از محققین بیان کردند که استفاده از مکمل روی منجر به بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی (لیپاز، فسفولیپاز، پروتئازها و ...) می‌شود. این می‌تواند دلیلی باشد که مکمل روی از طریق افزایش فعالیت این آنزیم‌ها، قابلیت هضم را در آزمایش فعلی بهبود بخشیده است (Hosseini-Vardanjani *et al*., 2020).

جدول۵. تأثیر مکمل مس و روی در جیره غذایی بر قابلیت هضم مواد مغذی بره‌های پرواری

پارامتر	جیره‌ها			SEM	*P value*
	۱	۲	۳		
قابلیت هضم ماده خشک (درصد)	۷۰/۶۳^{b}	۷۵/۵۹^{a}	۷۶/۷۵^{a}	۱/۱۱	۰/۰۰۶
قابلیت هضم ماده آلی (درصد)	۷۲/۳۷^{b}	۷۶/۸۷^{a}	۷۷/۱۸^{a}	۱/۰۹	۰/۰۰۹
قابلیت هضم پروتئین خام (درصد)	۷۵/۲۹	۷۷/۶۹	۷۸/۰۰	۰/۸۸	۰/۰۸۷
قابلیت هضم چربی خام (درصد)	۷۰/۸۴	۷۵/۷۵	۷۵/۹۱	۱/۳۹	۰/۰۰۶
قابلیت هضم فیبر نامحلول در شوینده خنثی (درصد)	۶۲/۸۹^{b}	۶۳/۵۶^{b}	۶۷/۴۲^{a}	۱/۰۸	۰/۰۱۸
قابلیت هضم فیبر نامحلول در شوینده اسیدی (درصد)	۵۹/۹۷	۶۲/۵۸	۶۴/۴۹	۱/۳۰	۰/۰۷۳

*SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

P value: سطح احتمال معنی‌داری

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

تیمار (۱): جیره پایه (شاهد)، تیمار (۲) جیره پایه + سولفات مس و روی، تیمار (۳) جیره پایه + مکمل کیلات پایدار شده مس و روی

اثر مکمل مس و روی در جیره غذایی بر فراسنجه‌های خونی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در جدول ۶ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود استفاده از مکمل مس و روی در جیره سبب افزایش معنی‌داری در غلظت پروتئین تام و آلبومین پلاسما در بره‌ها شد (P<۰/۰۵). غلظت گلوگز، کلسترول، تری‌گلیسرید، عناصر مس و روی پلاسما تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. با این حال، غلظت مس و روی پلاسما در بره‌های تغذیه شده با مکمل کیلات پایدار شده در مقایسه با بره‌های تغذیه شده با جیره شاهد به صورت عددی افزایش یافت (P<۰/۰۵). علت عدم تاثیر معنی‌دار جیره های آزمایشی بر میزان گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول و غلظت مس و روی پلاسما حاکی از این است که احتمالاً که میزان روی ومس در جیره پایه به اندازه‌ای کم نبوده که بتواند تأثیری بر این فراسنجه‌ها در سایر تیمارها داشته باشد.

