Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 15, Issue 3, 2024 p: 108-119

OPEN ACCESS

Research Paper

The Effect of Different Lysophospholipid Levels on Blood and Milk Biochemical Parameters, Liver and Rumen Enzymes, and Rumen Microbial Population in Early Lactation of Holstein Dairy Cows

Matin Movagharnezhad[1], Yadollah Chashnidel[2], Asadollah Teymouri Yansari[3] and Mohsen Gholizadeh[4]

1- Ph.D. Student, Department of Animal Nutrition, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran, (Corresponding author: matin.movagharnezhad@gmail.com)
2-Associate Professor, Department of Animal Nutrition, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
3- Professor, Department of Animal Nutrition, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
4- Associate Professor, Department of Animal Genetic, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

Received: 9 December, 2023 Accepted: 21 April, 2024

Extended Abstract

Background: High-yielding cows, especially at the beginning of the lactation period, are mainly in a negative energy balance. This problem occurs due to energy consumption less than the requirements for high production, which causes the animal to use its body reserves. Therefore, it is necessary to enrich the diet in various ways, one of which is to use fat supplements. Increasing the level of dietary fat is important to provide energy during this period. Fat supplementation can reduce negative energy balance in high-yielding cows. The beneficial effects of fat supplementation depend on its type and amount. Fats should be relatively ineffective to reduce their harmful effects = in the rumen (such as reductions in the ratio of acetate to propionate, fiber digestion, and methane production). Fats reduce fat oxidation in the liver and dry matter consumption in livestock by influencing the hormones of the digestive system. A decrease in the passage rate of digestible substances from the rumen by adding fat to the diet can increase the expansion of the rumen and stimulate the stretch receptors in the rumen, resulting in probably a decrease in dry matter intake. However, the use of fat in feeding dairy cows also has limitations that must be overcome. Using emulsifier compounds can be very important during this period due to the property of emulsifying fats and increasing fat digestion. The emulsifier molecule can be dissolved in water with its hydrophilic part and in fat with its hydrophobic part and plays an important role in helping to form micelles. Therefore, emulsifiers can distribute fat droplets in the emulsion, which is necessary for fat digestion and absorption. Lysophospholipids are among the emulsifying compounds that increase fat digestion and absorption in the diet. Lysophospholipid is a strong feed additive to improve digestion and absorption and increase feed productivity, which increases production, feed efficiency, and absorption of dietary nutrients. In this research, the effects of using this emulsifier on blood and milk biochemical parameters, liver enzymes, and rumen microbial population are studied in the early lactation period of Holstein dairy cows.

Methods: This experiment was carried out on 15 multi-calving Holstein dairy cows (three groups of five cows) with an average weight of 720 ± 50 kg and lactation days of 16 ± 5 days in a completely randomized design. The treatments were three levels of lysophospholipid in the feed (zero, 0.1, and 0.15%) for 35 days. The experimental diets were completely mixed and provided to the cows twice a day in the morning and afternoon. Cows had free access to water. At the end of the experimental period (35 days), blood was taken from the tail vein of randomly selected cows in three replications of each treatment to measure total protein, triglyceride, total cholesterol, blood nitrogen, unesterified fatty acids, and beta-hydroxybutyrate. To check the liver enzymes, blood samples were taken from cows before feed consumption on days 0 and 34 of the experimental period, by applying a 12-hour deprivation of feed consumption, to measure the activity of liver enzymes, *viz*. alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST). At the end of the experimental period, rumen fluid was obtained from the rumens of all experimental cows to evaluate pH, ammonia nitrogen, volatile fatty acids (VFAs), enzymes, and bacterial and protozoan populations.

Copyright ©2024 Movagharnezhad et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

Results: The diets containing lysophospholipid decreased blood urea nitrogen. The lowest blood urea nitrogen was observed in the treatment containing 0.15% lysophospholipid, which was significantly different from the treatments containing different levels of lysophospholipid ($p < 0.05$). However, no significant differences were observed between different treatments in total protein, triglyceride, total cholesterol, non-esterified fatty acids, and beta-hydroxybutyrate. Adding lysophospholipid caused a significant decrease in the level of liver AIT, but it did not significantly affect the other liver enzymes (AIP and AST). A significant increase was also observed in the activity level of ruminal carboxymethylcellulase ($p < 0.05$). However, there were no significant differences between the treatments in the activity of ruminal microcrystalline cellulase. An improvement in the production of ruminal VFAs (acetic acid and valeric) was observed in the treatments containing lysophospholipid (especially the 0.15% level) compared to the control treatment ($p < 0.05$), but it did not significantly influence other ruminal VFAs. In addition, the results of the experimental treatments on the rumen microbial population showed that the bacterial and protozoan population was not significantly affected by supplementing the diet with lysophospholipid.
Conclusion: In general, the results show that the use of lysophospholipid supplement not only has no negative effects, but it has positive results, especially at the level of 0.15%, on blood and rumen parameters and the rumen bacterial population in the early lactation period of Holstein dairy cows.

Keywords: Bacterial Population, Blood and Rumen Parameters, Early Lactation Period, Holstein Cow, Lysophospholipid

How to Cite This Article: Movagharnezhad, M., Chashnidel, Y., Teymouri Yansari, A & Gholizadeh, M. (2024). The Effect of Different Lysophospholipid Levels on Blood and Milk Biochemical Parameters, Liver and Rumen Enzymes, and Rumen Microbial Population in Early Lactation of Holstein Dairy Cows. *Res Anim Prod,* 15(3), 108-119. DOI: 10.61186/rap.15.3.108

مقاله پژوهشی

بررسی اثر سطوح مختلف لیزوفسفولیپید بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و شیر، آنزیم‌های کبدی و شکمبه‌ای و جمعیت میکروبی شکمبه در اوایل شیردهی گاوهای شیری هلشتاین

متین موقرنژاد[1]، یداله چاشنی دل[2]، اسداله تیموری یانسری[3] و محسن قلی‌زاده[4]

۱- دانشجوی دکتری، گروه تغذیه دام، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران، (نویسنده مسوول: matin.movagharnezhad@gmail.com)
۲- دانشیار، گروه تغذیه دام، دانشکده علوم دامی و شیلات،دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۳- استاد، گروه تغذیه دام، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۴- دانشیار، گروه ژنتیک دام، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۰۲
صفحه: ۱۰۸ تا ۱۱۹

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: گاوهای پرتولید به‌ویژه در ابتدای دوره شیردهی به‌طور عمده در تعادل منفی انرژی قرار دارند. این مسئله به‌دلیل مصرف انرژی کمتر از احتیاجات لازم برای تولید بالا رخ می‌دهد که سبب می‌شود تا حیوان از ذخایر بدن خود استفاده نماید. براین اساس، باید جیره مصرفی را غنی کرد. یکی از این راه‌ها، استفاده از مکمل چربی است. افزایش سطح چربی جیره جهت تأمین انرژی در این دوران اهمیت دارد از این‌رو برای تأمین انرژی در خوراک از چربی استفاده می‌شود. مکمل چربی می‌تواند تعادل منفی انرژی در گاوهای پرتولید را کاهش دهد. اثرات مفید مکمل چربی به نوع و مقدار آن بستگی دارد. برای کاهش اثرات مخرب چربی‌ها در شکمبه (مثل کاهش نسبت استات به پروپیونات، کاهش هضم الیاف و کاهش تولید متان) باید نسبتاً بی‌اثر شوند با این‌حال، استفاده از چربی در تغذیه گاو شیری محدودیت‌هایی نیز به‌همراه دارد که باید برطرف شود. به‌کار بردن ترکیبات امولسیفایر به‌دلیل ویژگی امولسیون‌کنندگی چربی‌ها و افزایش هضم چربی‌ها، در این دوران می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. مولکول امولسیفایر می‌تواند با بخش آب‌دوست خود در آب و با بخش آب‌گریز خود در چربی حل شود و نقش مهمی در کمک به تشکیل میسل ایفا نماید. بنابراین، امولسیفایرها می‌توانند قطرات چربی را در امولسیون توزیع کنند که این امر برای هضم و جذب چربی‌ها لازم است. از ترکیبات امولسیفایری که باعث افزایش هضم و جذب چربی موجود در جیره می‌شود، می‌توان به لیزوفسفولیپیدها اشاره کرد. لیزوفسفولیپید یک افزودنی خوراک قوی برای بهبود هضم، جذب و افزایش بهره‌وری خوراک بوده که باعث افزایش تولید، راندمان خوراک و جذب مواد مغذی جیره می‌شود. در این پژوهش به بررسی اثرات استفاده از این امولسیفایر بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و شیر، آنزیم‌های کبدی و شکمبه‌ای و جمعیت میکروبی شکمبه در اوایل دوره‌ی شیردهی گاوهای شیری هلشتاین پرداختیم.

