13 (3) 49-56, Autumn 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effects of using acidogenic Top Chlor in close-up dry period on urine pH, blood calcium concentration and spectral peak bands of chlorine ion with protein fraction

Ghasem Ali Teymouri Jervekani [1*], Abbas Rajaeerad [2]

[1] *Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran*
[2] *Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of technology, Isfahan, Iran*

Key Words
Top Chlor ™ product
DCAD
Close-up
Urine pH

Abstract

Introduction: Adding anions from anionic salt such as calcium chloride, ammonium chloride, calcium sulfate and magnesium sulfate to the prepartum diet reduced the incidence of postpartum hypocalcemia in dairy cow but reduced feed intake. Top Chlor ™ is an acidifying coproduce which inducing mild metabolic acidosis and improving the palatability of prepartum diet. This study was conducted to evaluate the effects of Top Chlor ™ on urine pH, blood calcium concentration and chlorine ion binding with protein fraction of feed.

Materials & Methods: Close-up cows (255 days of gestation) in a dairy farm, were randomly divided into two groups of control (non-anionic salt, n=30) and treatment (Top Chlor ™, n=30). Urine and Serum samples were collected before calving and also at the time of partition, 24 and 48 hours after calving. Molecular structural changes of Top Chlor ™ were studied by infrared spectroscopy and X-ray diffraction. The data were analyzed by mixed procedures of SAS software.

Result: The urine pH of cows that consumed Top Chlor™ decreased significantly (6.56 vs. 8.15, $P<0.05$). Cows that fed Top Chlor ™ before calving had higher blood calcium concentrations within 24 hours of calving (8.38 vs. 7.32 mg/dl, $P<0.05$). Serum phosphor concentration decreased in cows receiving control diet at 24 hours before calving (4.48 vs. 5.97 mg/dl, $P <0.05$). Serum magnesium concentration was not significant ($P>0.05$). X-ray diffraction analysis showed that organic structures and amino acids were coordinated with magnesium in 6-aqueous magnesium complexes with different states. Also, the molecular structure studies showed that during the processing of Top Chlor™, free NH_2 compounds in amino acid structures bonded with chlorine ions and NH_3Cl complex was formed.

Conclusion: The results of the study showed that the Top Chlor™ has a suitable acidifying power and this improved the postpartum blood calcium concentration of dairy cow. Also, the results of FTIR showed that chlorine ion has bonded with the protein part of the feed.

* Corresponding Author's email: gha.teimoori@gmail.com
Received: 31 May 2021; Reviewed: 27 July 2021; Revised: 6 September 2021; Accepted: 7 October 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.300006.2613

مقاله پژوهشی

اثرات استفاده از محصول اسیدوژنیک تاپ‌کلر در گاوهای انتظار زایمان بر pH ادرار، غلظت کلسیم خون و پیک جذب یون کلر با بخش پروتئینی خوراک

قاسمعلی تیموری‌جروکانی[1*]، عباس رجایی‌راد[2]

[1] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

[2] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

کلمات کلیدی

تاپ‌کلر
اختلاف کاتیون و آنیون
دوره انتظار زایمان
pH ادرار

چکیده

مقدمه: اضافه نمودن آنیون‌ها از منابع نمکی مانند کلسیم‌کلراید، آمونیوم کلراید، کلسیم سولفات و منیزیم سولفات به جیره قبل زایش، وقوع هایپوکلسیمی را در گاوها کاهش داده‌است ولی مصرف خوراک نیز کاهش داده است. تاپ‌کلر، خوراک اسیدی‌کننده‌ای است که اساس تولید آن، علاوه بر القای اسیدوز متابولیکی خفیف، بهبود خوش‌خوراکی گاوهای انتظار زایمان بوده است. هدف پژوهش حاضر بررسی استفاده از تاپ‌کلر در خوراک گاوهای انتظار زایمان، بر کاهش pH ادرار، غلظت کلسیم خون و هم‌چنین اتصال یون کلر به ترکیبات آلی خوراک بود.

مواد و روش‌ها: در یک گاوداری ۹۰۰راسی، گاوهای انتظار زایمان در روز ۲۵۵ آبستنی به دو گروه شاهد و تیمار تاپ‌کلر تقسیم شدند و جیره‌های آزمایشی را دریافت کردند. نمونه‌های سرم و pH ادرار در قبل زایمان و هم‌چنین نمونه سرم در زمان زایش، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از زایش جمع‌آوری شد. تغییرات ساختار مولکولی تاپ کلر به‌وسیله طیف‌سنجی مادون قرمز و پراش اشعه ایکس مورد مطالعه قرارگرفت. داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SAS و با رویه Mixed انجام گرفت.

نتایج: گاوهایی که تاپ‌کلر مصرف کرده بودند pH ادرار کم‌تر (۶/۵۶ در مقابل ۸/۱۵؛ P<۰/۰۵) و غلظت کلسیم خون بیش‌تری (۸/۳۸ درمقابل ۷/۳۲ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در ۲۴ ساعت پس از زایش داشتند (P<۰/۰۵). غلظت فسفر خون در ۲۴ ساعت پیش از زایش در گاوهای دریافت کننده جیره کنترل کاهش نشان داد (۴/۴۸ درمقابل ۵/۹۷ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، P<۰/۰۵). غلظت منیزیم خون تحت تاثیر قرار نگرفت (P>۰/۰۵). آنالیز پراش اشعه ایکس نشان داد ساختارهای آلی و آمینواسیدها با حالت‌های گوناگونی با منیزیم در کمپلکس‌های منیزیم ۶ آبه جفت شده است. آنالیز طیف‌سنجی نشان داد که در فرایند تولید تاپ‌کلر، گروه‌های آمینی آزاد موجود در ساختار آمینواسیدها با یون کلر پیوند برقرار کرده است و تشکیل آمین‌هیدروکلراید داده است.

