مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۳۰ شماره ۴/ سال۱۳۹۹/ صفحات ۲۷ تا ۳۹

DOI: 10.22034/as.2021.34524.1511

اثر عصاره شیرین‌بیان بر فراسنجه‌های تخمیرجیره‌های حاوی سطوح مختلف کنسانتره در شرایط برون تنی

پریسا دارات[۱]، فرشید فتاح نیا[۲]، گلناز تأسلی[۳]*، حمیدرضا میرزایی الموتی[۴] و علی خطیب جو[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/٤/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/٦

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام

[۲] به‌ترتیب دانشیار و استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام

[۳] استادیار پژوهشی بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شهرکرد، ایران

[٤] دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

* مسئول مکاتبه: Email: gtaasoli@gmail.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: هدف از دستکاری فرآیندهای تخمیری شکمبه به حداکثر رساندن بازده مصرف خوراک و افزایش تولید حیوان نشخوارکننده می‌باشد. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌دلیل احتمال ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی و انتقال آن به انسان محدود شده است و تحقیقات زیادی برای یافتن جایگزین‌های مناسب برای آنها انجام شده است. ساپونین‌ها از جمله ترکیبات فعال گیاهان می‌باشند که به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه محققین قرار گرفته است. از عصاره ریشه شیرین‌بیان به‌دلیل وجود ساپونین می‌تواند به منظور دستکاری تخمیر شکمبه استفاده کرد. **هدف**: در این تحقیق اثر عصاره شیرین‌بیان در جیره‌های حاوی سطوح مختلف کنسانتره بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه در شرایط برون تنی مطالعه شد. **روش کار**: عصاره شیرین‌بیان در سطوح ۱، ۲ و ۳ گرم در لیتر محیط کشت به دو جیره آزمایشی با نسبت علوفه به کنسانتره ۴۰ به ۶۰ یا ۶۰ به ۴۰ درصد اضافه شد. تولید گاز، pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی، جمعیت پروتوزوآ و الگوی اسیدهای چرب فرار اندازه‌گیری و گوارش‌پذیری ماده آلی برآورد شد. **نتایج**: اثر نوع جیره بر تولید گاز (P=۰/۰۵) و گوارش‌پذیری ماده آلی برآورد شده معنی‌دار بود(P<۰/۰۱) ، به‌طوری‌که جیره‌های دارای سطح بیشتر کنسانتره در مقایسه با جیره‌های دارای سطح کمتر کنسانتره تولید گاز و گوارش‌پذیری ماده آلی بیشتری داشتند (P<۰/۰۵). استفاده از عصاره شیرین‌بیان باعث کاهش گوارش‌پذیری ماده آلی برآورده شده (P<۰/۰۵) و کل جمعیت پروتوزوآ (P<۰/۰۱) شد. برهمکنش نوع جیره و سطح عصاره بر تولید و سرعت تولید گاز، غلظت نیتروژن آمونیاکی، pH، گوارش‌پذیری ماده آلی برآورد شده، کل جمعیت پروتوزوآ و جنس‌های انتودینیوم، اپیدینیوم، دیپلودینیوم، یودیپلودینیوم و ایزوتریشا اثری نداشتند. **نتیجه‌گیری نهایی**: سطوح استفاده شده عصاره شیرین‌بیان بر فراسنجه‌های تخمیر جیره‌های با نسبت متفاوت علوفه به کنسانتره تأثیری نداشت.

واژگان کلیدی: عصاره شیرین‌بیان، پویایی تخمیر، نسبت علوفه به کنسانتره، برون تنی

مقدمه

مواد فیتوشیمیایی، ترکیبات معمول گیاهان و جزئی از جیره روزمره حیوانات گیاهخوار هستند و در سال‌های اخیر توانایی برخی مواد فیتوشیمیایی و تأثیر آن بر روند تخمیر شکمبه مورد توجه قرار گرفته است (والاس و همکاران ۲۰۰۲). از این عصاره‌های گیاهی برای تخمیر بهینه شکمبه استفاده می‌شود (میرزایی الموتی و همکاران ۱۳۹۶). ساپونین‌ها از جمله مواد فیتوشیمیایی گیاهان هستند که به لحاظ شیمیایی گلیکوزیدهای با وزن مولکولی بالا همراه با یک بخش غیر قندی استروئیدی یا تری‌ترپنوئیدی با یک یا چند زنجیره قندی هستند (پاترا و ساکسنا ۲۰۰۹a). ساپونین‌ها باعث افزایش نفوذپذیری غشاء سلولی میکروارگانیزم‌ها می‌شوند و در بعضی پژوهش‌ها باعث افزایش تولید اسیدهای چرب فرار، کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه و کاهش پروتوزوآی شکمبه شده‌اند (هارت و همکاران ۲۰۰۸). در آزمایش برون‌تنی استفاده از ۰/۶ گرم بر لیتر محیط کشت ساپونین، غلظت نیتروژن آمونیاکی کاهش اما تولید متان تغییری نداشت (پاترا و یو ۲۰۱۵). پژوهش دیگری نشان داد که ساپونین باعث کاهش تولید متان و جمعیت پروتوزوآی شکمبه شد (پاترا و یو ۲۰۱۳). استفاده از سطوح ۳۰ و ۶۰ گرم بر کیلوگرم ماده خشک ساپونین در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که با افزایش میزان ساپونین غلظت آمونیاک کاهش یافت (محقی و همکاران ۱۳۹۱). هم‌چنین، پژوهش دیگری با عصاره شیرین‌بیان که غنی از ساپونین است، نشان داد که در شرایط برون‌تنی سطح ۱ گرم بر لیتر عصاره شیرین بیان تولید نیتروژن آمونیاکی را کاهش داد وسطح ۲ گرم بر لیتر آن علاوه بر کاهش تولید نیتروژن آمونیاکی، تولید متان و کل اسیدهای چرب فرار را نیز کم کرد و با افزایش عصاره شیرین‌بیان جمعیت کل پروتوزوآ نیز کاهش یافت (راموز- مورایز و همکاران ۲۰۱۸).

