

## بررسی اثرات تجویز اسید فولیک و متیونین بر محتوای ۵-متیل تتراهیدروفولات و روی زرده تخم‌مرغ و میزان روی و هموسیستئین سرم خون در مرغان تخمگذار

ستار باقری<sup>۱</sup>، حسین جانمحمدی<sup>۲\*</sup>، رامین ملکی<sup>۳</sup>، علیرضا استاد رحیمی<sup>۴</sup>، روح الله کیانفر<sup>۵</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
  - ۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
  - ۳- استادیار پژوهشی جهاد دانشگاهی استان آذربایجان غربی، ارومیه، ایران.
  - ۴- استاد مرکز تحقیقات تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
  - ۵- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
- \*نویسنده مسئول مکاتبات: janmohammadi@tabrizu.ac.ir  
(دریافت مقاله: ۹۵/۱۰/۱۴ پذیرش نهایی: ۹۶/۲/۲۰)

### چکیده

این مطالعه برای ارزیابی اثرات تجویز اسیدفولیک و متیونین بر محتوای ۵-متیل تتراهیدروفولات و عنصر روی زرده تخم‌مرغ و میزان روی و هموسیستئین سرم خون مرغان تخمگذار لگهورن سویه‌های -لاین ۳۶۷ از سن ۲۰ تا ۲۶ هفتگی صورت گرفت. جیره‌های آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی به روش فاکتوریل ۴×۴ با ۴ سطح متیونین (۰، ۰/۳۲، ۰/۴۲ و ۰/۴۸ درصد جیره) و ۴ سطح اسید فولیک (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) تنظیم شد. مکمل‌سازی جیره مرغان تخمگذار با اسید فولیک در سطوح ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره باعث افزایش معنی‌دار میزان ۵-متیل تتراهیدروفولات زرده تخم‌مرغ شد ( $p < 0/05$ ). همچنین، سطح ۵-متیل تتراهیدروفولات زرده به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر اثر متقابل متیونین و اسیدفولیک جیره قرار گرفت ( $p < 0/05$ ). میزان هموسیستئین و عنصر روی سرم خون و عنصر روی زرده با افزایش سطح اسیدفولیک به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، ولی متیونین جیره بر سطح روی زرده تاثیر نداشت. اسید فولیک (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و متیونین (۰/۳۲، ۰/۴۲ و ۰/۴۸ درصد جیره) افزوده شده در جیره مرغ‌های تخمگذار باعث افزایش محتوای فولات تخم‌مرغ به شکل ۵-متیل تتراهیدروفولات می‌شود. کلیدواژه‌ها: اسید فولیک، متیونین، هموسیستئین، روی، تخم‌مرغ.

**مقدمه**

اسید فولیک یکی از مهم‌ترین ویتامین‌های گروه B می‌باشد. نقش آن در انتقال واحدهای تک‌کربنه به‌خصوص ساخت پورین‌ها و پیریمیدین‌ها (RNA و DNA)، تبدیل برخی از اسیدهای آمینه به همدیگر مثل سرین و گلیسین و ساخت متیونین در نتیجه متیلاسیون از هموسیستئین از اهمیت بالایی برخوردار است (Bagley et al., 2005). روی و اسید پتروئیل گلوتامیک (اسید فولیک) برای سلامتی حیوانات مورد نیاز هستند. در عین حال، هر دوی این مواد مغذی برای ساخت اسیدهای نوکلئیک بسیار ضروری می‌باشند (Milne et al., 1984). فولات‌های موجود در مواد غذایی به‌صورت پلی‌گلوتامات بوده و باید گلوتامات‌های اضافی با فرآیند مربوطه جدا شده و به‌شکل مونوگلوتامات جذب شوند (Halsted, 1990). دکونژوگاز (Deconjugase) روده یک آنزیم وابسته به روی می‌باشد که بهترین فعالیت آن در pH برابر ۶/۵ صورت می‌گیرد (Halsted, 1990). متیونین سنتتاز (MS) و بتائین-هموسیستئین ترانسفراز (BHMT) هر دو، آنزیم متیل ترانسفراز وابسته به روی هستند و برای متیلاسیون هموسیستئین و تبدیل آن به متیونین کاربرد دارند (Jing, 2015). احتمال افزایش میزان فولات تخم-مرغ در نتیجه غنی‌سازی جیره مرغان تخمگذار با استفاده از اسید فولیک سنتز شده، وجود دارد. بنابراین، می‌توان تخم مرغ را با این روش به یک منبع عالی از نظر فولات تبدیل کرد (Sherwood et al., 1993; House et al., 2002; Hebert et al., 2005; Hoey et al., 2009; Tactacan et al., 2010; Dickson et al., 2010). تقریباً ۹۵ درصد فولات تخم مرغ در زرده آن قرار دارد (Sherwood et al., 1993).