نتیجه‌گیری و بحث: این تحقیق نشان داد که محصول تاپ‌کلرداری قدرت اسیدی‌کننده مطلوبی دارد که سبب بهبود غلظت کلسیم‌خون گاوها شد. داده‌های حاصل از طیف سنجی مادون قرمز نشان داد که یون کلر با بخش پروتئینی خوراک، پیوند برقرار کرده است.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: gha.teimoori@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۰ خرداد ۱۴۰۰؛ تاریخ داوری: ۵ مرداد ۱۴۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۱۵ شهریور ۱۴۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۵ مهر ۱۴۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.300006.2613

مقدمه

هایپوکلسیمی یکی از مهم‌ترین اختلالات متابولیکی است که طی آن غلظت کلسیم خون به کم‌تر از ۸ میلی‌گرم در دسی‌لیتر می‌رسد و بیش از ۵۰ درصد گاوهای چندشکم‌زا را در زمان زایش تا ۳ روز پس از زایش مبتلا می‌کند (Goff، ۲۰۰۸). در طی تحقیقی، ۱۴۶۲ راس گاو در ۴۸ ساعت پس از زایش خونگیری شدند و گزارش شد که ۲۵، ۴۱، ۴۹ و ۵۴ درصد گاوهای با دوره شیردهی اول، دوم، سوم و چهارم به بالاتر، از هایپوکلسیمی رنج می‌برند (Reinhardt و همکاران، ۲۰۱۱).هایپوکلسیمی سبب کاهش مصرف خوراک، افزایش غلظت اسیدهای چرب غیراستریفه و کاهش عملکرد سیستم ایمنی می‌شود (Martinez و همکاران، ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳). هم‌چنین، سبب افزایش بروز بیماری‌های متابولیکی نیز شده‌است (Santos و همکاران، ۲۰۱۹). گاوهای که غلظت کلسیم خون کم‌تر از ۸ میلی‌گرم در دسی‌لیتر در ۲ ساعت پس از زایش داشتند، رخداد عفونت رحمی ۴۱/۷ درصد و بروز جفت‌ماندگی ۵۹/۶ درصد در آن‌ها افزایش یافت. در همین مطالعه گزارش شد که گوساله‌های متولدشده از گاوهای هایپوکلسیمی، ۱۶ درصد بروز اسهال بیش‌تری داشتند (Wilhelm و همکاران، ۲۰۱۷).این تحقیقات نشان می‌دهد که هایپوکلسیمی می‌تواند سبب افزایش بروز بیماری‌های متابولیک و درنتیجه کاهش تولید شیر و تولیدمثل شود. کاهش اختلاف کاتیون و آنیون جیره غذایی گاوها در پیش از زایش، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های کنترل کننده هایپوکلسیمی شناخته شده است (Goff، ۲۰۰۸). در نتیجه مکمل کردن آنیون‌ها از منابع نمکی مانند کلسیم کلراید، آمونیوم کلراید، کلسیم سولفات و منیزیم سولفات به جیره رواج پیدا کرد. مطالعات نشان دادند که افزودن نمک‌های آنیونیک تا سطح اختلاف کاتیون و آنیون برابر با ۵۰- تا ۱۰۰- میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم ماده خشک در جیره قبل زایش، ۱۳ درصد غلظت کلسیم خون را در پس از زایش بهبود داد و به‌طور موفقیت‌آمیزی تب شیر را کنترل کرد (Charbonneau و همکاران، ۲۰۰۶). اما افزودن نمک‌های آنیونیک، ۱/۳ کیلوگرم ماده خشک مصرفی را در پیش از زایش کاهش داد Charbonneau و همکاران، ۲۰۰۶). کاهش مصرف ماده خشک در پیش از زایمان سبب افزایش بروز اختلالات متابولیکی و کاهش تولید شیر در پس از زایش می‌شود (کمالی و همکاران ۱۳۹۹؛ ابائی‌کورس و همکاران، ۱۴۰۰). هر یک کیلوگرم کاهش مصرف خوراک پیش از زایش، وقوع بروز بیماری متریت را تا ۳ برابر کرد و دو کیلوگرم شیر تولیدی را در ۲۱ روز ابتدای زایمان کاهش داد (Huzzey و همکاران، ۲۰۰۶). محصولات اسیدی‌کننده سوی‌کلر، بیوکلر و انیمیت که از ترکیب اسیدکلریدریک با کنجاله سویا پدیدار شدند، تلاش دارند منابع آنیونی خوش‌خوراک برای گاوهای انتظار زایمان معرفی کنند (Leno و همکاران، ۲۰۱۷). گزارش شد که با کاهش اختلاف کاتیون و آنیون جیره گاوهای انتظار زایمان از ۱۷۰+ به ۶۹- میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم ماده خشک به‌وسیله خوراک آلی انیمیت، علاوه بر حفظ مصرف خوراک گاوها در پیش از زایش، غلظت کلسیم خون، مصرف خوراک و شیر تولیدی گاوها در بعدزایش بهبود یافت(Leno و همکاران، ۲۰۱۷). هر چند که در مطالعه فراتحلیلی اخیر، هر دو منابع آنیونی (نمک و آلی) مصرف خوراک را کاهش دادند (Santos و همکاران، ۲۰۱۹). تاپ‌کلر با شماره ثبت اختراع ۱۰۱۹۴۰، خوراک اسیدی کننده‌ای است که اساس تولید آن، علاوه بر القای اسیدوز متابولیکی خفیف، بهبود خوش‌خوراکی گاوهای انتظار زایمان بوده است. به‌طوری که این محصول آنیونیک آلی، حاوی ۱۱ درصد کلر و ۱/۶ درصد گوگرد می‌باشد و می‌تواند اختلاف کاتیون و آنیون جیره را کاهش دهد. هدف این آزمایش بررسی اثر تاپ‌کلر در خوراک گاوهای انتظار زایمان، بر کاهش pH ادرار، بهبود غلظت کلسیم خون و هم‌چنین پیوند یون کلر با ترکیبات آلی خوراک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی در یک گاوداری ۹۰۰ راسی واقع در منطقه جوزدان نجف‌آباد (مجتمع شیر و گوشت نصر) و در سال ۱۳۹۷ انجام شد. گاوهای انتظار زایمان در روز ۲۵۵ آبستنی در دو گروه شاهد (جیره بدون آنیونیک) و تیمار (تاپ‌کلر)، به‌طور تصادفی تقسیم و جیره را مصرف کردند. تاپ‌کلر با شماره ثبت اختراع ۱۰۱۹۴۰، و با شماره مجوز دامپزشکی ۹۱۳۹۶۰۳۰۱۱۶۵۹۷۷ در گروه تحقیق و توسعه شرکت سالم دام سپاهان با شماره ثبت ۵۵۵۲۸ طراحی و تولید شده است. تاپ کلر خوراک اسیدی کننده‌ای است که حاوی ۱۱ درصد کلر و ۱/۶ درصد گوگرد ۳/۱ درصد کلسیم و۲/۸ درصد منیزیم می‌باشد و می‌تواند اختلاف کاتیون و آنیون جیره را به‌طور موفقیت‌آمیزی کاهش دهد.در تیمار، ۶/۱ درصد از غلات و منابع پروتئینی با خوراک آنیونیک آلی تاپ‌کلر جایگزین گردید (جدول ۱). گاوها پیش از زایش یک بار در روز و پس از آن دو بار در روز تغذیه شدند و دسترسی آزاد به آب داشتند. هم‌چنین در پس از زایش از یک جیره استاندارد برای گاوهای تازه‌زا استفاده شد. جیره آزمایشی پیش و پس از زایمان با نرم‌افزار سیستم پروتئین و کربوهیدرات دانشگاه کرنل تنظیم شد (جدول ۱). داده‌های pH ادرار توسط دستگاه pH متر پرتابل به‌صورت تصادفی در قبل از شروع آزمایش و سپس ۲ بار در هفته، جمع‌آوری و اندازه‌گیری شد. نمونه خون در ۱۲ و ۲۴ ساعت قبل زایمان و زمان صفر (زایمان) و ۱۲ و ۲۴ ساعت بعداز زایمان جمع‌آوری و به آزمایشگاه ارسال گردید. غلظت سرمی کلسیم با روش کمپلکس کرسول فتالئین،منیزیم با روش زایلیدیل‌بلو و فسفر را با روش یوی و براساس کیت‌های تشخیصی

(پارس‌آزمون، تهران، ایران) و با دستگاه اتوآنالیزر و مطابق دستورالعمل، اندازه‌گیری شدند.