در بیشتر پژوهش‌هایی که اثر مواد فیتوشیمیایی بر فرایندهای تخمیر شکمبه بررسی شده است از جیره‌های با سطح بالای علوفه استفاده شده است. مصرف جیره‌های با کنسانتره بالا (نشاسته بالا) در تغذیه گاوهای شیرده سبب افزایش تولید اسید لاکتیک و کاهش pH مایع شکمبه می‌شود. در چنین شرایطی به دلیل کاهش pH، جمعیت میکروبی شکمبه تغییر می‌کند و فرآیند تخمیر نیز متفاوت از شرایط طبیعی شکمبه می‌شود. لذا در چنین شرایطی مکانیزم اثرگذاری متابولیت‌های ثانویه گیاهان بر میکروارگانیسم‌های شکمبه نیز دچار تغییراتی می‌شود که علت آن تغییر گروه‌های آب‌دوست و آب‌گریز ساختمان ترکیبات فیتوشیمیایی گیاهی است. متابولیت‌های ثانویه ممکن است با مهار باکتری‌ها اثر منفی کاهش pH بر شکمبه را کاهش دهند (کاردوزو و همکاران ۲۰۰۵).

از آنجایی که ساپونین مهم‌ترین ترکیب ماده مؤثره ریشه شیرین‌بیان است (علومی و حسیبی ۱۳۹۱)، بنابراین هدف از این آزمایش، بررسی اثر عصاره شیرین‌بیان بر فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیر شکمبه جیره‌های حاوی سطوح مختلف کنسانتره در شرایط برون تنی بود.

مواد و روش‌ها

عصاره ریشه شیرین‌بیان خشک شده از شرکت شیرین‌بیان زاگرس کرمانشاه تهیه شد. درصد ساپونین این عصاره با روش ماکار و همکاران (۱۹۹۹) اندازه‌گیری شد. هر گرم عصاره خشک شیرین‌بیان حاوی ۱۳۴/۷۵ میلی‌گرم ساپونین بود. دو جیره آزمایشی با نسبت علوفه به کنسانتره ۴۰ به ۶۰ یا ۶۰ به۴۰ درصد براساس جداول مؤسسه تحقیقات ملی (NRC 2001) برای گاوهای شیری تنظیم شد. جدول ۱ مواد خوراکی تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره‌های پایه را نشان می‌دهد. جیره‌های آزمایشی با استفاده از آسیاب دارای الک یک میلی‌متری آسیاب شدند. برای اندازه‌گیری فراسنجه‌های تولید گاز، ۲۰۰ میلی‌گرم از جیره‌های آزمایشی همراه با سطوح ۱ یا ۲ و یا ۳ میلی‌گرم در لیتر از عصاره شیرین بیان درون بطری‌های مخصوص تولید گاز ریخته شد. مایع شکمبه از دو رأس گوسفند نر نژاد کردی دارای فیستولای شکمبه با میانگین وزن زنده ۶۰ کیلوگرم

Table 1- Ingredients of experimental diets (%DM)

Ingredient (% of DM)	Experimental diets[1] 40% F+ 60% C	60% F + 40% C
Alfalfa	20	30
Corn silage	20	30
Corn grain	32.24	19.7
Barley grain	5	3.55
Soybean meal	17.2	10.15
Corn gluten meal	2.4	3.44
Vitamin premix	2.6	2.6
Salt	0.56	0.56
Chemical composition		
NE_L (Mcal/kg DM)	1.65	1.58
CP (% DM)	19.2	17.8

[1] 40% F+ 60% C: diet containing 40% forage and 60% concentrate, 60% F + 40% C: diet containing 60% forage and 40% concentrate.

جمع‌آوری شد و محلول بافر مطابق روش مک دوگال (۱۹۴۷) تهیه شد. قبل از انکوباسیون، مایع شکمبه با بافر در حضور گاز دی‌اکسیدکربن در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه کاملاً مخلوط شد. به تمام بطری‌ها، ۳۰ میلی‌لیتر مخلوط مایع شکمبه-محلول بافر اضافه و سپس به داخل هر شیشه ۱۵ ثانیه دی-اکسیدکربن تزریق و بلافاصله درپوش لاستیکی شیشه‌ها گذاشته شد و با استفاده از محافظ آلومینیومی مخصوص پرس گردید. برای تصحیح میزان گاز حاصل از نمونه‌های خوراک، سه بطری فاقد ماده خوراکی به عنوان بطری‌های بلانک در نظر گرفته شد. میزان گاز تولیدی با فشارسنج (مدل Testo 512 Digitalmonomer) در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت پس از شروع انکوباسیون قرائت شد. فراسنجه‌های تولید گاز با معادله بلومل و همکاران (۲۰۰۳) برآورد شد: $G = a + (1-e^{-ct})$ که در این رابطه، G: میزان گاز تجمعی تولید شده در زمان(میلی‌لیتر)، a: میزان گاز تولیدی توسط بخش بالقوه قابل‌تخمیر خوراک (میلی‌لیتر)، c: سرعت کل تولید گاز (درصد در ساعت) و t: زمان (ساعت) است.

برای مطالعه فراسنجه‌های تخمیر شکمبه (pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی و الگوی اسیدهای چرب فرار) و جمعیت پروتوزوآ یک آزمون تولید گاز ۲۴ ساعته انجام شد. pH مایع شکمبه نمونه‌ها بلافاصله پس از باز کردن هر ویال توسط دستگاه pH سنج اندازه‌گیری شد.

نیتروژن آمونیاکی به روش فنول هیپوکلریت اندازه‌گیری شد (برودریک و کانگ ۱۹۸۰). برای شمارش جمعیت پروتوزوآ مایع شکمبه، پنج میلی‌لیتر از مایع شکمبه با پنج میلی‌لیتر محلول فرمالین ۵۰ درصد رقیق شد. دو قطره رنگ سبز بریلیانت به آن اضافه و به خوبی تکان داده شد. ۲۴ ساعت بعد از افزودن رنگ، شمارش پروتوزوآ با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰ انجام شد (دهوریتی ۲۰۰۳) و جنس‌های مختلف پروتوزوآ با بزرگنمایی ۴۰ تعیین شد. غلظت نمونه‌های اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه به روش اوتنستین و بارلی (۱۹۷۱) و با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی انجام شد. قابلیت‌هضم ماده آلی با استفاده از رابطه زیر برآورد شد (منک و استینگس ۱۹۸۸).

