

تأثیر تغذیه‌ای روغن سویای اکسید شده در تقابل با نقش آنتی اکسیدانی هسته انار بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای به روش آزمایشگاهی

سید احسان غیائی^{1*} - رضا ولی زاده² - عباسعلی ناصریان²

تاریخ دریافت: 1391/11/02

تاریخ پذیرش: 1392/01/27

چکیده

به منظور بررسی اثرات احتمالی روغن سویای تازه، روغن سویای اکسید شده و پتانسیل آنتی اکسیدانی هسته انار بر ویژگی‌های تخمیر میکروبی از آزمایش‌های تولید گاز و Batch culture استفاده شد. فراسنجه‌های تولید گاز، دی اکسید کربن، متان، تجزیه پذیری ماده خشک، فاز تأخیر، زمان متناظر با نصف حداکثر تولید گاز (t0/5) و فراسنجه‌های محاسباتی نظیر پروتئین میکروبی، نسبت‌های مولی اسیدهای چرب فرار، انرژی قابل متابولیسم و قابلیت هضم ماده آلی در قالب طرح کاملاً تصادفی با اندازه گیری‌های تکرار شده در زمان مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل 1) جیره پایه و 4 درصد ماده خشک روغن خام تازه سویا (کنترل مجازی)، 2) جیره پایه و 4 درصد ماده خشک روغن خام اکسید شده سویا و 3) جیره پایه، 4 درصد ماده خشک روغن خام اکسید شده سویا و 8 درصد ماده خشک، هسته انار آسیاب شده بود. روغن سویای اکسید شده فراسنجه‌های گاز تولیدی کل، دی‌اکسید کربن کل، تجزیه پذیری ماده خشک، t0/5 و پروتئین میکروبی و نسبت مولی پروپیونات، تعداد مول کل اسیدهای چرب فرار، انرژی قابل متابولیسم و قابلیت هضم ماده آلی را کاهش و درصد متان، فاز تأخیر و نسبت مولی بوتیرات و استات را در مقایسه با تیمار حاوی روغن تازه افزایش داد. افزودن هسته انار به جیره به عنوان آنتی اکسیدان به طور معنی داری باعث افزایش کل تولید گاز، دی‌اکسید کربن کل، تجزیه پذیری ماده خشک، t0/5، نسبت‌های مولی پروپیونات و استات، تعداد مول‌های کل اسیدهای چرب فرار، انرژی قابل متابولیسم، قابلیت هضم ماده آلی و کاهش فاز تأخیر، درصد متان و نسبت مولی بوتیرات در مقایسه با تیمار حاوی روغن اکسید شده گردید. به طور کلی نتایج نشان داد که روغن اکسید شده، فراسنجه‌های مفید مرتبط با کشت میکروبی را از لحاظ کمی کاهش می‌دهد، اما هسته انار اثرات مخرب اسیدهای چرب غیر اشباع و ترکیبات پر اکسید روغن اکسید شده را اصلاح می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدان، تخمیر شکمبه‌ای، روغن سویای اکسید شده، هسته انار.

مقدمه

طریق برخی اسیدهای چرب خاص (6، 7 و 5) به منظور کاهش تقاضای انرژی در اوایل شیردهی مورد استفاده قرار گرفته است. از طرفی پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیر اشباع یکی از جایگاه‌های پذیرنده پروتون مازاد درون شکمبه بوده و با فرآیند تولید متان رقابت می‌کند (27). بنابراین استفاده از چربی در جیره (13 و 19) به ابزاری مدیریتی در کنترل وقایع متابولیکی پیرامون زایش تبدیل شده است. چربی در جیره دام‌های شیری، معمولاً از هسته‌های روغنی تأمین می‌شود که غالباً در فرآیند فرآوری تحت حرارت قرار می‌گیرند. شواهد نشان می‌دهد زیست هیدروژنه شدن روغن‌های حرارت دیده در شرایط مختلف (*In vivo*) (18)، (*In situ*) (48) و (*In vitro*) (37)) در ایزومری‌های اسید لینولئیک و لینولنیک غالباً کاهش می‌یابد. اثرات منفی وجود محصولات اکسیداسیون اسیدهای چرب از علل ذکر شده برای این فرآیند می‌باشد (37). محصولات مذکور می‌تواند هم فرآیند

دام‌های شیری در دوره انتقال، متحمل تغییرات قابل توجهی در متابولیسم گلوکز، اسیدهای چرب و مواد معدنی می‌شوند. برای تأمین نیاز متابولیکی دام‌ها در این دوره استراتژی‌های تغذیه‌ای متفاوتی به کار گرفته شده است از جمله می‌توان به حداقل میزان تغذیه ریز مغذی‌ها در اوایل دوره خشکی و افزایش آن در انتهای دوره خشکی اشاره کرد (31). از این رو تغذیه کربوهیدرات‌های غیر علوفه‌ای و چربی در جیره و یا کاهش درصد چربی شیر در ابتدای شیردهی از

1- استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند و دانش آموخته دکتری علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد،

2- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

(s.e.ghiasi@birjand.ac.ir)

* نویسنده مسئول:

تأمین نیازهای متابولیکی بزهای شیری سانن در دوره خشکی با استفاده از نرم افزار SRNS نسخه 1,94468 دانشگاه کرنل (47) بر مبنای ماده خشک حاوی 57/3 درصد علوفه و 42/7 درصد کنسانتره دارای 4 درصد روغن سویای خام تازه یا اکسید شده موازنه شد (جدول 1 و 2). روغن سویای خام بر اساس روش "AOCS: cd" (57-12) با عبور حباب‌های هوا از خلال روغن در دمای 92 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت اکسید شد به صورتی که ارزش عددی مشتقات پراکسید اسید چرب تولید شده بر اساس روش "AOCS: cd 8-53" از $1/373 \pm 0/037$ میلی‌اکی‌والان گرم در کیلوگرم روغن خام تازه تا حد $7/066 \pm 0/045$ میلی‌اکی‌والان گرم در کیلوگرم روغن خام اکسید شده افزایش یافت. تیمارهای آزمایشی شامل: 1) کنترل مجازی شامل جیره پایه و 4 درصد ماده خشک جیره روغن خام تازه سویا، 2) جیره پایه و 4 درصد ماده خشک جیره روغن خام اکسید شده سویا و 3) جیره پایه، 4 درصد ماده خشک جیره روغن خام اکسید شده سویا و 8 درصد ماده خشک جیره، هسته انار آسیاب شده (جایگزین با سوس گندم) بودند.

مراحل انجام آزمایشات و جمع‌آوری داده‌ها

به منظور بررسی اثرات روغن خام تازه سویا، روغن اکسید شده و پراکسیدهای تولید شده در تقابل با نقش آنتی‌اکسیدانی هسته انار بر کنتیک تولید گاز، تولید نیتروژن آمونیاکی، تولید گاز متان و تجزیه پذیری ظاهری ماده خشک (8) از آزمایش تولید گاز به روش نیمه اتوماتیک (28) با 10 تکرار و 2 اجرا استفاده شد. در این آزمایش مایع شکمبه از 3 راس گاو نر هلستاین دارای فیستولای دائمی شکمبه که دو وعده در روز با جیره حاوی 60 درصد علوفه و 40 درصد کنسانتره بر اساس ماده خشک در سطح نگهداری تغذیه می‌شدند، تهیه شد. سپس بر اساس روش اصلاح شده بولومل و همکاران (9) معادل 500 میلیگرم ماده خشک جیره آزمایشی و 50 میلیلیتر مخلوط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی در شیشه‌های 120 میلیلیتری بی‌هوازی قرار داده شد. فشار گاز تولیدی در زمان‌های 2، 4، 6، 8، 12، 24، 36، 48، 72، 96 و 120 ساعت از آغاز انکوباسیون بر اساس کیلوپاسکال اندازه‌گیری شده و به معادل حجمی در شرایط فشار و دمای استاندارد (1^{atm} و $0^{\circ}C$) تبدیل شد. برای اندازه‌گیری ماده خشک هضم شده حقیقی و نیتروژن آمونیاکی و میزان متان تولیدی از محیط کشت و شرایط روش تولید گاز به شیوه Batch culture با 5 تکرار برای هر فراسنجه استفاده شد. در این مرحله در زمان‌های 12، 24، 48، 72، 96 و 120 ساعت برای اندازه‌گیری تجزیه‌پذیری ظاهری ماده خشک و در زمان‌های 12، 24، 48 و 72 ساعت برای تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی (11) نمونه‌گیری از محیط کشت به عمل آمد. گاز تولیدی نیز در زمان‌های 12، 24، 48 و 72 ساعت برای اندازه‌گیری گاز متان

