Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

Comparative Effects of Conventional and Nanoliposomal licorice (*Glycyrrhiza glabra*) Extract Supplementation on Rumen Fermentation Parameters under Experimentally Induced Acidosis *in vitro*

Milad Maghsoudi Parsa[1], Ghader Jalilzadeh[2]*, Bahram Dalir-Naghadeh[3], Ehsan Anasori[4], Behzad Asadnezhad[5], Masoud Ahmadnejad[6]

[1,2,4] Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, Email: g.jalilzadeh@urmia.ac.ir
[3] Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran
[5] Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
[6] Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 04/12/2025
Revised: 27/02/2026
Accepted: 17/05/2026

Keywords:
Cattle
Methane
Nanoliposome
Licorice
Rumen acidosis

ABSTRACT

Background and Objective: Rumen acidosis is one of the most important nutritional disorders in ruminants, characterized by a decline in ruminal pH, epithelial damage, disruption of fermentative pathways, reduced nutrient absorption, and an increas methane emissions. Subacute ruminal acidosis (SARA) is highly prevalent in dairy and feedlot cattle and results in significant economic losses due to reduced milk yield, poor growth performance, veterinary costs, and energy lost through inefficient fermentation. With increasing restrictions on the use of antibiotic feed additives, plant-based additives such as *Glycyrrhiza glabra* (licorice) have gained attention due to their antimicrobial, anti-inflammatory, and fermentation-modulating properties. However, many plant extracts have limitations such as low solubility, instability, and poor bioavailability. Nanoliposome technology offers a promising strategy to improve stability, controlled release, and bioefficacy of bioactive compounds. This study aimed to evaluate the effects of free and nanoliposome-encapsulated licorice extract on ruminal fermentation parameters, methane production, protozoal population, and pH stabilization under normal and acidosis-induced conditions.

Materials and Methods: This *in vitro* study was conducted using rumen fluid collected from fistulated Holstein bulls. Nanoliposomes were synthesized via thin-film hydration and loaded with standardized commercial licorice extract containing 19–24% glycyrrhizin. The basal diet with a forage-to-concentrate ratio of 70:30 was used, with three treatments: basal diet alone, basal diet plus free licorice extract, and basal diet plus nanoliposome-encapsulated extract. Buffered rumen fluid was incubated at 39 °C under continuous CO_2. Gas production was recorded at multiple intervals up to 120 h. After 24 h of incubation, ruminal pH, protozoal counts, volatile fatty acids (VFA), methane production, digestibility, fermentable organic matter, and metabolizable energy were measured. An acidosis challenge test was performed by adding dextrose to induce rapid fermentation. Data were analyzed using the mixed model procedure of SAS and Tukey's

test for mean comparison.

Findings: Nanoliposomes exhibited a uniform spherical morphology with a hydrodynamic diameter of 122.2 nm and a low PDI (0.013), indicating high stability and homogeneity. Both free and nanoliposome licorice extract reduced lag time and increased early-stage fermentation rate, while decreasing gas production during late fermentation (48–120 h). Treatments increased butyrate concentration while decreasing acetate and propionate, resulting in a lower total VFA concentration and reduced methane production. The nanoliposome treatment caused a greater reduction in protozoal population compared with free extract and maintained a significantly higher ruminal pH, particularly under acidosis-induced conditions. Ammonia-nitrogen concentrations and substrate degradability remained within optimal ranges, indicating no adverse effects on overall microbial activity. In the acidosis challenge, nanoliposome licorice extract more effectively prevented severe pH decline and showed superior buffering and stabilization capacity, while supporting adequate microbial fermentation.

Conclusion: Encapsulation of licorice extract in nanoliposomes enhanced its functionality in modulating rumen fermentation, reducing methane emission, lowering protozoal counts, and maintaining ruminal pH during acidosis. Controlled release and improved stability of the encapsulated extract provided more sustained biological effects compared with the free form. These findings suggest that nanoliposome-encapsulated licorice extract can serve as an effective natural additive for mitigating SARA, improving nutrient utilization, enhancing environmental sustainability, and potentially reducing reliance on antibiotic feed additives in ruminant nutrition.

Cite this article: Maghsoudi Parsa, M., Jalilzadeh, Gh., Dalir-Naghadeh, B., Anasori, E., Asadnezhad, B., Ahmadjad, M. (2026). Comparative Effects of Conventional and Nanoliposomal licorice (*Glycyrrhiza glabra*) Extract Supplementation on Rumen Fermentation Parameters under Experimentally Induced Acidosis *in vitro*. *Journal of Ruminant Research*, 14(2), 89-109.

© The Author(s)
10.22069/ejrr.2026.24350.2033
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش در نشخوارکنندگان
شاپا چاپی: ۴۲۶۱-۲۳۴۵
شاپا الکترونیکی: ۴۲۵۳-۲۳۴۵

بررسی مقایسه‌ای تأثیر افزودن عصاره معمولی و نانولیپوزومال شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) بر فراسنجه‌های شکمبه‌ای در شرایط القای اسیدوز آزمایشگاهی

میلاد مقصودی پارسا[۱]، قادر جلیل‌زاده[۲*]، بهرام دلیرنقده[۳]، احسان عناصری[۴]، بهزاد اسدنژاد[۵]، مسعود احمدنژاد[۶]

[۴،۱،۲] به‌ترتیب دانشجوی دوره دکتری تخصصی داخلی بزرگ، دانشیار، استاد و دانشیار گروه بیماری‌های درونی و کلینیکال پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، رایانامه: g.jalilzadeh@urmia.ac.ir

[۳] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

[۵] پژوهشگر دوره پسادکترای تغذیه دام گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

[۶] استادیار گروه علوم بالینی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۹/۱۴
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۱۲/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۱۲/۲۶

واژه‌های کلیدی:
اسیدوز شکمبه
شیرین بیان
گاو شیری
متان
نانولیپوزوم

چکیده

سابقه و هدف: اسیدوز شکمبه یکی از اختلالات تغذیه‌ای شایع در نشخوارکنندگان است که با کاهش pH شکمبه، آسیب اپیتلیوم، کاهش عملکرد هضم و جذب مواد مغذی و افزایش تولید متان همراه بوده و پیامدهای اقتصادی و زیست‌محیطی قابل‌توجهی ایجاد می‌کند. به‌ویژه اسیدوز تحت حاد (Subacute ruminal acidosis, SARA) در گاوهای شیری و پرواری شایع بوده و موجب کاهش تولید شیر، رشد ضعیف، افزایش هزینه‌های درمان و اتلاف انرژی خوراک می‌شود. استفاده از افزودنی‌های خوراکی گیاهی مانند عصاره شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) به دلیل خواص ضدالتهابی، ضدمیکروبی و توانایی کاهش تولید متان، به‌عنوان جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل SARA مطرح است. هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره خالص و نانولیپوزومال شیرین‌بیان بر شاخص‌های تخمیری شکمبه، پیشگیری از اسیدوز القاشده در شرایط آزمایشگاهی و کاهش تولید گازهای گلخانه‌ای بود.

مواد و روش‌ها: مطالعه به‌صورت آزمایشگاهی روی مایع شکمبه گاوهای نر هلشتاین فیستوله‌دار انجام شد. نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره شیرین‌بیان با روش هیدراتاسیون لایه نازک سنتز شدند. جیره پایه با نسبت علوفه به کنسانتره ۷۰:۳۰ تنظیم و سه تیمار شامل جیره پایه، جیره به همراه عصاره خالص و جیره به همراه نانولیپوزوم عصاره در نظر گرفته شد. مایع شکمبه با بزاق مصنوعی مخلوط و تحت جریان CO_2 در شرایط ۳۹ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری(انکوبه) شد. تولید گاز در زمان‌های مختلف، pH، جمعیت پروتوزوآ، اسیدهای چرب فرار (Volatile fatty acids, VFA)، میزان تولید گاز متان، انرژی متابولیسمی و تجزیه‌پذیری خوراک پس از ۲۴ ساعت تعیین شدند. همچنین آزمون اسیدوز القایی با تزریق دکستروز به نمونه‌های شکمبه انجام شد. داده‌ها با مدل‌های مختلط در نرم‌افزار SAS و آزمون توکی تحلیل شدند.

یافته‌ها: نانولیپوزوم‌ها دارای ذرات یکنواخت با قطر هیدرودینامیکی ۱۲۲/۲ نانومتر و PDI برابر

با ۰/۰۱۳ بودند و SEM اشکال کروی پایدار نشان داد. هر دو تیمار عصاره خالص و نانولیپوزومال موجب کاهش زمان تأخیر تخمیر (Lag time) و افزایش نرخ تولید گاز در ساعات اولیه شدند، درحالی‌که در ساعات دیررس (۴۸ تا ۱۲۰ ساعت) تولید گاز کاهش یافت (P<۰/۰۵). استفاده از عصاره‌ها موجب افزایش بوتیرات و کاهش استات و پروپیونات، کاهش کل VFA و کاهش تولید متان شد (P<۰/۰۵). جمعیت پروتوزوآها در تیمار نانولیپوزومال کاهش بیشتری نشان داد و pH شکمبه بالاتر از عصاره خالص حفظ شد (P<۰/۰۵). همچنین ازت آمونیاکی و تجزیه‌پذیری خوراک در محدوده مطلوب باقی ماند. در شرایط اسیدوز القایی، تیمار نانولیپوزومال توانست pH را در سطح بالاتر حفظ کرده و شدت اسیدوز را کاهش دهد، درحالی‌که تولید گاز همچنان امکان فعالیت میکروبی مطلوب را نشان داد (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره شیرین‌بیان، به‌ویژه در فرم نانولیپوزومال، می‌تواند مسیر تخمیر شکمبه را به سمت الگوی پایدارتر هدایت کرده، تولید گاز و متان را کاهش دهد، جمعیت پروتوزوآ را تعدیل کند و pH شکمبه را در شرایط اسیدوز حفظ نماید. فناوری نانولیپوزوم با افزایش پایداری و رهایش آهسته ترکیبات فعال، اثر طولانی‌مدت و کارآمدتری نسبت به عصاره خالص ارائه می‌دهد و می‌تواند به‌عنوان ابزار مؤثری در مدیریت اسیدوز تحت حاد و بهبود بهره‌وری تغذیه‌ای و زیست‌محیطی نشخوارکنندگان مورداستفاده قرار گیرد.