درصد گوارش‌پذیری ماده آلی= ۱۴/۰+۸۸/۸۸۹ GP+۰/۰۴۵ CP

که در این رابطه، GP: حجم گاز حاصل از ۲۴ساعت انکوباسیون (میلی‌لیتر) و CP: پروتئین خام (درصد) است. داده‌های مربوط به فراسنجه‌های تخمیر شکمبه (pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی و غلظت اسیدهای چرب فرار)، جمعیت پروتوزوآ و قابلیت‌هضم ماده آلی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با نرم افزار آماری SAS و با استفاده از مدل آماری زیر تجزیه واریانس شدند:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ij}$$

Y_{ij}= متغیروابسته

μ= میانگین کل

A_i= اثر جیره آزمایشی

B_j= اثر سطح عصاره شیرین‌بیان

$(AB)_{ij}$= اثر متقابل نوع جیره آزمایشی و سطح عصاره شیرین‌بیان

e_{ij}= اثرخطای آزمایشی

داده‌های فراسنجه‌های تولید گاز به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با نرم‌افزار آماری SAS و با استفاده از مدل آماری زیر تجزیه واریانس شدند:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + R_k + (AB)_{ij} + e_{ij}$$

Y_{ij}= متغیروابسته

μ= میانگین کل

A_i = اثر جیره آزمایشی

B_j = اثر سطح عصاره شیرین‌بیان

R_k= اثربلوک (هر ران آزمایش گاز)

$(AB)_{ij}$= اثر متقابل نوع جیره آزمایشی و سطح عصاره شیرین‌بیان

e_{ij}= اثرخطای آزمایشی

میانگین تیمارها با استفاده از آزمون توکی مقایسه شد و سطح احتمال کمتر یا مساوی ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شدند.

نتایج و بحث

تولید گاز تحت تأثیر سطح عصاره شیرین‌بیان و برهمکنش نوع جیره و سطح عصاره شیرین‌بیان قرار نگرفت (P>۰/۰۵). در صورتی‌که نوع جیره، تولید گاز را تحت تأثیر قرار داد به طوری که جیره‌های دارای سطح بیشتر کنسانتره در مقایسه با جیره‌های دارای سطح کمتر کنسانتره تولید گاز بیشتری (۱۲۵/۹۹ در مقایسه با ۱۱۱/۱۹ میلی‌لیتر) داشتند (P=۰/۰۵). همچنین سرعت تولید گاز تحت تأثیر سطح عصاره شیرین‌بیان، نوع جیره و برهمکنش نوع جیره و سطح عصاره شیرین‌بیان قرار نگرفت (P>۰/۰۵) (جدول ۲). همسو با نتایج آزمایش حاضر، استفاده از سطوح مختلف ساپونین چای (۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌گرم، هو و همکاران، ۲۰۰۵)، جینوساپونین (مناتبی و همکاران ۲۰۱۴)، ساپونین عصاره شیرین‌بیان (راموز-موراليز و همکاران ۲۰۱۸) و ساپونین (اعظمی و همکاران ۱۳۹۲) اثری بر تولید گاز نداشت. درصورتی‌که نوریان سرور و روزبهان (۱۳۹۱) و جایمینیز-پیرالتا و همکاران (۲۰۱۱) افزایش تولید گاز را در زمان استفاده از عصاره گیاهان حاوی ساپونین گزارش کردند. ناهمسو با آزمایش حاضر، افزودن سطوح مختلف عصاره اتانولی و استنی ریشه شیرین‌بیان باعث افزایش تولید گاز شد (نوریان سرور و همکاران ۱۳۹۵). همچنین ناهمسو با نتایج آزمایش حاضر، افزودن ساپونین به جیره‌های دارای کنسانتره کمتر باعث کاهش (یوگیانتو و همکاران ۲۰۱۴) و به جیره‌های دارای کنسانتره بیشتر (اعظمی و همکاران ۱۳۹۲) سبب افزایش تولید گاز شد. تولید گاز نتیجه تخمیر کربوهیدرات به استات، پروپیونات و بوتیرات است (جیتاچیو و همکاران ۱۹۹۸) و به هضم و تخمیر سوبستراها و فعالیت و رشد میکربی وابسته است (مناتبی و همکاران ۲۰۱۴). ارتباط بسیار نزدیکی بین گاز تولیدی و تخمیر ماده آلی مخصوصاً کربوهیدرات‌ها وجود دارد (جیتاچیو و همکاران ۱۹۹۸). زیرا گاز تولیدی نتیجه تجزیه ماده آلی است. بنابراین افزایش گوارش‌پذیری ماده آلی برآورد شده در جیره‌های دارای کنسانتره بیشتر در آزمایش حاضر در افزایش گاز تولیدی قابل مشاهده است. افزایش تولید گاز در جیره‌های دارای سطح بیشتر کنسانتره ممکن است ناشی از افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌ها باشد. مشابه با نتایج آزمایش حاضر، مناتبی و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند جیره‌های دارای سطح بیشتر کنسانتره در مقایسه با جیره‌های دارای سطح کمتر کنسانتره تولید گاز بیشتری داشتند. این محققین بیان نمودند در جیره‌های دارای کنسانتره بیشتر، امکان تخمیر بیشتر سوبسترا برای باکتری‌های شکمبه فراهم می‌شود. زمانی‌که مقدار زیادی کربوهیدرات سهل‌الهضم (جیره‌های دارای کنسانتره بیشتر) در مقایسه با کربوهیدرات ساختمانی (جیره‌های دارای کنسانتره کمتر) در دسترس باکتری‌های شکمبه قرار می‌گیرد، مقدار زیادی اسیدهای چرب فرار در یک مدت زمان معین تولید می‌شود (دملو ۲۰۰۰). تفاوت در نتایج تولید گاز در آزمایش‌های مختلف انجام شده با عصاره‌های حاوی ساپونین در جیره‌های با نسبت متفاوت کنسانتره می‌تواند به عوامل مختلفی از جمله نوع، مقدار، ساختار ساپونین و ترکیب جیره (بوچیمن و

همکاران ۲۰۰۸)، و مدت انکوباسیون (یوگیانتو و همکاران ۲۰۱۴) مرتبط باشد.

