

طراحی و توسعه روشی سریع برای ارزیابی محافظت شکمبه‌ای و رهایش پسا شکمبه‌ای ویتامین سی پوشش‌دهی شده با روغن اشباع گیاهی

ساناز احمدی^۱، سیدمحمد رضا شریعت رضوی^۱، سیده‌های ابراهیمی^{۲*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۲. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول: (shebrahimi@um.ac.ir)

چکیده

ویتامین سی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم و عامل کلیدی در عملکردهای زیستی بدن، در گاوهای بالغ به‌صورت درون‌زا سنتز می‌شود، اما عواملی نظیر تنش و بیماری‌ها غلظت پلاسمایی آن را کاهش می‌دهند. به دلیل تخریب سریع ویتامین سی توسط میکروب‌های شکمبه، استفاده از فرم‌های محافظت شده ضروری است. این مطالعه با هدف طراحی روش آزمایشگاهی سریع برای ارزیابی کیفی پوشش‌دهی در یک نمونه ویتامین سی پوشش‌دار شده با روغن اشباع گیاهی انجام شد. آزمایش‌ها شامل اندازه‌گیری نسبت وزنی چربی به ویتامین سی، بررسی موفقیت پوشش‌دهی با اندازه‌گیری pH، ارزیابی تخمیرپذیری شکمبه‌ای با روش تولید گاز و تست رهایش پسا شکمبه‌ای با هضم آنزیمی بود. نتایج نشان داد که ۲۷ درصد محصول را چربی تشکیل داده، اما محافظت شکمبه‌ای تنها ۱۶ درصد موفقیت داشت. همچنین، رهایش پسا شکمبه‌ای ویتامین سی پوشش‌دار در شبیه‌سازی روده‌ای ۱۰۰ درصد بود. برای بهبود محافظت شکمبه‌ای ویتامین سی توصیه می‌شود در صد چربی اشباع در محصول نهایی افزایش یابد.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، ویتامین سی، شکمبه، ویتامین سی محافظت‌شده.

مقدمه

ویتامین سی یک ویتامین محلول در آب و اصطلاح عمومی برای تمام ترکیباتی است که فعالیت بیلوژنیک اسید اسکوربیک را نشان می‌دهند [۱]. ویتامین سی نقش‌های بسیار حیاتی در بدن را برعهده دارد به عنوان مثال مهم‌ترین آنتی اکسیدان در مایعات خارج سلولی شناخته می‌شود [۱]. از طرفی نقش موثر در سیستم تولیدمثل [۲]، سیستم ایمنی، متابولیسم و جذب آهن، سلنیوم، کروم و مس و نیز جذب ویتامین B12 نیز دارد [۳]. همچنین این ویتامین برای التیام زخم‌ها و کاهش التهاب بسیار مفید است. این ویتامین به صورت درون‌زا در کبد گاوهای بالغ سنتز می‌شود و پیش‌ساز آن گلوکز است [۱]. غلظت پلاسمایی این ویتامین با هرگونه تنش نظیر تنش گرمایی و سرمایی، ضایعات کبدی، افزایش وزن و بیماری‌های عفونی مانند ورم پستان کاهش پیدا می‌کند [۴، ۵]. به دلیل اینکه فلور میکروبی شکمبه ویتامین سی را به سرعت تجزیه می‌کند، جبران این کاهش از طریق تغذیه ویتامین سی محافظت نشده امکان‌پذیر نیست [۱، ۴]. لذا به جهت جبران کاهش غلظت پلاسمایی آن پیشنهاد می‌شود تغذیه ویتامین سی محافظت شده مورد استفاده قرار گیرد.

محافظت شکمبه‌ای در برابر تخریب و تجزیه میکروبی از یک سو و قابلیت رهایش کافی در محیط روده دو ویژگی اصلی برای محصولات پوشش‌دار است که باید قبل از تولید انبوه و تجاری‌سازی مورد نظر قرار گیرد. هدف از انجام این آزمایش طراحی و توسعه روش‌های آزمایش سریع، ساده و کارآمد برای بررسی کیفی یک نمونه ویتامین سی پوشش‌دار شده با روغن اشباع گیاهی بود.

مواد و روش‌ها

۱) اندازه‌گیری نسبت وزنی چربی به ویتامین سی در محصول تولیدشده

به جهت به‌دست آوردن نسبت چربی به ویتامین سی، ابتدا در یک ظرف یک گرم ویتامین سی پوشش‌دار ریخته شد و سپس به آن ۵۰ سی‌سی آب مقطر اضافه گردید. پس از آن دمای آب به دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت تا سبب باز شدن چربی و حل شدن ویتامین سی در آب گردد. به‌منظور جداسازی چربی سپس محلول سرد شد و با کاغذ صافی فیلتر شد، ویتامین سی به علت محلول بودن در آب، عبور کرده و چربی روی کاغذ صافی باقی ماند. سپس چربی روی کاغذ صافی به ظرف برگردانده شد و در دمای ۴۰ درجه خشک شد و با داشتن وزن ظرف خالی میزان چربی محتوی آن اندازه‌گیری و طبق جدول زیر سهم چربی در نمونه استفاده شده به دست آمد.