زیست‌هیدروژنه شدن و هم‌باکتری‌های دخیل در این مسیر را متأثر نماید چرا که باکتری‌های بی‌هوازی نسبت به مشتقات اکسیداسیون اسیدهای چرب یا پراکسیدها حساس‌ترند (10). علاوه بر حساسیت میکروفلورای شکمبه نسبت به اثرات مسمومیت‌زایی اسیدهای چرب موجود در چربی جیره و کاهش میزان و بازدهی تولید پروتئین میکروبی (12 و 50)، چربی‌های جیره از قبیل مکمل‌های چربی و هسته‌های روغنی در صورتی که بدون پایدارکننده و نگهدارنده به مصرف برسند می‌توانند یک عامل معنی‌دار در افزایش رادیکال‌های آزاد در بدن حیوان باشند (1). افزودن آنتی‌اکسیدان به جیره تا حدودی می‌تواند اثرات منفی مشتقات پراکسیداسیون اسیدهای چرب در شکمبه را تعدیل نماید. مطالعات اسمیت و همکاران (45) نشان داد که تغذیه آنتی‌اکسیدان‌ها قابلیت هضم فیبر را در تقابل با هر دو چربی تازه و اکسید شده افزایش می‌دهد. چنین اثری بر نقش مثبت آنتی‌اکسیدان‌ها در بهبود محیط رشد میکروفلورای شکمبه و خصوصاً باکتری‌های تجزیه‌کننده فیبر تأکید دارد (45). بنابراین توجه به همزمانی نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در تغذیه چربی‌ها ضروری به نظر می‌رسد چرا که آنتی‌اکسیدان‌ها این اثرات منفی را با خنثی کردن پراکسیدها و رادیکال‌های آزاد و نیز کاهش اکسیداسیون متعادل می‌نمایند (15).

آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک عمدتاً شامل ترکیبات فنولی مانند بوتیلات هیدروکسی تولوئن، بوتیلات هیدروکسی آنیزول، ترشیو بوتیل هیدرو کوئینون و گالات و آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌مری مانند آنوکسومر، یونوکس 100 و یونوکس 300 هستند که به دلیل سرطان‌زا بودن استفاده از آنها محدود شده و گرایش به استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهی جهت کاربرد در مواد خوراکی افزایش یافته است (33، 36 و 51). عصاره هسته انار غنی از پلی‌فنول‌ها و حاوی بیش از 100 ترکیب فعال زیستی می‌باشد (43) که از این میان اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد التهاب ترکیباتی همچون پانیکالائین و الایتائین (20 و 32) با بوتیلات هیدروکسی تولوئن تجاری برابری می‌کند (35 و 42). از آنجا که اطلاعات زیادی در مورد نقش آنتی‌اکسیدانی هسته انار بر فرآیند تخمیر شکمبه‌ای در حضور روغن‌ها در دست نیست، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر تغذیه‌ای روغن سویای اکسید شده در تقابل با نقش احیاکنندگی ترکیبات فعال زیستی هسته انار به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی و ارگانیک، بر کنتیک تولید گاز، نیتروژن آمونیاکی، متان تولیدی، قابلیت هضم ماده خشک و سایر فراسنجه‌های کشت میکروبی در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

جیره‌ها و تیمارهای آزمایشی

جیره‌های آزمایشی برای استفاده در روش تولید گاز بر اساس

توسط سرنگ‌های ایزوله نمونه برداری شده و توسط سیستم الکترونیکی مجهز به حسگر استاندارد گاز متان به منظور تعیین غلظت گاز مذکور مورد آزمایش قرار گرفت و گاز تولیدی مجتمع در شیشه به صورت متوالی تخلیه شد.

جدول 1- ترکیب اجزاء تشکیل دهنده و مواد مغذی جیره‌های آزمایشی (بر اساس درصد ماده خشک)
Table 1- Composition and ingredients of experimental diets (basis of % DM)

Ingredients محتویات	تیمارها Treatments		
	1	2	3
Alfalfa یونجه خشک	9.87	9.87	9.87
Corn silage سیلوی ذرت	19.74	19.74	19.74
Wheat straw کاه گندم	27.64	27.64	27.64
Wheat bran سبوس گندم	9.87	9.87	-
Pomegranate seed هسته انار	-	-	8
Barley ground دانه جو	14.81	14.81	14.81
Canola meal کنجاله کانولا	11.85	11.85	13.72
Fresh soybean oil روغن سویا تازه	4	-	-
Oxidized soybean oil روغن سویا اکسید شده	-	4	4
Mineral premix ¹ مکمل مواد معدنی ¹	0.99	0.99	0.99
Limestone سنگ آهک	0.99	0.99	0.99
Salt نمک	0.25	0.25	0.25
Calculated composition (%) ترکیب شیمیایی محاسبه شده (%)			
CP پروتئین خام	13.2	13.2	13.4
ADF فیبر نا محلول در شوینده اسیدی	30.39	30.39	31
NDF فیبر نا محلول در شوینده خنثی	48.7	48.7	49
EE عصاره اتری	6.7	6.7	7
NFC کربوهیدرات غیر فیبری	25.7	25.7	24.8
Ca کلسیم	0.80	0.87	0.87
P فسفر	0.29	0.29	0.30
Ash خاکستر	8.1	8.1	7.9

¹ منیزیم، آهن، ید، مس، منگنز، سلنیوم، روی، گوگرد، کبالت، کلسیم و فسفر به ترتیب 250، 20، 1/3، 5، 6، 4، 0.4، 0.90، 0.6 و 15 و 12 میلی‌گرم در گرم
¹Concentration of Mg, Fe, I, Cu, Mn, Se, Zn, S, Co, Ca and P is 50, 20, 1.3, 5, 6, 40, 90, 0.6, 15 and 12 mg/g respectively.

همکاران (8) با مختصری اصلاحات در دستگاه معادلات دو مجهولی به صورت زیر استفاده شد.

$$1) AA+(2 \times PP)=(2 \times cVFA)-fCO_2-CH_4$$

$$2) AA+(PP/2)=cVFA-fCO_2+CH_4$$

$$CH_4 = \text{متان (میلی مول)}$$

$$fCO_2 = \text{دی اکسید کربن حاصل از تخمیر (میلی مول)}$$

$$cVFA = \text{کل اسیدهای چرب فرار محاسباتی (میلی مول)}$$

$$AA = \text{نسبت مولی استات} = PP = \text{نسبت مولی پروپیونات}$$

در معادلات فوق تعداد مول دی اکسید کربن حاصل از بافری معادل تعداد مول‌های کل اسیدهای چرب فرار و مجموع نسبت‌های مولی استات، بوتیرات و پروپیونات معادل 1 در نظر گرفته شد. برای مقایسه میانگین فراسنجه‌های مدل‌های غیر خطی و مقادیر محاسبه شده در زمان ثابت از رویه GLM نرم افزار SAS و آزمون توکی استفاده شد (38). مقایسه میانگین تیمارها بر اساس ارزیابی میانگین اندازه گیری‌های مکرر در طول زمان در قالب طرح‌های کاملا تصادفی با مدل آماری زیر و با استفاده از رویه GLM نرم افزار آماری SAS و آماره هتلینگ - لاولی تریس انجام شد (38).

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + t_k + \delta_{ij} + (\tau \times t)_{ik} + \epsilon_{ijk}$$

در مدل فوق y_{ijk} مشاهده ijk ام، μ میانگین و سایر اجزاء مدل به ترتیب شامل اثر تیمار، اثر زمان، کوواریانس بین اندازه گیری‌ها در هر تیمار، اثرات متقابل زمان k و تیمار i و خطای تصادفی یا واریانس بین اندازه گیری‌های j در هر تیمار i در زمان k بود.

