

黄花蒿提取物对奶牛瘤胃发酵指标的影响

王丽芳¹, 斯琴毕力格², 敖长金²

(¹内蒙古自治区农牧业科学院, 呼和浩特 010031; ²内蒙古农业大学, 呼和浩特 010018)

摘要:【目的】在奶牛日粮中添加菊科植物黄花蒿乙醇提取物, 研究其对瘤胃中乙酸、丙酸、丁酸等发酵指标的影响, 进一步探讨其对 CLA 合成的溶纤维丁酸弧菌 *Butyrivibrio fibrisolvens* (*B. fibrisolvens*) 和蛋白溶解梭菌 *Clostridium proteoclasticum* (*C. proteoclasticum*) 的影响, 旨在阐明黄花蒿乙醇提取物对奶牛瘤胃发酵的作用, 并从瘤胃层次阐明其对牛奶中 CLA 合成的部分作用机制。【方法】选取 15 头体重为 (600±29) kg、胎次 2-3、泌乳期 (158±3) d 及泌乳量 (22.8±1.8) kg·d⁻¹ 相近的荷斯坦奶牛为试验动物, 试验牛统一管理, 自由采食、自由饮水; 每天饲喂 2 次、挤奶 2 次 (早上 4:30、下午 16:30)。试验采用完全随机设计, 分为 3 组, 分别是对照组和 2 个试验组, 每组 5 头牛。试验 1 组黄花蒿乙醇提取物的添加量为 96 g/(d·头), 试验 2 组黄花蒿乙醇提取物的添加量为 160 g/(d·头)。试验期 40 d, 前 9 d 为预饲期, 10—40 d 为正式期。【结果】奶牛日粮中添加黄花蒿乙醇提取物可以增加瘤胃中 pH 值, 其中两个试验组 pH 值分别增加了 2.63% 和 8.61%, 但差异不显著 ($P>0.05$); 添加黄花蒿乙醇提取物均降低了瘤胃中 VFA 的含量, 除异戊酸和戊酸低剂量黄花蒿乙醇提取物与对照组差异不显著外, 其余各组乙酸、丙酸、丁酸均与对照组差异显著 ($P<0.05$)。添加黄花蒿乙醇提取物均增加了瘤胃液相和瘤胃液混合物中 *B. fibrisolvens* 的相对百分比, 差异显著 ($P<0.05$); 降低了瘤胃固相中 *B. fibrisolvens* 的相对百分比, 差异不显著 ($P>0.05$)。添加黄花蒿乙醇提取物均降低了瘤胃液相和瘤胃固相中 *C. proteoclasticum* 的相对百分比, 差异显著 ($P<0.05$), 增加了瘤胃液混合物中 *C. proteoclasticum* 的相对百分比, 但是差异不显著 ($P>0.05$)。【结论】奶牛日粮中添加黄花蒿乙醇提取物影响瘤胃发酵, 对瘤胃不同内容物中 *B. fibrisolvens* 和 *C. proteoclasticum* 影响不同, 总体趋势是增加瘤胃中 *B. fibrisolvens* 的相对百分比, 降低瘤胃中 *C. proteoclasticum* 的相对百分比, 有利于调控 CLA 的生成。

关键词: 黄花蒿乙醇提取物; 奶牛; 瘤胃; 溶纤维丁酸弧菌; 蛋白溶解梭菌

The Effects of *Artemisia annua* Extracts on the Rumen Fermentation in Dairy Cows

WANG LiFang¹, SIQINBILIGE², AO ChangJin²

(¹Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010031; ²Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

Abstract: 【Objective】The effects of daisy plant (*Artemisia annua*) extracts (AAE) on the fermentation indexes such as acetic acid, propionic acid and butyric acid in the rumen in dairy cows were studied in this paper, and furthermore the effects on *B. fibrisolvens* and *C. proteoclasticum* for regulating CLA synthesis in the rumen were researched. The purpose of this study was to explore the effects of AAE on rumen fermentation in dairy cows, and to investigate the part mechanism of effecting CLA synthesis from the rumen. 【Method】Fifteen dairy cows (600±29) kg, parity 2-3, in lactating (158±3) d and milk yield (22.8±1.8) kg·d⁻¹ were used in completely random design in 40 d experimental periods. The experimental dairy cows were

收稿日期: 2018-02-12; 接受日期: 2018-06-12

基金项目: 国家自然科学基金 (31860663)、内蒙古自治区自然科学基金 (2013MS0418)、内蒙古农牧业科学院青年创新基金 (2014QNJJM02)