استناد: مقصودی پارسا، میلاد؛ جلیل‌زاده، قادر؛ دلیرنقده، بهرام؛ عناصری، احسان؛ اسدنژاد، بهزاد؛ احمدنژاد، مسعود. (۱۴۰۵). بررسی مقایسه‌ای تأثیر افزودن عصاره معمولی و نانولیپوزومال شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) بر فراسنجه‌های شکمبه‌ای در شرایط القای اسیدوز آزمایشگاهی. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۴(۲)، ۱۰۹-۸۹.

10.22069/ejrr.2026.24350.2033

© نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

اسیدوز شکمبه یکی از مهم‌ترین اختلالات تغذیه‌ای نشخوارکنندگان است که با کاهش اشتها، آسیب اپیتلیوم شکمبه، آبسه کبدی، لامینایتیس (لنگش) و پاسخ‌های التهابی همراه بوده و اثرات اقتصادی پنهان (قابل‌توجه) علاوه بر هزینه بیماری اسیدوز بر دامداری‌ها دارد. تولید بیش‌ازحد اسیدهای آلی در شکمبه، pH را کاهش داده و موجب اختلال در عملکرد و پاراکراتوزیس یا هایپرکراتوزیس پرزهای شکمبه می‌شود که درنهایت با کاهش سطح جذب کارایی هضم و جذب مواد مغذی را کاهش می‌دهد (González و همکاران، ۲۰۱۲; Voulgarakis و همکاران ۲۰۲۳a). اسیدوز تحت حاد (SARA) ۱۰ تا ۲۶ درصد از گاوان شیری را در اویل دوره شیرواری می‌تواند تحت تأثیر قرار دهد که با توجه به کاهش تولید شیر، درمان، مرگ‌ومیر ناشی از عوارض SARA، رشد ضعیف، حذف اجباری خسارت قابل‌توجهی بر صنعت دامداری تحمیل می‌کند (Golder و Lean، ۲۰۲٤Streitenberger ; و همکاران، ۲۰۲۵). اسیدوز حاد بیشتر مواقع تصادفی و تک‌گیر بوده اما SARA در گاوان شیری از لحظه زایش تا ۵ ماه اول و گاوان پرواری را تا لحظه کشتار می‌تواند درگیر کند هزینه این درگیری در آمریکا سالانه ۵۰۰ تا یک میلیارد دلار و ۱/۱۲ دلار به ازای هر رأس در هر روز برای گاوان شیری و ۹/٤ دلار برای کاهش وزن در گاوان پرواری به اضافه ۱۳ دلار برای اتلاف انرژی و جیره برآورد شده است. میزان مرگ‌ومیر ناشی از اسیدوز حاد در گاوان پرواری ۳ درصد تا ۷ درصد بوده است (Voulgarakis و همکاران، ۲۰۲۳a). اسیدوز مزمن یا تحت حاد ازنظر اقتصادی جنبه مهم‌تری است که در آن حیوانات ممکن است بیمار به نظر نرسند، اما مصرف خوراک و عملکرد آن‌ها کاهش می‌یابد درنتیجه هزینه پنهان خواهد داشت. FAO[1] در سال ۲۰۰٦ پیش‌بینی کرد که جمعیت جهان تا سال ۲۰۷۵ به ۹/۲ میلیارد نفر می‌رسد؛ بنابراین، برای تأمین پایدار غذای این جمعیت با فناوری‌های فعلی دشوار خواهد بود؛ بنابراین کشاورزی باید برافزایش بهره‌وری تمرکز بیشتری داشته باشد (Crosson و همکاران، ۲۰۱۱). یکی از ساده‌ترین و ابتدایی‌ترین روش‌هایی که بشر از زمان پیدایش دامپروری متمرکز برای عملکرد بهتر دست‌کاری ترکیبات جیره و افزودنی‌ها بوده است. افزایش نسبت کنسانتره در جیره نشخوارکنندگان یکی از روش‌های رایج برای ارتقای تولید است، اما به دلیل تخمیر سریع نشاسته، احتمال بروز اسیدوز شکمبه‌ای افزایش می‌یابد. در جیره اسیدوزی، تخمیر سریع منجر به کاهش pH و اسیدوز می‌شود. درنتیجه دامپزشکان و مسئولین تغذیه واحدهای دامپروری با افزایش بهره‌وری و تولید واحد با ضررهای اقتصادی بیماری‌های همراه آن (بیماری‌های متابولیکی و بیماری‌های تولید) دچار چالش هستند (Nikkhah و همکاران، ۲۰۲۱). یکی دیگر از روش‌های بهبود عملکرد استفاده افزودنی‌ها خوراکی است در دهه‌های قبل از آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند مونزین، لازالوسید و... جهت تعدیل تخمیر شکمبه و کنترل بیماری اسیدوز تحت حاد شکمبه (SARA) و حتی بهبود دهنده رشد استفاده می‌شد (Simanungkalitو همکاران، ۲۰۲۳)؛ اما بعد از سال ۲۰۰٦ در بسیاری از کشورها استفاده از آن‌ها به دلیل ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تهدید سلامت عمومی ممنوع شد بنابراین محققان دنبال ترکیباتی بودند که علاوه بر خاصیت تعدیل‌کنندگی تخمیر این اثرات سو را نداشته باشد (Benchaar و همکاران، ۲۰۰۸؛ Shakeriو Shahraki Forozandeh، ۲۰۲۵؛ Benchaarو Greathead، ۲۰۱۱؛ Voulgarakisو

[1] Food and Agriculture Organization

همکاران، ۲۰۲۳b). افزودنی‌هـایی ماننـد شـیرین‌بیـان (*Glycyrrhiza glabra*) با ترکیباتی مانند گلیسیریزین، ساپونین‌ها و ایزوفلاون‌ها، می‌توانند تخمیـر را تعـدیل کنند، تولید متان را کاهش دهنـد. اسـیدوز شـکمبه بـا کاهش pH و افزایش LPS باعث التهاب شـکمبه هـم مـی‌شـود کـه شـیرین‌بیـان بـا خـواص ضـدالتهابی و ضدمیکروبی، مـی‌توانـد ایـن شـرایط را تعـدیل کنـد (Crossonو همکـاران، ۲۰۱۱؛ El-Saber Batiha و همکاران، ۲۰۲۰؛ Hasan و همکاران، ۲۰۲۱؛Murray ، ۲۰۲۰). پیش‌بینی‌شده میانگین دمای کره زمین تا سـال ۲۱۰۰ حـدود ۱/۸ تـا ۳/۹ سـانتی‌گـراد افـزایش پیـدا مـی‌کنـد (Prasadو همکـاران، ۲۰۱۵). همچنـین از افزودنـی‌هـای خـوراکی در کـاهش تولیـد گازهـای گلخانه‌ای (GHG) تخمیر شکمبه بهره گرفته می‌شـود. یک گاو سالانه به‌طـور متوسـط ۷۰ تـا ۱۲۰ کیلـوگرم متان تولید می‌کند (Swainو همکاران، ۲۰۱٦). تولیـد متان در شکمبه همانند سینک هیدروژن[1] عمل می‌کنـد و به‌طوری‌که برای تولید ٤/۵ گـرم متـان حـدود ۱۰۰ گرم کربوهیدرات اتلاف می‌شود. کـاهش تولیـد متـان عـلاوه بـر اسـتراتژی جلـوگیری از گرمـایش جهـانی درعین‌حـال موجـب کـاهش اتـلاف انـرژی و بهبـود کارایی استفاده از مواد مغذی در نشخوارکنندگان مـی‌شـود (Patra،۲۰۱۱؛ Patra و Yu، ۲۰۱۲؛ Reddyو Hyder،۲۰۲۳). با وجود نقش گسترده گیاهان دارویـی و مشتقات آن‌ها در تولید داروهـای مـؤثر، بسـیاری از این ترکیبات با محدودیت‌هایی همچون حلالیـت کـم در محیط‌های آبی، ناپایداری شیمیایی، فراهمی زیستی ناکـافی، توزیـع غیراختصاصـی در بافـت‌هـا، بـروز عوارض به دلیل سمیت ناخواسته، تخریـب سـریع در دستگاه گـوارش و دسترسـی زیسـتی پـایین روبـه‌رو هسـتند (Chengو همکـاران، ۲۰۲۲؛ Sogut و همکـاران، ۲۰۲۱). نـانولیپوزوم‌هـا بـه‌عنـوان یکـی از کارآمدترین فناوری‌های نوین دارورسانی، بـا افـزایش پایـداری، بهبـود انحـلال‌پـذیری و کنتـرل رهـایش ترکیبـات گیـاهی، راهکـاری مـؤثر بـرای رفـع محدودیت‌های سیستم‌هـای سـنتی دارورسـانی ارائـه می‌کنند. استفاده از لیپوزوم‌ها موجب افزایش حلالیت، پایداری و فراهمـی زیسـتی ترکیبـات شـده و امکـان دارورسانی هدفمند به بافت‌هـای مـوردنظر را فـراهم مـی‌سـازد (Chenو همکـاران، ۲۰۲٤؛ Mujawar و Sankpal، ۲۰۲۵). علی‌رغم مطالعات متعـدد در زمینـه عصاره‌ها در جیـره و گونـه‌هـای متفـاوت اسـتفاده از فناوری نانو گزارش نشده است. هدف مطالعه حاضـر مقایسه اثر عصاره معمولی و نانولیپوزومال شیرین بیان بر فراسنجه‌های شکمبه گاو در شرایط القـای اسـیدوز آزمایشگاهی می‌باشد. ارزیابی تأثیر نـانولیپوزوم‌کـردن عصاره شیرین بیان بـر مقـدار و سـرعت اثـر بخشـی عصاره در شرایط القاشده اسیدوز تحت حـاد شـکمبه (SARA) در آزمایشـــگاه و نیـــز کارکردهـــای زیست‌محیطی و افـزایش بهـره‌وری ناشـی از عصـاره شیرین بیان از اهداف مطالعه حاضر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در مزرعه تحقیقاتی و آزمایشگاه علـوم تغذیه دام گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه انجام شـد. نانولیپوزوم حاوی عصـاره از شـرکت گنجـین دانـش حـامی بـا استانداردسـازی وجـود ۱۹ تـا ۲٤ درصـد گلیســریزین تهیــه شــد و نــانولیپوزوم‌هــا بــا روش هیدراتاسیون لایه نـازک سـنتز شـدند. عصـاره ریشـه شیرین‌بیان تجاری (تولیدشده در شـرکت شـیرین‌بیـان زاگرس) با استانداردسـازی وجـود ۱۹ تـا ۲٤ درصـد گلیسریزین استفاده‌شده اسـت. جیـره پایـه بـا نسـبت علوفه به کنسانتره ۷۰:۳۰ برای گاوهای پرواری تنظـیم شد این نسبت بـرای ایجـاد یـک مـدل آزمایشـگاهی اسیدوز با درجه متوسط انتخاب‌شده و لزومـاً نماینـده