پوشش‌دار شده سی جدول ۱. محاسبه نسبت چربی به ویتامین سی در ویتامین

تکرار	وزن ظرف خالی (گرم)	وزن کاغذ صافی (گرم)	وزن ویتامین سی پوشش‌دار (گرم)	وزن ظرف پس از خشک شدن (گرم)	وزن کاغذ صافی پس از خشک شدن (گرم)	وزن محاسبه شده برای چربی (گرم)
۱	۳۴/۵۳۱	۲/۰۵۵	۱/۰۰۴	۳۴/۷۹۳	۲/۰۶۴	۰/۲۷۱
۲	۳۳/۹۶۷	۲/۱۳۳	۱/۰۰۲	۳۴/۲۳۰	۲/۱۳۳	۰/۲۶۳
۳	۳۶/۶۱۹	۲/۱۹۶	۱	۳۶/۸۹۷	۲/۱۹۰	۰/۲۷۲

مطابق نتایج جدول ۱، به طور میانگین ۲۷ در صد ویتامین سی پوشش‌دار را چربی تشکیل داده است. این آزمایش صرفاً نسبت وزنی چربی و ویتامین سی را نشان می‌دهد.

۲) آزمایش میزان موفقیت پوشش‌دهی

یک گرم ویتامین سی خالص به ۵۰ سی‌سی آب اضافه و به صورت کامل مخلوط شد. باتوجه به درصد چربی اندازه‌گیری شده در آزمایش قبل، معادل یک گرم ویتامین سی خالص، از ویتامین سی پوشش‌دار (۱/۳۹۵ گرم) به ۵۰ سی‌سی آب اضافه شد و بعد از اختلاط کامل pH هر دو محلول اندازه‌گیری شد.

جدول ۲. مقایسه pH محلول‌های ویتامین سی خالص و پوشش‌دار

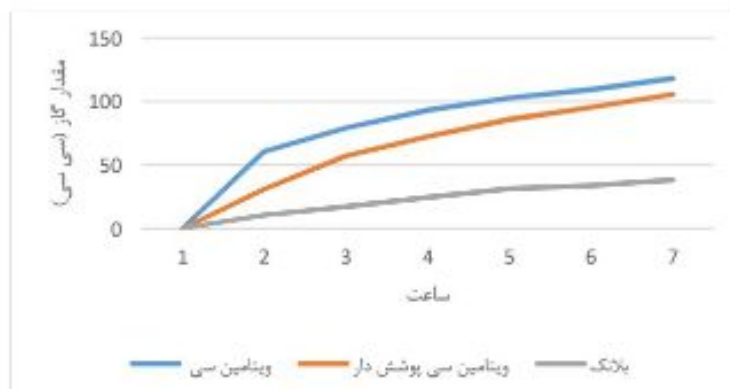
نمونه	pH
آب مقطر	۵/۹۸
محلول ویتامین سی خالص	۲/۷۷
محلول ویتامین سی پوشش‌دار	۲/۹۹

چنانچه ویتامین سی به نحو مطلوبی پوشش‌دهی شده بود باید pH در مخلوط ویتامین سی پوشش‌دار و آب در محدوده آب مقطر می‌بود اما همانطوریکه مشاهده می‌شود، pH مخلوط به محلول ویتامین سی در آب نزدیک است و لذا پوشش نتوانسته بود از انحلال ویتامین سی در محیط آبی جلوگیری کند.

۳) آزمایش تخمیر پذیری ویتامین سی پوشش‌دار

تخمیر پذیری ویتامین سی پوشش‌دار با استفاده از روش تولید گاز در آزمایشگاه، به روش منک و استینگاس، انجام شد [۷]. مایع شکمبه از یک راس گاوشیری دارای فیستولای شکمبه‌ای با نژاد هلشتاین و جیره‌ای پر پایه‌ای علوفه و کنسانتره، پیش از شیردوشی و خوراک‌دهی صبح در مرکز تحقیقات گاوشیری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و داخل فلاسک ۳۹ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی به‌سرعت به آزمایشگاه منتقل شد. مایع شکمبه توسط یک پارچه تنظیف چهارلایه صاف گردید و با نسبت ۱ به ۲ با محیط کشت بی‌هوازی، تحت شرایط بی‌هوازی و دمیدن گاز دی اکسید کربن مخلوط شد. یک گرم ویتامین سی خالص و ۱/۳۹۵ گرم ویتامین سی پوشش‌دار (معادل یک گرم ویتامین سی خالص) با چهار تکرار درون ویال‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. علاوه بر این، سه تکرار بدون ویتامین سی به‌عنوان پلانک قرار داده شد. ویال‌ها پس از

