نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، ص. ۲۷۳-۲۶۵

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 4, No. 3, Fall 2012, p. 265-273

بررسی مقاومت ریزکپسول‌های روغن ماهی در شرایط شکمبه و تأثیر آنها بر تولید گاز و قابلیت هضم به روش آزمایشگاهی

رشید صفری[1*]- رضا ولی زاده[2]- رسول کدخدائی[3]- بی بی نرجس علم الهدی[4]- عبدالمنصور طهماسبی[5]- عباسعلی ناصریان[6]

تاریخ دریافت:۹۰/۱۲/۲۸
تاریخ پذیرش:۹۱/۲/۱۶

چکیده

به منظور بررسی مقاومت انواع ریزکپسول‌های روغن ماهی در شکمبه و میزان خروج روغن از این ریزکپسول‌ها و تأثیر آنها بر تولید گاز و قابلیت هضم در شرایط شکمبه در مقایسه با تیمارهای حاوی روغن ماهی محافظت نشده سه آزمایش انجام شد. در آزمایش اول تأثیر pH شکمبه و شیردان بر میزان باز شدن دیوارهٔ ریزکپسول‌ها و خروج روغن در محیط آبی، در آزمایش دوم میزان تولید گاز و تأثیر روغن ماهی ریزکپسوله شده بر کینتیک تخمیری شکمبه و در آزمایش سوم تأثیر روغن ماهی ریزکپسوله شده بر تجزیه پذیری مواد در شکمبه با روش آزمایشگاهی (Batch culture) مطالعه شد. تیمارهای آزمایشی برای آزمایش اول شامل: ۱) ریزکپسول ساده، ۲) ریزکپسول اسید تانیکی و ۳) ریزکپسول کلسیمی با زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت بود. در آزمایش تولید گاز دو نوع جیره پایه شامل جیره علوفه‌ای (یونجه خشک) و جیره کامل (نسبت ۴۰: ۶۰ علوفه به کنسانتره) و هشت تیمار برای هر جیره شامل: ۱) کنترل (فاقد افزودنی)، ۲) روغن ماهی (۴ درصد ماده خشک جیره پایه)، ۳) پودر آب پنیر و روغن ماهی (به ترتیب ۱۲ و ۴ درصد ماده خشک جیره پایه)، ۴) پودر آب پنیر و اسید تانیک (به ترتیب ۱۲ و ۱/۲ درصد ماده خشک جیره پایه)، ۵) پودر آب پنیر، روغن ماهی و اسید تانیک (به ترتیب ۱۲، ۴ و ۱/۲ درصد ماده خشک جیره پایه)، ۶) ریزکپسول ساده (۱۶ درصد جیره پایه)، ۷) ریزکپسول اسید تانیکی (۱۷/۲ درصد جیره پایه) و ۸) ریزکپسول کلسیمی (۱۷/۲ درصد جیره پایه) با ۷۲ ساعت زمان انکوباسیون استفاده شد. در آزمایش سوم از یونجه خشک به عنوان جیره پایه با شش تیمار شامل: ۱) کنترل (فاقد افزودنی)، ۲) روغن ماهی، ۳) پودر آب پنیر و روغن ماهی، ۴) ریزکپسول ساده، ۵) ریزکپسول اسید تانیکی، ۶) ریزکپسول کلسیمی (نسبت تیمارها یکسان با آزمایش تولید گاز در نظر گرفته شد) در ۲۴ ساعت زمان انکوباسیون استفاده شد. در آزمایش اول میزان خروج روغن ماهی از ریزکپسول‌های ساده، اسید تانیکی و کلسیمی تحت شرایط pH شکمبه به ترتیب ۷۴، ۷ و ۱۲درصد و در pH شیردان به ترتیب ۷۴، ۵۹ و ۶۷ درصد از کل روغن ماهی کپسوله شده بود که برای ریزکپسول اسید تانیکی در شرایط pH شکمبه به صورت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کمتر از دو تیمار دیگر و در تیمار ریزکپسول کلسیمی به صورت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کمتر از ریزکپسول ساده بود. شرایط یکسانی برای تیمارهای مورد آزمایش در pH شیردان مشاهده شد. در آزمایش تولید گاز تیمارهای حاوی ریزکپسول اسید تانیکی بهترین عملکرد تولید گاز را در مقایسه با بقیه تیمارها نسبت به تیمار کنترل داشت و در جیره بر پایه علوفه اختلاف معنی‌داری بین این تیمار با تیمار کنترل مشاهده نشد. در آزمایش سوم درصد آزادسازی روغن ماهی از ریزکپسول‌های ساده، اسید تانیکی و کلسیمی به ترتیب ۷۸/۷۲، ۱۳/۵۲ و ۲۶/۲ در شرایط شبیه سازی شده شکمبه بود. تجزیه پذیری ماده خشک در تیمار حاوی ریزکپسول اسید تانیک با تیمار کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$)، از طرفی تیمارهای حاوی ریزکپسول‌های کلسیمی و اسید تانیکی در مقایسه با تیمارهای حاوی روغن ماهی محافظت نشده به طور معنی‌داری دارای عملکرد بهتری بود ($p<۰/۰۵$). با توجه به نتایج به دست آمده، تیمارهای حاوی مکمل روغن ماهی کپسوله شده نسبت به تیمارهای حاوی روغن ماهی محافظت نشده، عملکرد بهتری نشان داد. از این رو، می‌توان انتظار داشت که با استفاده از ریزکپسول‌های دارای دیوارهٔ مقاوم به باز شدن در شرایط شکمبه بتوان تأثیرات ضدمیکروبی اسیدهای چرب غیراشباع را در شکمبه کاهش داد و از آن به عنوان یک روش تغذیه ای برای دستکاری یا تغییر ترکیب اسیدهای چرب تولیدات دامی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه پذیری، روش تولید گاز، روغن ماهی، ریزکپسول

مقدمه

در سال‌های اخیر توجه زیادی به استفاده از روغن‌های حاوی اسیدهای چرب غیراشباع ضروری در تغذیه دام و طیور جهت غنی سازی تولیدات آنها (مانند شیر و گوشت) معطوف شده است. ورود این اسیدهای چرب به تولیدات دامی و بدن انسان با کاهش معنی‌دار بیماری‌های قلبی و عروقی همراه است (۱۲). از مزایای افزایش انتقال اسیدهای چرب ضروری به خون گاوهای شیری می‌توان به تأثیر مثبت آنها بر تولید مثل از طریق سنتز مطلوب هورمون‌ها و پروستوگلاندین‌ها اشاره کرد (۱۳). اسیدهای چرب غیراشباع خوراک عمدتاً در شکمبه نشخوارکنندگان بیوهیدروژنه شده و ترکیب اسیدهای چرب ورودی به شکمبه و خروجی از آن تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد (۱۸). از این رو به حداقل رساندن فرآیند بیوهیدروژناسیون شکمبه‌ای