اسید آمینه هموسیستئین که یک اسید آمینه گوگرددار است، از متابولیسم متیونین به‌وجود می‌آید. این اسید آمینه اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته است، زیرا افزایش سطح هموسیستئین پلاسما افزایش خطر ابتلا به آترواسکلروزیس، بیماری‌های قلبی-عروقی و کاهش توانایی‌های شناختی مغز و افسردگی را به‌دنبال دارد (Tiemeier et al., 2002). ری‌متیلاسیون هموسیستئین توسط آنزیم متیونین سنتتاز صورت گرفته و در نتیجه این واکنش، هموسیستئین به متیونین تبدیل می‌شود. بنابراین، بخشی از متیونین مورد نیاز از این طریق تامین می‌شود (House et al., 2003). ری‌متیلاسیون اساساً توسط نیاز به گروه‌های حاوی متیل تنظیم می‌شود. وقتی که مصرف گروه‌های حاوی متیل مثل متیونین زیاد باشد، نیاز به متیلاسیون مجدد کاهش می‌یابد. بنابراین، هموسیستئین احتمالاً بیشتر به‌سمت ترانس سولفوراسیون پیش می‌رود. اساساً کنترل متابولیسم متیونین کار پیچیده‌ای می‌باشد. بنابراین، تقسیم‌بندی هموسیستئین بین ری‌متیلاسیون و ترانس سولفوراسیون بسیار پیچیده است. مطالعات توازن کلاسیک بیان می‌دارند که این توازن با فراهمی گروه متیل تخمین زده می‌شود (Mudd et al., 1975). یکی از مهم‌ترین شاخص‌های ارزیابی میزان نیاز به فولات، اندازه‌گیری میزان هموسیستئین سرم خون می‌باشد (House et al., 2003). اسید فولیک با روی ترکیب غیرقابل جذب تشکیل داده و باعث دفع روی از دستگاه گوارش می‌شود، این در حالی است که روی با تبدیل پلی‌گلوتامات به فرم مونوگلوتامات فولات باعث افزایش جذب اسید فولیک در pH اسیدی در ابتدای روده مهره‌داران می‌شود (Milne et al., 1984).

جیره) و ۴ سطح اسید فولیک (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) آماده‌سازی شد (میزان فولات جیره پایه ۱/۰۶ میلی‌گرم در کیلوگرم بود). تیمار شاهد برای اسید فولیک صفر میلی‌گرم در کیلوگرم جیره و برای متیونین ۰/۳۲ درصد جیره می‌باشد.

اسید فولیک سنتتیک از نمایندگی شرکت لوهمن آلمان در ایران خریداری شد. اسم تجاری این محصول CUXAVIT FOLIC ACID است که دارای حداقل ۹۵ درصد اسید فولیک در ماده خشک می‌باشد. متیونین از شرکت دگوسای بلژیک تهیه شد.

**آزمایشات شیمیایی:** استاندارد ۵-متیل تتراهیدروفولات (شماره تولید: MO1۳۲، شماره CAS: ۶۸۷۹۲-۵۲-۹، فرمول  $C_2O_2H_{23}N_7Na_2O_6$  و وزن مولکولی ۵۰۳/۴۲ گرم بر مول) به صورت نمک سدیم ۵-متیل تتراهیدروفولیک اسید با بالاترین خلوص دسترسی  $\geq 88$  (UV-vis) از شرکت سیگما خریداری شد (Sigma, USA). تمام مواد شیمیایی و محلول‌های HPLC از شرکت مرک آلمان (Merck, Germany) تهیه شد.

**اندازه‌گیری فولات زرده:** مراحل استخراج و تعیین ۵-متیل تتراهیدروفولات زرده توسط هاوس و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش شده است (House et al., 2002). از هر واحد آزمایشی ۲ تخم‌مرغ به صورت تصادفی انتخاب و سریعاً جهت ارزیابی محتوای ۵-متیل تتراهیدروفولات زرده به آزمایشگاه جهاد دانشگاهی استان آذربایجان غربی که مجهز به HPLC بود، ارسال شد. جداسازی و اندازه‌گیری مقدار ۵-متیل تتراهیدروفولات در نمونه‌های زرده تخم‌مرغ بعد از جداسازی در بافر اسکوربات (pH=۷/۸) در یک

هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیر اسید فولیک و متیونین افزودنی بر محتوای ۵-متیل تتراهیدروفولات تخم‌مرغ به‌عنوان یکی از منابع غذایی مهم و در دسترس و همچنین، بررسی تاثیر اسید فولیک افزودنی بر عوامل دیگر مرتبط با اسید فولیک مانند روی و هموسیستئین سرم می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