برهمکنش نوع جیره و سطح عصاره، گوارش‌پذیری ماده آلی برآورد شده را تحت تأثیر قرار نداد. اما اثر نوع جیره بر گوارش‌پذیری ماده آلی برآوردشده معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). به طوری که جیره‌های دارای کنسانتره بیشتر در مقایسه با جیره‌های دارای کنسانتره کمتر باعث افزایش گوارش‌پذیری ماده آلی (۶۳/۹۶ در مقایسه با ۶۱/۳۱ درصد) شدند (جدول ۲). ناهمسو با نتایج آزمایش حاضر، یوگیانتو و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که جیره‌های دارای کنسانتره بیشتر در مقایسه با جیره‌های دارای کنسانتره کمتر گوارش‌پذیری ماده آلی کمتری داشتند. در جیره‌های دارای کنسانتره بیشتر، باکتری‌ها سوبسترای بیشتری برای تخمیر دارند (مناتبی و همکاران ۲۰۱۴). زیرا زمانی‌که مقادیر زیادی کربوهیدرات‌های سهل‌الهضم (جیره‌های دارای کنسانتره بیشتر) در مقایسه با کربوهیدرات‌های ساختمانی (جیره‌های دارای کنسانتره کمتر) در دسترس باکتری های شکمبه قرار می‌گیرد مقدار زیادی اسیدهای چرب فرار در یک مدت زمان معین تولید می‌شود (دملو ۲۰۰۰). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش گوارش‌پذیری جیره‌های دارای کنسانتره بیشتر در مقایسه با جیره‌های دارای کنسانتره کمتر به افزایش تخمیر و تولید گاز این جیره‌ها مرتبط باشد. تفاوت‌های این آزمایش و سایر آزمایش‌ها به لحاظ گوارش‌پذیری ماده آلی را می‌توان به برآورد گوارش‌پذیری ماده آلی در مطالعه حاضر و اندازه‌گیری مستقیم گوارش‌پذیری ماده آلی در سایر پژوهش‌ها ارتباط داد. همچنین اثر سطح عصاره بر گوارش‌پذیری ماده آلی برآوردشده معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). افزودن ۱ گرم عصاره شیرین‌بیان در مقایسه با عدم استفاده از آن و یا افزودن ۲ و ۳ گرم عصاره شیرین‌بیان باعث کاهش گوارش‌پذیری ماده آلی (به‌ترتیب ۶۰/۱۷، ۶۳/۴۴، ۶۳/۵۵ و ۶۳/۳۸ درصد) شد. در پژوهش‌های دیگر، استفاده از ساپونین باعث کاهش (اعظمی و همکاران ۱۳۹۲؛ یوگیانتو و همکاران ۲۰۱۴) و یا افزایش (نوریان سرور و همکاران ۱۳۹۵؛ جایمینیز_پیرالتا و همکاران ۲۰۱۱) گوارش‌پذیری ماده آلی شد. بنا بر برخی آزمایش‌ها (محقی و همکاران ۱۳۹۶) افزودن ساپونین تأثیری بر گوارش‌پذیری ماده آلی نداشت. مکانیسم ساپونین در کاهش گوارش‌پذیری شکمبه‌ای ماده آلی، ناشی از توانایی بالای ساپونین در جلوگیری از فعالیت آنزیم‌هایی است که الیاف را تجزیه می‌کنند (هریستو و همکاران ۲۰۰۳).

Table 2- Effect of different levels of liquorice extract in diets containing different levels of concentrate on gas production parameters and estimated organic matter digestibility

	Diet 40:60[1]				Diet 60:40[2]					*P-value*		
Parameter	LE0[3]	LE1[4]	LE2[5]	LE3[6]	LE0	LE1	LE2	LE3	SEM	Diet	LE	LE×Diet
Gas production (mL)	118.63	107.22	107.22	113.50	114.96	111.45	128.31	149.24	10.28	0.05	0.19	0.27
Gas production rate (%/h)	0.043	0.072	0.072	0.057	0.041	0.057	0.044	0.053	0.009	0.12	0.19	0.50
OMD (%)	62.05	63.20	63.20	61.44	64.83	61.79	63.89	65.32	1.08	<0.01	0.01	0.50

1- Diet containing 40% concentrate and 60% forage, 2- diet containing 60% concentrate and 40% forage, 3, 4, 5, 6- liquorice extract at level of 0, 1, 2 and 3 g/L, respectively.

Table 3- Effect of different levels of liquorice extract in diets containing different levels of concentrate on protozoa population (Log10 / gram of digesta)

	Diet 40:60[1]				Diet 60:40[2]					*P-value*		
Parameter	LE_0[3]	LE_1[4]	LE_2[5]	LE_3[6]	LE_0	LE_1	LE_2	LE3	SEM	Diet	LE	LE×Diet
Total	4.20	3.80	3.92	3.86	4.44	3.96	3.79	3.67	0.12	0.82	<0.01	0.25
Entodinium	4.16	3.75	3.89	3.85	4.40	3.92	3.67	3.64	0.13	0.96	<0.01	0.22
Diplodinium	2.46	1.69	1.79	0.00	1.81	2.66	2.66	0.92	0.65	0.26	0.04	0.55
Isotricha	2.53	1.63	1.63	2.30	3.03	1.69	0.87	0.77	0.66	0.37	0.15	0.45
Eudiplodinium	0.86	0.77	0.00	0.00	1.81	0.00	1.63	0.00	0.60	0.30	0.18	0.24
Epidinium	2.30	0.93	0.77	0.00	1.93	0.00	1.43	0.77	0.67	0.86	0.07	0.49

1- Diet containing 40% concentrate and 60% forage, 2- diet containing 60% concentrate and 40% forage, 3, 4, 5, 6- liquorice extract at level of 0, 1, 2 and 3 g/L, respectively.

Table 4- Effect of different levels of liquorice extract in diets containing different levels of concentrate on *in-vitro* rumen fermentation parameters

	Diet 40:60[1]				Diet 60:40[2]					*P-value*		
Parameter	LE_0[3]	LE_1[4]	LE_2[5]	LE_3[6]	LE_0	LE_1	LE_2	LE3	SEM	Diet	LE	LE×Diet
NH_3- N (mg/dl)	4.61	3.42	4.50	4.80	4.45	4.29	4.85	4.38	0.40	0.58	0.27	0.45
pH	6.55	6.67	6.57	6.69	6.63	6.64	6.56	6.53	0.06	0.52	0.58	0.37
Total VFA (mmol/L)	76.88	71.20	82.84	78.08	72.01	61.74	78.98	78.43	5.37	0.26	0.09	0.82
Acetate (%)	67.64	67.29	66.71	67.69	64.99	63.71	65.78	66.48	0.60	<0.01	0.11	0.13
Propionate (%)	19.39	19.78	19.17	20.04	19.21	19.40	20.08	19.78	0.65	0.95	0.82	0.74
Butyrate (%)	6.90	6.81	7.26	6.58	7.33	7.25	6.87	7.06	0.29	0.26	0.75	0.40
Isobutyrate (%)	1.66	1.65	2.21	1.94	2.55	3.57	2.28	1.84	0.71	0.18	0.78	0.48
Valerate(%l)	2.24	2.23	2.46	1.96	2.52	2.62	2.16	2.46	0.29	0.30	0.88	0.53
Isovaletate (%)	2.17	2.24	2.20	1.80	3.40	3.43	2.84	2.38	0.28	<0.01	0.06	0.54

