نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۳ شماره ۲/ سال۱۳۹۲

اثر محافظت روغن‌ماهی بر متابولیسم شکمبه‌ای اسیدهای چرب، قابلیت هضم مواد مغذی و فراسنجه‌های شکمبه‌ای در محیط برون‌تنی

حامد خلیل وندی بهروزیار[۱]، مهدی دهقان بنادکی[۲*]، محمد غفارزاده[۳]، کامران رضا یزدی[۲] و فاطمه غازیانی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲٤

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
[۲] دانشیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
[۳] پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران
[٤] استادیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
[*] مسئول مکاتبه: Email: dehghanb@can.ut.ac.ir

چکیده

در این‌مطالعه متابولیسم شکمبه‌ای اسیدهای چرب غیراشباع روغن ماهی و تأثیر محافظت آن بر روند تولید و تجمع محصولات نهایی و واسطه بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع زنجیربلند در شرایط برون‌تنی و در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. بعلاوه اثر افزودن انواع مختلف مکمل‌های روغن ماهی بر جمعیت پروتوزوآی مژک‌دار، فراسنجه‌های شکمبه‌ای و قابلیت هضم مواد مغذی در قالب طرح کاملا تصادفی مطالعه شد. میزان بیوهیدروژناسیون ظاهری اسیدهای چرب غیراشباع دارای اختلاف بسیار زیادی با مقادیر افزایش اسیدهای چرب اشباع متناظر با تعداد کربن برابر بود، که نشان‌گر ناکامل بودن فرایند بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب روغن ماهی است. انواع اسیدهای چرب ۱۸، ۲۰ و ۲۲ کربنه به عنوان اسیدهای چرب واسطه بیوهیدروژناسیون شناسایی و سهم هرکدام در بیوهیدروژناسیون ظاهری محاسبه شد. سیستم‌های مختلف محافظتی علاوه بر اثرگذاری بر میزان بیوهیدروژناسیون، کم‌وبیش روند بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب مختلف را تحت‌تأثیر قرار دادند. روغن‌ماهی محافظت نشده و اسیدهای چرب محافظت نشده، بیشترین تأثیر را بر جمعیت پروتوزوآ، غلظت نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار داشتند. محافظت روغن‌ماهی سبب افزایش تولید اسیدهای چرب فرار و افزایش نسبت مولی استات و افزایش قابلیت هضم دیواره‌سلولی شد. با این‌حال روش‌های مختلف محافظتی دارای اثرات متفاوتی در این زمینه بودند. انجام مطالعات بیشتر در زمینه تأثیر کپسوله‌کردن اسیدهای چرب بر روند بیوهیدروژناسیون و انجام آزمایشات درون‌تنی ضروری به‌نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: بیوهیدروژناسیون، پروتوزوآ، اسیدهای‌چرب فرار، قابلیت هضم

Effects of fish oil protection on ruminal metabolism of fatty acids, in vitro digestibility and ruminal parameters

H Khalilvandi-behrozyar[1], M Dehghan-banadaky[2*], M Ghafarzadeh[3], K Rezayazdi[2] and F Ghaziani[4]

Received: October 09, 2012 Accepted: February 12, 2013

[1] PhD student, Department of animal science, College of agriculture and natural resources, University of Tehran
[2] Associate Professor, Department of animal science, College of agriculture and natural resources, University of Tehran
[3] Assistant Professor, Chemistry and chemical engineering institute of Iran
[4]Assistant Professor, Department of animal science, College of agriculture and natural resources, University of Tehran
[*]Corresponding author: Email: dehghanb@can.ut.ac.ir

Abstract
A set of in vitro experiments conducted to determine ruminal metabolism of fish oil fatty acids (Complete randomized block design), effects of fish oil on protozoa population, rumen parameters and nutrient digestibility (Complete randomized design). Also the effects of oil protection methods on these parameters were addressed. Extent of apparent fatty acid biohydrogenation was too far from accumulation of corresponding saturated fatty acids, which indicated incomplete biohydrogenation of fish oil fatty acids. Different biohydrogenation intermediates of 18, 20 and 22 carbon length was detected in incubation vessels and their contribution on apparent biohydrogenation was calculated. Protection of fish oil affected extent of ruminal fatty acid biohydrogenation and also production and accumulation of biohydrogenation intermediates. Unprotected oil and fatty acids had major effects on protozoa counts, VFA and ammonia nitrogen concentrations. Protection methods were resulted in increased concentration of VFA and cell wall digestibility and molar proportions of acetate. However, different protection methods with different oil concentration had different effects. Further experiments to fully describe effects of oil microencapsulation on biohydrogenation and also in vivo experiments are warranted.

Keywords: Biohydrogenation, Protozoa, VFA, Digestibility

مقدمه

چربی‌ها یکی از اجزای جیره‌های غذایی نشخوارکنندگان هستند که با اهداف مختلف ازجمله تأمین اسیدهای‌چرب بمنظور تأثیر بر متابولیسم دام و یا تغییر پروفیل اسیدهای چرب محصولات مورد استفاده قرار می‌گیرند. روغن‌ماهی به‌لحاظ دارا بودن اسیدهای چرب امگا-۳ بلند زنجیر (ایکوزاپنتاانوئیک اسید و دکوزاهگزاانوئیک اسید)، اهمیت توجه زیادی را در مطالعات تغذیه‌ای به خود اختصاص داده که نتایج موید اهمیت اسیدهای-چرب روغن ماهی در سلامت و کارایی مناسب تولیدی و تولید مثلی دام است. با این‌حال، تلاش‌ها درجهت افزایش غلظت این اسیدهای چرب در محصولات تولیدی به‌لحاظ بیوهیدروژناسیون گسترده در شکمبه، موفقیت چندانی بدست نیاورده است.

گزارشاتی مبنی بر تحت تأثیر قرارگرفتن متابولیسم شکمبه‌ای اسیدهای چرب در اثر افزودن روغن‌ماهی به جیره غذایی وجود دارد. افزایش تجمع اسیدهای چرب ترانس، افزایش غلظت اسیدهای چرب مزدوج و مهار مراحل نهایی بیوهیدروژناسیون از این‌جمله است (لی و

همکاران ۲۰۰۵ و ۲۰۰۸، ماسوسکا و همکاران ۲۰۰۶). روند بیوهیدروژناسیون شکمبه‌ای اسیدهای‌چرب ۱۸ کربنه بصورت وسیعی در دهه‌های گذشته مورد مطالعه قرار گرفته است ولی اطلاعات بسیار اندکی در زمینه بیوهیدروژناسیون، عوامل موثر بر آن و محصولات نهایی و واسطه بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب روغن‌ماهی دردسترس است. بعلاوه هیچ گزارشی مبنی بر چگونگی اثر محافظت اسیدهای چرب بر این روند وجود ندارد. به‌نظر می‌رسد عواملی که قادر به تحت تأثیر قرار دادن سرعت و میزان دسترسی میکروارگانیسم‌ها به اسیدهای چرب باشند، بتوانند بر بیوهیدروژناسیون و محصولات نهایی و واسط آن تأثیرگذار باشند. استفاده از تکنیک‌های جدید همانند میکروکپسوله کردن اسیدهای چرب در دهه گذشته به عنوان یک روش موثر در محافظت اسیدهای چرب غیراشباع در برابر اکسیداسیون و نیز کاهش بو و طعم نامطلوب، مورد استفاده محققین صنایع غذایی قرار گرفته است (شهیدی و هان، ۱۹۹۳). با این‌حال اغلب گزارش‌ها در این زمینه محدود به خصوصیات فیزیکی محصولات تولیدی بوده و هیچ گزارشی در ارتباط با ارزش تغذیه‌ای میکروکپسول‌های روغنی بخصوص در زمینه تغذیه دام وجود ندارد. در فرایند میکروکپسوله کردن، روغن یا سایر مواد نیازمند محافظت با استفاده از تکنیک‌های خاصی درمیان مواد پوشاننده با خصوصیات مختلف احاطه می‌شوند. بنابراین می‌توان گفت این مواد علاوه بر تأمین ماده اصلی (کپسوله شده)، می‌توانند با در اختیار قرار دادن مواد دیواره‌ای، بخشی از موادمغذی موردنیاز دام را تأمین نمایند. بعلاوه خصوصیات و میزان قابل استفاده بودن موادمحافظت شده نیز تابعی از خصوصیات مواد پوشاننده خواهد بود. در این میان مکمل‌های میکروکپسوله، باتوجه به فراهم آوردن منابع قابل تخمیر در قالب مواد دیواره‌ای (پوشاننده) میکروکپسول در کنار تأمین اسیدهای چرب، می‌توانند با تأثیر بر pH و میکروارگانیسم‌های فعال در شکمبه، بر روند بیوهیدروژناسیون و تولید انواع محصولات واسط و نهایی بیوهیدروژناسیون تأثیرگذار باشند. تعیین اثر این مکمل‌ها بر فرایند هضم دیواره‌سلولی و تولید اسیدهای چرب فرار، نیز می‌تواند توان بالقوه آنها به‌عنوان نسل جدید مکمل‌های چربی را ارزیابی نماید.

هدف اصلی این تحقیق تعیین اثر میکروکپسوله کردن روغن‌ماهی با مواد دیواره‌ای تهیه شده از مالتودکسترین و کازئین با روش های مختلف (فرآوری شده برای تحریک تولید محصولات واکنش میلارد [Maillard Reaction Products] و یا بدون فرآوری حرارتی)بر متابولیسم شکمبه‌ای اسیدهای چرب، جمعیت پروتوزوآ، قابلیت هضم دیواره سلولی و میزان و پروفیل اسیدهای چرب فرار تولیدی در شرایط برون تنی و مقایسه نتایج با نمک‌های کلسیمی، روغن و اسیدهای چرب محافظت نشده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش بصورت مشترک در بخش تغذیه گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران انجام شده است. کلیه حیوانات مورد استفاده در این آزمایش بر اساس راهنمای نگهداری و استفاده از حیوانات مزرعه ای در تحقیقات علوم دامی FASS (۲۰۱۰) نگهداری شده‌اند. اسیدهای چرب آزاد با روش گانگا و همکاران (۱۹۹۸) از روغن‌ماهی تهیه شد. بدین منظور روغن ماهی مورد استفاده با استفاده از محلول هیدروکسید پتاسیم متانولی (۷ نرمال، ۷۰ درصد) با EDTA ۵ میلی مولار، تحت گاز آرگون به مدت ۲ ساعت، در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد با استفاده از همزن مغناطیسی حرارت داده شد. پس از سرد شدن محلول صابونی شده تا دمای اتاق، اسیدهای چرب آزاد با استفاده از اسید کلریدریک ۱۲ نرمال از حالت صابونی خارج شده و با استفاده از هگزان از محلول

جدا شد. بمنظور آبگیری از فاز آلی از سولفات سدیم بدون آب استفاده شد. پس از این مرحله فاز آلی جدا شده بوسیله‌ی دستگاه روتاری در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد تحت تبخیر قرار گرفت و اسیدهای چرب از هگزان جدا شده و تحت گاز آرگون تا استفاده در مراحل بعدی آزمایش در دمای ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

میکروکپسوله کردن روغن ماهی

کازئین (٨٣ درصد پرتئین‌خام، محصول شرکت کازئینات ایران) پودر گلوکز و مالتودکسترین (محصول شرکت دکستروز ایران) به نسبت مساوی به عنوان مواد پوشاننده مورد استفاده قرار گرفته و هموژن شدند. بمنظور تحریک آغاز واکنش میلارد، pHمخلوط با استفاده از هیدروکسید سدیم ١ مولار در ٧/٥pH تنظیم شده و مخلوط حاصله به مدت ٣٠ دقیقه در دمای ٨٩ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (کساراجو و همکاران ٢٠٠٩). روغن ماهی با نسبت های ١:٢، ١:١ و ٢:١ (مواد پوشاننده به روغن) به امولسیون افزوده شده و مجددا مراحل هم‌زدن و هموژن‌کردن تکرار شد. در نهایت میزان ماده خشک امولسیون ها بوسیله افزودن آب دیونیزه به ٣٠ درصد کل تصحیح شد. شرایط تهیه امولسیون ها و مراحل خشک کردن و نگهداری میکروکپسول‌های تولیدی بر اساس (چامپاگن و فوستیر، ٢٠٠٧؛ فانگ و همکاران، ٢٠٠٣، کوساراجو و همکاران، ٢٠٠٩؛ گارسالوی و همکاران، ٢٠٠٧) و با اندکی تغییرات انجام شد. جهت خشک کردن امولسیون-ها از دستگاه BUCHI Mini Spray DryerB-270 با دمای هوای ورودی ١٣٠ درجه سانتی گراد و دمای خروجی ٧٠-٦٠ درجه سانتیگراد استفاده شد. امولسیون ها در طول زمان خشک شدن هم زده شدند. محصولات جمع شده در محفظه نگهداری محصول، توزین و تحت گاز آرگون بسته بندی شده و تا آزمایشات بعدی در دمای ٢٠- درجه نگهداری شدند . در نهایت ٦ نوع میکروکپسول با استفاده از سه نسبت مختلف روغن به مواد پوشاننده تولید شد. در این میان نیمی از میکروکپسول ها با استفاده از مواد پوشاننده‌ی میلارد (حرارت داده شده) و نیمی دیگر با استفاده از مواد پوشاننده غیرمیلارد (بدون فرآوری حرارتی) بودند. مشخصات و ترکیب مواد تشکیل دهنده انواع امولسیون های مورد استفاده در تولید میکروکپسول ها در جدول شماره یک آورده شده است.