نتایج و بحث

فراسنجه‌های تخمینی مدل نمایی شفلد (41) بر اساس داده‌های به دست آمده از آزمایش تولید گاز و فراسنجه‌های محاسباتی مرتبط در زمان $t/5$ ، در جدول 3 گزارش شده است. بر اساس این نتایج تفاوت الگوی تخمیر از دیدگاه نرخ و پتانسیل تولید گاز بین تیمارهای آزمایشی به لحاظ آماری معنی دار بود. تیمار حاوی روغن سویای اکسید شده بالاترین نرخ تولید گاز و در مرتبه بعد تیمار حاوی روغن سویای تازه، نرخ تولید گاز بالاتری نسبت به تیمار حاوی هسته انار آسیاب شده داشت ($P < 0/001$). علی‌رغم این که انتظار می‌رود با وجود مشتقات پر اکسیداسیون اسیدهای چرب از جمله آلکانال‌ها، آلکانال‌ها، دی‌آلدئیدها، آلکانون‌ها و ... (14 و 46) نرخ تخمیر میکروبی تحت تأثیر رادیکال‌های آزاد این ترکیبات دستخوش افت ناشی از تخریب دیواره سلولی و یا برهم خوردن تعادل متابولیکی و فرآیندهای بیوشیمیایی میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی گردد (48)، افزایش نرخ به وجود آمده در گاز تولیدی در واحد زمان در تیمار حاوی روغن اکسید شده برآیندی از سلسله وقایع بیوشیمیایی رخ داده در

روغن‌های تازه و اکسید شده به منظور تجزیه شیمیایی اسیدهای چرب روش متیلاسیون توصیه شده توسط کرامر و همکاران (22) مشتق سازی شد و ترکیب اسیدهای چرب آنها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی Varian مدل 3800 cp مجهز به آنجکتور 1177 FID و ستون CP-Sill 88 تعیین شد. در ابتدا دمای آون به مدت 10 دقیقه در $50^\circ C$ قرار داشت، سپس با نرخ $5^\circ C$ در دقیقه به دمای $260^\circ C$ افزایش یافت و این شرایط به مدت 30 دقیقه ادامه یافت (25). از گاز هلیوم با نرخ 1/2 میلی لیتر در دقیقه تحت فشار 355 کیلوپاسکال به عنوان حامل استفاده شد. استانداردهای به کار رفته در آزمایش از شرکت Sigma-Aldrich تهیه گردید.

معادلات و روش‌های آماری

از مدل نمایی با فاز تأخیر اسپچفولد ($P=v(1-\exp(-k(t-lag)))$) (41) برای برازش داده‌های تولید گاز با به کارگیری روش مقایسات گوسن - نیوتن در رویه NLIN نرم افزار آماری SAS به شیوه رگرسیون غیر خطی (38) استفاده گردید.

در این مدل P گاز تولیدی، v گاز مرتبط با سوبسترای دارای پتانسیل تخمیر، k نرخ تولید گاز در زمان و lag با مفهوم زمان مربوط به فاز تأخیر به کار رفت. همچنین معادله ارسکوف - مکدونالد ($DMD=a+b(1-\exp(-ct))$) مورد استفاده قرار گرفت (30). در این مدل a بخش سریع تجزیه و b و c به ترتیب به عنوان بخش با تجزیه پذیری کند و نرخ تجزیه پذیری ماده خشک در زمان t در نظر گرفته شد.

همچنین میزان اسیدهای چرب فرار بر اساس گاز تولیدی در 24 ساعت انکوباسیون از معادله گنچاپو و همکاران (16) با ضریب تعیین $R^2=0/953$ و نیز سنتر پروتئین میکروبی بر اساس گاز تولیدی در زمان متناظر با تولید نصف حداکثر گاز تولیدی ($t_{0/5}$) یعنی زمانی که نرخ تجزیه میکروارگانیسم‌ها حداقل می‌باشد (8) از روابط زیر محاسبه گردید.

$$VFA = (GP_{24/0.5g} \times 0.0239) - 0.0601$$

$GP_{24/0.5g}$ = گاز تولیدی (میلی لیتر در 24 ساعت به ازاء نیم گرم ماده خشک)
 VFA = کل اسیدهای چرب فرار (میلی مول)

$$MM^2 = t_{0/5} \times \text{گاز تولیدی}^1 \quad (2/34)$$

فاکتور تساهم ظاهری به صورت نسبت سوبسترای تجزیه شده ظاهری (میلی گرم) به حجم گاز تولیدی (میلی لیتر) در زمان، بیان می‌شود ($r=0/95$) (8). برای محاسبه نسبت مولی استات، پروپیونات و بوتیرات از فرمول‌های بسط داده شده والین (52) توسط بلومل و

تفاوت معنی‌دار مشاهده شده در زمان فاز تأخیر می‌تواند نشان دهنده تأثیر همزمان مشتقات پراکسیداسیون اسیدهای چرب و ایزومری‌های ترانس اسیدهای چرب شکل گرفته در اثر حرارت در طی فرآیند آماده سازی روغن‌های اکسید شده (جدول 2) و اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در تیمارهای 1 و 2 بر تعادل اکسیداسیون احیا و سلامت غشاء سلولی میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی از طریق تغییر شرایط بهینه کشت میکروبی باشد.

محیط کشت ثابت تولید گاز می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که فاز تأخیر در تیمار دوم و در رتبه بعد در تیمار اول بالاترین زمان انکوباسیون را نسبت به تیمار حاوی هسته انار به خود اختصاص داده ($P < 0/001$) و این در حالی است که پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر بر اساس تخمین مدل غیر خطی و نیز گاز اندازه گیری شده پس از گذشت 120 ساعت از آغاز انکوباسیون در تیمار حاوی روغن اکسید شده کمترین مقدار را نشان داده است ($P < 0/01$). بر اساس این نتایج

جدول 2 - چگالی و ترکیب اندازه گیری شده اسیدهای چرب روغن سویای تازه و اکسید شده (میلی گرم در گرم)

Table 2- Density and measured fatty acid composition of oxidized and fresh soybean oil

Parameters	فرمول بسته Closed formula	اکسید شده Oxidized	تازه Fresh	فراسنجه
Dodecanoic	C12:0	0.459±0.01	0.074±0.00	اسید دودکانوئیک
Tetradecanoic	C14:0	1.055±0.01	0.727±0.00	اسید تترادکانوئیک
Cis-9-tetradecenoic	C14:1	4.044±0.05	1.15±0.01	اسید سیس -9-تترادکانوئیک
Pentadecanoic	C15:0	0.088±0.00	0.197±0.00	اسید پنتادکانوئیک
Cis-10-pentadecenoic	C15:1	0.229±0.00	0.163±0.00	اسید سیس -10- پنتادکانوئیک
Hexadecanoic	C16:0	136.556±0.05	107.328±0.06	اسید هگزادکانوئیک
Cis-9-hexadecenoic	C16:1	0.677±0.00	0.967±0.01	اسید سیس -9- هگزادکانوئیک
Heptadecanoic	C17:0	0.838±0.01	0.947±0.01	اسید هپتادکانوئیک
Cis-10- Heptadecenoic	C17:1	0.439±0.01	0.434±0.01	اسید سیس -10- هپتادکانوئیک
Octadecanoic	C18:0	33.865±0.03	39.234±0.03	اسید اکتادکانوئیک
Cis- Octadecenoic	C18:1	207.055±0.06	218.663±0.04	اسید سیس - اکتادکانوئیک
Cis- Octadecadienoic ²	C18:2 cis	509.21±0.09	525.191±0.08	اسید سیس - اکتادکا دی انوئیک ²
Trans- Octadecadienoic ¹	C18:2 trans	0.108±0.00	5.876±0.02	اسید ترانس - اکتادکا دی انوئیک ¹
Cis-9,12,15- Octadecatrienoic	C18:3α	68.845±0.01	73.683±0.07	اسید سیس - 9, 12, 15 اکتادکا تری انوئیک (آلفا)
Cis-6,9,12- Octadecatrienoic	C18:3γ	0.099±0.00	1.038±0.01	اسید سیس - 6, 9, 12 اکتادکا تری انوئیک (گاما)
Eicosanoic	C20:0	1.621±0.02	2.929±0.06	اسید ایکوزانوئیک
Eicosenoic	C20:1	0.077±0.00	1.989±0.04	اسید ایکوزنوئیک
Eicosadienoic	C20:2	0.218±0.00	0.355±0.01	اسید ایکوزادی انوئیک
Cis-11,14,17-Eicosatrienoic	C20:3	-	0.295±0.00	اسید سیس - 11, 14, 17 ایکوزا تری انوئیک
Cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic	C20:4	0.223±0.01	0.492±0.01	اسید سیس - 5, 8, 11, 14 ایکوزا تترا انوئیک
Cis-Eicosapentaenoic ²	C20:5	-	0.375±0.02	اسید سیس - ایکوزا پنتا انوئیک ²
Heneicosanoic	C21:0	-	0.078±0.00	اسید هنیکوزانوئیک
Docosanoic	C22:0	1.917±0.02	3.678±0.05	اسید دوکوزانوئیک
Cis-13- Docosenoic	C22:1	-	0.072±0.00	اسید سیس - 13- دوکوزنوئیک
Cis-Docosahexaenoic ²	C22:6	0.322±0.00	0.480±0.01	اسید سیس -دوکوزا هگزانوئیک ²
Tricosanoic	C23:0	0.247±0.01	0.277±0.02	اسید تریکوزانوئیک
Tetracosanoic	C24:0	0.642±0.01	1.299±0.03	اسید تتراکوزانوئیک
Cis-Tetracosenoic	C24:1	0.117±0.00	0.147±0.01	اسید سیس تتراکوزنوئیک
Others		31.154±0.03	12.129±0.07	سایر اسیدهای چرب
Unsaturated		791.557±0.15	831.102±0.18	اسیدهای چرب غیر اشباع
Saturated		177.289±0.18	156.768±0.16	اسیدهای چرب اشباع
Oil density(g/ml)		0.897±0.05	0.859±0.06	چگالی روغن (گرم در میلی لیتر)

¹ترکیبات مختلف ایزومری‌های ترانس شامل: ترانس/ترانس، سیس/ترانس، ترانس/ترانس. ²همه پیوند ها آرایش سیس دارند.

