



تولیات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

صفحه‌های ۷۴۰-۷۲۹

تأثیر عصاره اتانولی و استنی ریشه شیرین بیان بر فراسنجه‌های تخمیر، متان و جمعیت پروتوزوایی شکمبه بز

محمد ابراهیم نوریان سرور^{۱*}، علی خضریان^۲، محمد مهدی معینی^۳

۱. استادیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه - ایران

۲. دانشجوی دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه - ایران

۳. دانشیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه - ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۷/۲۷

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۰۵

چکیده

تأثیر ۶ سطح (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر) عصاره اتانولی و استنی ریشه شیرین بیان بر فرایند تولید گاز متان، تخمیر شکمبه و جمعیت پروتوزوایی بز مرخز به روش برون‌تنی بررسی شد. آزمون تولید گاز با جیره پایه یونجه برای هر تیمار در ۵ تکرار و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فراسنجه‌های تخمیر، متان، ضریب تفکیک‌پذیری (PF) و اسیدهای چرب فرار کل اندازه‌گیری شد. عصاره‌ها در تمام سطوح تولید گاز ۲۴ ساعت را افزایش داد ($P < 0/01$). عصاره اتانولی شیرین بیان تولید گاز متان را کاهش ($P < 0/05$)، ولی عصاره استنی آن در سطوح ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر تولید گاز متان را افزایش داد ($P < 0/01$). ماده آلی تجزیه شده تحت تأثیر هر دو نوع عصاره بهبود یافت ($P = 0/001$). عصاره اتانولی شیرین بیان تولید آمونیاک را کاهش داد ($P < 0/01$). ضریب بخش‌پذیری و تولید توده میکروبی در حضور هر دو عصاره اتانولی و استنی کاهش ($P < 0/01$)، ولی اسیدهای چرب فرار و انرژی قابل متابولیسم در تمام سطوح هر دو نوع عصاره نسبت به شاهد افزایش یافت ($P < 0/01$). به‌جز دی‌پلودینیان، سایر پروتوزوآها و جمعیت کل در اثر دو نوع عصاره کاهش یافتند ($P < 0/05$). براساس نتایج تحقیق حاصل، عصاره اتانولی و استنی شیرین بیان ضمن بهبود قابلیت هضم، تولید گاز متان و جمعیت پروتوزوایی را در شکمبه بز کاهش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: بز، پروتوزوآ، تخمیر، عصاره، فراسنجه، متان

مقدمه

تشکیل شده است [۱]. این ترکیب مهمترین ماده مؤثره ریشه شیرین بیان بوده که در حدود ۳۰ تا ۵۰ برابر شیرین تر از شکر است [۱]. فلاوانون‌ها، ایزوفلاون‌ها، اسیدتانیک و اسانس‌ها از دیگر ترکیبات مؤثره شیرین بیان هستند [۱]. مقدار گلیسیریتینیک اسید عصاره شیرین بیان ۰/۰۰۶۵۱ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر (۰/۰۲۲ درصد) گزارش شده است [۱۰].

احتمال دارد ترکیبات مؤثر موجود در شیرین بیان (ساپونین) با کاهش جمعیت پروتوزوا در شکمبه [۲۷] و به تبع آن کاهش تجزیه پروتئین، راندمان مصرف نیتروژن را بهبود دهند [۱۶]. استفاده از گیاه ساپوناریا (*Sapindus saponaria* بومی آمریکا)، جمعیت پروتوزوا و تولید گاز متان را به ترتیب ۵۴ و ۲۰ درصد کاهش می‌دهد، ولی تأثیری بر متانوژن‌ها ندارد [۱۵]. همچنین افزودن چهار سطح عصاره اتانولی گل گاوزبان (حاوی ساپونین) در شرایط آزمایشگاهی به مایع شکمبه گوسفند سبب افزایش گاز ۲۴ ساعته، کاهش ضریب بخش‌پذیری، کاهش گاز متان تا ۵۴ درصد، نیتروژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوایی شده است [۲]. استفاده از عصاره اتانولی - متانولی برگ دو گیاه سوبابل (*Leucaena leucocephala*) و بید مجنون (*Salix babylonica*) حاوی ساپونین سبب افزایش گاز ۲۴ ساعته، سوسترا تجزیه شده واقعی، ماده آلی تجزیه شده، انرژی قابل سوخت‌وساز، اسیدهای چرب فرار و پروتئین میکروبی در شرایط آزمایشگاهی گوسفندان می‌شود [۱۸]. در گوسفندان نیز استفاده از گیاه حاوی ساپونین، نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار و متان را کاهش می‌دهد [۲۶]. همچنین، به روش برون‌تنی با استفاده از مایع شکمبه گوسفند، افزودن ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌گرم ساپونین چای جمعیت پروتوزوا را به ترتیب ۱۹، ۲۵، ۴۵ و ۷۹ درصد کاهش داد و سبب مهار تولید گاز متان و کاهش آمونیاک و افزایش تولید پروتئین میکروبی می‌شود [۱۶].

کاهش واکنش‌های تولید متان، اتلاف انرژی و نیتروژن آمونیاکی تحت تأثیر عواملی نظیر مصرف خوراک، قابلیت هضم، گونه و مراحل فیزیولوژی، افزودن لیپیدها یا یونوفرها به جیره، تغییرات جمعیت میکروبی دستگاه گوارش دام و نسبت علوفه به کنسانتره قرار می‌گیرد [۶]. در تخمیر شکمبه‌ای، مقدار ۸ تا ۱۲ درصد انرژی قابل هضم از طریق تولید متان و ۷۵-۸۵ درصد نیتروژن مصرفی از طریق مدفوع و ادرار دام دفع می‌شود [۸]. با توجه به آثار سوء مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در دام و ضرورت کاهش تولید گاز متان و نیتروژن آمونیاکی، لازم است افزودنی‌های مناسبی همچون گیاهان دارویی بررسی شود.