مطالعات قبلی گزارش نمودند که مکمل سازی جیره پایه حاوی ۳۳ میلی‌گرم در کیلوگرم روی در بره‌های بلوچی با مقادیر ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی، تأثیر معنی‌داری بر گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول و آلبومین خون نداشت (Sobhanirad *et al*., 2014). همچنین عبر خی مطالعات گزارش کردند که عنصر روی در ترشح، رهاسازی و فعالیت هورمون انسولین نقش دارد که می‌تواند غلظت گلوکز خون را تحت تأثیر قرار دهد (Azizzadeh *et al*., 2005). مکمل کردن جیره پایه بزغاله‌ها با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم مس در هر روز، تأثیری بر غلظت کلسترول و تری‌گلیسرید ندارد (Solaiman *et al*., 2007). افزودن مس و روی به جیره بره‌ها تأثیری بر گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول و پروتئین تام سرم خون نداشته است (Cheraghi *et al*., 2018). این نویسندگان گزارش کردند که طبق نظریه کلیوی و همکاران (Klevay *et al*., 1973) کمبود نسبی یا مطلق مس و نسبت بالای روی به مس، یکی از عوامل بروز بیماری‌های عروق کرونر قلب است. بنابراین در این مطالعه میزان مس در جیره پایه برای جلوگیری از اختلال در سوخت و ساز کلسترول و تری‌گلیسرید کافی بوده است. همسو با نتایج پژوهش حاضر بهبود غلظت پروتئین تام سرم را در گوساله‌های دریافت کننده ۸۰ و ۱۴۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم ماده خشک از منبع سولفات روی را گزارش کردند (Ramalu *et a*l., 2015). تقریباً ۷۵ تا ۸۵ درصد از کل روی و مس پلاسما به آلبومین متصل می‌شود. در واقع آلبومین به عنوان یک پروتئین انتقالی برای یون‌های فلزی ضروری عمل‌کرده تا توزیع سیستماتیک آنها را افزایش دهد (Čobanová *et al*., 2020). برخی مطالعات دیگر بیان کردند که غلظت روی و مس پلاسما یا سرم، شاخصی از وضعیت روی در بدن است و در شرایطی که جیره دارای سطوح پایین این عناصر باشد، افزودن روی و مس به جیره غلظت آن‌ها را در پلاسما افزایش می‌دهد (Alimohamady *et al*., 2019). نتایج پژوهش‌های مختلف (Alimohamady *et al*, 2019., Fadayifar *et al*, 2012., Ma *et al*, 2020) بر روی بره‌ها، بزهای کشمیر و گوساله‌های شیرخوار نشان داد که مصرف مکمل روی، غلظت روی در پلاسما را افزایش می‌دهد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. علت بالاتر بودن عددی غلظت روی و مس پلاسما در تیمار حاوی کیلات پایدار شده، با زیست فراهمی بالاتر این منبع نسبت به شکل سولفات مرتبط می‌باشد (Norouzian *et al*., 2021).

بر اساس نتایج گزارش شده فعالیت آنزیم SOD و GPX در بره‌های تغذیه شده با جیره حاوی مکمل مس و روی به‌طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵). در حالی که فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) بین تیمارهای مختلف آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). در واقع با افزایش سطح مکمل در جیره، فعالیت آنزیم ALP در کبد از روند افزایشی برخوردار بود، اما نتواست تفاوت معنی‌داری بین تیمارها ایجاد کند. افزایش سطح سرمی ALP نشان‌دهنده برخی فعالیت‌های مخرب در اندام‌ها یا تغییر نفوذپذیری غشاء است (Nanev *et al*., 2020). ALP یک متالوآنزیم وابسته به روی است که می‌تواند به عنوان شاخصی از وضعیت روی بدن در نظر گرفته شود. در تضاد با نتایج مابرخی مطالعات دیگر نیز افزایش معنی‌دار فعالیت ALP را با استفاده از پروتئینات و سولفات روی را گزارش کردند (Fadayifar *et al*, 2012., Nagalakshmi et al, 2008). مکانیسم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانی شامل آنزیم‌هایی مانند SOD ، GPX ، گلوتاتیون ردوکتاز، کاتالاز و هم اکسیژناز است (Jarosz *et al*., 2017). در این بین آنزیم‌های SOD و GPX از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که در حذف رادیکال‌های آزاد و محصولات حاصل از تخریب آنها نقش دارند. از آنجایی که مس و روی در ساختمان این آنزیم‌ها شرکت دارد، کمبود

آنها فعالیت این آنزیم‌ها را کاهش داده که منجر به تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و آسیب به بافت‌ها می‌شود. نتیجه فعالت SOD، تولید پراکسید هیدروژن بوده که توسط GPX احیاء شده و در نهایت به آب تبدیل می‌شود (Guan *et al*., 2017). کاهش فعالیت آنزیم SOD را به عنوان شاخص از کمبود روی در نظر می‌گیرند (Fouda *et al*., 2011). افزایش معنی‌دار این دو آنزیم در تیمار ۲ و ۳ نسبت به تیمار شاهد نشان دهنده این است که سطح مس و روی در جیره پایه برای فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX کافی نیست و افزودن مکمل به ویژه به شکل کیلات پایدار شده، می‌تواند تعادل آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشد. پژوهشی افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX را در نتیجه افزودن روی مشاهده کردند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (Jarosz *et al*., 2017). افزودن روی به جیره پایه حاوی ۲۲ میلی‌گرم در کیلوگرم روی به شکل سولفات یا پروتئینات با افزایش فعالیت آنزیم SOD همراه بود (Fadayifar *et al*, 2012).