[1] hydrogen sink

جیره معمول گاو شیری پرتولید نیست و تیمارها شامل جیره پایه، جیره پایه به همراه ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره شیرین‌بیان خالص و جیره پایه به همراه ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره نانولیپوزومال بودند. برای تهیه مایع شکمبه، مایع شکمبه‌ها از سه رأس گاو نر هلشتاین فیستوله‌دار پیش از وعده صبح جمع‌آوری و در فلاسک حاوی CO_2 به‌سرعت به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌های سه گاو پس از اختلاط یکنواخت و از پارچه چهارلایه صاف شدند و با بافر حاوی ماکرومینرال، میکرومینرال، احیاکننده و ریسازورین بر اساس روش منک (Menkeو همکاران، ۱۹۷۹) روش اصلاح‌شده منک و استینگز (Menke و Steingass، ۱۹۸۸) به نسبت یک‌سوم مایع شکمبه و دوسوم بزاق مصنوعی مخلوط شدند. مخلوط تهیه‌شده تحت جریان مداوم CO_2 در بالن سه‌دهنه و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد تا زمان انتقال به شیشه های آزمایش نگهداری شد. برای ارزیابی میزان تولید گاز در شیشه‌های انکوباسیون ۵۰۰ میلی‌گرمی از هر گروه تیمار آسیاب شده (Tagliapietraو همکاران، ۲۰۱۱) به اضافه عصاره موردمطالعه به همراه ۵۰ میلی‌لیتر از مخلوط شیرابه و بافر مخلوط شده قبلی تحت گاز CO_2 در شیشه‌های مخصوص ۱۲۵ میلی‌لیتری ریخته با درپوش پلمپ شدند و در دمای ۳۹ درجه سلسیوس هر ۱ ساعت تکان داده شد. با استفاده از فشارسنج دیجیتال (Theodorouو همکاران، ۱۹۹٤) در ساعات ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲٤، ٤۸، ۷۲، ۹٦ و ۱۲۰ ساعت قرائت شد. به‌منظور تصحیح مقدار گاز تولیدی توسط شیرابه شکمبه در شرایط یکسان نمونه‌های فاقد جیره و عصاره به‌عنوان بلانک قرار داده‌شده است. در هر زمان با رابطه (۱) رگرسیونی حجم و فشار گاز و رابطه زیر با نرم‌افزار SAS 9/4 مقدار گاز تولیدی محاسبه شد.

رابطه ۱

$$GP = A\,(1 - e^{-c\,(T-L)})$$

در این رابطه، GP: تولید تجمعی گاز در یک زمان مشخص برحسب میلی‌لیتر است، A: پتانسیل کل تولید گاز یا حداکثر مقدار گازی است که می‌تواند طی تخمیر تولید شود برحسب میلی‌لیتر، c: نرخ تولید گاز یا سرعت تخمیر در واحد ساعت[1]، T: زمان تخمیر برحسب ساعت و L: زمان تأخیر (Lag time) یا مدتی است که قبل از شروع واقعی تولید گاز طی می‌شود.

فراسنجه‌های شکمبه، همانند pH، جمعیت پروتوزوآ، میزان متان تولیدی، اسیدهای چرب فرار، قابلیت هضم ماده خشک، انرژی قابل متابولیسم و ماده‌آلی قابل تخمیر نمونه‌ها بعد از انکوباسیون ۲٤ ساعته مجزا در هنگام انجام آزمون تولید گاز تعیین شد. اندازه‌گیری فراسنجه‌ها شامل میزان متان تولیدی مطابق روش دیمییر(۱۹۸۸) با اضافه کردن سدیم هیدروکسید ۱ نرمال به فلاسک ۲٤ ساعت انکوبه شده و قرائت تفاضل فشار گاز بعد ۱ دقیقه، شمارش پروتوزوآ با لام نئوبار، رنگ‌آمیزی متیلن‌بلو و میکروسکوپ نوری، pH با pHمتر، اسیدهای چرب فرار با استفاده از کروماتوگرافی گازی مطابق روش اوتنستی و بارتلی(۱۹۷۱) و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از رابطه(۲) گتاچیو و همکاران (۲۰۰۲) انجام گرفت. محاسبات انرژی قابل متابولیسم و ماده‌آلی قابل تخمیر بر اساس روابط (۳ و ٤) روش منک و استینگز (۱۹۸۸) صورت گرفت.

رابطه ۲:

$$SCFA_{(mmol/L)} = 0.0222GP - 0.00425$$

SCFA: اسید چرب گوتاه زنجیر بر حسب میلی مول در لیتر، GP: تولید گاز برحسب میلی‌لیتر ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک، ۰/۰۰٤۲۵ عدد ثابت منفی

رابطه ۳:

$$ME_{(MJ/Kg\ DM)} = 1.06 + (0.157\times GP) + (0.084\times CP) + (0.22\times CF) - 0.081\times CA$$

ME: انرژی قابل متابولیسم (MJ/kg DM)، ۱/۰٦ ثابت معادله (بیانگر مقدار پایه انرژی متابولیسمی)، GP: مقدار تولید گاز برحسب (ml/500 mg DM) با ۰/۱۵۷ ضریب ثابت تولید گاز، CP: پروتئین خام برحسب درصد ماده خشک با ضریب ثابت ۰/۰۸٤، CF: فیبر خام برحسب درصد ماده خشک با ضریب ثابت ۰/۲۲، CA: خاکستر خام برحسب درصد ماده خشک با ضریب ثابت منفی ۰/۰۸۱

رابطه ٤:

$$DOM_{(\%)}=0.9991\times GP+0.0595\times CP+0.0181\times CA+9$$

DOM: درصد ماده‌آلی قابل هضم در شکمبه (درصد ماده خشک) / GP: حجم تجمعی تولید گاز برحسب (CP / ml/500 mg DM.): درصد پروتئین خام / CA: درصد خاکستر خام

میزان نیتروژن آمونیاکی با استفاده از معرف‌های فنتول و هیپوکلریت و با روش Broderick و Kang (۱۹۸۰) صورت گرفت. مقدار تجزیه‌پذیری برحسب درصد با وزن خالص کاغذ صافی به گرم و وزن کاغذ به همراه نمونه‌های ۲٤ ساعت انکوباسیون صاف‌شده و آون شده به گرم و وزن خالص نمونه به گرم با رابطه(۵) زیر به دست آمد.

رابطه:

$$\text{تجزیه‌پذیری}\ (\%)=\frac{(\text{وزن کاغذ صافی}(gr))-(\text{وزن نمونه و کاغذ صافی بعد آون}(gr))}{\text{وزن نمونه}(gr)}\times 100$$

جهت بررسی اثر عصاره‌ها بر اسیدوز شکمبه در شرایط آزمایشگاهی آزمونی را طراحی و با تزریق دکستروز به شیرابه شکمبه‌های داخل فلاسک‌ها باعث القا اسیدوز شکمبه شد. در این آزمایش القای اسیدوز، دکستروز با غلظت ۵ درصد (وزنی–حجمی) به محیط تخمیر افزوده شد تا از طریق افزایش سریع تخمیر قندها موجب افت pH و شبیه‌سازی شرایط اسیدوز شکمبه‌ای گردد. برای هر فلاسک حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه، ۱۰ میلی‌لیتر محلول دکستروز ۵ درصد تزریق شد.

معیار تأیید بروز اسیدوز، کاهش مقدار pH در محیط تخمیر طی ٦ ساعت نخست پس از تزریق دکستروز بود که با ثبات میزان pH در این بازه و کاهش فعالیت بافری مایع شکمبه همراه بود.

این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار شامل گروه شاهد، اسیدوز کنترل نشده، اسیدوز کنترل‌شده با ویرجینیامایسین، اسیدوز همراه با عصاره خالص و اسیدوز با عصاره نانولیپوزومال همانند شرایط انکوباسیون قبلی انجام و نتایج بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون مقادیر pH و مقدار گاز تولیدی همانند روش‌های بالا قرائت شدند.

برای سنجش تمامی پارامترها در سه دوره مجزا در روزهای متفاوت تکرار شد و در هر دوره حداقل ۳ فلاسک برای هر پارامتر با سه تکرار به ازای هر زمان اندازه‌گیری انجام شد. فلاسک‌هایی که بعد از گشوده شده مستلزم حذف بودند را با سه تکرار به ازای هر زمان اندازه‌گیری انجام شد. برای ارزیابی اثر افزودنی‌ها بر تولید گاز، متان و سایر فراسنجه‌های شکمبه‌ای، مدل‌های آماری شامل اثر اصلی تیمار و اثر دور اجرای آزمون (Run) در معادله ۵ استفاده شد. در تحلیل کینتیک تولید گاز نیز اثر روزهای انجام آزمون و زمان انکوباسیون به‌عنوان عامل تکرارشونده، همراه با اثر متقابل زمان × نوع افزودنی در مدل آماری معادله ۵ وارد گردید. تحلیل داده‌ها با رویه MIXED نرم‌افزار SAS 9.4 انجام شد و مقایسه میانگین‌ها بر اساس میانگین حداقل مربعات و آزمون توکی صورت گرفت.