متابولیت‌های ثانویه گیاهی نظیر ساپونین‌ها، اثرات مثبتی بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه دارند و به دلیل خاصیت ضدپروتوزوایی [۲ و ۸]، سبب انتقال اسیدهای آمینه به روده کوچک در دام زنده و کاهش دامیناسیون آنها در شکمبه [۲۴]، کاهش تولید نیتروژن آمونیاکی و بهبود بازده تولید پروتئین میکروبی در دام می‌شوند [۱۶ و ۲۶]. عصاره‌های گیاهی خصوصاً عصاره‌های حاوی ساپونین فعالیت ضدپروتوزوایی دارند [۸]. کاهش جمعیت پروتوزوایی می‌تواند سبب بهبود مصرف نیتروژن و افزایش جریان پروتئین میکروبی به روده شود [۱۶]. بنابراین، انتظار می‌رود که کاهش جمعیت پروتوزوا توسط ساپونین‌ها منجر به افزایش عملکرد دام شود [۲۶]. ساپونین‌ها در غلظت‌های بالا آثار سوء بر اپی‌تلیوم روده دارند و در فرایند هضم در دام و تولید آنزیم‌های گوارشی اختلال ایجاد می‌کنند [۱۲].

متابولیت ثانویه اصلی گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) گلیسیریزین یا اسید گلیسیریزیک ($C_{42}H_{62}O_{16}$) بوده که یک تری‌ترپنوئید ساپونین است و از دو واحد اسید گلوکورونیک و یک مولکول اسید گلیسیریتینیک (آگلیکون)

تولیدات دامی

اضافه شد [۲۵]. مایع شکمبه در شرایط بی‌هوازی مخلوط و توسط پارچه تنظیف ۴ لایه تصفیه و با نسبت یک به دو با بافر بی‌کربنات [۲۲] ترکیب و به هر بطری تزریق شد. همه ۶۵ بطری برای دو حلال (۵ بطری برای هر سطح عصاره و ۵ بطری بلانک (فقط مایع شکمبه) برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۹ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند.

پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، مقدار کل گاز تولیدی در هر بطری توسط سرنگ مدرج ثبت شد. برای اندازه‌گیری متان با استفاده از آزمون تولید گاز، ابتدا مقدار گاز تولیدی ۲۴ ساعت ثبت و مقدار ۴ میلی‌لیتر سود ۱۰ نرمال به داخل محیط تخمیر محتوی ۱۵ میلی‌لیتر بافر و ۱۰۰ میلی‌گرم سوبسترا تزریق شد. سپس گاز که همان گاز متان است، اندازه‌گیری شد [۱۱]. پس از تعیین مقادیر گاز کل و متان، با در نظر گرفتن مقادیر ثابت ۸/۷ درصد برای سایر گازها (H_2 و N_2) [۲۰]، مقدار گاز دی‌اکسیدکربن با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد:

رابطه (۱)

سایر گازها + متان + دی‌اکسیدکربن = گاز کل
در رابطه ۱، مقادیر گاز کل، متان اندازه‌گیری شده و معلوم هستند و سایر گازهای نیز در حدود ۸/۷ درصد گاز کل بوده و لذا مقدار گاز دی‌اکسیدکربن با رابطه (۲) محاسبه شد:

رابطه (۲)

(متان + سایر گازها) - گاز کل = دی‌اکسیدکربن
پس از پایان انکوباسیون، از محیط‌های تخمیر نمونه‌های مایع شکمبه با هدف تعیین ماده آلی تجزیه شده، نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار تهیه شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی به وسیله روش فنول - هیپوکلریت و با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۷].

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر دو نوع عصاره اتانولی و استنی ریشه شیرین بیان بر فراسنجه‌های تخمیر، گازهای متان و دی‌اکسیدکربن و تغییرات جمعیت پروتوزوآ با استفاده از مایع شکمبه بز مرخز بود.

مواد و روش‌ها

جهت تهیه عصاره استنی و اتانولی، شیر قهوه‌ای رنگ ریشه شیرین بیان توسط آسیاب‌های معمولی به ذرات ریز (یک تا دو میلی‌متر) تبدیل شد. مخلوطی از آب و هر یک از حلال‌ها به صورت مجزا با نسبت ۵۰ میلی‌لیتر آب و ۵۰ میلی‌لیتر حلال تهیه شد. شیر قهوه‌ای آسیاب شده ریشه شیرین بیان در حلال (با نسبت ۱ گرم به ۸ میلی‌لیتر حلال) ریخته شده و سپس ترکیب حاصل توسط بطری‌های شیشه‌ای اسکات برای مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس توسط دستگاه تکان‌دهنده به خوبی مخلوط شد. سپس هر دو بطری حاوی حلال استن و اتانول برای مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۳۹ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری و سپس توسط صافی تصفیه شد [۱۸].

مایع شکمبه به روش لوله مری و در حالت ناشتا از سه راس بز نژاد مرخز (میانگین وزن $1/5 \pm 31/8$ کیلوگرم) گرفته و توسط فلاکس به آزمایشگاه منتقل و سپس به خوبی با هم مخلوط شدند. بزها با استفاده از جیره نگهداری (یونجه خشک) و روزانه دو مرتبه (۹ صبح و ۳ عصر) تغذیه می‌شدند.

