



Original Article

## Mechanism of Positive Phytobiotic Effects of Saffron Petals on Energy and Nitrogen Metabolism and Antioxidant Health of Sheep Rumen *In vitro*

Mojtaba Akbari Shooshood<sup>1</sup> , Javad Rezaei<sup>2\*</sup> , Mahdi Ayyari Noushabadi<sup>3</sup> ,  
Yousef Rouzbehan<sup>4</sup>

1- PhD student of Animal Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2- Associate Professor of Animal Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3- Assistant Professor of Medicinal Plants, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

4- Professor of Ruminant Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

\*Corresponding author: [rezaei.j@modares.ac.ir](mailto:rezaei.j@modares.ac.ir)

**Received:** 08 June 2024, **Revised:** 21 August 2024, **Accepted:** 06 August 2024

### Extended Abstract

**Introduction:** Every year, a significant number of saffron petals is left as a by-product after harvesting and separating the thread-like parts of the flower (stigmas). The saffron stigma constitutes only 7.4% of the flower's weight and the remaining 92.6% is unused. This plant residue (petals) is a valuable source of plant bioactive compounds (phytobiotics), which based on previous studies, has useful effects on rumen fermentation, digestion and diet efficiency. However, there is no specific information about the effect of this by-product on ruminal microbial populations, enzymatic activity, antioxidant health, as well as the mechanism of effectiveness. In the present study, it was hypothesized that the use of low levels of saffron petals in the diet (as a natural additive) could improve microorganism populations, hydrolytic enzymes and antioxidant health of the rumen. Therefore, this research was carried out to investigate the mechanism of the positive effects of saffron petals on the energy and nitrogen metabolism and antioxidant health of the sheep rumen using the *in vitro* method.

**Materials and Methods:** Experimental treatments included a diet without saffron petals (control) and diets containing 1, 2, and 3% of saffron petals (based on dry matter). The 24 and 72-h gas production tests were performed in 2 series (runs; in different weeks) and 3 replicates in each run (*i.e.*, 6 observations per treatment at each incubation time). The gas production from the samples incubated in the 100-mL glass syringes was recorded. Then, the protozoa (using a hemocytometer and light microscope), cellulolytic and proteolytic bacteria (using liquid medium and Hungate tubes), hydrolytic enzymes (via chemical methods and photometry), methane (by injecting NaOH solution to absorb CO<sub>2</sub>) and antioxidant capacity (via ferric reducing antioxidant power assay) were



measured. Truly degraded substrate was determined by boiling fermentation residues in the neutral detergent solution and weighing, ammonia-N by phenol-hypochlorite method, and the volatile fatty acids (VFA) using gas chromatography. Microbial biomass production, digestibility, metabolizable energy and partitioning factor were estimated using the equations. Data were analyzed using the Proc GLM of SAS 9.1 in a completely randomized design (6 observations per treatment).

**Results and Discussion:** The inclusion of different levels of saffron petals in the diet decreased the *in vitro* ruminal protozoa population ( $P<0.05$ ), due to its bioactive components, which damage the structure and function of the protozoa membrane, deactivate protozoa enzymes or deprive protozoa of the substrate and metal ions needed for their metabolism. Moreover, saffron petals increased the cellulolytic bacteria numbers and microbial biomass production ( $P<0.05$ ). This was due to the reduction of protozoa, which leads to the reduction of the bacteria predation and thus improves the growth and population of the cellulolytics. The ruminal fibrolytic enzymes and amylase activity decreased with the use of saffron petals in the diet ( $P<0.05$ ), because of the higher cellulolytic bacteria and microbial biomass, *i.e.*, higher bacteria activity. These improvements resulted in more ( $P<0.05$ ) diet digestibility, metabolizable energy, total VFA and truly degraded substrate in the saffron petals-containing groups. The inclusion of saffron petals in the diet resulted in decreasing *in vitro* ruminal methane release, ammonia-N production and acetate-to-propionate ratio ( $P<0.05$ ). These changes were due to the decreased protozoa numbers leading to less hydrogen supply for methanogens and higher hydrogen shift toward propionate, as well as less deamination process and ruminal nitrogen recycling. Another reason was the increase of cellulolytic bacteria that consume ammonia as their main nitrogen source. Antioxidant capacity increased with the use of saffron petals in the diet ( $P<0.05$ ), due to the bioactive compounds and antioxidants (such as flavonoids) present in this plant residue. The maximum truly degraded substrate was observed in the diet containing 3% of saffron petals. The lowest methane, protozoa and ammonia were in diets containing 2 and 3% of saffron petals. Moreover, adding 2 and 3% of saffron petals caused the highest antioxidant power.

**Conclusion:** The results showed that the positive effect of saffron petals on the ruminal metabolism and antioxidative health of sheep, *in vitro*, was due to the beneficial changes that occurred in microbial populations (increase of cellulolytic bacteria and decrease of protozoa), hydrolytic enzymes (fibrolytic enzymes and amylase) and its antioxidants. Therefore, low levels (up to 3% of diet) of saffron petals can be used as a natural phytobiotic additive to improve rumen fermentation and reduce loss of energy and nitrogen resources, although it is better to confirm the results *in vivo*.

**Conflict of Interest:** The authors declare no potential conflict of interest related to the work.

**Keywords:** Additive, Bioactive compounds, Enzyme activity, *In vitro* fermentation, Microbial population.

## مقاله پژوهشی

# سازوکار اثرات فیتوبیوتیکی مثبت گلبرگ زعفران بر متابولیسم انرژی و نیتروژن و سلامت آنتی‌اکسیدانی برون‌تنی شکمبه گوسفند

مجتبی اکبری شوشود<sup>۱</sup>، جواد رضائی<sup>۲\*</sup>، مهدی عیاری نوش‌آبادی<sup>۳</sup>، یوسف روزبهان<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲- دانشیار تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۳- استادیار گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۴- استاد تغذیه نشخوارکنندگان، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول: rezaei.j@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۹؛ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۵/۳۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۶

## چکیده

گلبرگ زعفران دارای آثار مثبت بر تخمیر شکمبه و دام می‌باشد، اما اثرات آن بر میکروارگانیسم‌ها، آنزیم‌ها و سلامت آنتی‌اکسیدانی شکمبه بررسی نشده است. لذا، این تحقیق سازوکار اثر مثبت گلبرگ زعفران بر متابولیسم انرژی و نیتروژن و سلامت آنتی‌اکسیدانی برون‌تنی شکمبه گوسفند را بررسی کرد. جیره‌های آزمایشی حاوی صفر (شاهد)، ۱، ۲ و ۳ درصد گلبرگ زعفران تنظیم گردید و آزمون تولید گاز ۲۴ و ۷۲ ساعته انجام شد. سپس، پروتوزوآها، باکتری‌های سلولولیتیک و پروتئولیتیک، آنزیم‌های هیدرولیتیک، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، تولید متان، توده میکروبی، هضم‌پذیری، سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی، آمونیاک و اسیدهای چرب فرار تعیین گردیدند. داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۲ سری (۶ مشاهده تیمار) تجزیه شد. گنجاندن سطوح مختلف گلبرگ زعفران در جیره موجب افزایش باکتری‌های سلولولیتیک، آنزیم‌های فیبرولیتیک، آمیلاز، توده میکروبی و کاهش پروتوزوآها شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با مصرف گلبرگ زعفران بهبود یافت ( $P < 0.05$ )، اما جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیک و پروتئاز روند کاهشی غیرمعنی‌داری داشت. در نهایت، تغییرات سازوکاری مذکور موجب افزایش تجزیه و قابلیت هضم جیره، کل اسیدهای چرب فرار، کاهش متان، آمونیاک و نسبت استات به پروپیونات نسبت به شاهد شد ( $P < 0.05$ ). حداکثر بهبود صفات در سطوح ۲ و ۳ درصد افزودنی مشاهده گردید. در مجموع، اثر مثبت گلبرگ زعفران بر متابولیسم و سلامت آنتی‌اکسیدانی شکمبه‌ای به دلیل محتوای آنتی‌اکسیدانی و تغییرات مفید در جمعیت‌های باکتریایی و آنزیم‌های هیدرولیتیک است. بنابراین، سطوح اندک (تا ۳ درصد جیره) آن می‌تواند به عنوان افزودنی فیتوبیوتیکی طبیعی برای بهبود شرایط تخمیر شکمبه و کاهش اتلاف منابع انرژی و نیتروژن مصرف شود، هرچند بهتر است نتایج در شرایط درون‌تنی تأیید شود.

واژه‌های کلیدی: افزودنی، تخمیر برون‌تنی، ترکیبات زیست‌فعال، جمعیت میکروبی، فعالیت آنزیمی.