جدول٦. تأثیر مکمل مس و روی در جیره غذایی بر برخی فراسنجه‌های خونی و آنزیم‌های کبدی بره‌های پرواری

پارامتر	تیمار			SEM	*P value*
	۱	۲	۳		
گلوکز (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۷۳/۳۱	۷۲/۵۳	۷۵/۱۳	۱/۰۲	۰/۱۵۶
پروتئین تام (گرم در دسی‌لیتر)	۵/۳۹^{b}	۶/۱۳^{a}	۶/۳۶^{a}	۰/۱۹۴	۰/۰۱۱
تری‌گلیسرید(میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۲۱/۰۷	۲۲/۳۶	۲۱/۷۷	۰/۹۰	۰/۴۱۸
کلسترول (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۶۴/۱۹	۶۳/۶۷	۶۵/۵۴	۲/۶۵	۰/۸۶۴
آلبومین (گرم در دسی‌لیتر)	۳/۰۶۲^{b}	۳/۳۸۳^{a}	۳/۴۷۷^{a}	۰/۰۷۹	۰/۰۰۸
روی (میلی‌گرم در لیتر)	۱/۲۰۱	۱/۲۳۷	۱/۴۱۷	۰/۰۷۶	۰/۱۴۰
مس (میلی‌گرم در لیتر)	۰/۶۴۲	۰/۷۰۲	۰/۷۲۲	۰/۰۲۸	۰/۱۸۷
آلکالین فسفاتاز (واحد در لیتر)	۲۰۷/۰۶	۲۳۴/۲۴	۲۳۰/۴۸	۱۰/۱۵	۰/۱۴۲
سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (واحد در گرم موگلوبین)	۱۱۴۳/۸۲^{b}	۱۳۵۷/۲۹^{a}	۱۴۲۷/۸۴^{a}	۳۳/۷۵	<۰/۰۰۰۱
گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) (واحد در گرم هموگلوبین)	۵۸/۲۸^{b}	۶۷/۴۸^{a}	۶۸/۴۳^{a}	۱/۵۷	<۰/۰۰۰۱

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

P value: سطح احتمال معنی‌داری

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

تیمار (۱): جیره پایه (شاهد)، تیمار (۲) جیره پایه + سولفات مس و روی، تیمار (۳) جیره پایه + مکمل کیلات پایدار شده مس و روی

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که استفاده از مکمل روی و مس ۱/۵ برابر احتیاجات توصیه شده NRC در جیره بره‌های پرواری صرف نظر از نوع منبع آن می‌تواند منجر به افزایش پتانسیل تولید گاز و کاهش pH شکمبه در شرایط برون‌تنی و افزایش مصرف ماده خشک، وزن نهایی، قابلیت هضم مواد مغذی و فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX در بره‌های پرواری شود. از طرفی مکمل کیلات پایدار ساخته شده در این پژوهش در مقایسه با شکل معدنی به شکل غیر معنی‌داری از طریق تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX، تعادل آنتی اکسیدانی را بهبود بخشیده و منجر به عملکرد بهتر بره‌های پرواری می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

تشکر و قدر دانی

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (ISNF) بر گرفته از طرح شماره "۴۰۰۴۴۳۰" انجام شده است.

"هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

منابع

بخشی زاده، سمیه؛ میرزائی آقجه قشلاق، فرزاد، تقی زاده، اکبر، سیف دواتی، جمال و نویدشاد، بهمن (۱۴۰۰). اثرات اشکال مختلف عنصر روی بر خصوصیات هضمی خوراک گاوهای شیرده با تولید بالا، با استفاده از روش‌های تولید گاز و کیسه نایلونی. *پژوهش های علوم دامی (دانش کشاورزی)*، ۳۱(۱)، ۵۳-۶۶.