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی اهر، دانشگاه تبریز- دانشجوی سابق دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: Rashid.safari@gmail.com
۳،۴- استادیار و کارشناس ارشد گروه صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذائی
۲، ۵ و ۶- استاد، دانشیار و استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

Archive of SID
www.SID.ir

اسیدهای چرب غیراشباع ضروری یکی از موارد مهم و مورد توجه تولیدکنندگان مکمل‌های خوراکی جهت افزایش فراهمی این اسیدهای چرب در روده است. بنابراین تحقیق بر روی متابولیسم چربی‌ها در نشخوارکنندگان از دو مقوله مدنظر قرار گرفته است. ۱) کنترل اثرات ضدمیکروبی اسیدهای چرب تا به این وسیله اسیدهای چرب بیشتری به جیره اضافه شود. ۲) تنظیم بیوهیدروژناسیون میکروبی به گونه‌ای که بتوان جذب اسیدهای چرب انتخابی را به منظور بهبود کیفیت شیر یا گوشت تولیدی افزایش داد (۹).

محققان استرالیایی (۲۴) در روشی که جهت محافظت شکمبه‌ای اسیدهای چرب غیراشباع ابداع کردند، روغن به عنوان هسته با پوششی از پروتئین عمل آوری شده با فرمالدهید، جهت ایجاد پیوندهای عرضی در ساختار پروتئین، احاطه شد. این روش محافظتی اسیدهای چرب غیر اشباع به منظور تغییر در ترکیب اسیدهای چرب شیر گاو شیری (۶ و ۱۷) و دام‌های کوچک (۷ و ۱۱) با موفقیت استفاده شد. ریزکپسوله کردن نیز روشی موثر برای محافظت اسیدهای چرب غیراشباع از اکسیداسیون و احتمالاً بیوهیدروژناسیون شکمبه‌ای است و می‌تواند جایگزینی برای فرمالدهید باشد که مصرف آن در سیستم تولیدات دامی بسیاری از کشورها ممنوع شد است. کنسانتره پودر آب پنیر (۳۵ درصد پروتئین) به عنوان ساختار پروتئینی تشکیل دهنده دیواره ریزکپسول‌ها کاربرد دارد (۲۵ و ۲۹). فنول‌های استخراج شده از گیاهان مانند اسید تانیک در شرایط اکسیداسیون (محیط قلیایی و مجاورت با اکسیژن) قابلیت ایجاد پیوند کووالانسی با گروه آمینی پپتیدهای موجود در کنسانتره پودر آب پنیر را دارد و می‌تواند منجر به تشکیل ساختار پروتئینی یکپارچه با مقاومت مکانیکی بالا شود که در نهایت باعث کاهش باز شدن دیواره ریزکپسول‌ها در آب می‌گردد. از طرفی واکنش اسید تانیک با پودر آب پنیر و تشکیل ساختارهای مولکولی بزرگ و یکپارچه باعث کاهش قابلیت حل شدن این ساختار در محیط آبی مانند محیط شکمبه‌ای می‌شود. نتیجه این عوامل، افزایش مقاومت ساختار پروتئینی و در نهایت ریزکپسول‌ها به شکسته شدن در شرایط شکمبه و کاهش تأثیر آنزیم‌های باکتریایی بر اسیدهای چرب غیراشباع به وسیله از دسترس خارج کردن این اسیدهای چرب می‌باشد (۲۱). ساختار یکپارچه تشکیل شده از پروتئین آب پنیر و اسید تانیک در شرایط اسیدی شیردان پایدار نیست و پروتئین‌های موجود در دیواره کپسول‌ها برای هضم آنزیمی در روده در دسترس قرار می‌گیرند که در نتیجه این امر دیوارهٔ ریزکپسول‌ها باز شده و باعث آزاد شدن اسیدهای چرب درون کپسول‌ها در روده می‌شود (۱۶ و ۲۶).

هدف از این مطالعه بررسی آزمایشگاهی تأثیر pH شکمبه و شیردان بر میزان خروج روغن از ریزکپسول‌ها، مقاومت انواع ریزکپسول‌های روغن ماهی در برابر شکنندگی در شرایط شکمبه‌ای و بررسی تأثیر ریزکپسول‌ها بر تولید گاز و قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده خشک تیمارها بر پایه علوفه و یا جیرهٔ کامل در مقایسه با تیمارهای حاوی روغن ماهی محافظت نشده بود.

مواد و روش‌ها

آماده سازی ریزکپسول‌ها

پودر آب پنیر دارای ۳۵ درصد پروتئین با نام تجاری WPC 35% (Whey Protein Concentrate) از شرکت غذایی Glanbia، کشور ایرلند، اسید تانیک خالص، بیکربنات کلسیم و هیدروکسید سدیم از شرکت Merck، کشور آلمان تهیه شد. برای تهیه کلیه محلول‌ها از آب دیونیزه استفاده شد.

جهت آماده سازی امولسیون و ریزپوشانی روغن ماهی در ابتدا محلول ۳۸ درصد (وزنی/وزنی) پودر آب پنیر با اضافه کردن وزن مناسبی از آن به آب دیونیزه در دمای اتاق و با استفاده از یک همزن مغناطیسی تهیه شد و سپس به مدت یک شبانه روز در یخچال نگهداری گردید تا حداکثر جذب آب توسط مولکول‌های پودر آب پنیر انجام شود. برای تهیه امولسیون، روغن ماهی به نسبت ۲۵ درصد وزن پودر آب پنیر به محلول ۳۸ درصد (وزنی/وزنی) این پلیمر اضافه گردید و به منظور رسیدن به یک مخلوط یکنواخت به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد. پیش مخلوط امولسیونی مذکور با استفاده از همگن ساز اولتراتوراکس (مدل T25، ساخت شرکت IKA، کشور آلمان) با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق یکنواخت گردید. جهت تهیه ریزکپسول ساده از امولسیون بدون افزودنی استفاده شد ولی جهت تهیه ریزکپسول اسید تانیکی ۳۰۰ میلی‌گرم بر گرم پروتئین موجود در امولسیون اسید تانیک به امولسیون اضافه گردید و برای تهیه ریزکپسول کلسیمی ۳۰۰ میلی گرم بر گرم پروتئین موجود در امولسیون اسید تانیک و ۲ درصد (وزنی/وزنی) کربنات کلسیم به امولسیون اضافه گردید. به منظور یکنواختی و کاهش بیشتر اندازه ذرات از دستگاه مولد امواج فراصوت با توان اسمی ۷۵۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلو هرتز (مدل Vibracell 750 VCX، ساخت شرکت Sonics، کشور انگلیس) استفاده شد. اعمال امواج فراصوت به شکل مداوم و به مدت ۵ دقیقه در حداکثر توان اسمی دستگاه در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد برنامه ریزی گردید. به منظور تأثیر بهینه اسید تانیک بر ساختار پروتئینی آب پنیر pH امولسیون‌های حاوی اسید تانیک با استفاده از هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال به ۹ رسانده و به مدت ۳ ساعت هوا دهی شدند و سپس به مدت ۱۲ ساعت در مجاورت هوا در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از همزن مغناطیسی بهم زده شدند (۲۰).