## مقدمه

تولید متان و آزادسازی ناهماهنگ آمونیاک در شکمبه نشخوارکنندگان منجر به از دست رفتن بخش قابل توجهی از منابع انرژی و نیتروژن خوراک می‌شود. از سوی دیگر، سلامت آنتی‌اکسیدانی شکمبه شرایط مناسب‌تری را برای فعالیت میکروبی و متابولیسم خوراک فراهم می‌کند. در این راستا، استفاده از افزودنی‌های خوراکی راه‌کاری مهم برای بهبود میکروبیوم شکمبه، بازده تخمیر و کاهش تأثیرات منفی اتلافات متابولیسمی دامی بر محیط زیست است (McDonald et al., 2022). مصرف برخی مواد افزودنی مانند آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی به دلیل ایجاد مقاومت باکتریایی از سال‌ها پیش به‌ویژه توسط اتحادیه اروپا ممنوع شده است و جایگزینی آن‌ها با ترکیبات طبیعی ضرورت دارد. بنابراین، نیاز به معرفی مکمل‌های جدید با منشأ طبیعی است که ضمن بهبود بازده خوراک، اثرات سوء ناشی از پرورش دام بر محیط زیست را کاهش داده و همچنین از نظر اقتصادی، ارزش افزوده جدیدی برای فرآورده‌های فرعی کشاورزی حاصل شود (Ilias et al., 2023).

از جمله این منابع می‌توان به فیتوبیوتیک‌ها یا مواد زیست‌فعال گیاهی اشاره نمود که قادرند به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد استفاده شوند. گلبرگ زعفران<sup>۱</sup> (*Crocus sativus* L.) یک منبع فیتوبیوتیکی طبیعی است که می‌تواند موجب بهبود سلامت و عملکرد حیوانات شود. حدود ۹۲/۶ درصد بخش گل زعفران (پس از جداسازی کلالة<sup>۲</sup>) به‌صورت ضایعات دور ریخته می‌شود (Chen et al., 2021)، در حالی که حاوی مقادیر قابل توجهی از فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، کومارین‌ها، اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها و ویتامین‌ها است و فلاونول‌ها (کامفرول، کوئرستین و ایزورامنتین) و آنتوسیانین‌ها (دلفینیدین، پتونیدین و مالویدین) در آن وجود دارد (Zhou et al., 2022; Lachguer et al., 2023). گلبرگ زعفران دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است که علیه باکتری‌های بیماری‌زا عمل می‌کند و تعدیل‌کننده ایمنی می‌باشد (Hosseini et al., 2018). در تحقیقی، کاربرد عصاره اتانولی گلبرگ زعفران در بره‌ها موجب بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی شد و اکسیداسیون لیپیدها را کاهش داد. همچنین، اثراتی مشابه با اثر

ویتامین E بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده گردید (Alipour et al., 2019). علاوه بر این، محققان بیان کردند که مصرف ۹ و ۱۸ درصد ماده خشک عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران می‌تواند به بهبود تخمیر برون‌تنی شکمبه از طریق کاهش فعالیت متانوژن‌ها و پروتوزوآها کمک کند (Alipour et al., 2021). محققان دیگری کاربرد بقایای علوفه‌ای زعفران به‌عنوان خوراک دام (Kardan Moghaddam et al., 2015; 2016) و مصرف عصاره گلبرگ زعفران در جیره پرندگان (Hosseini-Vashan et al., 2017) را پیشنهاد نمودند. در مجموع، سالانه مقادیر قابل توجهی گلبرگ زعفران پس از جداسازی کلالة باقی می‌ماند که پتانسیل مصرف به‌عنوان یک افزودنی فیتوبیوتیکی را دارا می‌باشد و می‌تواند باعث ایجاد ارزش افزوده از ضایعات زعفران شود. بقایای مذکور قابلیت بهبود تخمیر شکمبه، کاهش اتلاف مواد مغذی و در نتیجه بهبود وضعیت زیست‌محیطی را دارا است، اما تحقیقات در این زمینه کامل نیست (Alipour et al., 2019; 2021). از سوی دیگر، سازوکار آثار مثبت گلبرگ زعفران بر میکروارگانیسم‌ها، فعالیت آنزیم‌ها و سلامت آنتی‌اکسیدانی شکمبه به طور کامل بررسی نشده است. در پژوهش حاضر فرض شد که استفاده از سطوح اندک گلبرگ زعفران در جیره (به‌عنوان یک افزودنی طبیعی حاوی ترکیبات زیست‌فعال) بتواند جمعیت‌های میکروبی، فعالیت‌های آنزیمی و سلامت آنتی‌اکسیدانی شکمبه‌ای را بهبود دهد. بنابراین، این تحقیق با هدف بررسی سازوکار میکروبی-آنزیمی و آنتی‌اکسیدانی اثرات مثبت گلبرگ زعفران بر متابولیسم انرژی و نیتروژن و سلامت شکمبه‌ای گوسفند به روش برون‌تنی اجرا شد.

## مواد و روش‌ها

## تهیه نمونه، طرح و تیمارهای آزمایشی

گلبرگ زعفران در آبان از مزارع واقع در شهرستان سرایان خراسان جنوبی جمع‌آوری شد. آزمایش تحت کد اخلاق IR.MODARES.REC.1399.223 و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار، ۳ تکرار و در ۲ سری (run) در هفته‌های مختلف (یعنی در مجموع ۶ مشاهده برای

2. stigma (thread-like parts of the flower)

1. saffron petals

درجه سانتی گراد) قرار داده شدند. تخمیر در دو آزمون مجزای ۲۴ و ۷۲ ساعته انجام شد و در پایان، حجم کل گاز تولیدی یادداشت گردید (Menke et al., 1979).

#### تعیین جمعیت پروتوزوایی و باکتریایی

در پایان انکوباسیون، نسبت مناسبی از شیرابه با محلول فرمالین سالیین مخلوط شد و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد ذخیره گردید. تعداد پروتوزوآهای موجود در واحد حجم هر نمونه با استفاده از لام هموسیستمتر و میکروسکوپ نوری شمارش شد (Dehority, 2003) و محاسبات با توجه به بیشترین فراوانی مشاهده شده در مربع های لام صورت گرفت.

برای برآورد جمعیت باکتری های سلولولیتیک، انتقال محیط کشت و کاغذ صافی واتمن نمره ۱ (منبع الیاف) به لوله های هانگیت صورت گرفت و اتوکلاو گردید. پس از تزریق کردن رقت های مختلف شیرابه تخمیری به لوله ها، انکوباسیون بی هوازی ۲۱ روزه، در انکوباتور با دمای ۳۹ درجه سانتیگراد انجام شد. در پایان، تعداد کل سلولولیتیک ها از روی تجزیه و شکست کاغذ صافی تعیین گردید. برای تخمین جمعیت باکتری های پروتئولیتیک، محیط کشت مایع اختصاصی و ژلاتین (به عنوان منبع پروتئین) در لوله های هانگیت ریخته شد.

هر صفت) انجام شد. تیمارها عبارت بودند از: ۱- جیره پایه فاقد گلبرگ زعفران (شاهد)، ۲- جیره حاوی ۱ درصد گلبرگ زعفران، ۳- جیره حاوی ۲ درصد گلبرگ زعفران، و ۴- جیره حاوی ۳ درصد گلبرگ زعفران (بر اساس ماده خشک). جیره پایه حاوی یونجه خشک، کاه گندم، دانه جو، دانه ذرت، کنجاله سویا، نمک و مکمل ویتامین-مواد معدنی بود (جدول ۱) و در سایر تیمارها، گلبرگ زعفران به صورت یک افزودنی جایگزین بخشی از کل جیره شد.

#### آزمون تولید گاز برون تنی

به منظور انجام آزمون تولید گاز، مقدار ۲۰۰ میلی گرم از هر جیره آزمایشی داخل سرنگ های شیشه ای مجزا (۳ تکرار و ۲ سری) ریخته شد. شیرابه شکمبه قبل از خوراک دهی وعده صبح از گوسفندان شال نر فیستوله دار تهیه و با پارچه متقال چهار لایه صاف گردید. بزاق مصنوعی با مخلوط کردن نسبت مناسب آب مقطر، بافر، میکرومینرال، ماکرومینرال و احیاکننده طبق روش استاندارد تهیه شد، به نسبت ۲ به ۱ با شیرابه مخلوط گردید و تحت جریان CO<sub>2</sub> قرار گرفت. حجم ۳۰ میلی لیتر مخلوط شیرابه شکمبه-بزاق مصنوعی به هر سرنگ تزریق شد و سرنگ ها داخل انکوباتور (دمای ۳۹

جدول ۱. اجزاء خوراکی، ترکیب شیمیایی (درصد ماده خشک) و انرژی قابل سوخت و ساز (مگا کالری در کیلوگرم ماده خشک) جیره پایه.

