

体外添加不同水平的亚麻籽油对气体产量、瘤胃发酵及脂肪酸组分的影响

吴端钦^{1,2}, 贺志雄¹, 汤少勋¹, 谭支良^{1*}

¹中国科学院亚热带农业生态研究所 亚热带农业生态过程重点实验室, 湖南省畜禽健康养殖工程技术中心, 农业部中南动物营养与饲料科学观测实验站, 长沙 410125; ²中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 利用瘤胃体外产气法研究在羊草底物条件下添加不同水平的亚麻籽油(LSO)对气体产量、瘤胃发酵和脂肪酸组分的影响。LSO添加水平分别为底物干物质的5%和10%, 体外培养持续48 h。在12、24和48 h时测量总气体产量、甲烷及氢气产量, 培养结束后测定发酵指标和发酵液中脂肪酸成分。结果表明, LSO显著降低了产气量和甲烷产量, 提高了氢气产量; 添加LSO显著提高了总挥发性脂肪酸含量、丙酸和丁酸的比例, 还显著降低了发酵液pH和氨氮浓度; 同时, 添加LSO提高了发酵液中对人体健康有益的共轭亚油酸以及其他不饱和脂肪酸的比例。这些结果表明, 富含十八碳不饱和脂肪酸的LSO可以在粗饲料条件下抑制甲烷生成, 改善瘤胃发酵, 增加了多不饱和脂肪酸的含量, 而且抑制甲烷生成及改善瘤胃发酵的效果与添加剂量有关。

关键词: 甲烷; 瘤胃发酵; 脂肪酸; 体外

中图分类号: R827

文献标识码: A

Effects of Addition of Different Levels of Linseed Oil on Gas Production, Rumen Fermentation and Proportion of Fatty Acids *in vitro*

WU Duan-qin^{1,2}, HE Zhi-xiong¹, TANG Shao-xun¹, TAN Zhi-liang^{1*}

¹Key Laboratory for Agro-Ecological Processes in Subtropical Region, and Hunan Research Center of Livestock & Poultry Sciences, and South-Central Experimental Station of Animal Nutrition and Feed Science in Ministry of Agriculture, Institute of Subtropical Agriculture, The Chinese Academy of Sciences, Changsha, Hunan 410125, China;

²University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The effects of adding different levels of linseed oil (LSO) in *Leymus chinensis* meal on gas production, rumen fermentation, and fatty acids in fermentation fluid were investigated using *in vitro* procedure. Treatments were control, *Leymus chinensis* meal containing 5% or 10% of LSO and cultured 48 h *in vitro*. The total gas production, methane and hydrogen production were measured at 12, 24 and 48 h. After 48 h, rumen fermentation parameters and fatty acids in fermented liquid were measured. The results showed that LSO significantly reduced the gas and methane production, improved rumen fermentation and increased the hydrogen production; LSO significantly increased the total volatile fatty acid (TVFA), the proportion of propionate and butyrate, and significantly reduced the pH and ammonia nitrogen concentration; At the same time, LSO increased the proportion of conjugated linoleic acid and other unsaturated fatty acid which were beneficial to human health. In conclusion, addition of LSO in the forage can suppress methane production, improve rumen fermentation and increase the concentration of polyunsaturated fatty acids (PUFA).

Key words: methane; rumen fermentation; fatty acid; *in vitro*

在反刍动物瘤胃代谢过程中, 反刍动物在能量代谢过程中, 因甲烷形式损失的能量占饲料总能(GE)的2%~12%。家养反刍动物每年往大气中

排放约80 Tg甲烷, 占到跟人类活动有关排放甲烷量的22%。因此, 通过饲料营养调控来减少反刍动物甲烷的排放量, 不仅可以提高反刍动物对能量的利用效率, 还将带来良好的生态收益。

多不饱和脂肪酸对瘤胃微生物有较强的抑制作用, 富含多不饱和脂肪酸的植物油如葵花籽油, 可以显著的降低甲烷的生成, 降低乙酸比例, 提高丙酸比

例,改变瘤胃的发酵模式^[1]。有研究发现动物日粮中补充一些天然植物油,还可以增加动物产品中一些对人体有益的不饱和脂肪酸(如:共轭亚油酸)的含量。Benchaar 等^[2]在奶牛的日粮中添加不同水平的 LSO,发现乳中一些对人体健康有益的脂肪酸成分(如:trans-11 18:1, cis-9, trans-11 18:2)的含量,随着 LSO 添加水平的增加而增加。本研究利用体外法研究添加不同水平的 LSO,探索对甲烷生成、瘤胃发酵及脂肪酸中间产物的影响。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验用 LSO 购自甘肃天水陇上农家植物油加工中心,体外培养底物为羊草,过 1 mm 筛网。