مقادیر ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا یونجه توزین و به هر یک از بطری‌های ویتن ۱۲۰ میلی‌لیتری افزوده شد. عصاره اتانولی و استنی شیرین بیان نیز در ۵ سطح (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر برای هر ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه بافری) و هر سطح در ۵ تکرار دقیقاً پیش از تزریق ۳۰ میلی‌لیتر بافر بی‌کربنات به هر بطری شیشه‌ای ۱۲۰ میلی‌لیتری ویتن، در شرایط تزریق گاز دی‌اکسیدکربن به محیط

تولیدات دامی

در این رابطه‌ها، ME انرژی قابل سوخت‌وساز (مگاژول در هر کیلوگرم)، NE_L انرژی خالص شیردهی (مگاژول در هر کیلوگرم)، GP گاز تولیدی (میلی‌لیتر)، CP پروتئین خام (درصد)، EE چربی خام (درصد) و CA خاکستر (درصد) است.

مقدار ماده خشک، خاکستر خام، پروتئین خام و چربی خام با روش‌های رایج اندازه‌گیری شد. درصد ماده آلی جیره از اختلاف ماده خشک با خاکستر خام با روش رایج محاسبه شد [۴].

جمعیت پروتوزوای مژکدار شکمبه براساس سه زیرخانواده اتودینینه، افریواسکلوسینه، دیپلودینیانه و خانواده ایزوتریچیدا [۹] و با استفاده از لام هموسیئومتر و میکروسکوپ نوری (مدل Nikon, YS 100) با بزرگنمایی ۱۰x در ۹ تکرار برای هر تیمار شمارش شد. پس از اتمام فرایند تخمیر، مایع شکمبه با محلول فرمال سالیین (محلول حاوی ۸/۱ گرم کلرید سدیم خالص در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میلی‌لیتر فرمالین ۳۶ درصد) با نسبت ۱ به ۵ ترکیب شد و تا روز شمارش در دمای یخچال معمولی نگهداری شد. تعداد پروتوزوای در هر میلی‌لیتر مایع با استفاده از رابطه (۸) محاسبه شد:

رابطه (۸)

$$NP \text{ ml} = \frac{N}{[\text{area mm} \cdot \text{Dmm}^2]} \times 1000$$

در این رابطه، NP، تعداد پروتوزوای شمارش شده در هر میلی‌لیتر، N تعداد پروتوزوای در هر بار شمارش لام، area mm مساحت هر بخش لام (یک میلی‌متر مربع)، D_{mm} عمق هر بخش لام (۰/۱ میلی‌متر) و $\frac{1}{n}$ ضریب رقت (یک پنجم) است. داده‌های حاصل از آزمون تولید گاز و جمعیت زیرخانواده پروتوزوای در طول دوره گرمخانه‌گذاری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) برای مدل ۹ تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در دو سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ مقایسه شدند. از روش آزمون t مستقل برای

شاخص PF (عبارت است از میلی‌گرم ماده آلی تجزیه شده بخش بر میلی‌لیتر گاز تولیدی که بیان‌کننده مقدار سنتز پروتئین میکروبی است) با استفاده از رابطه (۳) محاسبه شد [۲۰]:

$$\text{رابطه (۳)} \quad PF = OMD / IVGP$$

در معادله مذکور، OMD مقدار ماده آلی تجزیه شده در هر بطری (میلی‌گرم) و IVGP میزان گاز تولیدی (میلی‌لیتر) است. پس از انکوباسیون محتویات بطری‌های تصفیه، گرمخانه‌گذاری و درنهایت داخل کوره قرار داده شد و ماده آلی تجزیه شده محاسبه شد [۱۸]. پس از اندازه‌گیری ماده آلی تجزیه شده، مقادیر توده میکروبی تولیدی و بازده توده میکروبی نیز با استفاده از رابطه (۴) محاسبه شد [۱۸]:

$$\text{رابطه (۴)} \quad MM_{\text{mg}} = OMD_{\text{mg}} - [GP_{\text{ml}} \times 2/2]$$

در این رابطه، MM میلی‌گرم توده میکروبی تولید شده، OMD ماده آلی تجزیه شده، GP گاز تولیدی ۲۴ ساعت و ۲/۲ ضریب استوکیومتری است. اسیدهای چرب فرار کل (میلی‌مولدر ۲۰۰ میلی‌گرم) با استفاده از دو روش دستگاه مارخام [۵] و رابطه (۵) اندازه‌گیری شد [۱۸]:

رابطه (۵)

$$SCFA_{\text{mmol/L}} = [(0/0222 \times GP) - 0/00425] \times 100$$

در این رابطه، SCFA اسیدهای چرب زنجیر کوتاه و GP گاز تولیدی در مدت ۲۴ ساعت است.

انرژی قابل سوخت‌وساز [۲۲] و انرژی خالص شیردهی [۳] به ترتیب با استفاده از رابطه‌های ۶ و ۷ محاسبه شد:

رابطه (۶)

$$ME_{\text{mj/KgDM}} = [(2/2) + (0/136 \times GP) + (0/0057 + CP) + (0/00029 \times EE^2)]$$

رابطه (۷)

$$NE_{L \text{ mj/KgDM}} = [(0/115 \times GP) + (0/0054 + CP) + (0/014 \times EE) - (0/0054 \times CA) - 0/36]$$

تولیدات دامی

تأثیر عصاره اتانولی و استنی ریشه شیرین بیان بر فراسنجه‌های تخمیر، متان و جمعیت پروتوزوایی شکمبه بز

نتایج و بحث

نتایج تجزیه تقریبی جیره پایه (یونجه) استفاده شده در تغذیه بزها و آزمون گاز، در جدول ۱ ارائه شده است. یونجه استفاده شده چین سوم بوده و برگ یونجه کمتری از حد انتظار داشت. لذا درصد پروتئین آن کمتر از حد معمول ۱۳ تا ۱۵ درصد می‌باشد.