جدول ١- ترکیب امولسیون های مورد استفاده در تولید انواع میکروکپسول ها

	آب (%)	پروتئین(%)	کربوهیدرات(%)	روغن(%)
میکروکپسول ١	٧٠	٦/٣	١٣/٧	١٠
میکروکپسول ٢	٧٠	٥	١٠	١٥
میکروکپسول ٣	٧٠	٣/٤	٦/٦	٢٠
میکروکپسول ٤	٧٠	٦/٣	١٣/٧	١٠
میکروکپسول ٥	٧٠	٥	١٠	١٥
میکروکپسول ٦	٧٠	٣/٤	٦/٦	٢٠

میکروکپسول‌های ٣-١ با استفاده از محصولات واکنش میلارد و ٦-٤ بصورت عادی با مخلوط کردن مواد کربوهیدراتی و پروتئینی تولید شدند. در هر کدام از گروه‌های مورد نظر نسبت روغن به مواد پوشاننده به ترتیب برابر با ١:٢، ١:١ و ٢:١ بوده است.

تولید نمک‌های کلسیمی

نمک های کلسیمی بر اساس روش درحال ثبت در اداره مالکیت فکری جمهوری اسلامی ایران بنام مولفین و با استفاده از روش های تغییر داده شده‌ی (استرومایر و همکاران، ۲۰۰۱؛ چالوپا و همکاران، ۱۹۹۱؛ وینسی و همکاران، ۱۹۹۵) ساخته شد. بطور خلاصه ابتدا در یک بالن ۳ دهانه مجهز به هم زن مکانیکی روغن‌ماهی اضافه شده و تا دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس به میزان موردنیاز (نسبت مولی) یک نبع کلسیمی مانند پودر کلسیم اکسید یا کلسیم هیدروکسید به آن اضافه شده و واکنش در محیط خنثی ادامه یافت. پس از اتمام واکنش محتویات بالن تا دمای اتاق تحت آرگون خنک شده و در نهایت به وسیله آسیاب به اندازه‌های ۲-۱ میلی‌متر آسیاب شد.

ارزیابی محصولات تولیدی

نحوه ارزیابی مکمل‌های تولیدی و نتایج آن بصورت کامل در مقاله‌ی جداگانه‌ای ارایه شده است. بمنظور ارایه اطلاعات مورد نیاز در تحلیل نتایج این مقاله، میزان کارایی کپسوله‌شدن و پروفیل اسیدهای چرب در مکمل‌ها ارایه شده است.

تعیین میزان بیوهیدروژناسیون و متابولیسم شکمبه‌ای اسیدهای چرب

مایع شکمبه از ۳ رأس گاو هلشتاین چندبار زایش کرده غیر شیرده مجهز به فیستولای شکمبه‌ای با میانگین وزنی ۲۰ ± ٦٨٠ کیلوگرم تهیه شد. خوراک حیوانات مورد آزمایش با نسبت علوفه به کنسانتره ی برابر با ٦٠:٤٠ (*CNCPS V5*)، به میزان ١٠ درصد بالاتر از سطح نگهداری در ۲ وعده برابر در ساعات ۸ صبح و ١٦ عصر به حیوانات داده شد (جدول ۲). پانزده روز به عنوان دوره عادت‌دهی در نظر گرفته شد. مایع شکمبه قبل از خوراکدهی صبح با استفاده از پمپ خلأ گرفته شده و به نسبت مساوی باهم مخلوط و در فلاسک های با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد ریخته شد. پس از انتقال به آزمایشگاه، مایع شکمبه بمنظور جداشدن باکتری‌های متصل به الیاف و اطمینان از حضور تمامی میکروارگانیسم های شکمبه در محیط کشت، ابتدا با استفاده از مخلوط کن به‌مدت ۲ دقیقه مخلوط و سپس با استفاده از پارچه توری ٤ لایه صاف و در حمام آبی با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد ، تحت جریان پیوسته CO_2 با حجم برابر از بافر مک دوگال (مک‌دوگال ١٩٤٨) مخلوط شد.

جدول ۲- ترکیب جیره غذایی حیوانات فیستولادار مورد استفاده جهت تهیه مایع شکمبه (گرم بر کیلوگرم ماده خشک)

ماده خوراکی	مقدار	ماده خوراکی	مقدار
یونجه خشک	٢١٧/٨	سبوس گندم	٤٥/٣
ذرت سیلو شده	٢٤٩/٩	سبوس برنج	٢٩/٥
کاه گندم	٨٧/٣	سدیم بیکربنات	٣/٢
تفاله چغندر	٢٨/٤	کلسیم کربنات	٤/٩
دانه جو	٩٩/٨	دی‌کلسیم فسفات	٠/٨
دانه ذرت	٢٨/٤	مکمل مواد معدنی-ویتامینی*	٣/٩
دانه گندم	٤٨/٨	نمک سفید	١/٦
کنجاله کلزا	٦٩/٢		
کنجاله سویا	٣٦/٣		

*هر کیلوگرم مکمل شامل: ٥٠٠٠٠٠IU ویتامین A، ١٠٠٠٠٠ IU ویتامین D3، mg ١٠٠ویتامین E، mg ١٩٠٠٠٠ Ca، mg ٩٠٠٠٠ P، mg ٥٠٠٠٠ Na، mg ١٩٠٠٠ Mg، mg ٣٠٠٠ Fe، mg ٣٠٠ Cu، mg ٢٠٠٠ Mn، mg ٣٠٠٠ Zn، mg ١٠٠ Co، mg ١٠٠ I، mg ١ Se و mg ٣٠٠٠ آنتی‌اکسیدان (B.H.T)

انکوباسیون منابع مختلف روغن ماهی با مایع شکمبه بر اساس روش ون نول و دمایر (١٩٩٦) و با اندکی تغییرات صورت گرفت. به منظور از بین بردن تأثیر روز و زمان انکوباسیون و تأثیر زمان بر کیفیت مایع شکمبه حیوانات، انکوباسیون در دو دوره (دوروز متفاوت) انجام شده و در هر دوره ٦ فلاسک (با ظرفیت ١٠٠ میلی لیتر) برای هر کدام از مکمل ها اختصاص یافت. به علاوه در هر دوره انکوباسیون، شش فلاسک حاوی مخلوط مایع شکمبه و بافر، مکمل‌های خوراکی و فاقد مکمل چربی به عنوان بلانک درنظر گرفته شد. مقدار ٣٥ میلی‌گرم روغن از هرکدام از مکمل‌ها، ٥٠٠ میلی گرم خوراک کامل (مشابه با خوراک تغذیه شده) آسیاب شده با الک ١ میلی متری (*Wiley Mill*) به عنوان سوسبسترای انرژی برای میکروارگانیسم‌ها و منبع

الیاف جهت اطمینان از مناسب بودن محیط برای بیوهیدروژناسیون و ۱۰ میلی گرم کربنات هیدروژن آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن برای میکروارگانیسم های شکمبه در داخل هر فلاسک ریخته شد (ابوغزاله و جنکینز ۲۰۰٤). درنهایت ۵۰ میلی لیتر از مخلوط مایع شکمبه و بافر تحت جریان مداوم دی‌اکسید کربن در داخل هر کدام از فلاسک‌ها ریخته شده و درب فلاسک‌ها پلمپ شد. انکوباسیون به مدت ٤۸ ساعت در حمام آبی شیکردار در دمای C ۳۹ انجام شد. pH فلاسک‌ها قبل از شروع انکوباسیون و پس از اتمام آن با استفاده از دستگاه pH متر ۸۲۷ Metrohm اندازه‌گیری شده و درنهایت یک میلی لیتر اسیدسولفوریک ۱۰ نرمال به منظور خاتمه فرایند های میکروبی به هر فلاسک اضافه شد. استخراج چربی از مایع شکمبه با روش فولچ و همکاران (۱۹۵۷) انجام شد. متیل استر اسیدهای چرب بر اساس روش ایچارا و فوکوبایاشی (۲۰۱۰) و با استفاده از اسید کلریدریک متانولی (*HCl/MeOH*) ساخته شد. هپتادکانوئیک اسید به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد چربی استخراج شده از دو فلاسک با هم مخلوط شده و در مجموع ۳ نمونه از هر دوره به ازای هر مکمل و هر ساعت انکوباسیون برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

پروفیل اسیدهای چرب با کروماتوگرافی‌گازی *Varian CP-3800* با شناساگر FID و ستون CP-Sil88 (100m × 250μm × 0.2μm، Chrompack, Middelburg, The Netherlands) تعیین شد. پیک های هر اسیدچرب با توجه به مخلوط استاندارد اسیدهای چرب (GLC 463 reference mixture, http://www.nu-chekprep.com) شناسایی و از نیتروژن به عنوان گاز حامل استفاده شد. دمای محل تزریق و شناساگر C ۲۵۰، مقدار تزریق ۱ میکرولیتر و *Split ratio* برابر با ۱:۵۰ انتخاب شد. از غلظت استاندارد داخلی برای محاسبه غلظت متیل استر اسیدهای چرب مختلف استفاده شد (لی و همکاران ۲۰۰۵). برنامه‌دمایی ستون بر اساس روش ارایه شده لی و همکاران (۲۰۰۵) انتخاب شد.

تعیین میزان قابلیت هضم دیواره سلولی و فراسنجه‌های شکمبه‌ای

علاوه بر فلاسک‌های بیوهیدروژناسیون، ۳ فلاسک به ازای هر مکمل در هر دوره بمنظور تعیین قابلیت هضم موادمغذی و ۳ فلاسک برای تعیین فراسنجه‌های شکمبه‌ای اختصاص یافت. مشخصات مایع شکمبه مورد استفاده و نحوه و مقدار افزودن مکمل‌ها کاملا مشابه با موارد فوق‌الذکر بود. انکوباسیون فلاسک‌ها همزمان با فلاسک‌های مربوط به بیوهیدروژناسیون و بمدت ٤۸ساعت در آون دارای با دمای C ۳۹ انجام و فلاسک‌ها بطور مرتب هر ۱ ساعت هم‌زده شده و پس از اتمام زمان انکوباسیون در یخ قرار گرفتند. در تعیین قابلیت هضم مواد داخل فلاسک‌ها با استفاده از کاغذصافی واتمن ٤۱ بدون خاکستر جدا شده و به‌مدت ٤۸ ساعت در آون ٦۰ درجه سانتی‌گراد برای تعیین میزان ماده خشک قرار گرفت. ماده آلی، NDF و ADF (ون سوست و همکاران ۱۹۹۱، ANKOM technologies)، تعیین و بر اساس مقادیر موجود در فلاسک‌های بلانک تصحیح شد. محتویات سایر فلاسک با استفاده از توری- ٤ لایه صاف شده و ۳ نمونه *ml* ۱ از هرفلاسک بمنظور شمارش پروتوزوآ برداشته شد. سپس اسید سولفوریک ۵۰درصد (نسبت ۱ به ۵۰ به مایع شکمبه) با مایع شکمبه مخلوط و بمدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و در دمای ۲۰- درجه سانتی- گراد نگهداری شد. برای اندازه‌گیری اسیدهای چرب‌فرار از کروماتوگرافی گازی با ستون شیشه ای (۱/٦۵متر× ٤/٦ میلی متر) به روش اتنستین و باتلر (۱۹۷۱) استفاده شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی با روش تغییر یافته برودریک و کانگ (۱۹۸۰) تعیین شد. محلول استاندارد با استفاده از محلول ۱۰۰*mM* آمونیاک (۰/٦٦۰۷ گرم سولفات‌آمونیوم در *ml* ۱۰۰اسیدکلریدریک*N* ۰/۱) تهیه و جذب نوری در طول موج*nm* ٦۳۰ قرائت شد. بمنظور

شمارش تعداد پروتوزوآ در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه از روش تغییر یافته ویرا و همکاران (۱۹۸۳)، بدون رنگ-آمیزی و با استفاده از لام هماتوسیتومتر استفاده شد. برای ثابت کردن تک یاخته ها از محلول ثابت کننده فرمالدئید ۵۰ درصد در محلول کلرور سدیم ۰/۹ درصد استفاده گردید. برای تسهیل در امر شمارش، مایع شکمبه به میزان ۱:۱ برابر رقیق شده و یک قطره از آن روی لام ریخته و با بزرگنمایی ۱۰ برابر شمارش شد.

روش های آماری

طرح آماری مورد استفاده در تعیین میزان و روند بیوهیدروژناسیون طرح بلوک‌های کامل تصادفی بود (مدل شماره ۱؛ در این مدل T_i به عنوان اثر تیمار *[نوع مکمل]* و D_j به عنوان اثر بلوک *[روزهای مختلف انجام آزمون بیوهیدروژناسیون]* است). روزهای مختلف انجام آزمون بیوهیدروژناسیون به عنوان بلوک مورد آزمون قرار گرفتند. طرح کاملا تصادفی (مدل شماره ۲؛ در این مدل T_i به عنوان اثر تیمار *[نوع مکمل]* است) در ارزیابی اثرات منابع مختلف روغن بر قابلیت هضم دیواره‌سلولی، فراسنجه‌های شکمبه‌ای و ارزیابی محصولات تولیدی استفاده شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری SAS 9.1 (۲۰۰۲) و رویه مدل خطی تعمیم یافته (GLM) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن با سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد.