۵۱۲ مرغ سفید لگهورن سویه های-لاین w-۳۶ از هفته ۲۰ تا ۲۶ با جیره‌هایی که شامل ۴ سطح اسید فولیک (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و ۴ سطح متیونین (۰/۲۵، ۰/۳۲، ۰/۴۲ و ۰/۴۸ درصد جیره) بود و به مدت ۷ هفته تغذیه شدند. آزمایش در یک مرغداری صنعتی در شهرستان مهاباد انجام شد. مدت دو هفته برای تطابق با محیط جدید طول کشید و وزن متوسط مرغان در شروع ۱/۳۵ کیلوگرم بود. هر گروه آزمایشی شامل ۴ تکرار بود. مرغ‌ها با ۱۶ ساعت روشنایی مصنوعی، دمای مطلوب و تهویه مناسب پرورش یافتند. ارائه آب و غذا به صورت کاملاً اختیاری بود. هر گروه آزمایشی شامل ۴ تکرار بود. واحد آزمایشی نیز شامل دو قفس کنارهم با ۴ قطعه مرغ بود.

**جیره آزمایشی:** تمام جیره‌ها با متیونین در سطوح ۰/۲۵، ۰/۳۲، ۰/۴۲ و ۰/۴۸ درصد جیره تنظیم و جهت تأمین بهترین سطح موثر متیونین بر افزایش فولات تخم‌مرغ بر اساس نیازهای طیور تخمگذار مورد آزمایش قرار گرفت. جیره آزمایشی بر پایه ذرت و سویا و بر اساس نیازمندی‌های طیور تخمگذار (NRC ۱۹۹۴) به‌عنوان جیره پایه انتخاب شد (جدول ۱). جیره‌های آزمایشی در ۴ سطح متیونین (۰/۲۵، ۰/۳۲، ۰/۴۲ و ۰/۴۸ درصد

کالیبره کرده و با قرار دادن نمونه‌ها به‌طور مستقیم در زیر مه‌پاش، نمونه را مستقیماً به شعله استیلن-هوا اسپری می‌کنیم و جذب نور حاصل از لامپ‌های کاتدی توخالی هر یک را اندازه‌گیری می‌کنیم. در صورت خارج بودن غلظت نمونه‌ها از محدوده خطی با رقیق‌سازی‌های مناسب و تهیه نمونه در محدوده خطی جذب را دوباره اندازه‌گیری کرده و نهایتاً فاکتور رقت را در محاسبات خود وارد می‌سازیم.

**تحلیل آماری داده‌ها:** تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۳ و رویه GLM صورت گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به‌روش فاکتوریل ۴×۴ و با ۴ سطح متیونین و ۴ سطح اسیدفولیک به مرحله اجرا در آمد. نتایج مربوط به روی و هموسیستئین سرم در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و مورد مقایسه قرار گرفت. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف (Kolmogrov-Smirnov) بررسی گردید. سطح معنی داری  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

### یافته‌ها

**محتوای ۵-متیل تتراهیدروفولات زرده:** نتایج آزمایشات فولات تخم مرغ نشان داد که تخم مرغ ظرفیت و پتانسیل بسیار خوبی برای غنی‌سازی با فولات در زمانی که اسید فولیک جیره افزایش یابد، دارد. محتوای فولات تخم مرغ در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که مکمل‌سازی جیره مرغان تخم‌گذار با ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره باعث افزایش معنی‌داری در زرده تخم مرغ ( $p < 0/05$ )، به ترتیب ۲۳۹/۹، ۶۱۵/۷۳،

اتم سفر نیترژن وارد دستگاه HPLC (آجگلینت سری ۱۱۰۰، تکنولوژی آجگلینت، ویلمینگتون، ایالات متحده آمریکا) شد و از ستون C18 (mm i.d ۴/۶×۲۵ cm) استفاده گردید. با استفاده از نرم‌افزار Chemstation کنترل صورت گرفت. دستگاه HPLC به ردیاب دیود اسی (DAD) و لوپ ۲۰ میکرولیتر مجهز بود. یک منحنی استاندارد خارجی با استفاده از ۵-متیل تتراهیدروفولات خالص به‌دست آمد و سپس میزان فولات تخم مرغ مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام آزمایش‌های ۵-متیل تتراهیدروفولات تخم مرغ در آزمایشگاه جهاد دانشگاهی استان آذربایجان غربی صورت گرفت.

