ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

თამარ ალბუთაშვილი

ცხოველთა საკვების ანტიოქსიდანტური მახასიათებლების გაუმჯობესება ქართული ყურძნის წიპწის ზეთის წარმოების ნარჩენების გამოყენებით

გამოყენებითი ბიომეცნიერებებისა და ბიოტექნოლოგიის სამაგისტრო პროგრამა

მისანიჭებელი ხარისხი: გამოყენებითი ბიომეცნიერებებისა და ბიოტექნოლოგიის მაგისტრი

ხელმძღვანელი: ზურაბ ქუჩუკაშვილი
აკადემიური დოქტორი,
ასოცირებული პროფესორი

გამოყენებითი ბიომეცნიერებების და ბიოტექნოლოგის მიმართულება
ბიოლოგიის დეპარტამენტი

თბილისი
2023

სარჩევი

ანოტაცია 4

Abstract 5

შესავალი 6

თავი I - ლიტერატურული მიმოხილვა 9

1.1. ჟანგბადის აქტიური ფორმების გავლენა ცოცხალ ორგანიზმებზე 9

1.2. ანტიოქიდანტების როლი ცხოველთა კვებაში 11

1.3. ღვინის გადამუშავების შედეგად მიღებული ნარჩენები 12

თავი II - კვლევის ობიექტი გამოყენებული მეთოდები 15

2.1. კვლევის ობიექტი 15

2.2. პოლიფენოლების ექსტრაქცია ეთილაცეტატით და სპირტწყალხნარით 16

2.3. წიპწიდან გამოყოფილი ექსტრატების მშრალი სახით მიღება 16

2.3.1 როტაციული ამაორთქლებელით გამხსნელების აორთქლება 16

2.3.2 ვაკუუმ თერმოსტატით კონცენტრატის გამოშრობა 17

2.4. საერთო პოლიფენოლების განსაზღვრა Folin-Ciocalteu-ს მეთოდით 17

2.5. საერთო ფლავანოიდების განსაზღვრა 19

2.6. ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრა ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდის გამოყენებით 20

2.7. ფარდობითი ანტიოქსიდანტური აქტივობის გამოთვლა ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდზე დაყრდნობით 22

2.8. მალონილ დიალდეჰიდის განსაზღვრა თიობარბიტურის მჟავის გამოყენებით 23

თავი III - ცხოველთა საკვების წარმოება და სიმულაციური ტესტირება 25

3.1 გამოყოფილი ექსტრაქტით და სინთეზურად და ბუნებრივად მიღებული კომერციული პრეპარატებით ცხოველთა ექსტრუდირებული საკვების წარმოება 25

3.2 ცხოველთა სატესტო საკვებზე დაკვირვება ვადიანობის განსასაზღვრად სიმულაციურ სტრესულ პირობებში 26

კვლევის შედეგები და მათი განხილვა 28

შედეგების შეჯამება 37

დასკვნები 38

გამოყენებული ლიტერატურა 39

ანოტაცია

დღითიდღე დიდი ყურადღება ექცევა როგორც ადამიანების, აგრეთვე ცხოველების, და მცენარეების საარსებო გარემოს საერთო ჯანმრთელობასა, კეთილდღეობას და სიჯანსაღეს. სწორედ ამიტომ ცხოველთა საკვების გაუმჯობესება წარმოადგენს ერთ ერთ გამოწვევას, მათ შორის კი გამოვყოფთ ჟანგვითი სტრესის შემცირების საკითხს, რომლისგან თავის დასაცავად აქტიურად იყენებენ ბუნებრივ თუ სინთეზურ ანტიოქსიდანტებს. აგრეთვე, ყურადღება მისაქცევია რომ ბოლო წლებში სინთეზური ანტიოქსიდანტების ნეგატიურმა ეფექტმა ნათლად დაგვანახა რომ ანტიოქსიდანტების ბუნებრივი ალტერნატივები გარემოში შეგვიძლია ვეძებოთ. ბუნებრივ პრეპარატებს არ აქვთ ანალოგიური კანცეროგენული თვისებები ცოცხალი ორგანიზმების მიმართ რის გამოც ზოგიერთი სინთეზური პრეპარატი აკრძალულია როგორც ადმაიანის ასევე ცხოველთა საკვებში გამოსაყენებლად.

ჩვენი კვლევის მიზანია შეგვესწავლა ქართული ყურძნის წიპწი ზეთის წარმოების ნარჩენებიდან გამოყოფილი, ბუნებრივი ექსტრაქტების პოტენციალი ცხოველთა საკვების ანტიოქსიდანტური მახასიათებლების გასაძლიერებლად.

კვლევაში გამოყენებული ყურძნის წიპწის ზეთის წარმოების ნარჩენები შეგროვდა ადგილობრივი ღვინის ქარხნიდან და დაექვემდებარა მოპოვების და გამწმენდი პროცესების სერიას, კონცენტრირებული ანტიოქსიდანტური ექსტრაქტის მისაღებად. წიპწის შროტის ექსტრაქტთან ერთად მოხდა სხვა კომერციული ანტიოქსიდანტების აქტივობის და ეფექტის შედარება როგორც ლაბორატორიულ აგრეთვე საწარმოო პირობებში. ლაბორატორიულ პირობებში ჩატარებულმა კვლევებმა აჩვენა ექსტრაქტების მთლიანი ფენოლური ნაერთების და ფლავონოიდების მაღალი დონე, რომლებიც ცნობილია მათი ძლიერი ანტიოქსიდანტური მოქმედებით. კონკრეტულად წიპწის შროტიდან გამოყოფილი ექსტრაქტები და სხვა კომერციული ბუნებრივი თუ სინთეზური ანტიოქსიდანტები ჩართული იყო ძაღლის საკვების რაციონებში და შეფასდა მისი გავლენა საკვების ანტიოქსიდანტურ მახასიათებლებზე.

შედეგებმა აჩვენებს, რომ ყურძნის წიპწის ზეთის წარმოების ნარჩენი ექსტრაქტის დამატებამ მნიშვნელოვნად გაზარდა ცხოველის საკვების ანტიოქსიდანტური შესაძლებლობები. წიპწის შროტის ექსტრაქტმა გამოავლინა ჯამური ფენოლური ნაერთების და ფლავონოიდების მაღალი დონე, რომლებიც ცნობილია მათი ძლიერი ანტიოქსიდანტური თვისებებით. ყურძნის თესლის ზეთის წარმოების ნარჩენების გამოყენება, როგორც ბუნებრივი ანტიოქსიდანტური წყარო ცხოველთა საკვებში, დიდ მოლოდინებს იძლევა როგორც მეცხოველეობის ინდუსტრიაში ასევე კომპანიონი ცხოველების საკვების გაუმჯობესებაში. ამ ნარჩენების ჩართვით, არა მხოლოდ შეიძლება გაზარდოს ცხოველის საკვების ანტიოქსიდანტური მახასიათებლები, არამედ შეიძლება შემცირდეს სინთეზურ დანამატებზე დამოკიდებულება, რაც გაზრდის ბუნებრივ საკვებ დანამატებზე მზარდ მოთხოვნას.

Abstract

Enhancing the antioxidant characteristics of animal feed by using the Georgian grape seed oil production residues

Nowadays, a lot of attention is paid to the overall health, health and well-being of the living environment of both humans, animals and plants. That is why the improvement of animal feed is one of the challenges, and among them I highlight the issue of reduction of oxidative stress, from which natural or synthetic antioxidants are actively used to protect themselves. It should also be noted that in recent years, the negative effect of synthetic antioxidants has clearly shown us that we can look for natural alternatives of antioxidants in the environment. Natural drugs do not have similar carcinogenic properties to living organisms, which is why some synthetic drugs are prohibited for use in human and animal feed.

The aim of our study was to study the potential of natural extracts from Georgian grape seed oil production waste to enhance the antioxidant properties of animal feed.

Grape seed oil production waste used in the study was collected from a local winery and subjected to a series of extraction and purification processes to obtain a concentrated antioxidant extract. The activity and effect of other commercial antioxidants were compared with the grape seed extract both in vitro and in vivo.

In laboratory studies, the grape seed extract revealed high levels of total phenolic compounds and flavonoids, known for their strong antioxidant activity. Specifically, extracts isolated from safflower whey and other commercial natural or synthetic antioxidants were incorporated into dog food rations and evaluated for their effects on the antioxidant properties of the food.

In general, the residue obtained after the extraction of grape seed oil is rich in bioactive compounds with antioxidant properties. Moreover, in vitro assays revealed substantial protective activity against free radicals, indicating its potential to reduce oxidative stress in animals.

The results indicate that the addition of residual extract of grape seed oil production significantly increased the antioxidant capacity of the animal feed. The extract revealed high levels of total phenolic compounds and flavonoids, known for their strong antioxidant properties. The use of grape seed oil production residues as a natural antioxidant source in animal feed holds great promise both in the livestock industry and in the improvement of pet food. By incorporating these residues, not only can the antioxidant properties of animal feed be increased, but the dependence on synthetic additives can be reduced, which will increase the growing demand for natural feed additives.

შესავალი

მსოფლიო მოსახლეობის დიდი ტემპით ზრდასთან ერთად გაიზარდა მოთხოვნილება სურსათზე და მათ შორის ცხოველთა საკვებზეც. შესაბამისად ერთი-ერთი გამოწვევა სწორედ სურსათის და ცხოველთა საკვების პრეზერვაციაა ისე რომ მინიმუმამდე დავიყვანოთ საზრდო ნივთიერებების დანაკარგი, ამასთანავე შევინარჩუნოთ პროდუქტის უვნებლობა და პირვანდელი იერსახე გრძელ ვადაში. დღეისათვის ერთ-ერთ გამოწვევად რჩება ოქსიდაციური სტრესის მართვა, რომელიც ცოცხალ ორგანიზმებზე ნეგატიურად აისახება. ჟანგვითი სტრესი და თავისუფალი რადიკალების სიჭარბე როგორც ადამიანებში, ასევე ცხოველების ორგანიზმში იწვევს უჯრედების და/ან ქსოვილების დაზიანებას [1] ქრონიკულ დაავადებებს როგორიცაა კიბო, დიაბეტი, გულის დაავადებები და სხვა [2].

ექსპერიმენტულად დადასტურდა, რომ პოლიფენოლები არა მხოლოდ ხელს უშლის სხვადასხვა დაავადებებს, არამედ გავლენას ახდენს დაავადების გავრცელებაზე, თრგუნავს პროგრესირებას და ხელს უწყობს ჭრილობის შეხორცების პროცესსაც კი [3].

უკანასკნელ პერიოდში ნარჩენების გადამუშავება [4, 5] ძალიან აქტუალური გახდა. განვითარებული ქვეყნები ცდილობენ გარემოზე ზიანის და რესურსების არასათანადო ხარჯვის საწინააღმდეგოდ დანერგონ უნარჩენო წარმოების პრაქტიკა.

ოქსიდაციური სტრესის მართვისთვის ამჟამად იყენებენ სინთეზურ და ბუნებრივ ანტიოქსიდანტებს, რომლებსაც გააჩნიათ ფერმენტული თუ არაფერმენტული აქტივობა თავისუფალი რადიკალების მიმართ. თუმცა წლიდან წლამდე სინთეზურ ანტიოქსიდანტებზე დაკვირვებამ ცხადყო რომ ზოგიერთი მათგანი აჩერებს თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნას, მაგრამ ნეგატიური გავლენა აქვს ცოცხალ ორგანიზმებზე, რადგან შემდგომში არ ხდება მათი ორგანიზმიდან გაწოვა. შესწავლილია რომ ზოგიერთი სინთეზური ანტიოქსიდანტი (Ethoxyquin, ბუტილირებული ჰიდროქსიანიზოლი - BHA) აკუმულირდება ქსოვილებში და იწვევს კანცეროგენობას, ციტოტოქსიკურობას, ოქსიდაციური სტრესის ინდუქციას, ენდოკრინულ დარღვევებს და სხვა პათოლოგიებს. შესაბამისად ევრო რეგულაციით 2017 წელს აიკრძალა სინთეზური ანტიოსიდანტის Etoxiquin - ის გამოყენება სურსათსა და შეიზღუდა ცხოველთა საკვებში [6]. აგრეთვე 2023 წლის 11 მაისიდან შეიზღუდა

სინთეზური ანტიოქსიდანტის, ბუტილირებული ჰიდროქსიანიზოლი (BHA) ის გამოყენება კატი საკვებში [7].

შესაბამისად თანდათან პრიორიტეტულობა ენიჭება ნატურალური ანტიოქსიდანტების გამოყენებას როგორც სურსათში [8,9] ისე ცხოველთა საკვებში [10]. მოგეხსენებათ საქართველო გამოირჩევა მცენარეთა მრავალფეროვნებით, რომელთა უმეტესობა ბუნებრივი ანტიოქსიდანტების წყაროა მათ შორის ერთ ერთი კარგად შესწავლილი პროდუქტია ღვინო და მასში არსებული ანტიოქსიდანტები (რეზვერატროლი, ანთოციანინები, კატექინები…)

ღვინის წარმოებისას ნარჩენების წიპწის ზეთის გამოხდის შედეგად მიღებული ნარჩენების ანტიოქსიდანტური აქტივობა ჯერ კიდევ არ შესწავლილა და რეალურად ხდება ამ ნარჩენების არარაციონალური უტილიზაცია. სწორედ რომ ღვინის წარმოებისას ნარჩენების შესწავლა და მასში არსებული ანტიოქსიდანტების იდენტიფიცირება, ასევე აქტივობის განსაზღვრა დაგვეხმარება ნარჩენების მიზანმიმართულად გამოყენებაში რითაც მივიღებთ უნარჩენო წარმოებას.