افزودن ۱۵۰ میلی‌لیتر از مخلوط مایع شکمبه و محلول بافر با درپوش لاستیکی بسته شد و در حمام آب گرم با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. با توجه به اینکه ویتامین سی در محیط برون‌تنی شکمبه‌ای طی مدت ۶ ساعت به‌طور کامل تخمیر می‌شود [۶]، بنابراین کشت برون‌تنی تولید گاز به‌مدت ۶ ساعت انجام گرفت. در فواصل زمانی یک ساعت ویال‌ها در حمام آب گرم به آرامی به حالت چرخشی حرکت داده می‌شدند. فشار گاز تولیدی در فواصل یک دقیقه‌ای توسط دستگاه اتوماتیک اندازه‌گیری فشار گاز ثبت شد. پس از تبدیل فشار به حجم با استفاده از رابطه خطی بین این دو متغیر، حجم گاز جمع‌ی در زمان‌های ۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ ساعت محاسبه و گزارش شد.



شکل ۱. نمودار تولید گاز جمع‌ی نمونه‌های آزمایشی و پلاتک طی مدت ۶ ساعت تخمیر برون‌تنی شکمبه‌ای

جدول ۳. مقادیر گاز تولیدشده در ۶ ساعت کشت گاز

نمونه	مقدار گاز تولیدشده (سی سی)
پلاتک	۳۸/۱۳
ویتامین سی خالص	۱۱۸/۱۸
ویتامین سی پوشش‌دار	۱۰۵/۴۱

همان‌طوریکه در جدول ۳ و شکل یک نشان داده شده است، میزان تولید گاز جمع‌ی خالص ناشی از تخمیر برون‌تنی شکمبه ای یک گرم ویتامین سی خالص، میزان ۸۰/۰۵ سی سی بوده است در حالیکه از تخمیر برون‌تنی شکمبه‌ای ۱/۳۹۵ گرم ویتامین سی پوشش‌دار شده ۶۷/۲۸ سی سی گاز تولید شده است. لذا میزان موفقیت پوشش‌دهی در برابر رهایش در محیط شکمبه حدود ۱۶ درصد بوده است.

۴) تست رهایش پسا‌شکمبه‌ای

برای بررسی میزان رهایش پسا‌شکمبه‌ای بقایای کشت برون‌تنی شکمبه‌ای، محتویات بطری کشت حاوی بقایای معادل یک گرم ویتامین سی دارای پوشش، صاف شدند و مورد هضم دو مرحله‌ای پپسین-پانکراتین قرار گرفتند. در این آزمایش بطری‌های بدون ویتامین سی و حاوی مقادیر ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم ویتامین سی اضافه شده به بافر حاوی آنزیم نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از مدت ۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه، pH محلول‌های باقی‌مانده اندازه‌گیری شد.

جدول ۴. مقادیر PH اندازه‌گیری شده پس از کشت شبیه‌ساز رودهای

نمونه	pH
-------	----

۷/۳۸	بدون ویتامین سی
۶/۹۷	۳۰۰ میلی گرم ویتامین سی
۶/۶۸	۶۰۰ میلی گرم ویتامین سی
۷/۱۳	بقایای ویتامین سی پوشش‌دار پس از ۶ ساعت کشت شکمبه‌ای

با توجه به آزمایش برون‌تنی شکمبه‌ای، انتظار می‌رفت میزان ۱۶۰ میلی گرم از ویتامین سی پوشش‌دار باقی مانده و به روده کوچک وارد شده باشد. همانطوریکه در جدول ۴ خلاصه شده است، بطری بدون ویتامین سی pH معادل ۷/۳۸ داشته است و در نتیجه حضور ۳۰۰ میلی گرم ویتامین سی، ۰/۴۱ واحد افت pH مشاهده شده بود. این افت با حضور ۶۰۰ میلی گرم ویتامین سی در بافر، معادل ۰/۷ بود. افت ۰/۲۵ واحدی pH در بطری حاوی بقایای تخمیر نشده شکمبه‌ای نشان می‌دهد ویتامین سی پوشش‌دار تخمیر نشده در نتیجه هضم آنزیمی برون‌تنی روده‌ای طی مدت ۶ ساعت هضم و رهایش یافته است.