جدول ۱: اقلام خوراکی و آنالیز شیمیایی جیره‌ها

ترکیبات (درصد)	شاهد	تاپ کلر
سیلوی ذرت	۳۶/۶	۶۳/۲
یونجه	۱۹/۸	۱۸/۶
دانه جو	۶/۵	۵/۶
دانه ذرت	۱۲/۷	۱۳/۶
کنجاله سویا	۵/۴	۵/۲
کنجاله کلزا	۴/۱	۳/۱
فول فت سویا	۱/۲	۱/۲
پودر گوشت	۱/۷	۱/۷
سبوس گندم	۸/۶	۶/۱
محصول تاپ‌کلر[1]	۰	۶/۱
توکسن بایندر	۰/۱	۰/۱
مکمل ویتامینه[2]	۰/۷	۰/۷
مکمل معدنی[3]	۱/۲	۱/۲
اکسید منیزیم	۰/۲	۰
کربنات کلسیم	۱/۲۴	۰/۵۴
ترکیب شیمیایی (درصد ماده خشک)		
ماده خشک	۴۵/۵	۴۸/۱
انرژی خالص شیردهی (Mcal/kg)	۱/۴۸	۱/۴۷
پروتئین خام	۱۴/۱	۱۴
دیواره سلولی	۳۷/۷	۳۵/۴
کلسیم	۰/۷۵	۱/۲۸
فسفر	۰/۴۵	۰/۴۷
پتاسیم	۱/۱۸	۱/۲۰
منیزیم	۰/۴۴	۰/۴
کلر	۰/۲	۰/۸۵
تعادل کاتیون-آنیون (meq/kg)[4]	۱۸۶	-۷۶

۱. کنجاله سویا و غلات فراوری شده با نمک‌های آنیونیک به کمک دستگاه اکسترودر (۲۰ درصد پروتئین، ۱۱ درصد کلر و ۱/۶ درصد گوگرد ۳/۱ درصد کلسیم و ۲/۸ درصد منیزیم، سالم دام سپاهان، اصفهان، ایران).

۲. هر کیلوگرم مکمل ویتامنی حاوی ۱۰۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۳۶۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D_3 و ۱۵۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E.

۳. هر کیلوگرم مکمل معدنی حاوی ۰/۳ گرم مس، ۰/۲ گرم آهن، ۰/۷ گرم منگنز، ۰/۸ گرم روی، ۰/۹گرم منیزیوم، ۰/۰۰۹گرم کبالت، ۰/۰۰۳ گرم سلنیوم و ۰/۰۰۲ گرم ید.

۴. (مجموع میلی‌اکی والان کاتیون‌های سدیم و پتاسیم) – (مجموع میلی‌اکی والان آنیون‌های کلر و گوگرد) در کیلوگرم جیره.

ماده‌خشک خوراک و علوفه‌ها، با خشک‌کردن نمونه‌ها در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا ثابت‌ماندن وزن، به‌دست آمد. نمونه‌های باقی‌مانده خوراک هر هفته با هم مخلوط شدند. جیره‌ها به‌صورت هفتگی بر اساس ماده خشک علوفه‌ها تصحیح گردیدند. نمونه‌های خشک شده و باقی‌مانده خوراک هر گاو، در پیش و پس از زایمان به‌صورت جداگانه با هم مخلوط و با آسیاب مجهز به الک یک میلی‌متری آسیاب شدند. سپس نمونه آسیاب‌شده برای سنجش غلظت نیتروژن، عصاره اتری، خاکستر و الیاف نامحلول در شوینده خنثی مورد ارزیابی قرارگرفت. برای انجام طیف‌سنجی مادون قرمز نمونه تاپ کلر، با توجه به این‌که نمونه مربوطه جامد بودند ابتدا مقداری از هر نمونه با پودر پتاسیم برمید با نسبت ۱ به ۱۰۰ مخلوط و در هاون ساییده شد و در ادامه در قالب تحت فشار قرارگرفته و قرص شفافی از آن‌ها تهیه شد. سپس نمونه در دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز قرار داده شد و محل نوارهای جذبی مادون قرمز ثبت گردید (Tamm و همکاران، ۱۹۹۷). در طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس، مقداری از نمونه تاپ کلر کاملاً پودر شد و تمامی‌صفحات موجودنمونه در مقابل اشعه قرار گرفت. یک‌دسته اشعه ایکس با طول موج معین (طول موج= ۱/۵۴۰ آنگستروم) تحت زوایای مختلف به هر صفحه تابانیده و هر صفحه در زاویه معین خود، اشعه تابیده شده را منعکس یا به‌عبارت صحیح پراش‌داد. در این حالت (پراش) طول مسیر نفوذ و بازگشت اشعه از سطوح موازی داخلی، مضرب صحیحی از طول موج می‌باشد. داده‌های پراش پرتو ایکس پودری، به‌صورت شدت فوتون بر حسب زاویه دتکتور (2θ) است. این داده‌ها به‌صورت لیستی از محل پیک و شدت آن‌ها آماده شدند (Case و همکاران ۲۰۲۰). داده‌های با اندازه‌گیری‌های تکرار شونده شامل pH ادرار، با استفاده از رویه Mixed و نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) و مطابق رابطه ۱تجزیه شدند (رابطه ۱):

$$y_{ijklo} = \mu + Treat_i + Time_j + (Treat \times Time)_{ij} + \beta_{lk} \times X_{ijk} + Cow_l + e_{ijklo}$$