აღნიშნულიდან გამომდინარე, ჩვენი **კვლევის მიზანია** ქართული ყურძნის გადამუშავების შედეგად მიღებული ნარჩენების გამოყენება ცხოველთა საკვების გასაუმჯობესებლად, რომელიც სამომავლოდ დაეხმარება უნარჩენო წარმოების მოდელის შექმნას და საფუძველს დაუდებს ნატურალური ინოვაციური ინგრედიენტებით ცხოველთა საკვების წარმოებას.

საკითხის გადასაჭრელად კი შერულდა შემდეგი **ამოცანები:**

- წიპწის შროტიდან პოლიფენოლების გამოყოფა სოქსლეტის ექსტრაქციის აპარატით, ორი სხვადასხვა გამხსნელის ეთანოლი, ეთილ აცეტატის საშუალებით;
- წიპწის შროტიდან გამოყოფილი ექსტრაქტის გამოშრობა.
- პოლიფენოლების და ფლავანოიდების რაოდენობრივი ანალიზი სპექტროფოტომეტრული მეთოდით;
- გამოყოფილი ექსტრაქტების და სინთეზურად და ბუნებრივად მიღებული კომერციული პრეპარატების ანტიოქსიდანტური თვისებების შესწავლა და ურთიერთ შედარება (ქემილომინესცენციით ჯამური ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრის და თიობარბიტურის ტესტით მალონილდიალდეჰიდის განსაზღვრის მეთოდებით);

- გამოყოფილი ექსტრაქტით და სინთეზურად და ბუნებრივად მიღებული კომერციული პრეპარატებით ცხოველთა ექსტრუდირებული საკვების წარმოება;
- ცხოველთა სატესტო საკვებზე დაკვირვება სიმულაციურ სტრესულ პირობებში;

საბოლოო ეტაპზე მოხდა მონაცემების შეგროვება, სტატისტიკური დამუშავება, ანალიზი, ყველა მიღებული შედეგის ლოგიკური ურთიერთშედარება და შეჯამება.

თავი I - ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1. ჟანგბადის აქტიური ფორმების გავლენა ცოცხალ ორგანიზმებზე

ჟანგბადის აქტიური ფორმები როგორც რეაქტიული ჟანგბადის სახეობები (ROS) მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ბიოლოგიურ სისტემებში. მიუხედავად იმისა, რომ ისინი აუცილებელია სხვადასხვა უჯრედული პროცესებისთვის. ორგანიზმში ჟანგბადის აქტიური ფორმების გამომუშავებასა და უჯრედულ ანტიოქსიდანტურ თავდაცვის მექანიზმებს შორის დისბალანსმა შეიძლება გამოიწვიოს ოქსიდაციური სტრესი, ბიომოლეკულების დაზიანება და პოტენციურად ხელი შეუწყოს სხვადასხვა დაავადებებსა და დაბერების პროცესებს [11,12]. ამ პროცესში ზეჟანგური ჟანგვის ძლიერ კატალიზატორებს წარმოადგენს მეტალები მაგალითად Fe, Zn რომელთაც ადვილად შეუძლიათ ელექტრონის გაცემა, საკუთარი თავის დაჟანგვა და თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნა [16].

$$ROOH + Fe2+ \rightarrow RO\cdot + OH^{-} + Fe3+$$

გამომდინარე ჟანგბადის აქტიური ფორმებს ცოცხალ ორგანიზმებზე აქვს შემდეგი გავლენა: უჯრედული სასიგნალო ფუნქცია: ჟანგბადის აქტიური ფორმები ($O_2^{\cdot}$, H_2O_2 , $OH^{\bullet}$, $^1O_2$, $HO^{\bullet}2$, $RO^{\bullet}2$) მოქმედებენ როგორც მნიშვნელოვანი სასიგნალო მოლეკულები სხვადასხვა უჯრედულ პროცესებში, როგორიცაა უჯრედების გამრავლება, დიფერენციაცია და აპოპტოზი (უჯრედების დაპროგრამებული სიკვდილი). ისინი მონაწილეობენ რედოქსის სასიგნალო გზებში, რაც ეხმარება უჯრედებს რეაგირება მოახდინონ გარემოში არსებულ ცვლილებებზე და დაარეგულიროს მნიშვნელოვანი ფიზიოლოგიური პროცესები.

დნმ-ის დაზიანება: რეაქტიული ჟანგბადის სახეობებმა (ROS) შეიძლება გამოიწვიოს დნმ-ის ოქსიდაციური დაზიანება, რაც იწვევს მუტაციებს და გენომიურ არასტაბილურობას. დნმ-ის გამოუსწორებელმა დაზიანებამ შეიძლება გაზარდოს კიბოს და სხვა გენეტიკური დარღვევების რისკი[13].

ცილების დაზიანება: რეაქტიული ჟანგბადის სახეობებს (ROS) შეუძლიათ შეცვალონ ცილები დაჟანგვით, რამაც შეიძლება შეცვალოს მათი სტრუქტურა და ფუნქცია. შესაბამისად ირღვევა უჯრედული პროცესები, რაც ხელს უწყობს სხვადასხვა დაავადებებს [14,15].

ლიპიდური პეროქსიდაცია: ლიპიდური პეროქსიდაცია იწყება, როდესაც რეაქტიული ჟანგბადის სახეობები (ROS), როგორიცაა ჰიდროქსილის რადიკალები (•OH), რეაგირებს უჯრედულ მემბრანებში არსებულ უჯერი ცხიმოვან მჟავებთან. ამ რეაქციის შედეგად წარმოიქმნება ლიპიდური რადიკალები, რომლებიც შემდეგ რეაგირებენ ჟანგბადთან ლიპიდური პეროქსილის რადიკალების შესაქმნელად. ამ პეროქსილის რადიკალებს შეუძლიათ რეაქციის გავრცელება მეზობელ ლიპიდებზე, რაც იწვევს ლიპიდების დაჟანგვის ჯაჭვურ რეაქციას. შესაბამისად ზიანდება უჯრედული მემბრანები რაც იწვევს უჯრედების დისფუნქციას და უჯრედების სიკვდილს [16].

ანთებითი პროცესები: რეაქტიული ჟანგბადის სახეობების (ROS) ჭარბმა რაოდენობამ შეიძლება გამოიწვიოს ორგანიზმში ანთებითი რეაქციები. ქრონიკული ანთება, რომელიც გამოწვეულია ოქსიდაციური სტრესით, ასოცირდება სხვადასხვა ქრონიკულ დაავადებებთან, მათ შორის გულ-სისხლძარღვთა დაავადებებთან, ნეიროდეგენერაციულ დარღვევებთან და დიაბეტთან.

დაბერება: ოქსიდაციური სტრესი ითვლება დაბერების პროცესის ერთ-ერთ ხელშემწყობ ფაქტორად. დროთა განმავლობაში, რეაქტიული ჟანგბადის სახეობებით (ROS) დაგროვილმა დაზიანებამ შეიძლება გამოიწვიოს უჯრედული დისფუნქცია და ქსოვილის მთლიანობის დაქვეითება, რაც ხელს უწყობს დაბერების პროცესს.

იმუნური პასუხი: რეაქტიული ჟანგბადის (ROS) სახეობები წარმოიქმნება იმუნური უჯრედების მიერ, როგორიცაა ნეიტროფილები და მაკროფაგები, როგორც პათოგენების წინააღმდეგ იმუნური პასუხის ნაწილი. ჟანგბადის აქტიური ფორმები მონაწილეობს შემოჭრილი მიკროორგანიზმების განადგურებაში, მაგრამ მათ აგრეთვე შეუძლიათ გამოიწვიონ მიმდებარე ქსოვილების დაზიანება [17].

ანტიოქსიდანტური თავდაცვის მექანიზი: უჯრედებს აქვთ ჩაშენებული ანტიოქსიდანტური თავდაცვის სისტემა, რომელიც ხელს უწყობს რეაქტიული ჟანგბადის სახეობების (ROS) განეიტრალებასა და დეტოქსიკაციას. ანტიოქსიდანტები, როგორიცაა ფერმენტები

(სუპეროქსიდის დისმუტაზა, კატალაზა და გლუტათიონ პეროქსიდაზა) და მოლეკულები (ვიტამინი C, ვიტამინი E, გლუტათიონი), გადამწყვეტ როლს თამაშობენ ბალანსის შენარჩუნებაში ჟანგბადის აქტიურ ფორმების წარმოებასა და ელიმინაციას შორის. [16]

1.2. ანტიოქიდანტების როლი ცხოველთა კვებაში

ანტიოქსიდანტები გადამწყვეტ როლს ასრულებენ ცხოველთა კვებაში, რაც ხელს უწყობს უჯრედებისა და ქსოვილების დაცვას ჟანგბადის აქტიური ფორმებისგან და სხვა თავისუფალი რადიკალების მიერ გამოწვეული ჟანგვითი დაზიანებებისგან. ცხოველის საკვები შეიცავს ისეთ კომპონენტებს, როგორიცაა ცხიმები, ცილები და სხვა ორგანული ნაერთები, რომლებიც მგრძნობიარეა დაჟანგვის მიმართ [16, 18]. საკვებში შემავალი საზრდო ნივთიერებები მგრძნობიარეა გარემო ფაქტორების მიმართ როგორიც არის ჟანგბადი, სინათლე და ტემპერატურა. შესაბამისად საკვებში შემავალი საზრდო ნივთიერებების ჟანგვამ შეიძლება გამოიწვიოს საკვების კვებითი ღირებულების დაქვეითება და ტოქსიკური ნაერთების წარმოქმნა, რაც შეიძლება ძალიან საშიში აღმოჩნდეს ცხოველებისათვის. ანტიოქსიდანტებს შეუძლიათ თავიდან აიცილონ ან შეანელონ საკვებში საზრდო ნივთიერებების ჟანგვის პროცესი თავისუფალი რადიკალების განეიტრალების გზით, რომლებიც ზიანს აყენებენ ცხოველის ორგანიზმს.

საკვების დაცვის გარდა, ცხოველის საკვებში შემავალი ანტიოქსიდანტები, ასევე შეიძლება ძალიან სასარგებლო იყოს ცხოველის ჯანმრთელობისთვის. მაგალითად, ოქსიდაციური სტრესი შეიძლება მოხდეს ცხოველის სხეულში, როდესაც ის განიცდის გარემო სტრესებს, როგორიცაა სიცხე, დაავადება ან მაღალ ენერგეტიკული საკვები. ცხოველის საკვებში არსებულ ანტიოქსიდანტებს შეუძლიათ ხელი შეუწყონ ოქსიდაციური სტრესის შემცირებას, თავისუფალი რადიკალების განეიტრალებისა და ცხოველის უჯრედების დაზიანებას. სწორედ ანტიოქსიდანტებმა შეიძლება გააუმჯობესონ ცხოველის იმუნური ფუნქცია, რეპროდუქციული მოქმედება და საერთო ჯანმრთელობა.

დღეისათვის ცხოველთა საკვებში გამოიყენება სინთეზური და ბუნებრივი ანტიოქსიდანტები, რომლებსაც გააჩნიათ ფერმენტული თუ არაფერმენტული აქტივობა თავისუფალი რადიკალების მიმართ. ბუნებრივი ნივთიერებებიდან ანტიოქსიდანტური თვისებებით

გამოირჩევა ვიტამინ E, ვიტამინ C, β-კაროტინი და სხვადასხვა მცენარეული წარმოშობის ნაერთები, როგორიცაა პოლიფენოლები, ფლავონოიდები და კაროტინოიდები. ხოლო სინთეზური ანტიოქსიდანტების მრავალ ნივთირებას ვხვდებით: BHA (ბუტილირებული ჰიდროქსიანიზოლი), BHT (ბუტილირებული ჰიდროქსიტოლუენი), TBHQ (მესამე ბუტილჰიდროქინონი), პროპილ გალატი, Ethoxyquin (ეტოქსიქინი), ასკორბილის პალმიტატი, გალატები როგორიც არის პროპილ გალატი, ოქტილ გალატი და დოდეცილ გალატი [19, 20,23].

ცხოველის საკვებში დამატებული ანტიოქსიდანტის შესაბამისი ტიპი და რაოდენობა დამოკიდებული არის სხვადასხვა ფაქტორზე, როგორიცაა ცხოველის სახეობა, დიეტა, ასევე საკვების წარმოების ტექნოლოგია. ანტიოქსიდანტები ძალიან სასარგებლოა ისეთი საკვები ნივთიერებების დაკარგვის თავიდან ასაცილებლად, როგორიცაა ვიტამინური კომპლექსები, ამინომჟავები და სხვა საკვები დანამატები. ვინაიდან ანტიოქსიდანტები იცავს მათ დაჟანგვით გამოწვეული ზიანისგან. ანტიოქსიდანტები ასევე გამოიყენება საკვების ორგანოლეპტიკური მახასიათებლების შესანარჩუნებლად, რითაც ამცირებს მათი იერსახის ცვლილებას.

1.3. ღვინის გადამუშავების შედეგად მიღებული ნარჩენები

ყურძნის ღვინოდ და წვენის სახით სამრეწველო გადამუშავებისას, დიდი რაოდენობით გამოუყენებელი ნარჩენები რჩება, რომელიც გადამუშავებული ყურძნის მოცულობის 10-20 % -ს შეადგენს. ყურძნის ნაყოფში სხვადასხვა კომპონენტების შემცველობა შემდეგნაირად ნაწილდება: კანი - 6.5 -10.5 %; ყურძნის წიპწა - 2 – 5%; რბილობი - 87-91%.

ხოლო ჭაჭისგან ყურძნის წიპწის წარმოების სამრეწველო ნედლეულს მეღვინეობის ნარჩენებს წარმოადგენს: ყურძნის მარცვლის კანი 43-45 %, წიპწა 24-26 % და კლერტი 22-32 %.