مقایسه مقدار هر فراسنجه بین دو عصاره اتانولی و استنی استفاده شد.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \varepsilon_{ijk} \quad (9)$$

در این رابطه، Y_{ijk} مقدار هر مشاهده، μ میانگین کل، T_i اثر تیمار و ε_{ijk} خطای آزمایش است.

جدول ۱. ترکیب شیمیایی یونجه استفاده شده در جیره بزها و آزمون گاز (درصد)

ماده خشک	ماده آلی	خاکستر	عصاره اتری	پروتئین خام
۹۶/۶۳	۹۴/۳۴	۵/۶۶	۶/۸۶	۱۰/۰۸

داشته است [۱۸]. اگرچه استفاده از مقادیر ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی گرم ساپونین چای تأثیری بر گاز تولیدی ۲۴ ساعت نداشته است [۱۶]. به دلیل اینکه عصاره استنی توانایی استخراج همه ماده مؤثره قطبی و غیرقطبی را دارد، احتمالاً به همین خاطر این عصاره اثربخشی بیشتری نسبت به عصاره اتانولی در همه صفات دارد. مقایسه بین دو عصاره نشان می‌دهد که در سطوح ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر، تأثیر عصاره استنی بیشتر از عصاره اتانولی و گاز تولیدی کل این عصاره بیشتر بود ($P < 0/05$ و $P < 0/01$).

عصاره اتانولی گاز متان را کاهش ($P = 0/014$) و عصاره استنی افزایش ($P < 0/01$) داده است. این تأثیر بر گاز دی‌اکسیدکربن عکس می‌باشد. مقایسه بین دو عصاره هم نشان داد که در سه سطح بالایی عصاره اتانولی گاز متان کمتری از عصاره استنی تولید شده است ($P < 0/05$). تولید متان فرایند پیچیده‌ای دارد و در واکنش‌های مرحله‌ای متانوژنسیس، گاز دی‌اکسیدکربن با گاز هیدروژن ترکیب شده و محصول متان تولید می‌شود [۲۳]. افزایش تولید اسید استیک و بوتیریک، بالا بودن فورمات و جمعیت متانوژن‌ها و پروتوزوآها در تولید آن نقش جدید دارند

درمقایسه با تیمار شاهد، عصاره اتانولی در سطوح ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ و به ترتیب ۵۱، ۴۷ و ۷۲ درصد و عصاره استنی در سطوح ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر به ترتیب ۶۷ و ۱۰۴ درصد تخمیر را بهبود داد و سبب افزایش گاز تولیدی ۲۴ ساعت شد ($P < 0/01$) (جدول ۲). اگرچه عصاره استنی گاز بیشتری نسبت به عصاره اتانولی تولید کرد ($P < 0/01$). در گرمخانه‌گذاری برون‌تنی، محتوای کربوهیدرات‌های ماده خوراکی تخمیر شده و اسیدهای چرب زنجیر کوتاه، گاز متان، دی‌اکسیدکربن و سلول‌های میکروبی تولید می‌شوند [۱۳، ۲۰ و ۲۸]، لذا گاز تولیدی نتیجه تجزیه‌پذیری ماده آلی و تولید اسیدهای چرب فرار است.

افزایش گاز تولیدی که ناشی از افزایش تجزیه‌پذیری ماده آلی است، احتمالاً به خاطر مقدار کم متابولیت‌های ثانویه عصاره و یا به خاطر توانایی میکروارگانیسم‌های شکمبه در تجزیه ماده مؤثره ساپونین است [۱۸]. مشابه با نتایج حاضر، گاز ۲۴ ساعت با استفاده از عصاره دو گیاه سوبابل و بید مجنون با ماده مؤثره ساپونین در چهار سطح صفر، ۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸ (میلی‌لیتر/گرم ماده خشک)، افزایش

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

میلی گرم در لیتر) بود، ولی عصاره اتانولی ($P < 0/01$) برخلاف عصاره استنی در سه سطح ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر در مقایسه با شاهد آمونیاک را کاهش داد. افزودنی های حاوی ساپونین سبب کاهش آمونیاک می شود و این اثربخشی به دلیل تأثیرات ضدپروتوزوایی آنها است [۸]. غلظت آمونیاک (میلی گرم در لیتر) بین دو عصاره اتانولی و استنی تفاوتی با هم نداشتند و تنها در سطح ۵۰۰ میکرولیتر عصاره استنی، آمونیاک بیشتری داشت ($P < 0/01$).

احتمالاً در عصاره اتانولی کاهش جمعیت پروتوزوایی دلیل کاهش آمونیاک می باشد، هرچند ممکن است به دلیل کاهش تجزیه پروتئین [۲۶] و یا کاهش فعالیت آنزیم اوره آز [۱۷] و یا از طریق باند شدن ساپونین با آمونیاک، تولید آمونیاک در شکمبه دام کاهش یابد [۱۷ و ۲۶]. فعالیت مهارکنندگی جمعیت باکتری های تولیدکننده آمونیاک و در نهایت کاهش آمونیاک مایع شکمبه گوسفند [۲۹] و در اثر ساپونین چای و استفاده از عصاره دو نوع گیاه یوکا و ساپوناریا غنی از ساپونین (بومی قاره آمریکا) در گوسفندان [۲۶] نیز گزارش شده است، درحالی که افزودن گیاه یوکا که منبع غنی از ساپونین است بر غلظت آمونیاک تأثیری نداشته است [۸].