به منظور تهیه ریزکپسول‌های حاوی روغن ماهی نمونه‌های امولسیونی به وسیله خشک کن پاششی آزمایشگاهی (مدل B190، ساخت شرکت Büchi، کشور سوئیس) به شکل پودر نرم و کوچک

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه خشک گردید. در طول مدت خشک کردن، دمای هـوای ورودی ۵ ± ۱۷۰ و هوای خروجی از خشک کن در ۵ ± ۷۰ درجه سانتی‌گـراد ثابت نگه داشته شد (۲۰).

جیره های غذایی و تیمارهای آزمایشی

این تحقیق شامل سه سری آزمایش بود. جهت آزمایش تأثیر pH شکمبه و شیردان بر میزان باز شدن دیواره ریزکپسول‌ها در محیط آبی از سه تیمار ۱) ریزکپسـول سـاده، ۲) ریزکپسـول اسـید تـانیکی و ۳) ریزکپسول کلسیمی استفاده شد. در آزمایش تولید گاز از دو نوع جیـره پایه شامل جیره بر پایه علوفه (یونجه خشک) و یا جیره کامل (نسـبت ۴۰: ۶۰ علوفه به کنسانتره بر اسـاس مـاده خشـک) (جـدول ۱) و در آزمایش Batch culture از یونجه خشک به عنوان جیره پایه استفاده شد. در تمام تیمارها مقدار جیره پایه ثابـت و تیمارهـای آزمایشـی بـه صورت مکمل بر جیره پایه افزوده شـدند. تیمارهـای آزمایشـی بـرای آزمایش تولید گاز شامل: ۱) کنترل (فاقد افزودنی)، ۲) روغن ماهی (۴ درصد ماده خشک جیره پایه)، ۳) پودر آب پنیـر و روغـن مـاهی (بـه ترتیب ۱۲ و ۴ درصد ماده خشک جیره پایه)، ۴) پودر آب پنیر و اسـید تانیک (به ترتیب ۱۲ و ۱/۲ درصد ماده خشک جیره پایه)، ۵) پودر آب پنیر، روغن ماهی و اسید تانیک (به ترتیب ۱۲، ۴ و ۱/۲ درصـد مـاده خشک جیره پایه)، ۶) ریزکپسـول سـاده (۱۶ درصـد جیـره پایـه)، ۷) ریزکپسول اسید تـانیکی (۱۷/۲ درصـد جیـره پایـه) و ۸) ریزکپسـول کلسیمی (۱۷/۲ درصد جیره پایه) بـود. تیمارهـای آزمایشـی آزمـایش Batch culture شامل: ۱) کنترل (فاقد افزودنی)، ۲) روغن مـاهی (۴ درصد ماده خشک جیره پایه)، ۳) پودر آب پنیـر و روغـن مـاهی (بـه ترتیب ۱۲ و ۴ درصد ماده خشک جیره پایه)، ۴) ریزکپسول ساده (۱۶ درصد جیره پایه)، ۵) ریزکپسول اسید تانیکی (۱۷/۲ درصد جیره پایه) و ۶) ریزکپسول کلسیمی (۱۷/۲ درصد جیره پایه) بودند.

مراحل انجام آزمایشات و جمع آوری داده‌ها

در مرحله اول تأثیر pH شکمبه و شیردان بـر میـزان بـاز شـدن دیواره ریزکپسول‌ها در محیط آبی مورد بررسی قـرار گرفـت. بـه ایـن منظور آزمایشات in vitro مطابق با روش ارائه شده به وسـیله پتـر و همکاران (۱۹) طراحی شد. جهت تهیـه محلـول‌هـای بـافری بـا pH شکمبه (pH=۶/۴) از بافر فسفات و با pH شیردان (pH=۲/۳) از بافر سیترات استفاده شد (۲۱). در این آزمایش از سرنگ‌هـای ۱۰۰ میلـی لیتری مجهز به لوله‌های خروج گاز اسـتفاده شـد. مقـدار ۰/۵ گـرم از تیمارهای مورد آزمایش در ۲۰ میلی لیتـر از محلـول‌هـای بـافری در زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰ دقیقه، ۱۲ و ۲۴ ساعت با ۴ تکـرار در هر زمان در دمای شکمبه‌ای انکوباسیون شد (۲۱). روغن سـطحی ریزکپسـول‌هـا قبـل از شـروع آزمـایش و میـزان روغـن خروجـی از ریزکپسول‌ها در طول زمان انکوباسیون با استفاده از روش شستشو بـه وسیله پترول اتر (۲) اندازه‌گیری شد.

در مرحله دوم جهت تعیین تأثیر روغن مـاهی محافظـت شـده در مقایسه با روغن ماهی محافظت نشده بر کینتیک تخمیـر شـکمبه‌ای جیره‌ها بر پایه علوفه و یا جیره حاوی علوفه و کنسانتره (جـدول ۱) از روش آزمایشگاهی تولیـد گـاز بـا اسـتفاده از مبـدل فشارسـنج نیمـه اتوماتیک استفاده شد (۱۴). در این آزمایش از مایع شکمبه ۳ گوسفند نر دارای فیستول دائمی شکمبه‌ای استفاده شد. ایـن دام‌هـا دو بـار در روز در ساعات ۸:۰۰ و ۱۷:۰۰ با جیره حاوی علوفه و کنسانتره (نسبت ۴۰: ۶۰ علوفه به کنسانتره بر اساس ماده خشـک) در حـد احتیاجـات نگهداری تغذیـه شـدند (جـدول ۱). مـایع شـکمبه‌ای قبـل از تغذیـه صبحگاهی گرفته شد و با استفاده از صافی پارچه‌ای تنزیب چهار لایه در داخل فلاکس هم دما با مـایع شـکمبه‌ای صـاف شـد (۵). جهـت اندازه‌گیری گاز تولیدی ۳۰۰ میلی گرم از جیره‌هـای پایـه بـه همـراه تیمارهای مورد آزمایش به کار رفت (۴ و ۲۷). میزان گاز تولید شده و نرخ تولید گاز در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ سـاعت انکوباسیون اندازه گیری گردید. بر اساس برازش رابطه بهینـه سـازی شده فرمول ارسکوف و مکدونالد ($P=b(1-e^{-ct})$) با استفاده از نرم افـزار آماری SAS مقدار تولید گاز (b) و نرخ تولید گاز در زمان (c) به دست آمد.