ყველა ღვინის მწარმოებელ ქვეყანაში მეღვინეობის მეორადი ნედლეულის უტილიზაციის პრობლემა საკმაოდ აქტუალურია. ამ მხრივ საქართველოში მნიშვნელოვან პრობლემას წარმოადგენს ღვინის მიღების შედეგად დარჩენილი მასის მიზნობრივი გამოყენაბა. ცნობილია, რომ ყურძნის გადამუშავებით წარმოიშვება მეორადი ნედლეული, რომლისაგანაც შესაძლებელია მივიღოთ მნიშვნელოვანი ღირებულების ეთილის სპირტი, ენანტის ეთერი,

ყურძნის ზეთი, ღვინის ქვის მჟავა, ტანინი, ენოსაღებარი, ფურფუროლი, საკვები საფუარი და მრავალი სხვა პროდუქტები.

კონკრეტულად წიპწის გადამუშავების შედეგად მიღებული ნარჩენები რომ განვიხილოთ. გაშრობამდე ყურძნის წიპწა შეიცავს 30-40% ტენს, 3-7% მთრიმლავ, 6-10% ცხიმოვან ნივთიერებებს და 1-2% მინერალურ ნივთიერებებს. ხოლო გამომშრალი წიპწის შედგენილობაში არის დაახლოებით 22% ცხიმოვანი ზეთი და ცხიმში ხსნადი ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები, მაგალითად: პროანტოციანიდინები, რეზევრატროლი,კატეხინები და სხვა.

მსოფლიოს მთელ რიგ ღვინის მწარმოებელ ქვეყანაში წიპწიდან ზეთს წნეხვის მეთოდით ღებულობენ, რომლის დროსაც ზეთის გამოსავლიანობა არსებულის 50%-ს არ აღემატება. ყურძნის წიპწის ზეთი მიიღება ყურძნის წიპწის ცივი დაწნეხვის მეთოდით.

ყურძნის წიპწა არის ღვინის წარმოების შედეგად დარჩენილი ღირებული ნარჩენი, საიდანაც შესაძლებელია მოვიროთ ყურძნის წიპწის ზეთი. მეღვინეობაში მოპოვებული ყურძნის წიპწის ტენიანობა მაღალია, რაც იწვევს მასში შემავალი ძვირფასი პროდუქტების სწრაფ გაფუჭებას. ყურძნის დაწურვისას ყურძნის წიპწის გამონთავისუფლებისთანავე ყურძნის წიპწის გაშრობა საშუალებას იძლევა შეჩერდეს ყურძნის წიპწის ზეთის ხარისხის გაუარესება. ყურძნის წიპწის საკმარისი რაოდენობით დაგროვების მიზნით, საწირო‍ა მისი შენახვის ორგანიზება და გამოშრობა. საშრობი რეჟიმის სწორი პარამეტრები და გარკვეული ხელსაყრელი შენახვის პირობები დამოკიდებულია მის ჰიდროთერმულ მახასიათებლების მაჩვენებლებზე. გამოშრობის შემდეგ ხება წიპწიდან ცივი დაწნეხვის მეთოდით ზეთის გამოწურვა. ცივი გამოწნეხვის მეთოდით მიღებული ზეთი კი შეიცავს ანტიოქსიდანტს რომელთაც აქვს მაღალი ბიოლოგიური აქტივობა. გასათავლისწინებელია რომ, წითელი ყურძნის ნაყოფში ზეთის შემცველობა უფრო მეტია, ვიდრე თეთრ ყურძენში. ასევე, მწიფე ყურძენი მეღვინეობის სამხრეთი ქვეყნებიდან უფრო მეტ ზეთს შეიცავს, ვიდრე მწიფე ყურძენი მეღვინეობის ჩრდილოეთი ქვეყნებიდან.

აღსანიშნავია, რომ ყურძნის წიპწის დაფქვის ხარისხით განისაზღვრება ყურძნის წიპწის ერთჯერადი დაწნეხვი ანუ, ყურძნის წიპწის ზეთის მოცილების ეფექტი. სწორედ დაფქვის პროცესში მნიშვნელოვანია ყურძნის წიპწის უჯრედების სტრუქტურის გახსნის სიღრმე.

მაღალხარისხოვანი ყურძნის წიპწის დაფქვა რთულია მათი სპეციფიკური სტრუქტურის რთულ აგებულებიდან გამომდინარე. ყურძნის წიპწის ერთგვაროვანი დაფქვისთვის, ყურძნის წიპწების დაფქვა ხდება ორ ეტაპად: თავიდან დისკიან დასაღერღებზე ან მსხვილი ფრაქციის მისაღებად, ხოლო შემდეგ სწორი ზედაპირის მქონე წიქვილებზე. ამის შემდეგ ხდება დაფქული მასის მექანიკური დაწნეხვა. ყურძნის წიპწებიდან პირველი ცივი გამოწნეხვის შედეგად მიიღება უმაღლესი ხარისხის ყურძნის წიპწის ზეთი და წიპწის შროტი [21,24].

თავი II - კვლევის ობიექტი გამოყენებული მეთოდები

2.1. კვლევის ობიექტი

კვლევის ობიექტს წარმოადგენს წიპწის შროტი [24], რომელიც გახლავთ წიპწის ზეთის წარმოების ნარჩენი პროდუქტი. კონკრეტულად ყურძნის წიპწა კი მიღებული იყო ქართული ყურძნიდან ევროპული სტილით ღვინის წარმოების შედეგად. მნიშვნელოვანია რომ ყურძნის დაწურვისას წიპწა ცალკე იყო გამოყოფილი კლერტის და ჩენჩოსგან. ამგვარად წიპწა ზეთის გამოწურვამდე მხოლოდ იფქვება და „ ცივი დაწნეხვის“ ანუ მექანიკური პრესით მუშავდება, რის შედეგადაც იღებენ წიპწის ზეთს და წიპწის შროტს.

წიპწის შროტიდან ანტიოქისდანტური ფრაქციის ექსტრაციისთვის გამოვიყენეთ ორი გამსხნელი ეთილაცეტატი და სპირტწყალხსნარი შესაბამისად ნიმუშებს მივანიჭეთ აბრევბიატურა F1, და F2.

წიპწის შროტში არსებულ ანტიოქსიდანტებთან შესადარებლად ავიღეთ, როგორც ბუნებრივი ასევე, სინთეზური პერპარატები.

ითვლება, რომ როზმარინის და ჩაის ექსტრაქტებში შემავალი ანტიოქსიდანტები ხელს უწყობენ უჯრედების დაცვას ოქსიდაციური სტრესისა და ანთებისგან, რამაც შეიძლება ხელი შეუწყოს ჯანმრთელობის სხვადასხვა სარგებელს. როზმარინის და ჩაის ექსტრაქტი გამოიყენება კვების მრეწველობაში, როგორც ბუნებრივი კონსერვანტი მისი ანტიოქსიდანტური თვისებების გამო.

შესაბამისად შევარჩიეთ ბუნებრივი ანტიოქსიდანტების ჯგუფიდან ერთი პრეპარატი: Rosemary Extract Carnosic acid + Carnosol - როზმარინის (RE) ექსტრაქტები [22,25,26,27], რომელიც კომერციულად იწარმოება კომპანია Layn ის მიერ. კონკრეტულად მწვანე ჩაის ექსტრაქტი შეიცავს ისეთ ნივთიერებებს როგორებიც არის: კატექინები ფლავონოლები, პოლიფენოლები და სხვა ანტიოქსიდანტური თვისებების ნივთიერებებს. რაც შეეხება როზმარინის ექსტრაქტების ის გამოირჩევა როზმარინის მჟავების, კარნოსის მჟავისა და კარნოსოლის შემცველობით, რომელიც ასევე პოლიფენოლების ჯგუფში შედის. ამიტომ, როგორც წიპწის შროტიდან გამოყოფილ ესტრქატებში აგრეთვე როზმარინის და ჩაის

ექსტრატებშიც გავზომეთ პოლიფენოლების, ფლავანოდების შემცველობა და საერთო ანტიოქსიდანტური აქტივობა.

დამატებით სხვადასხვა პრეპარატის ანტიოქსიდანტური ეფექტების შესადარებლად კვლევაში ჩავრთეთ აგრეთვე სინთეზური ანტიოქსიდანტების ორი პრეპარატი. კომპანია Vitafor - ის წარმოებული Vitablend (VIT) [28] და კომპანია Addiseo წარმოებული Oxinil (OXI) [29] . ორივე სინთეზური პრეპარატის აქტიური ნივთიერებები გახლდათ ბუტილირებული ჰიდროქსიანიზოლი (BHA) და ბუტილირებული ჰიდროქსიტოლუენი (BHT) მხოლოდ განსხვავებული კონცენტრაციებით.

2.2. პოლიფენოლების ექსტრაქცია ეთილაცეტატით და სპირტწყალხნარით

წიპწის შროტის გამოწვლილვა ანუ ექსტრაქცია გულისხმობს ნივთიერების გამოყოფას ნარევიდან ისეთი ტექნიკის გამოყენებით, როგორიცაა დისტილაცია, ფილტრაცია ან გამხსნელით ექსტრაქცია. ექსტრაქციამდე დავფქვით წიპწის შროტი და ავწონეთ 25 გრამი ნიმუში, რომელიც მოვათავსეთ ფილტრის ქაღალდის პაკეტში. აღნიშნული ფილტრის ქაღალდის შეფუთვა შემდეგ მოვათავსეთ სოქსლეტის აპარატში 3 დღის განმავლობაში. გამხსენლად კი გამოვიყენეთ პირველ შემთხვევაში ეთილ-აცეტატი (ნიმუში F1), რომელშიც შედარებით ნაკლებ პოლარული ნივთიერებები გადავიდა, ხოლო მეორე შემთხვევაში სპირტწყალხნარი (ნიმუში F2) რომელში შედარებით ძლიერ პოლარული ნაერთები მოხვდა.

2.3. წიპწიდან გამოყოფილი ექსტრატების მშრალი სახით მიღება

2.3.1 როტაციული ამაორთქლებელით გამხსნელების აორთქლება

მბრუნავი ამაორთქლებელი, რომელიც ასევე ცნობილია როგორც როტაციული ამაორთქლებელი არის ლაბორატორიული მოწყობილობა, რომელიც გამოიყენება ხსნარებიდან გამხსნელების ეფექტური და სტაბილურად აორთქლებისთვის. როტაციული ამაორთქლებელი გამოიყენება ლაბორატორიებში ნიმუშიდან გამხსნელის მოსაშორებლად.

შესაბამისად წიპწის შროტიდან ორი გამხსენლით (ეთილაცეტატიანი და სპირტწყალხსნარიანი ფრაქციები)[30] მიღებული პოლიფენოლების ექსტრაქტები მოვათავსეთ როტაციულ ამაორთქლებელში. პოლიფენოლების მშრალი სახით მისაღებად მოვაცილეთ გამხსნელი, ერთ შემთხვევაში ეთილაცეტატი, მერე შემთხვევაში სპირტწყალხსნარი და მივიღეთ ორი ნიმუში მშრალი მდგომარეობით.

2.3.2 ვაკუუმ თერმოსტატით კონცენტრატის გამოშრობა

ვაკუუმური თერმოსტატი ან ვაკუუმური საშრობი ღუმელი, ძირითადად გამოიყენება გაშრობის პროცესის დასაჩქარებლად ვაკუუმის და სითბოს გამოყენებით. სწორედ რომ წნევის კლებასთან ერთად, გამხსნელის დუღილის წერტილიც მცირდება, რაც ვაკუუმურ ღუმელს საშუალებას აძლევს მასში მოთავსებულ ნიმუშს მოცილდეს ტენიანობა და აქროლადი ნივთიერებები დაბალ ტემპერატურაზე.

ამიტომ, გამხსნელის აორთქლების შემდეგ ნიმუშები მოვათავსეთ ვაკუუმ თერმოსტატში ფაიფურის ჯამებით. 5 დღის განმავლობაში ნიმუშები გამოშრა თერმოსტატში ვაკუუმ გარემოში არაუმეტეს 70 გრადუს ტემპერატურაზე. მივიღეთ მშრალი ფხვნილი, რომელიც მოვათავსეთ ექსიკატორში სილიკაგელთან ერთად, რომ არ მომხდარიყო გარემოდან წყლის აბსორბცია.

2.4. საერთო პოლიფენოლების განსაზღვრა Folin-Ciocalteu-ს მეთოდით

Folin-Ciocalteu მეთოდი არის ფართოდ გამოყენებული ანალიტიკური ტექნიკა ნიმუშში მთლიანი პოლიფენოლის შემცველობის დასადგენად. Folin-Ciocalteu მეთოდი საშუალებას გაძლევთ შევაფასოთ პოლიფენოლების მთლიანი კონცენტრაცია ნიმუშში მათი შემცირების უნარის საფუძველზე. კონკრეტულად ფენოლური ნაერთების საერთო რაოდენობის განსაზღვრა ხდება სპექტროფოტომეტრული მეთოდით [31].

საკვლევ ნიმუშებში შემავალ ფენოლურ ნაერთებს ვჟანგავთ ფოლინის რეაგენტით, რომელიც შეიცავს ფოსფო ვოლფრამ მჟავას (H3PW12O40) და ფოსფო მოლიბდენ მჟავას (H3PMO12O40).