¹Different position of trans isomers: trans/cis, trans/trans, cis/trans. ²All bound's position are cis.

محیط کشت به کار رفته در هر سه تیمار انتظار می‌رود جمعیت میکروبی دارای پتانسیل تکثیر در ابتدای انکوباسیون و پس از فاز تأخیر و خنثی شدن ترکیب‌های رادیکال طی فرآیند بیوهیدروژناسیون و سایر مکانیزم‌های دفاعی (10) از تمام پتانسیل محیط کشت برای فعالیت بی‌هوازی خود استفاده کند.

از طرفی تعادل جمعیت میکروبی تحت تأثیر روغن‌های اکسید شده به سمت میکروارگانیزم‌های تولید کننده بوتیرات تمایل بیشتری پیدا کرده که نرخ گاز ناشی از بفری اسیدهای چرب فرار را در این تیمارها افزایش می‌دهد (16) که این با نتایج ارائه شده (جدول 4) در رابطه با گاز دی‌اکسید کربن مطابقت دارد. بنابراین عوامل ذکر شده از دلایل اصلی احتمالی در بالاتر بودن نرخ تولید گاز در تیمار 2 نسبت به تیمار 3 می‌باشد.

مجموع اثرات مخرب ترکیبات حاوی رادیکال‌های آزاد، ایزومری‌های ترانس و اسیدهای چرب غیر اشباع سبب شده تا رسیدن به نقطه عطف افزایشی نرخ تولید گاز (t 0/5) تا حدودی در تیمارهای حاوی روغن تازه و در حد قابل ملاحظه‌ای در تیمار حاوی روغن اکسید شده به تعویق بیافتد.

کاهش جمعیت میکروارگانیزم‌های شکمبه از قبیل جنس بوتیریوبیوریو فیروسولونس در اثر روغن‌های غیر اشباع و خصوصاً چربی‌های اکسید شده در مطالعات مختلف (44 و 49) را می‌توان به عنوان یکی از علت‌های ممکن برای افزایش زمان فاز تأخیر و نیز نقش آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فعال زیستی موجود در هسته انار در مقابل ترکیبات اکسید کننده موجود در چربی‌های اکسید شده را به عنوان عامل احتمالی در کاهش زمان فاز تأخیر در تیمار 3 به شمار آورد. از این رو با توجه به یکسان بودن ظرفیت تغذیه‌ای و بافری

جدول 3- اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های مدل کنتیک تولید گاز، ماده خشک هضم شده در زمان t0/5 و مقادیر محاسبه شده پروتئین میکروبی در زمان t0/5، انرژی قابل متابولیسم و تجزیه پذیری ماده آلی¹

Parameters فراسنجه	Treatments ² تیمارها ²			SEM	P-value
	1	2	3		
Gas production rate (c) ³ نرخ تولید گاز ³	0.091 ^a	0.102 ^b	0.076 ^c	3.7×10 ⁻⁴	P<0.001
Potential gas production(b) ⁴ پتانسیل تولید گاز در مدل ⁴	166.276 ^a	143.260 ^b	172.060 ^c	0.623	P<0.01
Lag time(h) فاز تأخیر (ساعت)	0.323 ^a	0.731 ^b	0.004 ^c	0.024	P<0.001
Gas produced in 120 h ⁴ کل گاز تولیدی در 120 ساعت ⁴	170.989 ^a	146.784 ^b	174.228 ^a	4.133	P<0.01
Time of t _{0.5} زمان t _{0.5} (ساعت)	16.275 ^a	14.119 ^b	19.284 ^c	0.117	P<0.001
Gas produced at t _{0.5} ⁴ گاز تولیدی در زمان t _{0.5} ⁴	89.238 ^a	74.750 ^b	93.388 ^c	0.327	P<0.001
Degraded DM at t _{0.5} ⁵ ماده خشک هضم شده در t _{0.5} ⁵	510.662 ^a	459.522 ^b	482.146 ^c	7.9×10 ⁻⁴	P<0.001
Microbial protein at t _{0.5} ^{7.5} پروتئین میکروبی در زمان t _{0.5} ^{7.5}	301.844 ^a	284.604 ^b	263.614 ^c	0.922	P<0.001
ME ^{6.1} انرژی قابل متابولیسم ^{6.1}	5.906 [*]	5.665 [†]	5.742 ^{†*}	0.079	P=0.09 ⁸
% OMD ⁷ تجزیه پذیری ماده آلی (%) ⁷	40.651 [*]	39.077 [†]	39.582 ^{†*}	0.516	P=0.09 ⁸

¹ میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05).

² تیمار 1: روغن تازه (کنترل مجازی)، تیمار 2: روغن اکسید شده و تیمار 3: روغن اکسید شده و هسته انار.

³ میلی‌لیتر در ساعت به ازاء هر گرم ماده خشک انکوبه شده، ⁴ میلی‌لیتر به ازاء هر گرم ماده خشک انکوبه شده، ⁵ میلی‌گرم به ازاء هر گرم ماده خشک انکوبه شده، ⁶ مگاژول به ازاء هر کیلوگرم ماده خشک، ⁷ محاسباتی. ⁸ تفاوت دو گروه با دو علامت متفاوت میل به معنی‌داری دارد.

¹ Means within same column with different superscripts differ (P<0.05).

² Treatments: 1) control (fresh oil) 2) oxidized oil and 3) oxidized oil and pomegranate seed.

³ ml/hour/g incubated DM, ⁴ ml/g incubated DM, ⁵ mg/g incubated DM, ⁶ Mj/Kg DM, ⁷ Calculated. ⁸ Parameters with Latin signs just trend to be different.

نتایج جدول 3 نشان می‌دهد که تولید پروتئین میکروبی تحت تأثیر چربی اکسید شده به طور معنی‌داری در هر دو تیمار 2 و 3 فارغ از حضور آنتی‌اکسیدان کاهش یافته است. همچنین حضور آنتی‌اکسیدان در تیمار 3 نیز موجب کاهش تولید پروتئین میکروبی نسبت به تیمار 2 گردیده است ($P < 0/001$). با توجه به کاهش معنی‌دار تولید نیتروژن آمونیاکی در زمان انکوباسیون در تیمار 2 که نشان دهنده کاهش هضم پروتئین خام در اثر مشتقات پراکسیداسیون اسیدهای چرب می‌باشد و نیز افزایش معنی‌دار تولید نیتروژن آمونیاکی در طول زمان در تیمار 3 که احتمالاً بهینه بودن شرایط محیط کشت به نفع افزایش جمعیت پروتوزوایی و تجزیه بیشتر پروتئین میکروبی را نشان می‌دهد (شکل 3)، کاهش پیاپی در تولید پروتئین میکروبی در تیمارهای 2 و 3 قابل توجیه بوده و با نتایج حاصل از سایر مطالعات (50) مطابقت دارد. مطالعات وازکوئر-آنن و جنکینز (50) نشان می‌دهد که هضم پروتئین خام در اثر اعمال تیمار چربی اکسید شده در مقایسه با چربی تازه به شدت کاهش یافته است. همچنین تولید نیتروژن میکروبی برای چربی اکسید شده در مقایسه با چربی تازه کاهش یافته اما نرخ عبور نیتروژن برای چربی اکسید شده افزایش نشان می‌دهد که به دلیل کاهش قابلیت هضم پروتئین خام و در نتیجه بالاتر بودن نیتروژن غیر آمونیاکی برای تیمار چربی اکسید شده گزارش شده است. آنها نشان دادند که درصد نیتروژن خوراک در ترکیب باکتری‌ها در اثر آنتی‌اکسیدان و چربی اکسید شده به دلیل تغییر در جمعیت میکروبی کاهش و خروج اسیدهای چرب اشباع در اثر تغذیه چربی اکسید شده افزایش می‌یابد. از این مطالعه اینطور بر می‌آید که چربی اکسید شده متابولیسم پروتئین میکروبی را با توجه به کاهش هضم پروتئین خام، کاهش تولید نیتروژن میکروبی و سوق دادن پتانسیل میکروبی به سمت خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد از طریق افزایش زیست‌هیدروژنه شدن، کاهش می‌دهد.