مدل شماره ۱ : $Y_{ij}= \mu + T_i+ D_j + e_{ij}$

مدل شماره ۲: $Y_{ij}= \mu + T_i + e_j$

نتایج و بحث

کیفیت محصولات تولیدی و پروفیل اسیدهای چرب

جدول ۳ نشان‌دهنده عملکرد سیستم‌های محافظتی در مقدار روغن و کارایی کپسوله‌شدن می‌باشد. کارایی کپسوله شدن بطور معنی داری تحت تأثیر نسبت روغن به مواد پوشاننده و نوع مواد دیواره‌ای قرار گرفت. جدول ٤ نشان دهنده پروفیل اسیدهای چرب مکمل است. برخی از تیمارها سبب کاهش اسیدهای‌چرب غیراشباع شدند. بیشترین تأثیر مربوط به مواد پوشاننده غیرمیلارد بوده و این روند با افزایش نسبت روغن و در نتیجه افزایش روغن سطحی تشدید می-شود. بنابراین انتخاب سطح بهینه روغن در استفاده از این روش ضروری است. عملکرد مناسب‌تر سیستم های پوشاننده میلارد را می توان به عملکرد بهتر آن در کارایی کپسوله شدن و اثرات آنتی‌اکسیدانی محصولات میلارد و در نتیجه کاهش اکسیداسیون در حین انجام فرایند خشک کردن نسبت داد. موارد فوق بطور کامل در مقاله مستقلی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. این داده ها با هدف استفاده در تحلیل نتایج ارایه شده است

میزان بیوهیدروژناسیون و محصولات واسط و نهایی آن

جداول شماره ٥ و ٦ به ترتیب نشان‌دهنده‌ی میزان اسیدهای چرب و میانگین بیوهیدروژناسیون ظاهری با گذشت ٤٨ ساعت از انکوباسیون می‌باشند. روش‌های محافظتی سبب کاهش معنی‌دار بیوهیدروژناسیون نسبت به منابع محافظت نشده شده و تفاوت هایی بین انواع پوشش‌های دیواره‌ای وجود داشت. بیشترین میزان محافظت مربوط به پوشش‌های میلارد بود و افزایش نسبت روغن به مواد پوشاننده سبب افزایش بیوهیدروژناسیون شد که در مواد غیرمیلارد بیشتر بود. افزایش بیوهیدروژناسیون با افزایش میزان روغن را می توان با کاهش کارایی کپسوله‌شدن و افزایش دسترسی میکروبی به روغن توجیه کرد. بخشی ازمقاومت بالاتر مکمل‌های میلارد به دلیل کارایی بالاتر کپسوله شدن و اصلی‌ترین عامل آن را می‌توان کاهش توان تجزیه میکروارگانیسم‌های شکمبه در برابر پیوندهای میلارد دانست (نواک و وایلگالا ۲۰۰۵، مک-نیون و همکاران ۲۰۰۲).

جدول ۳- میزان روغن (گرم/۱۰۰ گرم)و کارایی کپسوله شدن (درصد) میکروکپسول ها در سیستم‌های مختلف تولید

	نمک کلسیمی	میکروکپسول ۱	میکروکپسول ۲	میکروکپسول ۳	میکروکپسول ٤	میکروکپسول ٥	میکروکپسول ٦	S.E.M
روغن	۸۷/۳٥^{a}	۳۲/٤۷^{d}	٥۱/٥۳^{c}	٦٦/٤٥^{b}	۳۲/۱٥^{d}	٥۲/۰۱^{c}	٦۸/٦٤^{b}	۱/۰۱۲
کارایی کپسوله شدن		۹۸/۰۱^{a}	۹۹/۰٥^{a}	٦۲/٤۸^{c}	۸۹/٤٥^{b}	٥٤/٦٦^{d}	٤۲/۲٥^{e}	۰/۳۹۱

میانگین های دارای حروف متفاوت در هر ردیف دارای تفاوت آماری در سطح آماری ٥ درصد می باشند.

جدول ۴- ترکیب اسیدهای چرب (g/100 g) موجود در روغن ماهی قبل و پس از انجام واکنش های فرآوری مختلف

	روغن ماهی	اسیدچرب	نمک کلسیمی	میکروکپسول ۱	میکروکپسول ۲	میکروکپسول ۳	میکروکپسول ٤	میکروکپسول ٥	میکروکپسول ٦	S.E.M
12:0	۰/۱۳۰	۰/۱۳۱	۰/۱۲۹	۰/۱۳۰	۰/۱۲٦	۰/۱۳٥	۰/۱۳۱	۰/۱٤۷	۰/۱٥٤	۰/۰۰۳۸
14:0	۱/۱۲٦	۱/۱۳٥	۱/۱۱۷	۱/۱۲۹	۱/۰۹٤	۱/۱۷۲	۱/۱۳٦	۱/۲۷٦	۱/۲٤۱	۰/۰۳٤
15:0	۲/۱۲۲	۲/۱۳۹	۲/۱۰٦	۲/۱۲۹	۲/٥٦۲	۲/۲۰۹	۲/۱٤۱	۲/٤۰٦	۲/٥۲۹	۰/٦٤۰
16:0	۳/۱۱۹^{b}	۳/۱٤٤^{b}	۳/۰۹٤^{b}	۳/۱۲۸^{b}	۳/۱۹۰^{b}	۳/۸٤٦^{a}	۳/۱٤٦^{a}	۳/٥۳٥^{a}	۳/۷۱٦^{a}	۰/۹٤۰
16:1 cis-9	٤/۱۱٥	٤/۲۸۸	٤/۰۸۳	٤/۱۲۷	٤/۲۹۸	٤/۲۸۳	٤/۱٥۱	٤/۲٦٥	۳/۹۰۳	۰/۱۲٤
16:2	٥/۱۱۲	٥/۱٥۳	٥/۰۷۲	٥/۱۲۷	٥/۲٦٦	٥/۳۲۰	٥/۱٥۷	٥/۷۹٤	٥/۰۹۰	۰/۱٥٥
16:4n-3	٦/۱۰۸	٦/۱٥۷	٦/۰٦۰	٦/۱۲٦	٥/۹۳٥	٦/۳٥۷	٦/۱٦۲	٦/۲۲٤	٦/۲۷۷	۰/۱۸٥
17:0	۷/۱۰٥	۷/۱٦۱	۷/۰٤۹	۷/۱۲٥	٦/۹۰۳	۷/۳۹٤	۷/۱٦۷	۷/۰٥۳	۷/٤٦٤	۰/۲۱٥
18:0	۸/۱۰۱	۸/۱٦٦	۸/۳۷۸	۸/٥۸۰	۸/۷٦۳	۹/۸۷۸	۸/٦۲۳	۸/٦۹۸	۹/۱۹٤	۰/۳٦٥
18:1 cis-9	۲٦/۱٥۷^{a}	۲٥/٦٦٦	۲٥/۹٥۲^{a}	۲٦/۲۳۳^{a}	۲٥/٤۱۳	۲۱/۷٤۲^{c}	۲٦/۳۸۲^{a}	۲۳/۰٤۲^{b}	۲۱/۱۱۳^{c}	۰/٦٥٥
18:1 trans	۱/٤۱٥	۱/٤۲٦	۱/٤۰٤	۱/٤۱۹	۱/۳۷٥	۱/۲۷٦	۱/۳٦۸	۱/۲۳٥	۱/۳۸۷	۰/۰٦۰
18:2n-4	۰/۳٦۹^{a}	۰/۳۷۲^{a}	۰/۳٦٦^{a}	۰/۳۷۰^{a}	۰/۳٥۸^{a}	۰/۳۳٦^{a}	۰/۳٥٦^{a}	۰/۲۷۰^{b}	۰/۲۲۸^{c}	۰/۰۱٥
18:2n-6	۲/۰۸٥^{a}	۲/۰٥٥^{a}	۲/۰٥٥^{a}	۱/۹۸۰^{a}	۱/۹۹٤^{a}	۱/۷٤۲^{b}	۱/۹۸۳^{a}	۱/٥۳۷^{c}	۱/٤۰٤^{c}	۰/۰۹۲
18:3n-3	۲/٥۳۱^{a}	۲/٥۷۰^{a}	۲/۷۱۸^{a}	۲/٥۳۳^{a}	۲/٤۷٤^{a}	۲/۱۱۲^{a}	۲/٤٦۲^{a}	۱/۸٥۸^{b}	۱/۷۷۳^{b}	۰/۰۹۷
18:4n-3	۳/۱۳۹^{a}	۳/۱٦٤^{a}	۳/۱۱٤^{a}	۳/۱٤۸^{a}	۳/۰٥۰^{a}	۲/٦۰۹^{b}	۳/۰۳٥^{a}	۲/٤۹٦^{b}	۱/۹٤٥^{c}	۰/۱۳٤
20:00	۰/۱٦۹	۰/۱۷۱	۰/۱٦۸	۰/۱۷۰	۰/۱٦٥	۰/۱٤۱	۰/۱٦٤	۰/۱٤٤	۰/۱٥٥	۰/۰۱۷
20:1cis	۱/۲٤٦^{a}	۱/۲٥٦^{a}	۱/۲۹٦^{a}	۱/۲٤۹^{a}	۱/۲۱۰^{a}	۱/۰۳٥^{b}	۱/۲۰٤^{a}	۱/۰۱۱^{b}	۰/۹۹۲^{b}	۰/۰٥۳
20:4n-3	۰/۸۸۷^{a}	۰/۸۹٤^{a}	۰/۸۸۰^{a}	۰/۸۸۹^{a}	۰/۸٦۳^{a}	۰/۷۳۰^{b}	۰/۸٥۷^{a}	۰/٦٤۲^{c}	۰/٥٤۳^{d}	۰/۰۳۸
20:4n-6	۰/۷۸۲^{a}	۰/۷۹۳^{a}	۰/۷۸۱^{a}	۰/۷۸۹^{a}	۰/۷٦٥^{a}	۰/٦٤۸^{b}	۰/۷٦۱^{a}	۰/٥٦۹^{c}	۰/٥۸۲^{c}	۰/۰۳۳
20:5n-3	۹/۸۹۷^{a}	۱۰/۰٤۹	۹/۹٤٤^{a}	۹/۹۰۱^{a}	۹/٦۷٥^{a}	۸/۱۸٦^{b}	۹/٦۲٥^{a}	۷/۱۹٤^{c}	٦/۰۸۸^{d}	۰/۳۷۸
22:1 cis	۰/۲۳۹	۰/۲٤۱	۰/۲۳۷	۰/۲٤۰	۰/۲۳۲	۰/۲۲۷	۰/۲۳۱	۰/۲۳۳	۰/۲٤٦	۰/۰۱۰
22:5n-3	۱/۷۳٥^{a}	۱/۷٤٦^{a}	۱/۷۲۱^{a}	۱/٦۸۳^{a}	۱/٦۸٦^{a}	۱/٤٤۹^{b}	۱/٦۷٦^{a}	۱/۳۷٦^{b}	۱/۰۸۱^{c}	۰/۰۷۲
22:6n-3	۱۰/۲۰۱^{a}	۱۰/۱۹۲	۱۰/۲۲۰^{a}	۱۰/۰۲۷^{a}	۹/۸٥۸^{a}	۸/٤٦۱^{b}	۹/۸۰٦^{a}	۷/٤٥۰^{c}	٦/۳۱۲^{d}	۰/۳٤٦
Other	۲/۱۱۰	۱/۹۱٤	۲/۰۲۸	۱/٦۹۳	۱/۹۰۱	۱/۸۰۳	۱/۸۸٥	۱/٦۰۸	۱/۳۷٤	۰/۳۳٤
SFA	۲۱/۸۷۲	۲۲/۰٤۷	۲۲/۰٤۱	۲۲/۳۹۱	۲۲/۸۰۳	۲۳/۱۷٥	۲۲/٥۰۸	۲٤/۲٥۹	۲٤/٤٥۳	۰/٦۹٤
MUFA	۳۳/۱۷۲^{a}	۳۲/۸۷۷	۳۲/۹۷۲^{a}	۳۳/۲٦۸^{a}	۳۲/۸۲۹	۳۰/٤۳٤^{b}	۳۳/۳۳۷^{a}	۳۰/۸۲٦^{b}	۲۸/۸۱۱^{c}	۰/۷۳۹
PUFA	٤۱/۸٤۹^{a}	٤۲/۲۸۰	٤۱/۹٤۳^{a}	٤۱/٥۷۳^{a}	٤۱/۲٥٥	۳۸/۸۸۳^{b}	٤۰/۸۷٥^{ab}	۳٥/٦۷۸^{c}	۳۲/۷۳٦^{d}	۰/۸٥٤

اعداد هر ردیف با علامت بالانویس متفاوت دارای تفاوت آماری هستند (P≤۰/۰٥).