مواد و روش‌ها: این آزمایش بر روی ۱۵رأس (۳ گروه ۵رأسی) گاو شیری هلشتاین چند شکم زایش با میانگین وزن ۵۰±۷۲۰ و روزهای شیردهی ۵ ± ۱۶روز در قالب یک طرح کاملاً تصادفی شامل ۳ سطح لیزوفسفولیپید در خوراک (صفر، ۰/۱ و ۰/۱۵ درصد) به‌مدت ۳۵ روز انجام شد. جیره‌های آزمایشی به‌صورت کاملاً مخلوط بودند و دو بار در روز در صبح و بعداز ظهر در اختیار گاوها قرار داده شدند. گاوها به آب دسترسی آزاد داشتند. در پایان دوره آزمایش (۳۵ روزگی) ۳ تکرار از هر تیمار به‌صورت تصادفی انتخاب و از سیاهرگ دمی آن‌ها خون‌گیری انجام و مقادیر پروتئین کل، تری‌گلیسرید، کلسترول تام، نیتروژن اوره‌ای خون، اسیدهای چرب استریفه نشده و بتا هیدروکسی بوتیرات اندازه‌گیری‌شد. برای بررسی آنزیم‌های کبدی خون‌گیری از گاوها در روزهای صفر و ۳۴ دوره آزمایشی، قبل از مصرف خوراک با اعمال ۱۲ ساعت محرومیت از مصرف خوراک انجام و فعالیت آنزیم‌های کبدی آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز اندازه‌گیری شد. همچنین در پایان دوره آزمایشی از شکمبه تمامی گاوهای آزمایشی مایع شکمبه دریافت و pH، نیتروژن آمونیاکی، اسیدهای چرب فرار، آنزیم‌ها و جمعیت باکتریایی و پروتوزوایی ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که جیره‌های حاوی لیزوفسفولیپید باعث کاهش نیتروژن اوره‌ای خون شدند. کم‌ترین مقدار نیتروژن اوره‌ای خون در تیمار حاوی۰/۱۵ درصد لیزوفسفولیپید مشاهده شد که با تیمارهای حاوی سطوح مختلف لیزوفسفولیپید اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$)؛ با این‌حال، بر روی پروتئین کل، تری‌گلیسرید، کلسترول تام، اسیدهای چرب استریفه نشده و بتا هیدروکسی بوتیرات بین تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. افزودن لیزوفسفولیپید باعث کاهش معنی‌داری در سطح آنزیم آلانین ترانس آمیناز کبدی شد، اما بر روی سایر آنزیم‌های کبدی همچون آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینوترانسفراز تاثیر معنی‌داری نداشت. با توجه به نتایج، افزایش معنی‌داری در سطح فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز شکمبه‌ای نیز مشاهده شد ($p<۰/۰۵$)؛ در حالی‌که بر روی میزان فعالیت آنزیم شکمبه‌ای میکروکریستالین سلولاز بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بهبود تولید اسیدهای چرب فرار شکمبه‌ای (اسیداستیک و والریک) در تیمارهای حاوی لیزوفسفولیپید (به‌خصوص سطح ۰/۱۵ درصد) نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ($p<۰/۰۵$)؛ هر چند بر سایر اسیدهای چرب فرار شکمبه‌ای، تاثیر معنی‌داری نداشت. علاوه براین، نتایج اثر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت میکروبی شکمبه نشان داد که مکمل‌سازی جیره با لیزوفسفولیپید، تأثیر معنی‌داری بر جمعیت باکتریایی و پروتوزوایی نداشت.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی، نتایج نشان داد که استفاده از مکمل لیزوفسفولیپید نه‌تنها تأثیر منفی ندارد، بلکه به‌ویژه در سطح ۰/۱۵ درصد نتایج مثبتی بر فراسنجه‌های خونی و شکمبه‌ای و جمعیت باکتریایی شکمبه در اوایل دوره شیردهی گاوهای شیری هلشتاین به‌همراه دارد.

واژه‌های کلیدی: اوایل دوره شیردهی، جمعیت باکتریایی، فراسنجه خونی و شکمبه‌ای، گاو هلشتاین، لیزوفسفولیپید

مقدمه

میزان تولید شیر گاو شیری در سراسر جهان برای مصرف‌کنندگان و دامداران مهم است. با افزایش سطح زندگی و افزایش جمعیت جهان، تقاضا برای مصرف شیر به‌طور فزاینده‌ای روبه افزایش است، از این‌رو برای افزایش پایداری تولید مواد لبنی بر افزایش راندمان خوراک تأکید شده است؛ زیرا افزایش راندمان خوراک می‌تواند به‌طور همزمان منجر به بهبود تولید گاوها و کاهش تأثیرات زیست محیطی شود. افزایش مصرف خوراک در راستای افزایش تولید، از مهم‌ترین اقدامات مدیریتی است. از طرفی در گاوهای تازه‌زا و اوایل دوره شیردهی به‌دلیل کم حجم بودن شکمبه، عدم توسعه کافی پرزها برای تولید اسیدچرب به‌عنوان پیش‌ساز گلوکز و همچنین رشد محدود جمعیت میکروبی، از عملکرد پایینی برخوردار می‌باشند. در نتیجه از ذخایر بدن برای تأمین انرژی و تولید شیر استفاده

می‌کنند. از جمله اقدامات مهم در این دوره غنی‌سازی خوراک است که حیوان با مصرف پایین، انرژی لازم برای تولیداتش را تأمین نماید. افزایش راندمان خوراک می‌تواند به بهبود تولید گاوها و کاهش اثرات زیست محیطی به‌طور هم‌زمان منجر شود (Vandehar *et al.*, 2016).

با توجه به مطالعات انجام شده در حیوانات نشخوارکننده و غیرنشخوارکننده، لیزوفسفولیپید (LPL)[1] می‌تواند یک افزودنی خوراک قوی برای بهبود هضم، جذب و بهره‌وری خوراک (به‌خصوص چربی‌ها) باشند که باعث افزایش تولید، راندمان خوراک و جذب مواد مغذی جیره، می‌شود (Tagesson *et al.*, 2005؛ Zhao & Kim, 2017). LPL به‌دلیل خاصیت امولسیون کنندگی، به‌عنوان افزایش هضم و جذب چربی در خوراک پیشنهاد شده است (Zhao *et al.*, 2015). همچنین LPL ژن‌های مختلف را در اپیتلیوم روده تنظیم می‌کند که برای بهبود جذب مواد مغذی، و در نتیجه افزایش تولید مؤثر است (Brautigan *et al.*, 2017). همچنین گزارش شده است که تغذیه لیزوفسفولیپید به گاوهای شیری اواسط دوره‌ی شیردهی و بره‌های پرواری، می‌تواند باعث بهبود جمعیت میکروبی شکمبه شود (Lee *et al.*, 2017؛ Farahmandpoor *et al.*, 2022؛ Hou *et al.*, 2019). در مطالعه‌ای دیگر تأثیر مکمل‌سازی جیره با LPL را بر فعالیت باکتریای لیپولیتیک شکمبه با روغن بالا در جیره به‌صورت آزمایشگاهی بررسی و گزارش کردند که افزودن لیزوفسفولیپید سبب افزایش خطی جمعیت باکتریای لیپوژنیک و کاهش خطی در جمعیت باکتریای سلولولیتیک با افزایش سطح استفاده از LPL شد (Kim *et al.*, 2020). علاوه براین، گزارش شد که افزودن لیزوفسفولیپید اثرات مثبتی بر غلظت پروتئین، گلوبولین و فراسنجه‌های لیپیدی خون داشت (Jenkins *et al.*, 2002؛ Yuhahei *et al.*, 2020) و براساس مطالعات انجام شده، لیزوفسفولیپیدها به‌عنوان یک افزودنی خوراک برای گاوهای شیری در مقایسه با سایر امولسیون کننده‌ها، تولید و بهره‌وری خوراک (به‌عنوان مثال، سورفاکتانت‌ها) را افزایش می‌دهند که اغلب با افزایش فعالیت‌های آنزیمی پروتئاز و سلولاز در شکمبه همراه است؛ بنابراین، بهبود هضم الیاف را هم در شرایط *in vitro* و *in vivo* درپی دارد (Kamande *et al.*, 2000؛ Huang *et al.*, 2017). همچنین گزارش شده است که استفاده از مکمل لیزوفسفولیپید، باعث بهبود غلظت آنزیم کبدی (ALP[2] و AST[3]) و آنزیم‌های شکمبه‌ای (CMC[4] و MCC[5]) می‌شود (Hou *et al.*, 2019؛ Gallo *et al.*, 2017). در مطالعه‌ای دیگر با بررسی اثر استفاده از لیزولسیتین سویا اضافه شده در دو جیره با منبع مختلف روغن بر عملکرد بره و پارامترهای شکمبه و خون انجام و گزارش شد که جیره‌های حاوی بیوسورفاکتانت سبب بهبود فعالیت آنزیم‌های شکمبه‌ای در بره‌ها شد (Gallo *et al.*, 2019). در مطالعه‌ای با بررسی تأثیر افزودن لیزوفسفولیپید در دو سطح (۰/۰۵ و ۰/۰۷۵) بر میزان استفاده از نیتروژن خوراک گزارش شد که افزودن لیزوفسفولیپید به جیره سبب افزایش میزان نیتروژن اوره‌ای خون و ترشح نیتروژن شیر شد. همچنین افزودن LPL به جیره کاهش دفع نیتروژن ادراری را درپی داشت (Lee *et al.*,2019).

