



The Effect of Mixtures of Free or Encapsulated Plant Essential Oils (Carvacrol, Thymol, and Eucalyptol) on Performance, Nutrient Digestibility, and Blood Metabolites of Holstein Dairy Cows

Amin Khezri^{1*}, Hamidreza Shafabakhsh¹, Ali Alizadeh²

1- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

3- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-E-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

*Corresponding Author's Email: akhezri@uk.ac.ir

How to cite this article:

Received: 04-03-2025
Revised: 15-04-2025
Accepted: 19-04-2025
Available Online: 29-07-2025

Khezri, A., Shafabakhsh, H., & Alizadeh, A. (2025). The effect of mixtures of free or encapsulated plant essential oils (carvacrol, thymol, and eucalyptol) on performance, nutrient digestibility, and blood metabolites of Holstein dairy cows. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 17(2), 155-166. (in Persian with English abstract)
<http://doi.org/10.22067/IJASR.2025.92428.1241>

Introduction: Natural feed additives, particularly plant essential oils (PEOs)—derived from leaves, flowers, bark, and other plant parts and rich in bioactive compounds like terpenes, phenolics, and aldehydes—have gained increasing attention in ruminant nutrition. These compounds exert antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and digestive stimulant effects, which make them attractive candidates for improving health, productivity, and metabolic efficiency in dairy cows, especially during the critical early lactation period. Early lactation is a challenging phase for high-yielding dairy cows, characterized by negative energy balance, reduced dry matter intake (DMI), mobilization of body reserves, and increased risk of oxidative stress and metabolic disorders. Supplementing diets with natural additives such as PEOs is a strategy to improve nutrient utilization, reduce stress, and support milk production and immune function. Although PEOs modulate ruminal fermentation, inhibit undesirable microbes, and promote volatile fatty acid (VFA) production, their high volatility and rapid degradation in the rumen can limit their effectiveness. Encapsulation technology, using protective coatings (e.g., lipids, polysaccharides), addresses this issue by improving stability, controlled release, and targeted delivery of active ingredients to the lower gut, thereby enhancing their bioavailability and physiological effects. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of free vs. encapsulated mixtures of carvacrol, thymol, and eucalyptol on feed intake, nutrient digestibility, milk yield and composition, and blood metabolites in Holstein dairy cows during early lactation.

Material and Methods: A total of 21 Holstein multiparous cows (average parity of 2.16 ± 1.7 , mean body weight of 620 ± 43 kg, average daily milk yield of 33.6 ± 3.4 kg, and 30 ± 12 days in milk) were enrolled in a completely randomized design with three dietary treatments ($n = 7$ per treatment). Cows were housed in individual tie stalls with free access to water and fed twice daily (08:00 and 17:00). A total of 21 Holstein multiparous cows (average parity of 2.16 ± 1.7 , mean body weight of 620 ± 43 kg, average daily milk yield of 33.6 ± 3.4 kg, and 30 ± 12 days in milk) were enrolled in a completely randomized design with three dietary treatments ($n = 7$ per



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

 <http://doi.org/10.22067/IJASR.2025.92428.1241>

treatment). Cows were housed in individual tie stalls with free access to water and fed twice daily (08:00 and 17:00). The experimental treatments were: Control: Basal TMR diet without additive; Free PEOs: Basal diet + 80 mg/kg DM of free essential oil mixture (carvacrol, thymol, eucalyptol); Encapsulated PEOs: Basal diet + 40 mg/kg DM of encapsulated essential oil mixture (same compounds). The trial lasted 56 days, comprising 14 days of adaptation and 42 days of data collection. Feed intake was recorded daily. Milk production was measured during three daily milkings (05:00, 12:00, 18:00), and milk composition was analyzed on days 54–55. Fecal samples were collected for digestibility analysis using internal markers. Blood samples were drawn on days 40 and 55 to evaluate glucose, urea nitrogen, cholesterol, NEFA, BHB, and total antioxidant capacity (TAC).

Results and Discussion: Dry matter intake (DMI) was slightly increased in cows fed encapsulated PEOs compared to the control. This may be attributed to improved palatability and reduced negative sensory impacts due to microencapsulation, which masks the pungent odor and bitter taste of free essential oils. Cows receiving encapsulated PEOs showed significantly higher apparent crude protein digestibility, suggesting a more efficient bypass of ruminal degradation and improved absorption in the small intestine. This finding is consistent with Calsamiglia et al. (2007), who reported that certain EO compounds can inhibit ruminal proteolysis, leading to increased rumen-undegraded protein (RUP) flow. Notably, the milk protein percentage and yield were higher in the encapsulated group. This is likely linked to the increased availability of absorbable amino acids, supporting enhanced milk protein synthesis in the mammary gland. Furthermore, blood analysis showed elevated total antioxidant capacity (TAC) and blood glucose in the encapsulated PEO group. The improved TAC suggests a reduction in oxidative stress, which is crucial during early lactation when metabolic demands are high. Elevated glucose also reflects improved energy status due to better nutrient digestion and possible shifts in VFA profiles toward more glucogenic propionate (Patra & Yu, 2012). In contrast, cows fed free PEOs demonstrated moderate improvements in intake and digestibility but less pronounced than the encapsulated group. This supports the concept that encapsulation enhances the functional delivery of EOs beyond the rumen. The somatic cell count (SCC), although not statistically significant, tended to be lower in EO-fed cows, particularly in the encapsulated group. This may reflect better mammary health or immune-modulating effects of PEOs. These results collectively highlight the advantages of encapsulated over free essential oils in enhancing performance, digestion, and metabolic health in dairy cows.

Conclusion: Results of this study showed that incorporating encapsulated plant essential oil mixtures (KaroGut™) into the diet positively impacts feed intake, protein digestibility, and performance in early-lactation dairy cows. Notably, the encapsulated form increased blood glucose and antioxidant capacity while reducing milk somatic cell counts, crucial for mitigating oxidative stress and sustaining milk production during early lactation.