**اندازه‌گیری هموسیستئین سرم:** در روز آخر آزمایش از هر کدام از تیمارهای آزمایشی دو مرغ انتخاب و از طریق ورید زیر بال ۳ میلی‌لیتر خون‌گیری انجام شد و بعد از جدا کردن سرم از سلول‌های خونی و نگه‌داری آنها تا زمان آزمایش در دمای ۸۰- سیلسیوس با استفاده از کیت ارزیابی آنزیمی هموسیستئین (Homocysteine Enzymatic Assay Kit Manual) شرکت بیوساینس و دستگاه اسپکتوفوتومتر مدل Cecil ساخت انگلستان (شماره سریال ۷۱۰۵۵) در طول موج ۳۴۰ nm خوانده شد.

**اندازه‌گیری میزان روی سرم و زرده:** از دستگاه جذب اتمی (مدل PG-990) ساخت کمپانی PG Instrument انگلستان، مجهز به شعله برای اندازه‌گیری روی استفاده گردید. ثبت و پردازش داده‌های دستگاه با استفاده از نرم‌افزار AAWIN 2.0 در محیط ویندوز انجام شد.

برای آنالیز این فلزات مستقیماً با محلول استاندارد ۰/۰۱ الی ۱ میلی‌گرم در لیتر دستگاه جذب اتمی را

بودند، اختلاف معنی‌داری در میزان روی سرم مشاهده نشد ولی با افزایش اسید فولیک از ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره روند کاهشی مشاهده گردید. متیونین جیره تاثیر معنی‌داری بر روی زرده نداشت و همچنین اثرات متقابل بین متیونین و اسیدفولیک نیز در میزان روی زرده مشاهده نشد (جدول ۲).

**محتوی هموسیستئین سرم:** افزودن اسید فولیک بر جیره مرغ‌های تخمگذار باعث کاهش معنی‌دار میزان هموسیستئین سرم خون شد (جدول ۳). با افزودن میزان اسیدفولیک روند کاهشی در بین تیمارها مشاهده گردید. البته، در بین سطوح مختلف اسیدفولیک تفاوت معنی‌داری دیده نشد.

۶۷۷/۱۶ و ۵۹۸/۱۵ میکروگرم در ۱۰۰گرم زرده تخم‌مرغ شد (جدول ۲). همچنین متیونین افزودنی نیز باعث بهبود میزان فولات تخم‌مرغ در تمام سطوح شد ولی در بین سطوح تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، همچنین مشاهده شد که فولات زرده به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر اثر متقابل متیونین و اسید فولیک می‌باشد.

**محتوی روی زرده و سرم:** میزان اسیدفولیک افزودنی جیره به‌طور معنی‌داری در سطوح ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره باعث کاهش روی زرده تخم‌مرغ شد (جدول ۲). در مورد روی سرم نیز همین روند مشاهده شد و با افزایش اسید فولیک جیره میزان روی سرم نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در بین تیمارهایی که با اسید فولیک مکمل سازی شده

جدول ۱- اجزای خوراکی و ترکیبات شیمیایی جیره پایه

مواد غذایی (%)	جیره ۱	جیره ۲	جیره ۳	جیره ۴
ذرت	۴۸/۸	۴۸/۷۲	۴۸/۶۱	۴۸/۵۵
کنجاله سویا	۳۰/۸۶	۳۰/۸۸	۳۰/۹	۳۰/۹۱
گندم	۴/۲۱	۴/۲	۴/۱۹	۴/۱۸
صدف کوهی	۴/۵	۴/۵	۴/۵	۴/۵
صدف دریایی	۴/۲۲	۴/۲۱	۴/۲۲	۴/۲۱
روغن گیاهی	۴/۳۹	۴/۳۹	۴/۳۸	۴/۳۸
دی کلسیم فسفات	۱	۱	۱	۱
پودر استخوان	۱/۱	۱/۱	۱/۱	۱/۱
نمک	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۵
مکمل معدنی ۱	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل ویتامینه ۲	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
متیونین	۰	۰/۰۷	۰/۱۸	۰/۲۳
لیزین	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۰۸
Zn(so <sub>4</sub> )	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲
کل	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
انرژی متابولیسم (kcal/kg)	۲۸۴۴	۲۸۴۴	۲۸۴۴	۲۸۴۴
پروتئین (%)	۱۶/۱	۱۶/۱۸۹	۱۶/۲۵	۱۳/۲۸
کلسیم (%)	۴	۴	۴	۴
فسفر در دسترس (%)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
سدیم (%)	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶
آرژنین (%)	۱/۰۲	۱/۰۲	۱/۰۲۱	۱/۰۲
لایزین (%)	۰/۸۸	۰/۸۸	۰/۸۸	۰/۸۸
ترئونین (%)	۰/۶۱	۰/۶۱	۰/۶۱	۰/۶۱
تریئوفان (%)	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
متیونین (%)	۰/۲۵	۰/۳۲	۰/۴۲	۰/۴۸
متیونین+سیستئین (%)	۰/۷۷	۰/۸۴	۰/۹۵	۱/۰۰۷
فولات (mg/kg)	۱/۰۹	۱/۰۹	۱/۰۹	۱/۰۹
روی (mg/kg)	۱۳۰	۱۳۰	۱۳۰	۱۳۰