1.2 试验动物饲养及瘤胃液采集

试验动物为四头安装永久性瘤胃瘘管的浏阳黑山羊(体重为 25 ± 2 kg),单笼饲养,作为瘤胃液供体。饲喂按照中国地方山羊营养需要,并结合美国 NRC 营养需要,配制山羊日粮,精粗比为 30:70,粗饲料为当地的玉米秸秆。早上 8:00 点和晚上 8:00 各喂一次,自由采食、饮水。

晨饲前 2 h,利用手动真空管采集每头羊的瘤胃液,放入事先预热(39 °C)且充满 CO₂ 气体的保温瓶中。在持续通 CO₂ 的条件下,将四只羊的瘤胃液混合均匀,过四层医用纱布,待用。

1.3 体外培养

试验底物为粉碎的羊草,LSO 为天然传统压榨法制作而成。试验分三个处理组:对照组(Control)、底物+5% LSO 组和底物+10% LSO 组,每组三个重复。缓冲液配制参照 Goering and Van Soest (1970)^[3]配方。体外培养体系为瘤胃液:缓冲液=1:4,底物为 50 mg,39 °C 条件下恒温水浴,振荡培养 48 h。

1.4 总气体、甲烷及氢气测定

用压力传感器(昆山双桥传感器测控技术有限公司)测定 12、24 和 48 h 产气压力,并用相应公式转变成产气量。在培养 12、24 和 48 h 时间点,分别抽取两管气体(5 mL/管),测定甲烷及氢气含量。甲烷测定利用配备了火焰-离子化检测的 7890 型气相色谱(安捷伦),测定气相柱为 Hayesep Q 填充柱(2.44 m × 1/8 in., 2.0 mm ID),气相柱和检测器温度分别为 60 °C 和 100 °C,维持 3 min,氮气为载体,流速为 21 mL/min。氢气测定所用的仪器与测定

甲烷所用的为同台仪器,柱温设为 60 °C,维持 2.5 min,其余检测条件与测定甲烷相同。

1.5 发酵参数测定

48 h 培养结束后,用 pH 计(型号:PHS-3C,上海精密科学仪器有限公司)立即测定发酵液的 pH 值。取 5 mL 发酵培养液,-20 °C 冷冻保存,待测。VFA 浓度具体测定参照 Vanzant 和 Cochran (1994)^[4]的方法,氨氮浓度测定参照 Weatherburn (1967)^[5]方法。

1.6 长链脂肪酸测定

发酵液中脂肪酸按照 Bligh 和 Dyer^[6]描述的方法进行提取,根据 Ichihara 等^[7](1996)的操作步骤进行脂肪酸甲酯化。然后用配备了火焰-离子检测器的 5890 型气相色谱(安捷伦),气相柱为 CP-Sil 88 熔融石英毛细管柱(100 m × 0.25 mm, 0.2 μm),H₂ 为载体。升温程序为:炉温开始为 45 °C,维持 4 min,以 13 °C 升温速度升到 175 °C,维持 27 min,然后再以 4 °C 升温速度升到 215 °C,维持 35 min,测定时间为 86 min。

1.7 统计分析

试验数据利用 Excel 2010 整理后,采用 SAS 软件的广义线性模型(GLM)对数据进行显著性分析,多重比较采用 Duncan 氏法。 $P < 0.05$ 表示差异性显著。

2 结果

2.1 体外添加不同水平的 LSO 对总气体产量、甲烷及氢气产量的影响

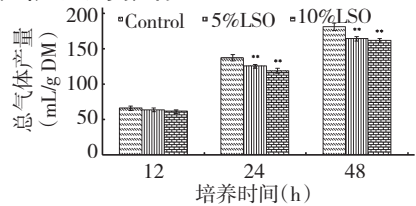


图 1 体外添加不同水平的 LSO 对总气体产量的影响

Fig. 1 Effects of addition of different levels of linseed oil on gas production *in vitro*

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, ** $P < 0.01$.

由图 1 可以看出,在整个培养期间,对照组的产气量均高于添加 LSO 处理组,而且在 13~48 h 培养时段中,对照组的产气量极显著高于两个 LSO 添加组($P < 0.01$),但是添加 LSO 的两个处理组之间差

异不显著($P > 0.05$)。

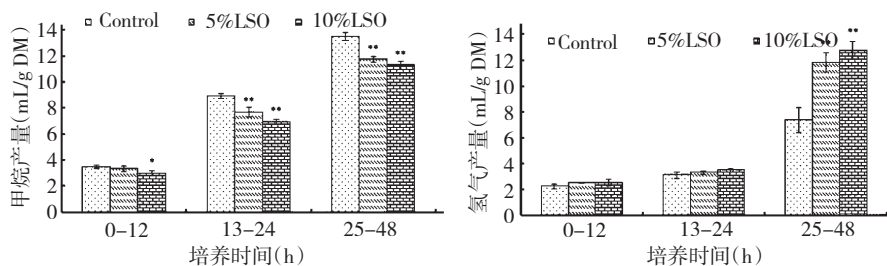


图2 体外添加不同水平的 LSO 对甲烷和氢气产量的影响

Fig. 2 Effects of addition of different levels of linseed oil on CH₄ and H₂ production *in vitro*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