联系方式: 王丽芳, Tel: 13848189461; E-mail: wanglifang100008@163.com

integrated management, free ingestion, free drinking water, feeding 2 times per day, milking 2 times (4:30 a.m., 16:30 p.m.). The experiments groups comprised the control and two treatments (treatment one and treatment two, the doses of AAE for supplementation was $96 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ and $160 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ for every cow, respectively). The experimental period comprised a 9-d adaptation and a 31-d the formal period. 【Result】 The results showed as follows: ruminal pH values tended to increase in two treatments for AAE supplementation compared with the control, which increased by 2.63% and 8.61%, respectively ($P>0.05$). The concentrations for acetic acid, propionic acid and butyric acid decreased significantly in two treatments except for isovaleric acid and valeric acid in the low dose of AAE compared with the control ($P<0.05$). AAE supplementation increased the relative percentage of *B. fibrisolvens* in rumen mixture and rumen liquid ($P<0.05$), and decreased the relative percentage of *B. fibrisolvens* in rumen solid ($P>0.05$). AAE supplementation decreased the relative percentage of *C. proteoclasticum* in rumen liquid and rumen solid ($P<0.05$), and increased the relative percentage of *C. proteoclasticum* in rumen mixture ($P>0.05$).

【Conclusion】 It was concluded that AAE supplementation had adverse effect on rumen fermentation characteristics, and had different effects on *B. fibrisolvens* and *C. proteoclasticum* on different contents of the rumen, but the general trend was increasing the relative percentage of *B. fibrisolvens*, and decreased the relative percentage of *C. proteoclasticum*, which was beneficial to CLA synthesis.

Key words: *Artemisia annua* extracts; dairy cows; rumen; *B. fibrisolvens*; *C. proteoclasticum*

0 引言

【研究意义】共轭亚油酸 (CLA) 是一组含有共轭双键的亚油酸 (linoleic acid) 的几何异构体和位置异构体的总称^[1-2], cis-9、trans-11-CLA 被认为是 CLA 的最主要的活性形式, 俗名瘤胃酸, 占牛奶中总 CLA 的 80%—90%^[3]。CLA 具有抗癌、抗糖尿病、减少脂肪沉积和动脉硬化、改变营养分配及调节免疫系统等生物学作用^[4-8]。因此, 增加乳中 cis-9、trans-11-CLA 含量成为动物营养学领域的研究热点。【前人研究进展】国内外很多学者对增加乳中 CLA 含量开展了大量研究。研究表明, 奶牛日粮中分别添加富含亚油酸及亚麻酸的日粮及浸提的油料籽实和豆油可以增加牛奶中 CLA 含量^[9], 添加鱼油可以提高牛奶中 CLA 含量^[10], 体外试验表明, 稀释率、pH 值及鱼油和葵花油对 CLA 含量有显著影响^[11], 在体外试验亚油酸 C18:2 存在的条件下, 添加离子载体 (尼日利亚菌素, 莫能菌素和替曲那新) 减少了亚油酸的完全氢化, 增加了 200% 的 cis-9, trans-11-CLA^[12], 奶牛采食含有菊科植物的牧草或其提取物可以增加牛奶和羊奶中 CLA 含量^[13-16]。【本研究切入点】多数研究主要集中于如何增加牛奶中 CLA 的含量, 但是对于影响 CLA 合成的作用机制研究相对较少, 特别是对于植物提取物调控牛奶中 CLA 含量的作用机制研究较少。【拟解决的关键问题】本研究通过在奶牛日粮中添加菊科植物黄花蒿乙醇提取物, 研究其对瘤胃中影响 CLA 合成的溶纤维丁酸弧菌 *Butyrivibrio fibrisolvens* (*B.fibrisolvens*) 和蛋白溶解梭菌 *Clostridium*

proteoclasticum (*C.proteoclasticum*) 的影响, 同时探讨对奶牛瘤胃中挥发性脂肪酸和 pH 值的影响, 旨在从瘤胃层次探明黄花蒿乙醇提取物对牛奶中 CLA 合成的部分作用机制。

1 材料与方法

1.1 试验时间和地点

试验于 2016 年 9 月 5 日至 10 月 15 日在内蒙古呼和浩特市赛罕区章盖营牧场进行, 试验期 40 d, 前 9 d 为预饲期, 10—40 d 为正式期。

1.2 试验材料

1.2.1 试验动物及饲养管理 选取 15 头体重为 (600 ± 29) kg、胎次 (2—3)、泌乳期 (158 ± 3) d 及泌乳量 (22.8 ± 1.8) $\text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$ 相近的荷斯坦奶牛为试验动物。试验牛统一管理, 自由采食、自由饮水; 每天饲喂 2 次、挤奶 2 次 (早上 4:30、下午 4:30)。