Keywords: Plant essential oils, encapsulation, digestibility, blood metabolites, dairy cow performance

تأثیر مخلوط اسانس‌های گیاهی کارواکرول، تیمول و اکالیپتول به شکل آزاد یا کپسوله شده بر عملکرد تولیدی، گوارش پذیری مواد مغذی و متابولیت‌های خون گاوهای شیرده هلشتاین

امین خضری^{۱*}، حمیدرضا شفابخش^۱، علی علیزاده^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۳۰

چکیده

این پژوهش با هدف مطالعه تأثیر افزودن مخلوط اسانس‌های گیاهی آزاد و کپسوله شده به جیره بر عملکرد شیردهی، گوارش‌پذیری مواد مغذی و متابولیت‌های خونی گاوهای شیرده هلشتاین انجام شد. برای این منظور از ۲۱ رأس گاو شیرده هلشتاین با میانگین شکم زایش $2/16 \pm 1/7$ ، میانگین وزن بدن 620 ± 43 کیلوگرم، تولید شیر روزانه $33/6 \pm 3/4$ کیلوگرم و روزهای شیردهی 30 ± 12 روز در قالب طرح کامل تصادفی با سه تیمار آزمایشی (هفت تکرار برای هر تیمار) استفاده گردید. جیره‌های آزمایشی شامل (۱) جیره پایه (جیره بدون افزودنی)، (۲) جیره پایه + ۸۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی (کارواکرول، تیمول و اکالیپتول) به شکل آزاد در هر کیلوگرم ماده خشک، (۳) جیره پایه + ۴۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی (کارواکرول، تیمول و اکالیپتول) به شکل کپسوله شده در هر کیلوگرم ماده خشک بود. نتایج نشان داد که گاوهای تغذیه شده با جیره دارای مخلوط اسانس‌های گیاهی به شکل کپسوله شده، تمایل به مصرف خوراک و تولید شیر تصحیح شده برای چهار درصد چربی بیشتر، قابلیت هضم پروتئین بالاتر و میزان پروتئین شیر بیشتر در مقایسه با گروه شاهد داشتند. میانگین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل خون گاوهای تغذیه شده با جیره دارای اسانس‌های گیاهی کپسوله شده در مقایسه با گاوهای تغذیه شده با شاهد بالاتر بود. گاوهای تغذیه شده با جیره دارای مخلوط اسانس‌های گیاهی به شکل کپسوله شده، تمایل به کاهش سول‌های سوماتیک بدنی شیر و نیتروژن اوره‌ای خون در مقایسه با گروه شاهد داشتند. به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که اضافه کردن اسانس‌های گیاهی به شکل کپسوله به جیره از طریق بهبود خوراک مصرفی، قابلیت هضم پروتئین و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل خون می‌تواند اثر مثبت بر کاهش تنش اکسیداتیو و عملکرد گاوهای شیرده اوایل شیردهی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: پارامترهای خون، تولید شیر، گاوهای شیرده، متابولیت‌های ثانویه گیاهی، هضم

مقدمه

اسیدهای چرب غیراستریفیه شده (NEFA) و بتا-هیدروکسی بوتیرات (BHB) را داشته باشد (Khezri et al., 2009). به این دلیل، استفاده از افزودنی‌های خوراکی طبیعی برای بهبود وضعیت سلامت، افزایش بهره‌وری و کاهش مشکلات متابولیکی در گاوهای تازه‌زا اهمیت ویژه‌ای دارد. اسانس‌های گیاهی ترکیبات طبیعی هستند که از قسمت‌های مختلف گیاهان (مانند برگ، گل، ساقه، ریشه و بذر) استخراج می‌شوند. این ترکیبات عمدتاً شامل ترپن‌ها، فنل‌ها، آلدهیدها، کتون‌ها و الکل‌های معطر بوده و مسئول رایحه و خواص زیستی گیاهان می‌باشند (Ferreira et al., Kholif et al., 2021). در سال‌های اخیر، استفاده از اسانس‌های گیاهی مانند کارواکرول، تیمول و اکالیپتول در تغذیه گاوهای شیری به دلیل خواص ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و ضد التهابی آن‌ها توجه زیادی از متخصصین گاو شیری را به خود جلب کرده است. اسانس‌های گیاهی

در اوایل دوره شیردهی، گاوهای شیری با چالش‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی متعددی از جمله افزایش ناگهانی نیازهای انرژی برای تولید شیر و کاهش مصرف خوراک مواجه می‌شوند. این شرایط منجر به تعادل منفی انرژی شده که می‌تواند پیامدهای نامطلوبی مانند کاهش نمره بدنی، افزایش بسیج ذخایر چربی، کاهش عملکرد سیستم ایمنی، تغییرات در متابولیت‌های خونی از جمله افزایش غلظت

۱- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۲- گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر رفسنجان، رفسنجان، ایران

(Email: akhezri@uk.ac.ir.)

(*) نویسنده مسئول:

<http://doi.org/10.22067/IJASR.2025.92428.1241>

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ۲۱ رأس گاو شیرده هلستاین با میانگین شکم زایش $2/16 \pm 1/7$ ، میانگین وزن بدن 620 ± 43 کیلوگرم، تولید شیر روزانه $33/6 \pm 3/4$ کیلوگرم و روزهای شیردهی 30 ± 12 روز در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تیمار آزمایشی (۷ تکرار برای هر تیمار) استفاده شد. طول دوره آزمایش ۵۶ روز بوده که ۱۴ روز اول برای عادت‌پذیری گاوها به جیره‌های آزمایشی و ۴۲ روز برای نمونه‌گیری و جمع‌آوری داده در نظر گرفته شد. در ابتدای آزمایش، میزان تولید شیر و وزن بدن گاوها ثبت گردید و گاوها به‌طور تصادفی به هر یک از سه تیمارهای آزمایشی اختصاص داده شدند. اسانس‌های گیاهان آویشن و اکالیپتوس (مخلوط کارواکرول، تیمول و اکالیپتول با نسبت‌های مساوی) به‌شکل آزاد و یا کپسوله‌شده (نام تجاری کاروگات) از شرکت آرال فناور کارو (ایران) تهیه گردید. احتیاجات غذایی گاوها با استفاده از جداول آکادمی علوم، مهندسی و پزشکی (NASEM, 2021) تعیین و براساس آن جیره‌های غذایی فرمول شدند (جدول ۱). تعیین ترکیب شیمیایی نمونه‌های جیره شامل ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام و خاکستر براساس روش AOAC (2023) و اندازه‌گیری بخش‌های فیبری براساس روش ون سوست و همکاران (Van Soest et al., 1991) انجام شد. جیره‌های آزمایشی شامل (۱) جیره پایه (جیره بدون افزودنی)، (۲) جیره پایه + ۸۰ میلی‌گرم اسانس‌های گیاهی آزاد در هر کیلوگرم ماده خشک، (۳) جیره پایه + ۴۰ میلی‌گرم اسانس‌های گیاهی کپسوله‌شده در هر کیلوگرم ماده خشک بود.