۱: مکمل معدنی به ازای هر کیلوگرم از جیره: ۲/۴ میلی گرم مس، ۰/۳۴ میلی گرم ید، ۳۰ میلی گرم آهن، ۲۹/۷۶ میلی گرم منگنز، ۰/۰۸ میلی گرم سلنیوم، ۲۵/۸۷ میلی گرم روی.

۲: مکمل ویتامینی به ازای هر کیلوگرم از جیره: ۳۵۲۰ واحد ویتامین A، ۵۹ میلی گرم ویتامین B1، ۶/۱ میلی گرم ویتامین B2، ۸۶/۱۳ میلی گرم نیاسین، ۳/۱۳ میلی گرم پانتوتنیک اسید، ۱ میلی گرم B6، ۰/۰۶ میلی گرم بیوتین، ۸۰ میلی گرم کولین، ۰/۰۰۴ میلی گرم ویتامین B12، ۱۹ میلی گرم B9، ۱۰۰۰ واحد ویتامین D3، ۸/۸ واحد ویتامین E، ۸۸ میلی گرم ویتامین K3، همه محاسبات بر اساس نیازمندی‌های NRC (۱۹۹۴) ارزیابی شده است.

جدول ۲- اثر جیره‌های آزمایشی بر ۵-متیل تراهایدروفولات و روی زرده تخم‌مرغ

تیمارهای آزمایشی	فولات زرده میکروگرم در صد گرم زرده	روی زرده میلی‌گرم در صد گرم زرده
<b>متیونین</b>		
۰/۲۵ درصد جیره	۴۷۳/۱۴ <sup>b</sup>	۳/۱۹
۰/۳۲ درصد جیره	۵۷۱/۵۲ <sup>a</sup>	۳/۲۳
۰/۴۲ درصد جیره	۵۱۳/۰۲ <sup>a</sup>	۳/۱۲
۰/۴۸ درصد جیره	۵۷۳/۲۹ <sup>a</sup>	۳/۲۳
SEM	۴۳/۱۲	۰/۰۲
<b>اسید فولیک</b>		
۰ میلی‌گرم	۲۳۹/۹۴ <sup>c</sup>	<sup>a</sup> ۳/۶۷
۵ میلی‌گرم	۶۱۵/۷۳ <sup>ab</sup>	<sup>a</sup> ۳/۵۶
۱۰ میلی‌گرم	۵۹۸/۱۵ <sup>b</sup>	<sup>b</sup> ۲/۹۱
۱۵ میلی‌گرم	۶۷۷/۱۶ <sup>a</sup>	<sup>c</sup> ۲/۶۲
SEM	۵۵/۱۲	۰/۰۴
<b>اثر اسید فولیک×متیونین</b>		
۰/۲۵T1 متیونین درصد جیره)×(۰ اسید فولیک	۱۷۰/۳ <sup>G</sup>	۳/۸۴
۰/۲۵T2 متیونین درصد جیره)×(۵ اسید فولیک	۴۹۰/۲۷۵ <sup>DFE</sup>	۳/۶۴
۰/۲۵T3 متیونین درصد جیره)×(۱۰ اسید فولیک	۵۶۸ <sup>CDE</sup>	۲/۸۴
۰/۲۵T4 متیونین درصد جیره)×(۱۵ اسید فولیک	۶۶۳/۹۷۵ <sup>ABC</sup>	۲/۴۴
۰/۳۲T5 متیونین درصد جیره)×(۰ اسید فولیک	۲۱۴/۵۵ <sup>G</sup>	۳/۶۹
۰/۳۲T6 متیونین درصد جیره)×(۵ اسید فولیک	۶۵۴,۲۷۵ <sup>ABC</sup>	۳/۴۸
۰/۳۲T7 متیونین درصد جیره)×(۱۰ اسید فولیک	۸۰۷/۵ <sup>A</sup>	۳/۰۲
۰/۳۲T8 متیونین درصد جیره)×(۱۵ اسید فولیک	۶۰۹/۷۵ <sup>CDE</sup>	۲/۷۲
۰/۴۲T9 متیونین درصد جیره)×(۰ اسید فولیک	۲۱۰/۴۵ <sup>G</sup>	۳/۶
۰/۴۲T10 متیونین درصد جیره)×(۵ اسید فولیک	۶۴۱/۵۹۷ <sup>BCD</sup>	۳/۳۲
۰/۴۲T11 متیونین درصد جیره)×(۱۰ اسید فولیک	۵۴۸/۶۲۵ <sup>CDE</sup>	۲/۸۹
۰/۴۲T12 متیونین درصد جیره)×(۱۵ اسید فولیک	۶۵۱/۰۲۵ <sup>ABC</sup>	۲/۶۵
۰/۴۸T13 متیونین درصد جیره)×(۰ اسید فولیک	۳۶۴/۴۵ <sup>F</sup>	۳/۵۵
۰/۴۸T14 متیونین درصد جیره)×(۵ اسید فولیک	۶۷۶/۳۷۵ <sup>ABC</sup>	۳/۷۹
۰/۴۸T15 متیونین درصد جیره)×(۱۰ اسید فولیک	۴۶۸/۴۷۵ <sup>EF</sup>	۲/۸۹
۰/۴۸T16 متیونین درصد جیره)×(۱۵ اسید فولیک	۷۸۳/۸۷۵ <sup>AB</sup>	۲/۶۷
SEM	۱۱۲/۲	۰/۱۲۲