სწორედ ეს მჟავები შედიან რეაქციაში ფენოლური ნაერთებთან და იწვევენ მათ დაჟანგვას, რის შედეგადაც აღდგებიან ვოლფრამის და მოლიბდენის ოქსიდებად. ჟანგვის შედეგად მიღებულ ვოლფრამის და მოლიბდენის ოქსიდებს აქვთ ლურჯი შეფერილობა. სარეაქციო არეში შეტანილი ნიმუშების ხსნარის ფერები იცვლება პოლიფენოლების კონცენტრაციის შესაბამისად. ამ ლურჯი შეფერილობის ხსნარების გაზომვა ხდება შემდგომში სპექტრომეტრით 765 ნანომეტრზე. რეაქციიდან გამომდინარე ლურჯი ფერის ინტენსივობა ნიმუშში პოლიფენოლების კონცენტრაციის პროპორციულია. ანუ მიღებული ექსტენციის კოეფიციენტის სიდიდე - ე.წ „ფენოლური კოეფიციენტის მნიშვნელობა“ პროპორციულად შეესაბამება საკვლევ ნიმუშებში შემავალი ფენოლური ნაერთების რაოდენობას, რასაც ვსაზღვრავთ საკალიბრო მრუდის მიხედვით გალის მჟავასთან მიმართებაში.

ექსპერიმენტის დაწყებამდე მოვამზადეთ საკალიბრო ნიმუშები გალის მჟავის შემდეგი კონცენტრაციებით 20მგ/ლ, 40მგ/ლ, 80მგ/ლ, 120მგ/ლ. რომელთან მიმართებაშიც მოხდება შემდგომ ნიმუშებში პოლიფენოლების კონცენტრაციების გადათვლა.

რაც შეეხება უშუალოდ ექსპერიმენტი წარიმართა შემდეგნაირად:

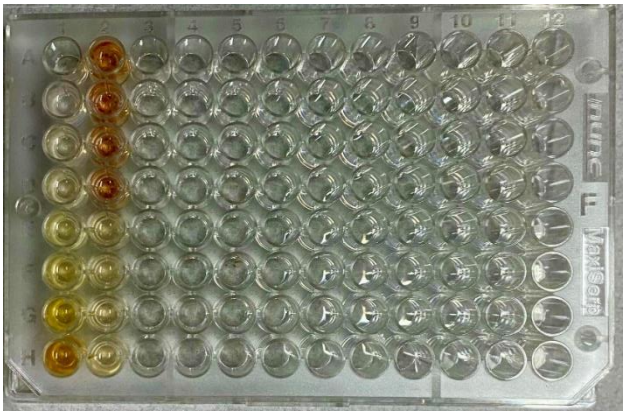
- 9 ცალ 25 მლ - იან მზომ კოლბებში გადავიტანეთ 9 მლ დისტილირებული წყალი. 4 კოლბა გამოვიყენეთ საკალიბრო ნიმუშების მოსამზადებლად. 4 კოლბა კი ნიმუშებისთვის (F1, F2, RE) , ხოლო ერთი კოლბა გამოვყავით კონტროლად (BL- ბლანკი);
- კოლბებში დავამატეთ 1 მლ ნიმუშები, რომელიც წინასწარ იყო გახსნილი ეთილაცეტატიანი ფრაქცია (F1) გახსნილი სპირტში, ხოლო სპირტწყალხსნარიანი ფრაქცია (F2) სპირტსა და წყალში (50-50). საბოლოოდ წიპწის შროტიდან გამოყოფილი ექსტრატის კონცენტრაცია იყო 100მგ/ლ. რაც შეეხება კომერციული ბუნებრივი როზმარინის (RE) ექსტრატი გავხსენით DSMO -ში და მივიღეთ 1000 მგ/ლ კონცენტრაციის ფრაქციები, ხოლო კონტროლის კოლბაში ჩავამატეთ მხოლოდ გამოხდილი წყალი (BL- ბლანკი);
- შემდეგ ეტაპზე დავუმატეთ 1მლ ფოლინის რეაგენტი და დავაყოვნეთ 5 წუთი;
- დაყოვნების შემდეგ დავუმატეთ 10მლ 7%-იანი Na2CO3;
- კოლბები გადავავსეთ დისტილირებული წყლით 25 მილილიტრამდე;

- საბოლოოდ მომზადებული ნიმუშები დავაყოვნეთ 90 წუთი ოთახის ტემპერატურაზე, ბნელ გარემოში;
- 90 წუთის შემდეგ სპექტროფოტომეტრის საშუალებით 765 ნანომეტრზე გავზომეთ თითოეული ხსნარის შთანთქმა.

2.5. საერთო ფლავანოიდების განსაზღვრა

საერთო ფლავონოიდების განსაზღვრა ELISA Microplate Readers დახმარებით არის გავრცელებული ტექნიკა, რომელიც გამოიყენება ანალიტიკურ ქიმიაში სხვადასხვა ექსტრაქტებში ფლავონოიდების მთლიანი შემცველობის რაოდენობრივი დასადგენად. ფლავონოიდები არის პოლიფენოლური ნაერთების კლასი, რომლებიც გვხვდება სხვადასხვა მცენარეებში და ისინი ცნობილია მათი ანტიოქსიდანტური და ანთების საწინააღმდეგო თვისებების გამო. ამ ანალიზის დროს ფლვანოიდების განსაზღვრამდე ხდება პრაიმინგის ხსნარის რეაგირება საკვლევ ხსნარებში არსებულ ფლავონოიდურ რგოლებთან, რათა გააძლიეროს ფლავონოიდის რეაქტიულობა და გამოვლენა. შემდეგ ემატება ალუმინის (Al_3^+) იონების ხსნარი, რომელიც კომპლექსდება ფლავონოიდური სტრუქტურის ჰიდროქსილის და კეტო ჯგუფებთან. საბოლოოდ ჰიდროქსიდის ჯგუფი ასტაბილურებს რეაქციას და აძლიერებს მოყვითალო შეფერილობის წარმოქმნას. ფერის განვითარება შეიძლება მოხდეს რეაქციის ყველა ეტაპზე, ნიმუშის ფლავონოიდების ბუნების გამო. რამდენიმე წუთის ინკუბაციის შემდეგ, ნიმუშის შთანთქმა იზომება 405-450 ნმ. ფლავონოიდების შემცველობის დასადგენად ნიმუშები საჭიროა შევადაროთ კვერცეტინის სტანდარტს. შესაბამისად ეს მეთოდი კონკრეტულად ეფუძნება რეაქციას Al3+ იონებსა სა და ფლავონების სტრუქტურაში არსებულ C3 და C5 ჰიდროქსილის ჯგუფებს და C4 კეტოჯგუფებს შორის, რის შედეგადაც ვიღებთ ფერად კომპლექსებს, რომელთა გაზომვა შესაძლებელია ELISA Microplate Readers ის დახმარებით [32].

საკალიბრო მრუდის ასაგებად გამოვიყენთ კვერცეტინის და DSMO-ს სხვადასხვა კონცენტრაციის ხსნარები, რომლთა დასამზადებლადაც მოვამზადეთ 2% კონცენტრაციის კვერცეტინის დედახსნარი. ექსპერიმენტისთვის საკალიბრო კონცენტრაციებია: 9.4 მკგ/მლ. 18.8 მკგ/მლ. 37.5 მკგ/მლ. 75მკგ/მლ. და 150 მკგ/მლ.



სურათი 1. ELISA Microplate Readers - ის პლანშეტი სადაც Al^{+} იონების რეაქციაში შევია საკვლევ ხსნარებში არსებულ ფლავანოიდებთან და მოგვცა მოყვითალო შეფერილობა.

ექპერიმენტის მიმდინარეობა:

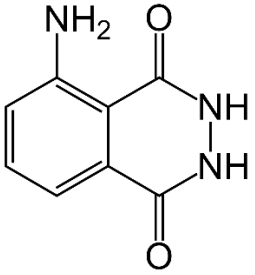
- ELISA Microplate Readers პლანშეტის ფოსოებში (სურ. 1.) მოვათავსეთ 100 μL ნიმუშები (F1,F2,RE) და საკალიბრო ნიმუშები;
- შემდეგ დავამატეთ 50 μL პრაიმ სოლუშენი და 10 წუთი დავაყოვნეთ ოთახის ტემპერატურაზე;
- დავამატეთ 25 μL Al – ის კომპლექსი და 10 წუთი ისევ დავაყოვნეთ ოთახის ტემპერატურაზე;
- საბოლოო ეტაპზე დავამატეთ 100 μL პიდროქსიდის სხნარი და დავდგით სანჟღრეველაზე 10 წუთი;
- პლაშეტი სადაც ნიმუშები და რეაგენტები გადავიტანეთ ჩავდგით ELISA Microplate Readers - ში 405-450 ნმ ტალღის სიგრძეებზე.

2.6. ანტიოქსიდანტური აქტივობის განსაზღვრა ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდის გამოყენებით

ლუმინოლის ქიმილუმინესცენციის მეთოდი გამოიყენება ნაერთების ანტიოქსიდანტური აქტივობის დასადგენად მათი უნარის გაზომვით, დათრგუნონ ქიმილუმინესცენცია,

რომელიც წარმოიქმნება ლუმინოლის რეაქტიული ჟანგბადის სახეობებთან (ROS) რეაქციით. ეს მეთოდი ეფუძნება პრინციპს, რომ ანტიოქსიდანტებს შეუძლიათ დათრგუნონ ROS-ების წარმოქმნა, რომლებიც მონაწილეობენ ოქსიდაციურ სტრესში და უჯრედების დაზიანებაში [33].

კერძოდ ლუმინოლი ($C_8H_7N_3O_2$) (სურ. 1), იგივე 5-ამინო-2,3-დიჰიდროფტალაზინ-1,4-დიონი, არის ნივთიერება, რომელსაც ახასიათებს ქემილუმინესცენცია და თუ დავუმატებთ დამჟანგავ აგენტს, მოგვცემს გარკვეული ინტენსივობის ნათებას. ლუმინოლი არის ყვითელი ფერის კრისტალური ფხვნილი, რომელიც კარგად იხსნება პოლარულ ორგანულ გამხსნელებში და უხსნადია წყალში.



სურ. 1 ლუმინოლის მოლეკულა

ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის პრინციპი მდგომარეობს იმაში რომ ლუმინოლი იჟანგება სხვადასხვა მჟანგავი აგენტის მიერ. ჩვენ გამოვიყენეთ წყალბადის პეროქსიდით, ე.წ. წყალბადის ზეჟანგი, H_2O_2. ხოლი რეაქციის ინიცირებისთვის კატალიზატორად გამოვიყენეთ სისხლის წითელი მარილი.

ექსპერიმენტის მიმდინარეობა:

- საინკუბაციო არეში შევიტანეთ 4 მლ ქემილუმინესცენციის ბუფერი
  - Na2HPO4/Na2H2PO4 (pH=9.18);
- შემდეგ ეტაპზე დავამატეთ 50 მიკროლიტრი 5%-იანი სისხლის წითელი მარილი, და 50 მიკრო ლიტრი 0.05%-იანი ლუმინოლი;

- შემდგომ დავამატეთ 10 მიკრო ლიტრი ნიმუშის (F1,F2, RE, VIT, OXI, კვერცეტინი) მოცულობები. საკონტროლო ნიმუშად კი შევიტანეთ სპირტი ანალოგიურად 10 მიკროლიტრის მოცულობით;
- მომზადებული ხსნარები მოვათავსეთ ქემილუმინომეტრში, სადაც სპეციალური ხელსაწყოს საშუალებით (შპრიცი) დავამატეთ 200 მიკროლიტრი წყალბადის ზეჟანგი, H2O2.
- საბოლოოდ არეში არსებული ლუმინოლი და გვაძლევს ნათებას, რაც აღირიცხება ფოტოელექტროგამამრავლებლით და იწერება თვითმწერზე ინდუქციური მრუდის სახით

თვითმწერზე რომელთანაც დაკავშირებული იყო ლუმინომეტრი, მითითებული გვქონდა შემდეგი პარამეტრები:

პირველ შემთხვევაში ქემილუმინომეტრის პარამეტრები სარეაქციო არეში 10 მიკროლირი ნიმუშების შეტანისას:

- თვითმწერი - 200 მილივოლტი;
- ფოტოელემენტზე მინიჭებული ძაბვა - 0.7kV;
- ლენტის სიჩქარე. - 10 სმ/წთ.

მეორე შემთხვევაში ქემილუმინომეტრის პარამეტრები სარეაქციო არეში 10 მიკროლირის ნიმუშების შეტანისას:

- თვითმწერი - 100 მილივოლტი;
- ფოტოელემენტზე მინიჭებული ძაბვა - 0.7kV;
- ლენტის სიჩქარე. - 10 სმ/წთ.

2.7. ფარდობითი ანტიოქსიდანტური აქტივობის გამოთვლა ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდზე დაყრდნობით

ქემილუმინომეტრის დახმარებით მივიღეთ ნიმუშების ინდუქციური მრუდები. ამ მრუდების გამოყენებით გამოვითვალეთ ფარდობითი ანტიოქსიდანტური აქტივობა შემდეგი ფორმულით: **$RU_{(AA)}=(1-h/H) \times 100\%$**

სადაც H- ანტიოქსიდანტის დამატების გარეშე ქემილუმინისენციის ნათების ინტენსივობა ანუ პიკის სიმაღლეა არეში. h-პიკის სიმაღლე ანტიოქსიდანტის დამატების შემდეგ. პროცენტებში ნიმუშების ქემილუმინესცენციის ნათების ინტენსივობა-პიკის სიმაღლე და ანტიოქსიდანტური აქტივობა გამოვხატეთ ანტიოქსიდანტის მიერ საკონტროლო ხსნარის პიკის სიმაღლის შემცირებით. მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, დავითვალეთ ნიმუშების ფარდობითი ანტიოქსიდანტური აქტივობა მილიგრამ პოლიფენოლზე.

მონაცემების სტატისტიკური ანალიზისთვის გამოვიყენეთ სტატისტიკური პროგრამა IBM SPSS, კერძოდ ერთფაქტორიანი დისპერსიული ანალიზი (One-Way Anova).