انتخاب مقادیر ۸۰ میلی‌گرم برای اسانس‌های گیاهی آزاد و ۴۰ میلی‌گرم برای اسانس‌های گیاهی کپسوله‌شده در هر کیلوگرم ماده خشک براساس مطالعات قبلی و با در نظر گرفتن اثرات بیولوژیکی اسانس‌ها انجام گرفت (Khiaosa-Ard & Zebeli, 2013). جیره‌های آزمایشی در دو نوبت (۸:۰۰) و (۱۷:۰۰) به‌صورت کاملاً مخلوط و در حد اشتها در اختیار گاوها قرار می‌گرفت، به‌گونه‌ای که در انتهای ۲۴ ساعت حدود ۱۰ درصد از خوراک در آخور باقی بماند. در طول آزمایش، گاوها در جایگاه‌های انفرادی نگهداری شده و دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند. گاوها روزانه در سه نوبت ۵ صبح، ۱۲ ظهر و ۱۸ عصر دوشیده شده و شیر تولیدی گاوها در هر سه وعده دوشش ثبت گردید. برای ترکیب شیمیایی شیر در روزهای ۵۴ و ۵۵ دوره آزمایشی، نمونه‌گیری از شیر هر سه وعده در داخل ظروف دارای پتاسیم دی کرومات انجام شد و توسط دستگاه میکرو اسکن (مدل B133) برای چربی، پروتئین، لاکتوز، مواد جامد بدون چربی شیر و کل مواد جامد شیر آنالیز گردید.

به‌دلیل داشتن ترکیبات فعال زیستی؛ مانند ترپن‌ها، فنولیک‌ها و آلکالوئیدها، قادر به تعدیل تخمیر شکمبه، بهبود گوارش‌پذیری مواد مغذی و کاهش استرس اکسیداتیو (خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی) در دام هستند (Saeedi et Benchaar et al., 2008; al., 2017). مطالعات مختلفی در رابطه با اثر اسانس‌های گیاهی بر عملکرد تولیدی و وضعیت متابولیکی گاوهای شیری انجام شده است (Benchaar & Hassanat, 2025; Khurana et al., 2024). نتایج برخی مطالعات نشان داده‌اند که کارواکرول و تیمول می‌تواند با بهبود سلامت شکمبه و کاهش تخمیر غیرمولد، تولید شیر را بهبود بخشد. به‌عنوان مثال، افزودن کارواکرول به جیره گاوهای شیری باعث افزایش تولید شیر تصحیح‌شده براساس چربی (FCM) شده است (Benchaar, 2020; Spanghero et al., 2009). در مطالعه دیگر اضافه کردن تیمول به جیره میش‌های شیری باعث بهبود هضم مواد مغذی و تولید شیر گردید (Giannenas et al., 2011). این ترکیبات قادرند رشد میکروبی شکمبه را تحت‌تأثیر قرار داده و از طریق کاهش تولید متان و افزایش تولید اسیدهای چرب فرار، بهره‌وری انرژی را در حیوان افزایش دهند (Calsamiglia et al., Bach et al., 2023; Kung et al., 2007). با این حال، یکی از چالش‌های اصلی استفاده از اسانس‌های گیاهی، تجزیه سریع آن‌ها در شکمبه و کاهش اثرگذاری آن‌ها در مراحل بعدی هضم است (Patra & Yu, 2012). یکی از روش‌های مؤثر برای حفظ اثرات اسانس‌های گیاهی، استفاده از فناوری کپسوله‌سازی است. در این روش، ترکیبات فعال درون یک پوشش محافظ قرار گرفته و از تجزیه سریع آن‌ها در محیط شکمبه جلوگیری می‌شود. کپسوله‌سازی باعث افزایش پایداری ترکیبات فعال، بهبود کنترل رهایش آن‌ها در روده کوچک و در نتیجه افزایش جذب و اثربخشی این ترکیبات می‌شود (Duman et al., 2024). نتایج تحقیقات برون تنی نشان می‌دهد که استفاده از اسانس‌های گیاهی به‌صورت کپسوله‌شده، نسبت به فرم آزاد، تأثیر بهتری بر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی این اسانس‌ها دارد (Amin et al., 2021). با توجه به مزایای ذکر شده، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر مخلوط اسانس‌های گیاهی در دو شکل آزاد یا کپسوله‌شده بر عملکرد تولیدی، گوارش‌پذیری مواد مغذی و متابولیتهای خونی گاوهای شیرده هلستاین انجام شد تا مشخص کند که آیا استفاده از اسانس‌های گیاهی به‌صورت کپسوله‌شده می‌تواند نسبت به فرم آزاد، تأثیر بهتری بر بهبود وضعیت متابولیکی و عملکرد گاوهای شیری در اوایل دوره شیردهی که در حساس‌ترین مرحله فیزیولوژیکی خود قرار دارند، داشته باشد.

جدول ۱- اجزاء مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره کاملاً مخلوط‌شده (جیره پایه)

Table 1- The ingredients and chemical composition of TMR (basal diet)

اجزاء جیره پایه Ingredients	درصد (ماده خشک) (% DM)
یونجه خشک Dry alfalfa	28
سیلاژ ذرت Corn silage	12
دانه جو آسیاب شده Ground barley grain	26
سبوس گندم Wheat bran	6
دانه ذرت آسیاب شده Ground corn grain	7
کنجاله سویا Soybean meal	19
مکمل معدنی و ویتامینی ^۱ Vitamin and mineral premix ¹	0.9
کلسیم کربنات Calcium carbonate	0.3
سدیم بی‌کربنات Sodium bicarbonate	0.3
نمک Salt	0.3
ترکیب شیمیایی Chemical composition	
ماده خشک (درصد) Dry matter (%)	70.13
ماده آلی (درصد از ماده خشک) Organic matter (% DM)	92.45
پروتئین خام (درصد از ماده خشک) Crude protein (% DM)	17.12
پروتئین قابل تجزیه در شکمبه (درصد از پروتئین خام) Rumen-degradable protein (% of CP)	62.0
پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه (درصد از پروتئین خام) Rumen undegradable protein (% of CP)	38.0
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد از ماده خشک) Neutral Detergent Fiber (% DM)	33.79
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (درصد از ماده خشک) Acid Detergent Fiber (% DM)	19.38
انرژی خالص شیردهی (مگا کالری در کیلوگرم) Net energy lactation (Mcal kg/DM)	1.69

در هر کیلوگرم جیره: ۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D، ۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، دو گرم منگنز، سه گرم روی، سه گرم آهن، ۱۰۰ میلی‌گرم کبالت، ۶۰ گرم سدیم، ۰/۱ گرم ید، ۱۸۰ گرم کلسیم، ۹۰ گرم فسفر، ۰/۱ گرم کبالت، ۲۰ گرم منیزیم، ۰/۳ گرم مس و ۰/۰۱ گرم سلنیوم
Each kilogram of vitamin-mineral premix contained: Vitamin A (500,000 IU), Vitamin D (100,000 IU), Vitamin E (100), Iron (3 g), Manganese (2 g), Zinc (3 g), Iodine (0.1 g), Cobalt (0.1 g), Phosphorus (90 g), Calcium (180 g), Sodium (60 g), Magnesium (20 g), Copper (0.3g), Selenium (0.001g).