جهت برآورد انرژی خالص و قابلیت هضـم مـادهٔ آلـی تیمارهـای آزمایشی از میزان گاز تولیدی در مدت ۲۴ ساعت بر اساس میلـی‌لیتـر بر گرم ماده خشک و تجزیه تقریبی تیمارها، از معادله‌های زیر استفاده شد که توسط گروه تحقیقاتی هوهینن بر پایه انکوباسیون آزمایشگاهی ارائه شده است (۲۲).

۰/۰۶۵۱ × (٪)خاکسـتر + ۰/۴۵× (٪)پـروتئین خـام + ۸۸۹/ ۰× گـاز تولیدی + ۱۴/۸۸ = (٪) قابلیت هضم ماده آلی

۹/۲۲ × (۱۴/۶۴ / ((۰/۱۵ × (٪) چربی) + (۰/۰۵۷× (٪) پروتئین‌خام) + (۰/۰۲۷۲× گـازتولیـدی) + (۲/۲)) = (مگـاژول بـر کیلـوگرم) انرژی‌خالص

جهت برآورد میزان اسیدهای چرب فرار در تیمارهای آزمایشـی از معادله زیر استفاده شد که بر اساس تحقیقات گتاچو و همکاران (۵) بـا دقت R^2=۰/۹۴ به دست آمده است.

۰/۰۲۲۲ × (میلی لیتر در ۰/۵ گرم ماده خشک در ۲۴ ساعت)گاز تولیدی + ۰/۰۰۴۲۵− = (میلی مول) اسیدهای چرب فرار

در مرحله سوم جهت تعیین تأثیر روغن ماهی محافظـت شـده در مقایسه با روغن ماهی محافظت نشده بـر تجزیـه پـذیری شـکمبه‌ای جیره بر پایه علوفـه (یونجـه خشـک) از روش آزمایشـگاهی Batch culture استفاده شد. مایع شکمبه سه ساعت بعد از تغذیه صبح از سه رأس گوسفند نر دارای فیستولای دائمـی شـکمبه گرفتـه شـد. مـایع شکمبه با استفاده از پارچه تنزیب چهار لایه صاف و برای حفظ شرایط

Archive of SID

www.SID.ir

بهینه آن از تزریق مداوم گاز دی اسید کربن استفاده و در داخل فلاکس هم دما با مایع شکمبه‌ای قرار داده شد. مایع شکمبه با محلول بافر فسفات بیکربنات (۱۵) با نسبت ۱:۱ مخلوط و pH آن در حد ۶/۸ تعدیل شد. مقدار ۰/۵ گرم جیره پایه (یونجه خشک) در داخل بطری‌های شیشه‌ای ۱۲۵ میلی‌لیتری قرار داده شد. ۶ تکرار برای هر تیمار در هر زمان انکوباسیون (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت) استفاده شد. گاز تولید شده در هر زمان انکوباسیون از بطری‌های شیشه‌ای تخلیه گردید. pH تیمارهای آزمایشی بلافاصله بعد از اتمام هر زمان انکوباسیون توسط pH متر دیجیتال (مدل ۶۹۱، شرکت Metrohm، سوئیس) اندازه‌گیری شد. تجزیه پذیری ماده خشک با سه تکرار برای هر تیمار در هر زمان اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری میزان تجزیه پذیری ماده خشک در هر زمان انکوباسیون، محتویات بطری‌ها به لوله‌های سانتریفیوژ ۵۰ میلی لیتری با وزن مشخص منتقل و با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی استخراج و مواد باقیمانده در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شد (۱ و ۲۸). کل روغن سطحی و روغن ماهی سطحی قابل استخراج از تیمارها با استفاده از روش شستشو به وسیله پترول اتر با سه تکرار برای هر تیمار در هر زمان بدست آمد (۲ و ۳). درصد روغن ماهی سطحی قابل استخراج از هر تیمار از اختلاف تیمار حاوی روغن ماهی با تیمار کنترل نسبت به کل مقدار روغن ماهی موجود در تیمار مورد بررسی به دست آمد.

نتایج حاصل از هر سه آزمایش با رویه Mixed نرم‌افزار آماری SAS در قالب طرح‌های کاملاً تصادفی به صورت تکرار شده در زمان مورد آنالیز آماری قرار گرفتند.

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + d_{j(i)} + \tau_k + (\alpha\tau)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

در این مدل μ میانگین، α_i، τ_k و $(\alpha\tau)_{ik}$ به ترتیب اثرات ثابت تیمار i، زمان k و اثر متقابل آنها، $d_{j(i)}$ اثر تصادفی j تکرار در هر گروه i، ε_{ijk} خطای تصادفی j تکرار در هر گروه i در زمان k بود.

نتایج

تأثیر pH شکمبه و شیردان بر آزاد سازی روغن ماهی از ریزکپسول‌های مختلف روغن ماهی در نمودار ۱ نشان داده شده است. میزان خروج روغن از ریزکپسول‌های ساده، اسید تانیکی و کلسیمی در شرایط pH شکمبه به ترتیب ۷۴، ۷ و ۱۲ درصد و در pH شیردان به ترتیب ۷۴، ۵۹ و ۶۷ درصد کل روغن ماهی کپسوله شده در این تیمارها بود.

میزان آزاد سازی روغن ماهی برای ریزکپسول اسید تانیکی در شرایط pH شکمبه به صورت معنی‌داری کمتر از دو تیمار دیگر و در تیمار ریزکپسول کلسیمی به صورت معنی‌داری کمتر از ریزکپسول ساده بود ($p<۰/۰۵$). شرایط یکسانی برای تیمارهای آزمایشی در pH شیردانی مشاهده شد. میزان آزاد سازی روغن ماهی از تیمارهای آزمایشی در pH شیردان در ریزکپسول اسید تانیکی و ریزکپسول کلسیمی به صورت معنی‌داری بیشتر از همین تیمارها در pH شکمبه بود ولی اختلاف معنی‌داری در تیمار ریزکپسول ساده در دو pH مختلف مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). نتایج حاصل از تأثیر تیمارهای دارای افزودنی روغن ماهی محافظت شده و محافظت نشده در مقایسه با تیمارهای فاقد روغن ماهی بر تولید گاز و فراسنجه های تخمیر شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول ۱- ترکیب جیره غذایی مورد استفاده در روش آزمایشگاهی تولید گاز و جیره خوراکی گوسفندان نر در طول آزمایش (درصد در ماده خشک)

مورد	درصد
اجزاء خوراکی	
یونجه خشک	۴۰
جو	۳۲
کنجاله کانولا	۱۱
سبوس گندم	۱۵
کربنات کلسیم	۱
نمک طعام	۰/۳
مکمل مواد معدنی و ویتامینی[۱]	۰/۷
ترکیب شیمیایی محاسبه شده	
پروتئین خام	۱۶/۱
چربی (عصارهٔ اتری)	۳
فیبر نامحلول در شوینده اسیدی	۲۰/۱
فیبر نامحلول در شوینده خنثی	۳۳/۵
کلسیم	۱/۲
فسفر	۰/۶

۱- حاوی ویتامین A چهار میلیون و چهار صد واحد بین‌المللی، ویتامین D هشتصد هشتاد هزار واحد بین‌المللی، ویتامین E چهار صد واحد بین‌المللی، کلسیم ۰/۵۷ درصد، گوگرد ۱۵/۷۵ درصد، کبالت ۳۶۰ ppm، مس ۴۰۸۰۰ ppm، ید ۲۷۰۰ ppm، آهن ۱۰۲۰۰ ppm، منگنز ۱۲۲۴۵۰ ppm، روی ۱۲۲۴۵۰ ppm.