Table 1. Feed ingredients, chemical composition (% DM) and metabolizable energy (Mcal.kg<sup>-1</sup> DM) of basal diet.

| اجزاء خوراکی<br>Feed ingredients                |     | ترکیب شیمیایی<br>Chemical composition                  |       |
|-------------------------------------------------|-----|--------------------------------------------------------|-------|
| یونجه خشک<br>Alfalfa hay                        | 35  | پروتئین خام<br>Crude protein                           | 14.15 |
| کاه گندم<br>Wheat straw                         | 5   | فیبر نامحلول در شوینده خنثی<br>Neutral detergent fiber | 28.15 |
| دانه جو<br>Barley grain                         | 26  | فیبر نامحلول در شوینده اسیدی<br>Acid detergent fiber   | 16.73 |
| دانه ذرت<br>Corn grain                          | 25  | خاکستر<br>Ash                                          | 5.57  |
| کنجاله سویا<br>Soybean meal                     | 8   | عصاره اتری<br>Ether extract                            | 2.56  |
| نمک<br>NaCl                                     | 0.5 | کربوهیدرات های غیر فیبری<br>Non-fiber carbohydrates    | 49.60 |
| پرمیکس معدنی-ویتامینی<br>Mineral-vitamin premix | 0.5 | انرژی قابل سوخت و ساز<br>Metabolizable energy          | 2.67  |

جیره پایه فاقد گلبرگ زعفران بود. در سایر تیمارها، سطوح ۱، ۲ و ۳ درصد از گلبرگ زعفران به ترتیب جایگزین بخشی از کل جیره شدند.  
The basal diet was free of saffron petals. In other treatments, the levels of 1, 2 and 3% of saffron petals (on DM basis) replaced a portion of the total diet, respectively.

### ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تولید متان

قدرت کل آنتی‌اکسیدانی شیرابه تخمیری توسط روش توان آنتی‌اکسیدانی احیاکنندگی آهن فریک<sup>۴</sup> بررسی شد و توان شیرابه تخمیری تیمارهای مختلف در احیای یون‌های  $Fe^{3+}$  به  $Fe^{2+}$  در حضور معرف تری‌پیریدیل تیرازین توسط روش فتومتری اندازه‌گیری گردید (Benzie & Strain, 1996). به‌منظور تعیین متان حاصل از تخمیر جیره‌های مختلف، آزمون‌های گاز ۲۴ و ۷۲ ساعته مانند بالا انجام شد و حجم کل گاز تولیدی پس از پایان انکوباسیون ثبت گردید. سپس، حجم ۴ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم ۱۰ مولار به داخل هر سرنگ تزریق شد تا دی‌اکسید کربن را جذب نماید. پس از پایین‌آمدن پیستون، حجم گاز باقیمانده داخل سرنگ مجدداً ثبت گردید که معادل متان (و مقادیر ناچیزی هیدروژن) می‌باشد (Fievez et al., 2005).

### ضریب هضم ماده آلی و انرژی قابل سوخت‌وساز

پس از پایان انکوباسیون ۲۴ ساعته، حجم گاز خالص تولیدی محاسبه شد. سپس، مقادیر ضریب هضم ماده آلی و انرژی قابل سوخت‌وساز جیره‌های آزمایشی با قراردادن حجم گاز خالص ۲۴ ساعته، پروتئین خام، خاکستر و عصاره اتری در معادلات ۱ و ۲ (Menke et al., 1979) به دست آمد.

$$ME = 2.20 + (0.136 \times GP_{24}) + (0.057 \times CP) + (0.0029 \times EE^2) \quad (1)$$

$$OMD (\%) = 14.88 + (0.889 \times GP_{24}) + (0.448 \times CP) + (0.651 \times Ash) \quad (2)$$

در معادلات بالا، ME مقدار انرژی قابل سوخت‌وساز (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)، GP حجم گاز تولیدی (میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک انکوبه‌شده)، CP پروتئین خام (درصد)، EE عصاره اتری (درصد)، OMD ضریب هضم ماده آلی (درصد) و Ash خاکستر خام (درصد) است.

### سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی، تولید توده

#### میکروبی و شاخص تفکیک‌پذیری

برای محاسبه سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی<sup>۵</sup> در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت، محتویات تخمیری داخل هر

پس از اتوکلاو، تزریق شیرابه و انکوباسیون مانند بالا انجام شد و تعداد لوله‌های مثبت و منفی از روی تجزیه و تغییر حالت ژلاتین به دست آمد. در این روش، تعداد لوله با محتویات تجزیه‌شده و تجزیه‌نشده مشخص می‌گردد. سپس جمعیت باکتری با مراجعه به جداول محتمل‌ترین عدد<sup>۶</sup> حاصل می‌آید (Dehority, 2003).

### آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه‌ای

برای تعیین فعالیت آنزیم‌های شکمبه‌ای آزمون گاز انجام شد و محتویات تخمیری به ظرف ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد. پس از افزودن پنج میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های لیزوزیم و تتراکلرید کربن، انکوباسیون ۳ ساعت؛ ۳۹ درجه سانتیگراد انجام گردید. برای توقف واکنش، ظرف بر روی یخ قرار داده شد. نمونه سونیکاسیون (۶ دقیقه؛ ۵۰ میلی‌ولت) و سپس سانتریفیوژ (۲۰ دقیقه؛  $27000 \times g$ ؛ ۴ درجه سانتیگراد) گردید و لایه رویی جدا شد. برای اندازه‌گیری فعالیت کربوکسی‌متیل سلولاز، ابتدا محلول‌های بافر، سوبسترا (کربوکسی‌متیل سلولز)، معرف اسید دی‌نیتروسالسیلیک، نمک راشل و استاندارد گلوکز تهیه شد. سپس، مخلوط سنجش حاوی بافر، شیرابه شکمبه و سوبسترا آماده و انکوباسیون (۱۰ دقیقه؛ ۳۹ درجه سانتیگراد) گردید. واکنش با افزودن اسید دی‌نیتروسالسیلیک متوقف شد و جذب نوری در طول موج ۵۷۵ نانومتر اندازه گرفته شد. تعیین فعالیت آویسلاز شبیه آنزیم قبل بود، اما از آویسل (میکرو کریستالین سلولز) به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. محلول آویسل ۴۸ ساعت در یخچال نگهداری گردید و به هم‌زدن نمونه‌ها در طول انکوباسیون وجود داشت. به‌منظور بررسی فعالیت آمیلاز، از نشاسته به‌عنوان سوبسترا استفاده شد و آزادسازی قند طی ۳۰ دقیقه انکوباسیون تعیین گردید. فعالیت تجزیه‌کنندگی کاغذ صافی نیز مشابه کربوکسی‌متیل سلولاز بود، اما سوبسترای آزمایشی کاغذ صافی و اتمن بود و انکوباسیون یک ساعته انجام گردید. فعالیت پروتئاز با استفاده از کازئین به‌عنوان سوبسترا و ثبت پروتئین هیدرولیز شده طی ۲ ساعت انکوباسیون برآورد شد (Vercoc et al., 2010).

5. Truly degraded substrate (TDS)

3. Most probable number (MPN)

4. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

(به عنوان حامل) تزریق شد. در نهایت، غلظت هر اسید چرب و کل اسیدهای چرب فرار تولیدی برآورد گردید.

### تجزیه آماری

داده‌های حاصل از دو زمان انکوباسیون ۲۴ و ۷۲ ساعته به صورت مجزا در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه آماری شد. هر زمان انکوباسیون شامل ۴ تیمار، ۳ تکرار و ۲ سری بود، یعنی در مجموع ۶ مشاهده برای تیمار وجود داشت. تجزیه داده‌ها با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS (ویرایش ۹/۱) انجام شد. در این تحقیق، تیمار به عنوان اثر ثابت در نظر گرفته شد و سری به عنوان اثر تصادفی وارد مدل گردید. مدل آماری به صورت معادله ۵ بود:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + R_j(T) + e_{ij} \quad (5)$$

در مدل بالا،  $Y_{ijk}$  مقدار هر مشاهده،  $\mu$  میانگین،  $T_i$  اثر ثابت تیمار،  $R_j(T)$  اثر تصادفی سری در تیمار و  $e_{ij}$  خطای باقیمانده است. مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی با آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح ۵ درصد انجام شد.

### نتایج و بحث

#### جمعیت‌های میکروبی و تولید توده میکروبی

جمعیت‌های میکروبی و تولید توده میکروبی برون تنی تیمارها در جدول ۲ ارائه شده است. جمعیت پروتوزوایی با افزودن سطوح گلبرگ زعفران به جیره، به طور معنی داری کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). حداقل جمعیت پروتوزوآهای طی دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت، در تیمار حاوی ۳ درصد افزودنی مشاهده شد. دلیل کاهش پروتوزوآها به وجود ترکیبات زیست فعال مربوط بود (Vercoc et al., 2010)، زیرا این ترکیبات ممکن است در ساختار و عملکرد غشای پروتوزوآها آسیب وارد کنند. همچنین، این احتمال وجود دارد که آنزیم‌های پروتوزوایی را غیرفعال نمایند. از سوی دیگر، برخی متابولیت‌های گیاهی پروتوزوآها را از سوبسترا و یون‌های فلزی مورد نیاز محروم می‌کنند (Zhou et al., 2011). کاهش جمعیت پروتوزوایی می‌تواند بازچرخ نیتروژن بین باکتری‌ها و پروتوزوآ را کمتر نماید و موجب بهبود رشد و بازده توده میکروبی و کاهش متان گردد (Dehority, 2003; Newbold et al., 2015). یافته‌ها با نتایج به

سرنگ در انتهای انکوباسیون با کاربرد محلول شوینده خنثی به مدت یک ساعت جوشانده شد و در نهایت تحت مکش پمپ خلأ صاف گردید. بقایا در آون خشک شد و وزن به دست آمد. پس از آن، سوزاندن در کوره الکتریکی انجام شد و مجدداً توزین گردید. در پایان، میزان سوبسترای تجزیه شده حقیقی با کسر مواد باقیمانده از وزن نمونه اولیه پیش از انکوباسیون به دست آمد. به منظور تخمین میزان تولید توده میکروبی<sup>۶</sup> و شاخص تفکیک پذیری<sup>۷</sup> نمونه‌ها، مقادیر گاز تولیدی و سوبسترای تجزیه شده حقیقی زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب در معادلات ۳ و ۴ قرار داده شد (Vercoc et al., 2010).

$$MBP = TDS - (GP \times 2.2) \quad (3)$$

$$PF = TDS/GP \quad (4)$$

در معادلات فوق، MBP تولید توده میکروبی (میلی گرم در گرم ماده خشک)، TDS میزان سوبسترای تجزیه شده حقیقی (میلی گرم در گرم ماده خشک) GP حجم تولید گاز (میلی لیتر به ازای یک گرم ماده خشک)، PF شاخص تفکیک پذیری (میلی گرم به ازای هر میلی لیتر) و ۲/۲ ضریب ثابت استوکیومتری است.