گیاههای شامل ترکیبات فرار از گیاهان هستند که به دلیل ترکیب شیمیایی خاص خود، می‌توانند به عنوان افزودنی‌های طبیعی به جیره‌های دامی برای بهبود عملکرد گوارشی و سلامتی استفاده شوند. از جمله اثرات مثبت اسانس‌ها می‌توان به اثر اسانس دارچین بر افزایش مصرف خوراک و اسانس آویشن بر بهبود هضم، تنظیم فعالیت میکروبی شکمبه و تحریک ترشح بزاق اشاره کرد (Benchaar et al., 2007).

اسانس‌های کپسوله‌شده دارای ویژگی جلوگیری از تجزیه سریع و کنترل آزادسازی اسانس‌ها در مسیر دستگاه گوارش می‌باشند. این اسانس‌ها می‌توانند در قسمت‌های خاص دستگاه گوارش آزاد شوند و اثر طولانی‌مدت داشته باشند (Garba, & Frincioglu, 2023). در پژوهش حاضر، ماده خشک مصرفی گاوهای تغذیه‌شده با جیره دارای مخلوط اسانس کپسوله‌شده در مقایسه با جیره شاهد (بدون اسانس) تمایل به افزایش داشت ($P=0/06$)، به گونه‌ای که اضافه کردن مخلوط اسانس کپسوله‌شده به جیره گاوها باعث افزایش مصرف ماده خشک این گروه از گاوها در مقایسه با گروه تغذیه‌شده با جیره شاهد (بدون اسانس) شد ($21/38$ در مقابل $20/75$ کیلوگرم در روز). این امر به ویژه در دوره‌های اولیه شیردهی، زمانی که گاوها با کاهش مصرف خوراک و افزایش اسیدهای چرب غیراستریفیه‌شده و بتا هیدروکسی بوتیرات خون به دلیل استرس‌های متابولیکی و تغییرات هورمونی روبه‌رو هستند، بسیار مهم است (Moodi et al., 2025) و احتمالاً به دلیل تأثیر مثبت اسانس‌های گیاهی کپسوله‌شده بر اشتها و مصرف خوراک حیوان از طریق تأثیرات سیستم عصبی مرکزی می‌باشد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که برخی اسانس‌های گیاهی با کاهش تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه و کاهش تولید متان در شکمبه، باعث بهبود محیط تخمیر شکمبه و افزایش مصرف خوراک می‌شوند (Castillejos et al., 2006). میانگین قابلیت هضم ماده خشک برای جیره‌های یک الی سه به ترتیب $67/25$ ، $68/16$ و $70/83$ درصد بود و تحت تأثیر افزودن اسانس‌های گیاهی آزاد و یا کپسوله‌شده به جیره‌ها قرار نرفت ($P>0/05$). اضافه کردن مخلوط اسانس‌های گیاهی کپسوله به جیره گاوهای شیری تمایل به افزایش قابلیت هضم ماده آلی ($P=0/08$) و الیاف نامحلول در شوینده خنثی ($P=0/09$) در مقایسه با جیره شاهد داشت، اما به طور معنی‌داری باعث بهبود قابلیت هضم ظاهری پروتئین شد ($67/87$ در مقابل $64/14$ درصد، $P=0/04$). تأثیرات احتمالی اسانس‌های گیاهی بر بهبود قابلیت هضم شامل مهار فعالیت ریزجانداران پروتئولیتیک در شکمبه، افزایش ترشح آنزیم‌های گوارشی (مانند پپسین و تریپسین) و فراهم کردن محیط مناسب برای فعالیت آنزیم‌های گوارشی از طریق کاهش تنش اکسیداتیو است. نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد که ترکیباتی مانند

خوراک مصرفی گاوها به صورت روزانه در تمام دوره آزمایش ثبت و باقی‌مانده خوراک در اول صبح هر روز توزین شده و برای تعیین ماده خشک مصرفی روزانه گاوها، از خوراک روز قبل آن‌ها کسر گردید. وزن کشتی از گاوها سه مرتبه (ابتدا، اواسط و انتهای دوره آزمایشی) با باسکول دیجیتال برای محاسبه تغییرات وزن بدن انجام شد. برای تعیین قابلیت هضم مواد مغذی، نمونه‌گیری از مدفوع در هفته آخر به مدت شش روز و به طور مستقیم از محتویات راست‌رونده انجام گرفت و از روش خاکستر نامحلول در اسید به عنوان نشانگر داخلی استفاده شد (Vankeulen & Young, 1977). برای تعیین ترکیبات خون در روز ۵۶ آزمایش از محل ورید دم خون‌گیری انجام شده و نمونه‌های خون در داخل آب یخ قرار گرفت و سپس در دور 3000 به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم نمونه‌ها برای آنالیزهای بعدی در دمای منفی 20 درجه سلسیوس نگهداری شدند. متابولیت‌های خون شامل گلوکز، نیتروژن اوره‌ای خون، کل پروتئین، کلسترول و اسیدهای چرب غیراستریفیه‌شده و بتا هیدروکسی بوتیرات با استفاده از کیت‌های تجاری پارس آزمون با اسپکتروفتومتر (مدل ELMER35) اندازه‌گیری شدند (Khezri et al., 2009). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی خون با روش اسید تیوباربیتیک و از طریق دستگاه اتوآنالایزر آلسیون (ساخت بلژیک) اندازه‌گیری شد. طرح آزمایشی مورد استفاده در این پژوهش طرح کامل تصادفی با سه تیمار و هفت تکرار (گاو) در هر تیمار بود. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار آماری SAS (SAS, 2009) و رویه Mixed استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد و با آزمون توکی انجام گرفت. مدل آماری مورد استفاده به صورت $Y_{ijk} = \mu + T_i + e_{ij}$ بوده که در آن Y_{ij} : متغیر وابسته (مقدار صفت مشاهده‌شده در تیمار i)، μ : میانگین صفت، T_i : اثر ثابت تیمار (جیره آزمایشی) و e_{ij} : اثر باقی‌مانده می‌باشد.

نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از تأثیر جیره‌های آزمایشی بر تغییرات وزن بدن، ماده خشک مصرفی و قابلیت هضم مواد مغذی در جدول ۲ نشان داده شده است. وزن اولیه گاوها در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت که نشان‌دهنده توزیع مناسب گاوها در تیمارهای آزمایشی می‌باشد. همچنین کاهش وزن بدن در تمامی گروه‌ها مشاهده شد، اما در گروه‌های دریافت‌کننده اسانس‌های گیاهی، این کاهش وزن به صورت عددی کمتر بود ($P>0/05$). نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از ترکیبات اسانس‌های گیاهی می‌تواند تأثیر مثبتی بر حفظ وزن بدن در گاوهای شیرده داشته باشد، اما این اثر وابسته به نوع اسانس، دوز مصرفی و مدت زمان آزمایش است

تیمول و کارواکرول می‌توانند از فعالیت میکروب‌های تولیدکننده آمونیاک جلوگیری کرده و شرایط بهتری برای هضم مواد مغذی فراهم کنند (Busquet et al., 2005). همچنین نتایج برخی از پژوهش‌ها نشان می‌دهد که استفاده از اسانس‌های گیاهی از جمله

تیمول باعث تثبیت فعالیت میکروبی شکمبه و بهبود هضم پروتئین شده (McIntosh et al., 2003) که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد.

جدول ۲- اثر اضافه کردن مخلوط اسانس‌های گیاهی آزاد یا کپسوله‌شده به جیره بر ماده خشک مصرفی و قابلیت هضم مواد مغذی در گاوهای شیرده
Table 2- Effect of adding a blend of free or encapsulated essential oils to diet on dry matter intake and nutrient digestibility in dairy cows

صفت Parameter	جیره‌های آزمایشی Experimental diets			میانگین خطای استاندارد SEM	احتمال معنی‌داری P-value ¹
	جیره پایه (شاهد) Basal diet	جیره پایه + ۸۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی آزاد در کیلوگرم Basal diet + 80 mg free essential oils/kg	جیره پایه + ۴۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی کپسوله در کیلوگرم Basal diet + 40 mg encapsulated essential oils /kg		
وزن گاوها در شروع آزمایش (کیلوگرم) Initial cows' body weight (kg)	620.26	618.41	621.13	7.4	0.92
وزن گاوها در پایان آزمایش (کیلوگرم) Final cows' body weight (kg)	590.67	594.19	599.85	6.5	0.78
میانگین تغییرات وزن بدن (درصد) Average body weight gain (%)	-4.7	-3.91	-3.42	0.9	1.06
ماده خشک مصرفی (کیلوگرم در روز) Dry matter intake (kg/d)	20.75	21.14	21.38	0.38	0.06
قابلیت هضم (درصد) Digestibility (%)					
ماده خشک Dry matter	67.25	68.16	70.83	1.42	0.19
ماده آلی Organic matter	69.52	70.84	72.69	1.25	0.08
پروتئین خام Crude protein	64.14 ^b	67.95 ^{ab}	67.87 ^a	1.04	0.04
الیاف نامحلول در شوینده خنثی Neutral Detergent Fiber	50.26	51.83	53.11	1.38	0.09

جیره‌های آزمایش شامل جیره ۱: جیره پایه (شاهد)، جیره ۲: جیره پایه + ۸۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی آزاد در هر کیلوگرم ماده خشک، جیره ۳: جیره پایه + ۴۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی کپسوله شده در هر کیلوگرم ماده خشک بودند.

۱- میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

The experimental diets consisted of diet 1: a basal diet (control diet with no additives), diet 2: the basal diet + 80 mg of free plant essential oils mixture per kg of diet dry matter, and diet 3: the basal diet + 40 mg of encapsulated plant essential oils mixture per kg of DM.

Means of each row with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

داشته باشد. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که برخی اسانس‌های گیاهی مانند تیمول و کارواکرول می‌توانند از طریق بهبود هضم مواد مغذی و افزایش بازده استفاده از انرژی در شکمبه، تولید شیر را افزایش دهند (Benchaar et al., 2011; Castillejos et al., 2006). میزان شیر تصحیح‌شده برای چهار درصد در گروه شاهد (۳۲/۴۵ کیلوگرم و در تیمارهای دارای اسانس آزاد و کپسوله تمایل به افزایش معنادار داشت و به ترتیب ۳۳/۴۰ و ۳۴/۳۵ کیلوگرم در روز بود ($P=0.08$)).

جدول ۳، نشان‌دهنده تأثیر جیره‌های آزمایشی بر تولید و ترکیب شیر گاوهای آزمایشی است. تولید شیر در شاهد (بدون اسانس) برابر با ۳۵/۱۳ کیلوگرم در روز بود، درحالی‌که در تیمار حاوی ۸۰ میلی گرم اسانس آزاد و ۴۰ میلی گرم اسانس کپسوله‌شده به ترتیب به ۳۶/۴۵ و ۳۷/۱ کیلوگرم افزایش یافت. با این حال، این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبودند ($p=0.11$). این نتایج نشان می‌دهد که افزودن اسانس‌های گیاهی به جیره غذایی می‌تواند به بهبود تولید شیر کمک کند، اما میزان افزایش ممکن است به عوامل متعددی مانند ترکیب اسانس، میزان مصرف خوراک و وضعیت متابولیکی گاوها بستگی

جدول ۳- اثر اضافه کردن مخلوط اسانس‌های گیاهی آزاد یا کپسوله‌شده به جیره بر تولید و ترکیب شیر گاوهای شیرده

Table 3- Effect of adding a blend of free or encapsulated essential oils to diet on milk yield and composition in dairy cows