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، در هر ستون اعداد دارای حروف غیر مشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند ( $p < 0.05$ ).

جدول ۳- اثر اسید فولیک بر میزان هموسیستین و روی سرم

تیمارها (اسید فولیک)	هموسیستین (میکرومول/لیتر)	روی (میلی گرم/لیتر)
۰ میلی گرم	۱۳/۵ <sup>a</sup>	۳/۸ <sup>a</sup>
۵ میلی گرم	۷/۹ <sup>b</sup>	۲/۸ <sup>b</sup>
۱۰ میلی گرم	۷/۷ <sup>b</sup>	۲/۵ <sup>b</sup>
۱۵ میلی گرم	۷/۳ <sup>b</sup>	۲/۳ <sup>b</sup>
SEM	۰/۶۹	۰/۰۴

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، در هر ستون اعداد دارای حروف غیرمشابه از نظر آماری اختلاف معنی داری دارند ( $p < 0.05$ ).

## بحث و نتیجه گیری

متیونین و اضافه کردن اسید فولیک بخش مربوط به متابولیسم فولات در مورد اسیدهای آمینه گوگرددار بیشتر فعال شده، بنابراین تبدیل هموسیستین به متیونین افزایش می‌یابد و در نتیجه هم نیاز به متیونین کاهش یافته و هم هموسیستین که در بدن دارای اثرات مضر است کاهش می‌یابد.

محتوی ۵-متیل تتراهیدروفولات زرده به‌طور معنی داری با مکمل سازی جیره با اسید فولیک در مقایسه با جیره‌هایی که با اسید فولیک مکمل نشده بود، افزایش یافت. این نتایج یافته‌های محققان دیگر را که در مورد غنی سازی تخم مرغ گزارشاتی داشتند تأیید می‌کند (Sherwood *et al.*, 1993; House *et al.*, 2002; Hebert *et al.*, 2005; Hoey *et al.*, 2009; Tactacan *et al.*, 2010; Dickson *et al.*, 2010). نتایج این مطالعه نشان داد که مکمل سازی جیره با اسید فولیک صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در کیلوگرم جیره بطور معنی داری باعث افزایش فولات زرده تخم مرغ ( $p < 0.05$ )، به ترتیب ۲۳۹/۹۴، ۶۱۵/۷۳، ۵۹۸/۱۵ و ۶۷۷/۱۶ میکروگرم در صد گرم زرده شد (جدول ۲).

در مطالعه‌ای که توسط دیکسون و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی مرغان تخمگذار سویه ۳۶-W و ۹۸-W از

میزان هموسیستین سرم یک شاخص مهم در ارزیابی میزان فولات خون است (House *et al.*, 2003). هبرت و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که افزایش میزان اسید فولیک جیره مرغان تخمگذار بالاتر از صفر میلی گرم در کیلوگرم جیره باعث کاهش معنی دار میزان هموسیستین خون شده است (Hebert *et al.*, 2005). در مطالعه‌ای که توسط تاکتاکان و همکاران در سال ۲۰۱۱ صورت گرفت، مشخص شد که افزودن اسید فولیک به میزان ۸/۸۲ میلی گرم در کیلوگرم جیره و ۵-متیل تتراهیدروفولات در سطح ۹/۰۵ میلی گرم در کیلوگرم جیره در مقایسه با جیره شاهد با میزان فولات ۱/۴۹ میلی گرم در کیلوگرم جیره باعث کاهش معنی دار هموسیستین سرم شده است. مکانیسم کاهش هموسیستین خون با بالاتر رفتن فولات جیره، به تاثیر این ویتامین در بازمتیله کردن هموسیستین در چرخه متیلاسیون مربوط می‌شود. ۵-متیل تتراهیدروفولات بین سلولی گروه متیل خود را به هموسیستین داده و آن را به متیونین تبدیل می‌کند (Bagley *et al.*, 2005). بنابراین با توجه به مسیرهای بیوشیمیایی که اشاره شد، مشخص می‌شود که با کاهش