رابطه ۵:

$$Yij=\mu+Ti+Rj+eij$$

Yi: مشاهده i، μ: میانگین کل مشاهدات، Ti: اثر تیمار،R: اثر نوبت اجرا (روز انجام آزمون)، eij: اثراشتباه آزمایشی

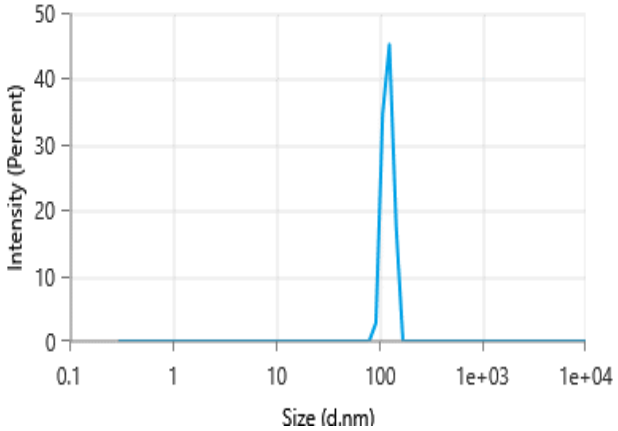
رابطه ٦:

$$Yij=\mu+Ti+Itj+Rk+(T\times It)ij\ j+eij$$

Yi: مشاهده i، µ: میانگین کل مشاهدات، Ti: اثر تیمار،R: اثر نوبت اجرا (روز انجام آزمون)، Itj: اثرزمان انکوباسیون، (T×It)ij اثرمتقابل زمان انکوباسیون و نوع فرآوری، eij: اثر اشتباه آزمایشی

نتایج و بحث

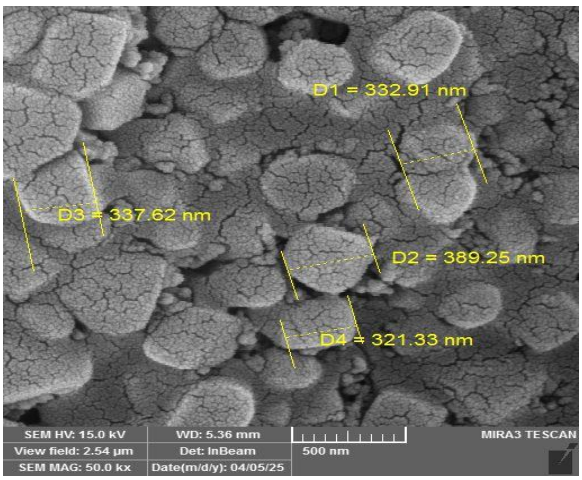
نتایج آنالیز پراکندگی نور دینامیکی DLS: بررسی DLS (آنالیز پراکندگی نور دینامیکی) نانولیپوزوم‌های عصاره شیرین‌بیان نشان داد که ذرات دارای یک پیک اصلی با میانگین قطر هیدرودینامیکی ۱۲۲٫۲ نانومتر (نمودار ۱) و شاخص PDI=۰/۰۱۳ بوده‌اند که نشان‌دهنده یکنواختی مطلوب اندازه ذرات است. این ویژگی‌ها با کاربری نانولیپوزوم‌ها در سامانه‌های دارورسانی سازگار است.



نمودار ۱: آنالیز پراکندگی نور دینامیکی نانولیپوزومال عصاره شیرین بیان

Figure 1: Dynamic light scattering analysis of nanoliposomal licorice extract

نتایج تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM: نتایج SEM نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره شیرین‌بیان، ذرات با اشکال کروی با سطح صاف و بدون نقص قابل‌توجه را نشان داد (شکل ۱). میانگین اندازه‌های نانولیپوزوم‌ها ۲۵۵ نانومتر را نشان داد. توزیع نسبتاً یکنواخت اندازه‌ها و تجمع حداقلی ذرات بیانگر تشکیل موفق نانوساختارهای لیپیدی پایدار بوده و با نتایج آنالیز DLS سازگار است.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) ذرات نانولیپوزوم‌های عصاره‌ی شیرین‌بیان

Image 1: Scanning electron microscope (SEM) image of licorice extract nanoliposome particles

تولید گاز: نتایج تولید گاز تجمعی و شاخص‌های کنتیکی تولید گاز در جدول ۱، ایجاد تغییرات الگوی تخمیر و تولید گاز در جیره‌های اسیدوزی را توسط هر دو گروه تیمار نشان می‌دهد. در نتایج تولید گاز دو ساعت اول اختلاف معناداری میان تیمارها و گروه شاهد مشاهده نشد. در ساعات میانی انکوباسیون (٤ تا ۱۲ ساعت) تیمار حاوی عصاره خالص شیرین‌بیان و تیمار نانولیپوزوم‌های عصاره شیرین‌بیان تولید گاز بالاتری نسبت به شاهد داشتند. در زمان‌های بلندمدت‌تر (۲٤ تا ۱۲۰ ساعت) مقدار گاز تولیدی در تیمار شیرین‌بیان کمتر از شاهد بود. نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره نیز روندی مشابه نشان دادند؛ به‌طوری‌که از ۲٤ ساعت به بعد میزان گاز تولیدی را در جیره اسیدوزی کاهش دادند (P<۰/۰۰۰۱). باوجود تشابه رفتاری هر دو شکل عصاره (خالص و نانولیپوزومال) اما در تیمار نانولیپوزوم‌ها در ٤ ساعت اولیه تخمیر افزایش تولید گاز بیشتری؛ و از سوی دیگر در دوره ٤۸ تا ۱۲۰ ساعت کاهش تولید گاز بیشتری از عصاره خالص داشت. در بازه ٤ تا ۲٤ ساعت اختلاف معنی‌داری میان دو تیمار مشاهده نشد (P<۰/۰۰۰۱). همچنین هر دو گروه تیمار کاهش معنی‌دار در پتانسیل تولید گاز (B) نسبت به شاهد نشان دادند، اما تفاوتی میان آن‌ها دیده نشد (P=۰/۰۳٦). در گروه شاهد ۱٤۹/۵۵ میلی‌لیتر در ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک و در تیمارهای عصاره خالص و نانولیپوزومال به ترتیب ۱۳۸/٤۸ و ۱۳۸/۲۱ میلی‌لیتر در ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک بود. نرخ تولید گاز (C) در شاهد ۰/۰۲ میلی‌لیتر در ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک، در عصاره خالص ۰/۰۳ میلی‌لیتر در ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک و در نانولیپوزوم ۰/۰٤ میلی‌لیتر در ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک بود و هر دو تیمار بدون اختلاف معنی‌دار بین دو تیمار نرخ بالاتری نسبت به شاهد داشتند (P=۰/۰۲۸). زمان تأخیر (Lag time) نیز در شاهد ۱/۰۹ ساعت و در تیمارهای عصاره خالص و نانولیپوزومال به ترتیب ۰/۳۲ و ۰/۰٦ ساعت بود که نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار این شاخص در هر دو تیمار نسبت به شاهد اما بدون تفاوت معنی‌دار میانشان است (P=۰/۰۱٦).

عدم تفاوت معنی‌داری میان گروه‌ها در دو ساعت نخست نشان می‌دهد که عصاره شیرین‌بیان و شکل نانولیپوزومال آن اثر فوری بر آغاز فرایند تخمیر ندارند. بااین‌حال، در ساعات میانی تخمیر (۲ تا ۱۲ ساعت) تفاوت افزایش معنی‌دار تولید گاز در تیمارها کاهش زمان تأخیر، تسریع در آغاز فعالیت میکروبی و تغییر مسیر تخمیر به‌وسیله تیمارها است؛ که این موضوع را کم بودن Lag time تیمارها نسبت به شاهد و همچنین با بالابودن نرخ تولید گاز (C) در گروه تیمارها قابل‌درک است. از طرفی ترکیبات زیست فعال شیرین‌بیان از طریق اثرات ضدمیکروبی بر گروه‌های خاص پروتوزوآ یا باکتری‌های متصل به فیبر یا حتی باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک، سبب تغییرات موقتی در مسیر تخمیر و درنتیجه افزایش تولید گاز در ساعات اولیه شده باشند. این تغییرات معمولاً با فعال‌سازی سریع‌تر مسیرهای پروپیونات‌زایی همراه است، مسیری که عمدتاً به فعالیت باکتری‌هایی نظیر *Megasphaera elsdenii* وابسته است و پیش‌تر نیز نشان داده‌شده که در کاهش لاکتات نقش کلیدی دارد (Nagarajaو همکاران، ۱۹۸۷). کاهش مشابه در تولید گاز حدود ۲٤ ساعت از آغاز تخمیر، در هر دو تیمار بیانگر شروع اثر تعدیلی شیرین‌بیان بر تولید گازهای شکمبه از این زمان به بعد است. این اثر تعدیلی کاهش تولید گاز در ساعات دیررس (٤۸ تا ۱۲۰ ساعت) به دلیل رهایش آهسته و کنترل‌شده‌تر ماده مؤثره در ساختار نانولیپوزوم چشمگیرتر از عصاره خالص است. ازآنجاکه یکی از اهداف استفاده از فناوری نانولیپوزومی، افزایش پایداری ترکیبات گیاهی

و ایجاد امکان اثرگذاری طولانی‌تر در محیط شکمبه است، الگوی مشاهده‌شده در نمودار ۲ به‌طور مستقیم از این فرض پشتیبانی می‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نانولیپوزوم‌ها قادرند به شکلی کارآمدتر در طول زمان فرایند تخمیر را تعدیل کنند و با کاهش تولید گازهای شکمبه، ریسک اسیدوز را در مراحل دیرتر تخمیر کاهش دهند.