ضریب تفکیک پذیری [۲۰]، در تمام سطوح هر دو عصاره کاهش یافت ($P < 0/01$). به عبارت دیگر، تأثیر هر دو عصاره شیرین بیان مطلوب نبوده است. این ضریب، زمانی افزایش می یابد که ماده آلی بیشتری تجزیه ولی گاز کمتر تولید کند. چون گاز تولیدی به ازای هر واحد ماده آلی تجزیه شده بیشتر شده است، لذا پروتئین میکروبی تولیدی و بازده تولید پروتئین میکروبی کاهش داشته اند ($P < 0/01$). تنها در سطح ۲۰۰ میکرولیتر عصاره استنی ضریب تفکیک پذیری بیشتر از عصاره استنی است ($P = 0/049$). به همین دلیل، تنها در این سطح از عصاره استنی توده میکروبی تولید شده بیشتر از عصاره اتانولی است.

[۲۳]. همچنین، ساپونین سبب افزایش تعداد متانوژن ها [۱۴] و کاهش پروتوزوآ [۱۵] در شکمبه می شود. لذا باتوجه کاهش متان و جمعیت پروتوزوآ در عصاره اتانولی ممکن است، این عصاره از طریق تأثیر بر جمعیت پروتوزوآ متان را کاهش داده باشد. عصاره استنی چون حاوی ترکیبات مؤثره بیشتری است، به نظر می رسد از طریق افزایش جمعیت متانوژن ها سبب افزایش متان شده است. کاهش گاز متان تحت تأثیر ساپونین چای به روش برون تنی [۱۶] و به روش دام زنده [۲۹] و افزایش جمعیت متانوژن ها در حضور ساپونین [۱۴] نیز گزارش شده است.

عصاره اتانولی شیرین بیان تنها در سطوح ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر و به مقدار ۱۰ تا ۱۴ درصد و عصاره استنی در همه سطوح به مقدار ۷ تا ۲۰ درصد ماده آلی تجزیه شده افزایش داد ($P < 0/01$). ارتباط بسیار نزدیکی بین گاز تولیدی و تخمیر ماده آلی خصوصاً کربوهیدرات ها وجود دارد [۱۳]. لذا افزایش قابل توجه تجزیه ماده آلی تجزیه در افزایش گاز تولیدی قابل مشاهده است (جدول های ۲ و ۳). عصاره استنی به طور قابل توجهی مؤثرتر از عصاره اتانولی است که می تواند ناشی از توانایی این عصاره در استخراج همه ماده مؤثر قطبی و غیرقطبی دانست [۲۰]. ماده آلی تجزیه شده در عصاره استنی در سطوح ۵۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر به ترتیب ۷/۹، ۵/۹ و ۹/۱ میلی گرم بیشتر از عصاره اتانولی است. مشابه با نتایج تحقیق حاضر، استفاده از گیاه حاوی ساپونین و ترکیبات قندی تجزیه پذیری ماده آلی را افزایش داده است [۱۵ و ۱۸]، هرچند استفاده از گیاه ساپوناریا (بومی آمریکا) در روش برون تنی و عصاره گل گاوزبان (حاوی ساپونین و کربوهیدرات) تأثیری بر قابلیت هضم ماده آلی نداشته است [۲ و ۱۵].

اگرچه در هر دو نوع عصاره، غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم در لیتر) در دامنه غلظت طبیعی (۳۰۰-۸۵

تولیدات دامی

تأثیر عصاره اتانولی و استنی ریشه شیرین بیان بر فراسنجه‌های تخمیر، متان و جمعیت پروتوزوایی شکمبه بز

جدول ۳. تأثیر دو نوع عصاره اتانولی و استنی ریشه شیرین بیان بر فراسنجه‌های تخمیر مایع شکمبه بز به روش پرونتی^۱

P	مقدار عددی	SEM	عصاره شیرین بیان				
			۵۰۰	۳۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰
۰/۰۰۱	۳/۰۰	۰/۱۵۴	فراسنجه‌های تخمیر				
			۸۴/۶ ^a	۷۶/۲ ^b	۷۸/۲ ^b	۶۹/۳ ^c	۶۴/۳ ^{cd}
۰/۰۰۱	۳/۰۰	۳/۰۰	نوع عصاره				
			۹۱/۵ ^b	۷۹/۶ ^b	۷۰/۶ ^c	۷۰/۷ ^c	۶۹/۷ ^c
۰/۰۰۱	۰/۹۳۳	۱/۳۴	ماده آلی تجزیه شده (میلی گرم به ازای ۲۰۰ میلی گرم)				
			۴۷/۰ ^a	۴۲/۳ ^{ab}	۴۳/۴ ^b	۳۵/۸ ^{cd}	۳۳/۵ ^d
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۳۴	ماده آلی تجزیه شده (درصد)				
			۵۶/۹ ^a	۴۶/۰ ^b	۴۰/۷ ^c	۳۸/۶ ^c	۳۳/۵ ^d
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۲۱	آمونیاک (میلی گرم در لیتر)				
			۳۰/۰	۲۴/۰	۲۳/۰	۲۷/۰	۲۷/۰
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۲۷	صرب بخش پذیری (PF)				
			۲۰/۳ ^c	۲۴/۷ ^{cd}	۲۳/۴ ^d	۲۸/۸ ^e	۲۷/۵ ^f
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	نوده میکروبی تولیدی (میلی گرم)				
			۲/۱۴ ^d	۲/۷۸ ^{cd}	۲/۴۱ ^c	۲/۶۱ ^b	۲/۹۰ ^a
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۱/۳۶۵	بازده تولید نوده میکروبی (درصد)				
			۰/۲۸	۰/۱۹۲	۰/۱۶۱	۰/۱۲۴	۰/۱۰۰

۱ - مقایسات ردیفی مربوط به تیمارها و مقایسات ستونی مربوط به دو نوع عصاره می‌باشد.

Sig: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ردیف معنی دار است ($P < 0.01$). مقادیر کمتر از ۰/۰۵ بیانگر وجود تفاوت معنی دار بین دو عصاره اتانولی و استنی است.