جدول ٥- پروفیل اسیدهای چرب غیراشباع (گرم/۱۰۰ گرم) در روغن ماهی و اسیدهای چرب ماهی در مقایسه با منابع محافظت شده ۴۸ ساعت پس از قرارگیری در محیط شکمبه

	روغن ماهی	اسیدهای چرب	نمک کلسیمی	میکروکپسول ۱	میکروکپسو ل ۲	میکروکپسو ل ۳	میکروکپسو ل ٤	میکروکپسو ل ٥	میکروکپ سول ٦	S.E.M
18:1 cis-9	٥/۱۳۳^{e}	٤/٦٤۷^{f}	۹/۸۰٥^{c}	۱٤/٥۳۱^{b}	۱٥/۲۷۰^{a}	۱۰/٦۱٤^{c}	۹/۲۰۳^{d}	٥/۰۲۳^{e}	۳/۷٦۱^{g}	۳۰۲۱
18:2n-6	۰/۲۳٥^{g}	۰/۱٥۰^{h}	۰/۷۱۳^{b}	۱/۱۱٤^{a}	۱/۱٦٤^{a}	۰/٤۸٥^{d}	۰/٦۹٥^{c}	۰/٤۰٥^{e}	۰/۲٦٤^{e}	۰۲۳۹
18:3n-3	۰/۲۹٥^{g}	۰/۱۹۸^{h}	۰/۹٤۱^{b}	۱/٤۰٦^{a}	۱/٤۷٥^{a}	۰/٦۱۱^{d}	۰/۸۸۹^{c}	۰/٤۹۰^{e}	۰/۳۳۳	۰۲٤۱
18:4n-3	۰/۳٦٦^{f}	۰/۲٤٦^{g}	۱/۱۷۷^{b}	۱/۷٤٤^{a}	۱/۸۳۲^{a}	۰/۷٥۷^{c}	۱/۱۰٤^{b}	۰/٦۰٥^{d}	۰/٤۱۳^{e}	۰۳۲۷
20:5n-3	۱/۱٥٥^{e}	۰/۷۷٥^{f}	۳/٦۷۸^{b}	٥/٤۹٦^{a}	٥/۷٦٦^{a}	۲/۳۸۷^{c}	۳/٤۷٦^{b}	۱/۸۹۷^{d}	۱/۳۰۲^{e}	۰۹٥۲
22:5n-3	۰/۱۹۸^{e}	۰/۱۳۲^{f}	۰/٦۱۱^{b}	۰/۹٤۳^{a}	۰/۹۸٥^{a}	۰/٤۱۰^{c}	۰/٥۹۱^{b}	۰/۳۳٦^{d}	۰/۲۲٤^{e}	۰۱۸۱
22:6n-3	۱/۱۷٦^{e}	۰/۷۸۳^{f}	۳/٦۹٤^{b}	٥/٥۸۸^{a}	٥/۸٦۰^{a}	۲/٤۳۱^{c}	۳/٥۱۷^{b}	۱/۹٦٤^{d}	۱/۳۲٤^{e}	۰۹٦۳
امگا-۳و٦	۳/٤۲٥^{e}	۲/۲۸۳^{f}	۱۰/۸۱٥^{b}	۱٦/۲۸۹^{a}	۱۷/۰۸۲^{a}	۷/۰۸۲^{c}	۱۰/۲۷۲^{b}	٥/٦۹۸^{d}	۳/۸٥۹^{e}	۳٦۸٤

اعداد گزارش شده حداقل مربعات و SEM اندازهگیری مجزا برای هرکدام از فرآوری ها هستند. اعداد هرسطر با علامت بالا نویس متفاوت دارای تفاوت آماری هستند (P≤۰/۰٥).

جدول ۶- میانگین درصدبیوهیدروژناسیون مجموع اسیدهای چرب امگا-۳ و ۶ واسیداولئیک درساعات مختلف انکوباسیون سیستم‌های مختلف تولید

	روغن ماهی	اسیدهای چرب	نمک کلسیمی	میکروکپسول[†] ۱	میکروکپسول ۲	میکروکپسول ۳	میکروکپسول ٤	میکروکپسول ٥	میکروکپسول ٦	S.E.M
امگا۳ و ٦	۸۸/٤۱٦^{bx}	۹۲/۳۲۲^{ax}	٦۳/۰۹٤^{e}	٤٤/۳٦۹^{f}	٤۰/۷٤۹^{f}	۷۱/۳۲۸^{dx}	٦٤/۲۰۰^{e}	۷۳/٦۳۲^{d}	۷۹/۰٥۳^{cx}	۱/۰۰۸٦
اسید اولئیک	۸۰/۳۷۱^{ay}	۸۲/۳۷٤^{ay}	٥۹/۲۲۰^{d}	٤٤/٦۰۹^{f}	۳۹/۹۱۳^{g}	٥۱/۱۸٤^{ey}	٦٥/۱۱۷^{c}	۷٥/٦۲۳^{b}	۷٦/٦٥۹^{by}	۱/۲٥۳٥

جداول شماره ۷، ۸ و ۹ به ترتیب نشان دهنده مقادیر اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع واسطه بیوهیدروژناسیون پس از گذشت ٤۸ ساعت از زمان انکوباسیون و نسبت افزایش آنها به کاهش غیراشباع ترین اسیدهای چرب متناظر آنها است. همان‌طورکه در جداول مشاهده می شود در ارتباط با اسیدهای چرب ۱۸، ۲۰ و ۲۲ کربنه افزایش اسیدهای چرب اشباع قادر به توجیه به ترتیب ۳٦، ۲٥ و ۲۱ درصد از کاهش اسیدهای چرب غیراشباع متناظر بوده که نشان دهنده عدم کامل بودن فرایند بیوهیدروژناسیون در اسیدهای چرب روغن ماهی است. در این میان میزان اسید چرب اشباع ۲۲ کربنه بیشترین میزان افزایش نسبت به زمان صفر را نسبت به اسیدهای چرب اشباع ۱۸ و ۲۰ کربنه داشت. همان‌طور که در جدول ۸ نشان داده شده، واسطه‌های بیوهیدروژناسیون در ارتباط با اسیدهای چرب ۱۸، ۲۰ و ۲۲ کربنه افزایش قابل توجهی پس از گذشت ٤۸ ساعت از خود نشان می دهند. عدم بیوهیدروژناسیون کامل اسیدهای چرب روغن ماهی یا اسیدهای چرب روغن‌های گیاهی در حضور روغن ماهی توسط محققین مختلفی گزارش شده است (بوکارت و همکاران ۲۰۰۸، شنگفیلد و همکاران ۲۰۱۱ و ۲۰۱۲، لی و همکاران ۲۰۰٥، واسوسکا و همکاران ۲۰۰٦). بر خلاف اسیدهای چرب غیراشباع ۱۸ کربنه اطلاعات بسیار کمی در رابطه با فرایند بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع زنجیر بلند ۲۰ و ۲۲ کربنه وجود دارد. در جدیدترین تحقیق در این رابطه کلین و جنکینز (۲۰۱۱) به بررسی فرایند بیوهیدروژناسیون DHA با استفاده از اسیدهای چرب نشان دار پرداخته و افزایش رادیواکتیویته در اسیدهای چرب ۲۲ کربنه غیراشباع و اشباع را گزارش و عنوان کردند که باوجود افزایش غلظت اسیدهای چرب غیراشباع ۱۸ کربنه ترانس در محیط های حاوی روغن ماهی، این اسیدهای چرب از منشأ دکوزاهگزانوئیک اسید نبوده و از اسیدهای چرب ۱۸ کربنه منشأ گرفته اند. اطلاعات حاصل از این مطالعه نشان دهنده افزایش معنی دار اسیدهای چرب ۱۸ کربنه ترانس و بخصوص ترانس ۱۱ و سایر اسیدهای چرب غیراشباع ۲۰و ۲۲ کربنه است که با نتایج مطالعه (تورال و همکاران ۲۰۱۰، کلین و جنکینز ۲۰۱۱) همخوانی دارد. با این حال، مطالعه مشابهی در زمینه ایکوزاپنتانوئیک اسید برای مقایسه نتایج وجود ندارد. تورال و همکاران (۲۰۱۰) افزایش انواع ایزومرهای اسیدهای چرب ۲۰ و ۲۲ کربنه غیراشباع را در اثر انکوباسیون روغن‌ماهی در محیط شکمبه گزارش کرده‌اند. با این‌حال افزایش خالص اسیدهای چرب اشباع و یا واسطه‌های غیراشباع متناظر با هر اسیدچرب، قادر به توجیه کامل بیوهیدروژناسیون ظاهری اسیدهای چرب مورد بررسی نبود (جدول ۹). این امر می‌تواند بدلیل تبدیل بخشی از اسیدهای چرب به اسیدهای چرب با تعداد کربن کمتر یا بیشتر در طی فرایند متابولیسم میکروبی باشد. تفاوت های معنی داری بین میزان تجمع انواع واسطه‌های بیوهیدروژناسیون بین تیمارهای مختلف وجود دارد که می توان تفاوت در سرعت آزادسازی و میزان فراهمی لحظه‌ای اسیدهای چرب غیراشباع در محیط شکمبه و

تفاوت‌های موجود در قابلیت تجزیه دیواره میکروکپسول‌ها و تخمیر موادخوراکی موجود در فلاسک‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها و تأثیر آن بر pH را به عنوان یکی از توجیهات احتمالی ارایه کرد. نبود گزارش های مشابه امکان ارایه دلایل مستندتر را از بین می برد. با این‌حال می‌توان از این امر به عنوان یکی از موارد بالقوه در تأثیرگذاری هدفمند بر روند بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب مختلف در مایع شکمبه نام برد. ون‌وسن‌برگ و جوبلین (۲۰۰۳) در بررسی بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع ۱۸ کربنه به این نتیجه رسیدند که سویه های مختلف باکتری‌های جنس Butirivibrio توانایی تولید انواع واسطه های بیوهیدروژناسیون از جمله انواع اسیدهای چرب ترانس در شکمبه را دارند. بسا و همکاران(۲۰۰۷) گزارشی از انواع واسطه های بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب ۱۸ کربنه شامل اسید لینولئیک و اسید لینولنیک و افزایش غلظت این اسیدهای چرب در گوشت حیوانات مصرف کننده را ارایه نمودند که این امر نشان دهنده تکمیل نبودن فرایند بیویهدروژناسیون و شکل گیری مواد واسط بیوهیدروژناسیون در حین فرایند بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع ۱۸ کربنه و جریان آنها به بیرون از شکمبه و ورود آنها به بافت های بدن است. چو و همکاران (۲۰۰٤) در بررسی اثر افزودن روغن ماهی بر روند بیوهیدروژناسیون اسید لینولئیک و اسید لینولنیک و تجمع واسطه های بیوهیدروژناسیون به این نتیجه رسیدندد که افزودن روغن ماهی تأثیری بر فرایند لیپولیز و بیوهیدروژناسیون ظاهری این دو اسید چرب نداشته ولی سبب کاهش تولید اسید استئاریک و افزایش تجمع انواع اسیدهای چرب واسطه بیوهیدروژناسیون از جمله انواع اسیدهای چرب ترانس شد. در آزمایش چو و همکاران (۲۰۰٤) افزایش سطوح روغن ماهی سبب کاهش بیوهیدروژناسیون ایکوزاپنتانوئیک اسید و دکوزاهگزانوئیک اسید شد ولی تأثیری بر میزان بیوهیدروژناسیون اسید لینولنیک و اسید لینولئیک نداشت. این محققین پیشنهاد کردند که اسیدهای چرب روغن ماهی سبب ممانعت از انجام مراحل نهایی بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب ۱۸ کربنه باچند پیوند دوگانه می شوند. هارفوت و هازلوود (۱۹۸۸) تولید اسیدهای چرب ترانس را به عنوان یکی از مهمترین محصولات حدواسط در فرایند بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع ۱۸ کربنه عنوان نمودند. بیم و همکاران (۲۰۰۰) ونوع و مقدار چربی موجود در محیط شکمبه را از مهمترین عوامل تأثیرگذار بر میزان و نرخ لیپولیز و بیویهدروژناسیون معرفی نمودند. ون‌نول و دمایر (۱۹۹٦) میزان pH شکمبه را از مهمترین عوامل تأثیرگذار بر این فرایند دانستند. این عوامل می‌توانند با تأثیرگذاری بر نرخ ورود اسیدهای چرب به محیط شکمبه میزان پیشرفت واکنش بیوهیدروژناسیوون به سمت اتمام و تولید اسیدهای چرب اشباع متناظر و یا افزایش تولید و تجمع محصولات حدواسط را تحت تأثیر قرار می دهند. موسلی و همکاران (۲۰۰۲، ۲۰۰٦) و پروئل و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از مطالعات رادیوایزوتوپی انواع واسطه های ترانس در فرایند بیویهدروژناسیون اسید اولئیک را مورد شناسایی قرار دادند. ابوغزاله و همکاران (۲۰۰۵) عنوان نمودند که شرایط محیطی شکمبه از جمله pH و نرخ ترقیق از شکمبه به شدت میزان و نوع اسیدهای چرب ترانس واسطه بیوهیدروژناسیون اسید اولئیک را تحت تأثیر قرار می دهد. علاوه بر اسیدهای چرب غیراشباع ترانس انواع دیگر واسطه های بیوهیدروژناسیون اولئیک اسید همانند کتواستئاریک اسید و هیدروکسی استئاریک اسید توسط محققین مختلف گزارش شده است (جنکینز و همکاران، ۲۰۰٦؛ موروان و جوبلین، ۱۹۹۹؛ هادسون و همکاران، ۱۹۹۵). انواع اسیدهای چرب غیراشباع ۱۸ کربنه دارای پیوندهای دوگانه مزدوج در موقعیت های مختلف به عنوان مهمترین ایزومرهای واسط در فرایند