1.2.2 试验日粮 试验所用精饲料和粗饲料均来自呼和浩特市赛罕区章盖营牧场, 粗饲料由苜蓿、羊草、玉米青贮和谷草组成, 基础日粮组成及营养水平见表 1。

1.2.3 黄花蒿乙醇提取物 黄花蒿乙醇提取物购于南京泽朗公司, 提取工艺条件是: 乙醇浓度 55%, 提取温度 95°C , 提取 2 h。GC-MS 和 LC-MS 分析的黄花蒿乙醇提取物活性成分主要包括: 倍半萜类 35%、芳香族类 29%、脂肪酸类 6%、甾体类 6%、三萜类 6%、脂肪族类 4%、生物碱类 3%、酚类 5%、杂环类 2%、其他 4% (GC-MS); 黄酮类和萜类 (LC-MS)。

表 1 基础饲粮组成及营养水平（干物质基础）

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (DM basis)

饲粮组成 (DM)	Diet composition	含量 Content (%)	营养水平 Nutrient levels
原料 Ingredients			干物质 DM(kg/ (d·头)) 13.5
精饲料 Concentrated feed		53.2	产奶净能 NE _L (MJ·kg ⁻¹) 6.4
苜蓿 Alfalfa		10.9	粗蛋白 CP (%) 14.2
羊草 Leymus chinensis		3.6	粗脂肪 EE (%) 2.94
青贮 Silage		25.1	中性洗涤纤维 NDF (%) 42.5
谷草 Millet straw		7.2	钙 Ca (%) 0.83
			磷 P (%) 0.65

1.3 试验设计

试验采用完全随机设计，分为 3 组，分别是对照组和 2 个试验组，每组 5 头牛。试验 1 组黄花蒿乙醇提取物的添加量为 96 g/（d·头），试验 2 组黄花蒿乙醇提取物的添加量为 160 g/（d·头）^[16]，每天饲喂两次，饲喂时黄花蒿乙醇提取物先与 200g 精饲料混合均匀让奶牛采食完再饲喂 TMR 饲料。前 9 d 为预饲期，10—40 d 为正式期，试验期共 40 d。

1.4 测定指标

溶纤维丁酸弧菌 *B.fibrisolvens*、蛋白溶解梭菌 *C.proteoclasticum*、瘤胃总菌 Total bacteria、pH 值、VFA。

正式试验期最后一天，每组随机选取 3 头牛，通过口腔采集瘤胃液，4 层纱布过滤后直接测 pH 值；过滤后的瘤胃液取 5 mL 加入预先装有 1 mL 25%偏磷的离心管中，摇匀，置于-20℃冰箱中冷冻保存待测 VFA；分别取过滤后的瘤胃液相、瘤胃固相及瘤胃液全混合物分装于 5 mL 冻存管，所有样品置于液氮中冷冻保存备测 3 种细菌。

1.4.1 细菌基因组 DNA 的提取 DNA 提取参照 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒说明书操作。并利用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测所提取的细菌基因组 DNA 的质量。

1.4.2 标准质粒的制备 分别采用这 3 种细菌的特异性引物，同时以瘤胃内容物基因组 DNA 为模板，PCR 扩增其特异性片段，利用胶回收试剂盒（AXYGEN，USA）回收产物，并连接 pMD18-T 载体（Takara，Japan），转化入感受态细胞。菌落 PCR 鉴定阳性克隆子测序鉴定。根据测序结果，利用质粒提取试剂盒（AXYGEN，USA）提取含有目的片段的标准质粒，并利用 Qubit 3.0（Invitrogen，USA）测定质粒 DNA 溶液浓度，计算标准质粒的拷贝数。

1.4.3 标准曲线的制备 把标准质粒 DNA 进行 10 倍梯度系列稀释制作标准样品和待测样品一起扩增，得出标准曲线，根据所得标准曲线计算出样品中的基因拷贝数，最后以基因拷贝数每 μL 为单位进行分析。

1.4.4 荧光定量 本研究通过荧光定量的方法对 3 种菌的基因进行定量。基因引物序列见表 2，引物浓度均为 10 mmol·L⁻¹。qPCR 反应在专用的 PCR 八连管（Axygen，USA）中进行，25 μL 体系，反应体系见表 3。所有样品做 3 个重复，使用 Takara 试剂盒。RT-PCR 的反应程序为：95℃变性 10 min，在 95℃变性 10 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，循环 40 次，荧光数据采集在延伸时进行。实时定量 PCR 在 FTC-3000 荧光定量 PCR 仪中进行。