علاوه براین، جنکینز و همکاران (Jenkins *et al.*, 1998) نشان دادند که فسفولیپیدها (منبع LPL) در شکمبه می‌توانند از تخریب میکروبی فرار کنند و به روده باریک برسند. بر این اساس، همانند اثرات مثبت LPL که در حیوانات غیرنشخوار کننده نشان داده شده است، می‌توان برای گاوهای شیری نیز انتظار داشت. فرض بر این است که فراسنجه‌های خونی و شکمبه‌ای و جمعیت باکتریایی شکمبه گاوها، به‌دلیل افزایش استفاده از مواد مغذی جیره تحت‌تأثیر افزودن LPL در گاوهای شیری قرار می‌گیرد. بنابراین، در مطالعه حاضر استفاده بالقوه از LPL به‌عنوان یک افزودنی خوراک بر میزان فراسنجه‌های خونی و شکمبه‌ای و جمعیت میکروبی شکمبه گاوهای شیری اوایل دوره‌ی شیردهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۵ رأس گاو با میانگین وزن ۵۰±۷۲۰ و روزهای شیردهی ۵ ± ۱۶ روز و تعداد زایش ۱ ± ۳ انتخاب شده و در سه تیمار و پنج تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی و در جایگاه‌های مخصوص نگهداری و ارزیابی شدند. گاوها به‌صورت تصادفی به سه گروه پنج‌تایی تقسیم شده و طی دوره ۳۵ روزه، سه نوع جیره را دریافت کردند. جیره‌های آزمایشی بر پایه جداول نیازهای گاو شیری NRC (۲۰۰۱) تنظیم شدند و شامل: ۱- تیمار شاهد بدون افزودن لیزوفسفولیپید در جیره و با جیره حاوی منبع لیپید (پودر چربی) ۲- تیمار شاهد همراه با ۰/۱ درصد لیزوفسفولیپید ۳- تیمار شاهد همراه با ۰/۱۵ درصد لیزوفسفولیپید بودند. مکمل لیزوفسفولیپید مورد استفاده در این پژوهش از شرکت سیمرغ بهین دارو (بابلسر، ایران) تهیه شد. جیره‌های آزمایشی به‌صورت کاملاً مخلوط بودند و دوبار در روز در صبح و بعدازظهر در اختیار گاوها قرار داده شدند. گاوها به آب دسترسی آزاد داشتند. به‌منظور ارزیابی فراسنجه‌های خونی نمونه‌های خون (۵ میلی‌لیتر) در روز ۳۵ دوره آزمایشی و قبل از دوشش در صبح گرفته و در لوله‌های ونوجکت ۵ میلی‌لیتری حاوی ماده ضد انعقاد EDTA[6] از سیاهرگ دمی همه گاوهای آزمایشی جمع‌آوری، در محفظه یخ قرارداده و به آزمایشگاه منتقل شد، و پس از تهیه سرم برای تعیین مقادیر پروتئین کل، تری‌گلیسرید، کلسترول تام، نیتروژن اوره‌ای خون مورد آزمایش قرار گرفت. همچنین پلاسمای به‌دست آمده در فریزر در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد جهت اندازه‌گیری اسیدهای چرب استریفه نشده (NEFA) و بتا هیدروکسی بوتیرات (BHB) نگهداری و در پایان آزمایش به دامپزشکی مبنا ارسال گردید. اندازه‌گیری پروتئین تام سرم خون به‌روش بیوره (Zhou & Regenstein, 2006) و اندازه‌گیری کلسترول، تری‌گلیسرید ونیتروژن اوره خون به‌وسیله کیت شرکت پارس آزمون و به‌ترتیب با روش تشخیص کمی (CHOD-PAP)، کالری‌متری آنزیماتیک و فتومتریک انجام شد. برای اندازه‌گیری نیتروژن اوره‌ای شیر (MUN)[7] نمونه شیر در روز ۳۵ دوره آزمایشی، (حدود ۱۰ میلی‌لیتر) از تمامی گاوهای شیری تحت آزمایش جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل و به‌روش دی‌استیل مونوکسیم (کیت درمان کاو، ساخت ایران) با استفاده از اسپکتروفتومتری با طول موج ۳۲۰ نانومتر

1- lysophospholipid
2- Alkaline phosphatase
3- Aspartate transaminase
4- Carboxy Methile Cellulase
5- Micro Crystaline Cellulase
6- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
7- Milk Urea Nitrogen

تعیین شد (Stojevic *et al.*, 2005). برای بررسی آنزیم‌های کبدی خون‌گیری از گاوهای مورد آزمایش در روزهای صفر و ۳۴ دوره آزمایشی، قبل از مصرف خوراک با اعمال ۱۲ ساعت محرومیت از مصرف خوراک انجام شد. زمان خون‌گیری صبح بود و به‌وسیله لوله ونوجکت ۵ میلی‌لیتری حاوی ماده ضد انعقاد EDTA از سیاهرگ گردن اخذ شده و بعد از اتمام کار، نمونه‌های خون با رعایت اصول سرد نگه داشتن به‌سرعت به آزمایشگاه ارسال شد و پس از تهیه پلاسما، میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، با کیت پارس آزمون و به‌روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد (Hou *et al.*, 2019). برای ارزیابی آنزیم‌های شکمبه‌ای نمونه‌های مایع شکمبه گاوهای مورد آزمایش در پایان آزمایش و دو ساعت بعد از مصرف خوراک با استفاده از لوله مری از شکمبه گاوهای آزمایشی، مایع شکمبه اخذ شد. سپس نمونه مایع شکمبه با پارچه کنفی چهار لایه صاف شده، و بلافاصله در فلاسک در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه فرستاده شد. به‌منظور بخش‌بندی آنزیم‌های مورد بررسی در شیرابه شکمبه به سه بخش مجزا (جامد، خارج سلولی و داخل سلولی) تقسیم‌بندی شدند. از شیرابه شکمبه بعد از ۳ بار سانتریفیوژ مایع رویی (سوپرناتانت) با دور ۴۵۰ و به‌مدت ۵ دقیقه، مایع رویی به‌دست آمد که برای بررسی بخش آنزیم‌های خارج سلولی در نظر گرفته شد. فعالیت دو آنزیم کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز بر اساس روش آگاروال (Agarwal, 2000) اندازه‌گیری شد. همچنین به‌منظور اندازه‌گیری فراسنجه‌های شکمبه‌ای، بعد از گرفتن مایع شکمبه و صاف کردن آن با پارچه کنفی ۴ لایه، pH نمونه‌ها با دستگاه pHمتر دیجیتال قابل حمل (مدل ۸۲۷ متررون) اندازه‌گیری شد (Beauchemin *et al.*, 2003) و نمونه‌ای از آن برای تعیین نیتروژن آمونیاکی (NH_3-N) و ترکیب اسیدهای چرب فرار (VFA)[1] به‌طور جداگانه برداشته (۱۰ میلی‌لیتر) سپس به آن معادل همان حجم اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال اضافه شد و برای تجزیه آزمایشگاهی در فریزر در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه با استفاده از تیتراسیون به‌روش کانوی (Conway, 1950) انجام شد. محاسبه ترکیب اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه (والریک، ایزووالریک، بوتیریک، پروپیونیک و استیک) نیز به‌روش اوتنستین و بارتلی (Ottenstein & Bartley , 1971) با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC – PU4410 – PHILIPS) انجام شد. برای اندازه‌گیری جمعیت باکتریایی و پروتوزوآها مایع شکمبه در روز ۳۴ دوره آزمایشی (۳ ساعت بعد مصرف وعده خوراک صبح) مایع شکمبه گرفته و بلافاصله در فلاسک آب گرم به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه محیط کشت با pH ۷/۵۸ تهیه و سپس مقداری از مایع شکمبه با محلول رقیق‌سازی مخلوط و رقت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و۰/۰۰۱ تهیه و سپس از هر رقت سه تکرار با تلقیح ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رقیق در محیط کشت تهیه شد و با گازدهی با CO_2 به‌مدت۳۰ ثانیه درب لوله‌های کشت محکم بسته شد و در انکوباتور با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ۱۴ روز نمونه‌ها بررسی و pH قرائت و با تغییر pH و مشاهده رنگ کدر و خاکستری در ته هر لوله، رشد باکتری تعیین شد و با استفاده از جداول MPN (محتمل‌ترین روش)[2] شمارش انجام شد (Dehority, 2003). برای شمارش پروتوزوآها بعد از صاف کردن مایع شکمبه با پارچه متقال، در یک لوله آزمایش فویل پیچیده شده، ۴ میلی‌لیتر مایع شکمبه ریخته شد. سپس به‌ترتیب یک میلی‌لیتر فرمالین ۱۸/۵ درصد، هشت قطره رنگ متیلن بلو و در نهایت ۳ میلی‌گرم گلیسرول به‌محتوای لوله آزمایش اضافه گردید (Dehority, 1984) محتوای لوله آزمایش را کمی تکان داده و بعد از گذشت دو ساعت از ثابت ماندن لوله آزمایش، شمارش پروتوزوآ به‌وسیله میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ×۴۰ و لام نئوبار انجام شد.

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. این طرح با سه تیمار و پنج رأس گاو در هر تیمار، با تعداد ۱۵ رأس گاو شیری هلشتاین انجام شد. داده‌های به‌دست آمده از آزمایش با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین تیمارها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

در این رابطه: Yij مقدار هر مشاهده، μ میانگین جامعه، T_i اثر تیمار و E_{ij} خطای آزمایش می‌باشد.