غیرقابل جذب تشکیل داده و باعث دفع روی از دستگاه گوارش می‌شود. این در حالی است که روی با تبدیل پلی‌گلوتامات به فرم منوگلوتامات فولات باعث افزایش جذب اسید فولیک در pH اسیدی در ابتدای روده مهره‌داران می‌شود (Milne et al., 1984). تاکتاکان و همکاران در سال ۲۰۱۱ یک سیستم حمل‌کننده اسید فولیک در کل روده مرغان تخمگذار را شناسایی کردند (Tactacan et al., 2010). بالاترین جذب اسید فولیک زمانی مشاهده شد که روده اسیدی بوده و pH تقریباً برابر با ۶ داشت. بیشترین مقدار جذب اسید فولیک در دئودنوم و ژژنوم و کمترین جذب در ایلئوم و سکوم مشاهده شد.

نتایج مطالعه نشان داد با افزایش اسید فولیک و متیونین در جیره طیور تخمگذار میزان فولات تخم‌مرغ که از نوع ۵-متیل تتراهیدروفولات بوده و شکل فعال این ویتامین از نظر بیولوژیکی می‌باشد، افزایش یافته و تخم‌مرغ را به منبع عالی از این ویتامین تبدیل می‌کند.

### سپاسگزاری

از زحمات آقایان مهندس قشلاقی و مهندس نیکخواهی کارشناسان آزمایشگاه جهاد دانشگاهی ارومیه تشکر و قدردانی می‌شود. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

سنین ۲۵ تا ۲۸ هفتگی در یازده دوره ۲۸ روزه صورت گرفت، مشخص شد که بیشترین میزان فولات تخم‌مرغ در اولین دوره‌های شروع آزمایش به دست آمد و نشان داد که با بالغ شدن مرغ‌ها توانایی آنها در جذب فولات کاهش یافته و ذخیره فولات در زرده از طریق مگنوم و تخمک توسط پروتئین‌های باند شونده با فولات کاهش می‌یابد. لذا، این محققین اعلام کردند بهترین زمان غنی‌سازی تخم‌مرغ با فولات قبل از شروع پیک تولید و در اوایل تولید می‌باشد (Dickson et al., 2010).

یک تخم‌مرغ غنی‌شده با فولات با وزن تقریبی ۵۵ گرم دارای ۱۰۱ میکروگرم فولات طبیعی می‌باشد. این مقدار می‌تواند ۲۵، ۶۷ و ۱۷ درصد فولات مجاز روزانه (RDA) برای بزرگسالان (۴۰۰ میکروگرم در روز) و کودکان (۱۵۰ میکروگرم در روز) و زنان حامله (۶۰۰ میکروگرم در روز) را به ترتیب تأمین کند (Bagley et al., 2005).

در جدول ۲ مشاهده می‌شود که اسید فولیک جیره تاثیر معنی‌داری بر میزان روی تخم‌مرغ داشته است، طوری که با افزایش اسید فولیک افزودنی میزان روی تخم‌مرغ کاهش یافته است. در مورد سطح روی سرم نیز همین روند مشاهده می‌شود و به‌طور معنی‌داری در سطوح افزوده‌شده اسید فولیک، روی سرم نسبت به تیمار شاهد کاهش می‌یابد. احتمالاً این اتفاق به این خاطر است که افزایش اسید فولیک با روی ترکیب