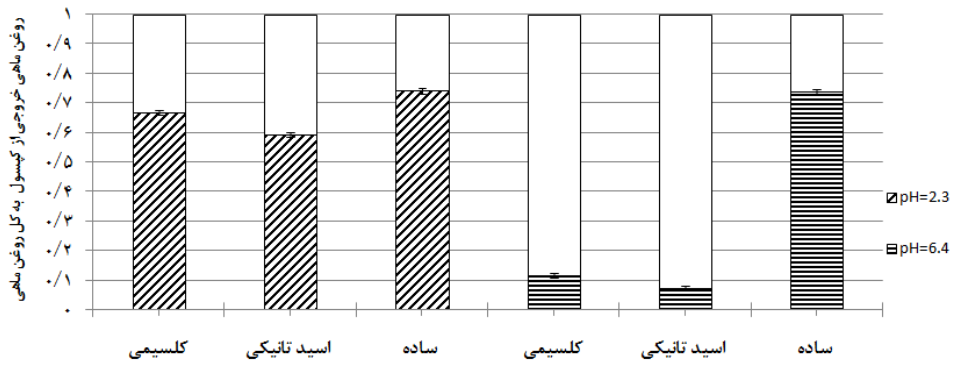
نتایج حاصل از تولید گاز نشان دهنده کاهش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) در کل گاز تولیدی و تولید گاز در ۲۴ ساعت اول انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی برای تیمارهای دارای افزودنی روغن ماهی محافظت نشده است (جداول ۲ و ۳).

تأثیر نامطلوب تیمارهای روغن ماهی محافظت نشده بر تخمیر شکمبه‌ای به صورت معنی‌دار بر تجزیه پذیری ماده آلی نمایان شد از جمله کاهش معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) در تولید اسیدهای چرب فرار و انرژی خالص (محاسباتی) مشاهده شد.

تیمارهای حاوی ریزکپسول اسید تانیکی بهترین عملکرد تولید گاز را در مقایسه با بقیه تیمارها نسبت به تیمار کنترل بر پایه یونجه خشک و یا جیره کامل داشتند به‌طوری که در جیره بر پایه علوفه اختلاف معنی‌داری بین این تیمار با تیمارهای کنترل مشاهده نشد.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱- تأثیر pH شکمبه (pH=٦/٤) و شیردان (pH=۲/۳) بر آزاد سازی روغن ماهی از ریزکپسول‌های مختلف روغن ماهی در مدت زمان ٢٤ ساعت انکوباسیون آزمایشگاهی در محیط آبی (نسبت روغن ماهی خروجی از کپسول به کل روغن ماهی کپسوله شده)

جدول ۲- کل گاز تولیدی، نرخ تولید گاز و مقادیر محاسباتی تجزیه پذیری ماده آلی، اسیدهای چرب فرار و انرژی خالص در تیمارهای آزمایشی بر پایه علوفه[1]

	کنترل[1]	روغن ماهی	پودر آب پنیر	پودر آب پنیر/ اسید تانیک	پودر آب پنیر/ روغن ماهی	پودر آب پنیر/ روغن ماهی/ اسید تانیک	ریزکپسول ساده	ریزکپسول اسید تانیکی	ریزکپسول کلسیمی	خطای استاندارد
نرخ تولید گاز (در ساعت)	۰/۰۶۱	۰/۰۴۹	۰/۰۵۴	۰/۰۵۶	۰/۰۴۸	۰/۰۴۶	۰/۰۴۷	۰/۰۵۴	۰/۰۵۳	
گاز تولیدی در ۲۴ ساعت انکوباسیون (میلی لیتر در گرم ماده خشک)	۲۲۰/۱^{a}	۱۸۹/۱^{d}	۲۰۶/۶^{b}	۲۱۵/۹^{a}	۱۸۶/۵^{d}	۱۸۸/۲^{d}	۱۹۳/۹^{c}	۲۱۵/۶^{a}	۱۹۵/۸^{c}	۲/۴۵
کل گاز تولیدی (میلی لیتر در گرم ماده خشک)	۲۸۵/۲^{a}	۲۵۱/۷^{d}	۲۶۹/۴^{b}	۲۸۳/۷^{a}	۲۶۰/۱^{c}	۲۶۶/۰^{bc}	۲۶۹/۸^{b}	۲۸۳/۰^{a}	۲۶۹/۵^{b}	۳/۶۶
اسیدهای چرب فرار (میلی مول در گرم ماده خشک)	۵/۱۰^{a}	۴/۲۰^{c}	۴/۵۸^{b}	۴/۷۸^{b}	۴/۱۳^{c}	۴/۱۲^{c}	۴/۳۰^{c}	۴/۷۷^{b}	۴/۳۴^{c}	۰/۰۹
انرژی خالص (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)	۶/۱۲^{b}	۵/۷۹^{c}	۵/۸۷^{c}	۶/۰۳^{b}	۵/۹۰^{c}	۵/۹۳^{c}	۶/۰۲^{b}	۶/۴۰^{a}	۶/۰۶^{b}	۰/۰۷
تجزیه پذیری ماده آلی(٪)	۶۲/۲۲^{a}	۵۴/۹۱^{d}	۵۹/۹۷^{b}	۶۱/۶۲^{a}	۵۶/۳۹^{c}	۵۶/۶۹^{c}	۵۷/۷۰^{c}	۶۱/۵۷^{a}	۵۸/۰۵^{c}	۰/۷۱

میانگین های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند (P <۰/۰۵).

۱- جیره پایه حاوی یونجه خشک بود.

تیمارهای حاوی ریزکپسول های کلسیمی و ساده در هر دو سری انکوباسیون عملکرد بهینه تری نسبت به تیمارهای حاوی روغن محافظت نشده در تولید گاز و تجزیه پذیری ماده خشک و تولید اسیدهای چرب فرار و انرژی خالص (محاسباتی) نشان دادند، در عین حال این مقادیر به صورت معنی‌داری (P<۰/۰۵) از تیمار کنترل بر پایه جیره کامل پایین‌تر بود.