表 2 瘤胃氢化菌 PCR 的引物序列

Table 2 Primer sequence of biohydrogenation associated bacteria used for real-time PCR

细菌 Target bacterium	序列(5' to 3') Primer sequence	扩增片段 Product size (bp)	退火温度 Annealing temperature (℃)
瘤胃总菌 Total bacteria	F:CGGCAACGAGCGCAACCC R:CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	147	55
溶纤维丁酸弧菌 <i>B.fibrisolvens</i>	F:GCCTCAGCGTCAGTAATCG R:GGAGCGTAGGCGGTTTTAC	187	55
蛋白溶解梭菌 <i>C.proteoclasticum</i>	F:TCCGGTGGTATGAGATGGGC R:GTCGCTGCATCAGAGTTTCCT	185	55

F 和 R 分别代表上、下游引物 F and R indicates forward and reverse primers, respectively

表 3 PCR 体系

Table 3 PCR system

试剂 Reagents	体积 Volume (μL)
SRBR Premix Ex TaqTM II (2×)	12.5
正向引物 Forward	1
反向引物 Reverse	1
DNA	5
ddH ₂ O	to 25

1.4.5 *B.fibrisolvens* 的计算 $B.fibrisolvens (\%) = B.fibrisolvens / \text{Total bacteria} \times 100$;

C.proteoclasticum 的计算: $C.proteoclasticum (\%) = C.proteoclasticum / \text{Total bacteria} \times 100$ 。

1.4.6 VFA 测定 参考文献[17]方法测定 VFA 含量。

1.5 数据处理

试验数据采用 Excel2007 初步整理后, 采用 SAS 9.2 进行方差分析 (ANOVA), 采用 DUNCAN 法进行多重比较, $P<0.05$ 作为差异显著的判断标准。

2 结果

2.1 对瘤胃 pH 值和 VFA 的影响

从表 4 可以看出, 与对照组相比, 奶牛日粮中

添加黄花蒿乙醇提取物可以增加瘤胃中 pH 值, 其中两个试验组 pH 值分别增加了 2.63%和 8.61%, 但差异不显著 ($P>0.05$); 添加黄花蒿乙醇提取物均降低了瘤胃中 VFA 的含量, 除异戊酸和戊酸低剂量黄花蒿乙醇提取物与对照组差异不显著外, 其余各组 VFA 均与对照组差异显著 ($P<0.05$)。其中两个试验组乙酸含量分别降低了 36.27%和 57.25%, 丙酸含量分别降低了 28.01%和 45.81%, 丁酸含量分别降低了 17.86%和 42.86%, 异戊酸含量分别降低了 23.35%和 52.10%, 戊酸含量分别降低了 5%和 50%, 且 VFA 降低与黄花蒿乙醇提取物添加量呈剂量效应关系。

2.2 对瘤胃中溶纤维丁酸弧菌的影响

从表 5 可以看出, 与对照组相比, 奶牛日粮中添加黄花蒿乙醇提取物均增加了瘤胃液相和瘤胃液混合物中 *B.fibrisolvens* 的相对百分比, 两个试验组分别增加了瘤胃液相中 *B.fibrisolvens* 37.04%和 40.74%, 增加了瘤胃液混合物中 *B.fibrisolvens* 83.3%和 55.56%, 差异显著 ($P<0.05$); 降低了瘤胃固相中 *B.fibrisolvens* 的相对百分比, 与对照组相比, 两个试验组 *B.fibrisolvens* 的相对百分比分别降低了 12.5%和 18.75%, 但是差异不显著 ($P>0.05$)。

表 4 黄花蒿乙醇提取物对瘤胃内 pH 值和 VFA 的影响

Table 4 The effects of artemisia annua extracts on ruminal fluid pH value and VFA *in vivo* (mmol·L⁻¹)

项目 Items	对照组 Control group	试验 1 组 Experimental group 1	试验 2 组 Experimental group 2	SEM	P 值 P value
pH	6.85	7.03	7.44	0.24	0.116
乙酸 Acetate acid	42.41a	27.03b	18.13c	1.75	<0.0001
丙酸 Propionic acid	12.42a	8.93b	6.73b	1.02	0.004
丁酸 Butyrate	7.00a	5.75b	4.00c	0.24	<0.0001
异戊酸 Isovaleric acid	1.67a	1.28ab	0.80c	0.21	0.0165
戊酸 Valerate	0.80a	0.76a	0.40b	0.05	0.0003