همان‌طور که در جدول 3 گزارش شده است فراسنجه‌های انرژی قابل متابولیسم و تجزیه پذیری ماده آلی که بر اثر گاز تولیدی از تخمیر معادل وزنی 200 میلی گرم سوپسترا فرموله و محاسبه شده افت و جبران عددی مختصری را به ترتیب در اثر روغن‌های اکسید شده و اعمال تیمار حاوی هسته انار نشان داد که این تفاوت‌ها تمایل به معنی‌داری دارد ($P = 0/09$). جدول 4 اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های مدل ارسکوف مکدونالد، تولید متان و دی‌اکسید کربن در 24 ساعت انکوباسیون، اسیدهای چرب فرار کل و نسبت‌های مولی اسیدهای چرب فرار را نشان می‌دهد. نرخ تجزیه پذیری ماده خشک به صورت گرم در ساعت در تیمار حاوی روغن تازه دارای بالاترین مقدار نسبت به سایر تیمارها بود. عواملی همچون اثرات منفی مشتقات پراکسیداسیون اسیدهای چرب چه به لحاظ نامساعد نمودن محیط انکوباسیون و صرف پتانسیل میکروبی در خنثی‌سازی

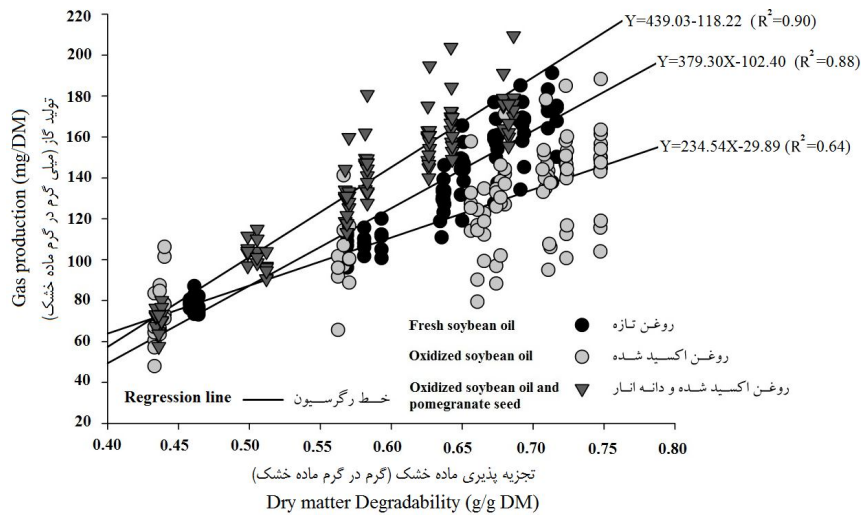
نتایج مربوط به تجزیه پذیری ماده خشک در زمانی که تولید گاز به نصف کل گاز تولیدی می‌رسد (زمانی که نرخ تجزیه میکروارگانیسم‌ها در حداقل مقدار خود می‌باشد ($t_{0/5}$)) نشان دهنده کاهش معنی‌دار تجزیه پذیری ماده خشک تحت تأثیر مشتقات پراکسیداسیون اسیدهای چرب نسبت به تیمار کنترل مجازی حاوی روغن تازه و افزایش معنی‌دار تجزیه پذیری ماده خشک در اثر نقش احتمالی آنتی‌اکسیدانی هسته انار در تیمار 3 نسبت به تیمار 2 بوده است ($P < 0/001$) که با نتایج وازکوئر آنون و همکاران (50) مطابقت دارد.

از آنجا که استرس اکسیداتیو در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها هنگامی اتفاق می‌افتد که رادیکال‌های آزاد در سلول تجمع یافته و منجر به اختلال در عملکرد صحیح غشای سلولی، همانند سازی DNA و کاهش طول عمر سلول می‌شود (40) طبیعی است که میکروارگانیسم‌های شکمبه که عمدتاً بی‌هوازی بوده و سیستم آنتی‌اکسیدانی کمتر توسعه یافته‌ای نسبت به موجودات هوازی دارند (10) در اثر محصولات پراکسیداسیون اسیدهای چرب بیشتر دچار اختلالات ناشی از استرس اکسیداتیو گردند. تغذیه چربی‌های اکسید شده نه تنها میزان پراکسیدها را در حیوان بالا می‌برد بلکه می‌تواند تخمیر شکمبه را نیز از طریق کاهش تولید پروتئین میکروبی و بازدهی تحت تأثیر منفی خود قرار دهد (50). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در جیره این اثرات منفی را با خنثی کردن پراکسیدها و رادیکال‌های آزاد و نیز کاهش پراکسیداسیون اسیدهای چرب متعادل می‌نماید (17). بر اساس تحقیقات صورت گرفته (45)، تغذیه آنتی‌اکسیدان‌ها همچنین قابلیت هضم فیبر را چه در چربی تازه و چه در چربی اکسید شده افزایش داده است که بر نقش مفید آنتی‌اکسیدان‌ها بر جمعیت میکروبی شکمبه تأکید دارد.

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول 3 زمان $t_{0/5}$ تولید گاز در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P < 0/001$). به نظر می‌رسد کاهش $t_{0/5}$ در تیمار دوم نسبت به سایر تیمارها نمایانگر این است که ظرفیت بافری محیط کشت بدون آنتی‌اکسیدان در تیمار حاوی روغن اکسید شده نسبت به روغن تازه با سرعت بیشتری خنثی شده و شرایط محیطی به نفع کاهش جمعیت پروتوزوآها و سویه‌های باکتریایی حساس پیش می‌رود. اما در محیط حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هسته انار $t_{0/5}$ یا نقطه عطف کاهشی منحنی تولید گاز به طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها افزایش می‌یابد. این افزایش می‌تواند به معنای حفظ شرایط بهینه محیط کشت به لحاظ بافری به مدت طولانی‌تری نسبت به سایر تیمارها باشد که احتمالاً به دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی ترکیبات هسته انار در حفظ پایداری محیط و حذف رادیکال‌های آزاد و محصولات مضر پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع بوده است.

تیمار 1 افزایش معنی‌داری به همراه نداشت. با توجه به فراسنجه زمانی 0/5t در جدول 3 بهینه بودن شرایط تخمیر برای تولید بیشتر گاز تخمیری در مقابل گاز ناشی از بافوری برای مدت طولانی‌تر نسبت به سایر تیمارها می‌تواند دلیل اصلی افزایش عددی تعداد مول‌های گاز متان در تیمار 3 طی 24 ساعت انکوباسیون باشد. اما به طور کلی در صد متان تولیدی در تیمار 3 طی 72 ساعت انکوباسیون در بازه‌های زمانی مختلف نشان دهنده روند کاهشی نسبت به سایر تیمارها در طول زمان بوده (شکل 2) که احتمالاً بیانگر نقش مثبت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هسته انار در پیشبرد مسیر تخمیر به سمت سنتز متان کمتر می‌باشد. بر اساس مطالعات ماو و همکاران (27) به طور کلی تغذیه چربی‌ها به دلیل کاهش جمعیت متانوژن‌ها و نیز رقابت بیوهیدروژناسیون با تولید متان بر سر پروتون‌های آزاد، باعث کاهش تولید متان می‌گردد. اعمال تیمار حاوی روغن اکسید شده به دلیل نقشی که پراکسیدها و رادیکال‌های آزاد در کاهش جمعیت میکروبی دارند باعث کاهش رقابت در استفاده از پروتون‌ها بین آرک‌های متانوژن مقاوم تر و باکتری‌های فیبرولایتیک حساس تر موثر در زیست‌هیدروژناسیون شده (50) و انتظار می‌رود که برآیند واکنش‌ها باعث تولید بیشتر متان گردد. از طرفی افزودن آنتی‌اکسیدان‌های هسته انار به محیط کشت با بهینه نمودن شرایط کلی انکوباسیون و افزایش جمعیت پروتوزوآها منجر به افزایش تجزیه باکتری‌های فیبرولایتیک موثر در زیست‌هیدروژناسیون و نیز افزایش رشد نمایی آرک‌های متانوژن و تولید بیشتر متان گردید (21).