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

جدول ۴. تأثیر دو نوع عصاره اتانولی و استنی ریشه شیرین بیان بر فراسنجه‌های انرژی و منابع آن در شکمبه بز به روش پروتئینی

SEM	عصاره شیرین بیان					نوع عصاره	فراسنجه‌های تخمیر
	مقدار عددی P	۵۰۰	۳۰۰	۲۰۰	۱۰۰		
۰/۰۰۱	۱/۵۳	۱۰۵/۰ ^c	۱۱۳/۴ ^{b,c}	۱۱۸/۸ ^b	۱۲۳/۰ ^{ab}	۱۳۱/۴ ^a	۶۶/۰ ^d
۰/۰۰۱	۴/۳۶	۱۱۷/۸ ^b	۱۱۷/۰ ^b	۱۱۷/۳ ^b	۱۲۱/۹ ^{ab}	۱۳۵/۹ ^a	۶۷/۰ ^c
۰/۰۰۱	۰/۹۳۳	۷۹/۸ ^a	۶۷/۹ ^b	۷۰/۷ ^b	۵۸/۵ ^c	۵۱/۷ ^{cd}	۴۶/۱ ^d
۰/۰۰۱	۳/۱	۹۴/۸ ^a	۷۷/۳ ^b	۶۴/۳ ^c	۶۴/۸ ^c	۵۸/۹ ^c	۴۶/۱ ^d
۰/۰۰۱	۰/۱۴۳	۰/۰۰۴	۰/۰۱۵	۰/۰۲۳	۰/۳۴۶	۰/۱۷۱	۱/۰۰
۰/۰۰۱	۰/۱۸۹	۸۰/۰ ^a	۷/۰ ^b	۶/۴ ^c	۶/۴ ^c	۵/۸ ^c	۵/۰ ^d
۰/۰۰۱	۰/۱۶۱	۰/۰۰۴	۰/۰۱۵	۰/۰۲۲	۰/۳۴۶	۰/۱۷۱	۱/۰۰
۰/۰۰۱	۰/۱۶۱	۳/۷۹ ^a	۳/۸۸ ^b	۳/۳۳ ^b	۲/۶۹ ^c	۲/۳۳ ^{cd}	۲/۰ ^d
۰/۰۰۱	۰/۱۶۱	۴/۶ ^a	۳/۸ ^b	۳/۰ ^c	۳/۰ ^c	۲/۷ ^c	۲/۰ ^d
		۰/۰۰۴	۰/۰۱۵	۰/۰۲۳	۰/۳۵۰	۰/۱۷۱	۱/۰۰

۱ - مقایسات ردیفی مربوط به تیمارها و مقایسات ستونی مربوط به دو نوع عصاره می‌باشد.
 تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ردیف معنی دار است (P < ۰/۰۱). مقادیر کمتر از ۰/۰۵ بیانگر وجود تفاوت معنی دار بین دو عصاره اتانولی و استنونی است.

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

تأثیر عصاره اتانولی و استنی ریشه شیرین بیان بر فراسنجه‌های تخمیر، متان و جمعیت پروتوزوایی شکمبه بز

افزایش تولید گاز، غلظت اسیدهای چرب فرار نیز افزایش یافت ($P < 0/01$) (جدول ۴). استفاده از عصاره دو نوع گیاه سوبابل و بیدمجنون به روش برون‌تنی نیز سبب افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار شد است [۱۸]. اگرچه استفاده از سه گیاه غنی از ساپونین تأثیری بر غلظت اسیدهای چرب کل نداشته است [۱۵]. اسیدهای چرب فرار به عنوان منبع انرژی مورد استفاده میکروارگانیسم و دام زنده قرار می‌گیرد [۲۱]. همان‌طور که انتظار می‌رود با افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار، دو فراسنجه انرژی قابل سوخت‌وساز و انرژی شیردهی در هر دو نوع عصاره اتانولی و استنی شیرین بیان افزایش یافت ($P < 0/01$) (جدول ۴).

فراسنجه‌های اسیدهای چرب فرار، انرژی قابل سوخت‌وساز و انرژی خالص شیردهی در سطوح ۵۰ و ۱۰۰ تفاوتی با هم نداشتند، ولی در دو سطح ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر عصاره استنی، فراسنجه‌های مذکور بیشتر از عصاره اتانولی بودند ($P < 0/05$). جمعیت کل پروتوزوآ به‌غیر از سطح ۵۰ میکرولیتر تحت تأثیر هر دو نوع عصاره اتانولی ($P < 0/05$) و استنی ($P < 0/01$) کاهش یافت (جدول ۵).

برخلاف بررسی حاضر، استفاده از عصاره حاوی ساپونین دو گیاه سوبابل و بیدمجنون به روش برون‌تنی [۱۸] و ساپونین چای [۱۶] به روش برون‌تنی مایع شکمبه گوسفند و ساپونین چای در گوسفندان نژاد هوو [۲۹] سبب بهبود راندمان سنتز پروتئین میکروبی شده است.