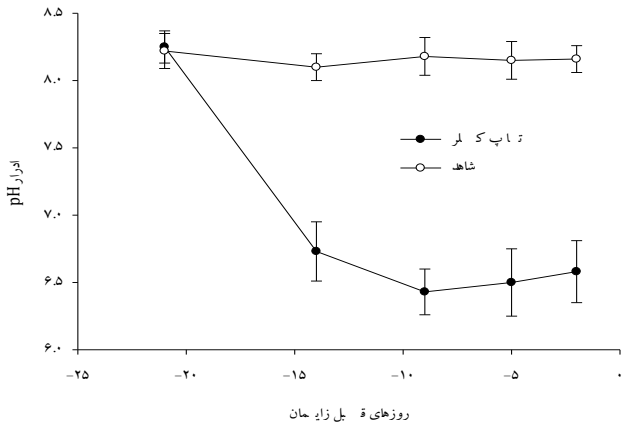
در این رابطه، Y_{ijklo}، متغیر وابسته pH ادرار؛ μ، میانگین کل؛ $Treat_i$، اثر ثابت گروه آزمایشی i؛ $Time_j$، اثر ثابت زمان j؛ $\beta_{lk} \times X_{ijk}$، داده‌های pH ادرار قبل از شروع آزمایش به‌عنوان عامل کواریت درطول آزمایش درنظر گرفته شد. Cow_l، اثر تصادفی گاو با میانگین‌صفر و واریانس یکسان‌معادل با کواریانس‌بین اندازه‌گیری‌های تکرارشونده بین گاوها؛ $Resid_{ijklo}$، اثرباقی‌مانده تصادفی با میانگین صفر وواریانس‌همگن σ^2 است.ازساختار کوواریانس Autoregressive order 1 که کم‌ترین میزان معیار AICC داشت به‌عنوان ساختارهای نهایی تجزیه برای داده‌های تکرار شونده در زمان استفاده شد (Littell و همکاران، ۱۹۹۸). داده‌های مربوط به مواد معدنی خون، بدون درنظر گرفتن زمان و از مدل آماری ساده طرح کاملاً تصادفی و با آزمون t مستقل و طبق رابطه ۲ تجزیه شدند (رابطه ۲):

$$(Y_{ijk} = \mu + T_i + e_{ijk}$$

که در آن، Y_{ijk}، مقدار هر مشاهده؛ μ، میانگین کل؛ T_i، اثر ثابت گروه آزمایشی و e_{ijk} نیز اثر باقی‌مانده تصادفی با میانگین صفر و واریانس همگن σ^2است. داده‌ها در پیش و پس از زایمان به‌صورت جداگانه تجزیه آماری شدند.

نتایج

مطابق شکل ۱، pH ادرار گاوهایی که تاپ‌کلر مصرف کرده بودند، به‌طور معنی‌داری کاهش نشان‌داد (۶/۵۶ درمقابل ۸/۱۵، P<۰/۰۵). هم‌چنین با نزدیک شدن گاوها به زایش pH ادرار در هر دو گروه کاهش یافت (P=/۰۰۰۲). هم‌چنین اثر متقابل تیمار در زمان نیز معنی‌دار شد (P=۰/۰۴).



شکل ۱: اثر محصول اسیدوژنیک تاپ کلر بر pH ادرار گاوهای قبل زایمان.
میانگین pH ادرار در گروه شاهد ۸/۱۵ و در تیمار تاپ کلر ۶/۵۶ بود. اثر تیمار P=۰/۰۰۱، اثر زمان P=۰/۰۰۰۲ و اثر متقابل زمان * در تیمار P= ۰/۰۴

نتایج اثر محصول اسیدوژنیک تاپ‌کلر در جیره گاوهای پیش از زایمان بر غلظت مواد معدنی سرم خون در جدول ۲ نمایش داده شده است. غلظت کلسیم خون در ۲۴ و ۱۲ ساعت قبل زایش تفاوتی نداشت (P>۰/۰۵). غلظت فسفر خون در ۲۴ ساعت پیش از زایش به‌طور معنی‌داری در گاوهای مصرف کننده تاپ کلر افزایش یافت (P<۰/۰۵) ولی در ۱۲ ساعت قبل زایش مشابه بود (P>۰/۰۵). غلظت منیزیم خون نیز در قبل زایش بین تیمارها تفاوتی نداشت (P>۰/۰۵). غلظت کلسیم، فسفر و منیزیم در زمان زایش تحت تاثیر تیمار قرار نگرفت (P>۰/۰۵).

آنالیز طیف‌سنجی مادون‌قرمز نمونه‌محصول‌اسیدوژنیک تاپ‌کلر در قبل و بعد از فرآوری در شکل ۲ نشان داده شده است. هم‌چنین آنالیز پراش اشعه ایکس نمونه محصول اسیدوژنیک تاپ‌کلر در قبل و بعد از فرآوری در شکل ۳ نشان داده شده است.

جدول۲: اثر محصول اسیدوژنیک تاپ‌کلر در جیره گاوهای پیش از زایمان بر غلظت مواد معدنی سرم خون (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)

فراسنجه	تیمارهای آزمایشی		SEM[1]	P-Value[2]
	تاپ کلر	شاهد		
پیش از زایمان				
کلسیم [3]				
۲۴ ساعت	۹/۰۵	۸/۸۹	۰/۲۱	۰/۷۸
۱۲ ساعت	۸/۹۴	۸/۷۶	۰/۱۹	۰/۸۳
فسفر[3]				
۲۴ ساعت	۵/۹۵	۴/۴۶	۰/۲۶	۰/۰۲
۱۲ ساعت	۴/۷۸	۴/۲۲	۰/۱۹	۰/۲۶
منیزیم [3]				
۲۴ ساعت	۲/۲۵	۲/۳۸	۰/۰۵	۰/۵۳
۱۲ ساعت	۲/۲۷	۲/۵۶	۰/۰۷	۰/۳۱
زایش				
کلسیم	۷/۷۹	۷	۰/۲۵	۰/۲۴
منیزیم	۲/۳۹	۲/۵۱	۰/۰۵	۰/۵۲
فسفر	۴/۲۱	۳/۸۲	۰/۱۷	۰/۵۵