رادیکال‌های آزاد و پراکسیدها از طریق مکانیزم‌های دفاعی و چه از طریق ایجاد فاز تأخیر و میل به سمت تولید گاز بافوری بیشتر به دلیل بوتیرات بیشتر (جدول 4) تحت تأثیر تغییر جمعیت میکروبی به سمت باکتری‌های تولید کننده بوتیرات، می‌تواند از دلایل احتمالی کاهش نرخ تجزیه پذیری ماده خشک در تیمارهای حاوی روغن اکسید شده باشد. این شواهد با نتایج واز کوئز آنون و همکاران (49) مطابقت دارد. هرچند نقش آنتی‌اکسیدانی هسته انار در فراسنجه‌های مختلف مشهود است اما نرخ تجزیه پذیری ماده خشک در تیمار 3 همچنان تحت تأثیر پراکسیدها دچار کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار 1 شده که البته با در نظر گرفتن حداقل بودن فاز تأخیر و بیشینه بودن تجزیه پذیری کل و تجزیه پذیری موثر با احتساب نرخ خروج 0/03 گرم ماده خشک در ساعت و همچنین افزایش این نرخ نسبت به تیمار 2، برآیند نقش آنتی‌اکسیدانی هسته انار بر هضم میکروبی مثبت ارزیابی شد. شکل 1 بیان می‌کند که تابعیت گاز تولیدی از ماده خشک به ترتیب در تیمارهای 3، 1 و 2 روند کاهشی داشته است. این نتایج نشان می‌دهد که در تیمارهای 3 و 2 به ترتیب شرایط بهینه و نامساعد تخمیر گاز تولیدی همبستگی بیشتر و کمتری با تجزیه پذیری ماده خشک ایجاد نموده است. در این زمینه توجه همزمان به گازهای تولیدی و نسبت مولی اسیدهای چرب فرار تولید شده تحت تأثیر تیمارها اطلاعات تحلیلی بهتری را به دست می‌دهد. نتایج جدول 4 نشان می‌دهد که تعداد مول متان تولیدی در 24 ساعت انکوباسیون فاقد هرگونه تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای 1 و 2 و نیز بین تیمارهای 2 و 3 می‌باشد که این میزان در تیمار 3 نسبت به



شکل 1- رابطه رگرسیون خطی بین گاز تولیدی و تجزیه پذیری ماده خشک در تیمارهای آزمایشی

Figure 1- Linear regression between gas production and dry matter degradability in experimental groups

جدول 4- اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های تخمینی مدل ارسکوف - مکدونالد، تعداد مول گازهای متان و دی اکسید کربن تولیدی، نسبت‌های مولی محاسبه شده استات، پروپیونات و بوتیرات و کل اسیدهای چرب تولیدی در 24 ساعت انکوباسیون¹

Table 4- Effect of treatments of parameters of Orskov-Mcdonald model, CH₄ and CO₂ production, VFAs molar proportion and total VFA produced in 24 h¹ incubation¹

Parameters فراسنجه	تیمارها ² Treatments ²			SEM	p-value
	1	2	3		
DM Degradation rate ³ نرخ تجزیه پذیری ماده خشک ³	0.104 ^a	0.052 ^b	0.093 ^c	6.8×10 ⁻	P<0.001
Potentially degradable DM ⁴ ماده خشک دارای پتانسیل تجزیه ⁴	0.696 ^a	0.682 ^b	0.738 ^c	4.2×10 ⁻⁴	P<0.01
Effective degradability ⁵ تجزیه پذیری موثر ⁵	0.431 ^a	0.402 ^b	0.455 ^c	6.1×10 ⁻⁴	P<0.001
CH ₄ production in 24 ^h ⁶ متان تولیدی در 24 ساعت ⁶	0.646 ^a	0.666 ^{ab}	0.690 ^b	0.004	P<0.01
Total CO ₂ ⁵ دی اکسید کربن کل ⁶	4.198 ^a	3.782 ^b	3.866 ^a	0.120	P<0.05
Fermentative CO ₂ ⁶ دی اکسید کربن ناشی از تخمیر ⁶	1.722 ^a	1.520 ^b	1.545 ^b	0.052	P<0.05
Acetate ^{7,8} نسبت مولی استات ^{8,7}	0.502 ^a	0.549 ^b	0.576 ^c	0.005	P<0.01
Propionate ^{7,8} نسبت مولی پروپیونات ^{8,7}	0.394 ^a	0.310 ^b	0.313 ^b	0.017	P<0.01
Butyrate ^{7,8} نسبت مولی بوتیرات ^{8,7}	0.104 ^a	0.140 ^a	0.111 ^a	0.022	n.s
Acetate/Propionate ⁸ نسبت مولی استات به پروپیونات ⁸	1.283 ^a	1.971 ^b	1.860 ^b	0.120	P<0.01
Total VFA ^{6,8} کل اسیدهای چرب فرار ^{6,8}	2.474 [*]	2.262 [†]	2.321 ^{†*}	0.070	P=0.08 ⁹

¹ میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05).

² تیمار 1: روغن تازه (کنترل مجازی)، تیمار 2: روغن اکسید شده و تیمار 3: روغن اکسید شده و هسته انار آسیاب شده.

³ گرم ماده خشک در ساعت، ⁴ گرم به ازاء هر گرم ماده خشک انکوبه شده، ⁵ با احتساب نرخ خروج 0/03 گرم ماده خشک در ساعت، ⁶ میلی‌مول در گرم ماده خشک در 24 ساعت انکوباسیون، ⁷ نسبت مولی، ⁸ محاسباتی، ⁹ تفاوت دو گروه با دو علامت متفاوت میل به معنی‌داری دارد.

¹ Means within same column with different superscripts differ (P<0.05).

² Treatments: 1) control (fresh oil) 2) oxidized oil and 3) oxidized oil and pomegranate seed.

³ g DM/hour, ⁴ g/g incubated DM, ⁵ passage rate assumed to be 0.03 g DM/hour, ⁶ mMol/ g incubated DM for 24^h, ⁷ Molar proportion, ⁸ Calculated. ⁹ parameters with Latin signs just trend to be different.

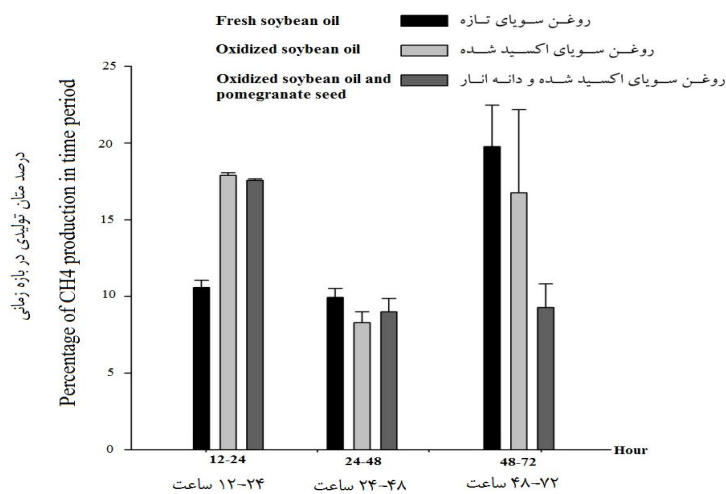
توجهی از گاز دی‌اکسید کربن تولیدی، ناشی از تخمیر بوده که رابطه‌ای مشابه با دی‌اکسید کربن کل در مورد اثر تیمارها در آن مشاهده شد (جدول 4).

تعداد مول‌های دی‌اکسید کربن ناشی از تخمیر نیز کاهش قابل توجهی در اثر اعمال تیمارهای حاوی روغن اکسید شده با و بدون هسته انار نشان داد. هرچند در تیمار 3 به لحاظ عددی تحت تأثیر آنتی‌اکسیدان، افزایش مختصری در تعداد مول‌های گاز دی‌اکسید کربن تخمیری مشاهده گردید، ولی از لحاظ آماری مورد تأیید قرار نگرفت. تعداد مول‌های اسیدهای چرب فرار کل محاسباتی بر اساس گاز تولیدی در 24 ساعت انکوباسیون نیز در اثر روغن اکسید شده کاهش یافته و در حضور آنتی‌اکسیدان گرایش افزایشی غیر معنی‌داری نشان داد (P=0/08).