جدول ۳ اثر سطوح مختلف عصاره شیرین‌بیان در جیره‌های دارای نسبت متفاوت علوفه به کنسانتره بر جمعیت پروتوزوآ را نشان می‌دهد. کل جمعیت پروتوزآ تحت تأثیر نوع جیره و برهمکنش نوع جیره و سطح عصاره شیرین‌بیان، قرار نگرفت (P>۰/۰۵). اما افزودن عصاره شیرین‌بیان در سطح ۱، ۲ یا ۳ گرم در لیتر محیط کشت در مقایسه با عدم استفاده از آن باعث کاهش تعداد کل پروتوزوآ (به‌ترتیب ۳/۸۸، ۳/۸۵، ۳/۷۷ و ۴/۳۲) شد (P<۰/۰۵). جمعیت پروتوزوآی جنس *انتودینیوم* و *دیپلودینیوم* تحت تأثیر نوع جیره و برهمکنش نوع جیره و سطح عصاره شیرین‌بیان قرار نگرفت (P>۰/۰۵). درحالی‌که اثر سطح عصاره شیرین‌بیان بر جمعیت پروتوزوآی جنس *انتودینیوم* و *دیپلودینیوم* معنی‌دار بود، به‌طوری‌که افزودن عصاره شیرین‌بیان در سطح ۱، ۲ یا ۳ گرم در لیتر محیط کشت در مقایسه با عدم استفاده از آن باعث کاهش تعداد پروتوزوآی جنس *انتودینیوم* (به-ترتیب ۳/۸۴، ۳/۷۸، ۳/۷۴ و ۴/۲۸) و در سطح ۳ گرم در لیتر محیط کشت عصاره شیرین‌بیان در مقایسه با عدم استفاده از آن یا افزودن ۱ و ۲ گرم در لیتر محیط کشت عصاره شیرین‌بیان باعث کاهش تعداد پروتوزوآی جنس *دیپلودینیوم* (به‌ترتیب ۰/۴۶، ۲/۱۴، ۲/۱۸ و ۲/۲۳) شد (P<۰/۰۵). مشابه با این نتایج، برهمکنش نوع جیره (سطوح مختلف کنسانتره به علوفه) و ساپونین بر جمعیت کل پروتوزوآ اثری نداشت (مناتبی و همکاران ۲۰۱۴). همسو با نتایج آزمایش حاضر، استفاده از ساپونین (محقی و همکاران ۱۳۹۶)، ساپونین عصاره اتانولی و استنی ریشه شیرین‌بیان (نوریان سرور و همکاران ۱۳۹۵) و ساپونین عصاره شیرین‌بیان (راموز-موراليز و همکاران ۲۰۱۸) باعث کاهش جمعیت کل جمعیت پروتوزوآ شد. نوریان سرور و همکاران (۱۳۹۵) مشابه با نتایج آزمایش حاضر گزارش کردند که تحت تأثیر ساپونین عصاره ریشه شیرین‌بیان، جنس‌های *انتودینیوم* و *افریواسکلوس* و خانواده *ایزوتریشیا* پروتوزوآ کاهش یافت. همچنین راموز- موراليز و همکاران (۲۰۱۸)، حذف پروتوزوآی جنس *هولوتریش* را تحت تأثیر افزودن عصاره شیرین‌بیان گزارش کردند. عدم تأثیر نوع جیره و برهمکنش نوع جیره و سطح عصاره شیرین‌بیان بر جمعیت کل پروتوزآ را می‌توان به عدم تأثیر فاکتورهای ذکر شده بر غلظت نیتروژن آمونیاکی (جدول ۴) نسبت داد. زیرا پروتوزوآ با باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک همزیستی دارند (تکاهاشی و همکاران ۲۰۰۵). عصاره‌های گیاهی خصوصاً عصاره‌های حاوی ساپونین فعالیت ضد پروتوزوآیی دارند (باسکوت و همکاران ۲۰۰۶) چرا که پروتوزوآ به ساپونین حساس هستند و غشای سلولی آنها دچار تغییر شده و پروتوزوآ می‌میرد (بنچار و گرییتد ۲۰۱۱). یوکاریوت‌ها (مانند پروتوزوآ) به علت حضور کلسترول در ساختار غشایی خود نسبت به پروکاریوت‌ها (مانند باکتری‌ها) به ساپونین حساس‌ترند (کلیتا و همکاران ۱۹۹۶). همچنین ساپونین قدرت مهار فعالیت پروتوزوآ و قارچ را از طریق اتصال با استرول غشای‌سلولی این میکروارگانیسم‌ها دارد (بداس و همکاران ۲۰۰۸). اثر تجزیه‌کنندگی ساپونین بر غشای سلول در نتیجه اتصال بخش غیرقندی ساپونین با استرول‌های (کلسترول) موجود درغشا صورت می‌گیرد که به شکل‌گیری کمپلکس‌های نامحلول(گلاورت و همکاران ۱۹۶۲) و متلاشی‌شدن غشای سلولی پروتوزوآ منجر می‌شود (سوهاریتی و همکاران ۲۰۱۱). پروتوزوآی شکمبه با شکار باکتری‌ها موجب کاهش بازچرخش پروتئین شکمبه می‌شود، بنابراین از بین رفتن پروتوزوآ موجب افزایش بازده استفاده از نیتروژن و افزایش سنتز پروتئین میکربی و به دنبال آن ورود پروتئین میکربی به دوازدهه می‌گردد (پاترا و ساکسنا ۲۰۰۹b). با این حال اثر ساپونین بر کاهش تعداد پروتوزوآ موقتی است و باکتری‌های شکمبه به حضور ساپونین در شکمبه سازگار می‌شوند و با تولید آنزیم-های تجزیه کننده، ساپونین را به بخش‌های سازنده‌اش (قند و ساپوژنین) تجزیه می‌کنند (وانگ و همکاران ۱۹۹۸). درصد انتودینیوم در بیشتر حیوانات اهلی (حتی در جیره تمام علوفه) در دامنه ۸۰-۹۹ درصد است. اما میانگین آن حدود ۸۸-۹۰ درصد است(دیهوریتی ۱۹۷۸). این می‌تواند دلیل بالا بودن جمعیت پروتوزوآی جنس انتودینیوم در بین دیگر جنس‌ها در آزمایش حاضر باشد. غلظت نیتروژن آمونیاکی تحت تأثیر نوع جیره، سطح عصاره شیرین‌بیان و برهمکنش نوع جیره و سطح