同行数据不同小写字母 a,b,c 表示差异显著 ($P<0.05$)。下同
In the same row, values with different small letter(a,b,c) mean significant difference($P<0.05$). The same as below

表 5 黄花蒿乙醇提取物对瘤胃溶纤维丁酸弧菌的影响

Table 5 The effects of *Artemisia annua* extracts on ruminal *B.fibrisolvens in vivo*

	对照组 Control group	试验 1 组 Experimental group 1	试验 2 组 Experimental group 2	P 值 P value
瘤胃液相 Rumen liquid	0.27b	0.37a	0.38a	0.0325
瘤胃固相 Rumen solid	0.16	0.14	0.13	0.8451
瘤胃液全混合物 Rumen mixture	0.18b	0.33a	0.28a	0.0127

2.3 对瘤胃中蛋白溶解梭菌的影响

从表 6 可以看出,与对照组相比,奶牛日粮中添加黄花蒿乙醇提取物均降低了瘤胃液相和瘤胃固相中 *C.proteoclasticum* 的相对百分比,两个试验组分别降低了瘤胃液相中 *C.proteoclasticum* 5.03%和 1.12%,降低了瘤胃固相中 *C.proteoclasticum* 22.69%和

4.20%,差异显著 ($P<0.05$);增加了瘤胃液混合物中 *C.proteoclasticum* 的相对百分比,与对照组相比,两个试验组 *C.proteoclasticum* 的相对百分比分别增加了 54.49%和 16.67%,其中试验 1 组显著高于对照组 ($P<0.05$),试验 2 组与对照组差异不显著 ($P>0.05$)。

表 6 黄花蒿乙醇提取物对瘤胃蛋白溶解梭菌的影响
Table 6 The effects of *Artemisia annua* extracts on ruminal *C.proteoclasticum* in vivo

	对照组 Control group	试验 1 组 Experimental group 1	试验 2 组 Experimental group 2	P 值 P value
瘤胃液相 Rumen liquid	1.79	1.70	1.77	0.9661
瘤胃固相 Rumen solid	2.38	1.84	2.28	0.4201
瘤胃液全混合物 Rumen mixture	1.56b	2.41a	1.82ab	0.0601

3 讨论

3.1 瘤胃发酵参数

VFA 是瘤胃发酵的主要指标之一,是碳水化合物在瘤胃中发酵的主要产物,可提供反刍动物总能量需要的 70%—80%,且 VFA 含量与反刍动物能量转化效率呈正相关,与 pH 值呈负相关。本试验结果表明,添加黄花蒿乙醇提取物显著降低了瘤胃中 VFA 的含量,增加了 pH 值,提示黄花蒿乙醇提取物可能会影响能量转化效率,影响瘤胃发酵。

本研究结果与相关研究结果不完全一致。BAYAT 等^[18-19]研究报道,奶牛日粮中添加芥蓝油、活酵母、肉豆蔻酸、菜籽油、红花油和亚麻油对瘤胃 pH 值和 VFA 没有显著影响;而本试验显著降低了瘤胃中 VFA 的含量,增加了 pH 值,导致这种差异的可能是因为添加物不同所致,本试验添加的是植物提取物,而上述研究中添加的是植物油等。本试验也与一些试验结果相同,王丽芳^[16]研究结果表明,在奶山羊日粮中添加不同剂量的黄花蒿乙醇提取物均降低了瘤胃中乙酸、丙酸、丁酸等 VFA 各采样时间点的平均浓度,增加了 pH 平均值,与本试验结果一致,说明黄花蒿乙醇提取物对不同奶畜瘤胃发酵的影响相似。

3.2 瘤胃中 *B. fibrisolvens*和 *C. proteoclasticum*

反刍动物产品中 CLA 主要来源于两个途径,分别是外源途径和内源途径,外源途径就是亚油酸在瘤胃 *B.fibrisolvens* 等分泌的异构化酶作用下,异构化为 cis-9, trans-11-CLA,内源途径就是瘤胃不饱和脂肪

酸生物氢化形成的中间产物反式油酸(trans-11-18: 1, TVA)进入乳腺中,在 Δ^9 -去饱和酶的作用下生成 CLA^[20], *C. proteoclasticum* 可以把 TVA 转化为 C18:0 饱和脂肪酸^[21],近来, *C. proteoclasticum* 被归类为 *Butyrvibrio proteoclasticus*, 在现在的研究中, *C. proteoclasticum* 进一步被归类为 *B. proteoclasticus*^[22]。可以看出, *B. fibrisolvens* 对 cis-9, trans-11-CLA 的生成具有正调控作用,而 *C. proteoclasticum* 对 cis-9, trans-11-CLA 的生成具有负调控作用。因此通过营养调控措施,增加瘤胃中 *B. fibrisolvens* 的含量,降低 *C. proteoclasticum* 的含量有利于 cis-9, trans-11-CLA 的生成。