اسیدهای چرب فرار هر دو عصاره به روش اندازه‌گیری دستگاه مارخام در دامنه مطلوب غلظت اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه (۷۰-۱۵۰ میلی‌مول بر لیتر) بود [۲۱]، ولی به روش برآورد با معادله، به‌غیر از سطوح ۳۳۰ و ۵۰۰ میکرولیتر، کمتر از حد مطلوب بود. در هر دو روش اندازه‌گیری و برآورد اسیدهای چرب فرار کل، همراه با افزایش سطح عصاره شیرین بیان، غلظت اسیدهای چرب فرار افزایش یافت ($P < 0/01$). افزایش اسیدهای چرب فرار دقیقاً همسو با افزایش تجزیه‌پذیری ماده آلی است. محصول فرایند تخمیر سوبسترا و کربوهیدرات‌های آن با مایع شکمبه به روش برون‌تنی، اسیدهای چرب فرار، گاز و سلول‌های میکروبی است [۱۳]. تولید گاز نتیجه تخمیر کربوهیدرات‌ها به استات، پروپیونات و بوتیرات است [۱۳]. در این آزمایش با

جدول ۵. تأثیر عصاره اتانولی و استنی ریشه شیرین بیان بر جمعیت پروتوزوایی ($N \times 10^5$) شکمبه بز^۱

مقدار عددی	SEM	عصاره شیرین بیان (میکرولیتر به ازای هر ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه بافری)						نوع عصاره	پروتوزوآ
		۵۰۰	۳۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	شاهد		
۰/۰۲۶	۰/۰۶۴۹	۲/۰۹۷ ^b	۲/۱۶۷ ^b	۲/۲۶۴ ^b	۲/۲۶۴ ^b	۲/۸۰۵ ^a	۲/۸۶۱ ^a	اتانولی	
۰/۰۰۱	۰/۰۶۳۶	۱/۹۳۱ ^c	۱/۹۳۱ ^c	۲/۲۱۷ ^b	۲/۴۸۶ ^{ab}	۲/۴۷۴ ^{ab}	۲/۸۶۱ ^a	استنی	کل پروتوزوآ
		۰/۰۲۹	۰/۰۰۱	۰/۲۶۵	۰/۲۵۴	۰/۰۰۱	۱/۰۰	Sig	
۰/۰۴۸	۰/۰۶۱۴	۲/۰۸۳ ^b	۲/۱۶۷ ^b	۲/۲۳۶ ^b	۲/۱۹۴ ^b	۲/۷۶۳ ^a	۲/۷۲۲ ^a	اتانولی	
۰/۰۰۱	۰/۰۶۰۹	۱/۸۴۷ ^c	۱/۸۸۹ ^c	۲/۱۸۸ ^b	۲/۴۰۳ ^{ab}	۲/۴۷۴ ^{ab}	۲/۷۲۲ ^a	استنی	انتودینینه
		۰/۰۶۷	۰/۰۰۱	۰/۲۴۶	۰/۱۱۳	۰/۰۰۱	۱/۰۰	Sig	

تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

جدول ۵. تأثیر عصاره اتانولی و استنی ریشه شیرین بیان بر جمعیت پروتوزوایی ($N \times 10^5$) شکمبه بز^۱

مقدار عددی	SEM	عصاره شیرین بیان (میکرولیتر به ازای هر ۳۰ میلی لیتر مایع شکمبه بافری)						نوع عصاره	پروتوزوا
		۵۰۰	۳۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	شاهد		
۰/۲۰۳	۰/۰۰۶۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۲۸	۰/۰۴۲	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	اتانولی	
۰/۵۹۷	۰/۰۰۵۷	۰/۰۲۸	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۰۱	۰/۰۱۴	استنی	دیپلودینیانه
		۰/۱۵۶	۱/۰۰	۰/۵۶۲	۰/۳۲۴	۰/۰۸۳	۱/۰۰	Sig	
۰/۰۱۳	۰/۰۰۵۶	۰/۰۰۰ ^b	۰/۰۰۰ ^b	۰/۰۰۰ ^b	۰/۰۱۴ ^{ab}	۰/۰۱۴ ^{ab}	۰/۰۵۵ ^a	اتانولی	
۰/۰۵۰	۰/۰۰۶۱	۰/۰۱۴ ^{ab}	۰/۰۰۱ ^b	۰/۰۱۴ ^{ab}	۰/۰۱۴ ^{ab}	۰/۰۰۰ ^b	۰/۰۵۵ ^a	استنی	افریواسکالسینه
		۰/۳۲۱	۰/۳۲۱	۰/۳۲۱	۰/۳۲۴	۰/۳۲۴	۱/۰۰	Sig	
۰/۰۴۱	۰/۰۰۶۴	۰/۰۱۴ ^b	۰/۰۰۰ ^b	۰/۰۰۰ ^b	۰/۰۱۴ ^b	۰/۰۱۴ ^b	۰/۰۶۹ ^a	اتانولی	
۰/۰۲۲	۰/۰۰۹۰	۰/۰۴۲ ^{ab}	۰/۰۲۷ ^{ab}	۰/۰۰۱۴ ^b	۰/۰۵۵ ^{ab}	۰/۰۰۱ ^b	۰/۰۶۹ ^a	استنی	ایزوتریشیده
		۰/۳۱۰	۰/۵۶۲	۱/۰۰	۰/۱۰۳	۰/۳۴	۱/۰۰	Sig	

۱ - مقایسات ردیفی مربوط به تیمارها و مقایسات ستونی مربوط به دو نوع عصاره می باشد.
a-d: تفاوت میانگین ها با حروف متفاوت در هر ردیف معنی دار است ($P < 0/01$).
Sig: مقادیر کمتر از ۰/۰۵ بیانگر وجود تفاوت معنی دار بین دو عصاره اتانولی و استنی است.

عصاره های اتانولی و استنی ریشه شیرین بیان در شرایط آزمایشگاه، تولید گاز کل، تجزیه پذیری ماده آلی و انرژی قابل متابولیسم را افزایش و تولید کاهش گازهای دی اکسید کربن و متان در مایع شکمبه بز کاهش می دهد. عصاره استنی نتایج بهتری از اتانولی دارد و لذا مطالعه آن در دام زنده توصیه می شود.