نتایج و بحث

فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و شیر

نتایج آنالیز مربوط به فراسنجه‌های خونی در جدول (۲) ارائه شده است. نتایج نشان داد که افزودن مکمل لیزوفسفولیپید به‌جیره گاوهای شیری اوایل دوره شیردهی، بر پروتئین کل، کلسترول، تری‌گلیسرید، نیتروژن اوره‌ای شیر (MUN)، اسیدهای چرب استریفیه نشده (NEFA) و بتاهیدروکسی بوتیریک اسید (BHBA) بین تیمارها تأثیر معنی‌داری نداشت؛ با این‌حال، نتایج نشان داد که مقدار BUN (p=۰/۰۳۶۱) بین تیمارها تفاوت معنی‌داری دارد. بیش‌ترین مقدار BUN (P=۰/۰۳۶۱) در تیمار شاهد مشاهده شد که با تیمارهای حاوی سطوح مختلف لیزوفسفولیپید اختلاف معنی‌داری داشت. تیمار حاوی ۰/۱۵ درصد LPL کمترین سطح نیتروژن اوره‌ای خون را داشت.

1-*Volatile Fatty Acids*

2- Most Probably Number= MPN

جدول ۱- اجزای جیره و ترکیبات شیمیایی خوراک مصرفی

Table1. Diet components and chemical compounds of feed

اجزای جیره/ تیمارها (درصد) Diet components/treatments (percentage)	شاهد (-) Control (-)	۰/۱ درصد LPL[1] %0/1 LPL	۰/۱۵ درصد LPL %0/15 LPL
یونجه Alfalfa	5.07	5.07	5.07
دانه جو Barley	6.71	6.71	6.71
دانه ذرت Corn	7.92	7.93	7.93
کنجاله سویا Soybean meal	4.57	4.57	4.57
سویا برشته شده Roasted soybean	2.13	2.13	2.13
کاه گندم Wheat straw	1.13	1.13	1.13
پودر گوشت Meat meal	1.67	1.67	1.67
مکمل پروتئین Protein supplement	6.42	6.42	6.42
پودر چربی Fat powder	3.00	3.00	3.00
سیلو یونجه Alfalfa silage	34.71	34.61	34.57
اوره Urea	0.12	0.12	0.12
تفاله چغندر قند Sugar beet pulp	24.14	24.14	24.14
کنجاله پنبه دانه Cottonseed meal	0.76	0.76	0.76
نمک Salt	0.09	0.09	0.09
سدیم بی‌کربنات Sodium bicarbonate	0.48	0.48	0.48
کربنات کلسیم Calcium carbonate	0.15	0.15	0.15
بنتونیت Bentonite	0.09	0.09	0.09
ملاس Molasses	0.38	0.38	0.38
اکسید منیزیم Magnesium oxide	0.17	0.17	0.17
توکسین بایندر[2] Toxin binder	0.05	0.05	0.05
مکمل ویتامینی [3] Vitamin supplement	0.11	0.11	0.11
مکمل معدنی[4] Mineral supplement	0.11	0.11	0.11
ترکیب شیمیایی Chemical analysis			
ماده خشک (درصد) DM (%)	81.35	81.34	81.34
مواد آلی (درصد) Organic matter (%)	95.67	95.59	95.71
پروتئین خام (درصد) Crude protein (%)	16.68	16.67	16.70
الیاف مواد شوینده خنثی (درصد) NDF (%)	26.55	26.54	26.51
الیاف شوینده اسیدی (درصد) ADF (%)	18.51	18.41	18.47
کربوهیدرات غیرالیافی (درصد) Non fiber carbohydrate (%)	41.78	41.36	41.45
عصاره اتر (درصد) Ether extract	6.81	6.83	6.83
کلسیم (درصد) Calcium (%)	0.83	0.83	0.83
فسفر (درصد) Phosphorous (%)	0.41	0.41	0.41
انرژی خالص شیردهی (مگاکالری/کیلوگرم) Net lactating energy (Mcal/Kg)	1.62	1.63	1.64

[1] لیزوفسفولیپید [2] شرکت رویان دارو. [3] هر کیلوگرم از مکمل شامل: ۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین آ، ۱۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین د و ۰/۱ گرم ویتامین ای. [4] هر کیلوگرم از مکمل مواد معدنی شامل: ۱۸۰ گرم کلسیم، ۹۰ گرم فسفر، ۲۰ گرم منیزیم، ۶۰ گرم سدیم، ۲ گرم منگنز، ۳ گرم آهن، ۰/۳ گرم مس، ۳ گرم روی، ۰/۱ گرم کبالت، ۰/۱ گرم سلنیوم، ۰/۱ گرم ید، ۰/۳ گرم آنتی‌اکسیدانت.

1-Lysophospholipid 2-Royan Darou Co. 3-Each Kilogram of supplementcontain:500000 IU Vit A,10000 IU Vit A,10000 IU Vit D, and 0/1 gram Vit E. Each Kilogram element supplement contain:180 g Ca, 90 g P, 20 g Mg, 60 g Na, 2 g Mn, 3 g Fe, 0/3 g Co, 3g Zn, 0/1 g Cu, 0/1g Se, 0/1 g I, 0/3 g Antioxidant.

جدول ۲- نتایج اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی و شیر در گاوهای شیری
Table 2. The results of experimental treatments on blood and milk parameters in dairy cows

موارد Items	تیمار با سطح LPL[1] خوراک Treatment with diet LPL[1] level			انحراف از میانگین SEM	سطح معنی داری *p*-value
	شاهد (-) Control(-)	۰/۱ درصد %0/1	۰/۱۵ درصد %0/15		
پروتئین کل (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) Total protein (mg/dL)	71.04	71.42	72.31	1.163	0.3357
کلسترول (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) Cholestrol (mg/dL)	76.41	76.09	75.68	0.671	0.2631
تری‌گلیسرید (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) Triglyceride (mg/dL)	39.68	40.25	40.53	0.362	0.1134
[2]NEFA (µIU/L) (میکرو واحد بین‌المللی بر لیتر)	0.36	0.29	0.27	0.038	0.1064
[3]BHBA (mmol/L) (میلی‌مول بر لیتر)	487.15	475.34	469.28	6.471	0.2137
[4]BUN (mg/dL) (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	40.26[a]	39.54[b]	39.08[b]	0.206	0.0361
[5]MUN (mg/dL) (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	11.84	11.62	11.39	0.394	0.1766

۱- لیزوفسفولیپید؛ ۲- اسیدهای چرب استریفیه نشده ۳- بتاهیدروکسی بوتیریک اسید ۴- نیتروژن اوره‌ای خون؛ ۵- نیتروژن اوره‌ای شیر
* میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ درصد می‌باشند.
1- Lysophospholipid, 2- Non Esterified Fatty Acid, 3- beta hydroxyl butyric acid, 4-Blood Urea Nitrogen, 5-Milk Urea Nitrogen
* The averages shown in defferet Latin letters in each colum, have a significant difference at the 0.05% level.