جدول ۱- تأثیر افزودن عصاره شیرین‌بیان خالص و نانولیپوزومال در جیره اسیدوزی بر حجم گاز تولیدی تجمعی در زمان‌های مختلف و ضرایب کنتیکی تولید گاز (میلی‌لیتر به ازای ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)

Table 1. Effects of adding pure licorice extract and nanoliposomal licorice extract to an acidogenic diet on cumulative gas production at different incubation times and gas production kinetic parameters (mL per 500 mg of dry matter)

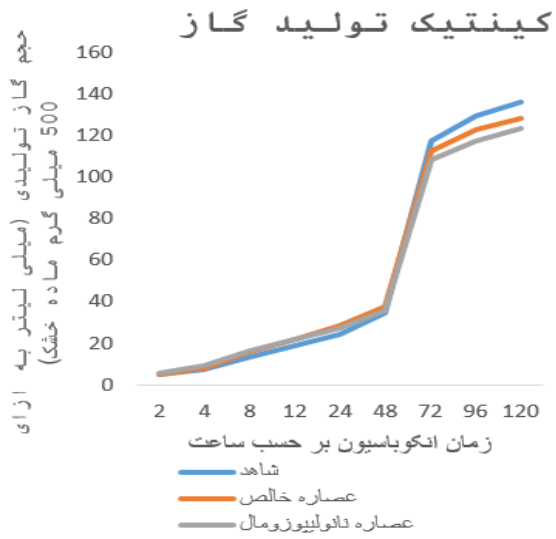
زمان‌های انکوباسیون Incubation times	تیمارها Groups				
	شاهد Control	عصاره خالص Pure extract	عصاره نانولیپوزومال Nanoliposome extract	اشتباه معیار میانگین SEM	سطح معنی‌داری P-value
2	5.03	5.18	5.63	0.60	<0.0001
4	7.68^{b}	7.28^{ab}	9.47^{a}	0.60	<0.0001
6	13.54^{b}	16.01^{a}	16.31^{a}	0.60	<0.0001
8	18.88^{b}	22.10^{a}	22.02^{a}	0.60	<0.0001
10	24.15^{b}	28.41^{a}	27.29^{a}	0.60	<0.0001
12	34.43^{b}	37.49^{a}	36.07^{a}	0.60	<0.0001
24	59.22^{a}	57.50^{b}	56.00^{b}	0.60	<0.0001
48	91.49^{a}	88.12^{b}	85.34^{c}	0.60	<0.0001
72	117.64^{a}	112.62^{b}	108.58^{c}	0.60	<0.0001
96	129.71^{a}	123.20^{b}	117.89^{c}	0.60	<0.0001
120	136.32^{a}	128.84^{b}	123.90^{c}	0.60	<0.0001
ضرایب Coefficient					
B (DM ml/500 mg)	149.55^{a}	138.84^{b}	133.21^{b}	3.40	0.036
C (DM ml/500 mg)	0.021^{b}	0.023a	0.024^{a}	0.001	0.028
Lag time (h)	1.09^{a}	0.32^{b}	0.06^{b}	0.04	0.016

[a-c]در هر ردیف میانگین‌های با حروف متفاوت ازنظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

B: پتانسیل تولید گاز برحسب ml/500 mg DM، C: نرخ تولید گاز برحسب ml/500 mg DM، Lag time: زمان تأخیر شروع فرایند تخمیر

[a-c]Means within each row with different superscript letters are significantly different (P < 0.05).

B: Gas production potential (ml/500 mg DM), C: Gas production rate (ml/500 mg DM)



نمودار ۲: نمودار مقایسه‌ای اثرات متفاوت گروه‌های تیمار و شاهد در زمان‌های مختلف بر کنتیک تولید گاز در جیره اسیدوزی

Figure 2: Comparative effects of different experimental groups and control on gas production kinetics at various incubation times in acidogenic diet

اسیدهای چرب فرار: جدول ۲ نتایج تأثیر استفاده از عصاره خالص شیرین‌بیان و نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره بر ترکیب اسیدهای چرب فرار شکمبه را نشان می‌دهد. هر دو تیمار عصاره خالص (۲٤/٦۰) و نانولیپوزوم عصاره (۲٤/٦٤) موجب افزایش معنی‌دار درصد بوتیریک اسید نسبت به گروه شاهد (۲۱/۹٦) شدند. در مقابل، کاهش غلظت استیک اسید (از مقدار ۵۱/۰۲ درصد در شاهد به ٤۸/۱۸ درصد در عصاره خالص و ٤۹/۳۰ درصد در تیمار نانولیپوزومال)؛ کاهش مجموع پروپیونیک و ایزوبوتیریک اسید از ۲٦/۰۳ درصد به ترتیب به ۲۵/۱۱درصد و ۲٤/۹۸ درصد در تیمارهای عصاره خالص و نانولیپوزومال ثبت‌شده است. علاوه بر این، کل اسیدهای چرب فرار نیز از ۷٤/۳۳ میلی‌مول در لیتر در گروه شاهد به ۷۱/۱٤ در تیمار خالص و ۷۱/۰۹ میلی‌مول در لیتر در تیمار نانولیپوزوم کاهش یافت.

نتایج مربوط به VFA نیز با افزایش بوتیرات و کاهش استات در تیمارهای شیرین‌بیان، همراه با کاهش پروپیونات و ایزوبوتیرات و کاهش کل VFA، همگی نشان‌دهنده انتقال مسیر تخمیر از تولید اسیدهای چرب غالب شکمبه به سمت یک الگوی تعدیل‌شده‌تر تخمیر همانند نتایج تولید گاز است. کاهش استات و کل VFA، مکانیسم اثر مشابه مونسین دارد که با کاهش شدت تخمیر برای پیشگیری از اسیدوز تحت‌حاد استفاده می‌شود (Ahmed و همکاران، ۲۰۲۲). از طرفی افزایش بیش‌ازحد تحمل VFA حرکات دستگاه گوارش را سرکوب می‌کند که این کاهش VFA کل توسط تیمارها می‌تواند بر کاهش حرکات شکمبه اثر مثبت داشته باشد و در سازوکارهای جلوگیری از اسیدوز و عوارض آن نقش حمایتی ایفا کند (Crichlow و Chaplin، ۱۹۸۵).

جدول ۲- تأثیر افزودن عصاره شیرین‌بیان خالص و نانولیپوزومال در جیره اسیدوزی بر اسیدهای چرب فرار تولیدی در مدت ۲٤ ساعت انکوباسیون

Table 2. Effect of adding free and nanoliposome-encapsulated licorice extract to an acidotic diet on volatile fatty acid production after 24 h of incubation

فرا سنجه‌های تخمیری Fermentation parameter	تیمارGroups			اشتباه معیار میانگین SEM	سطح معنی‌داری P-value
	شاهد Control	عصاره خالص Pure extract	عصاره نانولیپوزومال Nanoliposome extract		
کل اسیدهای چرب فرار (میلی مول در لیتر) Total VFA (mmol/L)	74.33[a]	71.14[b]	71.09[b]	0.26	0.02
اسید والریک(درصد) Valeric acid (٪)	0.50	0.71	0.63	0.026	0.08
اسید ایزو والریک(درصد) Isovaleric acid (٪)	0.47	0.37	0.42	0.015	0.13
اسید بوتیریک(درصد) Butyric acid (درصد)	21.96[b]	24.60[a]	24.65[a]	0.23	0.02
پروپیونیک + ایزو بوتیریک (درصد) Propionic + isobutyric acid (٪)	26.03[a]	25.11[b]	24.98[c]	0.09	0.03
اسید استیک(درصد) Acetic acid (٪)	51.02[a]	48.18[c]	49.30[b]	0.15	0.01

[a-c]در هر ردیف میانگین‌های با حروف متفاوت ازنظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

[a-c]Means within each row with different superscript letters are significantly different (P< 0.05).

بااین‌حال، برخلاف مطالعه Darat و همکاران (۲۰۲۱) که تغذیه شیرین‌بیان اثر معناداری بر VFA نداشت، یافته‌های حاضر نشان‌دهنده تأثیر قابل‌توجه عصاره با دوز و نسبت جیره متفاوت بوده و این اختلاف احتمالاً از تفاوت در سطح مصرف، روش استخراج، یا نسبت علوفه به کنسانتره ناشی شود اما از طرفی همسو با این مطالعه اضافه کردن عصاره خالص شیرین‌بیان تغییری در اسیدهای چرب فرار شاخه‌دار (اسید والریک و ایزووالریک) ایجاد نکرده بود. از جنبه دیگر مسیرهای تولید استات و بوتیرات برخلاف مسیر پروپیونات تولیدکننده H_2 و متان است. غلظت بالای H_2 شکمبه باعث افزایش تخمیر پروپیونات می‌شود و تغییر در تعادل VFA کاهش تولید متان را منجر می‌شود (Harfoot،۱۹۸۱؛Reid و همکاران، ۱۹۸۰؛ Sejian و همکاران، ۲۰۱۵؛ Vaghar Seyedin و همکاران، ۲۰۲۲) که یکی از اهداف مطالعه بررسی تیمارها جهت جلوگیری از اسیدوز و عوارض آن درعین‌حال کاهش تولید متان است. باید توجه داشت که در اسیدوز تحت حاد برخلاف اسیدوز حاد که در اثر تولید، تجمع و جذب اسیدلاکتیک کاهش pH و بروز علائم داریم؛ در اسیدوز تحت حاد کاهش pH به علت تجمع مزمن VFA بوده و اسیدلاکتیک موجود با میکروفلور پویا متابولیزه و به اسید چرب فرار تبدیل می‌شود (Gonzálezو همکاران، ۲۰۱۲؛Slyter ، ۱۹۷٦). در مطالعه Ramos-Morales و همکاران (۲۰۱۸) استفاده از ۲ گرم بر لیتر عصاره موجب کاهش مجموع اسیدهای چرب فرار (VFA) شده است که با نتایج حاصله ما هم سو است.