چراغی، مشعوف لیلا؛ عربی، حسنعلی، فرح آور، عباس، زمانی، پویا و علیمحمدی، رضا (۱۳۹۷). تأثیر افزودن روی و مس به جیره ی میش های آبستن در اواخر دوره ی آبستنی بر پروفیل مواد کانی خون و شیر، عملکرد رشد بره ها و برخی فراسنجه های خونی. *علوم دامی ایران*، ۴۹ (۲)، ۲۸۴-۲۶۷.

صوفی، بهاره؛ علی‌جو، یونس‌علی، خمیس آبادی، حسن و خوب بخت زینب (۱۴۰۰). تأثیر منابع معدنی، آلی و نانو روی بر عملکرد رشد، فراسنجه های خونی و فعالیت آنتی اکسیدانی در بره های سنجابی. *نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان* ، ۹ (۴)، ۱۹-۳۲.

RERERENCES

Adejoro, F. A. (2019). The use of condensed tannins and nitrate to reduce enteric methane emission and enhance utilization of high-forage diets in sheep (PhD Thesis). University of Pretoria. Pretoria in South Africa.

Alimohamady, R., Aliarabi, H., Bruckmaier, R. M. & Christensen, R. G. (2019). Effect of different sources of supplemental zinc on performance, nutrient digestibility, and antioxidant enzyme activities in lambs. *Biological Trace Element Research, 189*(1), 75-84.

Antonyuk, S. V., Strange, R. W., Marklund, S. L., & Hasnain, S. S. (2009). The structure of human extracellular copper–zinc superoxide dismutase at 1.7 Å resolution: insights into heparin and collagen binding. *Journal of Molecular Biology, 388*(2), 310-326.

AOAC International. (2012). Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 19th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

Arthington, J. D. (2005). Effects of copper oxide bolus administration or high-level copper supplementation on forage utilization and copper status in beef cattle. *Journal of Animal Science, 83*(12), 2894-2900.

Azizi-Shotorkhoft, A., Sharifi, A., Mormohammadi, D., Rezaei, J., Kiani, A., & Fazaeli, H. (2014). Effect of energy source on some hydrolytic enzyme's activities in different fractions of rumen liquor and N retention in sheep fed diet containing heat-processed broiler litter. *Small Ruminant Research*, 2, 17-34.

Azizzadeh, M., Mohri, M., & Seifi, H. A. (2005)" Effect of oral zinc supplementation on hematology, serum biochemistry, performance, and health in neonatal dairy calves" *Comparative Clinical Pathology, 14*, 67–71.

Bakhshizadeh, S., Mirzaei, F., Taghizadeh, A., Seifdavati, J., & Navidshad, B. (2021). The effects of different forms of zinc on characteristics digestibility of diatery dairy cows with high production using gas production and nylon bags techniques. *Journal of Animal Science Research, 31*(1), 53-66. In persian

Blümmel, M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1997). In vitro gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 77*, 24-34.

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.

Caldera, E., Weigel, B., Kucharczyk, V.N., Sellins, K.S., Archibeque, S.L., Wagner, J.J., Han, H., Spears, J.W., & Engle, T.E. (2019). Trace mineral source influences ruminal distribution of copper and zinc and their binding strength to ruminal digesta. *Journal of Animal Science, 97*, 1852–1864.

Cheraghi Mashoof, L., Aliarabi, H., Farahavar, A., Zamani, P., & Alimohamady, R. (2018). The effect of adding zinc and copper to diet of late-pregnant ewes on blood and milk minerals profile, lambs' growth performance and some blood parameters. *Iranian Journal of Animal Science, 49*(2), 267-28. In Persian

Čobanová, K., Váradyová, Z., Grešáková, Ľ., Kucková, K., Mravčáková, D., & Várady, M. (2020). Does herbal and/or zinc dietary supplementation improve the antioxidant and mineral status of lambs with parasite infection. *Antioxidants, 9* (12), 1172.

Engle, T. E., & Spears, J. W. (2000). Dietary copper effects on lipid metabolism, performance, and ruminal fermentation in finishing steers. *Journal of Animal Science, 78*(9), 2452-2458.

Eren, V., Gökdal, Ö., Akşit, H., Atay, O., & Özuğur, A. K. (2013). The effects of additional organic copper and organic zinc trace minerals on accumulation and elimination levels in female kids. *Ankara Üniv Vet Fak Derg, 60,* 89-92.