بیوهیدروژناسیون اسید لینولئیک توسط محققین مختلفی گزارش شده است (والاس و همکاران، ۲۰۰۷؛ اوگاوا و همکاران، ۲۰۰۱؛ ریبیرو و همکاران، ۲۰۰۷؛ تتر و جنکینز، ۲۰۰۶؛ کیم و همکاران، ۲۰۰۲؛ آندو و همکاران، ۲۰۰۴). لور و همکاران (۲۰۰۴) و دستیلاتس و همکاران (۲۰۰۵) انواع واسطه های بیوهیدروژناسیون اسید لینولنیک به عنوان یکی از مهمترین اسیدهای چرب غیراشباع امگا-۳ را مورد شناسایی قرار دادند. واسوسکا و همکاران (۲۰۰۶) انواع ایزومر خای ۱۸:۳ و ۱۸:۲ را به عنوان مهمترین واسطه های بیوهیدروژناسیون اسید لینولنیک عنوان کردند. ابوغزاله و جنکینز (۲۰۰۴) ناپدید شدن شکمبه ای اسیدهای چرب روغن ماهی در اثر انکوباسیون با مایع شکمبه را گزارش نموده و این فرایند را در اثر ایزومریزه شدن، هیدروژنه شدن و یا کاهش تعداد کربن های زنجیر اسیدچرب دانستند. جنکینز و همکاران (۲۰۰۸) ایجاد اسیدهای چرب دارای ۵ و ٦ پیوند دوگانه حداقل با یک پیوند غیراشباع در موقعیت ترانس و متعاقبا بیوهیدروژناسیون به ایزومرهای دارای ٤ و ٥ پیوند غیراشباع را از مهمترین ایزومرهای حد واسط در فرایند بیوهیدروژناسیون ایکوزاپنتانوئیک و دکوزاهگزانوئیک اسید عنوان نمودند که با یافته های این پژوهش مبنی بر تولید و تجمع انواع اسیدهای چرب ۲۰ و ۲۲ کربنه با تعداد متفاوت پیوندهای دوگانه در کنار تولید اسیدهای چرب اشباع ۲۰ و ۲۲ کربنه، هم‌راستا است. با این‌حال تحقیقات بیشتر در این زمینه با استفاده از رادیوایزوتوپ ها و شناسایی آنها در مایع شکمبه ، محتویات روده‌ای و انواع بافت ها و مایعات بدن، می-تواند در شناسایی هرچه بیشتر فرایند بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب روغن ماهی به عنوان اسیدهای چرب غیراشباع امگا-۳ زنجیر بلند و شناسایی روش های خاص در زمینه دستکاری فرایند بیویهدروژناسیون آنها بمنظور افزایش میزان اسیدهای چرب غیراشباع مفید در محصولات تولیدی نشخوارکنندگان، مفید باشد.

جدول ۷- میزان تغییرات اسیدهای چرب اشباع ۱۸، ۲۰ و ۲۲ کربنه پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در مقایسه با زمان صفر

اسیدچرب (گرم بر ۱۰۰ گرم)	C18:0		C20:0		C22:0	
	۰	٤٨	۰	٤٨	۰	٤٨
روغن ماهی	٨/١٠١^{e}	١٨/٠٢١^{a}	١/٤١٩^{ab}	٣/٢٦٤^{b}	٠/٠٨٢	٢/٢٨٤^{b}
اسیدهای چرب ماهی	٨/١٦٦^{e}	١٧/٧٤٨^{a}	١/٤٢١^{a}	٢/٣٦٢^{a}	٠/٠٧٣	٢/٥٩٥^{a}
نمک های کلسیمی	٨/٣٧٨^{de}	١٥/٤٧٣^{e}	١/٤١٨^{abc}	٢/٨٣٧^{g}	٠/٠٨١	١/٥٤٩^{d}
میکروکپسول ١	٨/٥٨٠^{d}	١٤/٦٣٨^{e}	١/٤٢٠^{a}	٢/٨٥٧^{f}	٠/٠٦٨	١/١٦٤^{f}
میکروکپسول ٢	٨/٧٦٣^{d}	١٣/٧٤٩^{f}	١/٤١٥^{bc}	٢/٧٩٤^{h}	٠/٠٨٠	١/٠٩٥^{f}
میکروکپسول ٣	٩/٨٧٨^{b}	١٦/١٦٣^{c}	١/٣٩١^{d}	٢/٦٤٣^{i}	٠/٠٧٦	١/٧٩٣^{c}
میکروکپسول ٤	٨/٦٢٣^{d}	١٦/٤٨٣^{b}	١/٤١٤^{c}	٢/٩٢٦^{e}	٠/٠٦٩	١/٣٦٩^{e}
میکروکپسول ٥	٩/٦٩٨^{c}	١٦/٢٧٣^{bc}	١/٤٢٢^{a}	٢/٩٣٧^{d}	٠/٠٧١	١/٥٩٧^{d}
میکروکپسول ٦	١٠/١٩٤^{a}	١٥/٨١١^{d}	١/٣٥٥^{e}	٢/٩٧٢^{c}	٠/٠٨١	١/٤٧٣^{de}
SEM		٠/١١٠٦		٠/٠٠١٨		٠/٠٧٨٢

قابلیت هضم مواد مغذی و فراسنجه‌های شکمبه‌ای

جدول ۱۰ نشان‌دهنده اثر انواع مکمل‌ها بر قابلیت هضم ظاهری ماده‌خشک، ماده‌آلی، دیواره سلولی و دیواره سلولی منهای همی‌سلولز است. بیشترین میزان قابلیت هضم در کلیه‌موارد مربوط به گروه کنترل (بدون افزودن روغن ماهی) بوده ولی اختلاف معنی‌داری با نمک‌های کلسیمی و برخی از میکروکپسول‌های میلارد وجود نداشت. افزایش میزان روغن در مکمل‌های کپسوله‌شده سبب کاهش بیشتر قابلیت هضم شد که دیواره‌سلولی بیشترین کاهش را ازخود نشان داد. مقادیر قابلیت هضم در گروه‌های دریافت کننده مواد محافظت شده بصورت معنی‌داری بالاتر از روغن

فرآوری نشده یا اسیدهای چرب بود. کاهش قابلیت هضم دیواره سلولی با افزودن روغن ماهی به جیره گزارش و دلایل مختلفی همانند اثرات پوشانندگی چربی-ها، کاهش تعداد و فعالیت باکتری‌های سلولولتیک و عدم توانایی در اتصال به الیاف ذکر شده است (تامینگا و دورئو ۱۹۹۱، هندرسون ۱۹۷۳، مک‌زولاک و همکاران ۱۹۸۱، دورئو و چیلارد ۱۹۹۷، چالوپا و همکاران ۱۹۸۳). واچیرا و همکاران (۲۰۰۰) در بررسی اثر منابع مختلف اسیدهای چرب امگا-۳ بر قابلیت هضم شکمبه-ای و پس شکمبه‌ای مواد مغذی به این نتیجه رسید که روغن ماهی سبب کاهش قابلیت هضم شکمبه‌ای الیاف و ماده آلی می‌شود ولی در عین‌حال تأثیری بر قابلیت هضم در کل دستگاه گوارش ندارد. مارتین و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثرات روغن کتان بصورت روغن آزاد، دانه کامل و دانه اکسترود شده به این نتیجه رسیدند که هر سه منبع سبب کاهش قابلیت هضم دیواره سلولی در کل دستگاه گوارش نسبت به گروه کنترل می‌شوند. هو و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده نمودند که افزودن منابع روغن سبب کاهش معنی‌دار قابلیت هضم نسبت به گروه کنترل می‌شود ولی تفاوت معنی-داری بین انواع منابع روغن مشاهده نشد.

جدول ۸- میزان تغییر در اسیدهای چرب غیر اشباع واسطه بیوهیدروژناسیون در مکمل های روغن ماهی ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون

اسیدچرب (گرم بر ۱۰۰ گرم)	t10 C18:1		t11 C18:1		C22:1		C22:2		C22:3	
	۰	٤٨	۰	٤٨	۰	٤٨	۰	٤٨	۰	٤٨
روغن ماهی	۰/۸۹۰^{a}	/۷۳٦	۰/۵۲۵^{a}	۱۲/۲۱۵	۰/۲۳۹^{a}	/۱۰۸	/۷۲۰	۲//۳۵۲^{a}	۰/۳۸۲^{a}	٤/۳٦۸^{a}
اسیدهای چرب ماهی	۰/۸۹۷^{a}	/۰۲۱	۰/۵۲۹^{a}	۱۳/۱٤٦	۰/۲٤۱^{a}	/۱٤٦	/٦۹۰	۲/۳۸۱^{a}	۰/۳۷۲^{a}	٤/٤۲۱^{a}
نمک های کلسیمی	۰/۸۸۳^{a}	/۸۹۳	۰/۵۲۱^{a}	۹/٤۵۷^{c}	۰/۲۳۷^{a}	/۲٤۵	/۷۱۰	۱/٦۹۹^{b}	۰/۳۸۱^{a}	۳/۱۵٦^{b}
میکروکپسول ۱	۰/۸۹۲^{a}	/۸۸۱	۰/۵۲۷^{a}	٦/۱٤۹^{e}	۰/۲٤۰^{a}	/۵۱۱	/۷۳۰	۱/۱٤۳^{e}	۰/۳۸۵^{a}	۲/۱۲۳^{d}
میکروکپسول ۲	۰/۸٦٤^{a}	/۷۰۷	۰/۵۱۰^{a}	۵/۵۸۰^{f}	۰/۲۳۲^{a}	/۳٦۳	/٦۸۰	۱/۰۳۱^{e}	۰/۳۷۳^{a}	۱/۹۱۵^{e}
میکروکپسول ۳	۰/۷٤۰^{b}	/۹٦٦	۰/٤۳۷^{c}	٦/٤۲۸^{e}	۰/۱۹۷^{b}	/۹۸۰	/٦۹۰	۱/٤۹۹^{c}	۰/۳۷۱	۲/۷۸۳^{c}
میکروکپسول ٤	۰/۸٦۰^{a}	/۹۳۵	۰/۵۰۸^{b}	۹/۵۹۵^{c}	۰/۲۳۱^{a}	/۲٤۸	/۷۲۰	۱/۷۰۱^{b}	۰/۳۸٦^{a}	۳/۱۵۹^{b}
میکروکپسول ۵	۰/٦۵۱^{c}	/٤۲۰	۰/۳۸٤^{d}	۷/۹۱۲^{d}	۰/۱۷۳^{c}	/۸۱۳	/۷۱۰	۱/۳۷۲^{d}	۰/۳٦۵^{b}	۲/۵٤۷^{c}
میکروکپسول ٦	۰/۵۵۱^{d}	/۱۹٤	۰/۳۲۵^{e}	۷/۱۷۲^{d}	۰/۱٤٦^{d}	/٦٤۸	/٦۷۰	۱/۲٤۷^{d}	۰/۳۷۳^{a}	۲/۳۱٦^{d}
SEM	۰/۱۲۵٤		۰/۰۳٦۹		۰/۱۱٦۲		۰/۰۲۰۵		۰/۰۲۳۲	

اسیدچرب (گرم بر ۱۰۰ گرم)	C20:1		C20:2		C20:3		C20:4n-6		20:4n-3	
	۰	٤٨	۰	٤٨	۰	٤٨	۰	٤٨	۰	٤٨
روغن ماهی	۱/۲٤٦^{a}	/۸۹۷	۰/۲۸۰^{a}	/۰۰۰	/۱۷۲	۲/۳٤۵^{a}	/۷۸۲	/۳۳۱	۰/۸۸۷^{a}	۳۱
اسیدهای چرب ماهی	۱/۲۵٦^{a}	/۰۸۰	۰/۲۷٤^{a}	/۱۲٦	/۱٦۳	۲/٤۹۳^{a}	/۷۹۳	/٤۱۵	۰/۸۹٤^{a}	۳۹
نمک های کلسیمی	۱/۲۹٦^{a}	/۹۹٤	۰/۲٦۳^{b}	/۳۷۷	/۱۵۷	۱/٦۱٤^{b}	/۷۸۱	/۹۱٦	۰/۸۸۰^{a}	۹۰
میکروکپسول ۱	۱/۲٤۹^{a}	/۳۳٦	۰/۲۸۳^{a}	/۸٦۱	/۱٦۱	۱/۰۰۹^{d}	/۷۸۹	/۸۵۳	۰/۸۸۹^{a}	۹۷
میکروکپسول ۲	۱/۲۱۰^{ab}	/۲۱٤	۰/۲۷٤^{ab}	/۷۳٤	/۱۷۳	۰/۸٦۰^{e}	/۷٦۵	/۸۰٦	۰/۸٦۲^{ab}	۸۸
میکروکپسول ۳	۱/۰۳۵^{c}	/۹۱۰	۰/۲۷۲^{ab}	/۳۱۹	/۱٦۸	۱/۵٤٦^{b}	/٦٤۸	/۸۷۸	۰/۷۳۰^{c}	۸٦
میکروکپسول ٤	۱/۲۰٤^{b}	/۹٤۷	۰/۲٦۹^{ab}	/۳٤۵	/۱٦۹	۱/۵۷٦^{b}	/۷٦۱	/۸۹۵	۰/۸۵۷^{b}	۸۸
میکروکپسول ۵	۰/۹۱۱^{d}	/٦۹۰	۰/۲۸۱^{a}	/۱٦۷	/۱۷۳	۱/۳٦۸^{c}	/۵٦۹	/۷۷٦	۰/٦٤۱^{d}	۷٦
میکروکپسول ٦	۰/۷۷۲^{e}	/۵۹۲	۰/۲٦۷^{b}	/۱۰۰	/۱۷۲	۱/۲۸۹^{c}	/٤۸۲	/۷۳۲	۰/۵٤۳^{e}	۷۲
SEM	۰/۱۳۲۸		/۰۰۳۲۵		/۰۱۱٦۷		/۰۸۳		۰/۰۹٤٦	

a,b,c علامت بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دارآماری بین انواع مکمل‌ها است ($P\leq۰/۰۵$) .تفاوت بین زمان صفر و٤٨ درهمه تیمارها درهرسه اسیدچرب معنی دار بود .