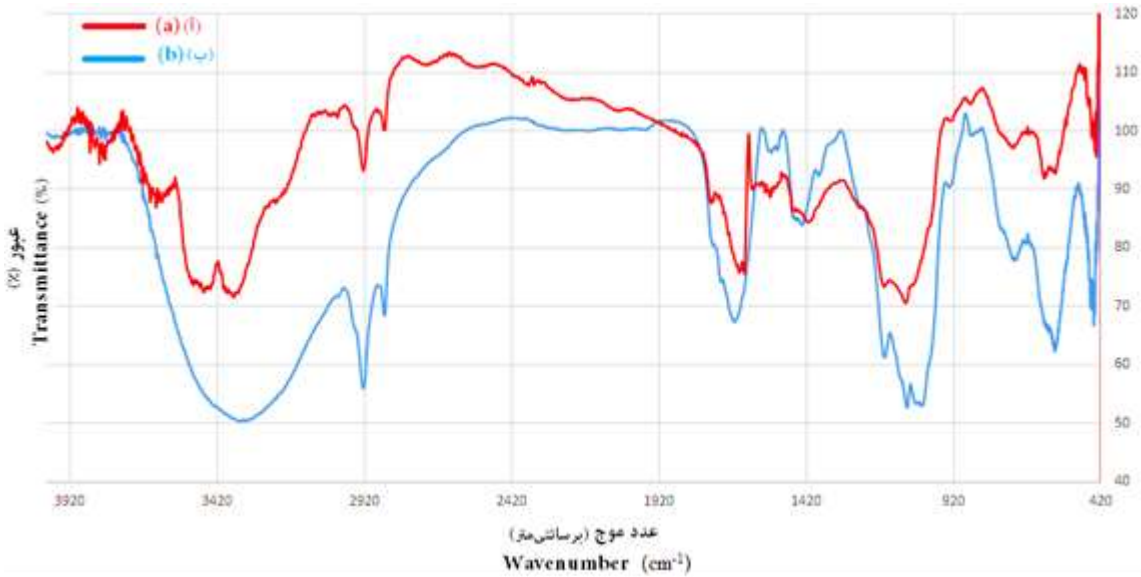
۱. خطای استاندارد میانگین‌ها . ۲سطح معنی‌داری، ۳. نمونه‌های خون در ۲۴ و ۱۲ ساعت پیش از زایش گرفته شد.

مطابق جدول ۳، گاوهایی که قبل از زایمان تاپ‌کلر را مصرف کرده بودند، غلظت کلسیم خون بیش‌تری در ۱۲ ساعت (۸/۴۸ در مقابل ۷/۲۲ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر،P=/۰۱) و ۲۴ ساعت پس از زایش (۸/۲۲ در مقابل ۷/۳۱ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، P=۰/۰۲) داشتند. اما غلظت فسفر و منیزیم خون در ۱۲ و یا ۲۴ ساعت پس از زایش تحت تاثیر تیمار قرار نگرفت (P>۰/۰۵).

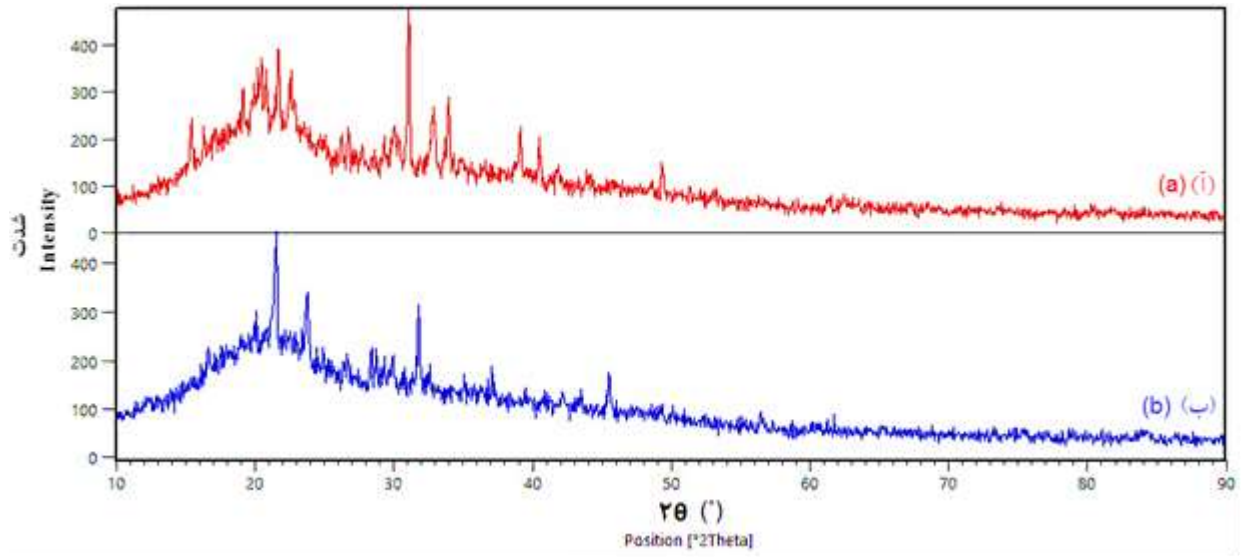
جدول۳: اثر محصول اسیدوژنیک تاپ‌کلر در جیره گاوهای پیش از زایمان بر غلظت مواد معدنی سرم خون (میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در دوره پس از زایش

فراسنجه	تیمارهای آزمایشی		SEM	P-Value
	تاپ کلر	شاهد		
پس از زایمان				
کلسیم[3]				
۱۲ ساعت	۸/۴۸	۷/۲۲	۰/۲۲	۰/۰۱
۲۴ ساعت	۸/۲۲	۷/۳۱	۰/۱۷	۰/۰۲
فسفر[3]				
۱۲ ساعت	۵/۱۱	۴/۳۴	۰/۱۷	۰/۳۷
۲۴ ساعت	۵/۲۶	۴/۸۱	۰/۲۱	۰/۲۴
منیزیم[3]				
۱۲ ساعت	۲/۴۹	۲/۶۰	۰/۰۸	۰/۵۶
۲۴ ساعت	۲/۶۹	۲/۵۸	۰/۰۷	۰/۴۶

۱. خطای استاندارد میانگین‌ها، ۲. سطح معنی‌داری، ۳. نمونه‌های خون در ۲۴ و ۱۲ ساعت پس از زایش گرفته شد.



شکل ۲: آنالیز طیف سنجی مادون قرمز نمونه محصول اسیدوژنیک تاپ‌کلر در قبل (آ) و بعد از فرآوری (ب)



شکل ۳: آنالیز پراش اشعه ایکس نمونه محصول اسیدوژنیک تاپ‌کلر در قبل (آ) و بعد از فرآوری (ب)