2.8. მალონილ დიალდეჰიდის განსაზღვრა თიობარბიტურის მჟავის გამოყენებით

მალონდიალდეჰიდის (MDA) კონცენტრაციის განსაზღვრა თიობარბიტური მჟავას (TBA) მეთოდის გამოყენებით ძირითადად გამოიყენება ლიპიდური პეროქსიდაციის შესაფასებლად, რომელიც ხდება ცხიმებსა და ლიპიდებში. ლიპიდური პეროქსიდაცია არის პროცესი, როდესაც რეაქტიული ჟანგბადის სახეობები თავს ესხმიან და ანადგურებენ პოლიუჯერი ცხიმოვან მჟავებს უჯრედის მემბრანებში და ლიპიდებით მდიდარ სხვა სტრუქტურებში, რის შედეგადაც წარმოიქმნება MDA და სხვა დაკავშირებული ნაერთები [34].

TBA მეთოდი გამოიყენება MDA-ს, ლიპიდური პეროქსიდაციის გვერდითი პროდუქტის რაოდენობრივი დასადგენად და ჩვეულებრივ გამოიყენება ლიპიდების შემცველ ნიმუშებზე, რათა შეფასდეს ლიპიდების ჟანგვითი დაზიანების მასშტაბი. მეთოდი გულისხმობს ფერადი კომპლექსის ფორმირებას MDA-სა და TBA-ს შორის, რომლის აღმოჩენაც შესაძლებელია სპექტროფოტომეტრიულად.

TBA მეთოდი სპეციალურად გამოიყენება ლიპიდური პეროქსიდაციისა და MDA წარმოქმნის შესაფასებლად, რაც მას შესაფერისს ხდის ლიპიდებით მდიდარი ნიმუშების

გასაანალიზებლად, როგორიცაა ცხიმები, ზეთები, ლიპიდებით მდიდარი ბიოლოგიური ქსოვილები და ლიპიდების შემცველი სხვა მასალები.

ჩვენი ექსპერიმენტი მალონილ დეალდეჰიდის განსასაზღვრად წარიმართა შემდეგნაირად:

- 8 ცენტრიფუგის სინჯარებში ვათვასებთ 1 მილილტს 17% იან ტრიქლორძმარმჟავას, რომელსაც გააჩნია ფერმენტული ჟანგვის უნარი;
- სინჯარებში ვამატებთ ნიმუშებს BL, F1, F2, RE, VIT, OXI, K კონტროლი (მზესუმზირის ზეთი), Q (კვერცეტინი). სარეაქციო არეში შეტანამდე ნიმუშები 3 დღის განმავლობაში იყო 100°C -ზე თერმული დამუშავების პირობებში.
- შემდეგ სინჯარებს ვაცენტრიფუგირებთ 10 წუთი 10000 rpm ბრუნზე;
- 2 მილილიტრი სუპერნატანტი გადაგვაქვს სინჯარებში სადაც არის შეტანილი 10 მილილიტრი თიობარბიტურის მჟავა;
- სინჯარები გადაგვაქვს წყლის აბაზანაში და ვადუღებთ 10 წუთი;
- საბოლოოდ ვზომავთ სპექტრომეტრით 532 ნმ. ტალღის სიგრძეზე.

ლიპიდების პეროქსიდული ჟანგვის შუალედური პროდუქტების რაოდენობა გამოვთვალეთ ფორმულით:

$$K=(A0 – Ak) /\varepsilon,$$

სადაც k - ლიპიდების პეროქსიდული ჟანგის პროდუქტებია; A0- საცდელი ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე; Ak - საკონტროლო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე; ε - ექსტინციის მოლარული კოეფიციენტი, რომელიც მოცემულ შემთხვევაში ტოლია 1.56×10^5 სმ$^{-1}$, მოლ$^{-1}$.

თავი III - ცხოველთა საკვების წარმოება და სიმულაციური ტესტირება

3.1 გამოყოფილი ექსტრაქტით და სინთეზურად და ბუნებრივად მიღებული კომერციული პრეპარატებით ცხოველთა ექსტრუდირებული საკვების წარმოება

სატესტო საკვების წარმოებამდე ლაბორატორიულ პირობებში მზესუმზირის ზეთს დავამატეთ . თითოეული ანტიოქსიდანტი (F1, F2, RE, VIT, OXI, კვერცეტინი) ხოლო მზესუმზირის ზეთი კონტროლად გამოვყავით, რადგან მასში არ მოხდა არცერთი ანტიოქსიდანტის დამატება. კვლევაში გამოყენებული ანტიოქსიდანტების მწარმოებელი კომპანიებისგან მივიღეთ რეკომენდაცია რომ მცნერაეული წარმოშიბის ზეთში როგორიც არის მზესუმზირის ზეთი რეკომენდირებულია 0,1% ანტიოქსიდანტის დამატება. შესაბამისად ზეთის სატესტო ნიმუშებს დავამატეთ 0,1% ჩართულობით ზემოთ ჩამოთვლილი სინთეზური და ბუნებრივი ანტიოქსიდანტები.

ექსტრუდირებული ცხოველის საკვების წარმოება სხვადასხვა ანტიოქსიდანტებით გულისხმობს ანტიოქსიდანტური ნაერთების დამატებას საკვების რაციონში. სატექსტო ძაღლის რაციონების დამზადებამდე მოხდა რაციონის ფორმულირება ცხოველური, მცენარეული ნედლეულით, ასევე ვიტამურ-მინერალური კომპლექსებით და სხვა დანამატებით. სატესტო რაციონებში ჩართული იყო ჩვენ მიერ წიპწის შროტიდან გამოყოფილი 2 ექსტრაქტი ეთიალ-აცეტატიანი და სპირტწყალხსნარიანი (F1, F2), ბუნებრივი ანიოქსიდანტი როზმარინის ექსტრაქტი (RE) და 2 სინთეზური ანტიოქსიდანტი BHA სა და BHT ს შემცველობით (VIT, OXI) , ასევე კვერცეტინი როგორც ანტიოქსიდანტური თვისებების მატარებელი აგენტი და კონტროლი - მზესუმზირის ზეთი, რომელსაც გამოწურვის პროცესში არ ქონდა ანტიოქსიდანტი დამატებული.

საწარმოო ტექნოლოგიური პროცესი არის შემდეგი ეტაპების თანმიმდევრობა: თავდაპირველად ხდება ცხოველური და მცენარეული ტიპის ნედლეულის აწონვა რაციონში

მითითებული წონის შესაბამისად, შემდეგომ ეს აწონილი მასა იფქვება და გადადის შემრევში/მიქსერში სადაც ემატება ვიტამინურ მინერალური კომპლექსები და სხვა საჭირო დანამატები. შერეული მასა მიდის კონდიციონერში სადაც მასას ემატება ორთქლი, წყალი და გადის ტემპერატურულ დამუშავებას 95C მდე. აღნიშნული სველი და ცხელი მასა გადადის ექსტრუდერში სადაც მაღალი წნევის და ტემპერატურის პირობებში ხდება ექსტრუდირების პროცესი. ექსტრუდერიდან გამომავალი გრანულები გადადის საშრობში რომ გრანული ტენი 26-28% დან მცირდეს 6-7% მდე. ამგვარი გამომშრალი გრანულები მიდის ვაკუუმ შემფუთავ დანადგარში, სადაც ექსხმება მცენარეული ან ცხოველური წარმოშობის ზეთი ვაკუუმ პირობებში. ჩვენ შემთხვევაში კვლევაში გამოყებული იყო მზესუმზირის ზეთი, შესაბამისად მოხდა საკვების მზესუმზირის ზეთით შეფუთვა და შემდგომ გაგრილება გარემო ტემპერატურამდე. ამგვარად დამზადდა 7 საკვები სხვადასხვა ანტიოქსიდანტის ჩართულობით.

3.2 ცხოველთა სატესტო საკვებზე დაკვირვება ვადიანობის განსასაზღვრად სიმულაციურ სტრესულ პირობებში

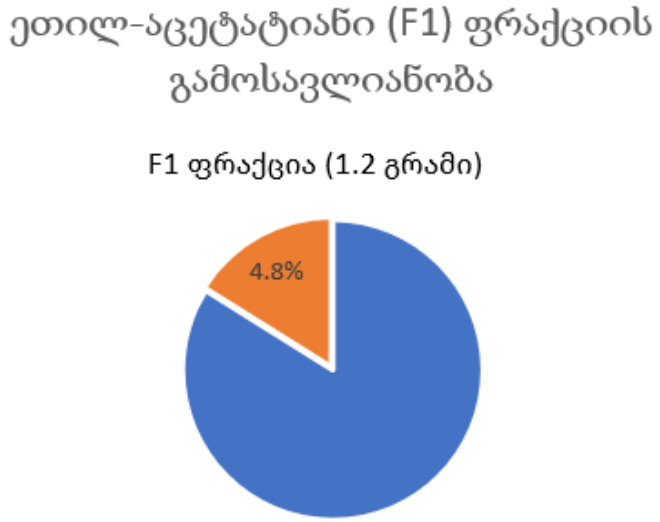
ცხოველთა საკვების სტრეს ტესტი არის კონტროლირებადი ექსპერიმენტების სერია, რომელიც შექმნილია შინაური ცხოველების საკვების დაძველების პროცესის სიმულაციისა და დაჩქარების მიზნით, რათა დადგინდეს მისი შენახვის ვადა. ამ ტიპის ტესტირება ეხმარება მწარმოებლებს გააცნობიერონ, თუ როგორ ინარჩუნებს იერსახეს მათი პროდუქცია დროთა განმავლობაში და სხვადასხვა პირობებში, რაც უზრუნველყოფს, რომ საკვები რჩება უვნებელი და ხარისოხობრივად სტაბილური ხანგრძლივი შენახვის შემდეგაც კი. კონკრეტულად პროცესი რომ აღვწეროთ საკვების თავსდება ისეთ სტრესულ პირობებში რომელიც დააჩქარებს მის გაფუჭებას. ანუ ხდება მაქსიმალურად ცუდი შენახვის პირობებში საკვებზე დაკვირვება რამდენი ხანი გაუძლებს ასეთ გარემოს საზრდო ნივთიერებები (ცილები, ცხიმები, ნახშირწყლები, ვიტამინები), ასევე რამდენად გამრავლდება პათოკენური მიკრო ორგანიზმები თუ ოქსიდაციას განიცდის ცხიმები.

ჩვენ შემთხვევაშიც სატესტო 7 საკვები მოვათავსეთ სტრესულ პირობებში - თერმოსტატში 37C გრადუსზე, 45% ფარდობითი ტენიანობის პირობებში (სურ.2). თითოეული საკვები შემოწმდა .პეროქსიდის რიცხვზე პირველ დღეს თერმოსტატში ჩადებამდე შემდეგ მესამე და მეხუთე დღეს.

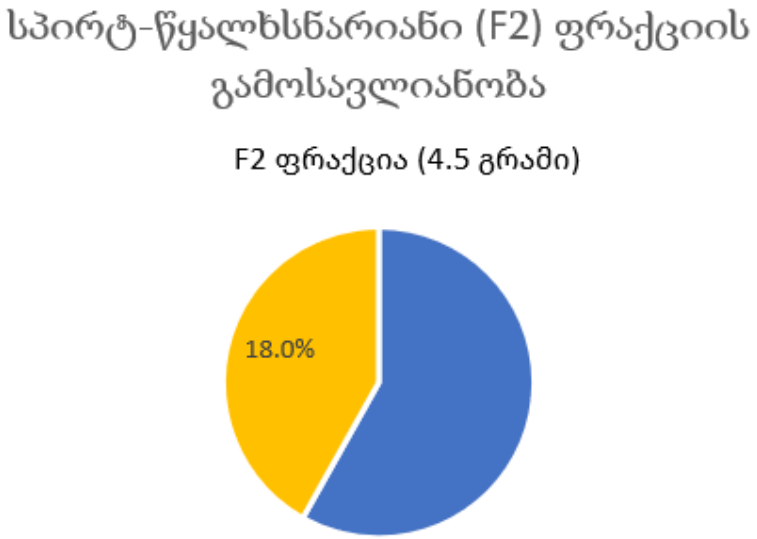
სურათი 2. ნიმუშები: F,F2,RE,VIT,OXI, კვერცეტინი და ზეთი თერმოსტატში თერმოსტატში 37C გრადუსზე, 45% ფარდობითი ტენიანობის პირობებში

კვლევის შედეგები და მათი განხილვა

თავდაპირველად დადგინდა ჩვენი საკველვი ნიმუშების (F1, F2) გამოსავლიანობა ეთილ-აცეტატით და სპირტ-წყალხნარით გამოწვლილ ფრაქციებში.



გრაფიკი 1. წიპწის შროტიდან F1(ეთილ-აცეტატური) ფრაქციის გამოსავლიანობა. აღებულ იქნა 25 გრამი წიპწის შროტი, რომლიდანაც მიღებულია 1.2 გრამი ეთილ-აცეტატური ფრაქცია.



გრაფიკი 2. 25 გრამი წიპწის შროტიდან, (F2) სპირტ-წყალხსნარით გამოწვლილი ფრაქციის გამოსავლიანობა მივიღეთ 4.5 გრამი ანუ 18%.

პროცესმა გვიჩვენა (გრაფ. 1-2), რომ 25 გრამი ნიმუშიდან ეთილ-აცეტატური ფრაქციის (F1) შემთხვევაში მივიღეთ 1.2 გრამი ექსტრაქტი, ხოლო სპირტ-წყალხსნარიან ფრაქციას (F2), ამ შემთხვევაში გამონაწვლილი იყო 4.5 გრამი.