نتایج حاصل از روند تولید گاز در ۷۲ ساعت انکوباسیون آزمایشگاهی بر پایه جیره علوفه ای و یا جیره کامل نشان داد که روغن ماهی محافظت نشده از ابتدای زمان انکوباسیون بر منحنی تولید گاز تأثیر گذار بود، هرچند این اختلاف در ۲۴ ساعت اولیه بیشتر بود.

نتایج حاصل از تأثیر روغن ماهی محافظت شده و محافظت نشده بر pH شکمبه و تجزیه پذیری شکمبه‌ای ماده خشک در شرایط آزمایشگاهی (Batch culture) و تأثیر محیط شکمبه‌ای بر میزان آزاد سازی روغن ماهی از ریزکپسول‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است.

در میان تیمارهای آزمایشی pH شکمبه‌ای اختلاف معنی‌داری با تیمار کنترل (جیره علوفه‌ای فاقد افزودنی) نداشت از طرفی تجزیه پذیری ماده خشک در تیمارهای حاوی روغن ماهی محافظت نشده به صورت معنی‌داری کاهش یافت. مابین تیمارهای حاوی روغن ماهی محافظت شده بهترین عملکرد مربوط به تیمار حاوی ریزکپسول اسید تانیکی بود که با تیمار کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- کل گاز تولیدی، نرخ تولید گاز و مقادیر محاسباتی تجزیه پذیری ماده آلی، اسیدهای چرب فرار و انرژی خالص در تیمارهای آزمایشی بر پایه علوفه و کنسانتره[1]

	کنترل	روغن ماهی	پودر آب پنیر	پودر آب پنیر / اسید تانیک	پودر آب پنیر / روغن ماهی	پودر آب پنیر / روغن ماهی / اسید تانیک	ریزکپسول ساده	ریزکپسول اسید تانیکی	ریزکپسول کلسیمی	خطای استاندارد
نرخ تولید گاز(در ساعت)	۰/۰۵۴	۰/۰۵۳	۰/۰۶۴	۰/۰۶۲	۰/۰۵۵	۰/۰۵۴	۰/۰۷۷	۰/۰۶۵	۰/۰۷۱	
گاز تولیدی در ۲۴ ساعت انکوباسیون (میلی لیتر در گرم ماده خشک)	۲۵۹/۴^{a}	۲۰۵/۰^{d}	۲۵۶/۶^{a}	۲۴۵/۳^{b}	۱۹۴/۹^{c}	۱۹۴/۲^{c}	۲۵۵/۵^{a}	۲۵۴/۵^{a}	۲۴۵/۳^{b}	۲/۵۵
کل گاز تولیدی (میلی لیتر در گرم ماده خشک)	۳۲۹/۸^{a}	۲۷۴/۰^{c}	۳۲۲/۲^{ab}	۳۱۲/۴^{b}	۲۶۰/۳^{d}	۲۵۹/۰^{d}	۲۹۵/۳^{c}	۳۱۶/۹^{b}	۲۹۳/۹^{c}	۴/۰۱
اسیدهای چرب فرار (میلی مول در گرم ماده خشک)	۵/۷۵^{a}	۴/۵۴^{c}	۵/۶۹^{a}	۵/۴۴^{b}	۴/۳۱^{c}	۴/۳۰^{c}	۵/۶۲^{ab}	۵/۶۴^{ab}	۵/۴۴^{b}	۰/۱۰
انرژی خالص (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)	۶/۷۲^{c}	۶/۱۱^{d}	۶/۸۳^{c}	۶/۷۳^{c}	۶/۱۵^{d}	۶/۱۳^{d}	۷/۰۵^{ab}	۷/۱۶^{a}	۷/۰۱^{b}	۰/۰۷
تجزیه پذیری ماده آلی(٪)	۶۹/۷۳^{a}	۵۹/۵۵^{b}	۷۰/۱۶^{a}	۶۸/۱۵^{a}	۵۹/۲۰^{b}	۵۹/۰۶^{b}	۶۹/۶۳^{a}	۶۹/۷۹^{a}	۶۸/۱۵^{a}	۰/۹۱

میانگین های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P<۰/۰۵$).

۱- جیره پایه به‌صورت جیره کامل حاوی علوفه و کنسانتره (نسبت ۴۰: ۶۰ علوفه به کنسانتره بر اساس ماده خشک) برای کلیه تیمارهای آزمایشی بود.

از طرفی تیمار حاوی ریزکپسول کلسیمی نیز در مقایسه با تیمارهای حاوی روغن ماهی محافظت نشده دارای عملکرد بهتری بود ($P<۰/۰۵$). تجزیه پذیری ماده خشک در تیمار حاوی افزودنی ریزکپسول ساده روغن ماهی در مقایسه با تیمارهای ریزکپسول اسید تانیکی و ریزکپسول کلسیمی به صورت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) پایین‌تر بود که نشان دهندهٔ عدم مقاومت بهینه این ریزکپسول در شرایط شبیه سازی شده شکمبه است. نتایج حاصل از میزان روغن ماهی قابل استخراج از تیمارهای حاوی روغن ماهی نشان دهندهٔ آزاد سازی ۷۸/۷۲، ۱۳/۵۲ و ۲۶/۲ درصدی روغن ماهی به ترتیب از ریزکپسول‌های ساده، اسید تانیکی و کلسیمی است. نتایج حاصل از میزان آزادسازی روغن ماهی نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای ریزکپسوله شده نسبت به تیمارهای حاوی روغن ماهی محافظت نشده است ($P<۰/۰۵$) که این اختلاف در تیمار ریزکپسول اسید تانیکی بیشترین مقدار را داشت. نتایج یکسانی در رابطه با مقادیر روغن سطحی قابل استخراج از تیمارهای مورد آزمایش به دست آمد، که تیمار حاوی مکمل ریزکپسول اسید تانیکی نسبت به تیمار کنترل (فاقد روغن افزودنی) اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$).

همبستگی بین گاز تولیدی در زمان‌های مختلف انکوباسیون در آزمایش تولید گاز و تجزیه پذیری ماده خشک به دست آمده از آزمایش Batch culture در نمودار ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده همبستگی بالا ($R^2=۰/۹۰$) بین گاز تولیدی و تجزیه پذیری ماده خشک در زمان‌های مختلف انکوباسیون در جیرهٔ پایه حاوی علوفه خشک است. بنابراین انتظار می‌رود، بتوان از نتایج این دو آزمایش به صورت مکمل در تعیین تأثیر مکمل سازی روغن ماهی به صورت محافظت شده و محافظت نشده بر تخمیر شکمبه‌ای و نیز میزان کارایی ریزکپسوله کردن استفاده کرد.