فیوز و همکاران (۲۰۰۳)، در بررسی اثرات انواع روغن ماهی بر قابلیت هضم و تجزیه‌پذیری به این نتیجه رسیدند که روغن ماهی سبب کاهش تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای دیواره سلولی می‌شود، ولی تأثیری بر قابلیت هضم درون‌تنی در کل دستگاه گوارش ندارد. اثرات متفاوت انواع اسیدهای چرب غیراشباع بر قابلیت هضم را می‌توان تحت تأثیر میزان غیراشباع بودن آنها و اثرات متعاقب هرکدام از آنها بر جمعیت میکروبی دستگاه گوارش دانست. بعلاوه سرعت و وسعت متفاوت بیوهیدروژناسیون انواع اسیدهای چرب در

شکمبه هم می‌تواند توجیه کننده بخشی از این اثرات باشد. اثر متفاوت منابع مختلف میکروکپسوله بر فراسنجه های مختلف قابلیت هضم می تواند بدلیل تفاوت در میزان آزادسازی روغن از میکروکپسول های مختلف در واحد زمان و میزان کل روغن آزاد شده از میکروکپسول ها باشد. همان‌طور که در بخش های قبلی هم مورد اشاره قرار گرفته است، فرایند آزادسازی روغن از میکروکپسول ها تابعی از قابلیت تجزیه پذیری دیواره میکروکپسول توسط میکروارگانیسم های شکمبه است که علاوه بر تحت تأثیر قرار دادن قابلیت هضم، سرنوشت اسیدهای چرب غیراشباع کپسوله شده را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد. در آزمایش هووس و همکاران (۲۰۱۰) اثر سطوح مختلف روغن ماهی بر باکتری‌های سلولولتیک در حضور گراس و شبدر قرمز در فاز مایع و جامد محتویات شکمبه مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش بالاترین سطح روغن ماهی درحضور شبدرقرمز سبب کاهش *Ruminococcus albus* در فاز مایع محتویات شکمبه شد ولی تأثیری بر جمعیت سایر گونه‌های سلولولتیک نداشت. با این‌حال در فاز جامد جمعیت *Ruminococcus flavefaciens* و *albus Ruminococcus* تحت تأثیر قرار نگرفته و جمعیت *Fibrobacter succinogenes* تنها در حضور گراس‌ها کاهش یافت. عدم تأثیر منفی نمک‌های کلسیمی بر قابلیت هضم دیوار سلولی در تحقیقات متعدد به اثبات رسیده است (جنکینز ۱۹۹۳، تامینگا و دورئو ۱۹۹۱، جنکینز و پالمیکوئیست ۱۹۸٤). تفاوت‌های موجود بین انواع مکمل‌های کپسوله شده را می‌توان بازتابی از توان میکروب‌های شکمبه در هضم دیواره کپسول و آزادسازی روغن در محیط شکمبه دانست. کاهش بیشتر قابلیت هضم توسط روغن در مقایسه با اسیدهای چرب آزاد می‌تواند بعلت بیوهیدروژناسیون و بی‌اثر شدن سریع‌تر اسیدهای چرب آزاد نسبت به اسیدهای چرب گلیسرولی و یا توانایی کمتر آنها در پوشاندن سطوح الیاف و ممانعت کمتر از تشکیل کلونی-های باکتریایی بعلت تفاوت خصوصیات فیزیکی آنها نسبت به روغن‌ها باشد.

جدول ۱۱ نشان‌دهنده‌ی اثرات مکمل‌های روغن بر pH، نیتروژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوآ است. pH شکمبه در محیط‌های حاوی روغن و اسیدهای چرب محافظت نشده بالاتر بود که می‌تواند بدلیل تخمیر کمتر در اثر افزودن روغن و در نتیجه تولید اسیدهای چرب فرار کم‌تر دانست. بالاترین میزان pH شکمبه مربوط به گروه دریافت کننده روغن ماهی بود که می‌تواند بدلیل کاهش قابل ملاحظه تولید اسیدهای چرب فرار در اثر کاهش قابلیت هضم (جداول ۱۰ و ۱۲) و اثرات سمی اسیدهای چرب روغن ماهی بر میکروارگانیسم‌های شکمبه باشد. نتایج مشابهی مبنی بر افزایش pH شکمبه همزمان با افزایش سطوح روغن ماهی در جیره گزارش شده است (شنگفیلد و همکاران ، ۲۰۱۲). در مطالعه هریستوف و همکاران (۲۰۰٤) اسیدهای چرب کاپریک، لوریک و میرستیک که سبب از بین رفتن کامل پروتوزوآ در محیط‌های کشت شده‌اند، سبب کاهش pH شکمبه شده‌اند. بااین حال تفاوت در نوع مواد قابل دسترس برای تخمیر و خصوصیات بافری مناسب می-تواند از جمله دلایل بدست آمدن این نتایج باشد. در مطالعه پوتو و همکاران (۲۰۱۱)، تفاوت معنی‌داری در میزان pH در سیستم کشت پیوسته در اثر افزودن روغن ماهی، سویا و یا روغن اشباع در مقایسه با گروه کنترل وجود نداشت ولی روغن ماهی بر خلاف روغن سویا و روغن اشباع سبب افزایش قابل ملاحظه جمعیت شکمبه‌ای *Selenomonas ruminantium* شد. روغن‌ماهی و اسیدهای آزاد سبب کاهش معنی‌دار جمعیت پروتوزوآ در مقایسه با گروه کنترل و مکمل‌های محافظت شده شدند. تفاوت بین مکمل‌های میکروکپسوله‌شده غیرمیلارد با سطوح بالای روغن با سایر مکمل‌ها معنی-دار بود.

جدول ۹-میزان افزایش اسیدهای چرب اشباع و واسطه مسیر بیوهیدروژناسیون نسبت به میزان کاهش اسیدهای چرب غیراشباع متناظر

	اسیدهای چرب ۱۸ کربنه				اسیدهای چرب ۲۲ کربنه		
	C18:0	t10 C18:1	t11 C18:1	C22:0	C22:1	C22:2	C22:3
روغن ماهی	۰/۳۵۶^{bx}	۰/۱۰۲^{ay}	۰/۴۱۹^{ax}	۰/۲۰۸^{b}	۰/۲۷۱^{y}	۰/۱۵۴^{az}	۰/۳۷۶^{ax}
اسیدهای چرب ماهی	۰/۳۳۱^{cz}	۰/۱۰۸^{az}	۰/۴۳۶^{ax}	۰/۲۲۹^{a}	۰/۲۶۳^{y}	۰/۱۵۳^{az}	۰/۳۶۷^{ax}
نمک های کلسیمی	۰/۳۳۸^{cy}	۰/۰۹۶^{az}	۰/۴۲۵^{ax}	۰/۱۹۵^{c}	۰/۲۶۶^{y}	۰/۱۳۱^{abz}	۰/۳۶۸^{ax}
میکروکپسول ۱	۰/۴۰۱^{ax}	۰/۰۶۵^{by}	۰/۳۷۲^{bx}	۰/۲۱۲^{b}	۰/۲۴۵^{y}	۰/۰۸۰^{cz}	۰/۳۳۶^{bx}
میکروکپسول ۲	۰/۳۷۸^{abx}	۰/۰۶۴^{by}	۰/۳۸۴^{bx}	۰/۲۱۶^{b}	۰/۲۴۱^{y}	۰/۰۷۵^{cz}	۰/۳۲۸^{bx}
میکروکپسول ۳	۰/۳۹۹^{ax}	۰/۰۷۸^{by}	۰/۳۸۱^{bx}	۰/۲۴۳^{a}	۰/۲۵۲^{y}	۰/۱۱۴^{bz}	۰/۳۴۱^{bx}
میکروکپسول ٤	۰/۳۵۸^{bx}	۰/۰۹۴^{ay}	۰/۴۱۴^{ax}	۰/۱۷۶^{d}	۰/۲۷۳^{y}	۰/۱۳۳^{abz}	۰/۳۷۶^{ax}
میکروکپسول ٥	۰/۳۶۱^{bx}	۰/۰۹۷^{ay}	۰/۴۱۳^{ax}	۰/۲۳۸^{a}	۰/۲۵۵^{y}	۰/۱۰۳^{bz}	۰/۳۴۰^{bx}
میکروکپسول ٦	۰/۳۴۷^{bcy}	۰/۱۰۲^{az}	۰/۴۲۴^{ax}	۰/۲۳۸^{a}	۰/۲۵۷^{y}	۰/۰۹۹^{bcz}	۰/۳۳۲^{bx}
میانگین	۰/۳۶۳	۰/۰۸۹	۰/۴۰۷	۰/۲۱۷	۰/۲۵۸	۰/۱۱۶	۰/۳۵۵

	اسیدهای چرب ۲۰کربنه					
	C20:0	C20:1	C20:2	C20:3	C20:4n-6	20:4n-3
روغن ماهی	۰/۲۱۱^{cx}	۰/۱۸۹^{aby}	۰/۱۹۷^{ay}	۰/۲۴۹^{ax}	۰/۰۶۳^{az}	۰/۰۴۸^{az}
اسیدهای چرب ماهی	۰/۲۰۹^{cy}	۰/۱۹۷^{ay}	۰/۲۰۰^{ay}	۰/۲۵۱^{ax}	۰/۰۶۷^{az}	۰/۰۵۴^{az}
نمک های کلسیمی	۰/۲۳۰^{bx}	۰/۱۱۳^{dz}	۰/۱۸۱^{aby}	۰/۲۳۶^{abx}	۰/۰۲۲^{bcv}	۰/۰۴۴^{abv}
میکروکپسول ۱	۰/۳۲۶^{ax}	۰/۱۲۵^{dz}	۰/۱۳۱^{cz}	۰/۱۹۳^{cy}	۰/۰۱۴^{cv}	۰/۰۲۰^{cv}
میکروکپسول ۲	۰/۳۵۳^{ax}	۰/۱۱۹^{dz}	۰/۱۲۸^{cz}	۰/۱۷۶^{cy}	۰/۰۱۱^{cv}	۰/۰۱۶^{cv}
میکروکپسول ۳	۰/۲۱۶^{cx}	۰/۱۵۱^{cy}	۰/۱۸۰^{aby}	۰/۲۳۸^{abx}	۰/۰۴۰^{bz}	۰/۰۲۳^{cz}
میکروکپسول ٤	۰/۲۴۶^{bx}	۰/۱۲۱^{dz}	۰/۱۷۵^{by}	۰/۲۲۹^{bx}	۰/۰۲۲^{bcv}	۰/۰۳۴^{bv}
میکروکپسول ٥	۰/۲۴۱^{bx}	۰/۱۴۷^{cy}	۰/۱۶۷^{by}	۰/۲۲۶^{bx}	۰/۰۳۹^{bz}	۰/۰۲۳^{cz}
میکروکپسول ٦	۰/۲۰۸^{cx}	۰/۱۷۱^{by}	۰/۱۷۴^{by}	۰/۲۳۳^{abx}	۰/۰۵۳^{abz}	۰/۰۳۷^{bz}
میانگین	۰/۲۴۹	۰/۱۴۸	۰/۱۷۱	۰/۲۲۶	۰/۰۳۷	۰/۰۳۳

اعداد نمایش داده شده میانگین حداقل مربعات حاصل از محاسبات انجام شده با استفاده از مقادیر کاهش اسیدهای چرب غیراشباع والد (اسیدهای چرب ۱۸ کربنه، DHA و EPA)

و مقادیر افزایش اسیدهای چرب اشباع و واسطه های متناظر با هر دسته از اسیدهای چرب مورد بررسی است که قبلا در جداول مربوطه نشان داده شده اند.

a,b,cعلامت بالانویس متفاوت درهرستون نشان دهنده تفاوت معنی دارآماری بین انواع مکمل‌ها است ($P\leq ۰/۰۵$) .علامت بالانویس متفاوت درهرردیف نشان دهنده تفاوت معنی‌داربین اسیدهای چرب دریک مکمل است (y،x).