در مطالعه‌ای که با بررسی اثر افزودن مکمل لیزوفسفولیپید بر فراسنجه‌های خونی در گاوهای شیری انجام گرفت، گزارش شد که مصرف مکمل لیزوفسفولیپید سبب کاهش غلظت نیتروژن اوره‌ای خون شد ولی بر سایر فراسنجه‌ها تأثیری نداشت (Marchesini *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای دیگر که توسط ظینی و همکاران (Zeyni *et al.*, 2019) با بررسی تأثیر مکمل لیزوفسفولیپید بر سطوح پروتئین کل، کلسترول و تری‌گلیسرید در گاوهای شیری انجام شد، نتایج نشان داد که مصرف لیزوفسفولیپید تأثیر چندانی بر سطوح این فراسنجه‌های خونی در گاوهای شیری نداشت. این نتایج نشان می‌دهد که لیزوفسفولیپید به‌طور مستقیم تأثیر قابل‌توجهی بر سطوح پروتئین کل، کلسترول و تری‌گلیسرید ندارد. علاوه بر این، در مطالعه‌ای که با بررسی تاثیر لیزوفسفولیپید بر فراسنجه‌های سرمی خون بره‌های پرواری تغذیه شده با لیزوفسفولیپید انجام گرفت، گزارش شد که غلظت اسیدهای چرب غیر استریفه سرم با افزایش مقادیر لیزوفسفولیپید افزایش یافت ولی غلظت پروتئین کل، کلسترول، تری‌گلیسرید بدون تغییر بود (Kross *et al.*, 2018). نتایج این مطالعات با نتایج مطالعه حاضر، همسو می‌باشد. سطوح پروتئین کل و نیتروژن اوره در خون نشان دهنده عملکرد کبدی است (Bobe *et al.*, 2004) و افزایش جزئی در غلظت آنها ممکن است نشان‌دهنده جذب اسیدهای چرب جیره در حضور LPL باشد (Gallo *et al.*, 2017). این تغییرات بالقوه با افزودن امولسیفایر (LPL) بر عملکرد کبد ممکن است اثرات مفیدی بر متابولیسم حیوان و تولید شیر داشته باشد. با این‌حال، تفاوت در نتایج به‌دست آمده در این مطالعه را می‌توان تا حدودی از نظر وجود تفاوت‌های فردی و ذاتی موجود بین حیوانات مورد مطالعه دانست. یکی از روش‌های غیرتهاجمی و مناسب برای بررسی وضعیت بدن از نظر آسیب‌های کبدی، تنش‌ها، شرایط متابولیکی و تغذیه‌ای گاوها به‌خصوص در ۴ هفته‌ی اول بعد از زایمان، سنجش متابولیت‌های بدن است. اسیدهای چرب استریفه نشده (NEFA) و بتاهیدروکسی بوتیریک اسید (BHBA) از شاخص‌های مهم متابولیکی و سلامت کبد در بدن هستند (Mashek & Coleman, 2001). افزایش غلظت این شاخص‌ها در خون نشان‌دهنده‌ی بروز مشکلات در دام طی دوره‌های مختلف تولید به‌خصوص در هفته‌های اول پس از زایش است. اسیدهای چرب استریفه نشده در خون نشان‌دهنده‌ی وضعیت بسیج چربی‌های بدن در پاسخ به تعادل منفی انرژی به‌خصوص در اوایل دوره‌ی شیردهی است. در مطالعه‌ای تأثیر جزئی LPL بر کاهش سطح NEFA و BHBA در گاوهای شیری گزارش شده است (Zeyni *et al.*, 2016)؛ با این‌حال، گزارش شد که استفاده از LPLها از افزایش تدریجی NEFA و BHBA جلوگیری کرده و غلظت آن‌ها را در سطح پایین نگه می‌دارد. اویکونومو و همکاران (Oikonomou *et al.* 2015)، عدم تأثیر قابل‌توجه LPLها بر سطح کلسترول، تری‌گلیسرید، NEFA و BHBA را در نشخوارکنندگان گزارش کردند. این نتایج در خصوص بهبود سطح NEFA و BHBA خون با نتایج این مطالعه هم‌سو است. در طی کاهش دریافت انرژی طی هفته‌های اول زایش و افزایش تولید شیر، گاو به تجزیه ذخایر تری‌آسیل‌گلیسرول بدن خود می‌پردازد و در نتیجه تجزیه بافت‌های چربی بدن، تولید NEFA و ورود آن‌ها به‌جریان خون افزایش می‌یابد. BHBA، به‌مانند NEFA نشانگری برای بررسی کتوز می‌باشد و در هفته‌های اول بعد از زایمان غلظتش افزایش می‌یابد. گزارش شده است که استفاده از LPL می‌تواند از افزایش سطح BHBA در خون جلوگیری کند (Chen *et al.*, 2008). نتایج این مطالعه هم‌سو با مطالعه حاضر است. در مطالعه‌ای گزارش شد که اثرات مکمل‌سازی خوراک با LPL تأثیری بر نیتروژن اوره‌ای شیر نداشت (Brake *et al.*, 2013). نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر هم‌سو است. استفاده از چربی به‌همراه مکمل LPL می‌تواند از ایجاد بالانس منفی شدید انرژی در گاوهای شیری پرتولید جلوگیری کند. نیتروژن اوره‌ای بیانگر میزان غلظت آمونیاک در شکمبه و نیز مقدار پروتئین (و انرژی) جیره است. از این‌رو، همبستگی زیادی بین MUN و BUN

وجود دارد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که BUN در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. BUN اندازه‌گیری مقدار نیتروژن خون است که از تجزیه اوره، محصول زائد متابولیسم پروتئین، به‌دست می‌آید. افزایش سطح BUN می‌تواند نشان‌دهنده اختلال در عملکرد کلیه، کم‌آبی یا سایر مشکلات سلامتی باشد. اویکونومو و همکاران (Oikunomou *et al.*, 2015) و چن و همکاران (Chen *et al.*, 2008) دریافتند گاوهایی که از جیره خوراکی حاوی LPL تغذیه می‌شوند، در مقایسه با گاوهایی که از جیره خوراکی شاهد تغذیه می‌شوند، سطح BUN کمتری در خون خود دارند. این محققان پیشنهاد کردند که اثر مفید LPLها بر سطوح BUN ممکن است به‌دلیل توانایی آنها در افزایش جذب و استفاده از پروتئین جیره خوراکی و ترویج حذف مواد زائد نیتروژنی از طریق کلیه‌ها باشد. میزان کلسترول، تری‌گلیسرید و NEFA خون در بین تیمارها مشابه بود اما غلظت و BUN خون کاهش یافت زیرا گزارش داد که عدم تأثیر LPLها بر متابولیسم لیپید در گاوها ممکن است به این دلیل باشد که گاوهای مورد مطالعه قبلاً LPL مصرف می‌کردند. جیره‌ای که سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع باشد، ممکن است هرگونه اثرات بالقوه LPL را پنهان نماید. مکانیسمی که توسط آن LPLها اثرات مفید خود را بر متابولیسم لیپوپروتئین و عملکرد کلیه اعمال می‌کنند هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است، اما به احتمال زیاد آنها از طریق مسیرهای متعددی از جمله افزایش جذب و استفاده از مواد مغذی، تعدیل متابولیسم لیپید و پروتئین، و ارتقاء عملکرد کبد و کلیه است.

آنزیم‌های کبدی و شکمبه‌ای

نتایج آنالیز مربوط به قابلیت هضم مواد مغذی در جدول (۳) ارائه شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده اثر تیمار بر آنزیم‌های کبدی AST و ALP و همچنین بر آنزیم شکمبه‌ای MCC معنی‌دار نبود؛ هرچند در مورد آنزیم کبدی ALT (p=۰/۰۳۲۴) و آنزیم شکمبه‌ای CMC (p=۰/۰۴۲۱) معنی‌دار بود. در خصوص آنزیم ALT، گاوهایی که با جیره حاوی لیزوفسفولیپید تغذیه شدند، سطح آنزیم کبدی پایین‌تری نسبت به تیمار شاهد داشتند که در این میان با افزایش سطح مصرف لیزوفسفولیپید در جیره، از مقدار آنزیم ALT کاسته شد (p=۰/۰۳۲۴)؛ از طرفی، نتایج آنزیم شکمبه‌ای CMC نشان داد که گاوهای تغذیه شده با سطوح مختلف لیزوفسفولیپید، غلظت بالاتری از آنزیم CMC را در شکمبه داشتند که بیشترین این غلظت برای تیمار ۳ (حاوی ۰/۱۵ درصد LPL) بود که با تیمار ۲ (حاوی ۰/۱ درصد LPL) تفاوت معنی‌داری نداشت ولی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (p=۰/۰۴۲۱).

جدول ۳- اثر تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم‌های کبدی و شکمبه‌ای در گاوهای شیری

Table 3. The results of experimental treatments on liver and rumen enzymes activity in dairy cows

موارد Items	تیمار با سطح LPL[1] خوراک Treatment with diet LPL[1] level			انحراف از میانگین SEM	سطح معنی‌داری *p*-value
	شاهد (-) Control(-)	۰/۱ درصد %0/1	۰/۱۵ درصد %0/15		
آنزیم‌های کبدی (واحد در لیتر) Hepatic enzymes(unit/L)					
[2]ALT	40.08[a]	33.36[b]	28.17[c]	1.481	0.0324
[3]AST	57.48	55.76	54.86	1.744	0.0875
[4]ALP	134.73	134.89	135.18	12.72	0.2655
آنزیم‌های شکمبه‌ای (نانو مول بر دقیقه بر میلی‌گرم) Rumen enzymes(nmol/min/mg)					
[5]CMC	50.92[b]	54.63[a]	55.81[a]	1.127	0.0421
[6]MCC	10.87	11.32	11.96	0.896	0.6899

۱- لیزوفسفولیپید؛ ۲- آلانین آمینوترانسفراز؛ ۳- آسپارتات آمینوترانسفراز؛ ۴-آلکالین فسفاتاز؛ ۵- کربوکسی متیل سلولاز؛ ۶-میکروکریستالین سلولاز

*میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ درصد می‌باشند.

1- Lysophospholipid, 2- Alanine Amino Transferase, 3- Aspartate Amino Teransferase, 4- Alkaline Phosphatase, 5- Carboxy Methyle Cellulase, 6-Micro Crystaline Cellulase

*The averages shown in defferet Latin letters in each colum, have a significant difference at the 0.05% level.

اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی برای تشخیص سلامت کبد و بررسی عملکرد و متابولیسم آن استفاده می‌شود. یکی از ناهنجاری‌های اصلی که باعث افزایش سطح آنزیم‌های کبدی در خون می‌شود، بروز کبد چرب است. بنابراین، افزایش سطح آنزیم‌های کبدی در خون نشان دهنده مشکلات کبدی است (Stojevic *et al.*, 2005). ریکو و همکاران (Rico *et al.*, 2017) گزارش داد که مکمل لسیتین (مورد استفاده در سطوح ۱۰ گرم در روز) هیچ تأثیری بر آنزیم‌های کبدی در سطوح مورد استفاده نداشت. با این‌حال، ALT ممکن است متابولیسم لیپید را تحت‌تأثیر قرار دهد، اما سازوکار آن مشخص نشده است. همچنین میزان مکمل چربی در جیره ممکن است در دوره‌های مختلف شیردهی در گاوهای شیری نقش متفاوتی داشته باشد. در مطالعه‌ای دیگر که بر روی بره‌های نر پرواری آمیخته‌های افشاری با زل انجام گرفت، گزارش شد که میزان غلظت آنزیم‌های کبدی ALP، ALT و AST، با افزودن مکمل لیزوفسفولیپید تغییری نکرد (Farahmandpoor *et al.*, 2022). آنها پیشنهاد کردند که عدم افزایش آنزیم‌های کبدی می‌تواند به‌دلیل تأثیر مثبت مکمل لیزوفسفولیپید بر متابولیسم مواد مغذی و درنتیجه عملکرد نرمال کبد باشد. در آزمایش دیگری که توسط هو و همکاران (Hou *et al.*, 2019) انجام شد، گزارش شد که LPL باعث افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی به‌ویژه آنزیم AST در خون می‌شود که با نتایج مطالعه حاضر غیرهم‌سو است. در خصوص اثرات منابع لیزوفسفولیپیدی بر فعالیت آنزیم‌های شکمبه‌ای CMC و MCC در شکمبه، نتایج متفاوتی ارائه شده است. در مطالعه‌ای بر روی اثر لیزولستین بر آنزیم‌های CMC و MCC شکمبه‌ای، گزارش شد که لیزولستین می‌تواند فعالیت آنزیم‌های CMC و MCC شکمبه‌ای را کاهش دهد (Fadden, 2019). این نتایج نشان

می‌دهد که لیزولستین ممکن است به‌تواند به‌عنوان یک ماده ضد باکتریایی در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد، زیرا کاهش فعالیت آنزیم‌های CMC و MCC شکمبه‌ای می‌تواند به کاهش تولید گاز در شکمبه و روده‌ها منجر شود. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر غیر هم‌سو است. هم‌سو با نتایج منتشر شده وتستین (Wettstein, 2000)، فعالیت آنزیم‌های میکروبی (CMCase و MCCase) در جیره‌های مکمل چربی و لیزوفسفولیپید در مقایسه با گروه شاهد بیشتر بود. این ممکن است نشان دهد که LPL می‌تواند اثرات مضر افزودن چربی در شکمبه را تعدیل کند، که ممکن است منجر به افزایش اثرات باکتری‌های سلولایتیک شود که به‌طور عمده مسئول فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک هستند و غالباً در هضم الیاف نقش دارند (Stojevic *et al.*, 2003). فعالیت‌های آنزیم میکروبی شکمبه بازتاب کیفی میکروب‌های شکمبه است که در هضم خوراک نقش دارند (Kamra *et al.*, 2010؛ Raghuvansi *et al.*, 2010). در مطالعه حاضر، فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک (CMCase و MCCase) زمانی‌که جیره‌های گاو شیری حاوی مکمل‌های چربی، به‌عنوان منبع انرژی، با LPL ترکیب شد، بهبود یافت. همچنین گزارش شد که جیره حاوی روغن مکمل با لیزولسیتین، فعالیت آنزیم‌های شکمبه را در مقایسه با جیره بدون لیزولسیتین و شاهد بهبود بخشید (Gallo *et al.*, 2019). نتایج این مطالعات، با پژوهش حاضر هم‌سو است. میزان فعالیت آنزیم‌های میکروبی به‌طور عمده به ترکیبات خوراک مصرفی، سطح چربی خوراکی، منبع و سطح LPL مصرفی در جیره بستگی دارد.

فراسنجه‌های شکمبه‌ای (pH، نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار)

نتایج اثر تیمارها بر درصد اسیداستیک (p=۰/۰۴۵۲) و اسید والریک (p=۰/۰۰۳۳)، اختلاف معنی‌داری را نشان داد. در این‌خصوص، بیشترین درصد اسید استیک تولیدی برای تیمار ۳ (حاوی ۰/۱۵ درصد LPL) بود که با تیمار ۲ (حاوی ۰/۱ درصد LPL) تفاوت معنی‌داری نداشت، ولی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (p=۰/۰۴۵۲). کمترین درصد اسید استیک تولیدی نیز برای تیمار شاهد بود که با تیمار ۲ (حاوی ۰/۱ درصد LPL) تفاوت معنی‌داری نداشت ولی با تیمار ۳ (حاوی ۰/۱۵ درصد LPL)، اختلاف معنی‌داری داشت (p=۰/۰۴۵۲). همچنین درخصوص درصد اسید والریک تولیدی بین تیمارها نشان داده شد که بیشترین درصد برای تیمار ۳ (حاوی ۰/۱۵ درصد LPL) بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (p=۰/۰۰۳۳). کمترین درصد اسید والریک تولیدی نیز برای تیمار شاهد بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (p=۰/۰۰۳۳).

جدول ۴- اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های شکمبه‌ای در گاوهای شیری

Table 4. The results of experimental treatments on ruminal parameters in dairy cows

موارد Items	تیمار با سطح LPL[1] خوراک Treatment with diet LPL level: شاهد (-) Control(-)	۰/۱ درصد %0/1	۰/۱۵ درصد %0/15	انحراف از میانگین SEM	سطح معنی‌داری *p*-value
pH	5.82	5.86	5.93	0.253	0.8244
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌مول بر دسی‌لیتر) Ammonia nitrogen (mmol/dL)	7.17	7.25	7.23	1.072	0.0843
VFA[2] کل (میلی‌مول در لیتر) Total VFA(mmol/L)	114	116	119	2.391	0.4175
اسید استیک (درصد) Acetic acid (%)	54.71[b]	57.67[ab]	63.98[a]	2.934	0.0452
اسید پروپیونیک (درصد) Propionic acid (%)	19.82	19.73	19.45	1.092	0.6817
اسید بوتیریک (درصد) Butyric acid (%)	10.18	11.61	12.17	0.897	0.4281
اسید ایزوبوتیریک (درصد) Isobutyric acid (%)	0.91	0.88	0.97	0.023	0.4677
اسید ایزووالریک (درصد) Isovaleric acid (%)	0.74	0.92	0.88	0.066	0.4737
اسید والریک (درصد) Valeric acid (%)	1.73[c]	1.81[b]	1.89[a]	0.028	0.0034
نسبت استات به پروپیونات Acetate Propionate ratio	2.86	2.93	3.21	0.311	0.5324

۱- لیزوفسفولیپید؛ ۲- اسید چرب فرار

*میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ درصد می‌باشند.

1- Lysophospholipid, 2- Volatile Fatty Acids

* The averages shown in defferet Latin letters in each colum, have a significant difference at the 0.05% level.

تغییرات عمده مشاهده شده در تخمیر شکمبه با افزودن LPL در جیره در این مطالعه باعث افزایش نسبت استات در کل VFA بدون تفاوت در نسبت پروپیونات شد و در نتیجه تمایل به افزایش نسبت استات به پروپیونات، بوتیرات و ایزوبوتیرات داشت. در این‌رابطه ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2016)، گزارش دادند که افزودن LPL باعث کاهش تولید استات و همچنین نسبت استات به پروپیونات در گاوهای شیری شد که با نتایج این آزمایش غیر هم‌سو است. با این‌حال، در آن آزمایش استفاده از LPL (۰/۰۵ – ۰/۰۷۵ درصد ماده خشک جیره) نسبت به مطالعه حاضر، کمتر بود. مطالعاتی که اثرات LPL را بر تخمیر شکمبه بررسی کردند، بسیار محدود هستند. در مطالعه‌ای که توسط ساسون و همکاران (Sasson *et al.*, 2013) با بررسی اثر لیزولسیتین بر میزان تولید اسیدهای چرب فرار در شکمبه ۲۵ گاو شیری اندازه‌گیری و بررسی شد. نتایج نشان داد که مصرف لیزولسیتین به‌مقدار ۱۰ گرم روزانه باعث افزایش معنی‌داری در میزان اسیداستیک تولیدی در شکمبه می‌شود. این یعنی لیزوفسفولیپید ممکن است تأثیر مستقیمی بر فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه داشته باشد و میزان

اسیداستیک تولیدی را افزایش دهد. با این‌حال، هنگامی‌که یونجه خشک با لسیتین سویا آغشه شد، نتایج متناقضی از نسبت استات: پروپیونات از ۵ نمونه آغشته شده آزمایشگاهی مشاهده شد (Jenkins *et al.*, 1998). در آن مطالعه، هنگامی‌که فسفولیپیدهای خالص شده با یونجه خشک مخلوط شدند، نسبت پروپیونات به‌صورت خطی با افزایش فسفولیپیدها، افزایش یافت که در آن کاهش قابلیت هضم NDF مشاهده شد. در مطالعه حاضر، افزایش عددی نسبت استات و نسبت استات به پروپیونات ممکن است با افزایش جزئی در قابلیت هضم ظاهری NDF همراه باشد. همچنین در این آزمایش با افزایش سطوح LPL میزان والرات افزایش یافت. این نتایج، با توجه به افزایش جزئی مقدار والرات، تا حدودی به نتایج ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2016) نزدیک بود. افزایش نسبت والرات با افزایش LPL ممکن است تا حدی در هضم NDF و نسبت استات در شکمبه افزایش یابد زیرا والرات توسط باکتری‌های سلولولیتیک برای تحریک هضم الیاف مورد نیاز است (Andries *et al.*, 1997). علاوه براین، افزایش مقدار والرات در گاوهایی که با جیره‌های حاوی LPL به‌عنوان منبع امولسیفایر تغذیه می‌کنند، ممکن است بر رشد باکتری‌های سلولی تأثیر بگذارد. با این‌حال، سایر اسیدهای چرب فرار شاخه‌دار به‌طور قابل‌توجهی تحت‌تأثیر قرار نگرفتند. به‌طورکلی، تغییرات در غلظت‌های استات و والرات بدون تغییر غلظت کل VFA نشان می‌دهد که LPL ممکن است بر نسبت باکتری‌های شکمبه تأثیر بگذارد. با این‌حال، درجه تغییرات نسبت میکروبی توسط LPL براساس عدم تغییر در pH شکمبه، NH_3 و درجه تغییرات در VFA توسط LPL نیست، که با مطالعه آزمایشگاهی سونتاکه و همکاران (Sontake *et al.*, 2014) هم‌سو است. در این مطالعه، LPL از لسیتین سویا تولید شد و در تغذیه گاوهای آزمایشی استفاده شد که در آن اثرات LPL بر تخمیر شکمبه ناچیز بود. اثر مکمل امولسیفایر بر تخمیر شکمبه بسته به‌نوع و اشباع چربی و نوع جیره متفاوت است (Brooks *et al.*, 2017؛ Kim *et al.*, 2020).