#### تعیین pH، نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار

پس از پایان انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته، میزان pH محتویات هر سرنگ توسط pH متر دیجیتال تعیین شد. سپس، ۵ میلی لیتر شیرابه با ۰/۱ میلی لیتر اسید سولفوریک ۵۰ درصد مخلوط، و برای تعیین آمونیاک و اسیدهای چرب فرار به صورت منجمد در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید. غلظت نیتروژن آمونیاکی نمونه‌ها بر اساس روش فنل-هیپوکلرایت، نورسنجی و دستگاه میکروپلیتریدر (مدل Epoch) تعیین شد (Galyean, 2010). به منظور اندازه گیری اسیدهای چرب فرار، حجم ۱ میلی لیتر از شیرابه ذخیره شده با ۰/۲ میلی لیتر اسید متافسفريك ۲۵ درصد (حاوی اسید ۲- اتیل بوتیریک ۰/۲ درصد؛ به عنوان استاندارد داخلی) مخلوط و به مدت ۱ ساعت در یخچال قرار داده شد. پس از آن، مایع رویی توسط سانتریفیوژ جدا گردید و به دستگاه گاز کروماتوگرافی (UNICAM 4600, SB Analytical, UK) مجهز به ستون مویینه (کپیلاری؛ Agilent J&W HP-FFAP, USA) و گاز هلیوم

جدول ۲. اثر سطوح مختلف گلبرگ زعفران در جیره بر جمعیت پروتوزوایی ( $\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ )، باکتری‌ها ( $\text{Log}_{10} \text{ mL}^{-1}$ ) و تولید توده میکروبی ( $\text{g.kg}^{-1} \text{ DM}$ ) برون تنی شکمبه

| Table 2. Effect of different saffron petals levels in diet on <i>in vitro</i> ruminal protozoa ( $\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ), bacteria ( $\text{Log}_{10} \text{ mL}^{-1}$ ) and microbial biomass production ( $\text{g.kg}^{-1} \text{ DM}$ ) |                               |                                            |                                            |                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|
| درصد گلبرگ زعفران<br>Saffron petals (%)                                                                                                                                                                                                             | کل پروتوزوآ<br>Total protozoa | باکتری سلولولیتیک<br>Cellulolytic bacteria | باکتری پروتئولیتیک<br>Proteolytic bacteria | توده میکروبی<br>Microbial biomass |
| <b>24 h</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                               |                                            |                                            |                                   |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                   | 6.75 <sup>a</sup>             | 8.283 <sup>d</sup>                         | 8.189 <sup>a</sup>                         | 129 <sup>c</sup>                  |
| 1                                                                                                                                                                                                                                                   | 5.75 <sup>b</sup>             | 8.328 <sup>c</sup>                         | 8.162 <sup>a</sup>                         | 132 <sup>c</sup>                  |
| 2                                                                                                                                                                                                                                                   | 5.10 <sup>c</sup>             | 8.402 <sup>b</sup>                         | 8.152 <sup>a</sup>                         | 152 <sup>b</sup>                  |
| 3                                                                                                                                                                                                                                                   | 5.00 <sup>c</sup>             | 8.476 <sup>a</sup>                         | 8.152 <sup>a</sup>                         | 159 <sup>a</sup>                  |
| SEM                                                                                                                                                                                                                                                 | 0.061                         | 0.013                                      | 0.016                                      | 2.20                              |
| P-value                                                                                                                                                                                                                                             | <0.001                        | <0.001                                     | 0.105                                      | <0.001                            |
| <b>72 h</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                               |                                            |                                            |                                   |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                   | 4.90 <sup>a</sup>             | 8.211 <sup>d</sup>                         | 8.130 <sup>a</sup>                         | 120 <sup>c</sup>                  |
| 1                                                                                                                                                                                                                                                   | 3.55 <sup>b</sup>             | 8.286 <sup>c</sup>                         | 8.119 <sup>a</sup>                         | 129 <sup>b</sup>                  |
| 2                                                                                                                                                                                                                                                   | 2.85 <sup>c</sup>             | 8.371 <sup>b</sup>                         | 8.111 <sup>a</sup>                         | 136 <sup>a</sup>                  |
| 3                                                                                                                                                                                                                                                   | 2.75 <sup>c</sup>             | 8.424 <sup>a</sup>                         | 8.103 <sup>a</sup>                         | 139 <sup>a</sup>                  |
| SEM                                                                                                                                                                                                                                                 | 0.061                         | 0.011                                      | 0.014                                      | 2.39                              |
| P-value                                                                                                                                                                                                                                             | <0.001                        | <0.001                                     | 0.112                                      | 0.001                             |

SEM، خطای استاندارد میانگین‌ها. در هر ستون، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

SEM, standard error of the means. In each column, different superscripts indicate significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ).

جمعیت باکتری‌های پروتئولیتیک با افزودن گلبرگ زعفران در جیره روند کاهشی غیرمعنی‌داری داشت (جدول ۲)، که با فعالیت پروتئاز ۲۴ و ۷۲ ساعته (جدول ۳) مطابقت دارد. اطلاعات خاصی درباره اثر گلبرگ زعفران وجود ندارد اما در سایر مطالعات، اسانس‌های گیاهی (فیتوبیوتیک) منجر به کاهش فعالیت پروتئازی شدند، که به وجود ترکیبات زیست‌فعال، به‌ویژه فنول‌ها، مربوط بوده است (Duval et al., 2007; Abdillan et al., 2024).

مطابق جدول ۲، گلبرگ زعفران منجر به افزایش تولید توده میکروبی شد ( $P < 0.05$ ) که با توضیحات بالا درباره افزایش تعداد سلولولیتیک‌ها (ازجمله فراوان‌ترین گروه‌های شکمبه‌ای) قابل تفسیر است و در واقع (طبق جدول ۴) سوبسترای قابل‌تجزیه بیشتر و با همزمانی مناسب‌تری برای رشد و فعالیت باکتری‌ها مهیا شده است (McDonald et al., 2022). هم‌چنین، طبق جدول ۵، اثرات مثبت آنتی‌اکسیدانی گلبرگ زعفران در ایجاد محیط شکمبه‌ای مناسب‌تر را در تفسیر این داده باید در نظر داشت؛ زیرا فلاونوئیدها با به دام‌انداختن رادیکال‌های آزاد و کیلیت کردن فلزات، نقش مؤثری در کاهش تنش اکسیداتیو ایفا می‌کنند (Ognik et al., 2016). این موضوع احتمالاً با فراهم کردن شرایط زیستی مناسب‌تر

دست‌آمده از دیگر گیاهان حاوی متابولیت‌های زیست‌فعال (مانند عصاره شیرین بیان غنی از فلاونوئیدها) هم‌سو بود (Ramos-Morales et al., 2015).

مصرف گلبرگ زعفران باعث افزایش جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک در انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته شد ( $P < 0.05$ )، به طوری که بیشترین تعداد مربوط به تیمار حاوی ۳ درصد افزودنی بود. اطلاعاتی در خصوص اثر گلبرگ یا دیگر فرآورده‌های زعفران بر جمعیت‌های میکروبی شکمبه‌ای در دست نیست. به هر حال، افزایش سلولولیتیک‌ها در پژوهش حاضر به ترکیبات زیست‌فعال گیاه مرتبط است که باعث کاهش پروتوزوآ شد (جدول ۲) و در نتیجه، شکار باکتری‌ها به‌ویژه سلولولیتیک‌ها را کاهش داده و منجر به بهبود رشد و جمعیت این باکتری‌ها شده است (Dehority, 2003). در تأیید نتایج آزمایش حاضر، بهبود جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک در اثر مصرف مواد مؤثره سایر گیاهان مشاهده گردیده است (Ku-Vera et al., 2020). هم‌چنین، گزارش شده است که یک افزودنی خاص می‌تواند به استقرار بهتر برخی جمعیت‌های میکروبی در دستگاه گوارش کمک کند که باعث افزایش فعالیت آنزیمی می‌شود و این موضوع بر عملکرد حیوان اثر مثبت می‌گذارد (Radzikowski, 2017).



شکمه‌ای، باعث بهبود رشد و فعالیت باکتری‌ها شده است.

### فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک

طبق اطلاعات جدول ۳، اثر تیمارها بر آنزیم‌های فیبرولیتیک (کربوکسی‌متیل سلولاز، آویسلاز، فعالیت تجزیه‌کنندگی کاغذ صافی) و آمیلاز در انکوباسیون‌های ۲۴ و ۷۲ ساعته معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). بیشترین فعالیت در هر دو زمان در تیمارهای حاوی ۲ و ۳ درصد افزودنی دیده شد. اطلاعاتی در خصوص اثر فرآورده‌های زعفران بر فعالیت آنزیمی شکمبه در دست نیست. به هر حال، تأثیر مثبت تیمارهای حاضر بر آنزیم‌های فیبرولیتیک و آمیلاز را باید به کاهش پروتوزوآها (کاهش شکارگری)، افزایش باکتری‌های سلولولیتیک (طبق جدول ۲) و احتمالاً بهبود آمیلولیتیک‌ها در اثر ترکیبات زیست‌فعال مرتبط دانست (Dehority, 2003)؛ زیرا یک افزودنی می‌تواند به نفع برخی میکروب‌های خاص در دستگاه گوارش عمل کند که باعث افزایش فعالیت آنزیمی آن گروه‌ها می‌شود (Radzikowski, 2017). دیگر محققان نیز بیان کردند ترکیبات فیتوبیوتیکی

عملکرد آنزیم‌های گوارشی را افزایش می‌دهند (Buragohain, 2017). به‌علاوه، افزایش فعالیت آمیلاز در این پژوهش با کاهش نسبت استات به پروپیونات در جیره‌های حاوی گلبرگ زعفران (جدول ۶) هم‌خوانی دارد. تحقیقات دیگر نیز اثر مثبت برخی گیاهان دارویی بر عملکرد گوارش نشخوارکنندگان و افزایش فعالیت‌های آنزیمی از جمله آمیلاز را نشان دادند (Bąkowski & Kiczorowska, 2021; Sheida et al., 2023).

برعکس آنزیم‌های فیبرولیتیک و آمیلاز، فعالیت پروتئاز با افزودن گلبرگ زعفران به جیره روند کاهشی اندک اما غیرمعنی‌دار را نشان داد. این روند با کاهش آمونیاک (جدول ۵) هم‌راستا می‌باشد و نشانه‌ای از روند کلی کاهش تجزیه و تخریب پروتئین است. اطلاعات خاصی درباره اثر گلبرگ زعفران وجود ندارد، اما محققان اثر اسانس‌ها و متابولیت‌های دیگر گیاهان در کاهش باکتری‌های با توان زیاد تولید آمونیاک (Ku-Vera et al., 2020) و کاهش فعالیت پروتئاز (به‌دلیل اتصال ترکیبات زیست‌فعال مانند گروه هیدروکسیل فنولی به آنزیم) (Duval et al., 2007; Abdillah et al., 2024) را گزارش دادند.

جدول ۳. اثر سطوح مختلف گلبرگ زعفران در جیره بر فعالیت برون‌تنی برخی آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه‌ای.

Table 3. Effect of different saffron petals levels in diet on *in vitro* activity of some ruminal hydrolytic enzymes.

| درصد گلبرگ زعفران<br>Saffron petals (%) | کربوکسی‌متیل سلولاز<br>CMCase ( $\mu\text{mol glucose.mL}^{-1}$ per h) | آویسلاز<br>Avicelase ( $\mu\text{mol glucose.mL}^{-1}$ per h) | تجزیه‌کنندگی کاغذ<br>صافی<br>FPD ( $\mu\text{mol glucose.mL}^{-1}$ h) | آمیلاز<br>Amylase ( $\mu\text{mol glucose.mL}^{-1}$ h) | پروتئاز<br>Protease (mg protein.mL <sup>-1</sup> h) |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>24 h</b>                             |                                                                        |                                                               |                                                                       |                                                        |                                                     |
| 0                                       | 4.46 <sup>b</sup>                                                      | 2.62 <sup>b</sup>                                             | 2.80 <sup>b</sup>                                                     | 13.04 <sup>c</sup>                                     | 0.738 <sup>a</sup>                                  |
| 1                                       | 4.58 <sup>b</sup>                                                      | 2.74 <sup>b</sup>                                             | 2.86 <sup>ab</sup>                                                    | 14.50 <sup>b</sup>                                     | 0.732 <sup>a</sup>                                  |
| 2                                       | 4.61 <sup>ab</sup>                                                     | 2.92 <sup>a</sup>                                             | 2.95 <sup>a</sup>                                                     | 15.88 <sup>a</sup>                                     | 0.725 <sup>a</sup>                                  |
| 3                                       | 4.67 <sup>a</sup>                                                      | 2.99 <sup>a</sup>                                             | 3.00 <sup>a</sup>                                                     | 16.45 <sup>a</sup>                                     | 0.721 <sup>a</sup>                                  |
| SEM                                     | 0.070                                                                  | 0.079                                                         | 0.064                                                                 | 0.226                                                  | 0.017                                               |
| P-value                                 | 0.045                                                                  | 0.010                                                         | 0.066                                                                 | 0.002                                                  | 0.183                                               |
| <b>72 h</b>                             |                                                                        |                                                               |                                                                       |                                                        |                                                     |
| 0                                       | 3.94 <sup>c</sup>                                                      | 2.46 <sup>b</sup>                                             | 3.80 <sup>b</sup>                                                     | 10.97 <sup>b</sup>                                     | 0.553 <sup>a</sup>                                  |
| 1                                       | 4.16 <sup>b</sup>                                                      | 2.88 <sup>a</sup>                                             | 3.93 <sup>b</sup>                                                     | 11.01 <sup>b</sup>                                     | 0.556 <sup>a</sup>                                  |
| 2                                       | 4.24 <sup>a</sup>                                                      | 3.03 <sup>a</sup>                                             | 3.96 <sup>b</sup>                                                     | 12.19 <sup>ab</sup>                                    | 0.533 <sup>a</sup>                                  |
| 3                                       | 4.28 <sup>a</sup>                                                      | 3.12 <sup>a</sup>                                             | 4.21 <sup>a</sup>                                                     | 12.85 <sup>a</sup>                                     | 0.526 <sup>a</sup>                                  |
| SEM                                     | 0.077                                                                  | 0.142                                                         | 0.066                                                                 | 0.66                                                   | 0.015                                               |
| P-value                                 | 0.000                                                                  | 0.008                                                         | 0.014                                                                 | 0.039                                                  | 0.155                                               |

SEM، خطای استاندارد میانگین‌ها. در هر ستون، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

FPD, filter paper-degrading activity; SEM, standard error of the means. In each column, different superscripts indicate significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ).

## تولید گاز، قابلیت هضم و فراسنجه‌های تخمیری

چنان‌که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، با افزایش سطح گلبرگ زعفران در جیره، مقادیر تولید گاز، قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل سوخت‌وساز و سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی (۲۴ و ۷۲ ساعته) در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت ( $P < 0.05$ ) و در جیره ۳ درصد گلبرگ زعفران به بیشترین مقدار رسید. این بهبود را باید به مواد زیست‌فعال گیاه (از جمله فلاونوئیدها) نسبت داد که با کاهش جمعیت پروتوزوا و افزایش میکروب‌های سلولولیتیک (جدول ۲)، آنزیم‌های فیبرولیتیک و آمیلاز (جدول ۳) باعث بهبود تخمیر و هضم خوراک شده‌اند. افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در اثر گلبرگ زعفران (جدول ۵) و در نتیجه کاهش تنش اکسیداتیو در محیط تخمیر نیز در بهبود شرایط برای فعالیت میکروبی و در نهایت هضم خوراک مؤثر بوده است (McDonald et al., 2022). در تأیید این نتایج، مطالعات نشان داده‌اند که متابولیت‌های ثانویه با تقویت فعالیت میکروب‌های مفید، هدررفت تخمیری منابع انرژی و پروتئین را کاهش می‌دهند (Vercoe et al., 2010). فلاونوئیدها (موجود در گلبرگ زعفران) غنی از بخش‌های کامفرول و کورستین هستند. این متابولیت‌ها با بهبود تجزیه الیاف، اسید چرب فرار و سیستم ایمنی، عملکرد

نشخوارکنندگان را ارتقا می‌دهند، اما مصرف بیش از حد آنها می‌تواند آثار منفی در هضم و جذب داشته باشد (Olagaray & Bradford, 2019). بنابراین، بیشینه سطح مجاز مصرف آن‌ها باید رعایت شود و در پژوهش حاضر نیز از سطوح کم گلبرگ زعفران در حد یک افزودنی استفاده شد. در تحقیق دیگری نیز مکمل‌های خوراکی گیاهی (مانند زیره، رازیانه و بادرنجبویه)، گاز تولیدی، اسیدهای چرب فرار و تخمیر برون‌تنی شکمبه را افزایش دادند که ناشی از ترکیبات فلاونوئیدی موجود در آن‌ها بود (Rahmy et al., 2019).