نتایج و بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که نمونه ویتامین سی پوشش‌دار حاوی ۲۷ درصد چربی به عنوان پوشش‌دهنده ویتامین سی بود. با این حال، آزمایش pH محلول ویتامین سی پوشش‌دار (۲/۹۹) در مقایسه با آب مقطر (۵/۹۸) و ویتامین سی خالص (۲/۷۷) حاکی از عدم موفقیت کامل پوشش‌دهی در جلوگیری از رهایش زودهنگام ویتامین سی بود. در آزمایش تخمیرپذیری شکمبه‌ای، تولید گاز تجمعی از ویتامین سی پوشش‌دار (۶۷/۲۸ سی سی) در مقایسه با ویتامین سی خالص (۸۰/۰۵ سی سی) نشان‌دهنده موفقیت ۱۶ درصدی پوشش‌دهی در محافظت از تخریب شکمبه‌ای بود. در تست رهایش پسا شکمبه‌ای، کاهش ۰/۲۵ واحدی pH در بقایای ویتامین سی پوشش‌دار پس از هضم آنزیمی رودهای، رهایش موفقیت‌آمیز ویتامین سی تخریب نشده در شکمبه را در محیط برون‌تنی روده را تأیید کرد. این نتایج بیانگر آن است که اگرچه نمونه مورد مطالعه قابلیت رهایش پسا شکمبه‌ای دارد، اما کارایی پوشش‌دهی آن در برابر تخریب شکمبه‌ای محدود است.

نتیجه‌گیری کلی

روغن‌های اشباع گیاهی پتانسیل پوشش‌دهی ویتامین سی را دارند اما محافظت بیشتر ویتامین سی در برابر تجزیه شکمبه‌ای نیازمند بهینه‌سازی روش پوشش‌دهی است و در این راستا افزایش سهم چربی در محصول پوشش‌دار توصیه می‌شود.

منابع

1. Matsui, T., 2012. 'Vitamin C nutrition in cattle', Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 25(5), 597-605
2. Gorzalez-Maldonado, J., Rivas-Caceres, R.R., Garcia-Bonilla, J.P., Torres-Moreno, M. and Cuestas-Ayllon, M., 2019. 'Supplementation of ascorbic acid to improve fertility in dairy cattle. Review', Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 10(4), 1000-1012.
3. McDowell, L.R., 2020. John Wiley and Sons Ltd (Wiley-Blackwell)
4. Seifzadeh, S., Seifdavati, J., Abdi-Benemar, H., Salem, A.Z.M., Sharifi, R.S. and Elghandour, M.M.M.Y., 2022. 'Dietary vitamin C in pre-parturient dairy cows and their calves: blood metabolites, copper, zinc, iron, and vitamin C concentrations, and calves growth performance', Tropical Animal Health and Production, 54(1), 54.
5. Doković, R., Kurubić, V., Ilić, Z., Cincović, M., Petrović, M., Fratrić, N. and Jašović, B., 2023. 'The effect of Vitamin C in the therapy of haemolactia in dairy cows', Acta Scientiae et Intellectus, 2021, 1-7.
6. Knight, C.A., Dutcher, R.A., Guerrant, N.B. and Beechdel, S.I., 1941. 'Utilization and excretion of ascorbic acid by the dairy cow', Journal of Dairy Science, 24(7), 567-577
7. Menke, K.H. and Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Animal Research and Development, 28, 7-55.



Development of a rapid method for evaluating ruminal protection and post-rumen releasability of a vitamin C coated with saturated vegetable oil

Sanaz Ahmadi¹, Seyed Mohammad Reza Shariatrazavi¹, Seyed Hadi Ebrahimi^{2*}

4. M.Sc. Student, Department of Animal Science, University of Ferdowsi, Mashhad, Iran

5. Professor, Department of Animal Science, University of Ferdowsi, Mashhad, Iran

*Corresponding author E-mail: shahbrahimi@um.ac.ir

Abstract

Vitamin C, as an important antioxidant and key factor in biological functions of the body, is synthesized endogenously in adult cattle, but factors such as stress and diseases reduce its plasma concentration. Due to the rapid degradation of vitamin C by rumen microbes, the use of protected forms is essential. This study aimed to design a rapid *in vitro* method for qualitative evaluation of vitamin C sample coated with saturated vegetable oil. The tests included measuring the weight ratio of fat to vitamin C, examining the success of coating by measuring pH, evaluating rumen fermentability by gas production technique, and post-ruminal releasability by an enzymatic digestion. The results showed that 27% of the product was fat, but ruminal protection was only 16% successful. Also, the post-rumen release of coated vitamin C in intestinal simulation was 100%. To improve rumen protection of vitamin C, it is recommended to increase the percentage of saturated fat in the final product.

Keywords: Antioxidant, Vitamin C, Ruminal, Protected Vitamin C.