بحث

نتایج حاصل از آزمایش تأثیر pH شکمبه و شیردان بر میزان مقاومت دیواره ریزکپسول‌ها در محیط آبی نشان دهندهٔ مقاومت بهینه ریزکپسول‌های اسید تانیکی و در درجه دوم ریزکپسول‌های کلسیمی در شرایط شکمبه است.

نتایج آزمایشات رودریگز و همکاران (۲۱) نشان دهنده کاهش ۵۰ درصدی محلولیت پروتئین تیمار شده با اسید تانیک در pH شکمبه‌ای است، در حالی‌که در pH شیردان تفاوتی در محلولیت پروتئین آب پنیر فرآوری شده با اسید تانیک در مقایسه با تیمار کنترل فاقد افزودنی مشاهده نشد.

از طرفی تحقیقات اشمیت و همکاران (۲۳) نشان می‌دهد که تغییرات شدید pH بر ساختار دوم و سوم پروتئین‌ها موثر است و باعث تغییر در محلولیت، شکل پروتئین و خواص ساختاری آن می‌شود. بنابراین می‌توان انتظار داشت در pH شیردان ساختار پروتئین دیواره ریزکپسول تحت تأثیر قرار گیرد و ریزکپسول‌های اسید تانیکی و کلسیمی که در pH شکمبه محلولیت پایین‌تری دارند و مقاوم به خروج روغن از درون ریزکپسول بودند در اثر تغییر ساختار توان خود را از دست داده و روغن محافظت شده آزاد شود.

Archive of SID

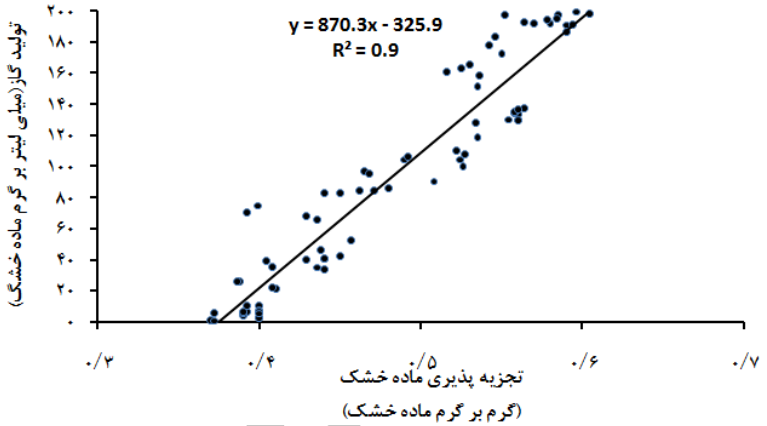
www.SID.ir

جدول ٤- تجزیه پذیری ماده خشک جیره بر پایه علوفه، pH شکمبه‌ای و روغن ماهی قابل استخراج در تیمارهای آزمایشی در شرایط ٢٤ ساعت انکوباسیون آزمایشگاهی به روش Batch culture

مورد	کنترل[1]	روغن ماهی	پودر آب پنیر/ روغن ماهی	ریزکپسول ساده	ریزکپسول اسید تانیکی	ریزکپسول کلسیمی	خطای استاندارد
pH شکمبه	۶/۷۸	۶/۷۴	۶/۷۳	۶/۷۵	۶/۷۳	۶/۷۳	۰/۰۵
تجزیه پذیری ماده خشک (گرم در گرم ماده خشک)	۰/۴۹۶^{a}	۰/۴۴۴^{d}	۰/۴۴۵^{d}	۰/۴۶۶^{c}	۰/۴۹۷^{a}	۰/۴۸۷^{b}	۰/۰۰۷
روغن استخراجی سطحی (میلی گرم در گرم ماده خشک)	۳۱/۴۸^{d}	۶۹/۸۴^{a}	۶۹/۵۵^{a}	۶۲/۹۷^{b}	۳۶/۸۹^{cd}	۴۱/۹۶^{c}	۰/۰۸
روغن ماهی استخراجی سطحی (درصد از کل روغن ماهی)	–	۹۵/۹^{a}	۹۵/۲^{a}	۷۸/۷۲^{b}	۱۳/۵۲^{d}	۲۶/۲^{c}	۰/۲۱

میانگین های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P < ۰/۰۵$)

۱- جیره پایه حاوی یونجه خشک برای کلیه تیمارهای آزمایشی بود.



نمودار ۲- همبستگی بین گاز تولیدی در آزمایش تولید گاز و تجزیه پذیری ماده خشک به دست آمده از آزمایش Batch culture در جیره آزمایشی بر پایه علوفه خشک (یونجه خشک) در زمان‌های مختلف انکوباسیون

بنابراین محلولیت پایین در pH شکمبه‌ای برای ساختار پروتئینی دیواره ریزکپسول‌های تیمار شده و از طرفی تغییر ساختار پروتئین‌های دیواره ریزکپسول‌ها به همراه محلولیت بیشتر در pH شیردان تایید کننده نتایج حاصل از این آزمایش است.

نتایج حاصل از آزمایش تولید گاز که نشان دهنده تولید گاز حاصل از تخمیر میکروبی در شرایط شبیه سازی شدهٔ شکمبه است، کاهش معنی‌داری را در تیمارهای حاوی روغن ماهی محافظت نشده نسبت به تیمارهای کنترل نشان داد که این نتایج با داده‌های حاصل از میزان اسیدهای چرب فرار تولیدی و ماده آلی قابل هضم محاسباتی و نیز نتایج تجزیه پذیری ماده خشک در شرایط شبیه سازی شده شکمبه حاصل از آزمایش سوم مطابقت دارد. تحقیقات مختلفی در رابطه با تأثیر منفی روغن‌های غیراشباع از جمله روغن ماهی بر تخمیر شکمبه‌ای به‌خصوص بخش فیبری جیره غذایی و جمعیت باکتریایی شکمبه انجام شده است. به‌طور کلی با افزودن کمتر از ۱۰ درصد چربی به جیره غذایی، تجزیه پذیری کربوهیدرات‌های ساختاری در شکمبه حدود ۵۰ درصد یا حتی بیشتر از آن کاهش می‌یابد. این کاهش در تجزیه پذیری همراه با کاهش در تولید اسیدهای چرب فرار و گازهای متان و هیدروژن است (۸، ۹ و ۱۰). در آزمایشات تولید گاز وBatch culture، مقایسه آماری تیمارهای حاوی مکمل روغن ماهی به صورت کپسوله شده نسبت به تیمارهای حاوی روغن ماهی محافظت نشده، نشان دهنده عملکرد بهتر این تیمارها است. قابل ذکر است که تیمار ریزکپسول اسید تانیکی بجز در کل گاز تولیدی در جیره بر پایه علوفه دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار کنترل (فاقد روغن ماهی) نبود. نتایج حاصل از تعیین میزان روغن ماهی سطحی (در تیمارهای کپسوله شده روغن ماهی خارج شده از کپسول) در آزمایشBatch culture نشان دهندهٔ عملکرد بهینه ریزکپسول‌ها با دیواره مقاوم به حلالیت (ریزکپسول اسید تانیکی و ریزکپسول کلسیمی) است که در ریزکپسول اسید تانیکی ۱۳ درصد از روغن