فراسنجه‌های تخمیری: نتایج این پژوهش در جدول ۳ نشان می‌دهد که افزودن عصاره خالص شیرین‌بیان و

نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره به جیره اسیدوزی میزان متان بعد ساعت ۲٤ از ٤۲/۳٤ میلی‌لیتر در ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک در گروه شاهد به ٤۰/۷۲ میلی‌لیتر در ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک در تیمار عصاره خالص و ۳۹/۸٦ میلی‌لیتر در ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک در تیمار نانولیپوزومال به‌طور معنی‌دار کاهش یافت (P=۰/۰۲). جمعیت پروتوزوآهای شکمبه نیز از ۱۹/۲ ×$۱۰^{۵}$ تک یاخته در هر میلی‌لیتر در شاهد به ۱۸/۷ ×$۱۰^{۵}$ در تیمار عصاره خالص و ۱۸ ×$۱۰^{۵}$ تک‌یاخته در هر میلی‌لیتر در نانولیپوزوم‌ها کاهش پیدا کرد و شدت کاهش در تیمار نانولیپوزومال بیشتر از عصاره خالص بود (P=۰/۰۱). همچنین مقدار pH از ٦/۷٤ در شاهد به ٦/۸۱ در عصاره خالص و ٦/۸۹ در نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره رسید و میانگین pH در تیمار نانولیپوزومال به‌طور معنی‌داری بالاتر از تیمار عصاره خالص بود (P=۰/۰۱). بیشترین تغییرات غلظت ازت آمونیاکی مربوط به تیمار نانولیپوزوم‌ها (۱۲/۵۹ میلی‌مول بر لیتر) بوده و از ۱۰/۰٦ در شاهد به ۱۱ /۵۷ میلی‌مول بر لیتر در تیمار عصاره خالص به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P=۰/۰۳). درصد تجزیه‌پذیری خوراک نیز تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت؛ به‌طوری‌که مقدار آن در تیمار عصاره خالص (۳۵ درصد) به‌صورت معنی‌داری کمتر از گروه شاهد (۳٦/۵ درصد) و تیمار نانولیپوزومال (۳۵/۵۱ درصد) بود (P=۰/۰٤).

جدول ۳- تأثیر افزودن عصاره شیرین‌بیان خالص و نانولیپوزومال در جیره اسیدوزی بر فراسنجه‌های تخمیری در مدت ۲٤ ساعت انکوباسیون

Table 3. Effect of adding pure and nanoliposome-encapsulated licorice extract to acidogenic diet on fermentation parameters after 24 h incubation.

فرا سنجه‌های تخمیری Fermentation parameters	تیمارGroups				
	شاهد Control	عصاره خالص Pure extract	عصاره نانولیپوزومال Nanoliposome extract	اشتباه معیار میانگین SEM	سطح معنی‌داری P-value
متان (میلی‌لیتر به ازای ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) Methane (mL per 500 mg DM)	42.34[a]	40.72[b]	39.86[b]	0.16	0.02
pH	6.74[c]	6.81[b]	6.89[a]	0.07	0.01
جمعیت پروتوزوآیی (×$۱۰^{۵}$/ml) Protozoa population (cells ×10^{5} mL)	19.20[a]	18.70[b]	18.00[c]	0.06	0.01
ازت آمونیاکی (میلی مول بر لیتر) Ammonia (mmol/L)	10.06[b]	11.57[ab]	12.59[a]	0. 20	0.03
تجزیه‌پذیری (درصد) Dry matter digestibility (٪)	36.50[a]	35.00[b]	35.51[a]	0.20	0.04

[a-c]در هر ردیف میانگین‌های با حروف متفاوت ازنظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

[a-c]Means within each row with different superscript letters are significantly different (P< 0.05).

کاهش انرژی متابولیسمی در تیمارهای مطالعه حاضر با یافته‌های Liang و همکاران(۲۰۲٤) همسو است که گزارش کرده بودند عصاره شیرین‌بیان قادر است با بهبود میکروبیوم شکمبه، الگوی تخمیر را تعدیل و نشخوار را بهینه‌سازی کند. در این نتایج اگرچه در نگاه اول ممکن است به‌عنوان یک اثر منفی بر قابلیت هضم تلقی شود، اما با توجه به‌شرایط آزمایش (جیره اسیدوزی) و هدف احتمالی مدیریت تخمیر شکمبه برای کاهش خطر اسیدوز، قابل توجیه است.

شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) حاوی ترکیبات زیست‌فعال متعددی از جمله گلیسیریزین، فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی است (Asl و Hosseinzadeh، 2008). این ترکیبات دارای خواص ضد میکروبی شناخته شده‌ای هستند و می‌توانند بر جمعیت میکروبی شکمبه تأثیر بگذارند. تحقیقات نشان داده‌اند که ترکیبات فنولی و ساپونینی موجود در شیرین‌بیان می‌توانند با ایجاد اختلال در غشای سلولی باکتری‌ها، به ویژه باکتری‌های گرم‌مثبت، باعث مهار رشد و فعالیت آن‌ها شوند(Bodas و همکارن ، 2012). ازآنجایی‌که باکتری‌های گرم‌مثبت نقش مهمی در تخمیر مواد غذایی و تولید اسیدهای چرب فرار در شکمبه ایفا می‌کنند، مهار آن‌ها می‌تواند منجر به کاهش تولید SCFA و در نتیجه کاهش انرژی متابولیسمی و قابلیت هضم ماده آلی شود. این مکانیسم می‌تواند توجیه‌کننده کاهش مشاهده‌شده در هر سه فراسنجه در تیمار حاوی عصاره خالص باشد.

مطالعات مختلف حیوانی نیز عدم تأثیر سوء کاهش فراسنجه‌های این پژوهش را تقویت می‌کنند. همراه با کاهش پروتوزوآ و متان در مطالعه Abarghuei و Salem (۲۰۲۱)؛ بهبود وزن لاشه در بزهای تغذیه‌شده با ۵ درصد شیرین‌بیان در مطالعه Towajeو همکاران (۲۰۲۰)؛ اضافه کردن پودر شیرین‌بیان در جیره باعث افزایش وزن از شیرگیری و کاهش سن ازشیرگیری در گوساله‌ها در مطالعه Haliroodi و همکاران (۲۰۲٤) و نیز بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی و ایمنی در پژوهش Guo و همکاران (۲۰۱۹) همگی نشان می‌دهند که ترکیبات موجود در ریشه شیرین‌بیان ویژگی‌هایی مانند کاهش بار میکروبی مخرب، تعدیل مسیرهای تخمیری و حفاظت از اپیتلیوم شکمبه بدون اثر سوء هستند.

نکته قابل توجه در این پژوهش، تأثیر بارزتر عصاره نانولیپوزومال در کاهش فراسنجه‌های تخمیری است. نانولیپوزوم‌ها به عنوان سیستم‌های حامل، قادرند ترکیبات زیست‌فعال را درون خود محصور کرده، از تخریب زودهنگام آن‌ها در محیط شکمبه جلوگیری کرده و فراهمی زیستی و دسترسی آن‌ها را برای برهم‌کنش با سلول‌های میکروبی افزایش دهند(DJEBBAR و همکاران، ۲۰۲٤). به‌عبارت‌دیگر، نانولیپوزوماسیون ممکن است باعث رهایش کنترل‌شده و هدفمندتر ترکیبات مؤثر عصاره در محیط کشت‌شده و درنتیجه اثر مهاری قوی‌تری بر جمعیت میکروبی اعمال کرده باشد. این موضوع با یافته‌های سایر محققان که نشان داده‌اند نانوکپسولاسیون می‌تواند کارایی ترکیبات ضد میکروبی گیاهی را بهبود بخشد، همخوانی دارد(Phupaboon و همکاران، ۲۰۲۵). بنابراین، کاهش شدیدتر فراسنجه‌ها در تیمار نانولیپوزومال را می‌توان به اثربخشی بیشتر این فرم از عصاره نسبت داد.

از منظر تغذیه دام و مدیریت اسیدوز، کاهش تولید SCFAو قابلیت هضم ماده آلی در یک جیره اسیدوزی می‌تواند یک اثر مطلوب تلقی شود. اسیدوز شکمبه‌ای تحت‌حاد (SARA) معمولاً به دلیل تخمیر کربوهیدرات‌های قابل تخمیر و تولید مزمن اسیدهای چرب فرار رخ می‌دهد (Kleen و همکاران، ۲۰۰۳) با کاهش سرعت و میزان تخمیر از طریق افزودن ترکیبات گیاهی مانند شیرین‌بیان، می‌توان از تجمع اسید در شکمبه جلوگیری کرده و pH را در محدوده

ایمن‌تری حفظ نمود. هرچند که این کاهش تخمیر ممکن است با اندکی افت در انرژی دریافتی روزانه همراه باشد، اما مزیت آن در پیشگیری از عوارض اسیدوز و حفظ سلامت حیوان می‌تواند این کاهش جزئی را جبران کند.

اسیدوز القایی: اثرات عصاره خالص شیرین‌بیان و نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره در شرایط اسیدوزی القایی در جدول ۵ آورده شده است که میزان گاز تولیدی در تیمار اسیدوز کنترل‌نشده (۲٦/٤ میلی‌لیتر به ازای ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد (۱۲/۳٦ میلی‌لیتر به ازای ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) و شاهد مثبت (۱۵/٦ میلی‌لیتر به ازای ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) بود. درحالی‌که تیمار حاوی عصاره شیرین‌بیان خالص (۲۷/٤۱ میلی‌لیتر به ازای ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) و نانولیپوزومال (۲۸/۲۳ میلی‌لیتر به ازای ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) بیشترین میزان تولید گاز را نشان دادند (P<۰/۰۰۰۱). در ارزیابی pH نیز مقادیر ثبت‌شده در گروه شاهد ٦/۸۸، در اسیدوز کنترل‌نشده ٦/۰۵ و در شاهد مثبت ٦/۱۷ بود. pH در تیمارهای عصاره خالص و نانولیپوزومال به‌طور معنی‌داری بیشتر از هر دو گروه اسیدوز و شاهد مثبت ویرجینیامایسین بود (P<۰/۰۰۰۱).