عصاره شیرین‌بیان قرار نگرفت (جدول ۴). همسو با این نتایج، غلظت نیتروژن آمونیاکی تحت تأثیر سطح جینوساپونین و برهمکنش نوع جیره و سطح جینوساپونین (مناتبی و همکاران ۲۰۱۴) قرار نگرفت. کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در زمان استفاده از سطوح مختلف عصاره گیاهان حاوی ساپونین گزارش شده است (راموز_موراليز و همکاران ۲۰۱۸؛ محقی و همکاران ۱۳۹۶). مشابه با نتایج حاضر، آگوری و همکاران (۲۰۱۱) و یوگیانتو و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که غلظت نیتروژن آمونیاکی تحت تأثیر نوع جیره قرار نگرفت. در صورتی‌که مناتبی و همکاران (۲۰۱۴) افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی تحت تأثیر جیره‌های دارای کنسانتره بیشتر در مقایسه با جیره‌های دارای کنسانتره کمتر و یوگیانتو و همکاران (۲۰۱۴) کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی را تحت تأثیر ساپونین در جیره‌های دارای سطوح مختلف کنسانتره را گزارش کردند. ساپونین با اتصال به آمونیاک از افزایش بیش از حد غلظت آن در شکمبه جلوگیری می‌نماید و هنگام کاهش غلظت آمونیاک، آن‌را آزاد و به ساخت پروتئین میکربی کمک می‌کند (حسین و چیک ۱۹۹۵).

نتایج نشان داد که **pH** مایع شکمبه تحت تأثیر نوع جیره، سطح عصاره شیرین‌بیان و برهمکنش نوع جیره و سطح عصاره شیرین‌بیان قرار نگرفت (جدول ۴). همسو با این نتایج، استفاده از ساپونین (محقی و همکاران ۱۳۹۶ و نصریا و همکاران ۲۰۱۱) تأثیری بر **pH** مایع شکمبه نداشت. ناهمسو با این نتایج، مناتبی و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند افزودن جینوساپونین به جیره‌های دارای کنسانتره کمتر در مقایسه با جیره‌های دارای کنسانتره بیشتر باعث افزایش **pH** شد. گزارش شده است که **pH** مایع شکمبه به جذب اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه و تولید اسیدهای چرب فرار در شکمبه بستگی دارد (مائو و همکاران ۲۰۱۰). این تفاوت بین پژوهش‌ها از نظر **pH** می‌تواند ناشی از تفاوت جیره‌های آزمایشی، سطح ساپونین استفاده شده و نوع، مقدار و ساختار ساپونین (بخش غیر قندی و اسکلت قندی) باشد (حسن و همکاران ۲۰۱۰).

غلظت کل اسیدهای چرب فرار، پروپیونات، بوتیرات، ایزوبوتیرات و والرات تحت تأثیر نوع جیره و برهمکنش نوع جیره و سطح عصاره شیرین‌بیان، قرار نگرفت. در حالی‌که نوع جیره، غلظت استات و ایزووالرات را تحت تأثیر قرار داد و جیره‌های دارای کنسانتره کمتر در مقایسه با جیره‌های دارای کنسانتره بیشتر، استات بیشتر و ایزووالرات کمتری داشتند ($P<۰/۰۵$) (جدول ۴). همسو با نتایج آزمایش حاضر، استفاده از ساپونین عصاره لیراک در آزمایش سوهاریتی و همکاران (۲۰۱۱) اثری بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار نداشت. در صورتی راموز-موراليز و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند سطح ۲ گرم در لیتر عصاره شیرین‌بیان باعث کاهش کل اسیدهای چرب فرار شد. مشابه با این نتایج، مناتبی و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند افزودن جینوساپونین به جیره دارای کنسانتره بیشتر، بر پروفایل اسیدهای چرب تأثیر نداشت. در جیره‌های علوفه‌ای در مقایسه با جیره‌های کنسانتره‌ای، زمینه رشد باکتری‌های سلولولایتیک بیشتر فراهم است و از آنجایی‌که مهم‌ترین فرآورده نهایی این باکتری‌ها استات است بنابراین در این جیره‌ها استات بالاتری تولید شده است. ایزووالرات از جمله اسیدهای چرب شاخه‌دار است که از متابولیسم اسید آمینه لوسین در شکمبه حاصل می‌شود. جیره‌های دارای کنسانتره بیشتر(جدول ۱) میزان پروتئین بالاتر و کنجاله گلوتن ذرت کمتری (منبع پروتئین عبوری) در مقایسه با جیره‌های با کنسانتره کمتر داشت و همین می‌تواند علت غلظت بالاتر ایزووالرات در این جیره‌ها باشد. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که سطوح استفاده شده عصاره شیرین‌بیان این آزمایش توانایی تغییر تخمیر را نداشت.

سپاسگزاری

نویسندگان از شرکت شیرین‌بیان زاگرس کرمانشاه برای در اختیار قرار دادن عصاره شیرین‌بیان صمیمانه قدردانی می‌کنند.

منابع مورد استفاده

Aazami MH, Tahmasbi A, Naseryan AA and Valizadeh R, 2013. Effect of incremental levels of saponins on *in vitro* gas production. Pp. 333-337. Second national conference of livestock and poultry management. Shahid Bahonar University. Kerman, Iran. (In Persian).

Aguerre MJ, Wattiaux MA, Powell JM, Broderick GA and Arndt C, 2011. Effect of forage to concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion. Journal of Dairy Science 94: 3081-3039.

Beauchemin KA, Kreuzer M, O'Mara F and McAllister TA, 2008. Nutritional management forenteric methane abatement. Animal Production Science 48:21-27.

Benchaar C and Greathead H, 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. Animal Feed Science and Technology 166: 338– 355.

Benchaar C, Petit HV, Berthiaume R, Ouellet DR, Chiquette J and Chouinard PY, 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. Journal of Dairy Science 90: 886–897.

Blummel M, Karsli A and Russell JR, 2003. Influence of diet on growth yields of rumen micro-organisms *in vitro* and *in vivo*: influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. British Journal of Nutrition 90: 625-634.

Bodas R, López S, Fernández M, García-González R, Rodríguez AB, Wallace RJ and González JS, 2008. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. Animal Feed Science Technology 145: 245-258.

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

Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A and Kamel C, 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science 89: 761-771.

Cardozo PW, Calsamiglia S, Ferret A and Kamel C, 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. Journal of Animal Science, 83: 2572-2579.

Dehority BA, 2003. Rumen Microbiology. British Library Cataloguing in Publication Data. First published.

Dehority BA, 1978. Specificity of rumen ciliate protozoa in cattle and sheep. Journal of Protozoology 25: 509-513.