جمعیت باکتری‌ها و پروتوزوایی مایع شکمبه

نتایج آنالیز مربوط به جمعیت باکتریایی شکمبه در جدول (۵) ارائه شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده اثر تیمارها بر جمعیت کل باکتری‌ها و جمعیت پروتوزوایی معنی‌دار نبود.

جدول ۵- نتایج اثر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت باکتریایی شکمبه در گاوهای شیری

Table 5. The results of experimental treatments on the rumen bacterial population in dairy cows

موارد Items	تیمار با سطح LPL[1] خوراک Treatment with diet LPL level			انحراف از میانگین SEM	سطح معنی‌داری *p*-value
	شاهد (-) Control (-)	۰/۱ درصد lpl[3] 0/1 lpl٪	۰/۱۵ درصد lpl 0/15 lpl٪		
جمعیت کل باکتری (سلول در میلی‌لیتر × 10^9) Total bacteria(cell/ml*10^9)	4.68	4.93	5.18	0.465	0.0688
جمعیت کل پروتوزوآ(سلول در میلی‌لیتر× 10^5) Total protozoa(cell/ml*10^5)	5.86	6.09	6.17	0.171	0.0746

۱- لیزوفسفولیپید

* میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ درصد می‌باشند.

1- Lysophospholipid

* The averages shown in defferet Latin letters in each colum, have a significant difference at the 0.05% level.

اثرات نسبتاً کم LPL بر تخمیر شکمبه نیز با حداقل تغییرات در جمعیت باکتریایی مشاهده شده در مطالعه حاضر پشتیبانی می‌شود. جمعیت باکتری‌هایی که توسط LPL تغییر یافته بودند بسیار ناچیز بود. در این‌رابطه، حتی اگر برخی تغییرات مشاهده شد، درجه تغییرات در جمعیت‌ها توسط LPL احتمالاً بی‌اهمیت بود تا به تغییر قابل‌توجه تخمیر شکمبه کمک کند. به‌نظر می‌رسد مکمل LPL در سطوح مورد استفاده نمی‌تواند اثرات ضد میکروبی چربی مصرفی بر روی باکتری‌های آمیلولیتیک و پروتئولیتیک را کاهش دهد. در مطالعه لی و همکاران (Li *et al.*, 2019)، تأثیر مکمل لیزوفسفوگلیسیرید بر جمعیت‌های باکتریایی شکمبه را در بره‌های نر پرواری را بررسی کردند و نشان دادند که در جیره‌های حاوی ۰/۵ گرم در کیلوگرم ماده خشک، مکمل لیزو فسفوگلیسیرید، سبب افزایش اندکی در جمعیت باکتریایی شکمبه شدند. نتایج این مطالعه با مطالعه حاضر هم‌سو است. با این‌حال، نتایج ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2016) با مطالعه اثر LPL بر جمعیت باکتری‌های شکمبه مخالف بودند. آنها گزارش کردند که با توجه به اینکه *Treponema bryantii* باعث تخریب الیاف سلولولیتیک می‌شود (Kudo *et al.*, 1987) و نسبت این باکتری با افزایش LPL از ۱/۱۹ به ۱/۶۹ درصد افزایش یافت، اما نسبت باکتری‌های کل افزایش پیدا نکرد (Zhang *et al.*, 2022). در مطالعه آزمایشگاهی دیگری که توسط کیم و همکاران (Kim *et al.*, 2020) انجام شد، گزارش کرد که کاهش قابل‌توجهی در نسبت‌های نسبی باکتری‌های سلولولیتیک (*Fibrobacter succinogenes* و *Ruminococcus alb*us) و لیپولیتیک (*Butyrivibrio proteoclasticus* و *Anaerovibrio lipolytica*) با افزایش سطوح مکمل LPL مشاهده شد. از سوی دیگر، کماند و همکاران (Kamande *et al.*, 2000) اظهار داشت که استفاده از امولسیفایرها (Tween 60 و Tween 80) ممکن است فعالیت سلولاز میکروبی شکمبه را افزایش دهد و به‌جای بهبود توانایی اتصال باکتری‌های فیبرولیتیک، تخریب سلولز را افزایش دهد. با درنظر گرفتن نتایج قبلی، ممکن است مکمل LPL به‌تواند فعالیت میکروبی را شبیه به امولسیفایرهای دیگر (Tween 60 و Tween 80) در شکمبه تحت شرایط چربی بالا افزایش دهد (Kim *et al.*, 2004). با این‌وجود، اثرات احتمالی کاملاً به نوع مکمل LPL و سطح مورد استفاده آن در جیره بستگی دارد. در پژوهشی دیگر، مکمل لیزوفسفولیپید تمایل به افزایش خطی جمعیت میکروبی داشت. جمعیت پروتوزوآها بدون تغییر اما جمعیت قارچ‌ها تحت تأثیر مکمل لیزوفسفولیپید قرار گرفت. با توجه به جمعیت میکروبی، اگرچه تغییر معنی‌داری در مقدار کل باکتری‌ها در بین تیمارها وجود نداشت، مکمل لیزوفسفولیپید

تمایل به افزایش کل باکتری‌ها به‌صورت خطی داشت. تعداد مطلق تک‌یاخته‌های مژک‌دار با مکمل لیزوفسفولیپید در بین تیمارها تغییری نکرد (Kim *et al.*,2020).

می‌توان نتیجه گرفت که LPLها بر فراسنجه‌های خونی به‌خصوص بر متابولیسم لیپوپروتئین تأثیر مثبتی می‌گذارند. مکمل‌سازی جیره با LPL باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک، تخمیر شکمبه و جمعیت سلولی در گاوهای آزمایشی شد. در مجموع در مطالعه حاضر نشان داده شد که افزودن لیزوفسفولیپید به جیره گاوهای شیری در اوایل دوره‌ی شیردهی می‌تواند اثرات مثبتی را بر گاوهای اوایل دوره‌ی شیردهی به‌همراه داشته باشد. با این‌حال توصیه می‌شود تا از اثرات لیزوفسفولیپید در دزهای بالاتر و مدت‌زمان بیشتری استفاده شود و نتایج آن بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

از کارکنان گاوداری مهدشت، شرکت سیمرغ بهین دارو و همین‌طور گروه علوم دامی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Agarwal, N. (2000). Estimation of Fiber Degrading Enzyme. In Feed Microbiology ed. Chaudhary LC, Kamra D.N., & Agarwal D.K. Izatnagar, India: *CAS Animal Nutrition, IVRI*, 12, 283–290.

Andries, J. I., Buysse, F. X., Debrabander, D. L., & Cottyn, B. G. (1997). Isoacids in ruminant nutrition Their role in ruminal and intermediary metabolism and possible influences on performances A review. *Animal Feed Science Technology*, 18, 169–180.

Beauchemin, K.A., Krezer, M., & Mc-Allister, T.A. (2003). Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal Experimental Agriculture*, 48, 21-33.

Bobe, G., Young, J. W. & Beitz, D. C. (2004). Invited review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 3105–3124.

Brake, D. W., Titgemeyer, E. C., Bruok, M. J., Mcgregour, C. A., & Smith, J. F. (2013). Availability to lactating dairy cows of methionine added to soy lecithins and mixed with a mechanically extracted soybean meal. *Journal Dairy Science*, 96, 3064–3074.

Brautigan, J. Ming, X. H., & Zing, L. (2017). Intestinal digestibility of long chain fatty acids in early lactation of dairy cows. *Animal Feed and Technology*, 40, 109-119.

Brooks, C.C., Garner, G.B, Gehrke, C.W., Muhrer, M.E., & Pfander, W.H. (2017). The effect of added fat on the digestion of cellulose and protein by ovine rumen microorganisms. *Journal of Animal Science*, 13, 758-64.

Chen, X., Li, X., Zhang, H., & Wang, J. (2008). Effects of lysophospholipids on the performance immunity and expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 5451-5460.