صفت Parameter	جیره‌های آزمایشی Experimental diets			میانگین خطای استاندارد SEM	ارزش پی P- value ²
	جیره پایه (شاهد) Basal diet	جیره پایه + ۸۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی آزاد در کیلوگرم Basal diet + 80 mg free essential oils/ kg	جیره پایه + ۴۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی کپسوله در کیلوگرم Basal diet + 40 mg encapsulated essential oils /kg		
تولید شیر خام (کیلوگرم در روز) Milk yield (kg/d)	35.13	36.45	37.21	1.25	0.11
^۱ تولید شیر تصحیح شده برای ۴ درصد چربی 4% fat corrected milk(kg/d)	32.45	33.40	34.53	1.04	0.08
چربی شیر (درصد) Milk fat (%)	3.49	3.56	3.54	0.15	0.23
پروتئین شیر (درصد) Milk protein (%)	2.98 ^b	3.04 ^{ab}	3.12 ^a	0.06	0.04
لاکتوز شیر (درصد) Milk lactose (%)	4.68	4.69	4.67	0.04	0.19
مواد جامد بدون چربی شیر (درصد) Milk solids not fat (%)	8.36	8.40	8.45	0.09	0.31
کل مواد جامد شیر (درصد) Milk total solids (%)	11.85	11.95	11.98	0.27	0.52
چربی شیر (کیلوگرم در روز) Milk fat (kg/day)	1.23	1.30	1.32	0.09	0.11
پروتئین شیر (کیلوگرم در روز) Milk protein (kg/day)	1.05	1.11	1.16	0.08	0.13
لاکتوز شیر (کیلوگرم در روز) Milk lactose (kg/day)	1.64	1.71	1.73	0.07	0.15
مواد جامد بدون چربی شیر (کیلوگرم در روز) Milk solids not fat (kg/d)	2.94	3.06	3.14	0.18	0.65
کل مواد جامد شیر (کیلوگرم در روز) Milk total solids (%)	4.16	4.33	4.41	0.36	0.87
نیتروژن اوره‌ای شیر (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم) Milk urea nitrogen (mg/100g)	16.53	16.17	15.82	0.39	0.68
تعداد سلول‌های سوماتیک (۱۰۰۰ سلول در میلی لیتر) Somatic cell count (1000 cell/ml)	195	174	156	47.18	0.09

جیره‌های آزمایش شامل جیره ۱: جیره پایه (شاهد)، جیره ۲: جیره پایه + ۸۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی آزاد در هر کیلوگرم ماده خشک، جیره ۳: جیره پایه + ۴۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی کپسوله شده در هر کیلوگرم ماده خشک بودند.

۱- تولید شیر تصحیح شده برای چهار درصد چربی = $(0.4 \times \text{شیر خام}) + (15 \times \text{چربی شیر})$

۲- میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

The experimental diets consisted of diet 1: a basal diet (control diet with no additives), diet 2: the basal diet + 80 mg of free plant essential oils mixture per kg of diet dry matter, and diet 3: the basal diet + 40 mg of encapsulated plant essential oils mixture per kg of DM.

4% fat corrected milk = $(0.4 \times \text{raw milk}) + (15 \times \text{milk fat})$

Means of each row with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی کپسوله شده و بهبود سلامت پستان باشد. مطالعات قبلی (Tager & Krause, 2011) نشان داده‌اند که اسانس‌های گیاهی می‌توانند با کاهش التهاب و عفونت‌های پستان، این شاخص را بهبود بخشند که با نتایج پژوهش حاضر هم‌راستا است. کپسوله کردن اسانس‌ها از تخریب آن‌ها در محیط اسیدی شکمبه جلوگیری می‌کند و باعث می‌شود که آن‌ها در روده کوچک آزاد شده و اثرات ضدالتهابی بهتری از خود نشان دهند (Wallace, 2004).

نتایج متابولیت‌های خونی شامل گلوکز، پروتئین کل، نیتروژن اوره‌ای، کلسترول، اسیدهای چرب غیراستری شده، اسید بتا هیدروکسی بوتیریک و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل خون در جدول ۴ نشان داده شده است. در مطالعه حاضر، میزان کل پروتئین، کلسترول، اسیدهای چرب غیراستریفیه شده و بتا هیدروکسی بوتیرات خون تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت، اما سطوح گلوکز خون گاوهای تغذیه شده با جیره دارای اسانس‌های گیاهی کپسوله شده تمایل به افزایش معنی‌دار در مقایسه با گاوهای تغذیه شده با شاهد داشت (۶۱/۳۵ در برابر ۵۶/۷۱ میلی گرم بر دسی لیتر، $p=0.08$) که می‌تواند نشان‌دهنده بهبود متابولیسم کربوهیدرات یا انرژی در این گروه از گاوها باشد.

نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد که اسانس‌های گیاهی می‌توانند با بهبود متابولیسم کربوهیدرات و افزایش دسترسی به انرژی، سطوح گلوکز خون را افزایش دهند (Benchaa et al., 2008). همچنین نیتروژن اوره‌ای خون در گروه اسانس‌های گیاهی کپسوله شده تمایل به کاهش معنادار داشت ($P=0.09$) که می‌تواند نشان‌دهنده بهره‌وری بهتر نیتروژن یا کاهش تجزیه پروتئین در شکمبه باشد. نتایج برخی مطالعات بیانگر اثر کاهشی اسانس‌های گیاهی بر تولید آمونیاک در شکمبه از طریق کاهش جمعیت باکتری های تجزیه‌کننده پروتئین است (McEwan et al., 2002).

مطالعات قبلی (Yang et al., 2007) نشان داده‌اند که اسانس‌های گیاهی می‌توانند با بهبود تخمیر شکمبه‌ای و افزایش تولید پروپیونات، منجر به تولید انرژی بیشتر برای سنتز لاکتوز شوند که این امر در نهایت افزایش تولید شیر را به دنبال دارد. در پژوهش حاضر، میزان چربی، مواد جامد بدون چربی، مواد جامد کل و نیتروژن اوره‌ای شیر تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($P>0.05$)، اما میزان پروتئین شیر در گاوهای تغذیه شده با جیره دارای اسانس‌های کپسوله شده (۳/۱۲ درصد) نسبت به گروه شاهد (۲/۹۸ درصد) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P=0.04$).

افزایش میزان پروتئین شیر در گاوهایی که با جیره‌های حاوی اسانس‌های گیاهی کپسوله شده تغذیه می‌شوند، می‌تواند به‌طور مستقیم با افزایش قابلیت هضم پروتئین جیره در این گاوها مرتبط باشد که کاهش تجزیه پروتئین در شکمبه و افزایش عبور آن به روده، باعث افزایش قابلیت هضم پروتئین واقعی در محل جذب شوند.