جدول ۱۰- میانگین قابلیت هضم مواد مغذی در اثر افزودن منابع مختلف روغن ماهی

	شاهد	روغن	اسیدچرب	نمک کلسیمی	میکروکپسول ۱	میکروکپسول ۲	میکروکپسول ۳	میکروکپسول ٤	میکروکپسول ٥	میکروکپسول ٦	S.E.M
DM	۷۳/۰۵^{a}	۵۸/۹^{e}	۶۰/۱۸^{d}	۷۳/۸۱^{a}	۷۵/۴۳^{a}	۷۷/۴۷^{a}	۶۹/۳۱^{bc}	۷۱/۷۷^{b}	۶۶/۱۴^{c}	۶۱/۳۴^{d}	۱/۴
OM	۷۵/۵۱^{a}	۵۵/۲۸^{e}	۵۸/۴۴^{de}	۷۶/۷۲^{a}	۷۳/۸۶^{ab}	۷۶/۸۲^{a}	۷۱/۹۳^{bc}	۷۲/۵۱^{bc}	۶۹/۳۵^{c}	۶۱/۰۱^{d}	۱/۴
NDF	۶۴/۶۲^{ab}	۵۰/۱۳^{d}	۴۹/۲۵^{d}	۶۲/۱۶^{ab}	۶۶/۲۶^{a}	۶۲/۵۳^{ab}	۵۷/۷۶^{c}	۶۱/۲۸^{b}	۵۹/۳۱^{bc}	۵۱/۲۵^{d}	۱/۷
ADF	۶۴/۲۸^{a}	۳۹/۱۷^{e}	۴۴/۳۲^{de}	۶۰/۴۱^{ab}	۶۴/۲۰^{a}	۶۱/۳۴^{ab}	۵۴/۳۷^{bc}	۵۸/۵۹^{b}	۵۱/۹۸^{c}	۴۶/۵۸^{d}	۲/۱

اعداد هر ردیف با علامت بالانویس متفاوت دارای تفاوت آماری هستند ($P\leq ۰/۰۵$).

مطالعات مختلفی اثر انواع اسیدهای چرب بر جمعیت پروتوزوآ و باکتری‌های شکمبه را گزارش کرده‌اند (مایا و همکاران ۲۰۰۷، دورئو و فرلای ۱۹۹۵). در اغلب موارد روغن‌ماهی سبب کاهش جمعیت پروتوزوآ شده (هیرستوف و همکاران ۲۰۰۳) و برخی آن را یکی از مکانیسم‌های کاهش تولید متان عنوان کرده‌اند (وایتلا و همکاران ۱۹۸٤، فیویز و همکاران (۲۰۰۳). هیرستوف و همکاران (۲۰۰٤) اسید کاپریک، لوریک و میریستیک را به عنوان سمی‌ترین اسیدهای چرب برای پروتوزوآی شکمبه عنوان کردند. با این‌حال در یکی از مطالعات اخیر با استفاده از گاوهای شیری، سطوح مختلف روغن ماهی تأثیری بر جمعیت پروتوزوآی شکمبه نداشت (شینگفلد و همکاران،۲۰۱۲). باوجود کاهش جمعیت پروتوزوآ، غلظت نیتروژن آمونیاکی در گروه دریافت

کننده روغن‌ماهی و اسیدهای چرب محافظت نشده افزایش یافت. که با نتایج هیرستوف و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت داشت.

باکاهش جمعیت پروتوزوآ انتظار می‌رود بواسطه کاهش رویگرد (Turnover) پروتئین باکتریایی و کاهش آزادسازی خالص آمونیاک از منشأ پروتوزوآ، غلظت نیتروژن آمونیاکی کاهش یابد (دورئو و فرلای ۱۹۹۵). با این‌حال می‌توان این‌پدیده را با افزایش باکتری‌های پروتئولتیک در پاسخ به کاهش پروتوزوآ و یا کاهش ساخت پروتئین میکروبی در اثر کاهش فعالیت‌های باکتریایی توجیه کرد (مایا و همکاران ۲۰۰۷، یانگ و همکاران ۲۰۰۹). گزارشات متناقضی در زمینه اثر روغن‌ماهی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی و میزان و کارایی سنتز پروتئین میکروبی وجود دارد (واچیرا و همکاران ۲۰۰۰، دورئو و فرلای ۱۹۹۵). با این‌حال توجه به این مطلب ضروری است که بخشی از اثرات روغن ماهی در بالاتر بودن غلظت نیتروژن آمونیاکی می‌تواند بدلیل کاهش بیشتر فعالیت‌های ساخت پروتئین میکروبی در اثر ممانعت از رشد سایر باکتری‌ها و ارگانیسم‌های شکمبه و در نتیجه کاهش مورد استفاده قرار گرفتن نیتروژن آمونیاکی در مسیر سنتزی باشد. بعلاوه اطلاعاتی در زمینه تغییر در فعالیت آنزیم‌های پروتئولتیک مختلف در شکمبه در اثر افزودن منابع مختلف روغن وجود ندارد.

جدول۱۱- اثر افزودن منابع مختلف روغن ماهی بر فراسنجه‌های مختلف شکمبه‌ای

	شاهد	روغن	اسیدچرب	نمک کلسیمی	میکروکپسول ۱	میکروکپسول ۲	میکروکپسول ۳	میکروکپسول ٤	میکروکپسول ٥	میکروکپسول ٦	S.E.M
pH	٦/٢^{b}	٦/٧^{a}	٦/٦^{a}	٦/٠^{c}	٦/١^{bc}	٦/٢^{b}	٦/٣^{b}	٦/٠^{c}	٦/٣^{b}	٦/٤^{ab}	٠/٠٨
نیتروژن آمونیاکی	١٩/٥^{c}	٢٥/٧^{a}	٢٦/٣^{a}	١٩/٩^{c}	١٨/٨^{c}	١٨/٥^{b}	٢٢/٢^{b}	٢٠/١^{c}	٢٤/١^{a}	٢٦/٢^{a}	٠/٤٨
پروتوزوآ	١٠/١^{a}	٦/٠٥^{c}	٥/٢^{c}	١٠/٠^{a}	١٠/٦^{a}	١١/٣^{a}	٨/٧^{b}	٩/٢^{ab}	٨/٦^{b}	٨/٤^{b}	٠/٦٧

a,b,cعلامت بالانویس متفاوت درهر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دارآماری بین مکمل‌ها است ($P\leq ٠/٠٥$) .

غلظت نیتروژن آمونیاکی بصورت میلی مول در لیتر مایع شکمبه و جمعیت پروتوزوآ بصورت ضرب در $١٠^{٥}$ در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه بیان شده است.

جدول ۱۲ نشان‌دهنده غلظت و پروفیل اسیدهای چرب فرار تولیدی در شکمبه است. کاهش مقدارکل اسیدهای چرب فرار تولیدی در گروه روغن و اسیدچرب محافظت نشده را می‌توان نتیجه‌ی کاهش قابلیت هضم دیواره‌سلولی بواسطه اثرات منفی روغن بر باکتری‌های سلولولتیک دانست (تورال و همکاران ۲۰۱۰، ولامینک و همکاران ۲۰۰۸، واچیرا و همکاران ۲۰۰۰، فیویز و همکاران ۲۰۰۳). برخی از محققین عدم تأثیر و یا افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار در اثر افزودن روغن ماهی در محیط را گزارش کرده‌اند که بنظرمی‌رسدزمان نمونه‌برداری، غلظت روغن افزوده شده به محیط، پروفیل اسیدهای چرب در منابع روغن، نوع ماده تخمیر شده و عادت‌پذیری یا عدم عادت‌پذیری به روغن ماهی در حیوانات منشأ مایع شکمبه دارای اهمیت فراوانی باشد (پرستوف و همکاران ۲۰۰۳). افزایش غلظت مولی پروپیونات و کاهش استات در مکمل‌های محافظت نشده نسبت به گروه کنترل و مکمل‌های بی‌اثر بر محیط، نشان‌گر کاهش هضم الیاف بوده و نیز می‌تواند نشانه‌ای از کاهش تولید متان توسط روغن‌ماهی باشد (تورال و همکاران ۲۰۱۰، ولامینک و همکاران ۲۰۰۸). مقادیر بوتیرات در گروه دریافت‌کننده مکمل محافظت‌نشده و مکمل‌های محافظت شده با کارایی پایین کاهش و مقادیر ایزوبوتیرات، والرات و ایزووالرات افزایش یافت. به‌علاوه نسبت اسیدهای چرب فرار گلوکوژنیک به غیرگلوکوژنیک با افزودن مکمل‌های محافظت نشده افزایش یافت که با نتایج ولامینک و همکاران (۲۰۰۸)

مطابقت دارد. کاهش جمعیت قارچ‌های بی‌هوازی در شکمبه و همچنین کاهش جمعیت باکتری‌های گروه *Butyrivibrio* را می‌توان از جمله دلایل کاهش غلظت بوتیرات دانست. افزودن روغن سویا، ماهی یا منابع روغن اشباع در مطالعه پوتو وهمکاران (۲۰۱۱) تأثیری بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار نداشت. با این‌حال روغن ماهی سبب کاهش استات و افزایش غلظت مولی پروپیونات و روغن ماهی و سویا سبب کاهش غلظت بوتیرات شدند. در مطالعه هیرستوف و همکاران (۲۰۰٤) اسیدهای لینولنیک، لینولئیک و اولئیک سبب افزایش غلظت پروپیونات سبت به گروه شاهد شدند. با این‌حال تنها اسید لینولنیک و اسید لینولئیک سبب کاهش استات و بوتیرات نسبت به گروه کنترل شدند و اسید اولئیک در این دو مورد تأثیری نداشت. این نتایج نمایانگر بی‌اثر بودن مکمل‌های میکروکپسوله میلارد با سطوح روغن کم و متوسط بر متابولیسم عادی در شکمبه است. در مطالعه حاضر هم بیشترین کاهش در غلظت اسیدهای چرب فرار و استات مربوط به گروه دریافت کننده روغن ماهی بود که با نتایج مربوط به قابلیت هضم کاملا قابل توجیه است. کاهش کمتر قابلیت هضم و غلظت اسیدهای چرب فرار در اثر افزودن روغن‌های میکروکپسوله در مقایسه با روغن ماهی و اسیدهای چرب آزاد روغن ماهی می‌تواند بدلیل سمیت کمتر این اسیدهای چرب برای باکتری‌های سلولولتیک و یا بیوهیدروژناسیون سریع‌تر و بیشتر آنها در اثر حفظ جمعیت بیشتری از باکتری‌های گروه *Butyrivibrio* نسبت به روغن ماهی باشد.

جدول۱۲- اثر افزودن منابع مختلف روغن ماهی بر غلظت مجموع (میلی‌مول در لیتر) و پروفیل (مول در ۱۰۰ مول) اسیدهای چرب فرار در مایع شکمبه

	شاهد	روغ	اسیدچر	نمک	میکروکپسه	میکروکپسه	میکروکپسه	میکروکپسه	میکروکپسه	میکروکپسه	میکروکپسه	S.E.
استات	٦٥٦^{a}	٤٨٩^{e}	٥٠٤^{d}	٦٤٧^{ab}	٦٦٩^{a}	٦٤٥^{ab}	٦٢٣^{b}	٦٢٦^{b}	٦١١^{bc}	٥٩١^{c}	٩/٣
پروپیونات+ایزوبوتیر	٢١٥^{gh}	٤١٩^{a}	٤٠٠^{b}	٢١٨^{g}	٢١١^{h}	٢٢٥^{f}	٢٥٦^{e}	٢٤٧^{e}	٢٨٣^{d}	٣٠٤^{c}	٣/٨
بوتیرات	١٠٥/٣	٦٣/١	٦١/١^{d}	١١٣/٢	١٠٣/٧^{ab}	١١١/١^{a}	٩٥/٤^{b}	٩٥/٧^{b}	٨٢/٥^{c}	٨٣/١^{c}	٥/٦٣
والرات	١٣/٧^{c}	١٦/٦	٢٢/٣^{a}	١٤/١^{b}	١١/١^{c}	١٢/٥^{c}	١٧/٢^{b}	١٨/٨^{b}	١٥/٩^{b}	١٤/٢^{bc}	٢/٢١
ایزو والرات	٥/٣٩^{b}	٦/٧٢	٦/٩^{a}	٧/٧^{a}	٥/٢^{b}	٦/٤^{ab}	٨/٤^{a}	٦/٤^{ab}	٧/٦^{a}	٧/٧^{a}	/٩٢٩
مجموع	١٠٣/٩	٧٤/٠	٧٨/٤^{d}	١٠٥/٣	١٠٤/٤^{a}	١١٠/٣^{a}	٨٨/٢^{bc}	٩٥/٣^{b}	٨٧/٦^{c}	٨١/١٢^{c}	٢/٩٣

علامت بالانویس متفاوت درهر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار آماری است ($P\leq$۰/۰۵)

نتایج متفاوت مشاهده شده بین مطالعات مختلف را می‌توان بازتابی از مواد خوراکی متفاوت استفاده شده در آزمایشات مختلف بمنظور تخمیر نیز دانست. بطورکلی خوراک علاوه بر این‌که جمعیت میکروبی در شکمبه را تحت تأثیر قرار می‌دهد، می‌تواند بر نحوه پاسخ آنها به‌عوامل مختلف هم تأثیرگذار باشد. این امر در آزمایش هوس و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی اثر روغن ماهی بر جمعیت میکروبی در محیط‌های کشت حاوی یونجه یا شبدر به‌عنوان ماده قابل تخمیر کاملا قابل مشاهده است. نتایج آزمایش یانگ و همکاران (۲۰۰۹) در مقایسه اثرات روغن سویا و کتان و مخلوط آنها به عنوان منابع اسید لینولنیک و لینولئیک بر میزان و پروفیل اسیدهای چرب فرار نشان‌دهنده کاهش غلظت کل اسیدهای چرب و بوتیرات در اثر افزودن روغن بود ولی تفاوتی بین انواع روغن‌ها وجود نداشت. افزودن روغن کتان و مخلوط روغن کتان و سویا در این آزمایش سبب افزایش غلظت پروپیونات نسبت به گروه کنترل و روغن سویا شد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این مطالعه علاوه بر تأکید بر اثرات نامطلوب روغن‌ماهی محافظت نشده بر فراسنجه‌های شکمبه‌ای و

قابلیت هضم الیاف، مشخص‌کننده نقش محافظتی مناسب میکروکپسوله‌کردن با مواد میلارد بوده و عدم کامل بودن فرایند بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب روغن ماهی و تولید واسطه‌های مختلف در فرایند بیوهیدروژناسیون بود. در این ارتباط، تأثیر متفاوت استفاده از انواع روش‌های محافظت اسیدهای چرب از جمله استفاده از فرایند کلسیمی کردن و یا استفاده از ترکیبات مختلف به عنوان مواد دیواره ای (پوشاننده) اسیدهای چرب غیراشباع در فرایند میکروکپسوله کردن بر روند تولید و تجمع انواع واسطه های بیوهیدروژناسیون، بسیار جالب توجه بود. با این‌حال، باتوجه به قابلیت متفاوت مواد پوشاننده مختلف مورد استفاده در این تحقیق در تحریک یا جلوگیری از فرایند تخمیر و اثرات احتمالی آنها بر pH لحظه‌ای محیط انکوباسیون در کنار تأثیرات متفاوت بر سرعت و میزان آزاد سازی روغن در هر لحظه، و تأثیر احتمالی میزان دسترسی لحظه‌ای به اسیدهای چرب غیراشباع در کنار سایر شرایط محیطی از جمله pH بر چگونگی پیشرفت فرایند بیوهیدروژناسیون و تجمع محصولات حدواسط، تحقیقات بیشتری در این ارتباط و در ارتباط با اثر این مکمل ها بر جمعیت و فعالیت گروه‌های مختلف میکروبی دخیل در فرایند بیوهیدروژناسیون مورد نیاز است

تشکر و قدردانی

این پژوهش تحت پوشش حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۸۹۰۰۰۶۷۷ انجام شده است. بعلاوه مولفین از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران برای تأمین بخشی از هزینه های این تحقیق سپاسگذاری می نمایند.