شاخص تفکیک‌پذیری در انکوباسیون ۲۴ ساعته در اثر گلبرگ زعفران افزایش یافت ( $P = 0.01$ )، اما ۷۲ ساعت بعد از آغاز انکوباسیون تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نداشت. هرچه شاخص مذکور بیشتر باشد، نشان‌دهنده بهبود بازده تخمیر و توده میکروبی است (Vercoe et al., 2010). لذا، افزایش شاخص تفکیک‌پذیری ۲۴ ساعته نشان داد که با افزودن گلبرگ زعفران، سهم بیشتری از سوبسترای آلی از مسیر تولید گاز و اسیدهای چرب فرار به سمت تولید پروتئین میکروبی سوق داده شده است (Vercoe et al., 2010). اما در زمان ۷۲ ساعت، به نظر می‌رسد ورود فرآورده‌های حاصل از تجزیه سوبسترا در مسیرهای مختلف تفاوت زیادی نداشته است.

جدول ۴. اثر سطوح مختلف گلبرگ زعفران در جیره بر تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیر برون‌تنی شکمبه

Table 4. Effect of different saffron petals levels in diet on *in vitro* ruminal gas production and fermentation parameters

| درصد گلبرگ زعفران<br>Saffron petals (%) | تولید گاز<br>Gas production<br>(mL.200 mg <sup>-1</sup> DM) | هضم ماده آلی<br>Organic matter<br>digestibility (%) | انرژی قابل سوخت‌وساز<br>Metabolisable<br>energy (MJ.kg <sup>-1</sup><br>DM) | سوبسترای<br>تجزیه‌شده حقیقی<br>TDS (%) | شاخص<br>تفکیک‌پذیری<br>PF (mg<br>TDS.mL <sup>-1</sup> GP) |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>24 h</b>                             |                                                             |                                                     |                                                                             |                                        |                                                           |
| 0                                       | 45.15 <sup>c</sup>                                          | 64.7 <sup>c</sup>                                   | 9.08 <sup>c</sup>                                                           | 62.2 <sup>d</sup>                      | 2.77 <sup>b</sup>                                         |
| 1                                       | 47.4 <sup>b</sup>                                           | 66.7 <sup>b</sup>                                   | 9.38 <sup>b</sup>                                                           | 65.3 <sup>c</sup>                      | 2.76 <sup>b</sup>                                         |
| 2                                       | 48.25 <sup>b</sup>                                          | 67.4 <sup>b</sup>                                   | 9.50 <sup>b</sup>                                                           | 68.2 <sup>b</sup>                      | 2.83 <sup>a</sup>                                         |
| 3                                       | 49.8 <sup>a</sup>                                           | 68.8 <sup>a</sup>                                   | 9.71 <sup>a</sup>                                                           | 70.6 <sup>a</sup>                      | 2.84 <sup>a</sup>                                         |
| SEM                                     | 0.512                                                       | 0.455                                               | 0.069                                                                       | 0.738                                  | 0.007                                                     |
| P-value                                 | 0.004                                                       | 0.004                                               | 0.004                                                                       | <0.001                                 | 0.010                                                     |
| <b>72 h</b>                             |                                                             |                                                     |                                                                             |                                        |                                                           |
| 0                                       | 57.03 <sup>d</sup>                                          | -                                                   | -                                                                           | 74.7 <sup>d</sup>                      | 2.62 <sup>a</sup>                                         |
| 1                                       | 60.15 <sup>c</sup>                                          | -                                                   | -                                                                           | 79.1 <sup>c</sup>                      | 2.63 <sup>a</sup>                                         |
| 2                                       | 62.01 <sup>b</sup>                                          | -                                                   | -                                                                           | 81.8 <sup>b</sup>                      | 2.64 <sup>a</sup>                                         |
| 3                                       | 64.73 <sup>a</sup>                                          | -                                                   | -                                                                           | 85.1 <sup>a</sup>                      | 2.63 <sup>a</sup>                                         |
| SEM                                     | 0.621                                                       | -                                                   | -                                                                           | 0.664                                  | 0.008                                                     |
| P-value                                 | 0.002                                                       | -                                                   | -                                                                           | <0.001                                 | 0.478                                                     |

SEM، خطای استاندارد میانگین‌ها. در هر ستون، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

TDS, truly degraded substrate; PF, partitioning factor; SEM, standard error of the means. In each column, different superscripts indicate significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ).

ساعت کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). مهم‌ترین دلیل کاهش غلظت آمونیاک را باید به افت جمعیت پروتوزوایی (جدول ۲) در اثر متابولیت‌های ثانویه نسبت داد. در حقیقت، با کاهش تعداد پروتوزوآها توسط مواد زیست‌فعال، میزان شکار و تخریب باکتریایی کمتر شده و در نتیجه کاهش بازچرخ نیتروژن شکمبه‌ای، بهبود تولید توده میکروبی (افزایش ورود آمونیاک به پیکره باکتری‌ها) و اتلاف کمتر نیتروژن به شکل آمونیاک رخ داده است (Dehotity, 2003).

کاهش غلظت آمونیاک در نتیجه اثر منفی ترکیبات ثانویه گیاهی (مانند ترکیبات فنولی، تریپنی یا ساپونین‌ها) بر جمعیت پروتوزوایی توسط محققان دیگر نیز گزارش گردید (Newbold et al., 2015). در مطالعه دیگری نیز کاهش غلظت آمونیاک به تأثیر مهارکنندگی فلاونوئیدها (در مرکبات) و کاهش پروتوزوآها مربوط دانسته شد (Yu et al., 2024). به هر حال، غلظت نیتروژن آمونیاکی برون‌تنی در تمامی گروه‌های آزمایشی در دامنه مطلوب میکروارگانیسم‌ها ( $8/5$  تا  $30$  میلی گرم در دسی لیتر؛ McDonald et al., 2022) قرار داشت. بنابراین، کاهش آمونیاک و بهبود هم‌زمان رشد باکتری‌های سلولولیتیک و توده میکروبی در این تحقیق نشانه اثر مثبت گلبرگ زعفران بر متابولیسم نیتروژن در شکمبه است. در مطالعات دیگری، اسانس‌ها و مواد مؤثره گیاهی منجر به کاهش فعالیت پروتئاز و در نتیجه کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شدند (Duval et al., 2007; Abdillan et al., 2024).

#### اسیدهای چرب فرار

طبق یافته‌های جدول ۶، افزودن گلبرگ زعفران به جیره منجر به افزایش غلظت کل اسیدهای چرب فرار شد ( $P < 0.05$ ) که علت را می‌توان به افزایش میزان سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی (جدول ۴) در اثر بهبود فعالیت میکروبی و آنزیمی (جداول ۲ و ۳) ربط داد، زیرا بین تخمیر سوبسترا و تجمع اسیدهای چرب فرار ارتباط مثبت برقرار می‌باشد (McDonald et al., 2022). از سوی دیگر، کاربرد سطوح مختلف گلبرگ زعفران در جیره باعث افزایش درصد پروپیونات و کاهش نسبی استات شد و لذا نسبت استات به پروپیونات کمتر گردید ( $P < 0.05$ ). این رخداد به کاهش جمعیت پروتوزوایی و در نتیجه، انحراف نسبی در مسیر متابولیسمی هیدروژن به سمت پروپیونات مربوط است (Vercoc et al., 2024).

تولید متان، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، pH و آمونیاک چنان‌که در جدول ۵ ملاحظه می‌شود، سطوح مختلف گلبرگ زعفران موجب کاهش درصد متان در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون شد ( $P < 0.05$ ) و کمترین متان مربوط به تیمار حاوی ۳ درصد افزودنی بود. بخشی از کاهش تولید متان را می‌توان به کاهش تعداد پروتوزوآها در اثر مواد زیست‌فعال مربوط دانست، زیرا پروتوزوآها جزء تولیدکنندگان اصلی هیدروژن در شکمبه هستند و از طریق تأمین هیدروژن برای گونه‌های متان‌زا و با شکار و هضم باکتری‌ها، در انتشار متان مشارکت می‌کنند، اما گیاهان حاوی متابولیت‌های ثانویه (مانند فلاونوئیدها، تانن‌ها و ساپونین‌ها) می‌توانند باعث کاهش پروتوزوآهای شکمبه و در نتیجه افت متان شوند (Newbold et al., 2015). دلیل دیگر را باید به تخریب مستقیم باکتری‌های متان‌زا توسط اجزای زیست‌فعال و نیز کاهش نسبت استات به پروپیونات (مسیر پروپیونات هیدروژن را جذب می‌کند و کمتر به مسیر متان وارد می‌شود) در جیره‌های حاوی گلبرگ زعفران مربوط دانست که در مطالعات دیگر نیز تأیید شده است (Patra & Saxena, 2010). دیگران نیز گزارش کردند که ترکیبات فلاونوئیدی جیره مانند کورستین می‌توانند تولید متان را بدون تأثیر منفی بر تخمیر میکروبی شکمبه سرکوب کنند (Seradj et al., 2014).