این اثر سبب افزایش آمینواسیدهای قابل استفاده در متابولیسم برای سنتز پروتئین شیر می‌شود (Calsamiglia et al., 2007). مطالعات متعددی (Hristov et al., 2013) نشان داده‌اند که اسانس‌های گیاهی تیمول و کارواکرول در گیاه *Origanum vulgare* L. می‌توانند درصد چربی و پروتئین شیر را به‌طور معنی‌داری افزایش دهند که با یافته‌های پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد. اسانس‌های گیاهی از جمله تیمول، اوژنول و سینامالدئید می‌توانند از طریق بهبود متابولیسم نیتروژن و افزایش سنتز میکروبی پروتئین در شکمبه بر پروتئین شیر تأثیر مثبت بگذارند (Benchaa et al., 2008).

در پژوهش حاضر، سلول‌های سوماتیک بدنی شیر گاوهای تغذیه شده با تیمار دارای اسانس‌های گیاهی کپسوله شده تمایل به کاهش معیندار در مقایسه با گاوهای تغذیه شده با شاهد داشت (۱۵۶ در برابر ۱۹۵ هزار در هر میلی لیتر، $P=0.09$) که می‌تواند نشان‌دهنده اثرات

جدول ۴- اثر اضافه کردن مخلوط اسانس‌های گیاهی آزاد یا کپسوله‌شده به جیره بر متابولیت‌های خونی گاوهای شپرد

Table 4- Effect of adding a blend of free or encapsulated essential oils to diet on blood metabolites in dairy cows

متابولیت‌های خونی Blood metabolites	جیره‌های آزمایشی Experimental diets			میانگین خطای استاندارد SEM	ارزش پی P- value ¹
	جیره پایه (شاهد) Basal diet	جیره پایه + ۸۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی آزاد در کیلوگرم Basal diet + 80 mg free essential oils/kg	جیره پایه + ۴۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی کپسوله در کیلوگرم Basal diet + 40 mg encapsulated essential oils /kg		
گلوکز (میلی گرم در دسی لیتر) Glucose (mg/dl)	56.71	58.91	61.35	1.86	0.08
کل پروتئین (گرم در دسی لیتر) Total protein (g/dl)	8.8	9.1	9.0	0.56	0.47
نیتروژن اوردهای خون (میلی گرم در دسی لیتر) Blood urine nitrogen (mg/dl)	18.38	18.15	17.96	1.19	0.09
کلسترول (میلی گرم در دسی لیتر) Cholesterol (mg/dl)	220.57	212.42	215.14	16.53	0.95
اسیدهای چرب غیراستریفیه (میلی مول در لیتر) Non-esterifies fatty acids (mmol/L)	0.48	0.45	0.44	0.09	0.29
بتا هیدروکسی بوتیرات (میلی مول بر لیتر) β -Hydroxybutyric acid (mmol/L)	0.95	0.86	0.78	0.06	0.11
ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (میلی مول بر لیتر) Total anti-oxidant capacity (mmol/L)	0.68 ^b	0.73 ^{ab}	0.81 ^a	0.05	0.03

جیره‌های آزمایش شامل جیره ۱: جیره پایه (شاهد)، جیره ۲: جیره پایه + ۸۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی آزاد در هر کیلوگرم ماده خشک، جیره ۳: جیره پایه + ۴۰ میلی گرم مخلوط اسانس‌های گیاهی کپسوله شده در هر کیلوگرم ماده خشک بودند.

۱- میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی دار می‌باشند ($P < 0.05$).

The experimental diets consisted of diet 1: a basal diet (control diet with no additives), diet 2: the basal diet + 80 mg of free plant essential oils mixture per kg of diet dry matter, and diet 3: the basal diet + 40 mg of encapsulated plant essential oils mixture per kg of DM.

Means of each row with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

تنش اکسیداتیو بالایی هستند (Benchaa et al., 2008). اسانس‌های کپسوله‌شده به دلیل جذب بهتر در روده کوچک می‌توانند به طور مستقیم وارد جریان خون شده و با کاهش رادیکال‌های آزاد، بهبود سلامت کبد و تقویت سیستم ایمنی، تنش اکسیداتیو را کاهش داده و باعث تولید پایدارتر شیر در گاوهای شیری شوند.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اضافه کردن مخلوط اسانس‌های گیاهی کپسوله‌شده به جیره اثر مثبت بر مصرف خوراک، قابلیت هضم پروتئین و عملکرد گاوهای شیرده اوایل شیردهی دارد.

میانگین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل خون گاوهای تغذیه‌شده با جیره شاهد (بدون اسانس)، جیره دارای اسانس‌های گیاهی آزاد و جیره دارای اسانس‌های گیاهی کپسوله‌شده به ترتیب ۰/۷۳، ۰/۶۸ و ۰/۸۱ میلی مول بر لیتر بود و تحت تأثیر افزودن اسانس‌های گیاهی کپسوله‌شده به جیره‌ها قرار گرفت ($P = 0.03$) که نشان‌دهنده اثرات آنتی اکسیدانی قوی تر اسانس‌های کپسوله‌شده است و می‌تواند به کاهش تنش اکسیداتیو و بهبود سلامت کلی گاوها به ویژه در اوایل دوره شیردهی کمک کند. برخی محققان نشان دادند که اسانس‌های کپسوله‌شده می‌توانند تنش اکسیداتیو را در گاوهای شیری کاهش دهند و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل را بهبود بخشند. در اوایل شیردهی، گاوها به دلیل تعادل منفی انرژی و موبلیزاسیون چربی، در معرض

اسانس‌های گیاهی کپسوله‌شده به‌عنوان یک راهبرد تغذیه‌ای مؤثر در بهبود عملکرد گاوهای شیرده به‌ویژه در اوایل دوره شیردهی است، اما برای بهینه‌سازی استفاده از اسانس‌های گیاهی در جیره گاوهای شیرده، توصیه می‌شود که دوزهای مختلف اسانس‌های کپسوله‌شده در مطالعات بعدی و در بازه زمانی طولانی‌تر بررسی شود.