本试验通过营养调控措施,对黄花蒿乙醇提取物调控 cis-9, trans-11-CLA 合成的两种细菌 *B. fibrisolvens* 和 *C. proteoclasticum* 的研究结果表明,添加黄花蒿乙醇提取物可以增加瘤胃液相和瘤胃液全混合物中 *B.fibrisolvens* 的相对百分比,降低了瘤胃固相中 *B. fibrisolvens* 的相对百分比。茅慧玲^[23]研究报道,添加低比例杭白菊茎叶增加了瘤胃液相中 *B. fibrisolvens* 的含量,降低了瘤胃固相中 *B. fibrisolvens* 的含量,与本试验结果相一致;但是对于 *C. proteoclasticum* 研究结果却与本试验结果不同,本试验添加黄花蒿乙醇提取物降低了瘤胃液相和瘤胃固相中 *C. proteoclasticum* 的相对百分比,但增加了瘤胃液全混合物中的相对百分比,而茅慧玲^[23]研究表明,添加中比例杭白菊茎叶增加了瘤胃液相中 *C. proteoclasticum* 的含量,但是对瘤胃固相中 *C. proteoclasticum* 的含量没有影响。导致这种差异的原

因可能是这两种植物所含的活性成分不完全相同所致, 杭白菊茎叶的主要活性成分是黄酮类和挥发油类物质^[23], 而本试验所用黄花蒿乙醇提取物的主要活性成分除黄酮类还包括萜类和芳香族类物质。RAMOS-MORALES 等^[24]研究表明, 大蒜精油中丙基丙硫代亚磺酸酯(PTS)显著增加了瘤胃液中 *B. fibrisolvens* 的丰度 ($P < 0.05$), 降低了 *C. proteoclasticum* 的丰度 ($P > 0.05$), 与本试验结果基本一致; RAMOS-MORALES 等^[25]通过体外试验研究表明, 添加 $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蓖麻酸对 *B. fibrisolvens* 没有影响, 但降低了 *C. proteoclasticum* 的含量, 有助于 CLA 的积累, 主要原因是蓖麻酸阻止了 *C. proteoclasticum* 的生物氢化作用所致, 与本试验结果一致。

其他一些相关研究与本研究结果也存在异同点, 周薇等^[26]研究表明, 添加 α -亚麻酸在调控 CLA 生成的过程中, 降低了瘤胃液中 *B. fibrisolvens* 和 *C. proteoclasticum* 的含量, 且呈剂量依赖性, 而本研究的结果添加黄花蒿乙醇提取物增加了瘤胃液中 *B. fibrisolvens* 的含量, 与上述研究结果不一致, 但是降低 *C. proteoclasticum* 的含量与上述研究结果相似, 但是本研究这两种菌与黄花蒿乙醇提取物没有剂量效应关系, 与上述研究结果也不相符。刘仕军等^[27]研究表明, 添加鱼油和葵花油抑制了 *B. fibrisolvens* 的生长, 与本试验结果不一致。史浩亭等^[28]研究表明, 添加苏子油和橡胶籽油在高剂量(植物油添加量为饲料干物质含量的 3% 和 4%) 时均降低了瘤胃液中 *B. fibrisolvens* 的相对百分比。RAMOS-MORALES 等^[29]体外试验研究表明, 添加 $0.025 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 斑鸠菊酸降低了 *B. fibrisolvens* 的含量, 添加 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 斑鸠菊酸降低了 *B. fibrisolvens* 和 *C. proteoclasticum* 的含量, 与本试验结果不完全相同。本试验结果与以上结果不同的可能原因是添加物不同, 本试验添加的是植物提取物, 而以上试验添加的是植物油或脂肪酸。本试验总体趋势是增加瘤胃中 *B. fibrisolvens* 的相对百分比, 降低瘤胃中 *C. proteoclasticum* 的相对百分比, 有利于调控 CLA 的生成, 本试验结果与项目组在奶牛饲养试验中增加牛奶中 CLA 含量的结果相一致^[30]。

另外, 目前对 CLA 合成的调控作用在瘤胃层次研究通常只选取瘤胃液相和固相, 本研究对瘤胃液相、瘤胃固相和瘤胃液全混合物均进行了研究, 结果表明, *B. fibrisolvens* 和 *C. proteoclasticum* 在瘤胃不同内容物中表达量不同, 这提示在未来的研究中, 选择不同瘤胃内容物, 结果不相一致。