در هر دو زمان انکوباسیون، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با مصرف گلبرگ زعفران بیشتر شد ( $P < 0.05$ ) و حداکثر آن در سطح ۳ درصد افزودنی مشاهده گردید (جدول ۵)، که به دلیل آنتی‌اکسیدان‌های قوی مانند سافرانال، کامفرول و کروسین در این بقایای گیاهی است (Lachguer et al., 2023). یافته‌های این مطالعه با سایر تحقیقات در خصوص افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن و فرآورده‌های دامی توسط گلبرگ زعفران هم‌سو است (Alipour et al., 2019; Ebrahimi et al., 2024). چنان‌که در بالا اشاره گردید، بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی محیط تخمیر با عملکرد بهتر میکروب‌ها و بهبود هضم و بازده جیره همراه بود.

همان‌طوری که در جدول ۵ دیده می‌شود، سطوح گلبرگ زعفران فاقد تأثیر معنی‌دار بر pH برون‌تنی شکمبه بود و pH در تمامی تیمارها در محدوده مطلوب محیط شکمبه‌ای (۶ تا ۷) قرار داشت (Dehority, 2003). غلظت نیتروژن آمونیاکی برون‌تنی با گنجاندن سطوح مختلف گلبرگ زعفران در جیره در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲

2010). در سایر مطالعات نیز استفاده از ترکیبات حاوی پروپیونات و کاهش استات شده است (Seradj et al., 2014).  
 فلاونوئیدها، باعث افزایش کل اسیدهای چرب فرار (Li et al., 2022) و بهبود بازده تخمیر در اثر افزایش

جدول ۵. اثر سطوح مختلف گلبرگ زعفران در جیره بر آزادسازی متان، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی pH و آمونیاک برون‌تنی شکمبه

Table 5. Effect of different saffron petals levels in diet on *in vitro* ruminal methane release, total antioxidant capacity (TAC), pH and ammonia

| درصد گلبرگ زعفران<br>Saffron petals (%) | متان<br>Methane (% of GP) | ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی<br>TAC ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | pH                | نیتروژن آمونیاکی<br>Ammonia-N ( $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ ) |
|-----------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>24 h</b>                             |                           |                                                                               |                   |                                                                    |
| 0                                       | 25.45 <sup>a</sup>        | 457 <sup>c</sup>                                                              | 6.43 <sup>a</sup> | 15.70 <sup>a</sup>                                                 |
| 1                                       | 21.76 <sup>b</sup>        | 516 <sup>b</sup>                                                              | 6.41 <sup>a</sup> | 15.03 <sup>b</sup>                                                 |
| 2                                       | 21.46 <sup>b</sup>        | 532 <sup>b</sup>                                                              | 6.40 <sup>a</sup> | 14.63 <sup>c</sup>                                                 |
| 3                                       | 18.84 <sup>c</sup>        | 580 <sup>a</sup>                                                              | 6.39 <sup>a</sup> | 14.18 <sup>d</sup>                                                 |
| SEM                                     | 0.36                      | 13.76                                                                         | 0.020             | 0.141                                                              |
| P-value                                 | 0.003                     | 0.001                                                                         | 0.202             | 0.008                                                              |
| <b>72 h</b>                             |                           |                                                                               |                   |                                                                    |
| 0                                       | 26.38 <sup>a</sup>        | 460 <sup>d</sup>                                                              | 6.52 <sup>a</sup> | 18.57 <sup>a</sup>                                                 |
| 1                                       | 24.20 <sup>b</sup>        | 510 <sup>c</sup>                                                              | 6.51 <sup>a</sup> | 17.79 <sup>b</sup>                                                 |
| 2                                       | 22.45 <sup>c</sup>        | 561 <sup>b</sup>                                                              | 6.50 <sup>a</sup> | 16.83 <sup>c</sup>                                                 |
| 3                                       | 22.10 <sup>d</sup>        | 621 <sup>a</sup>                                                              | 6.50 <sup>a</sup> | 16.43 <sup>c</sup>                                                 |
| SEM                                     | 0.150                     | 8.529                                                                         | 0.017             | 0.084                                                              |
| P-value                                 | 0.001                     | <0.001                                                                        | 0.382             | 0.003                                                              |

SEM، خطای استاندارد میانگین‌ها. در هر ستون، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

SEM, standard error of the means. In each column, different superscripts indicate significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ).

جدول ۶. اثر سطوح مختلف گلبرگ زعفران در جیره بر غلظت کل (میلی‌مول در لیتر) و نسبت (درصد) اسیدهای چرب فرار برون‌تنی شکمبه.

Table 6. Effect of different saffron petals levels in diet on *in vitro* ruminal total concentration ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and proportion (%) of volatile fatty acids (VFA).

| درصد گلبرگ زعفران<br>Saffron petals (%) | کل اسید<br>چرب فرار<br>Total VFA | استات<br>Acetate<br>(A) | پروپیونات<br>Propionate<br>(P) | بوتیرات<br>Butyrate | ایزوبوتیرات<br>Isobutyrate | والرات<br>Valrate  | ایزووالرات<br>Isovalrate | A:P               |
|-----------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------|----------------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|
| <b>24 h</b>                             |                                  |                         |                                |                     |                            |                    |                          |                   |
| 0                                       | 61.80 <sup>c</sup>               | 63.70 <sup>a</sup>      | 22.35 <sup>d</sup>             | 11.80 <sup>a</sup>  | 1.50 <sup>a</sup>          | 0.173 <sup>c</sup> | 0.173 <sup>a</sup>       | 2.85 <sup>a</sup> |
| 1                                       | 62.76 <sup>b</sup>               | 62.63 <sup>b</sup>      | 24.18 <sup>c</sup>             | 11.14 <sup>c</sup>  | 1.43 <sup>b</sup>          | 0.499 <sup>b</sup> | 0.130 <sup>c</sup>       | 2.59 <sup>b</sup> |
| 2                                       | 63.27 <sup>b</sup>               | 61.25 <sup>c</sup>      | 25.09 <sup>b</sup>             | 11.51 <sup>b</sup>  | 1.50 <sup>a</sup>          | 0.520 <sup>a</sup> | 0.136 <sup>b</sup>       | 2.44 <sup>c</sup> |
| 3                                       | 65.96 <sup>a</sup>               | 59.49 <sup>d</sup>      | 26.97 <sup>a</sup>             | 11.41 <sup>b</sup>  | 1.48 <sup>a</sup>          | 0.519 <sup>a</sup> | 0.136 <sup>b</sup>       | 2.21 <sup>d</sup> |
| SEM                                     | 0.318                            | 0.154                   | 0.200                          | 0.073               | 0.008                      | 0.006              | 0.002                    | 0.022             |
| P-value                                 | 0.001                            | 0.001                   | <0.001                         | 0.007               | 0.005                      | 0.003              | 0.001                    | 0.001             |
| <b>72 h</b>                             |                                  |                         |                                |                     |                            |                    |                          |                   |
| 0                                       | 71.57 <sup>d</sup>               | 64.91 <sup>a</sup>      | 21.08 <sup>c</sup>             | 11.62 <sup>a</sup>  | 1.51 <sup>b</sup>          | 0.679 <sup>a</sup> | 0.201 <sup>a</sup>       | 3.08 <sup>a</sup> |
| 1                                       | 74.16 <sup>c</sup>               | 63.11 <sup>b</sup>      | 22.66 <sup>b</sup>             | 11.70 <sup>a</sup>  | 1.67 <sup>a</sup>          | 0.676 <sup>a</sup> | 0.179 <sup>b</sup>       | 2.79 <sup>b</sup> |
| 2                                       | 75.99 <sup>b</sup>               | 62.81 <sup>c</sup>      | 22.89 <sup>a</sup>             | 11.76 <sup>a</sup>  | 1.68 <sup>a</sup>          | 0.680 <sup>a</sup> | 0.179 <sup>b</sup>       | 2.75 <sup>c</sup> |
| 3                                       | 76.46 <sup>a</sup>               | 62.74 <sup>c</sup>      | 22.98 <sup>a</sup>             | 11.75 <sup>a</sup>  | 1.68 <sup>a</sup>          | 0.679 <sup>a</sup> | 0.178 <sup>b</sup>       | 2.73 <sup>c</sup> |
| SEM                                     | 0.302                            | 0.162                   | 0.17                           | 0.07                | 0.004                      | 0.016              | 0.002                    | 0.027             |
| P-value                                 | 0.001                            | <0.001                  | <0.001                         | 0.334               | <0.001                     | 0.993              | 0.016                    | <0.001            |

SEM، خطای استاندارد میانگین‌ها. در هر ستون، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

SEM, standard error of the means. In each column, different superscripts indicate significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ).

## نتیجه‌گیری

افزودن سطوح اندک (تا ۳ درصد) گلبرگ زعفران به جیره، به دلیل خواص فیتوبیوتیکی، منجر به بهبود تجزیه و هضم سوبسترا، تولید توده میکروبی و اسیدهای چرب فرار برون تنی شکمبه‌ای ۲۴ و ۷۲ ساعته شد و غلظت آمونیاک و نسبت استات به پروپیونات را کاهش داد. سازوکار اثر مثبت گلبرگ زعفران بر متابولیسم انرژی و نیتروژن شکمبه‌ای به دلیل تغییرات مفید در جمعیت‌های میکروبی (افزایش باکتری‌های سلولولیتیک و کاهش پروتوزوا)، آنزیم‌های فیبرولیتیک، آمیلاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بود. بنابراین، کاربرد سطوح اندک گلبرگ

زعفران (۲ تا ۳ درصد)، به عنوان یک افزودنی فیتوبیوتیکی طبیعی در جیره، با هدف بهبود تخمیر شکمبه و کاهش هدررفت منابع انرژی و نیتروژن می‌تواند مفید باشد، هر چند بهتر است نتایج در شرایط درون تنی تأیید شود.

## قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی خویش را از دانشگاه تربیت مدرس، به دلیل حمایت مادی و معنوی از پژوهش حاضر، ابراز می‌نمایند

## منابع

- Abdillah, A. E., Sarah, D., Ardian, A. A., Anas, M. A., Aprianto, M. A., Hanim, C., Kurniawati, A., Muhlisin, & Yusiati, L. M. (2024). Effect of nutmeg essential oil (*Myristica fragrans* Houtt.) on methane production, rumen fermentation, and nutrient digestibility *in vitro*. *Scientific Reports*, 14(1), 3554. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52532-3>.
- Alipour, F., Vakili, A. R., Danesh Mesgaran, M., & Ebrahimi, H. (2021). Effect of hydroalcoholic extract of saffron petal on total bacteria, methanogens and protozoa population in *in vitro*. *The 9th National Congress and the 1st International Congress of Animal Sciences of Iran*. (In Persian with English Summary).
- Alipour, F., Vakili, A., Danesh Mesgaran, M., & Ebrahimi, H. (2019). The effect of adding ethanolic saffron petal extract and vitamin E on growth performance, blood metabolites and antioxidant status in Baluchi male lambs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(11), 1695. <https://doi.org/10.5713/2Fajas.18.0615>.
- Bąkowski, M., & Kiczorowska, B. (2021). Probiotic microorganisms and herbs in ruminant nutrition as natural modulators of health and production efficiency—A review. *Annals of Animal Science*, 21(1), 3-28. <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0081>.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- Buragohain, R. (2017). Phytobiotics as health promoters for productivity: Potentialities and limitations in livestock. *Livestock Research International*, 5(2), 23-27.
- Chen, N., Xiang, J., Liu, Y., Li, H., & Yang, B. (2021). Preparation and characterization of antioxidant flavonoid-enriched extract from saffron by-product: A combination of ultrasound-assisted extraction and macroporous resin purification. *Chemical Papers*, 75, 2749-2763. <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01522-0>.
- Dehority, B. A. (2003). *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press Nottingham, UK.
- Duval, S. M., McEwan, N. R., Graham, R. C., Wallace, R. J., & Newbold, C. J. (2007). Effect of a blend of essential oil compounds on the colonization of starch-rich substrates by bacteria in the rumen. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2132-2141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03455>.
- Ebrahimi, S., Nasri, M. F., & Farhangfar, S. H. (2024). Dietary supplementation of saffron petal elicits positive effects on performance, antioxidant status, and health of dairy goats. *Small Ruminant Research*, 231, 107179. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2023.107179>.
- Fievez, V., Babayemi, O. J., & 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 and Technology*, 123, 197-210. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.05.001>.
- Galyean, M. L. (2010). *Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research*, Revised 2010. Department of Animal and Food Sciences. Texas Tech University, Lubbock, TX, USA.
- Hosseini, A., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. (2018). Saffron (*Crocus sativus*) petal as a

- new pharmacological target: A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(11), 1091-1099. <https://doi.org/10.22038%2FIJBMS.2018.31243.7529>.
- Hosseini-Vashan, S. J., Mohammadian, H., & Afzali, N. (2017). Investigation the effect of Hydroethanolic saffron petals' extracts on performance, carcass characteristics and blood biochemical parameters of Japanese quail. *Journal of Saffron Research* (semi-annual), 5(2), 181-189. (In Persian with English Summary) <http://dx.doi.org/10.22077/JSR.2018.58.1000>.
- Ilias, G., Ioannis, P., Vasiliki, I. C., Stella, D., Konstantina, V., Paraskevi, C., & Praffula, K. (2023). History of Feed Additives. In *Sustainable Use of Feed Additives in Livestock: Novel Ways for Animal Production* (pp. 79-98). Cham: Springer International Publishing.
- Kardan Moghaddam, V., Fathi Nasri, M. H., Valizadeh, R., & Farhangfar, H. (2015). Chemical composition, rumen degradability and fermentation parameters of saffron forage using in situ and gas production techniques. *Journal of Saffron Research*, 2(2), 129-140. (In Persian with English Summary) <https://doi.org/10.22077/jsr.2014.317>
- Kardan Moghaddam, V., Fathi NasriBehdani, M. A., Kardan Moghaddam H., & Fathi Nasari, M. H. (2016). Effect of *Pleurotus florida* fungi on chemical composition, ruminal degradability and gas production of saffron foliage residues. *Journal of Saffron Research*, 3(2), 175-187. (In Persian with English Summary) <https://doi.org/10.22077/jsr.2015.293>
- Ku-Vera, J. C., Jiménez-Ocampo, R., Valencia-Salazar, S. S., Montoya-Flores, M. D., Molina-Botero, I. C., Arango, J., Gómez-Bravo, C. A., Aguilar-Pérez, C. F., & Solorio-Sánchez, F. J. (2020). Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 584. <https://doi.org/10.3389%2Ffvets.2020.00584>.
- Lachguer, K., El Merzougui, S., Boudadi, I., Laktib, A., Ben El Caid, M., Ramdan, B., Boubaker, H., & Serghini, M. A. (2023). Major phytochemical compounds, *in vitro* antioxidant, antibacterial, and antifungal activities of six aqueous and organic extracts of *Crocus sativus* L. flower waste. *Waste and Biomass Valorization*, 14(5), 1571-1587. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01964-x>.
- Li, M., Hassan, F., Peng, L., Xie, H., Liang, X., Huang, J., Huang, F., Guo, Y., & Yang, C. (2022). Mulberry flavonoids modulate rumen bacteria to alter fermentation kinetics in water buffalo. *PeerJ Publishing*, 10, e14309. <https://doi.org/10.7717/peerj.14309>.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., & Wilkinson, R. G. (2022). *Animal Nutrition*, 8th ed. Prentice Hall, Essex, UK.
- 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(1), 217-222. <https://doi.org/10.1017/S0021859600086305>.
- Newbold, C. J., De La Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., & McEwan, N. R. (2015). The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>.
- Ognik, K., Cholewińska, E., Sembratowicz, I., Grela, E., & Czech, A. (2016). The potential of using plant antioxidants to stimulate antioxidant mechanisms in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 72(2), 291-298. <https://doi.org/10.1017/S0043933915002779>.
- Olagaray, K. E., & Bradford, B. J. (2019). Plant flavonoids to improve productivity of ruminants—A review. *Animal Feed Science and Technology*, 251, 21-36. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.02.004>.
- Patra, A. K., & Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1198-1222. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.010>.
- Radzikowski, D. (2017). Effect of probiotics, prebiotics and symbiotics on the productivity and health of dairy cows and calves. *World Scientific News*, 78, 193-198.
- Rahmy, H. A. F., El Bana, H. M., El-Bordeny, N. E., & Mahmoud, A. E. (2019). Effect of Caraway, fennel and Melissa addition on *in vitro* rumen fermentation and gas production. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 22(2), 67-72. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2019.67.72>.
- Ramos-Morales, E., Braganca, R., & Newbold, C. J. (2015). *In vitro* effect of a liquorice extract rich in flavonoids on protozoa activity and rumen fermentation. *XVI Jornadas sobre Producción Animal*, 19 y 20 de mayo de 2015, Zaragoza, España. Tomo, 2015, 143-145.
- Seradj, A. R., Abecia, L., Crespo, J., Villalba, D., Fondevila, M., & Balcells, J. (2014). The

- effect of Bioflavex® and its pure flavonoid components on *in vitro* fermentation parameters and methane production in rumen fluid from steers given high concentrate diets. *Animal Feed Science and Technology*, 197, 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.08.013>.
- Sheida, E. V., Ryazanov, V. A., & Duskaev, G. K. (2023). Metabolic parameters and methanogenesis in the rumen liquid in *in vitro* testing experimental diets supplemented with phytobiotics and CoCl<sub>2</sub>. *Agricultural Biology*, 58(4), 713-725. <http://doi.org/10.15389/agrobiology.2023.4.713eng>.
- Vercoe, P. E., Makkar, H. P. S., & Schlink, A. C. (2010). *In Vitro* Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies. Springer, Netherlands.
- Yu, S., Zhao, Y., Li, L., Zhao, H., Liu, M., & Jiang, L. (2024). Flavonoids from citrus peel display potential synergistic effects on inhibiting rumen methanogenesis and ammoniogenesis: a microbiome perspective. *Environmental Science and Pollution Research*, 31, 21208–21223. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-32509-5>.
- Zhou, L., Cai, Y., Yang, L., Zou, Z., Zhu, J., & Zhang, Y. (2022). Comparative metabolomics analysis of stigmas and petals in Chinese saffron (*Crocus sativus*) by widely targeted metabolomics. *Plants*, 11(18), 2427. <https://doi.org/10.3390/plants11182427>.
- Zhou, Y. Y., Mao, H. L., Jiang, F., Wang, J. K., Liu, J. X., & McSweeney, C. S. (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, 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.007>.