علاوه بر این، در مطالعه حاضر استفاده از شکل کپسوله مخلوط اسانس‌های گیاهی تمایل به افزایش میزان گلوکز و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی خون گاوها داشت و همچنین تمایل به کاهش سلول‌های سوماتیک شیر داشت که این مسئله به‌ویژه در اوایل شیردهی برای کاهش تنش اکسیداتیو و بهبود تولید پایدار شیر اهمیت زیادی دارد. این یافته‌ها نشان‌دهنده اثرات مثبت استفاده از مخلوط

References

1. Amin, N., Tagliapietra, F., Arango, S., Guzzo, N., & Bailoni, L. (2021). Free and microencapsulated essential oils incubated *in vitro*: Ruminal stability and fermentation parameters. *Animals (Basel)*, 11(1), 180. <https://doi.org/10.3390/ani11010180>
2. AOAC. (2023). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists (Washington, D.C., USA), 22.
3. Bach, A., Elcoso, G., Escartín, M., Spengler, K., & Jouve, A., (2023). Modulation of milking performance, methane emissions, and rumen microbiome on dairy cows by dietary supplementation of a blend of essential oils. *Animal*, 17, 100825. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100825>.
4. Benchaar, C. (2020). Diet supplementation with thyme oil and its main component thymol failed to favorably alter rumen fermentation, improve nutrient utilization, or enhance milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 104(1), 324-336. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18401>
5. Benchaar, C., & Greathead, H. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 166, 338-355. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.024>.
6. Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 209-228. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014>.
7. Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Whyte, T. D., & Chouinard, P. Y. (2007). Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 886-897. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71572-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71572-0).
8. Benchaar, C., & Hassanat, F., (2025). Diet supplementation with a mixture of essential oils: Effects on enteric methane emissions, apparent total-tract nutrient digestibility, nitrogen utilization, and lactational performance, *Journal of Dairy Science*. (In Press). <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25447>.
9. Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P. W., & Kamel, C. (2005). Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual-flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2508-2516. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72928-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72928-6).
10. Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2580-95. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>.
11. Castillejos, L., Calsamiglia, S., & Ferret, A. (2006). Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2649-2658. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72341-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72341-2).
12. Duman, E., Evcin, A., Enginar, H., Ersoy, B., Duman, E., Kayhan, H., & Çetinkaya, Z. (2024). Encapsulation of essential oils using complex coacervation: A study on microcapsule formation and efficiency. *International Journal of Computational and Experimental Science and Engineering*, 10(3), 527-536. <https://doi.org/10.22399/ijcesen.394>
13. Ferreira, F. J., Fernandes, L. D., Lobo Júnior, A. R., Rosado, G. L., & Bento, C. B. P. (2024). Meta-analysis of the effects of essential oils on consumption, performance, and ruminal fermentation of beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 311, 115956. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.115956>.
14. Garba, A. K., Frincioglu, S. Y. (2023). Role of encapsulation nutrients for improvement of ruminant performance and ruminant derived – products. *Eurasian Journal of Agricultural Research*, 7(2), 109-126.
15. Giannenas, I., Skoufos, J., Giannakopoulos, C., Wiemann, M., Gortzi, O., Lalas, S., & Kyriazakis, I. (2011). Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5569-5577. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4096>.
16. Hristov, A. N., Lee, C., Cassidy, T., Heyler, K., Tekippe, J. A., Varga, G. A., & Ott, T. L. (2013). Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 1189-1202. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5975>.
17. Khezri, A., Rezayazdi, K., Mesgaran, M. D., & MoradiSharbakh, M. (2009). Effect of different rumen-degradable

- carbohydrates on rumen fermentation, nitrogen metabolism and lactation performance of Holstein dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(5), 651-658.
18. Kholif, A. E., & Olafadehan, O. A. (2021). Essential oils and phytogetic feed additives in ruminant diet: Chemistry, ruminal microbiota and fermentation, feed utilization and productive performance. *Phytochemistry Reviews*, 20, 1087-1108. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09753-0>.
 19. Khiaosa-Ard, R., & Zebeli, Q. (2013). Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. *Journal of Animal Science*, 91(4), 1819-1830. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5691>.
 20. Khurana, R., Salami, S. A., Poblete, R. B., Fischer, A., Cofré, L. A., Bustos, V., & Tas, B.M., (2024). Effect of a garlic and citrus extract supplement on the lactation performance and carbon footprint of dairy cows under grazing conditions in Chile. *Animals (Basel)*, 14, 165. <https://doi.org/10.3390/ani14010165>.
 21. Kung, L., Williams, P., Schmidt, R. J., & Hu, W. (2008). A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4793-4800. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1402>.
 22. McEwan, N. R., Graham, R. C., Wallace, R. J., Losa, R., Williams, P., & Newbold, C. J. (2002). Effect of essential oils on ammonia production by rumen microbes. *Reproduction Nutrition Development*, 42(Suppl 1), S65.
 23. McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., & Beever, D. A. (2003). Newbold C.J. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied Environmental Microbiology*, 69(8), 5011-4. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5011-5014.2003>.
 24. Moodi, D., Khezri, A., Naserian, A. A., Ghazizadeh-Ahsae, M., Dayani, O., & Bahrampour, V. (2025). Predicting blood beta-hydroxybutyric acid in dairy cow herds through machine learning-based feature selection: On-farm data basis. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 13(1), 67-78. <https://doi.org/10.22103/JLST.2025.24546.1589>.
 25. NASEM, (2021). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 8th Revised Edition National Academy of Sciences, Washington, D.C. USA.
 26. Patra, A. K., & Yu, Z. (2012). Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4271-4280. <https://doi.org/10.1128/AEM.00309-12>.
 27. Saeedi, S., Dayani, O., Tahmasbi, R., & Khezri, A. (2017). Effect of supplementation of calf starter with fennel powder on performance, weaning age and fermentation characteristics in Holstein dairy calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berlin)*, 101(1), 81-87. <https://doi.org/10.1111/jpn.12511>.
 28. Statistical Analysis System. (2009). Users Guide: Statistics, Version 9.2. SAS Institute, Cary, NC, USA.
 29. Spanghero, M., Robinson, P. H., Zanfi, C., & Fabbro, C. (2009). Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 153, 153-157. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.06.004>.
 30. Tager, L. R., & Krause, K. M. (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2455-2464. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3505>.
 31. Vankeulen, J., & Young, B. A. (1977). Evaluation of acid insoluble ash as natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science*, 44, 282-287. <https://doi.org/10.2527/jas1977.442282x>.
 32. Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
 33. Wallace, R. J. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63(4), 621-629. <https://doi.org/10.1079/PNS2004393>.
 34. Yang, W. Z., Beauchemin, K. A., & Rode, L. M. (2020). Effects of dietary essential oils on ruminal fermentation, digestion, and milk production in lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 267, 114533.
 35. Yang, W. Z., Benchaar, C., Ametaj, B. N., Chaves, A. V., He, M. L., & McAllister, T. A. (2007). Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 90(12), 5671-5681. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0369>.