4 结论

奶牛日粮中添加黄花蒿乙醇提取物影响瘤胃发酵; 对瘤胃不同内容物中 *B. fibrisolvens* 和 *C. proteoclasticum* 影响不同, 总体趋势是增加瘤胃中 *B. fibrisolvens* 的相对百分比, 降低瘤胃中 *C. proteoclasticum* 的相对百分比, 有利于调控共轭亚油酸的生成。

References

- [1] NAJIBULLAH SEHAT, JOHN K. G. KRAMER, MAGDI M. MOSSOBA, MARTIN P. YURAWECZ, JOHN A. G. ROACH, KLAUS EULITZ, KIM M. MOREHOUSE, YOUH KU. Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids*, 1998, 33(10): 963-971.
- [2] YURAWECZ M P, ROACH J A G, SEHAT N, MOSSOBA M M, KRAMER J K G, FRITSCHKE J, STEINHART H, KU Y. A new conjugated linoleic acid isomer, 7 trans, 9 cis-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. *Lipids*, 1998, 33(8): 803-809.
- [3] KRAMER J K, PARODI P W, JENSEN R G, MOSSOBA M M, YURAWECZ M P, ADLOF R O. Ruminic acid: a proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. *Lipids*, 1998, 33(8): 835.
- [4] HA Y L, GRIMM N K, PARIZA M W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 1987, 8(12): 1881-1887.
- [5] LEE K N, KRITCHEVSKY D, PARIZAA M W. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Life Extension*, 1994, 108(1): 19-25.
- [6] HOUSEKNECHT K L, VANDEN HEUVEL J P, MOYA-CAMARENA S Y, PORTOCARRERO C P, PECK L W, NICKEL K P, BELURY M A. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 244(3): 678-682.
- [7] MILLER C C, PARK Y, PARIZA M W, COOK M E. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, 198(3): 1107-1112.
- [8] SCHAFERS S, VON SOOSTEN D, MEYER U, DRONG C, FRAHM J, TROSCHE A, PELLETIER W, SAUERWEIN H, DANICKE S.