جدول ۵- تأثیر افزودن عصاره شیرین‌بیان خالص و نانولیپوزومال بر اسیدوز شکمبه‌ای القاشده

Table 5- Effect of adding pure and nanoliposomal licorice extract on induced rumen acidosis

فرا سنجه‌های تخمیری Fermentation parameters	شاهد Control	اسیدوز کنترل نشده Uncontrolled acidosis	شاهد مثبت Positive control	عصاره خالص Pure extract	عصاره نانولیپوزومال Nanoliposome extract	اشتباه معیار میانگین SEM	سطح معنی‌داری P-value
			تیمار Groups				
گاز تولیدی میلی‌لیتر به ازای ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک بعد ۲٤ ساعت Gas production (mL/500 mg DM) 24th hour	12.36[d]	26.40[b]	15.60[c]	27.41[a]	28.23[a]	0.13	<0.0001
pH	6.88[a]	6.05[d]	6.17[c]	6.36[b]	6.40[b]	0.01	<0.0001

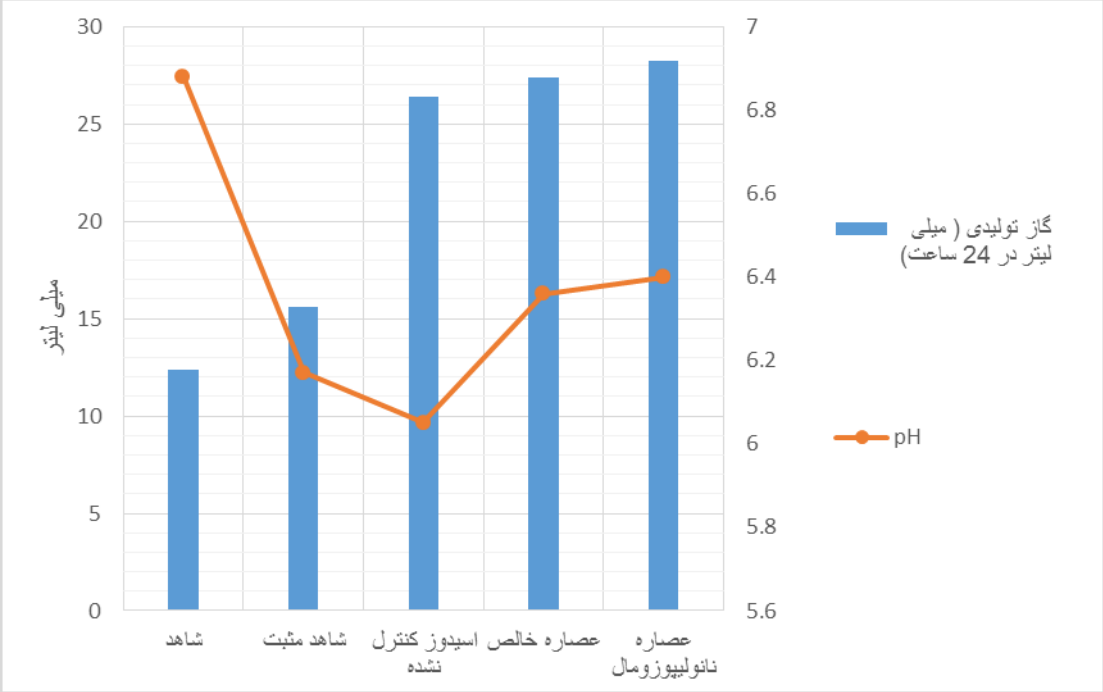
[a-c]در هر ردیف میانگین‌های با حروف متفاوت ازنظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

[a-c]Means within each row with different superscript letters are significantly different (P< 0.05).

نوع تیمارهای موردمطالعه در اسیدوز القایی نقش تعیین‌کننده‌ای در میزان تولید گاز و تغییرات pH محیط شکمبه (نمودار ۳) دارد. القای اسیدوز در گروه اسیدوز کنترل نشده موجب افزایش قابل‌توجه تولید گاز و کاهش pH تا سطح ٦/۰۵ شد؛ وضعیتی که با افزایش سریع تخمیر، تجمع اسیدهای چرب فرار و انباشت لاکتات در شکمبه مطابقت دارد. در مقابل، گروه شاهد مثبت توانست تولید گاز را کاهش داده و pH شکمبه را در سطح بالاتری (٦/۱۷) حفظ کند که این نتیجه می‌تواند ناشی از مهار باکتری‌های تولیدکننده اسید نظیر *Streptococcus bovis* باشد.

در مقایسه با این دو گروه، تیمارهای عصاره خالص شیرین‌بیان و نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره شیرین‌بیان باعث افزایش تولید گاز حتی بالاتر از گروه اسیدوز کنترل نشده شدند، اما توانستند pH را در محدوده نسبتاً پایدار (به ترتیب ٦/۳٦ و ٦/٤۰) نگه‌دارند. این

ویژگی نشان می‌دهد که عصاره شیرین‌بیان به‌ویژه در قالب نانولیپوزوم قادر است شدت اسیدوز را بدون مهار کامل تخمیر کاهش دهد و محیط شکمبه را در محدوده عملکردی مطلوب حفظ کند. این موضوع اهمیت ویژه‌ای در دام‌های پرتولید با جیره اسیدوزن دارد که حساسیت بیشتری به اسیدوز شکمبه نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد این تعدیل pH از طریق تغییر جهت مسیر تخمیر به سمت تولید اسیدهای چرب فرار با خاصیت اسیدی کمتر مانند پروپیونات رخ می‌دهد. بااین‌حال افزایش تولید گاز احتمالاً به تغییر در جمعیت میکروبیوم و افزایش فعالیت متانوژن‌ها مربوط است، موضوعی که نیازمند بررسی‌های تکمیلی است تا احتمال بروز مشکلاتی مانند نفخ ارزیابی شود.



نمودار ۳ نمودار مقایسه مقدار pH در مقادیر تولید گاز مختلف گروه‌های مختلف اسیدوز القایی

Figure 3: Comparison of pH values at different levels of gas production in various induced acidosis groups

مطالعات قبلی Rahchamani و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که افزودن ۱۰ درصد پودر شیرین‌بیان در جیره گوسفندان، باوجود کاهش باکتری‌های لاکتیک اسید و افزایش پروتوزوآ، pH شکمبه را تغییر نداده است. تفاوت نتایج می‌تواند ناشی از طبیعی بودن شرایط شکمبه در تحقیق راه‌چمنی باشد؛ زیرا pH در گروه کنترل آن مطالعه نیز در محدوده فیزیولوژیک باقی‌مانده بود. درحالی‌که در مطالعه حاضر، تیمارها در شرایط «چالش اسیدوز» بررسی شدند که نیازمند خواص تعدیل‌کنندگی شدیدتر بود.

ویژگی مهم عصاره شیرین‌بیان آن است که در شرایط طبیعی موجب افزایش غیرضروری pH نمی‌شود؛ اما در شرایط اسیدوزی، با مهار میکروارگانیسم‌های تولیدکننده اسید و تعدیل تخمیر، از افت بیشتر pH جلوگیری می‌کند. تبدیل عصاره شیرین‌بیان به نانولیپوزوم سبب پایداری بیشتر و رهایش آهسته‌تر ترکیبات فعال آن شده و کارایی این ترکیب را در تعدیل طولانی‌مدت تخمیر شکمبه افزایش می‌دهد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این ترکیب، به‌ویژه در فرم نانولیپوزومی، ظرفیت بالقوه‌ای برای استفاده در

جیره دام‌های پر تولید باهدف پیشگیری از اسیدوز و بهبود بهینگی بازده تولیدی دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه *in vitro* نشان داد که افزودن عصاره شیرین‌بیان، به‌ویژه در فرم نانولیپوزومال، توانست تخمیر شکمبه را در شرایط چالش اسیدوزی به‌طور معنی‌داری تعدیل کند؛ به‌طوری‌که نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره در مقایسه با عصاره خالص، کاهش پایدارتر تولید گاز تجمعی، پتانسیل تولید گاز، اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر و انرژی متابولیسمی را نشان دادند و هم‌زمان زمان تأخیر تخمیر را کاهش دادند که بیانگر تغییر کنترل‌شده الگوی تخمیر است. این اثرات احتمالاً به رهایش آهسته و تدریجی ترکیبات فعال در سامانه نانولیپوزومال مربوط بوده و موجب حفظ فعالیت میکروبی بدون تشدید شرایط اسیدی می‌شود. بااین‌حال، ازآنجاکه نتایج تحت شرایط آزمایشگاهی کنترل‌شده به‌دست آمده‌اند، کاربرد آن‌ها به‌عنوان افزودنی گیاهی بالقوه و جایگزین طبیعی آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره‌های پرکنسانتره نیازمند تأیید از طریق مطالعات *in vivo* بوده و تعمیم مستقیم به شرایط مزرعه باید با احتیاط صورت گیرد.

منابع

Abarghuei, M. J. & Salem, A. Z. M. (2021). Sustainable impact of pulp and leaves of Glycyrrhiza glabra to enhance ruminal biofermentability, protozoa population, and biogas production in sheep. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*:33371-3338 .

Ahmed, M. G., Al-Sagheer, A. A., El-Zarkouny, S. Z. & Elwakeel, E. A. (2022). Potential of selected plant extracts to control severe subacute ruminal acidosis *in vitro* as compared with monensin. *BMC Veterinary Research*, *18*(1): 356 .

Asl, M. N. & Hosseinzadeh, H. (2008). Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. Phytotherapy Research: *An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(6): 709-724.

Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G., Colombatto, D., McAllister, T. A. & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, *145*(1-4): 209-228 .

Benchaar, C. & ,.Greathead, H. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, *166*, 338-355 .

Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F. J. & López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4): 78-93.

Broderick, G. & Kang, J. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*, *63*(1), 64-75 .

Chen, Y., Tang, Y., Li, Y., Rui, Y. & Zhang, P. (2024). Enhancing the Efficacy of Active Pharmaceutical Ingredients in Medicinal Plants through Nanoformulations: A Promising Field. *Nanomaterials*, *14*(19): 1598. https://www.mdpi.com/2079-4991/14/19/1598

Cheng, X., Yan, H., Pang, S., Ya, M., Qiu, F., Qin, P., Zeng, C. & Lu, Y. (2022). Liposomes as multifunctional nano-carriers for medicinal natural products. *Frontiers in Chemistry*, *10*, 963004 .