این تفسیر با نتایج ارائه شده برای پروتئین میکروبی (جدول 4) و نیتروژن آمونیاکی (شکل 3) هم خوانی دارد. تولید دی‌اکسید کربن تابعی از دو پدیده تخمیر سوبسترا و بافری اسیدهای چرب فرار می‌باشد. از لحاظ تولید دی‌اکسید کربن بین تیمارهای حاوی روغن تازه و اکسید شده تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید (جدول 4) که احتمالاً نشان دهنده اثرات مضر مشتقات پراکسیداسیون اسیدهای چرب بر روند تجزیه سوبسترا و تولید اسیدهای چرب فرار است. به کار بردن هسته انار در تیمار 3 افزایش قابل توجهی را در کل تعداد مول‌های دی‌اکسید کربن تولیدی نسبت به تیمار 2 فراهم آورد که این میزان از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با تیمار 1 نداشت. این رویکرد نیز می‌تواند نشان دهنده نقش خنثی‌کنندگی ترکیبات فعال زیستی و آنتی‌اکسیدان‌های هسته انار باشد، هرچند بخش قابل

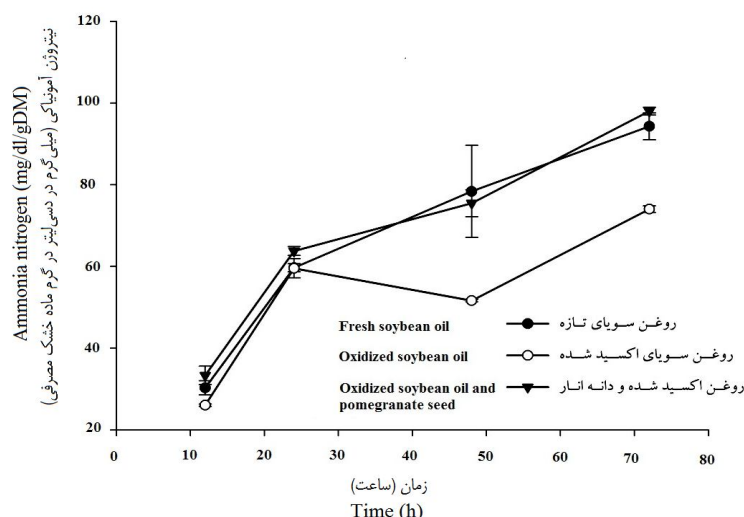
میکروارگانیزم‌های پروتئولایتیک رخ داده است. این شواهد با نتایج به دست آمده از مطالعه وازکوئر آنون و همکاران (49) بر روی تأثیر چربی اکسید شده بر قابلیت هضم پروتئین خام مطابقت دارد. طبق گزارش ماو و همکاران (27) تغذیه روغن‌ها باعث کاهش نیتروژن آمونیاکی تولیدی در شکمبه می‌شود. همچنین جوآنی (21) گزارش نموده که جمعیت پروتوزوآها که ارتباط مستقیمی با تجزیه پروتئین میکروبی دارند در اثر تغذیه چربی‌ها دچار کاهش معنی‌داری شده و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها این اثرات مضر را تعدیل می‌کند. بنابراین احتمالاً کاهش نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای حاوی روغن اکسید شده به دلیل کاهش شدید جمعیت حساس پروتوزوآ در اثر مشتقات پراکسیداسیون اسیدهای چرب و در نتیجه کاهش تجزیه پروتئین میکروبی باشد. از این رو طبیعی است که تیمار حاوی آنتی‌اکسیدان با خنثی نمودن عوامل نامساعد محیطی ناشی از روغن‌های اکسید شده باعث بهبود رشد جمعیت پروتوزوآها و افزایش نرخ تجزیه پروتئین میکروبی و به تبع آن افزایش تولید نیتروژن آمونیاکی گردد. به طور کلی اکسیداسیون روغن‌های خام گیاهی علاوه بر ایجاد ترکیبات دارای رادیکال‌های آزاد و افزایش ارزش عددی پراکسیدهای مشتق شده از اسیدهای چرب در طی تیمارهای حرارتی، منجر به ایزومریزاسیون گسترده اسیدهای چرب و ایجاد تنوع در ایزومری‌های سیس و خصوصاً ترانس می‌شود (جدول 2).

نسبت‌های مولی استات ($P < 0/01$) و پروپیونات ($P = 0/09$) در اثر استفاده از آنتی‌اکسیدان نسبت به تیمار 2 افزایش یافته در حالی که میزان مول‌های بوتیرات در تیمار 3 نسبت به تیمار 2 به طور غیر معنی‌داری کاهش یافت. همچنین در اثر اعمال تیمار روغن اکسید شده نسبت‌های مولی بوتیرات ($P = 0/2$) و استات ($P < 0/01$) افزایش و سهم پروپیونات ($P < 0/01$) کاهش پیدا کرد. این تغییرات می‌تواند تایید کننده نقش مثبت آنتی‌اکسیدان‌های هسته انار و اثرات منفی پراکسیدهای روغن اکسید شده بر تخمیر میکروبی باشد. توجه به این نکته ضروری است که فرض ناچیز بودن سایر اسیدهای چرب فرار (اسید والریک، ایزوبوتیریک و...) و نیز سایر گازهای تولیدی حاصل از انکوباسیون (هیدروژن و...) در معادلات تخمین نسبت‌های مولی اسیدهای چرب فرار به عنوان عاملی برای بیش تخمینی نتایج ارائه شده از جمله پروپیونات در تیمار 1 قابل ذکر است. بر اساس نتایج، روند تولید نیتروژن میکروبی در طی انکوباسیون تحت تأثیر معنی‌دار دو عامل زمان و تیمارهای آزمایشی قرار گرفت ($P < 0/05$). اعمال تیمار روغن‌های اکسید شده باعث کاهش معنی‌دار روند تولید نیتروژن آمونیاکی نسبت به تیمارهای 1 و 2 گردید (شکل 3). از آنجا که تولید نیتروژن آمونیاکی به شدت تحت تأثیر تجزیه پذیری پروتئین خام جیره می‌باشد، احتمالاً این کاهش تحت تأثیر نقش منفی رادیکال‌های آزاد و پراکسیدها بر تجزیه پذیری پروتئین خام توسط



شکل 2- تاثیر تیمارهای آزمایشی بر درصد متان در گاز تولیدی بازه‌های زمانی

Figure 2- Effect of treatments on percentage of methane production in time periods



شکل 3- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر تولید نیترژن آمونیاکی در طول زمان انکوباسیون
Figure 3- Effect of treatments on ammonia nitrogen (mg/dl/DM) over incubation time

اثر این ایزومریزاسیون کاملاً مشهود است. وجود ترکیباتی همچون پونیکالائین و الازیتانین (20 و 32) و نیز سایر فنول‌های ساده و پلی فنول‌های دارای نقش آنتی‌اکسیدانی در هسته انار تا حدود زیادی قادر به تأمین نیاز آنتی‌اکسیدانی و خنثی‌سازی ترکیبات مضر اسیدهای چرب اکسید شده برای کشت میکروبی است.

این امر نیاز به آنتی‌اکسیدان را جهت بهینه نمودن شرایط تخمیر میکروبی و کاستن از اتلاف پتانسیل میکروبی به سمت واکنش‌های دفاعی را افزایش می‌دهد. طبق گزارش مایا و همکاران (25) مسمومیت‌زایی اسیدهای چرب با افزایش پیوندهای دوگانه از اسید لینولئیک تا اسید ایکوزاپنتانویک دارای روند افزایشی بوده که با توجه به پروفیل اسیدهای چرب روغن اکسید شده و روغن تازه (جدول 2)

منابع

- Andrews, J., M. Vazquez-Anon, and G. Bowman. 2006. Fat stability and preservation of fatty acids with AGRADO_ antioxidant in feed ingredients used in ruminant rations. *Journal of Dairy Science*, 89(Suppl. 1):60. (Abstr.).
- AOAC, 2005, Official Methods of Analysis, 18th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- AOCS Official Method, 2003, Sampling and Analysis of Commercial Fats and Oils, Cd 8-53. Peroxide Value.
- AOCS Official Method, 2007, Sampling and Analysis of Commercial Fats and Oils, Cd 12-57. Fat Stability, Active Oxygen Method.
- Bauman, D. E., and J. M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of nutrition*, 23:203–227.
- Baumgard, L. H., B. A. Corl, D. A. Dwyer, A. Saebo, and D. E. Bauman. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278: R179–R184.
- Baumgard, L. H., J. K. Sangster, and D. E. Bauman. 2001. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). *Journal of Nutrition*, 131:1764–1769.
- Blümmel, M., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 1997. In vitro gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 77:24-34.
- Blümmel, M., R. Mgonezulu, X. B. Chen, H. P. S. Makkar, K. Becker, and E. R. Orskov. 1999. The modification of an in vitro gas production test to detect roughage related differences in in vivo microbial protein synthesis as estimated by the excretion of purine derivatives. *Journal of Agricultural Science*, 133:335–340.
- Brioukhanov, A. L., and A. I. Netrusov. 2004. Catalase and superoxide dismutase: Distribution, properties, and physiological role in cells of strict anaerobes. *Biochemistry (Mosc.)*, 69:949–962.
- Broderick, G. A., and J. H., Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, 63:64-75.
- Chaudhary L.C., N. McKain, A. J. Richardson, M. Barbier, J. Charbonnier, and R. J. Wallace. 2004. Screening for Fusocillus: factors that affect the detection of ruminal bacteria which form stearic acid from linoleic acid. *Reproduction Nutrition Development*, 44(Suppl 1): S65.