D'Mello JPF, 2000. Farm animal metabolism and nutrition. CABI Publishing, Wallingford, 438 pp.

Glauert AM, Dingle JT and Lucy JA, 1962. Action of saponin on biological membranes. Nature 196: 953-955.

Hassan SM, Byrd JA Cartwright LA and Bailey CA, 2010. Hemolytic and antimicrobial activities differ among saponin-rich extracts from guar, quillaja, yucca, and soybean. Applied Biochemistry Biotechnology. 162: 1008-1017.

Hart KJ, Ruiz DRY, Duva SM, McEwan NR and Newbold CJ, 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology 14: 78–35.

Hristov AN, Ivan M, Neill L and McAllister TA, 2003. Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity *in vitro*. Animal Feed Science and Technology 105: 163-184.

Hu WL, Liu JX, Ye JA, Wu YM and Guo YQ, 2005. Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*. Animal Feed Science and Technology 120: 333-339.

Hussain I and Cheeke PR, 1995. Effect of dietary *Yucca schidigera* extract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate- or roughage-based diets. Animal Feed Science and Technology 51: 231-242.

Jiménez-Peralta FS, Salem AZM, Mejia-Hernández P, González-Ronquillo M, Albarrán-Portillo B, Rojo-Rubio R and Tinoco-Jaramillo JL, 2011. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on *in vitro* gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. Journal of Livestock Science 136: 192-200.

Klita PT, Mathison GW, Fenton TW and Hardin RT, 1996. Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. Journal of Animal Science 74: 1144-1156.

Makkar HPS, Becker K, Abel H, Pawelzik E, 1999. Nutrient contents, rumen protein degradability and anti - nutritional factors in some colour and white flowering cultivars of Vicia faba beans. Journal of Science of Food and Agriculture 75:511-520.

Manatbay B, Cheng Y, Mao S and Zhu W, 2014. Effect of gynosaponin on rumen in *vitro* methanogenesis under different forage-concentrate ratios. Asian Australian Journal of Animal Science 27: 1088-1097.

Mao HL, Wang JK, Zhou YY and Liu JX, 2010. Effect of addition of tea saponins and soybean oil on methane production in the rumen of growing lambs. Journal of Livestock Science 129: 56-62.

McDougallEI, 1947. The composition and output of sheep saliva. Institute of Animal Pathology. University of Cambridge.

McIntosh FM, Williams P, Losa R, Wallace RJ, Beever DA and Newbold CJ, 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. Applied and Environmental Microbiology 69: 5011–5014.

Menke KH and Steingass H, 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Animal Research and Development 28: 7-55.

Mirzaei-Alamouti H, Razavian M, Masoumi R and Salmani Zavieh V, 2017. Effect of monension and plant extract on rumen and blood metabolites and gene expression of the urea transporter gene in the rumen epithelium of fattening lambs. Journal of Animal Sciences Researches 27(3): 161-174. (In Persian).

Mohaghi MM, Tahmasebi A, Valizadeh R, Naserian A, 2013. Determination of fermentation process of diet containing different levels of saponin and acid tannic under *in vitro* condition. Iranian Journal of Animal Science Research: 5: 39-47. (In Persian).

Mohaghi MM, Tahmasebi A, Valizadeh R, Naserian A, Kazemi M and Eskandari Torbagha A, 2018. Effect of different levels of saponin on the nutrient content, fermentation parameters, rumen protozoan population and blood parameters in Baluchi sheep. Journal of Animal Science 117: 241-256. (In Persian).

Nasri, S, Ben Salem H, Vasta V, Abidi S, Makkar HPS and Priolo A, 2011. Effect of increasing levels of Quillajasaponaria on digestion, growth and meat quality of Barbarine lamb. Animal Feed Science and Technology 164: 71-78.

Nourian Soror MA, Khazarian A and Moeni MM, 2016. Effects of ethanol and acetone extracts of Glycyrrhiza glabra root on ruminal fermentation parameters, methane production and goat protozoa population. Animal production 4: 729-740. (In Persian).

NRC, 2001.Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.

Oloomi H and Hassibi N, 2012. Evaluation of the content of secondary metabolites of Licorice root in some natural habitats of Kerman province. Medicinal plants. 41: 137-144. (In Persian).

Ottenstein DM and Bartley DA, 1971. Separation of free acids C2-C5 in diluted aqueous solution column technology. Journal of Chromatographic Science 9: 673-681.

Patra AK and Saxena J, 2009a. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. Antonie van Leeuwenhoek 96: 363-375.

Patra AK and Saxena J, 2009b. The effect and mode of action of saponins on the microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. Nutrition Research Reviews 22: 204-219.

Patra AK. 2012. Dietary Phytochemicals and Microbes. Spriger, New York, USA.

Patra AK and Yu Z. 2015. Effects of adaptation of in vitro rumen culture to garlic oil, nitrate, and saponin and their combinations on methanogenesis, fermentation, and abundances and diversity of microbial populations. Frontiers in Microbiology: 6:1-11.

Patra AK and Yu Z. 2013. Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on in vitro fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. Applied Microbiology and Biotechnology: 98(2):897-905.

Ramos-Morales E, Rossi G, Cattin M, Jones E, Braganca R and Newbold CJ, 2018. The effect of an isoflavonid-rich liquorice extract on fermentation, methanogenesis and the microbiome in the rumen simulation technique. FEMS Microbiology Ecology 94: 1-11.

Suharti S, Astuti DA, Wina E and Toharmat T, 2011. Rumen microbial population in the *in vitro* fermentation of different ratios of forage and concentrate in the presence of whole Lerak (*Sapindus rarak*) fruit extract. Journal of Animal Science 8: 1086 – 1091.

Takahashi J, Nwenya B, Santoso B, Sar C, Umetsu K, Kishimoto T, Nishizaki K, kimura K and Hamamoto O, 2005. Mitigation of methane emission and energy recycling in animal agricultural systems. Asian-Australian Journal of Animal Science 18: 1199-12080.

Wallace RJ, McEwan NR, McIntosh FM, Teferedegne B and Newbold CJ, 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. Asian Australasian Journal of Animal Science 15: 1458-1468.

Wang Y, McAllister TA, Newbold CJ, Rode LM, Cheeke PR and Cheng KJ, 1998. Effect of Yucca schidigera extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC). Animal Feed Science and Technology 74: 143-153.

Yogianto, Sudarman A, Wina E and Jayanegara A, 2014. Supplementation effects of tannin and saponin extracts to diets with different forage to concentrate ratio on in vitro rumen fermentation and methanogenesis. Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture 39: 144-151.