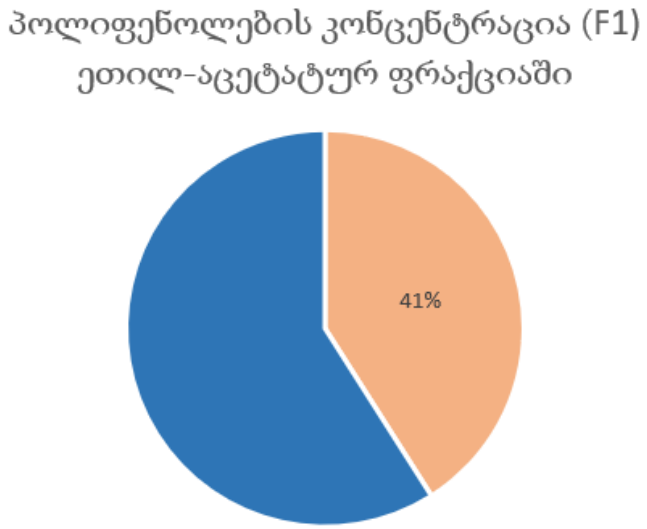
ამ შედეგებიდან გამომდინარე აშკარაა რომ მიღებული მონაცემებიდან სპირტ-წყალხსნარიანმა (F2) ფრაქციამ, ეთილ-აცეტატურთან (F1) შედარებით, ფაქტობრივად 4-ჯერ მაღალი გამოსავლიანობა გამოავლინა. შესაბამისად, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ წიპწის შროტიდან პოლიფენოლური ნაერთების ექსტრაქციისას, სპირტ-წყალხსნარიანი (F2) ფრაქცია არის ბევრად უფრო გამოსავლიანი და ეფექტური, ვიდრე ეთილ-აცეტატური ფრაქცია (F1).

ჩვენ საკვლევ ნიმუშებში წიპწის შროტიდან გამოყოფილ ექსტრაქტებში (F1, F2), ასევე კომერციულად წარმოებულ ბუნებრივ დანამტეი - როზმარინის ექსტრაქტებში (RE). Folin-Ciocalteu-ს მეთოდით საერთო პოლიფენოლების განსაზღვრის შემდეგად მივიღეთ შემდეგი შედეგები რაც ცხრილი 1. შია მოცემულია.

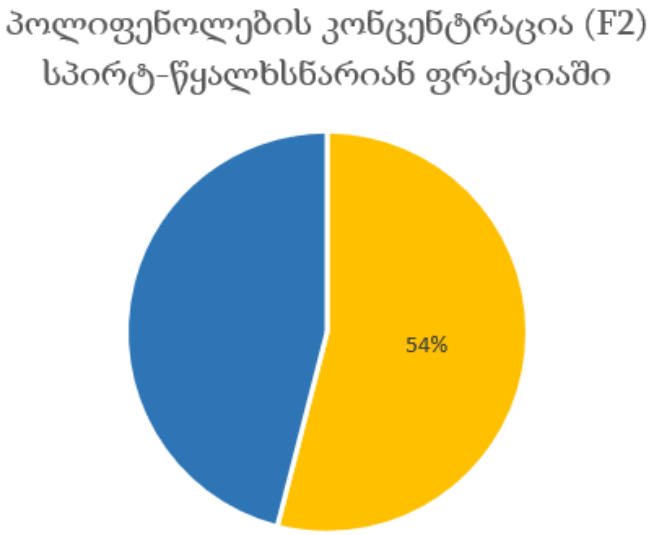
ნიმუშები	კონცენტრაცია
F1	0.41გ/ლ
F2	0.54 გ/ლ
RE	0.66 გ/ლ

ცხრილი 1. F1 (ეთილ-აცეტატურ) ფრაქციაში პოლიფენოლები კონცენტრაცია - 0,41 გ/ლ. F2 (სპირტ-წყალხსნარიან) ფრაქციაში არსებული პოლიფენოლების კონცენტრაცია -0,54 გ/ლ. RE (როზმარინის ექსტრაქტი) ფრაქციაში პოლიფენოლები კონცენტრაცია - 0,66 გ/ლ.

წიპწის შროტიდან ანტიოქსიდანტური ფრაქციის გამოწვლილივის შემდეგ პოლიფენოლების განსაზღრის მიზანი იყო დაგვედგინა დაახლოებით რა რაოდენობის პოლიფენოლებს შეიცავს საკვლევი ექსტრაქტები (F1, F2) და ნატურალური კომერციული პრეპარატი - RE როზმარინის ექსტრაქტი.



გრაფიკი 3. F1 (ეთილ-აცეტატურ) ფრაქციაში არსებული პოლიფენოლების კონცენტრაცია. Folin-Ciocalteu-ს მეთოდით საერთო პოლიფენოლების განსაზღვრის შედეგად გამოვლინდა, რომ ეთილ-აცეტატურ ფრაქციაში გამოიწვლილა პოლიფენოლები შემდეგი კონცენტრაციით: 0.41გ/ლ.



გრაფიკი 4. F2 (სპირტ-წყალხსნარიან) ფრაქციაში არსებული პოლიფენოლების კონცენტრაცია. Folin-Ciocalteu-ს მეთოდით საერთო პოლიფენოლების განსაზღვრის შედეგად გამოვლინდა, რომ სპირტ-წყალხსნარიან ფრაქციაში გამოიწვლილა პოლიფენოლური ნაერთები შემდეგი კონცენტრაციით: 0.54 გ/ლ.

ამ შედეგებით დაადასტურეს პოლიფენოლური ნაერთების არსებობა საკვლევ ნიმუშში (F1, F2) ასევე თავად წიპწის შროტში. F1 (ეთილ-აცეტატი) ფრაქციას აქვს პოლიფენოლის ყველაზე დაბალი კონცენტრაცია ნიმუშებს შორის - 0,41 გ/ლ. შემდეგ არის F2 (სპირტ-წყლიანი) ფრაქცია, რომელსაც აქვს პოლიფენოლის საშუალო კონცენტრაცია 0,54 გ/ლ. ამ შედეგებიდან გამომდინარე აშკარა რომ, ეთილ-აცეტატიანი და სპირტ-წყალხსნარიანი ფრაქციების ნიმუშების შედარებისას შეგვიძლია ნათლად ვთქვათ რომ წიპწის შროტიდან პოლიფენოლური ნაერთების ექსტრაქცია, სპირტ-წყალხსნარით (F2) ფრაქცია ბევრად უფრო გამოსავლიანი, ვიდრე ეთილ-აცეტატურით გამოწვლილი (F1) ფრაქცია.

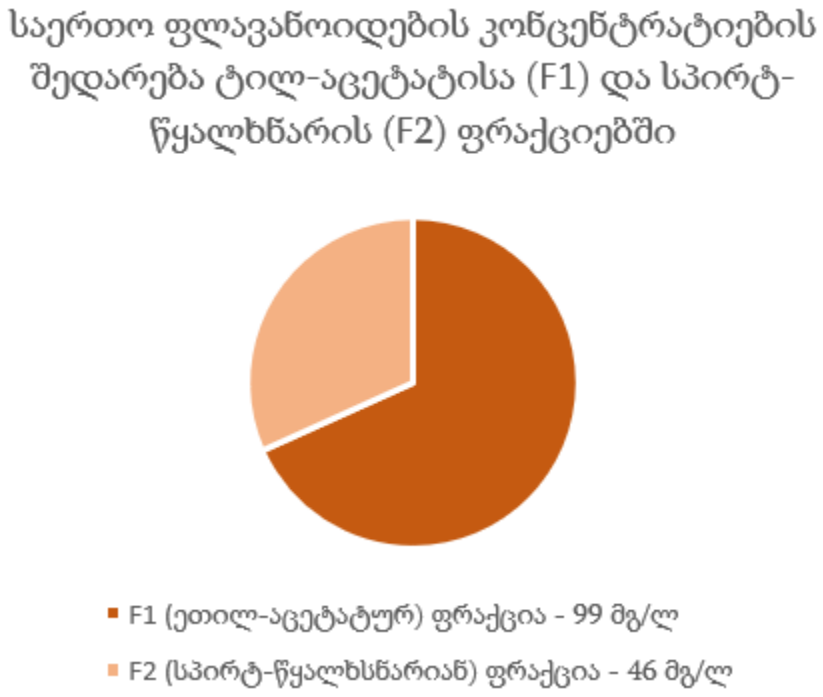
რაც შეეხება ნატურალური კომერციული პრეპარატს, მათი შედარებისას (ცხრილი 1) ვხედავთ რომ პოლიფენოლების ყველაზე მაღალი კონცენტრაცია გვხვდება RE-ში (როზმარინის ექსტრაქტს).

გარდა საერთო პოლიფენოლებისა, ასევე განვსაზღვრეთ საერთო ფლავანოიდების კონცენტრაციებიც თითოელ ფრაქციაში. ფლავანოიდების ანალიზის შედეგად მივიღეთ შემდეგი მონაცემები (ცხრილი 2.):

ნიმუშები	კონცენტრაცია
F1	99 მგ/ლ
F2	46 მგ/ლ
RE	44,888 მგ/ლ

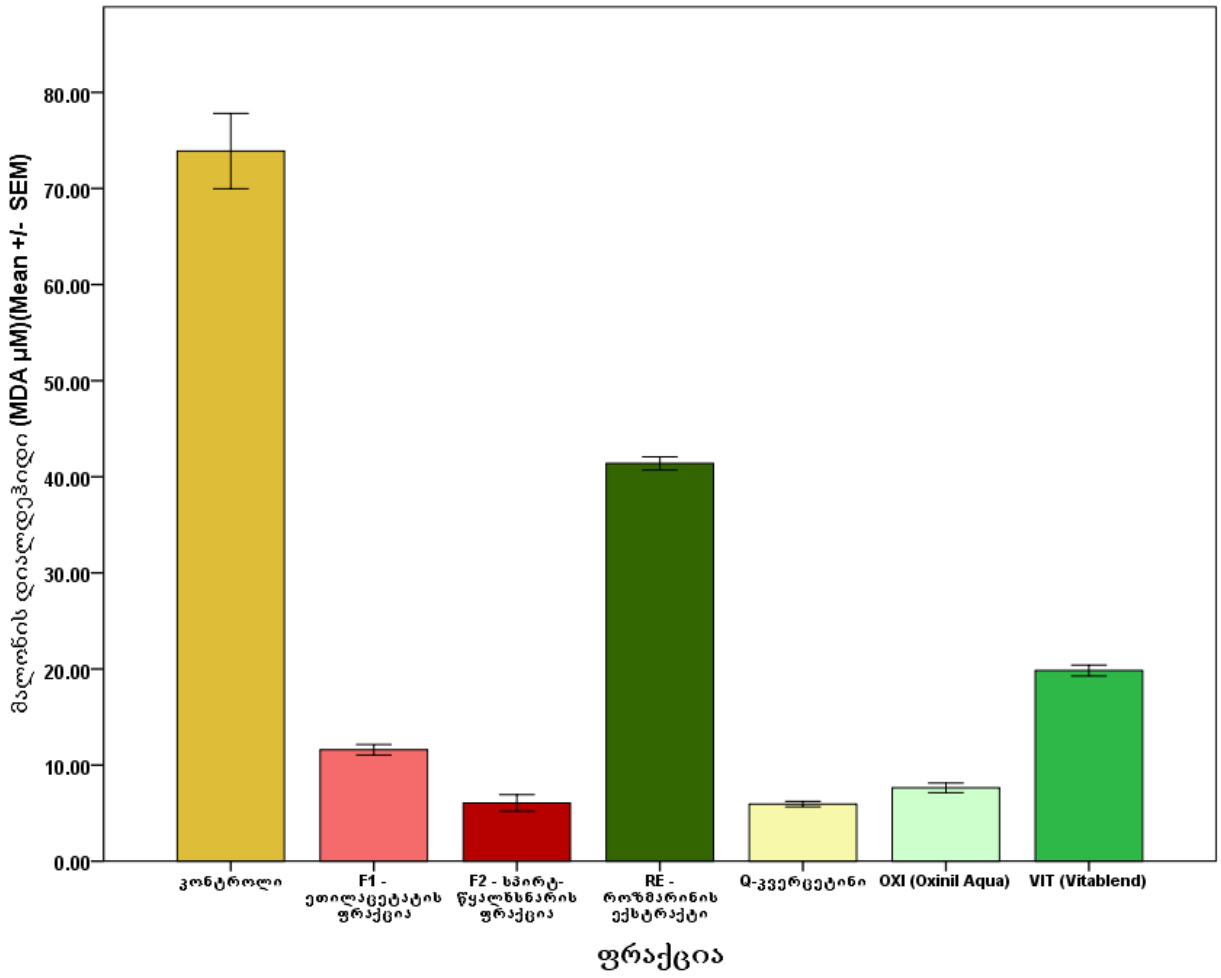
ცხრილი 2. F1 (ეთილ-აცეტატურ) ფრაქციაში ფლავანოიდების კონცენტრაცია - 99 მგ/ლ. F2 (სპირტ-წყალხსნარიან) ფრაქციაში არსებული პოლიფენოლების კონცენტრაცია -46 მგ/ლ. RE (როზმარინის ექსტრაქტი) ფრაქციაში პოლიფენოლები კონცენტრაცია - 44,888 მგ/ლ.

შედეგებიდან ყველაზე მაღალი ფლავანოიდების შემცველობა აჩვენა F1 (ეთილ-აცეტატიან) ფრაქციამ, ფლავანიოდთა შემცველობა იყო 99მგ/ლ ხოლო დაახლოებით ორჯერ ნაკლები 46 მგ/ლ გამოვლინდა F2 (სპირტწყალხსნარიან) ფრაქციაში. შესაბამისად, წიპწის შროტიდან ფლავანოიდური ნაერთების ექსტრაქციისთვის ეთილ-აცეტატური ფრაქცია (F1), არის ბევრად უფრო გამოსავლიანი და ეფექტური, ვიდრე სპირტ-წყალხსნარიანი (F2) ფრაქცია გრაფიკი 5.