- 13- Doepel, L., H. Lapierre, and J. J. Kennelly. 2002. Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. *Journal of Dairy Science*, 85:2315–2334.
- 14- Frankel, E. N., 1980. Lipid oxidation. *Progressive Lipid Research*, 19:1-22.
- 15- Frankel, E. N. 2005. Antioxidants. pp: 209–258 in *Lipid Oxidation*. 2nd ed. E. N. Frankel. The Oily Press, Bridgwater, UK.
- 16- Getachew, G., H. P. S. Makkar and K. Becker. 1998. The in Vitro Gas Coupled with Ammonia Measurement for Evaluation of Nitrogen Degradability in Low Quality Roughages using Incubation Medium of Different Buffering Capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77:87-95.
- 17- 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. *Agricultural Science*, 139: 341-350.
- 18- Gonthier, C., A. F. Mustafa, D. R. Ouellet, P. Y. Chouinard, R. Berthiaume, and H. V. Petit. 2005. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: Effects on blood parameters and milk fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*, 88:748–756.
- 19- Grum, D. E., J. K. Drackley, R. S. Younker, D. W. LaCount, and J. J. Veenhuizen. 1996. Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 79:1850–1864.
- 20- Heber, D., N. P. Seeram, H. Wyatt, S. M. Henning, Y. Zhang, L. G. Ogden, M. Dreher, and J. O. Hill. 2007. Safety and antioxidant activity of a pomegranate ellagitannin-enriched polyphenol dietary supplement in overweight individuals with increased waist size. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:10050–10054
- 21- Jouany, J. P. 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *Journal of Nutrition*, 126, 1335–1346.
- 22- Kramer, J. K. G., V. Fellner, M. E. R. Dugan, F. D. Sauer, M. M. Mossoba, and M. P. Yurawecz. 1997. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids*, 32:1219–1228.
- 23- Kramer, J. K. G., C. Cruz-Hernandez, and J., Zhou. 2001. Conjugated linoleic acids and octadecenoic acids: Analysis by GC. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103: 594– 632.
- 24- Lenartova, V., K. Holovska, and P. Javorsky. 1998. The influence of mercury on the antioxidant enzyme activity of rumen bacteria *Streptococcus bovis* and *Selenomonas ruminantium*, *FEMS Microbiology Ecology*, 27:319–325.
- 25- Maia, M. R., L. C. Chaudhary, L. Figueres, R. J. Wallace. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91: 303-314.
- 26- Makkar, H.P.S., 2004. Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. In: *Assessing Quality and Safety of Animal Feeds*. FAO Animal Production and Health Series 160. FAO, Rome, pp. 55–88.
- 27- Mao H., J. Wang, Y. Zhou and J. Liu. 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science* 129:56–62.
- 28- Mauricio, R. M., F. L. Moulda, E. Owena, K. S. Channaa, and M. K. Theodorou. 1999. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology*, 79: 321-330.
- 29- Moon, C. D., D. M. Pacheco, W. J. Kelly, S. C. Leahy, D. Li, J. Kopecny, and G. T. Attwood. 2008. Reclassification of *Clostridium proteoclasticum* as *Butyrivibrio proteoclasticus* comb. nov., a butyrate-producing ruminal bacterium. *Int. Journal of Systematic Evolution of Microbiology*, 58:2041–2045.
- 30- Orskov, E.R., McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *Journal of agricultural science*, 92, 499–503.
- 31- Overton, T. R., and M. R. Waldron. 2004. Nutritional Management of Transition Dairy Cows: Strategies to Optimize Metabolic Health. *Journal of Dairy Science*, 87: (E. Suppl.):E105–E119.
- 32- Pantuck, A. J., J. T. Leppert, N. Zomorodian, A. William, J. Hong, R. J. Barnard, N. Seeram, H. Liker, H. Wang, R. Elashoff, D. Heber, M. Aviram, L. Ignarro, and A. Belldegrun. 2006. Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 12:4018–4026.
- 33- Pratt, E., and V. Hudson. 1999. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica Granatum L.*) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* 15: 567-575.
- 34- Privé F., S. Combes, L. Cauquil, Y. Farizon, F. Enjalbert, and A. Troegeler-Meynadier. 2010. Temperature and duration of heating of sunflower oil affect ruminal biohydrogenation of linoleic acid in vitro. *Journal of Dairy Science*, 93:711-722.
- 35- Rajabian, T., H. Fallah-husseini, M. Karami, A. Rasooli, and T. Faghihzadeh. 2008. Effect of Pomegranate Fruit Juice and Seed Oil on Serum Lipid Levels and Atherosclerosis Development in Hypercholesterolemic Rabbits. *Journal of Medicinal Plants*, 25: 93-104 (In Persian).
- 36- Rajaii, A. 2005. Comparing method of super critical fluid whit method of soxhelt in extracting of tea oil and comparing the effect of antioxidation properties of tea oil whit sesame oil. A thesis of Master of Science in food science and technology, Tarbiat Modares University, agriculture faculty, 90pp.
- 37- Reddy, P. V., J. L. Morrill, and T. G. Nagaraja. 1994. Release of free fatty acids from raw or processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. *Journal of Dairy Science*, 77:3410–3416.
- 38- SAS. 2009. SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.2. SAS Institute, Cary, N.C. USA.
- 39- Sadeghi, N., B. Jannat, M. R. Oveisi, M. Hajimahmoodi, and M. Photovat. 2009. Antioxidant Activity of Iranian

- Pomegranate (*Punica Granatum L.*) Seed Extracts. Journal of agricultural science and technology, 11: 633-638.
- 40- Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38:995-1014.
- 41- Schofield, P., R. E. Pitt, and A. N. Pell. 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. Journal of Animal Science, 72:2980-2991.
- 42- Schubert, S., Lansky, E., and Neeman, I., 1999, Antioxidant and eicosanoid enzyme in habitation properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids, Journal of Ethnopharmacology, 66: 11-17.
- 43- Seeram, N. P., Y. Zhang, J. D. Reed, C. G. Krueger, and J. Vaya. 2006. Pomegranate phytochemicals. Pages 3-29 in Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine. N. P. Seeram, R. N. Schulman, and D. Heber, ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, BocaRaton, FL.
- 44- Shingfield, K. J., S. Ahvenjarvi, V. Toivonen, A. Vanhatalo, P. Huhtanen, and J. M. Griinari. 2008. Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. British Journal of Nutrition, 99:971-983.
- 45- Smith, J. L., L. G. Sheffield, and D. Saylor. 2002. Impact of ethoxyquin on productivity of dairy cattle. Journal of Dairy Science, 85(Suppl. 1):358. (Abstr.)
- 46- Spiteller, P., W. Kern, J. Reiner, and G. Spiteller. 2001. Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. Biochemistry and Biophysics Acta, 1531:188-208.
- 47- SRNS. 2012. Small Ruminant Nutrition System, ver 1.9.4468. official website: <http://nutritionmodels.tamu.edu/srns.html>.
- 48- Troegeler-Meynadier, A., M. C. Nicot, and F. Enjalbert. 2006. Effects of heating process of soybeans on ruminal production of conjugated linoleic acids and trans-octadecenoic acids in situ. Revue de Médecine Vétérinaire (Toulouse), 157:509-514.
- 49- Va'zquez-An'ón, M., J. Andrews, T. Webster, and T. Jenkins. 2006. Effects of feeding oxidised fat supplemented with antioxidant AGRADO on rumen nutrient digestibility and protein synthesis. Journal of Dairy Science, 89(Suppl. 1):406.
- 50- Va'zquez-An'ón, M., and T. Jenkins. 2007. Effects of feeding oxidized fat with or without dietary antioxidants on nutrient digestibility, microbial nitrogen, and fatty acid metabolism. Journal of Dairy Science, 90:4361-4367.
- 51- Wanasundara, U.N., and F. Shahidi. 1998. Antioxidant and prooxidant activity of green tea extract in marine oils. Journal of Food Chemistry, 63: 335-342.
- 52- Wolin, M. J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. Journal of Dairy Science, 43:1452-1459.