منابع

۱. علوم ح و حسیبی ن (۱۳۹۱) بررسی محتوای متابولیت های ثانویه ریشه گیاه شیرین بیان در برخی رویشگاه های طبیعی استان کرمان. گیاهان دارویی. ۹(۲): ۱۴۴-۱۳۷.
۲. نوریان سرور م ا و روزبهان ی (۱۳۹۱) تأثیر عصاره گل گاوزبان بر تخمیر شکمبه ای، جمعیت پروتوزوایی و کاهش تولید گاز متان به روش برون تنی. علوم دامی ایران. ۴۳(۲): ۲۹۶-۲۸۷.

در سطوح بالای عصاره تا حدودی تأثیر عصاره استنی بیشتر از اتانولی بود. در بین جمعیت پروتوزوایی شکمبه بز، زیر خانواده های اتودینیته و افریواسکلوسینه و خانواده ایزوتریشیدا نیز کاهش یافتند. فعالیت میکروبی شکمبه ممکن است تحت تأثیر ساپونین ها و سایر متابولیت های ثانویه افزودنی ها قرار بگیرد. سلول پروتوزوا به ساپونین حساس است و غشای سلولی آن دچار تغییر شده [۶] و پروتوزوا می میرد. افزودن ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی گرم ساپونین چای به مایع شکمبه به روش برون تنی، به ترتیب سبب کاهش ۱۹، ۲۵، ۴۵ و ۷۹ درصدی جمعیت پروتوزوا شده است [۱۶]. همچنین، ساپونین چای در گوسفندان نژاد هو، سبب کاهش جمعیت پروتوزوایی شد [۲۹]، اگرچه استفاده از عصاره دو نوع گیاه یوکا و ساپوناریا غنی از ساپونین تأثیری بر جمعیت پروتوزوایی مایع شکمبه نداشته است [۲۶].
باتوجه به نتایج حاصل، سطوح ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر

تولیدات دامی

3. Abas I, Ozpinar H, Can-Kutay H and Kahraman R (2005) Determination of the metabolizable energy (ME) and net energy actation (NEL) contents of some feeds in the marmara region by *in vitro* gas technique. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science. 29: 751-757.
4. AOAC (1995) Official method of analysis, Animal Feeds, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Virginia. USA. Pp. 1-18.
5. Barnett AJG and Reid RL (1957) Studies on the production of volatile fatty acids from grass by rumen liquor in an artificial rumen. I. The volatile fatty acid Production of fresh grass. Journal of Agriculture Science. 48: 315-321.
6. Benchaar C and Greathead H (2011) Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. Animal Feed Science and Technology. 166-167(1): 338-355.
7. Broderick GA and Kang JH (1980) Automated simultaneous determinations of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. Journal of Dairy Science. 63: 64-75.
8. 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.
9. Dehority BA (2003) Rumen Microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
10. Esmaeili S, Naghibi F, Mosaddegh M and Nazli N (2006) Determination of 18 β -Glycyrrhetic Acid in *Glycyrrhiza glabra* L. Extract by HPLC. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2: 137-141.
11. Fievez V, Babayemi OJ and Demeyer D (2005) Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. Animal Feed Science Technology. 123-124 (1): 197-210.
12. Gee JM, Wal JM, Miller K, Atkinson H, Grigoriadou F, Wijnands MVW, Penniks AH, Wortley G and Johnson IT (1996) Effect of Saponin on the transmucosal passage of β -lacto-globulin across the proximal small Intestine of Normal and β -lacto-globulin-sentized Rats. Toxicology. 117: 219-228.
13. Getachew G, Blümmel M, Makkar HPS and Becker K (1998) *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. Animal Feed Science and Technology. 72: 261-281.
14. Hess HD, Beuret RA, Lotscher M, Hindrichsen IK, Machmu"ller A, Carulla JE, Lascano CE and Kreuzer M (2004) Ruminant fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with sapindus saponaria fruits and cratylia argentea foliage. Animal Science. 79: 177-189.
15. Hess HD, Kreuzer M, Diaz TE, Lascano CE, Carulla JE, Soliva CR and Machmuller A (2003) Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. Animal Feed Science and Technology. 109: 79-94.
16. 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.
17. 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.
18. 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. Livestock Science. 136: 192-200.

19. Kleiber M, Cole HH and Mead SW (1943) Bloat in cattle and composition of rumen Gases. Journal of dairy Science. 26(10): 929-933.
20. Makkar HPS (2010) *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis (pp. 106-144). In: *In vitro* Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional.
21. McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA and Wilkinson RG (2010) Animal nutrition. 7th edition. Oliver and Boyd publishers (UK). Pp. 692.
22. Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D and Schneider W (1979) The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. Journal of Agricultural Science. (Camb.) 92: 217-222.
23. Morgavi DP, Forano E, Martin C and Newbold CJ (2010) Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. Animal. 4(7): 1024-1036.
24. Newbold CJ, McIntosh FM, Williams P, Losa R and Wallace RJ (2004) Effects of specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. Animal Feed Science Technology. 114: 105-112.
25. Pell AN and Schofield P (1993) Computerised monitoring of gas production to measure forage digestion. Journal of Dairy Science. 76: 1063-1073.
26. Pen B, Sar C, Mwenya B, Kuwaki K, Morikawa R and Takahashi J (2006) Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. Animal Feed Science Technology. 129: 175-186.
27. Tekeli AL, Çelik H and Kutlu R (2007) Plant Extracts; a new rumen moderator in ruminant diets. Journal of Tekirdag Agricultural Faculty. 4: 71-79.
28. Valdez FR, Bush LJ, Goetsch AL and Owens FN (1986) Effect of steroidal saponins on ruminal fermentation and on production of lactating cows. Journal of Dairy Science. 69: 1568-1575.
29. Zhou YY, Mao HL, Jiang F, Wang JK, Liua JX and McSweeney CS (2011) Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. Animal Feed Science and Technology. 166-167(1): 93-100.