بحث

کاهش pH ادرار در هنگام اضافه‌کردن آنیون‌ها به جیره، در مطالعات فراوانی نشان داده شده است. در توافق با آزمایش حاضر گزارش کردند با کاهش اختلاف کاتیون و آنیون جیره با افزودن آنیون‌ها از ۲۰۰ به ۱۰۰– میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم ماده خشک جیره، pH ادرار از ۸/۴ به ۶/۸ کاهش پیدا کرد (Charbonneau و همکاران، ۲۰۰۶). هم‌چنین در پژوهش با استفاده از سوی‌کلر، اختلاف کاتیون و آنیون جیره به ۱۵۰– میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم ماده خشک کاهش یافت و گزارش کردند pH ادرار به ۶,۷ افت پیدا کرد (Ramos-Nieves و همکاران، ۲۰۰۹). در جیره‌های گاوها در گامه شیردهی، pH ادرار در دامنه ۸ تا ۸/۵ گزارش شده است (Charbonneau و همکاران، ۲۰۰۶).در آزمایشی دیگر با افزودن نمک‌های آنیونیک کلسیم کلراید و منزیم سولفات به خوراک گاوهای قبل زایش، اختلاف کاتیون و آنیون جیره به ۷۴- میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم جیره کاهش دادند و گزارش کردند که از ۸/۲۹ به ۵/۹۶ کاهش یافته است. اندازه‌گیری pH ادرار یک شاخص مزرعه‌ای و ارزان جهت سنجش اسیدوز متابولیکی در جیره‌های اسیدوژنیک شناخته شده است. دامنه توصیه شده برای pH ادرار در خوراک‌های اسیدوژنیک از ۵/۸ تا ۶/۹ گزارش شده است (Goff، ۲۰۰۸). در نتیجه می‌توان دریافت که تاپ‌کلر با القای اسیدوز

متابولیکی خفیف در خون، کلیه‌ها را وادار به خروج یون هیدروژن کرده است و متعاقب آن pH ادرار کاهش یافته است. هم‌چنین مطالعات فراتحلیلی نشان دادند که با کاهش اختلاف کاتیون و آنیون جیره از ۲۰۰ میلی‌اکی والان به ۱۰۰- میلی اکی والان، غلظت کلسیم خون ۱۵ درصد بهبود یافت (Charbonneau و همکاران، ۲۰۰۶). در یک مطالعه فراتحلیلی اخیر که ۵۸ آزمایش مورد بررسی قرارگرفته بود، گزارش‌شد که استفاده از جیره‌های آنیونیک، غلظت کلسیم را به میزان ۰/۱۳ میلی‌مول افزایش داده است (Santos و همکاران، ۲۰۱۹). مطالعات متعددی بیان می‌کنند که افزودن آنیون‌ها به جیره گاوهای انتظار زایمان، با القای اسیدوز متابولیکی خفیف، کارایی هورمون پاراتیروئید و غلظت ویتامین دی سرمی را بهبود می‌دهد و در نهایت غلظت کلسیم خون افزایش می‌یابد (Goff و همکاران، ۲۰۱۴). از مکانیسم های دیگری که خوراک های اسیدوژنیک می‌تواند متابولیسم کلسیم را فعال کنند، افزایش دفع کلسیم ادرار می‌باشد که نتیجه‌ای از جذب بهتر کلسیم از دستگاه گوارش می‌باشد (Goff و همکاران، ۲۰۱۴). همان‌طورکه در قبل بیان شد pH ادرار گاوهای مصرف کننده تاپ کلر ۱/۵۹ واحد کاهش یافته است به‌عبارت دیگر قدرت اسیدی آن‌ها ۱۵/۹ برابر شده است و در نتیجه می‌توان انتظار داشت با مکانیسم‌های گفته شده غلظت کلسیم خون در این گروه افزایش یافته است. هر چند این pH ادرار در دامنه توصیه شده و ایمن برای گاوهای شیری می‌باشد.

هر چند که مصرف خوراک و تولید شیر در پس از زایش اندازه‌گیری نشد اما مطالعات مختلفی گزارش کردند که افزایش غلظت کلسیم خون با بهبود حرکات شکمبه مصرف خوراک را در پس از زایش بهبود می‌دهد (Martinez و همکاران، ۲۰۱۴). به‌طور مثال با کاهش اختلاف کاتیون و آنیون جیره از ۱۸۵ به ۷۶- میلی‌اکی‌والان در کیلوکرم جیره (مشابه با آزمایش حاضر) از خوراک تجاری انیمیت؛ تولید شیر ۳/۶ کیلوگرم تا ۲۰ روز بعد زایش افزایش یافت (Leno و همکاران، ۲۰۱۷). در آزمایش دیگر که گاوها خوراک اسیدوژنیک سوی‌کلر در پیش از زایش دریافت کرده بودند، ۱/۸ کیلوگرم شیر بیش‌تری تولیدکرده بودند (Ramos-Nieves و همکاران، ۲۰۰۹). استفاده از خوراک اسیدوژنیک سوی کلر در مقابل نمک‌های آنیونیک کلسیم کلراید و منیزیم سولفات در جیره قبل زایش، مصرف خوراک پیش از زایش و هم‌چنین خوراک مصرفی و تولید شیر پس از زایش را بهبود داد (Rajaeerad و همکاران، ۲۰۲۰). هم‌چنین در مطالعه فراتحلیلی اخیر نشان داده شد که با کاهش اختلاف کاتیون و آنیون جیره گاوهای انتظار زایمان، بروز بیماری‌های متابولیک جفت‌ماندگی، متریت و مجموع بیماری‌ها کاهش یافت، که منجر به افزایش ۱/۱ کیلوگرمی تولید شیر شد (Santos و همکاران، ۲۰۱۹).

غلظت فسفر سرم در ۲۴ ساعت قبل زایمان در گروه تاپ‌کلر افزایش یافت. گزارش شده است که جذب فسفر در حضور آنیون‌ها در شکمبه بهبود می‌یابد. اما متاسفانه داده‌های بسیار کمی در این زمینه موجود می‌باشد. همانند آزمایش حاضر با کاهش اختلاف کاتیون و آنیون جیره از ۱۱۰ به ۱۵۰- میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم ماده خشک جیره، غلظت فسفر خون به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Ramos-Nieves و همکاران، ۲۰۰۹). اما آن‌ها توضیح منطقی و روشنی در این زمینه ارائه نکردند. مطالعه فراتحلیلی اخیر نشان داد که با کاهش اختلاف کاتیون و آنیون جیره از ۱۰۰ به ۱۰۰- میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم ماده خشک جیره قبل زایش، هیچ تغییری در غلظت فسفر خون در قبل و بعد زایش دیده نشد (Santos و همکاران، ۲۰۱۹).