- Influence of conjugated linoleic acids and vitamin E on biochemical, hematological, and immunological variables of dairy cows during the transition period. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(2): 1585-1600.
- [9] DHIMAN T R, HELMINK E D, MCMAHON D J, FIFE R L, PARIZA M W. Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows fed extruded oilseeds. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82(2): 412-419.
- [10] CHOW T T, FIEVEZ V, MOLONEY A P, RAES K, DEMEYER D, DE SMET S. Effect of fish oil on *in vitro* rumen lipolysis, apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediates. *Animal Feed Science and Technology*, 2004, 117(1), 1-12.
- [11] ABUGHAZALEH A A, BUCKLES W R. The effect of solids dilution rate and oil source on trans C18: 1 and conjugated linoleic acid production by ruminal microbes in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(2): 963-969.
- [12] SAUER F D, FELLNER V, KINSMAN R, KRAMER J K, JACKSON H A, LEE A J, CHEN S. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. *Journal of Animal Science*, 1998, 76(3): 906-914.
- [13] COLLOMB M, BUTIKOFER U, SIEBER R, JEANGROS B, BOSSET J O. Correlation between fatty acids in cows' milk fat produced in the Lowlands, Mountains and Highlands of Switzerland and botanical composition of the fodder. *International Dairy Journal*, 2002, 12(8): 661-666.
- [14] CABIDDU A, ADDIS M, PINNA G, SPADA S, FIORI M, SITZIA M, PIRISI A, PIREDDA G, MOLLE G. The inclusion of a daisy plant (*Chrysanthemum coronarium*) in dairy sheep diet. 1: Effect on milk and cheese fatty acid composition with particular reference to C18: 2 cis-9, trans-11. *Livestock Science*, 2006, 101(1): 57-67.
- [15] WALLACE R J. Biohydrogenation of fatty acids in the rumen//*The 6th Joint Symposium of China-Korea-Japan on Rumen Metabolism and Physiology*, 2007, 4.
- [16] 王丽芳. 添加菊科植物黄花蒿提取物对奶山羊乳中 CLA 含量影响及机理研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010.
- WANG L F. The study on effects of compositae artemisia annua extracts on cla content in goat milk and the relative mechanism[D]. Huhhot: Inner Mogolia Agricultural University, 2010. (in Chinese)
- [17] 秦为琳. 应用气相色谱测定瘤胃挥发性脂肪酸方法的研究改进. 南京农业大学学报, 1982, 5(4): 110-115.
- QIN W L. A method of research and improvement for the determination of volatile fatty acids in rumen by gas chromatography. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1982, 5(4): 110-115. (in Chinese)
- [18] BAYAT A R, KAIRENIUS P, STEFANSKI T, LESKINEN H, COMTET-MARRE S, FORANO E, CHAUCHEYRAS-DURAND F, SHINQFIELD K J. Effect of camelina oil or live yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal methane production, rumen fermentation, and milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage diets. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(5): 3266-3181.
- [19] BAYAT A R, TAPIO I, VIKKI J, SHINGFIELD K J, LESKINEN H. Plant oil supplements reduce methane emissions and improve milk fatty acid composition in dairy cows fed grass silage-based diets without affecting milk yield. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(2): 1136-1151.
- [20] GRIINARI J M, CORL B A, LACY S H, CHOUINARD P Y, NURMELA K V, BAUMAN D E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. *Journal of Nutrition*, 2000, 130(9): 2285-2291.
- [21] POLAN C E, MCNEILL J J, TOVE S B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1964, 88(4): 1056-1064.
- [22] MOON C D, PACHECO D M, KELLY W J, LEAHY S C, LI D, KOPECNY J, ATTWOOD G T. Reclassification of *Clostridium proteoclasticum* as *Butyrivibrio proteoclasticus* comb. nov., a butyrate-producing ruminal bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(9): 2041-2045.
- [23] 茅慧玲. 植物源性物质对生长湖羊瘤胃发酵和肉品质的影响及其作用机理的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- MAO H L. Effects of plants-based materials on growth performance, rumen fermentation and meat quality of growing Hu lambs[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010. (in Chinese)
- [24] RAMOS-MORALES E, MARTINEZ-FERNANDEZ G, ABECIA L, MARTIN-GARCIA A I, MOLINA-ALCAIDE E, YANEZ-RUIZ D R. Garlic derived compounds modify ruminal fatty acid biohydrogenation and induce shifts in the *Butyrivibrio* community in continuous-culture fermenters. *Animal. Feed Science and Technology*, 2013, 184 (1/4): 38-48.
- [25] RAMOS MORALES E, MATA ESPINOSA M A, MCKAIN N, WALLACE R J. Ricinoleic acid inhibits methanogenesis and fatty acid biohydrogenation in ruminal digesta from sheep and in bacterial cultures. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(13): 4943-4950.
- [26] 周薇. α -亚麻酸对瘤胃微生物生物氢化中间产物的影响[D]. 延边: 延边大学, 2014.

- ZHOU W. The influence of α -linolenic acid on the intermediates of microbial bio-hydrogenation[D]. Yanbian: Yanbian University, 2014. (in Chinese)
- [27] 刘仕军, 王加启, 卜登攀, 刘亮, 梁松, 魏宏阳, 周凌云, 李旦. 日粮油脂对肉牛瘤胃液中 *A. lipolytica*, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *B. fibrisolven* 和 *R. albus* 数量的影响. 第五届博士生学术年会论文集, 2007: 336-345.
- LIU S J, WANG J Q, BO D P, LIU L, LIANG S, WEI H Y, ZHOU L Y, LI D. The effect of dietary fat on *A. lipolytica*, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *B. fibrisolven* and *R. albus* in the rumen of beef cattle// *The Fifth Annual Conference for the Doctoral Students*, 2007: 336-345. (in Chinese)
- [28] 史浩亭. 体外法研究苏子油与橡胶籽油对瘤胃发酵参数、脂肪酸组成及甲烷生成的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- SHI H T. Effects of perilla oil and rubber seed oil supplements on rumen fermentation parameters, fatty acid composition and methane production by a Rumen-Simulation Technique[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [29] RAMOS-MORALES E, MCKAIN N, GAWAD R M A, HUGO A, WALLACE R J. Vernonia galamensis and vernolic acid inhibit fatty acid biohydrogenation *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 2016, 222(11): 54-63.
- [30] 斯琴毕力格, 王丽芳, 丁赫, 刘旺景, 连海飞, 敖长金. 饲料中添加黄花蒿乙醇提取物对奶牛产奶性能及乳脂中共轭亚油酸含量的影响. *动物营养学报*, 2017, 29(11): 4137-4142.
- SI Q B L G, WANG L F, DING H, LIU W J, LIAN H F, AO C J. Effects of dietary Artemisia annua extracts on milk performance and conjugated linoleic acid content in milk fat of lactating cows. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(11): 4137-4142. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)