Effect of liquorice extract on rumen fermentation parameters : an *in-vitro* study

P Darat[1], F Fatahnia[2], G Taasoli[3*], H R Mirazei Alamouti[4] and A Khatibjou[2]

Received: July 10, 2019 Accepted: April 25, 2020

[1]Graduated Msc, Department of Animal Sciemce, Faculty of Agriculture, Ilam University
[2]Associate Professor 0,and Assistant Professor, respectivly, Department of Animal Sciemce, Faculty of Agriculture, Ilam University
[3]Assistant Professor, Department of Animal Science, Chaharmahal Bakhtiari Agirculture and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extention Organization, Shahrekord, Iran
[4]Associate Professor, Department of Animal Sciemce, Faculty of Agriculture, Zanjan University
[*]Corrosponding Author: Email: gtaasoli@gmail.com

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Researches

Journal of Animal Science/vol.30 No.4/ 2021/pp 27-39
https://animalscience.tabrizu.ac.ir

OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)

DOI: 10.22034/as.2021.34524.1511

Introduction: On the one hand, among many types of bioactivities, plants secondary metabolites have repetitively demonstrated antibacterial and antimicrobial activities. On the other hand, the growing concerns over resistance of bacteria to antibiotics and chemical residues in animal derived foods have attracted the attention of many towards utilization of natural antibacterial and antimicrobial compounds. Phytochemicals exhibit antibacterial, antiviral, and antifungal activities against a wide range of pathogenic and non-pathogenic microorganisms. The antimicrobial properties of phytochemicals as feed additives have been explored in livestock production system (Patra 2012). In the recent decade, plant-extracted antibacterial biomolecules have successfully substituted antibiotics, other chemotherapeutic agents, and chemical and growth promoting antibiotic feed additives in many research studies. Of many classes of phytochemicals, saponins have shown various types of bioactivities including antibacterial effects. These biomolecules have various mechanism of actions against bacteria. Saponins s could suppress the bacteriolytic activity of rumen ciliate protozoa thus enhancing the total microbial protein flow from the rumen. Moreover, saponins also have selective antibacterial effects which may prove useful in, for example, controlling starch digestion (Wallace et al 2002). Studies have investigated the beneficial effects of saponin rich licorice root extract on ruminal microbial population and rumen fermentation. It is of note that information on the effect of phytochemicals on ruminal microbial fermentation at low pH is scarce. The effects of plant extracts on ruminal microbial fermentation are pH-dependent. Most of the research have focused on the effects of phytochemicals on high-forage diets at pH over 6.2. Microbial populations and ruminal fermentation conditions varies between the cattle fed high-concentrate and high-forage diets leading to different final intestinal pH conditions. Ideally, a natural feed additive with the capacity of replacing ionophores of the high concentrate diet in low-pH environment is required. Therefore, we hypothesized that saponin rich licorice root extract could exert some antimicrobial activities at low pH. Hence, the objective of this experiment was to study the effect of licorice extract on *in-vitro* gas production parameters, pH, volatile fatty acids (VFA) and ammonia-N concentration as well as protozoa populations in diets containing different levels of concentrate to forage ratio.

Material and methods: Dehydrated licorice extract was obtained from Zagros Company (Kermanshah). Two experimental diets with different forage to concentrate ratio (40 to 60% or 60 to

40 %) were formulated. Licorice extract was added to diets at three levels of 1, 2 and 3 mg /liter of incubation media. The saponin content of licorice extract was 134.75 mg/g of dried licorice extract. For *in-vitro* gas production, rumen fluid was taken from two rumen fistulated Kordish rams. For measuring gas production, 200 mg of experimental diets with four levels of licorice extract (0, 1, 2 and 3 mg/L incubation medium) were incubated with 40 ml of buffered-rumen fluid for 120 hours. The cumulative produced gas was recorded at different times of incubation and gas production parameters were fitted with Blummel et al. equation (2003). Organic matter digestibility (OMD) was estimated after 24 hours of incubation (Menke and Steingass 1988). N-ammonia concentration was measured based on the method of Broderickand Kang et al. (1980). Rumen protozoa were identified according to the method of Dehority et al. (2003). After 24 h incubation, 5 ml of buffered rumen fluid was pipetted into a screw-capped test tube containing 5 ml of formalin. Thereafter, two drops of brilliant green dye (2 g brilliant green and 2 ml glacial acetic diluted to 100 ml with distilled water) were added to the test tube, mixed thoroughly, and allowed to stand overnight at room temperature. Total and differential counts of protozoa were made with five replications. *In-vitro* rumen concentration of volatile fatty acids (VFA) was measured by gas chromatography (Ottenstein and Bartley 1971). All *in-vitro* gas production trials were carried out in three runs. Rumen fermentation parameters, protozoa population and OMD data were analyzed in a factorial arrangement based on a completely randomized design and gas production data was analyzed in a factorial arrangement based on a complete randomized block design using Proc GLM of SAS software. The differences among treatments were evaluated using Tukey adjustment when the overall F-test was $P \leq 0.05$. Trends were declared when $0.05 < P \leq 0.10$.

Results and discussion: The results showed that the interaction of diets and licorice extract were not significant on *in-vitro* gas production, rate of gas production, estimated OMD, ammonia-N concentration, pH, total protozoa population, *Entodinium, Epidinium, Diplodinium, Eudiplodinium* and *Isotricha* population and *in-vitro* ruminal concentrations of total VFA, acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, valerate and isovalerate. The effect of diets on gas production ($P \leq 0.05$) and estimated OMD ($P<0.01$) was significant. High concentrate diets compared with low concentrate diets had greater gas production and estimated OMD. In disagreement with our findings, saponin decreased gas production in low concentrate diet (Yogianto et al 2014) and adding saponin to diet containing high level of concentrate increased gas production (Aazami et al 2013). Furthermore, high concentrate diet had lower OMD compared with the low concentrate diet (Yogianto et al 2014). Diets containing high concentrate had lower acetate and greater isovalerate concentrations ($P<0.01$). Addition of licorice extract reduced estimated OMD and total protozoa and *Entodinium* population ($P<0.01$) and tended to increase total VFA concentration ($P=0.09$) while decreasing the concentration of isovalrate ($P=0.06$).

Conclusion: Based on our results, it is concluded that licorice extract had no effect on fermentation parameters of diets containing different concentrate: forage ratios. Further studies are necessary to determine the effectiveness of saponin-containing plants extracts on rumen microbial fermentation and digestion kinetics.

Keywords: Concentrate: Forage ratio, Fermentation kinetic, *In vitro*, Licorice extract