یکی از فرضیه‌های این آزمایش، برهم‌کنش یون کلر حاصل از نمک‌های مربوطه با نیتروژن و اکسیژن موجود در ساختارهای آلی خوراک در فرآیند فرآوری محصول تاپ‌کلر بوده است که منجر به بهبود طعم و مزه خوراک و در نتیجه افزایش مصرف خوارک گاوها شود. در آنالیز طیف سنجی مادون قرمز، با بررسی برهم‌کنش امواج الکترومغناطیس در محدوده مادون قرمز با نمونه، می‌توان به گروه‌های عاملی و ساختار مولکول‌ها و پیوندهای موجود در نمونه پی‌برد (Case و همکاران،۲۰۲۰). با توجه به ماهیت پروتئینی ترکیب مورد نظر، گروه‌های عاملی کربوکسیل حاوی پیوند پپتیدی و کربونیل در ساختار موجود می‌باشند. مطابق شکل ۲، نوار جذبی در ناحیه $1630\ cm^{-1}$ تا ۱۶۶۰ مربوط به ارتعاش کششی گروه کربونیل(کوپل‌شده با ارتعاش کششی پیوند کربن-نیتروژن) و خمشی پیوند نیتروژن-هیدروژن، و نوار جذبی در ناحیه $1500\ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش خمشی پیوند نیتروژن-هیدروژن می‌باشد. پیک‌های مربوط به ارتعاش‌های کششی پیوند کربن-نیتروژن و پیوند کربن-اکسیژن نیز در ناحیه $1000 cm^{-1}$ تا ۱۲۵۰ ظاهر می‌شوند. نوارهای جذبی ارتعاشی گروه آمین انتهایی به‌صورت دوتایی در نواحی حدود $3200\ cm^{-1}$ و $3350\ cm^{-1}$ و نوار ارتعاشی آمین نوع دوم در ناحیه $3400 cm^{-1}$-۳۵۰۰ ظاهر می‌شوند. پیک‌های موجود در محدوده $2800\ cm^{-1}$ و $2900\ cm^{-1}$ نیز مربوط به ارتعاش‌های کششی، گروه متیل و متیلن می‌باشند.

نوار جذبی موجود در ناحیه $1700\ cm^{-1}$ نیز مربوط به گروه کربونیل در هیدروکلریدآمینواسید می‌باشد. هم‌چنین هیدروکلرید آمینواسیدها نوار جذبی قوی در ناحیه $2400\ cm^{-1}$-۳۴۰۰ که از انطباق نوارهای گروه هیدروکسی و آمین آزاد پروتون‌دارشده حاصل می‌شود، نشان می‌دهند. مشاهده تفاوت بین دو طیف موجود در شکل بالا، (ناحیه $1700\ cm^{-1}$ و هم‌چنین ناحیه بعد از $3000\ cm^{-1}$ در قبل و بعد از فرآوری) هیدروکلردار شدن بخشی از گروه‌های آمین آزاد را نشان می‌دهد (Singh و همکاران، ۱۹۹۷). در واقع یون‌های تزریق

شده به مواد اولیه در طی فرایند تولید تاپ کلر، با گروه‌های آمین آزاد موجود در ساختار ترکیب، برهم‌کنش می‌کند و منجر به هیدروکلردار شدن آمین‌های آزاد می‌شود و بعد از مصرف به وسیله دام، یون کلر آزاد می‌شود.

در شکل ۳، آنالیز پراش اشعه ایکس مربوط به نمونه قبل از فرآیند (آ) و بعد از فرآیند (ب)، به‌وضوح تغییر درفازهای ترکیب مربوطه را قبل و بعد از فرایند آشکار می‌سازد. در نمونه اولیه قبل از فرآیند، تطابق پیک‌های ظاهرشده در زوایای ۱۵/۳۷، ۲۱/۶۶، ۳۱/۰۷، ۳۲/۸۶، ۳۳/۹۲، ۳۹/۱، ۴۰/۴۵ و ۴۹/۳۱ با الگوهای استاندارد موجود، حضور ترکیب منیزیم کلراید ۶ آبه را نشان می‌دهد. همان‌طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود تغییر حاصل در الگوی (ب) نسبت به (آ)، نشان‌دهنده تغییر در ساختار منیزیم کلراید ۶ آبه بعد از انجام فرآیند می‌باشد. مطالعات انجام شده روی کمپلکس‌های منیزیم ($[Mg(H_2O)_6]^{2+}$) با ساختارهای آلی و آمینواسیدها نشان می‌دهد که این لیگاندها با حالت‌های گوناگونی می‌توانند با منیزیم کوئوردینه شوند و نیز با توجه به تعداد زیاد ملکول‌های آب، این کوئوردینه شدن می‌تواند به‌صورت یک، دو، سه یا چهار دندانه انجام شود (Case و همکاران، ۲۰۲۰). هم‌چنین مطالعات انجام شده روی تجزیه حرارتی منیزیم کلراید ۶ آبه نشان می‌دهد که این ترکیب در دمای ۷۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد یک یا دو ملکول آب خود را از دست می‌دهد که می‌تواند توسط گروه‌های نیتروژن و اکسیژن موجود در ساختار پروتئین و نشاسته جایگزین شود (Huang و همکاران، ۲۰۱۱).

شکل‌های ۲ و ۳ نشان می‌دهند که فرآوری اکستروژن باعث پیوند یون کلر با پروتئین شده است و می‌توان انتظار داشت که تلخی نمک‌ها از بین رفته باشد و گاوها مصرف خوراک بیش‌تری را تجربه کنند. از آن‌جاکه آزمایش حاضر به‌صورت انفرادی انجام نشد و گاوها به‌صورت گروهی نگه‌داری شده بودند مصرف خوراک نیز به‌صورت گروهی و روزانه در قبل زایش اندازه‌گیری شد که از لحاظ عددی در گروه شاهد ۱۴/۲ کیلوگرم و در گروه تاپ‌کلر ۱۴/۴ کیلوگرم‌درروز بود. Bradford و Barry (۲۰۰۹) نتایج مشابهی ارائه کرد مبنی بر این‌که محصولات فرآوری‌شده آنیونیک بیوکلر نسبت به گروه شاهد (بدون آنیونیک) اثر معنی‌داری بر ماده خشک مصرفی نداشت. از طرف دیگر محصول آنیونیک انیمیت با حفظ مصرف خوراک در قبل زایش، تولید شیر و مصرف خوراک پس از زایش را بهبود داد (Leno و همکاران، ۲۰۱۷). در آزمایش دیگری نیز مشخص شد استفاده از خوراک اسیدوژنیک سوی کلر در مقابل نمک‌های آنیونیک کلسیم کلراید و منیزیم‌سولفات،مصرف‌خوراک پیش از زایش را بهبود داد (Rajaeerad و همکاران، ۲۰۲۰). استفاده از سوی‌کلر (خوراک آنیونیک تجاری) در مقابل تیمار شاهد (بدون نمک آنیونیک) مصرف خوراک قبل زایمان را کاهش داده است (Ramos-Nieves و همکاران، ۲۰۰۹). در تایید این نتایج، مطالعه متاآنالیز اخیر نیز اعلام کرد صرف نظر از منبع آنیونیک‌ها (نمک‌های معدنی و محصولات تجاری)، مصرف خوراک در قبل‌زایمان کاهش یافت (Santos و همکاران، ۲۰۱۹). تحقیقات بیش‌تری نیاز است که اثرات منابع مختلف آنیونیک‌ها را بررسی کند.