გრაფიკი 5. F1 (ეთილ-აცეტატურ) და F2 (სპირტ-წყალხსნარიან) ფრაქციებში საერთო ფლავანოიდების კონცენტრაციების შედარებითი დიაგრამა. დიაგრამაზე მოცემულია ფლავანოიდების საერთო კონცენტრაციები მგ/ლ კონცენტრაციით.

პოლიფენოლებისა და ფლავანოიდების კონცენტრაციების ანალიზის გარდა, ასევე შევაფასეთ საკვლევი ნიმუშების ანტიოქსიდანტური აქტივობა (სურ.3) ჰიდროფობურ გარემოში. აღსანიშნავია, რომ ამ ექსპერიმეტისას გარდა ეთილ-აცეტატური, სპირტ-წყალხსნარიანი, ჩაის და როზმარინის ექსტრაქტებისა, გავზომეთ მზესუმზირის ზეთი როგორც კონტროლი, ასევე სინთეზური ანტიოქსიდანტები და კვერცეტინი, რომელსაც გააჩნია ანტიოქსიდანტური აქტივობაც, ვინაიდან იგი წარმოადგენს ბუნებრივ ფლავანოიდს, რომელიც ცნობილია თავისი ძლიერი ანტიოქსიდანტური თვისებებით.

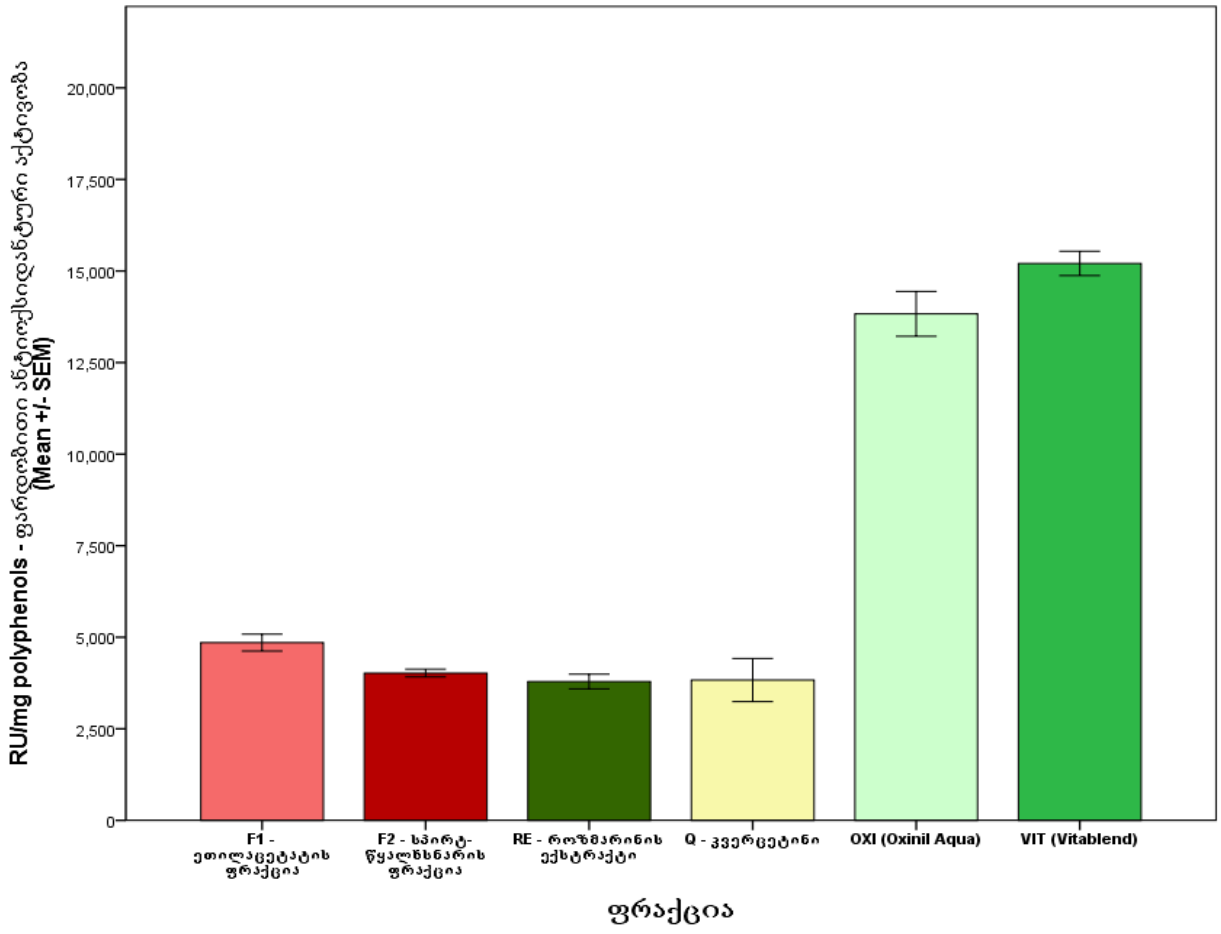


სურათი 3. ნიმუშების ანტიოქსიდანტური აქტივობა ჰიდროფობურ გარემოში ლიპიდური პეროქსიდაციისას. Q-კვერცეტინი; F1-ეთილ-აცეტატური ფრაქცია, F2-სპირტ-წყალხსნარის ფრაქცია, კონტროლი - მზესუმზირის ზეთი, RE - როზმარინის ექსტრაქტი, OXI - Oxinili Aqua სინტეზური ანტიოქსიდანტი, VIT - Vitablend სინთეზური ანტიოქსიდანტი.

მონაცემების სტატისტიკური ანალიზისათვის გამოვიყენეთ ერთფაქტორიანი დისპერსიული ანალიზი (One-Way Anova). ჩატარებულმა ანალიზმა გამოავლინა სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება საკვლევ ჯგუფებს შორის ($F(6,20)= 1033.676$, $p<0.05$).

ნიმუშებიდან ყველაზე მაღალი ანტიოქსიდანტური თვისებები გამოავლინა F2 და კვერცეტინმა. ასევე სარწმუნოდ მაღალია OXI (სინთეზურმა ანტიოქსიდანტის) და F2 ის შედეგები. აშკარაა რომ ჩვენ საკვლევ ნიმუშებს (F1, F2) მაღალი აქტივობა აქვთ ჰიდროფობურ გარემოში. აგრეთვე მაღალი აქტივობით არის წარმოდგენილი კვერცეტინი და OXI (Oxinil-

Aqua) ხოლო სინთეზური ანტიოქსიდანტების კიდევ ერთი წარმომადგენელი VIT (Vitablend) აშკარად არ გამოირჩევა დიდი აქტივობით საკვლევ ნიმუშებთან (F1, F2) შედარებით, მიუხედავად იმისა რომ ორივე სინთეზურ ანტიოქსიდანტში ერთი და იგივე აქტიური ნივთიერებებია. რაც შეეხება ბუნებრივი ანტიოქსიდანტების წარმომადგენელს RE - როზმარინის ექსტრაქტს აშკაარაა რომ მისი აქტივობა გაცილებით დაბალია ყველა ზემოთ ჩამოთვლილთან შედარებით.



სურათი 4. ნიმუშების ფარდობითი ანტიოქსიდანტური აქტივობა. ანტიოქსიდანტური ფარდობითი აქტივობა მოცემულია მილიგრამ პოლიფენოლზე გადაანგარიშებით. Q-კვერცეტინი; F1-ეთილ-აცეტატური ფრაქცია, F2-სპირტ-წყალხსნარის ფრაქცია, RE - როზმარინის ექსტრაქტი, OXI - Oxinili Aqua სინთეზური ანტიოქსიდანტი, VIT - Vitablend სინთეზური ანტიოქსიდანტი.

მონაცემების სტატისტიკური ანალიზისათვის გამოვიყენეთ ერთფაქტორიანი დისპერსიული ანალიზი (One-Way Anova). ჩატარებულმა ანალიზმა გამოავლინა სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება საკვლევ ჯგუფებს შორის ($F(5,23)= 745.986$, $p<0.05$).

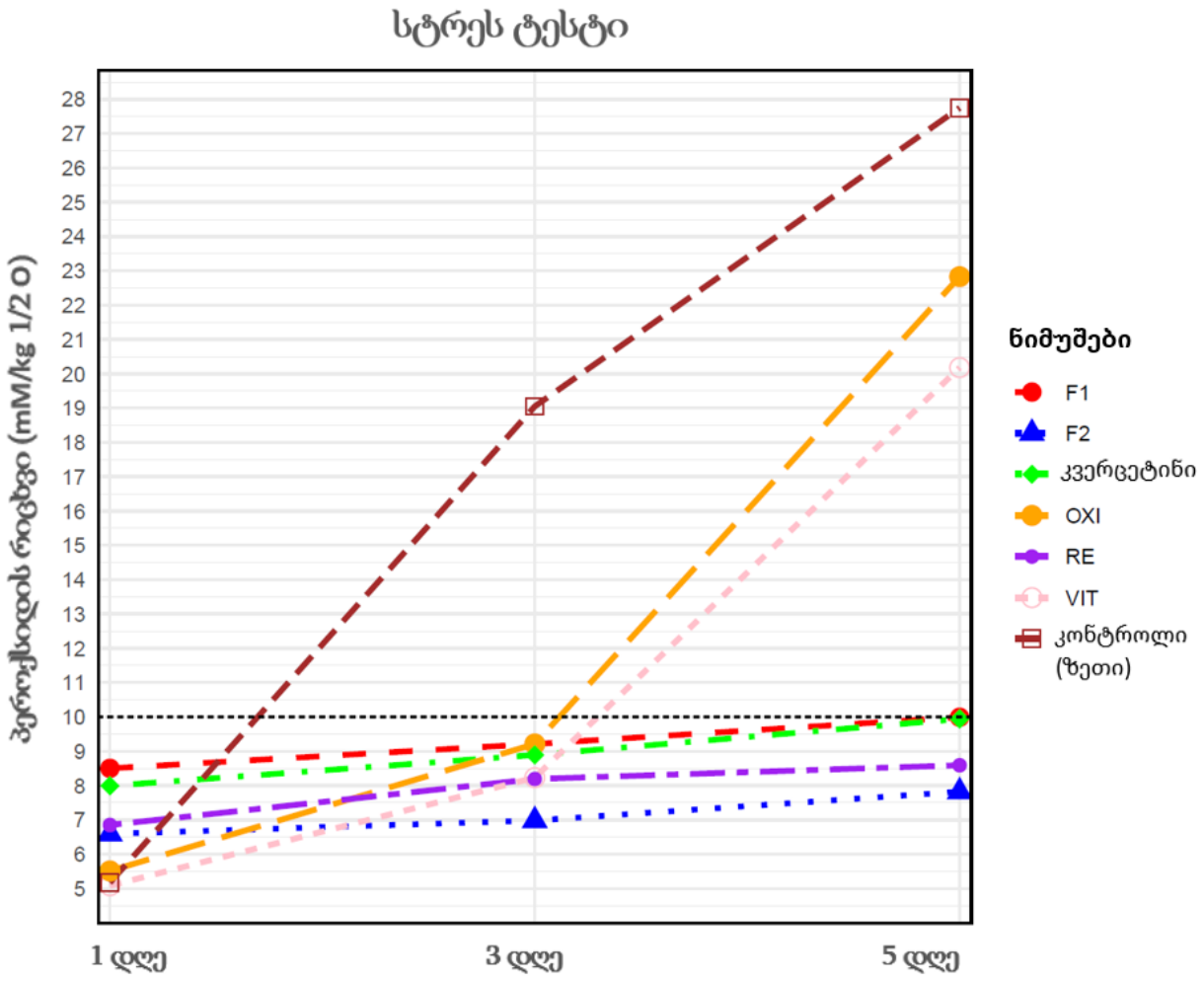
შევაფასეთ ნიმუშების ანტიოქსიდანტური აქტივობა ჰიდროფილურ გარემოში. მიღებული მონაცემებიდან გადავთვალეთ თითოეული ფრაქციის ფარდობითი ანტიოქსიდანტური აქტივობა მილიგრამ პოლიფენოლზე გადაანგარიშებით.

აღმოჩნდა რომ, სინთეზური ანტიოქსიდანტები OXI - Oxinili Aqua, VIT - Vitablend ავლენს ყველაზე მაღალ ანტიოქსიდანტურ აქტივობას, მიუხედავად იმისა, რომ მათი აქტივობა ჰიდროფობურ არეში გაცილებით დაბალი იყო ჩვენ საკვლევ ნიმუშებთან შედარებით. მათ შემდეგ ანტიოქსიდანტური აქტივობით გამოირჩევა F1 ეთილ- აცეტატიანი ფრაქცია, ხოლო მას მოსდევს დანარჩენი ნიმუშები: F2-სპირტ-წყალხსნარის ფრაქცია, RE - როზმარინის ექსტრაქტი, Q-კვერცეტინი, რომლებიც ავლენენ თანაბარ ანტიოქსიდანტურ აქტივობას. მიღებული მონაცემებიდან შეგვიძლია ასევე ვთქვათ რომ F1 ეთილ- აცეტატიანი ფრაქცია ავლენს უკეთეს ანტიოქსიდანტურ აქტივობას ჰიდროფილურ არეში, ხოლო F2-სპირტ-წყალხსნარის ფრაქცია უფრო აქტიური ჰიდროფობურ გარემოში.