Eryavuz, A., & Dehority, B. A. (2009). Effects of supplemental zinc concentration on cellulose digestion and cellulolytic and total bacterial numbers in vitro. *Animal Feed Science and Technology, 151*(3-4), 175-183.

Fadayifar, A., Aliarabi, H., Tabatabaei, M. M., Zamani, P., Bahari, A., Malecki, M., & Dezfoulian, A. H. (2012). Improvement in lamb performance on barley-based diet supplemented with zinc. *Livestock Science, 144*(3), 285-289.

Fouda, T.A., Youssef, M.A. and El-Deeb, W.M. (2011). Correlation between zinc deficiency and immune status of sheep". *Veterinary Research, 4* (2), 50-55.

Getachew, G., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2002). Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *The Journal of Agricultural Science, 139*(3), 341-352.

Genther, O. N., & Hansen, S. L. (2015). The effect of trace mineral source and concentration on ruminal digestion and mineral solubility. *Journal of Dairy Science, 98(1),* 566-573.

Goff, J. P. (2018). Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. *Journal of Dairy Science, 101*(4), 2763-2813.

Guan, T., Song, J., Wang, Y., Guo, L., Yuan, L., Zhao, Y., Gao, Y., Lin, L., Wang, Y., Wei, J. (2017). "Expression and characterization of recombinant bifunctional enzymes with glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities". *Free Radical Biology and Medicine, 110,* 188-195.

Hernández-Sierra, J. F., Ruiz, F., Pena, D. C. C., Martínez-Gutiérrez, F., Martínez, A. E., Guillén, A. D. J. P., ... & Castañón, G. M. (2008). The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. Nanomedicine*: Nanotechnology, Biology and Medicine, 4*(3), 237-240.

Hosseini-Vardanjani, S. F., Rezaei, J., Karimi-Dehkordi, S., & Rouzbehan, Y. (2020). Effect of feeding nano-ZnO on performance, rumen fermentation, leukocytes, antioxidant capacity, blood serum enzymes and minerals of ewes. *Small Ruminant Research, 191,* 106170.

Jadhav, S.E. (2005). "Effect of different levels and sources of zinc supplementation on growth, nutrient utilization, rumen fermentation, blood biochemical and immune response in male buffalo calves". PhD Thesis. Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar, India.

Jarosz, M., Olbert, M., Wyszogrodzka, G., Młyniec, K. & Librowski, T. (2017). "Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF-κB signaling". *Inflammopharmacology, 25,*11-24.

Jia, W., Jia, Z., Zhang, W., Wang, R., Zhang, S., & Zhu, X. (2008). Effects of dietary zinc on performance, nutrient digestibility and plasma zinc status in Cashmere goats. *Small Ruminant Research, 80*(1-3), 68-72.

Katulski, S.L. (2017). Effects of mineral supplementation on growing cattle and in vitro fermentation by ruminal microbes (PhD Thesis). Kansas State University. Lawrence in the state of Kansas, USA.

Kennedy, D. W., Craig, W. M., & Southern, L. L. (1993). Ruminal distribution of zinc in steers fed a polysaccharide-zinc complex or zinc oxide. *Journal of Animal Science, 71*(5), 1281-1287.

Klevay, L. M. (1973). Hypercholesterolemia in rats produced by an increase in the ratio of zinc to copper ingested. *The American Journal of Clinical Nutrition, 26*(10), 1060-1068.

Ma, F., Wo, Y., Li, H., Chang, M., Wei, J., Zhao, S. and Sun, P. 2020. Effect of the source of zinc on the tissue accumulation of zinc and jejunal mucosal zinc transporter expression in holstein dairy calves. *Animals*, *10*(8), 1246.

Mallaki, M., Norouzian, M. A., & Khadem, A. A. (2015). Effect of organic zinc supplementation on growth, nutrient utilization, and plasma zinc status in lambs. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, *39*(1), 75-80.

Mandal, G. P., Dass, R. S., Garg, A. K., Varshney, V. P., & Mondal, A. B. (2008). Effect of zinc supplementation from inorganic and organic sources on growth and blood biochemical profile in crossbred calves. *Journal of Animal and Feed Sciences*, *17*(2), 147.