Conway W. J. (1950). Micro diffusion analysis and volumetric error. (2th ed). *Crosby Lock Wood and Son. London*, U.K.346.

Dehority, B. A. (2003). Rumen Microbiology. *Nottingham University Press*, Nottingham, UK. 167-182.

Dehority, B. A. (1984). Evaluation of sub sampling and fixation procedures used for counting rumen. *Nottingham University Press*, Nottingham, UK. 218-235.

Fadden, J.W., Anti, G., & Macedo, V. P. (2019). Dietary lecithin supplementation in dairy cattle. *Animal Production*, 66, 57-64.

Farahmandpoor, M., Chashnidel, Y., Teymouri Yansari, A., & Kazemifard, M. (2021). Effects of lysophospholipids on performance, digestibility, blood parameters and rumen enzymes in mixed afshari-zel lamb (In Persian). *Journal of Ruminant Research*, 9(3), 53-67.

Gallo, S. B., Brochado, T., Brochine, L., Passarelli, D., Costa, S. F., & Bauno, J. C. (2017). Effect of biosurfactant added in two different oil source rations on lamb performance and ruminal and blood parameters. *Livestock Science*, 81, 1251-1261.

Gallo, S. B. Nordkrog, M., & Andersen, J. (2019). Effect of dietary supplementation with lysophospholipids on milk production, fat composition, and rumen parameters in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 233-241.

Hou, G. B., Cheng, L., Wu, T., Shen, S. Y., & Tain, W.C. (2019). Dietary supplementation of lysophospholipids effects feed digestion in ruminants. *Animals*, 19:144-156.

Huang, Y., Zhang, Y., Zhu, X., Liu, J., & Li, W. (2017). Lysophosphatidic acid enhances lipid synthesis and secretion in bovine mammary epithelial cells via an autocrine mechanism. *Journal of Cellular Physiology*, 233(8), 6145-6155.

Huo, Q. Li, B., Cheng, L., Wu, T., You, P., Shen, S., Li, Y., He, Y., Tian, W., Li, R., Li, J., Song, B., Wang, C., & Sun, X. (2019). Rationary Supplementation of Lysophospholipids and betain affects feed digestion in lambs. *Animals*, 9, 805.

Jenkins, T. C., Gimenez, T., & Cross, D. L. (1998). Influence of phospholipids on ruminal fermentation in vitro and on nutrient digestion and serum lipids in sheep. *Journal of Animal Science*, 67, 529–537.

Jenkins, T. C., Guan, S., & Jenny, A. (2002). Effect of different sort of emulisifier on nutrient digestion and lactation performance of dairy cows. *Journal of Mammal Research*, 44, 120-132.

Kamande, G.M., Baah, J., Cheng, K.J., McAllister, T.A., & Shelford, J.A. (2000). Effects of Tween 60 and Tween 80 on protease activity, thiol group reactivity, protein adsorption, and cellulose degradation by rumen microbial enzymes. *Journal of Dairy Science*, 83, 536-42.

Kamra, D.N., Sawal, R.K., Pathak, N.N., Kewalramani, N., & Agarwal, N. (2010). Diurnal variation in ciliate protozoa in the rumen of black buck (Antilope cerciapra) fed green forage. *Letter of Applied Microbiology*, 13, 165–167.

Kim, J. K., Mackle, T. R., Auldist, M. J., Thomson, N. A. & Bauman, D. E. (2004). Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 CLA in dairy cows fed fresh pasture. *Journal of Dairy Science*, 87, 369-378.

Kim, I. H., Zhao, P. Y., Z. F. Zhang, R. X. Lan, W. C., & Liu, A. (2020). Effect of lysophospholipids in diets differing in fat contents on growth performance, nutrient digestibility, milk composition and litter performance of lactating sows. *Animal*. 11, 984–990.

Kross, D. A., N. Tiwari1, M.J. Subhankar, k. Saxena, M. Ravikanth, & Shivi, M. (2018). Studies on comparative efficacy of lysolecithin supplement with synthetic DL methionine on broiler growth performance and carcass quality traits. *International Journal of Scientific and Research Publications Science*, 68, 250-353.

Kudo H., Cheng K. J., & Costerton, J. W. (1987). Interactions between Treponema bryantii and cellulolytic bacteria in the in vitro degradation of straw cellulose. *Candian Journal of Microbiology*, 33, 244–248.

Lee, C., Morris, D.L., Copelin, J. E., Hettick, J.M., & Kwon, I. H. (2017). Effects of lysophospholipids on short-term production, nitrogen utilization, and rumen fermentation and bacterial population in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102, 3110-20.

Li, H., Zhang, H., Li, X., Chen, X., Ding, L., & Wang, J. (2019). Effects of lysophospholipids on milk production, milk composition, and metabolic status in dairy cows during early lactation. *Animal Feed Science and Technology*, 248, 79-88.

Marchesini, G., Segato, S., Stetani, a.n., & Andrighetto, I. (2012). Lecithin a byproduct of biodiesel production and a source of choline for dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 15, 69-81.

Mashek, D. G., & R. Coleman, A. (2001). Long-chain *acyl*-CoA synthetases and fatty acid signaling. *Lipids*, 36(7), 697–706.

National Research Council. (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, 7th edition; National Academy Press: Washington, DC, USA, 2001.

Oikonomou, G., Arsenos, G., Tzora, A., & Katsoulos, P. D. (2015). Effects of dietary lysophospholipids supplementation on blood biochemical and hematological parameters in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(7), 4627-4638.

Ottenstein, D. M., & Bartley, D. A. (1971). Determination of rumen VFA. Analytical Chemistry. 43:952-955. *Applied Environtal Microbioly*, 48, 182-185.

Raghuvansi, S.K.S., Prasad, R., Mishra, A.S., Chaturvedi, O.H., Tripathi, M.K., Misra, A.K., Saraswat, B.L., & Jakhmola, R.C. (2007). Effect of inclusion of tree leaves in feed on nutrient utilization and rumen fermentation in sheep. *Bioresource Technology*, 98, 511-517.

Rico, D.E., Ying, Y., & Harvatine, J.K. (2017). Effects of lysolecithin on milk fat synthesis and milk fatty acid profile of cows fed diets differing in fiber and unsaturated fatty acid concentration. *Journal of Dairy Science*, 100, 11-26.

Sasson, G., Berkovich, Z., Shoham, J., Porat, D., Giladi, G., & Litvak, M. (2013). The Impact of Lysozyme on the Gastric Acid Output of the Stomach. *Journal of Gastronomy and Digestive Disorders*, 1(1), 102.

Sontake, U. B., Kaur, H., Tyagi, A. K., Kumar, M., & Hossan, S. A. (2014). Effect of feeding rice bran lyso-phospholipids and rumen protected fat on feed intake, nutrient utilization and milk yield in crossbred cows. *Indian Journal of Animal Science*, 84, 998–1003.

Stojević**,** Z., Milinković-Tur, S., Zdelar-Tuk, M., Pirsljin, J., Galić, G., & Bačić**,** I. **(**2005). Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. *Praxis Veteriary Journal*, 50, 261-264.

Tagesson, C., Franzen, L., Dahl, G., & Westrom, B. (2005). Lysophosphatidylcholine increases rat ileal permeability to macromolecules. *Animal Physiology*, 26, 369–377.

Vandehar, j., Rico, B., & Allen, M.S. (2016). Fat supplements affect fractional rates of ruminal fatty acid and passage in dairy cows. *Journal of Nutrition*. 136, 677-685.

Wettstein, H.R., & David, A. (2000). Effect of dietary supplementation of essential oils mixture on performance, milk qualityand mineral excretion in ruminant breeders. *Environmental Science of Animal Research*, 21, 13434e9.

Yuhahei, W.G., Kim, S., Wong, S.Y., & Lee, S.S. (2020). Effect of lysophospholipid in combied with corn gluten on growth performance, serum parameters, digestibility and body condition score in calf. *Livestock Science*, 32, 112-130.

Zeyni, A. A., Taghipour, M., Rezai, H., & Manouchehri, S. J. (2016). Effect of rationary lysophospholipid (LIPIDOLTM) supplementation on the improvement of forage usage and growth performance in Hanwoo heifer. *Journal of The Korean Society of Grassland and Forage Science*, 35, 232–237.

Zhang, H., Li, X., Chen, X., & Wang, J. (2016). Effects of lysophospholipids on the digestibility of nutrients in lipid metabolism on adipose tissue of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 5451-5460.

Zhang, Y., Chen, X., Zhang, H., Ding, L., Sun, Y., & Wang. J. (2022). Lysophospholipids supplementation during early lactation regulates lipid metabolism and improves hepatic function in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 104(6), 6554-6566.

Zhao P.Y. & Kim, I.H. (2017). Effect of emulsifier (lysophospholipids) on growth performance, nutrient digestibility and blood profile in weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 85, 330-414.

Zhao, P. Y., Zhang, Z. F., Lan, R. X. W. C. Liu, & Kim, I. H. (2015). Effect of lysophospholipids in diets differing in fat contents on growth performance, nutrient digestibility, milk composition and litter performance of lactating sows. *Animal*, 11, 984–990.

Zhou, P., & Regenstein, J. (2006). Determination of Total Protein Content in Gelatin Solutions with the Lowry or Biuret Assay. *Journal of Food Science*, (8)71, 469-474.