## منابع

- Bagley, P. and Shane, B. (2005). Folate. In Encyclopedia of Dietary Supplements. USA: New York, Marcel Dekker, pp: 219-228.
- Dickson, T.M., Tactacan, G.B., Hebert, K., Guenter, W. and House, J.D. (2010). Optimization of folate deposition in eggs through dietary supplementation of folic acid over the entire production cycle of Hy-Line W36, Hy-Line W98, and CV20 laying hens. Journal of Applied Poultry Research, 19: 80-91.
- Jing, M., Rech, L., Wu, Y., Goltz, D., Taylor, G.G. and House, J.D. (2015). Effect of zinc deficiency and zinc supplementation on homocysteine levels and related expression in rats. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 30: 77-82.
- Halsted, C.H. (1990). Intestinal absorption of dietary folates. In: Folic Acid Metabolism in Health and Disease. Picciano, M.F., Stokstad, E.L.R and Gregory, J.F. editors. USA: New York, NY: Wiley-Liss Inc, pp: 23-45.
- Hebert, K., House, J.D. and Guenter, W. (2005). Effect of dietary folic acid supplementation on egg folate content and the performance and folate status of two strains of laying hens. Poultry Science, 84: 1533-1538.
- Hoey, L., McNulty, H., McCann, E.M., McCracken, K.J., Scott, J.M., Marc, B.B., *et al.* (2009). Laying hens can convert high doses of folic acid added to the feed into natural folates in eggs providing a novel source of food folate. British Journal of Nutrition, 101: 206-212.
- House, J.D., Braun, K., Ballance, D.M., O'Connor, C.P. and Guenter, W. (2002). The enrichment of eggs with folic acid through supplementation of laying hen diet. Poultry Science, 81:1332-1337.
- House, J.D., O'Connor, C.P. and Guenter, W. (2003). Plasma homocysteine and glycine are sensitive indices of folate status in a rodent model of folate depletion and repletion. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51: 4461-4467.
- Milne, D.B., Canfield, W.K., Mahalko, J.R. and Sanstead, H.H. (1984). Effect of oral folic acid supplements on zinc, copper, and iron absorption and excretion. American Journal of Clinical Nutrition, 39: 535-539.
- Mudd, S.H. and Poole, J.R. (1975). Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimes. Metabolism, 24: 721-735.
- Sherwood, T.A., Alphin, R.L., Saylor, W.W. and White, H.B. (1993). Folate metabolism and deposition in eggs by laying hens. Archives of Biochemistry Biophysics, 307: 66-72.
- Tactacan, G.B., Jing, M., Rodriguez-Lecompte, J.C., Oconner, D.L., Guenter, W. and House, J.D. (2010). Characterization of folate-dependent enzymes and indices of folate status in laying hens supplemented with folic acid or 5-methyltetrahydrofolate. Poultry Science, 89: 688-696.
- Tactacan, G.B., Rodriguez-Lecompte, J.C., Karmin, O. and House, J.D. (2011). Functional characterization of folic acid transport in the intestine of the laying hen using the everted intestinal sac model. Poultry Science, 90: 83-90.
- Tiemeier, H., Van Tuijl, H.R., Hofman, A., Meijer, J., Kiliaan, A.J. and Breteler, M.M. (2002). Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. American Journal of Psychiatry, 159: 2099-2101.

## The effects of dietary folic acid and methionine administration on yolk and serum 5-methyltetrahydrofolate and zinc content and quantity of homocysteine on the laying hens serum

Bagheri, S.<sup>\*1</sup>, Janmohmmadi, H.<sup>2</sup>, Maleki, R.<sup>3</sup>, Ostadrahimi, A.<sup>4</sup>, Kianfar, R.<sup>5</sup>

1- PhD student, Department of Animal Science. Faculty of Agriculture. University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2- Associate Professor, Department of Animal Science. Faculty of Agriculture. University of Tabriz, Tabriz, Iran.

3- Assistant Professor, Department of chromatography, Iranian academic center for education, culture and research (ACECR), Urmia, IRAN.

4- Professor, Nutrition Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

5- Assistant Professor, Department of Animal Science. Faculty of Agriculture. University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Corresponding author. Department of Animal Science. Faculty of Agriculture. University of Tabriz, Tabriz

Corresponding author's email: sattar\_bagheri@yahoo.com

### Abstract

This study was performed to evaluate the effects of folic acid (FA) and methionine (Mt) administration on egg 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) content, levels of zinc in yolk and serum and concentration of homocysteine on Hy-line W36 hens from 20 to 26 weeks of age. The experiment was conducted as a 4×4 factorial arrangement of treatments in randomized complete design with four levels of Mt (0.25, 0.32, 0.42, 0.48 mg/kg of diet) and four levels of FA (0, 5, 10, 15 mg/kg of diet). Fortification of laying hens diets with FA 0, 5, 10 and 15 mg/kg of diet increased 5-MTHF into yolk significantly ( $p<0.05$ ). 5-MTHF content of egg was also significantly affected by FA×Mt interaction ( $p<0.05$ ). FA significantly reduced Zn level of egg and serum ( $p<0.05$ ), but Mt did not have any effect on Zn content in egg. Levels of serum homocysteine were significantly reduced by fortification of diet by FA ( $p<0.05$ ). Supplementation of laying poultry diet with FA and Mt could improve the content of yolk 5-MTHF.

**Keywords:** Folic acid, Methionine, Homocysteine, Zinc, Egg