Mantovani, R. A., de Figueiredo Furtado, G., Netto, F. M., & Cunha, R. L. (2018). Assessing the potential of whey protein fibril as emulsifier. *Journal of Food Engineering*, *223*, 99-108.

McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., & Sinclair, L. A. (2011). Animal nutrition 6th ed. Essex: Longman Scientific and Technical.

Mion, B., Van Winters, B., King, K., Spricigo, J. F. W., Ogilvie, L., Guan, L., & Ribeiro, E. S. (2022). Effects of replacing inorganic salts of trace minerals with organic trace minerals in pre- and postpartum diets on feeding behavior, rumen fermentation, and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *105*(8), 6693-6709.

Mohammadian, M., & Madadlou, A. (2016). Cold-set hydrogels made of whey protein nanofibrils with different divalent cations. *International Journal of Biological Macromolecules*, *89*, 499-506.

Nagalakshmi, D., & Himabindu, D. (2013). Effect of zinc supplementation from organic and inorganic sources on performance, nutrient utilization and carcass characteristics in lambs. *The Indian Journal of Animal Sciences*, *83*(4), 411-418.

Nagalakshmi, D., Dhanalakshmi, K. & Himabindu, D. (2009). "Effect of dose and source of supplemental zinc on immune response and oxidative enzymes in lambs". *Veterinary Research Communications*, *33*, 631-644.

Nakajima, S., Hira, T., Iwaya, H. & Hara, H. (2016). Zinc directly stimulates cholecystokinin secretion from enteroendocrine cells and reduces gastric emptying in rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *15*, 108-114.

Nanev, V., Vladov, I., & Kirazov, L. (2020). Serum trace elements and enzymes in lambs with introduced haemonchosis. *Acta Morphologica et Anthropologica*, *27*(3-4), 43-48.

Nathaniel, G., Annisa, T., Muktiani, A., Harjanti, D. W., & Widiyanto, W. (2021). The Effect of Zinc-Proteinate Supplementation on the In Vitro Digestibility and Ruminal Fermentation in Goat. *Animal Production*, *23*(3), 180-186.

Naumann, H. D., Tedeschi, L. O., Zeller, W. E., & Huntley, N. F. (2017). The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *46*, 929-949.

Neyestani, M., Shavali-Gilani, P., Fesahat, M., Molaee-Aghaee, E., & Shariatifar, N. (2020). The effect of food processing on the amount of trace elements and their bioavailability: a review. *Journal of Food Safety and Hygiene*, *6*(2), 53-66.

NRC, (2007). National Research Council. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. 1st rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.

Ørskov, E. R., & I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to the passage rate. *Journal of Agriculture Science, 92,* 499- 503.

Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *70*(1), 158-169.

Pal, R. P., Mani, V., Sarkar, S., Mir, S. H., Sharma, A., & Sharma, H. (2020). Comparing the effect of different levels of zinc hydroxychloride with inorganic zinc sulfate on in vitro rumen fermentation parameters. *Indian Journal of Dairy Science*, 73(6).

Patra, A. K., & Saxena, J. (2011). Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 91*(1), 24-37.

Pi, Z. K., Wu, Y. M., & Liu, J. X. (2005). Effect of pretreatment and pelletization on nutritive value of rice straw-based total mixed ration, and growth performance and meat quality of growing Boer goats fed on TMR. *Small Ruminant Research, 56*(1-3), 81-88.

Ramulu, S. P., Nagalakshmi, D., & Kumar, M. K. (2015). Effect of zinc supplementation on hematology and serum biochemical constituents in Murrah buffalo calves. *Indian Journal of Animal Research, 49(4),* 482-486.

SAS. (2010). SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.

Schlegel, P., Wyss, U., Arrigo, Y., & Hess, H. D. (2016). Mineral concentrations of fresh herbage from mixed grassland as influenced by botanical composition, harvest time and growth stage. *Animal Feed Science and Technology, 219,* 226-233.

Serra, S. D., Serra, A. B., Ichinohe, T., & Fujihara, T. (1997). Ruminal solubility of trace elements from selected Philippine forages. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 10*(4), 378-384.

Sobhanirad, S., M. H. Mashhadi, & R. B. Kashani. (2014). Effects of source and level of zinc on haematological and biochemical parameters in Baluchi lambs. *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences, 4* (7), 389-393.