საწარმოო ცდის ეტაპზე მზესუმზირის ზეთში დავამატეთ საკვლევი ნიმუშები (F1, F2) და სხვა ბუნებრივი და სინთეზური პრეპარატები. უშუალოდ საწარმოო პირობებში დავამაზადეთ ძაღლის სატესტო საკვები სხვადასხვა ანტიოქსიდანტური ფრაქციის შემცველი მზესუმზირის ზეთის ჩართულობით. თითოეული სატესტო საკვების შემოწმებისთვის კი გამოვიყენეთ (აქსელერაციული) სტრესტ ტესტის მეთოდი. სტრეს ტესტის პერიოდში საკვების ნიმუშები შემოწმდა პეროქსიდის რიცხვზე (ცხრილი 3) პირველ მესამე და მეხუთ დღეს, რის შედეგადაც მივიღეთ შემდეგი შედეგები:

ნიმუშები	1 დღე	3 დღე	5 დღე	განზომილება
F1	8.50	9.21	9.99	mM/kg 1/2 O
F2	6.59	6.98	7.82	mM/kg 1/2 O
RE	6.85	8.19	8.59	mM/kg 1/2 O
OXI	5.51	9.21	22.83	mM/kg 1/2 O
კონტროლი (ზეთი)	5.17	19.05	27.75	mM/kg 1/2 O
კვერცეტინი	7.99	8.89	9.94	mM/kg 1/2 O

ცხრილი 3. ნიმუშების პეროქსიდი რიცხვის მნიშვნელობა პირველ, მესამე და მეხუთე დღეს. F1-ეთილ-აცეტატური ფრაქცია, F2-სპირტ-წყალხსნარის ფრაქცია, კონტროლი - მზესუმზირის ზეთი, RE - როზმარინის ექსტრაქტი, OXI - Oxinili Aqua სინთეზური ანტიოქსიდანტი, VIT - Vitablend სინთეზური ანტიოქსიდანტი და კვერცეტინი.



გრაფიკი 4. ნორმასთან (ნორმა 10 mM/კგ 1/2 O) შედარებით F1-ეთილ-აცეტატური ფრაქციის, F2-სპირტ-წყალხსნარის ფრაქციის, კონტროლი - მზესუმზირის ზეთის, RE - როზმარინის ექსტრაქტის, OXI - Oxinili Aqua სინთეზური ანტიოქსიდანტის, VIT - Vitablend სინთეზური ანტიოქსიდანტის და კვერცეტინის პეროქსიდის რიცხვის შედარება და მატების ტენდენცია.

სტრეს ტესტის შედეგები ნათლად გვაჩვენებს (გრაფიკი 4.) რომ ანტიოქსიდანტური აქტივობა არ არის დამოკიდებული პოლიფენოლების თუ ფლავანოიდების კონცენტრაციაზე. აშკარაა რომ ჰიდროფილურ გარემოში მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობის მქონე პრეპარატებმა: F1-ეთილ-აცეტატური ფრაქცია, F2-სპირტ-წყალხსნარის ფრაქცია, კვერცეტინი, RE - როზმარინის ექსტრაქტი რეალურად საწარმოო პირობებშიც მაღალი ეფექტურობა გამოავლინა.

შედეგების შეჯამება

1. ანტიოქსიდანტური ფრაქციის გამოსავლიანობის თვალსაზრისით, სპირტ-წყალხსნარი არის უფრო ეფექტური საექსტრაქციო საშუალება ეთილ-აცეტატთან შედარებით;
2. წიპწის შროტიდან პოლიფენოლური ნაერთების ექსტრაქცია, სპირტ-წყალხსნარიანი გამხსნელით - ფრაქცია (F2) არის ბევრად უფრო გამოსავლიანი და ეფექტური, ვიდრე ეთილ-აცეტატური ფრაქცია (F1);
3. ჰიდროფობურ და ჰიდროფილურ გარემოში ანტიოქსიდანტების აქტივობა განსხვავდება, მაგრამ მათი აქტივობა არ არის ნიმუშებში შემავალი პოლიფენოლების კონცენტრაციებზე დიდად დამოკიდებული. ასევე, სინთეზური ანტიოქსიდანტების შედეგებმაც გვაჩვენა, რომ ისინი აქტიურები არიან ჰიდროფილურ გარემოში ხოლო მათი აქტივობა საგრძნობლად მცირდება ჰიდროფობურ გარემოში;
4. სტრესტ ტესტის შედეგებმა გვაჩვენა რეალურ პირობებში ბუნებრივმა პრეპარატებმა F1-ეთილ-აცეტატური ფრაქცია, F2-სპირტ-წყალხსნარის ფრაქცია, კვერცეტინი, RE - როზმარინის ექსტრაქტი მაღალი ეფექტურობა გამოავლინა.

დასკვნები

1. მხოლოდ ლაბორატორიული პირობებში, საკვლევი ნიმუშების ჰიდროფილურ და ჰიდროფობურ გარემოში შეფასებული ანტიოქსიდანტური აქტივობები არ იძლევა მკაფიო კორელაციას საწარმოო პირობებში მათ ეფექტიანობაზე.
2. ქართული ყურძნის წიპწის ზეთის წარმოების ნარჩენი, ე.წ. ყურძნის წიპწის შროტი, წარმოადგენს პერსპექტიულ რესურსს ბუნებრივი ინგრედიენტების მისაღებად ცხოველთა საკვების ანტიოქსიდანტური მახასიათებლების გასაუმჯობესებლად.

გამოყენებული ლიტერატურა

[1] Kornienko J.S., Smirnova I.S., Pugovkina N.A., Ivanova J.S., Shilina M.A., Grinchuk T.M., Shatrova A.N., Aksenov N.D., Zenin V.V., Nikolsky N.N., et al. High doses of synthetic antioxidants induce premature senescence in cultivated mesenchymal stem cells. Sci. Rep. 2019;9:1296. doi: 10.1038/s41598-018-37972-y.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6361906/

[2] A Botterweck 1, H Verhagen, R A Goldbohm, J Kleinjans, P A van den Brandt. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. 2000 Jul;38(7):599-605.doi: 10.1016/s0278-6915(00)00042-9.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10942321/

[3] Zuriñe Rasines-Perea , Pierre-Louis Teissedre. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. 2017 Jan 1;22(1):68. doi: 10.3390/molecules22010068.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28045444/

[4] Veronica D'Eusanio, Daniele Malferrari, Andrea Marchetti,Fabrizio Roncaglia, and Lorenzo Tassi. Waste By-Product of Grape Seed Oil Production: Chemical Characterization for Use as a Food and Feed Supplement. 2023 Feb; 13(2): 326. Published online 2023 Jan 24. doi: 10.3390/life13020326
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9958947/

[5] Manca, M.L., Casula, E., Marongiu, F. et al. From waste to health: sustainable exploitation of grape pomace seed extract to manufacture antioxidant, regenerative and prebiotic nanovesicles within circular economy. Sci Rep 10, 14184 (2020). https://doi.org/10.1038/s41598-020-71191-8

[6] COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2022/1375 of 5 August 2022 concerning the denial of authorisation of ethoxyquin as a feed additive belonging to the functional group of antioxidants and repealing Implementing Regulation (EU) 2017/962
https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R1375

[7] COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2022/654 of 20 April 2022 concerning the authorisation of butylated hydroxyanisole as a feed additive for cats
https://eur-lex.europa.eu/legal ontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R0654&from=EN

[8] Lourenço SC, Moldão-Martins M, Alves VD. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. Molecules. 2019 Nov 15;24(22):4132. doi: 10.3390/molecules24224132. PMID: 31731614; PMCID: PMC6891691.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6891691/#B46-molecules-24-04132

[9] Shah MA, Bosco SJ, Mir SA. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. Meat Sci. 2014 Sep;98(1):21-33. doi: 10.1016/j.meatsci.2014.03.020. Epub 2014 Apr 24. PMID: 24824531.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24824531/

[10] Waqas M, Salman M, Sharif MS. Application of polyphenolic compounds in animal nutrition and their promising effects. Journal of Animal and Feed Sciences. 2023;32(3):233-256. doi:10.22358/jafs/159718/2023.
http://www.jafs.com.pl/Application-of-polyphenolic-compounds-in-animal-nutrition-nand-their-promising-effects,159718,0,2.html

[11] Abdal Dayem A, Hossain MK, Lee SB, Kim K, Saha SK, Yang GM, Choi HY, Cho SG. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. Int J Mol Sci. 2017 Jan 10;18(1):120. doi: 10.3390/ijms18010120. PMID: 28075405; PMCID: PMC5297754.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297754/

[12] Shields Hazel J., Traa Annika, Van Raamsdonk Jeremy M. Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies. Front. Cell Dev. Biol., 11 February 2021 Sec. Signaling. DOI=10.3389/fcell.2021.628157
https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.628157/full

[13] Auten, R., Davis, J. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. Pediatr Res 66, 121–127 (2009).
https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181a9eafb

[14] Milkovic L., Cipak Gasparovic A., Cindric M., Mouthuy P.-A., Zarkovic N. Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts. *Cells.* 2019;8:793. doi: 10.3390/cells8080793.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31366062/

[15] Juan CA, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. Int J Mol Sci. 2021 Apr 28;22(9):4642. doi: 10.3390/ijms22094642. PMID: 33924958; PMCID: PMC8125527.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8125527/#:~:text=The%20effects%20of%20ROS%20on,(iii)%20aggregation%20between%20proteins.

[16] Suzan Onur, Adnan Ayhanci. "LIPID PEROXIDATION" April 2021. Edition: eBook (PDF) ISBN: 978-1-83968-827-0. Publisher: INTECHOPEN DOI: 10.5772/intechopen.95802
https://www.researchgate.net/publication/348190581

[17] Denis Martinvalet, Michael WalchEditorial: The Role of Reactive Oxygen Species in Protective Immunity. JOURNAL-Frontiers in Immunology 25 January 2022 Sec. Molecular Innate Immunity
https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.832946

[18] Corino C, Rossi R. Antioxidants in Animal Nutrition. Antioxidants (Basel). 2021 Nov 25;10(12):1877. doi: 10.3390/antiox10121877. PMID: 34942980; PMCID: PMC8698740.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8698740/

[19] Examples of natural and synthetic antioxidants available on the market
https://www.btsa.com/en/examples-of-natural-and-synthetic-antioxidants/

[20] J. Chem. Educ. 2012, 89, 1, 130–133 Publication Date:October 4, 2011
https://doi.org/10.1021/ed900025s

[21] გიზო გორგოძე. ყურძნის წიპწის ექსტრაქტოვანი ზეთის სამრეწველო წარმოების პროცესულ–აპარატურული დამუშავება. 2013 წელი. საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი.
https://gtu.ge/Stmm/Pdf/Gizo%20Gorgodze.pdf

[22] TruGro® GT OS, Rosemary Extract Carnosic acid + Carnosol is a natural solution based on polyphenol-rich extracts
https://layncorp.com/ingredient_item/trugro-aox/

[23] Amarachukwu Uzombah T (2022) The Implications of Replacing Synthetic Antioxidants with Natural Ones in the Food Systems. Natural Food Additives. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.103810.
https://www.intechopen.com/chapters/81679

[24] Gupta M, Dey S, Marbaniang D, Pal P, Ray S, Mazumder B. Grape seed extract: having a potential health benefits. J Food Sci Technol. 2020 Apr;57(4):1205-1215. doi: 10.1007/s13197-019-04113-w. Epub 2019 Sep 30. PMID: 32180617; PMCID: PMC7054588.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7054588/?report=reader

[25] Tanaka T, Matsuo Y. Production Mechanisms of Black Tea Polyphenols. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2020;68(12):1131-1142. doi: 10.1248/cpb.c20-00295. PMID: 33268645.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33268645/

[26] Khan N, Mukhtar H. Tea Polyphenols in Promotion of Human Health. Nutrients. 2018 Dec 25;11(1):39. doi: 10.3390/nu11010039. PMID: 30585192; PMCID: PMC6356332.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30585192/

[27] Nieto G, Ros G, Castillo J. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (Rosmarinus officinalis, L.): A Review. Medicines (Basel). 2018 Sep 4;5(3):98. doi: 10.3390/medicines5030098. PMID: 30181448; PMCID: PMC6165352.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30181448/

[28] Vitablend 55 is a slightly viscous liquid formulation of the antioxidants BHA and BHT with synergistic properties, blended in sunflower oil https://www.vitafor.com/ingredients/antioxidants

[29] Oxy-Nil® covers a complete antioxidant program to prevent losses due to autoxidation of raw materials and final products.
https://www.adisseo.com/en/products/#t1

[30] Emmulo E, Ceccantoni B, Bellincontro A, Mencarelli F. Use of water and ethanol extracts from wine grape seed pomace to prepare an antioxidant toothpaste. J Sci Food Agric. 2021 Nov;101(14):5813-5818. doi: 10.1002/jsfa.11232. Epub 2021 May 3. PMID: 33792066; PMCID: PMC8519093.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33792066/

[31] Bruna Nichelle LUCAS1, Flávia Michelon DALLA NORA1, Caroline Pagnossim BOEIRA1, Silvani VERRUCK2, Claudia Severo da ROSA1. Determination of total phenolic compounds in plant extracts via Folin-Ciocalteu's method adapted to the usage of digital images. DOI: https://doi.org/10.1590/fst.35122

[32] OxiSelect™ Flavonoid Assay Kit. Cell Biolabs Inc.
https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/XAN-5077-flavonoid-assay-kit.pdf

[33] Georgetti SR, Casagrande R, Di Mambro VM, Azzolini AE, Fonseca MJ. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. AAPS PharmSci. 2003;5(2):E20. doi: 10.1208/ps050216. PMID: 12866943; PMCID: PMC2751524.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12866943/

[34] Zeb A, Ullah F. A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Fried Fast Foods. J Anal Methods Chem. 2016;2016:9412767. doi: 10.1155/2016/9412767. Epub 2016 Mar 31. PMID: 27123360; PMCID: PMC4830699.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27123360/