Archive of SID

www.SID.ir

ماهی کپسوله شده از کپسول خارج و وارد محیط آزمایشی شده است که می‌تواند دلیل عملکرد بهینه تیمارهای دارای این مکمل نسبت به بقیه تیمارها در مقایسه با تیمار کنترل باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان انتظار داشت با استفاده از ریزکپسول‌های دارای دیواره مقاوم به باز شدن در شرایط شکمبه‌ای، به خصوص ریزکپسول اسید تانیکی بتوان تأثیرات ضدمیکروبی اسیدهای چرب غیراشباع را در شکمبه کنترل کرد و مقدار بیشتری از این اسیدهای چرب را به جیره غذایی دام اضافه نمود. از طرف دیگر با خارج کردن اسیدهای چرب از دسترس میکروب‌های شکمبه و جلوگیری از انجام فرایند بیوهیدروژناسیون می‌توان ترکیب چربی مورد نظر را به گونه‌ای انتخابی جهت جذب وارد روده باریک کرد.

منابع

1- Benchaar, C., H. V. Petit, R. Berthiaume, D. R. Ouellet, J. Chiquette, and P. Y. Chouinard. 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. J. Dairy Sci. 90: 886-897.

2- Drusch, S. 2007. Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. Food Hydrocolloids. 21: 1223-1228.

3- Drusch, S., Y. Serfert, and K. Schwarz. 2006. Microencapsulation of fish oil with n-octenylsuccinate-derivatised starch: Flow properties and oxidative stability. European J. Lipid Sci. Technol. 108: 501-512.

4- Garcia-Rodriguez, A., N. Mandaluniz, G. Flores, and L. M. Oregui. 2005. A gas production technique as a tool to predict organic matter digestibility of grass and maize silage. Anim. Feed Sci. and Technol. 123: 267–276.

5- Getachew, G., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2002. Tropical browses: content of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acids and in vitro gas production. Agric. Sci. 139: 341-350.

6- Gulati, S. K., J. R. Ashes, and T. W. Scott. 1999. Hydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their incorporation into milk fat. Anim. Feed Sci. Technol. 79: 57-64.

7- Gulati, S. K., E. B. Byers, Y. G. Byers, J. R. Ashes, and T. W. Scott. 1997. Effect of feeding different fat supplements on the fatty acid composition of goat milk. Anim. Feed Sci. Technol. 66: 159-164.

8- Ikwuegbu, O. A., and J. D. Sutton. 1982. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. Br. J. Nutr. 48: 365-375.

9- Jenkins, T. C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 76, 3851-3863.

10- Jenkins, T. C., and D. L. Palmquist. 1984. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. J. Dairy Sci. 67: 978-986.

11- Kitessa, S. M., S. K. Gulati, J. R. Ashes, E. Fleck, T. W. Scott, and P. D. Nichols. 2001. Utilisation of fish oil in ruminants: II. Transfer of fish oil fatty acids into goats' milk. Anim. Feed Sci. Technol. 89, 201-208.

12- Lock, A. L., and D. E. Bauman. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. Lipids. 39: 1197-1206.

13- Mattos, R., C. R. Staples, and W. W. Thatcher. 2000. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. Rev Reprod. 5: 38-45.

14- Mauricio, R. M., F. L. Moulda, E. Owena, K. S. Channaa, and M. K. Theodor. 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. Anim. Feed Sci. Technol. 79: 321-330.

15- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, and W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. J. Agric. Sci. 93: 217-222.

16- Messman, M. A., W. P. Weiss, and K. A. Albrecht. 1996. *In situ* disappearance of individual proteins and nitrogen from legume forages containing varying amounts of tannins. J. Dairy Sci. 79: 1430-1435.

17- Noakes, M., P. J. Nestel, and P. M. Clifton. 1996. Modifying the fatty acid profile of dairy products through feedlot technology lowers plasma cholesterol of humans consuming the products. Am. J. Clin. Nutr. 63: 42-46.

18- Palmquist, D. L., A. L. Lock, K. J. Shingfield, and D. E. Bauman. 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. Adv. Food Nutr. Res. 50: 179-217.

19- Peter, A. P., E. E. Hatfield, F. N. Owens, and U. S. Garrigus. 1971. Effects of aldehyde treatments of soybean meal on in vitro ammonia release, solubility and lamb performance. J. Nutr.101: 605-611.

20- Rawel, H. M., J. Kroll, and U. C. Hohl. 2001. Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins. Molecular Nutr. Food Res. 45: 72-81.

21- Rodriguez, D., L. D. Muller, and D. J. Schingoethe. 1975. *In vitro* and mouse evaluation of methods for protecting whey protein and casein from ruminal degradation. J. Dairy Sci. 58: 1841-1846.

22- Sallam, S. M. A., M. E. A. Nasser, A. M. El-Waziry, C. S. Bueno, and A. L. Abdalla. 2007. Use of an *in vitro*

Archive of SID

www.SID.ir

rumen gas production technique to evaluate some ruminant feedstuffs. Applied Sci. Res. 3: 34-41.
23- Schmidt, D. G., R. J. Meijer, C. J. Slangen, and E. C. Van-Beresteijn. 1995. Raising the pH of the pepsin-catalysed hydrolysis of bovine whey proteins increases the antigenicity of the hydrolysates. Clin. Exp. Allergy. 25: 1007-1017.
24- Scott, T., L. Cook, and S. Mills. 1971. Protection of dietary polyunsaturated fatty acids against microbial hydrogenation in ruminants. J. of Am. Oil Chemists' Society 48: 358-364.
25- Serfert, Y., S. Drusch, and K. Schwarz. 2009. Chemical stabilisation of oils rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during homogenisation, microencapsulation and storage. Food Chem. 113: 1106-1112.
26- Tabacco, E., G. Borreani, G. M. Crovetto, G. Galassi, D. Colombo, and L. Cavallarin. 2006. Effect of chestnut tannin on fermentation quality, proteolysis, and protein rumen degradability of alfalfa silage. J. Dairy Sci. 89: 4736-4746.
27- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 74: 3583–3597.
28- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3597.
29- Young, S. L., X. Sarda, and M. Rosenberg. 1993. Microencapsulating properties of whey proteins. microencapsulation of anhydrous milk fat. J. Dairy Sci. 76: 2868-2877.

Archive of SID

www.SID.ir