Solaiman, S. G., Craig Jr, T. J., Reddy, G., & Shoemaker, C. E. (2007). Effect of high levels of Cu supplement on growth performance, rumen fermentation, and immune responses in goat kids. *Small ruminant research, 69*(1-3), 115-123.

Solaiman, S. G., Shoemaker, C. E., & D'andrea, G. H. (2006). The effect of high dietary Cu on health, growth performance, and Cu status in young goats. *Small Ruminant Research, 66*(1-3), 85-91.

Soufi, B., Alijoo, Y. A., Khamisabadi, H., & Khoobbakht, Z. (2022). The effect of inorganic, organic and nano-zinc sources on growth performance, blood parameters and antioxidant activity of Sanjabi lambs. *Journal of Ruminant Research, 9*(4), 19-32. In persian

Spears, J. W., & Kegley, E. B. (2002). Effect of zinc source (zinc oxide vs zinc proteinate) and level on performance, carcass characteristics, and immune response of growing and finishing steers. *Journal of Animal science, 80*(10), 2747-2752.

Spears, J. W., Schlegel, P., Seal, M. C., & Lloyd, K. E. (2004). Bioavailability of zinc from zinc sulfate and different organic zinc sources and their effects on ruminal volatile fatty acid proportions. *Livestock Production Science, 90*(2-3), 211-217.

Stewart, W. C., Scasta, J. D., Taylor, J. B., Murphy, T. W., & Julian, A. A. M. (2021). Invited Review: Mineral nutrition considerations for extensive sheep production systems. *Applied Animal Science, 37*(3), 256-272.

Sun, X., Sarteshnizi, R. A., Boachie, R. T., Okagu, O. D., Abioye, R. O., Pfeilsticker Neves, R., & Udenigwe, C. C. (2020). Peptide–mineral complexes: Understanding their chemical interactions, bioavailability, and potential application in mitigating micronutrient deficiency. *Foods, 9*(10), 1402.

Suttle NF. (2010). Mineral Nutrition of Livestock (fourth edition). CAB International, Wallingford, UK. Mineral Nutrition of Livestock.pdf

Van Keulen, J., & Young, B. (1977). Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science, 44*(2), 282–287.

Van Soest, PJ, Robertson, J.B., & Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science, 74*(10), 3583–3597.

Váradyová, Z., Mihaliková, K., Kisidayova, S., & Javorsky, P. (2006). Fermentation pattern of the rumen and hindgut inocula of sheep grazing in an area polluted from the non-ferrous metal industry. *Czech Journal of Animal Science, 51*(2), 66.

Vázquez-Armijo, J. F., Martínez-Tinajero, J. J., López, D., Salem, A. F. Z. M., & Rojo, R. (2011).

In vitro gas production and dry matter degradability of diets consumed by goats with or without copper and zinc supplementation. *Biological Trace Element Research, 144*, 580-587.

Vigh, A., Criste, A., Gragnic, K., Moquet, L., & Gerard, C. (2023). Ruminal Solubility and Bioavailability of Inorganic Trace Mineral Sources and Effects on Fermentation Activity Measured in Vitro. *Agriculture*, *13*(4), 879.

Wang, R. L., Liang, J. G., Lu, L., Zhang, L. Y., Li, S. F., & Luo, X. G. (2013). Effect of zinc source on performance, zinc status, immune response, and rumen fermentation of lactating cows. *Biological Trace Element Research*, *152*, 16-24.

Ye, X., Lendel, C., Langton, M., Olsson, R. T., & Hedenqvist, M. S. (2019). Protein nanofibrils: Preparation, properties, and possible applications in industrial nanomaterials. *In Industrial Applications of Nanomaterials*, 29-63.

Zhang, F., Nan, X., Wang, H., Guo, Y. and Xiong, B. (2020). Research on the Applications of Calcium Propionate in Dairy Cows: A Review. *Animals (Basel), 3* (8), 1336.

Zhao, X., Hao, L., Xue, Y., Degen, A., & Liu, S. (2022). Effect of source and level of dietary supplementary copper on in vitro rumen fermentation in growing yaks. *Fermentation, 8*(12), 693.