Crichlow, E. & Chaplin, R. (1985). Ruminal lactic acidosis: Relationship of forestomach motility to nondissociated volatile fatty acids levels. *American Journal of Veterinary Research*, *46*(9):1908-1911 .

Crosson, P., Shalloo, L., O'brien, D., Lanigan, G., Foley, P., Boland, T. & Kenny, D. (2011). A review of whole farm systems models of greenhouse gas emissions from beef and dairy cattle production systems. *Animal Feed Science and Technology*, *166*: 29-45 .

Darat, P., Fatahnia, F., Taasoli, G., Mirzaei-Alamouti, H. & Khatibjou, A. (2021). Effect of Liquorice extract on *in vit*ro rumen fermentation parameters of diets containing different levels of concentrate. *Animal Science Research*, *30*(4): 27-39 .(In Persian). .

Djebbar, B., Hellali, D. H. & Merzougui, H. (2024). A Systematic Review of Nano-Encapsulation for Improving the Bioavailability of Dietary Supplements and Nutraceuticals. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 14(10).

El-Saber Batiha, G., Magdy Beshbishy, A., El-Mleeh, A., M. Abdel-Daim, M. & Prasad Devkota, H. (2020). Traditional uses, bioactive chemical constituents, and pharmacological and toxicological activities of *Glycyrrhiza glabra* L.(Fabaceae). *Biomolecules*, *10*(3): 352 .

Getachew, G., Makkar, H. & Becker, K. (2002). Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *The Journal of Agricultural Science*, *139*(3): 341-352 .

Golder, H. & Lean, I. (2024). Invited review: Ruminal acidosis and its definition—A critical review. *Journal of Dairy Science*, *107*(12):10066-10098 .

González, L., Manteca, X., Calsamiglia ,S., Schwartzkopf-Genswein, K. & Ferret, A. (2012). Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). *Animal Feed Science and Technology*, *172*(1-2):, 66-79 .

Guo, X., Cheng, L., Liu, J ,.Zhang, S., Sun, X. & Al-Marashdeh, O. (2019). Effects of licorice extract supplementation on feed intake, digestion, rumen function, blood indices and live weight gain of Karakul sheep. *Animals*, *9*(5): 279 .

Harfoot, C. (1981). Anatomy, physiology and microbiology of the ruminant digestive tract. *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*, 1-19 .

Hasan, M. K., Ara, I., Mondal, M. S. A. & Kabir, Y. (2021). Phytochemistry, pharmacological activity, and potential health benefits of *Glycyrrhiza glabra*. *Heliyon*, *7*(6).

Haliroodi, M., Dayani, O., Sharifi Hosseini, M. M. & Jeshari, M. (2024). The effect of different levels of licorice root powder in the starter diet on performance, skeletal growth indicators and blood cells of Holstein suckling calves. *Journal of Ruminant Research*, 12(4):109-126. (In Persian).

Kleen, J., Hooijer, G., Rehage, J. & Noordhuizen, J. (2003). Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50(8): 406-414.

Liang, S., Meng, J., Tang, Z., Xie, X., Tian, M., Ma, X., Yang, X., Xiao, D. & ,.Wang, S. (2024). Licorice Extract Supplementation Benefits Growth Performance, Blood Biochemistry and Hormones, Immune Antioxidant Status, Hindgut Fecal Microbial Community, and Metabolism in Beef Cattle. *Veterinary Sciences*, *11*(8): 356. https://www.mdpi.com/2306-7381/11/8/356

Liu, J., Ma, B., Hao, G., Su, D., Wang, T., Ding, Z. & Guo, X. (2023). Glycyrrhizin inhibits LPS-induced inflammatory responses in goat ruminal epithelial cells *in vitro*. *BMC Molecular and Cell Biology*, *24*(1): 28 .

Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *The Journal of Agricultural Science*, *93*: 217 - 222 .

Menke, K .H. & 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 .

Mujawar, N. & Sankpal, P. (2025). New Drug Delivery Mechanism in Combating Livestock Diseases. *In Biofilm Associated Livestock Diseases and their Management* (pp. 189-200). Springer .

Murray, M. T .(2020). *Glycyrrhiza glabra* (licorice). *Textbook of natural medicine*, 641 .

Nagaraja, T., Taylor, M., Harmon, D. & Boyer, J. (1987). *In vitro* lactic acid inhibition and alterations in volatile fatty acid production by antimicrobial feed additives. *Journal of Animal Science*, *65*(4):1064-1076 .

Nikkhah, A., RezaGholivand, A. & Khabbazan, M. (2021). Milk yield depression and its economic loss due to production diseases: Iran's large dairy herds. *Iranian Journal of Veterinary Research*, *22*(2): 136 .(In Persian).

Ottenstein, D. & Bartley, D. (1971). Improved gas chromatography separation of free acids C2-C5 in dilute solution. *Analytical Chemistry*, *43*(7), 952-955 .

Patra, A. K. (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production . *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, *6*: 416-428.

Patra, A. K. & Yu, Z. (2012). Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(12): 4271-4280 .

Phupaboon, S., Muslykhah, U., Suriyapha, C., Sommai, S., Matra, M., Dagaew, G., Prachumchai, R. & Wanapat, M. (2025). Encapsulated phytogenic oils enhance *in vitro* rumen fermentation and reduce methane emissions. *BMC Veterinary Research*, 21(1): 352.

Prasad, R., Sourie, S., Cherukuri, V., Fita, L. & Merera, C. (2015). Global warming: Genesis, facts and impacts on livestock farming and mitigation strategies. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, *3*:2319-1473 .

Rahchamani, R., Faramarzi, M., Moslemipor, F. & Bayat Kohsar, J. (2019). Effect of supplementing sheep diet with *Glycyrrhiza glabra* and *Urtica dioica* powder on growth performance, rumen bacterial community and some blood biochemical constituents. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, *9*(1): 95-103 .(In Persian).

Ramos-Morales, E., Rossi, G ,.Cattin, M., Jones, E., Braganca, R. & Newbold, C. (2018). The effect of an isoflavonid-rich liquorice extract on fermentation, methanogenesis and the microbiome in the rumen simulation technique. *FEMS Microbiology Ecology*, *94*(3): fiy009 .

Reddy, P. R .K. & Hyder, I. (2023). *Ruminant digestion*. *Textbook of Veterinary Physiology*, 353-366 .

Reid, J., White, O. D., Anrique, R. & Fortin, A. (1980). Nutritional energetics of livestock: some present boundaries of knowledge and future research needs. *Journal of Animal Science*, *51*(6): 1393-1415 .

Sejian, V., Bhatta, R., Soren, N., Malik, P., Ravindra, J., Prasad, C. S. & Lal, R. (2015). Introduction to concepts of climate change impact on livestock and its adaptation and mitigation. *In Climate change Impact on livestock: adaptation and mitigation* (pp. 1-23). Springer .

Shakeri, P. & Forozandeh Shahraki, A. D. (2025). Effects of nano-encapsulated plant promoter on the performance, blood parameters and structural growth of Holstein dairy calves. *Journal of Ruminant Research*, 13(2): 35-48. (In Persian).

Simanungkalit, G., Bhuiyan, M., Bell, R., Sweeting, A., Morton, C. L., Cowley, F. & Hegarty, R. (2023). The effects of antibiotic-free supplementation on the ruminal pH variability and methane emissions of beef cattle under the challenge of subacute ruminal acidosis (SARA). *Research in Veterinary Science*, *160*: 30-38 .

Slyter, L. L. (1976). Influence of acidosis on rumen function. *Journal of Animal Science*, *43*(4): 910-929 .

Sogut, O., Sezer ,U. A. & Sezer, S. (2021). Liposomal delivery systems for herbal extracts. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *61*: 102147 .

Streitenberger, N., Ramiro, R., Navarro, M. A., Asin, J., Henderson, E., Gonzales-Viera, O., Mete, A., Torii, E. H .& ,.Uzal, F. A. (2025). Pathology of ruminal acidosis in cattle. *Veterinary Pathology*: 03009858251339889 .

Swain, P. S., Dominic, G., Bhakthavatsalam, K. & Terhuja, M. (2016). Impact of ruminants on global warming: Indian and global context. In *Climate Change Challenge (3C) and Social-Economic-Ecological Interface-Building: Exploring Potential Adaptation Strategies for Bio-resource Conservation and Livelihood Development* (pp. 83-97). Springer .

Tagliapietra, F., Cattani, M., Hansen, H. H., Hindrichsen, I. K ,.Bailoni, L. & Schiavon, S. (2011). Metabolizable energy content of feeds based on 24 or 48 h *in situ* NDF digestibility and on *in vitro* 24 h gas production methods. *Animal Feed Science and Technology*, *170*(3-4): 182-191 .

Theodorou, M. K., Williams, B .A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, *48*(3-4): 185-197 .

Towaje, M., Kuttar, A., Abdulrahman, A., Salman, M. D. & RD, B. (2020). DIfferent rates of licorice root (*Glycyrrhiza glabra*) in diets and effect it in some quality of carcass of local goat males. *Pl. Arch*, *20*:110-114.

Vaghar Seyedin, S. M., Zeidi, A., Chamanehpour, E., Nasri, M. H. F. & Vargas-Bello-Pérez, E. (2022). Methane emission: Strategies to reduce global warming in relation to animal husbandry units with emphasis on ruminants. *Sustainability*, *14*(24): 16897 .

Voulgarakis, N., Athanasiou, L., Psalla, D., Gougoulis, D., Papatsiros, V. & Christodoulopoulos, G. (2023). Ruminal acidosis part II: Diagnosis, prevention and treatment. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *74*(4): 6329-6336 .

Voulgarakis, N., Gougoulis, D., Psalla, D., Papakonstantinou, G., Angelidou-Tsifida, M., Papatsiros, V., Athanasiou, L. & Christodoulopoulos, G. (2023). Ruminal Acidosis Part I: Clinical manifestations, epidemiology and impact of the disease. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *74*(3): 5883-5891 .