منابع مورد استفاده

AbuGhazaleh AA and Jenkins TC, 2004. Short communication: Docosahexaenoic acid promotes Vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. J Dairy Sci 87:1047-1050.

Bessaa RJB, Alvesa SP, Jerónimoa E, Alfaiab CM, Pratesb JAM and Silvaa JS, 2007. Effect of lipid supplements on ruminal biohydrogenation intermediates and muscle fatty acids in lambs. Eur J Lipid Sci Tech 109: 868–878.

Boeckaert C, Vlaeminck B, Dijkstra J, Issa-Zacharia A, van Nespen T, van Straalen W and Fievez V, 2008. Effect of dietary starch or micro algae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. J Dairy Sci 91: 4714-4727.

Broderick GA and Kang JH, 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. J Dairy Sci 63:64-75.

Chalupa W, Rickabaugh B, Kronfeld D and Sklan SD, 1984. Rumen fermentation in vitro as influenced by long chain fatty acids. J Dairy Sci 67:1439–1444.

Chalupa WM, Kronfeld PA, Coatesville DS, Schneider PA, Milwaukee PL and Sklan WI, (Rehovot, IL), 1991.Methods of increasing milk yields in ruminants. The Trustees of the University of Pennsylvania (Philadelphia, PA): United States Patents.

Champagne CP and Fustier P, 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. Curr Opin Biotech 18: 184-190.

Chow TT, Fievez V, Moloney AP, Raes K, Demeyer D and Smet SD, 2004. Effect of fish oil on in vitro rumen lipolysis, apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediates. Anim Feed Sci Tech 117: 1-12.

Destaillats F, Trottier JP, Galvez JM and Angers P, (2005). Analysis of alpha-linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids. J Dairy Sci 88:3231-3239.

Doreau M and Chilliard Y, 1997. Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. Reprod Nutr Dev 37:113-124.

Doreau M and Ferlay A, 1995. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review, Livest Prod Sci 43:97-110.

Fang X, 2003. Microencapsulation of linoleic acid with low- and high-molecular-weight components of soluble soybean polysaccharide and its oxidation process. Biosci Biotech Biochem 67: 1864-1869.

FASS, 2010. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. 3rd rev. ed. Federation of Animal Sciences Societies Savoy, IL.

Fievez V, Dohme F, Danneels M, Raes K and Demeyer D, 2003. Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation in vitro and in vivo. Anim Feed Sci Technol 104:41–58.

Folch J, Lees M and Stanley GHS, 1957. A simplified method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 226:497-509.

Ganga A, Nieto S, Sanhuez J, Romo C, Speisky H and Valenzuela A, 1998. Concentration and stabilization of n-3 polyunsaturated fatty acids from sardine oil. J Am Oil Chem Soc 75:733-736.

Gharsallaoui A, 2007 Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. Food Res Int. 2007 40: 1107-1121.

Henderson C, 1973. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. J Agric Sci 81:107-112.

Hristov AN, Ivan M, Neill L and McAllister TA, 2003. Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity in vitro. Anim Feed Sci Technol 105: 163–184.

Hristov AN, Grandeen KL, Ropp JK and McGuire MA, 2004. Effect of sodium laurate on ruminal fermentation and utilization of ruminal ammonia nitrogen for milk protein synthesis in dairy cows. J Dairy Sci 87:1820–1831.

Ichihara KI and Fukubayashi Y, 2010. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. J Lipid Res 51:635-640.

Jenkins TC and Palmquist DL, 1984. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. J Dairy Sci 67:978–986.

Jenkins TC, 1993. Lipid Metabolism in the Rumen. J Dairy Sci 76:3851–3863.

Jenkins TC, Wallace RJ, Moate PJ and Mosley EE, 2008. BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. J Anim Sci 86:397-412.

Kim YJ, Liu RH, Rychlik JL and Russell JB, 2002. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ- that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. J Appl Microbiol 92:976–982.

Klein CM and Jenkins TC, 2011. Docosahexaenoic acid elevates trans-18:1 isomers but is not directly converted into trans-18:1 isomers in ruminal batch cultures. J Dairy Sci 94:4676-4683.

Kosaraju SL, Weerakkody R and Augustin MA, 2009. In-vitro evaluation of hydrocolloid-based encapsulated fish oil. Food Hydrocolloid 23:1413-1419.

Lee MRF, Shingfield KJ, Tweed JK, Toivonen V, Huws SA and Scollan ND, 2008. Effect of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids in steers fed grass or red clover silages. Animal 2:1859-69.

Lee MRF, Tweed JKS, Moloney AP and Scollan ND, 2005. The effects of fish oil supplementation on rumen metabolism and the biohydrogenation of unsaturated fatty acids in beef steers given diets containing sunflower oil. J Anim Sci 80:361-367.

Loor JJ, Ueda K, Ferlay A, Chilliard Y and Doreau M, 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of *trans* fatty acid and conjugated linoleic acids in response to dietary forage: concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. J Dairy Sci 87:2472–2485.

Maczulak AE, Dehority BA and Palmquist DL, 1981. Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. Appl Environ Microbiol 42:856-862.

Maia MRG, Chaudhary LC, Figueres L and Wallace R J, 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. A Van Leeuw J Microb 1:303-314.

Martin C, Rouel J, Jouany JP, Doreau M and Chilliard Y, 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. J Anim Sci 86:2642–2650.

McNiven MA, Prestløkken E, Mydland LT and Mitchell AW, 2002. Laboratory procedure to determine protein digestibility of heat-treated feedstuffs for dairy cattle. Anim Feed Sci Technol 96:1-13.

Morvan B, and Joblin KN, 1999. Hydration of oleic acid by *Enterococcus gallinarum, Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus* sp. isolated from the rumen. Anaerobe 5:605–611.

Mosley EE, Nudda A, Corato A, Rossi E, Jenkins TC, and McGuire MA, 2006. Differential biohydrogenation and isomerization of [U-13C] oleic and [1-13C] oleic-acids by mixed ruminal microbes. Lipids 41:513–517.

Mosley EE, Powell GL, Riley MB and Jenkins TC, 2002. Microbial biohydrogenation of oleic acid to *trans* isomers in vitro. J Lipid Res 43:290–296.

Nowak W and Wylegala S, 2005. In situ evaluation of ruminal degradability and intestinal digestibility of extruded soybeans. Czech J Anim Sci 50:281-287.

Ogawa J, Matsumura K, Kishino S, Omura Y and Shimizu S, 2001. Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12- octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus.* Appl Environ Microbiol 67:1246–1252.

Ottenstein DM and Batler DA, 1971. Improved gas chromatography separation of free acids C2-C5 in dilute solution. Anal Chem 43:952-955.

Potu RB, AbuGhazaleh AA, Hastings D, Jones K and Ibrahim SA, 2011. The effect of lipid supplements on ruminal bacteria in continuous culture fermenters varies with the fatty acid composition. J Microb 49:216-223.

Proell JM, Mosley EE, Powell GL and Jenkins TC, 2002. Isomerization of stable isotopically labeled elaidic acid to *cis* and *trans* monoenes by ruminal microbes. J Lipid Res 43:2072– 2076.

Ribeiro CV, Eastridge ML, Firkins JL, St-Pierre NR and Palmquist DL, 2007. Kinetics of fatty acid biohydrogenation in vitro. J Dairy Sci 90:1405–1416.

SAS Institute Inc, 2002. Statistical Analysis System (SAS) User's Guide. SAS Institute. Cary. N. C. USA.

Shahidi F and Han XQ, 1993. Encapsulation of food ingredients. Crit Rev Food Sci Nutr 33: 501-47.

Shingfield KJ, Kairenius P, Arölä A, Paillard D, Muetzel S, Ahvenjärvi S, Vanhatalo A, Huhtanen P, Toivonen V, Griinari JM, and Wallace RJ, 2012. Dietary fish oil supplements modify ruminal biohydrogenation, alter the flow of fatty acids at the omasum, and induce changes in the ruminal Butyrivibrio population in lactating cows. J Nutr 142:1437-1448.

Shingfield KJ, Lee MRF, Humphries DJ, Scollan ND, Toivonen V, Beever DE and Reynolds CK, 2011. Effect of linseed oil and fish oil alone or as an equal mixture on ruminal fatty acid metabolism in growing steers fed maize silage-based diets. J Anim Sci 89:3728-3741.

Strohmaier GKM, Frederiksen OH, Eiler D. (Henderson, NV), 2001. Method for manufacturing rumen bypass feed supplements, Norel Aquisitions, Inc. (Fairlawn, OH): United States Patents.

Tamminga S and Doreau M, 1991. Lipids and rumen digestion. 151–160. In: Jouany J P (ed.): Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion. INRA, Paris.

Teter BB, and Jenkins TC, 2006. Conjugated linoleic acid synthesis within the gut microbial ecosystem of ruminants. Pages 3– 17 in Advances in Conjugated Linoleic Acid Research. Vol 3. Yurawecz MP, Kramer JKG, Gudmundsen O, Pariza MW, and Banni S, ed. AOCS Press, Champaign, IL.

Toral PG, Shingfield KJ, Hervás G, Toivonen V and Frutos P, 2010. Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. J Dairy Sci 93:4804–4817.

Van de Vossenberg JL, and Joblin KN. 2003. Biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids to stearic acid by a strain of *Butyrivibrio hungatei* from the bovine rumen. Lett. Appl. Microbiol. 37:424–428.

Van Soest PJ, Robertson JB and Lewis BA, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J Dairy Sci 74: 3583– 3597.

VanNevel CJ and Demeyer DI, 1996. Effect of pH on biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids and their Ca-salts by rumen microorganisms in vitro. Arch Anim Nutr 49:151-157.

Veira DM, Ivan M and Jui PY, 1983. Rumen ciliate protozoa: effects on digestion in the stomach of sheep. J Dairy Sci 66: 1015-1022.

Vinci AD, Cummings NJ, Kenneth R, Lajoie, Stephen M 1995. Batch process for fatty acid alkaline earth metal salt production, Church & Dwight Co., Inc. (Princeton, NJ): United States Patents.

Vlaeminck B, Mengistu G, Fievez V, Jonge LD and Dijkstra J, 2008. Effect of In Vitro Docosahexaenoic Acid Supplementation to Marine Algae-Adapted and Unadapted Rumen Inoculum on the Biohydrogenation of Unsaturated Fatty Acids in Freeze-Dried Grass. J Dairy Sci 91:1122–1132.

Wachira AM, Sinclair LA, Wilkinson RG, Hallett K, Enser M and Wood JD, 2000. Rumen biohydrogenation of n-3 polyunsaturated fatty acids and their effects on microbial efficiency and nutrient digestibility in sheep. J Agric Sci 135:419–428.

Wallace RJ, McKain N, Shingfield KJ and Devillard E, 2007. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. J Lipid Res 48:2247–2254.

Wąsowska I, Maia MRG, Niedźwiedzka KM, Czauderna M, Ramalho Ribeiro JMC, Devillard E, Shingfield KJ and Wallace RJ, 2006. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C 18 unsaturated fatty acids. Brit J Nutr 95:1199 -1211.

Whitelawa FG, Eadiea JM, Brucea LA and Shand WJ, 1984. Methane formation in faunated and ciliate-free cattle and its relationship with rumen volatile fatty acid proportions. Brit J Nutr 52:261-275.

Yang SL, Bua DP, Wanga JQ, Hua ZY, Lia D, Weia HY, Zhoua LY and Loor JJ, 2009. Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. Animal 3:1562-1569.