مطالعه حاضر نشان داد که محصول تاپ‌کلر، با کاهش pH ادرار و القای اسیدوز متابولیکی خفیف، غلظت کلسیم خون گاوها را پس از زایش بهبود داد. هم‌چنین با توجه به نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز و پراش اشعه ایکس، یون‌های کلر با گروه‌های آمینی اسیدآمینه بر هم‌کنش داشته و خوراک آلی پدیدار شده بود. با توجه به نتایج، استفاده از خوراک اسیدوژنیک تاپ کلر در سطح ۶ درصد جهت کاهش اختلاف کاتیون و آنیون جیره گاوهای قبل زایش توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری مدیریت و پرسنل محترم مجتمع شیر و گوشت نصر به‌خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام این پژوهش صمیمانه قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. **کمالی، س.؛ ملکی، م.؛ احمدی، ر. و مهدی‌پور، م.، ۱۳۹۸.** بررسی ارتباط میزان کاهش نمره بدنی پس از زایمان، فصل و تعداد شیرواری بر بروز ورم پستان بالینی در گاو شیری. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۱۲، شماره ۲، صفحات ۳۱ تا ۳۶.

۲. **ابائی‌کورس، ح.؛ زحمتکش، د.؛ عزیزی، ز. و پهلوان، ر.، ۱۴۰۰.** ارتباط بین سن اولین زایش و عملکرد شیردهی گاو هلشتاین در گله‌های منتخب ایران. فصلنامه محیط‌زیست جانوری. سال ۱۳، شماره ۲، صفحات ۵۹-۶۶.

3. **Bradford, T. and Barry, J., 2009**. Effects of acidified fermentation by-products and prepartum dcad on feed intake, performance, and health of transition dairy cows. Journal of Dairy Science. Vol. 19, pp: 95-105.

4. **Case, R.D.R.; Zubieta, J. and Doyle, R.P., 2020**. The Coordination Chemistry of Bio-Relevant Ligands and Their Magnesium Complexes. Molecules. Vol. 25, pp: 3172- 3233

5. **Charbonneau, E.; Pellerin, D. and Oetzel, G., 2006.** Impact of lowering dietary cation-anion difference in nonlactating dairy cows: A meta-analysis. Journal of Dairy Science. Vol. 89, pp: 537-548.

6. **Drackley, J.K., 1999**. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier?. Journal of dairy science. Vol. 82, pp: 2259-227.

7. **Goff, J.P. and Horst, R.L., 1997**. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. Journal of dairy science. Vol. 80, pp:1260-1268.

8. **Goff, J.P. and Horst, R.L., 19980**. Use of hydrochloric acid as a source of anions for prevention of milk fever. Journal of Dairy Science.Vol. 81, pp: 2874-2880.

9. **Goff, J.P., 2008**. The monitoring, prevention and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. Veterinary Journal. Vol. 176, pp: 50-57.

10. **Goff, J.P.; Liesegang, A. and Horst, R.L., 2014.** Diet induced pseudohypoparathyroidism: A hypocalcemia and milk fever risk factor. Journal of Dairy Science. Vol. 97, pp: 1520-1528.

11. **Goff, J.P.; Ruiz, R. and Horst, R.L., 2004.** Relative acidifying activity of anionic salts commonly used to prevent milk fever. Journal of Dairy Science. Vol. 875, pp: 1245-1255.

12. **Huang, Q.; Lu, G.; Wang, J. and Yu, J., 2011**. Thermal decomposition mechanisms of $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ and $MgCl_2 \cdot H_2O$. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. Vol. 91, pp: 159-164

13. **Huzzey, J.M.; Veira, D.; Weary, D. and Keyserlingk, M., 2007.** Prepartum Behavior and Dry Matter Intake Identify Dairy Cows at Risk for Metritis. Journal of dairy science. Vol. 90, pp: 3220-3228.

14. **Leno, B.M.; Ryan C.M.; Stokol, T. and Overton, T.R., 2017**. Effects of prepartum dietary cation-anion difference on aspects of peripartum mineral and energy metabolism and performance of multiparous Holstein cows. Journal of dairy science. Vol. 100, pp:4604-4622.

15. **Littell, R.C.; Milliken, G.A.; Stroup W.W. and Wolfinger, R.D., 1996**. SAS System of Mixed Models. SAS Institute, Cary, NC.

16. **Martinez, N.; Ainedino, L.; Bisinotto, R.; Ribeiro, E.; Gomes, G.; Lima, F.; Greco, L.; Risco, C.; Galvão, K. and Taylor-Rodriguez, D., 2014**. Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. Journal of dairy science. Vol. 97, pp: 874-887.

17. **Martinez, N.; Risco, C.A.; Lima, F.S.; Bisinotto, R.S.; Greco, L.F.; Ribeiro, E.S.; Maunsell, F.; Galvão, K. and Santos, J.E.P., 2012.** Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. Journal of dairy science. Vol. 95, pp: 7158-7172.

18. **Rajaeerad, A.; Ghorbani, G.R.; Khorvash, M.; Sadeghi Sefidmazgi, A.; Mahdavi, A.H. and Wilkens, M.R., 2021**. Low potassium diets with different levels of calcium in comparison with different anionic diets fed to prepartum dairy cows: Effects on sorting behaviour, total tract digestibility, energy metabolism, oxidative status and hormonal response. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. Vol. 105, pp: 14-25.

19. **Ramos-Nieves, J.M.; Thering, B.J.; Waldron, M.R.; Jardon, P.W. and Overton, T.R., 2009.** Effects of anion supplementation to low-potassium prepartum diets on macromineral status and performance of periparturient dairy cows. Journal of dairy science. Vol. 92, pp: 5677-5691.

20. **Reinhardt, T.A.; Lippolis, A.; McCluskey, J.D.; Goff, J.J.P. and Horst, R.L., 2011**. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. Veterinary Journal. Vol. 188, pp:122-124.

21. **Santos, J.; Lean, I.; Golder, H. and Block, E., 2019.** Meta analysis of the effects of prepartum dietary cation-anion difference on performance and health of dairy cows. Journal of dairy science. Vol. 102, pp: 2134-2154.

22. **Singh, B.R., 1999.** Infrared Analysis of Peptides and Proteins, ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC. pp: 1-36.

23. **Tamm, L.K. and Tatulian, S.A., 1997.** Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. Quarterly Reviews of Biophysics. Vol. 30, pp: 365-429.

24. **Wilhelm, A.; Maquivar, M.; Bas, S.; Brick, T.; Weiss, W.; Bothe, H.; Velez, J. and Schuenemann, G., 2017.** Effect of serum calcium status at calving on survival, health, and performance of postpartum Holstein cows and calves under certified organic management. Journal of dairy science. Vol. 100, pp: 3059-3067.