图2(I)显示,在培养开始的前12 h时段中,对照组的甲烷产量显著高于($P < 0.05$)10% LSO 添加组,5% LSO 添加组的甲烷产量低于对照组,但是它们之间差异不显著($P > 0.05$);在13~24 h培养时段中,对照组的甲烷产量极显著($P < 0.01$)高于两个 LSO 添加组,而5% LSO 添加组的甲烷产量极显著($P < 0.01$)高于10%添加组;在25~48 h培养阶段,对照组的甲烷产量极显著($P < 0.01$)高于两个 LSO 添加组,而5% LSO 添加组显著($P < 0.05$)

高于10%添加组。图2(II)表明,在培养的前24 h,各组之间的氢气产量均无显著差异($P > 0.05$),但随着 LSO 添加量的增加而呈现出增加的趋势;在25~48 h培养时段,对照组的氢气产量极显著($P < 0.01$)低于另外两组,同时,5% LSO 添加组显著($P < 0.05$)低于10%的添加组。

2.2 体外添加不同水平的 LSO 对瘤胃发酵参数的影响

表1 体外添加不同水平的 LSO 对瘤胃发酵参数的影响

Table 1 Effects of addition of different levels of linseed oil on rumen fermentation parameters *in vitro*

项目 Items	对照 Control	5% LSO	10% LSO	标准误 SEM
挥发性脂肪酸 (mmol/L)				
乙酸 Acetate	45.85	51.81 **	50.07 **	0.454
丙酸 Propionate	13.27	15.71 **	15.66 **	0.158
异丁酸 iso-Butyrate	1.22	1.41 *	1.36	0.043
丁酸 Butyrate	4.67	5.96 **	5.84 **	0.159
异戊酸 iso-Valerate	2.40	2.71 *	2.66	0.063
戊酸 Valerate	1.93	2.00	1.96	0.052
乙丙比 A/P ratio	3.46	3.3 *	3.2 **	0.032
总挥发性脂肪酸 TVFA	69.33	79.59 **	77.55 **	0.609
pH	6.65	6.6 *	6.46 **	0.028
氨态氮 Ammonia-N (mmol/L)	51.37	42.56 **	38.3 **	0.077

注:与对照组比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

由表1可以看出,对照组发酵液中的乙酸和丙酸浓度极显著($P < 0.01$)低于 LSO 添加组,并且两个 LSO 添加组之间无显著差异($P > 0.05$);对照组发酵液中异丁酸和异戊酸的浓度显著($P < 0.05$)低于5% LSO 添加组;对照组发酵液中丁酸和总挥

发性脂肪酸的浓度极显著低于($P < 0.01$)两个 LSO 添加组,但是两个 LSO 添加组之间差异不显著($P > 0.05$);对照组的乙丙比显著($P < 0.05$)高于5% LSO 添加组,极显著($P < 0.01$)高于10% LSO 添加组,但是两个 LSO 添加组之间差异不显著

($P > 0.05$)。

发酵液的 pH 值随着 LSO 添加剂量的增加而下降,10% LSO 添加组极显著($P < 0.01$)低于对照组,显著($P < 0.05$)低于 5% 添加组。同样,发酵液中的氨态氮浓度随着 LSO 添加剂量的增加而下

降,对照组中氨氮的浓度极显著($P < 0.01$)高于两个 LSO 添加组,而 5% LSO 添加组显著($P < 0.05$)高于 10% 组。

2.3 体外添加不同水平的 LSO 对发酵液中脂肪酸的影响

表 2 体外添加不同水平的 LSO 酸对发酵液中脂肪酸的影响 (%)

Table 2 Effects of addition of different levels of linseed oil on fatty acids *in vitro* (%)

脂肪酸 Fatty acids	对照 Control	5% LSO	10% LSO	标准误 SEM
C _{15:0}	1.14	0.49	0.49	0.129
C _{16:0}	6.56	4.33	8.27	1.320
C _{17:0}	0.36	0.21	0.25	0.041
C _{18:0}	1.94	3.04	11.93	2.451
C _{18:1} , t11-TVA	0.23	0.21	0.25	0.054
C _{18:1} , c9	1.05	0.22 ^{**}	0.45 [*]	0.098
C _{18:1} , c11	0.17	0.37	0.27	0.040
C _{18:2} , c9t11-CLA	-	0.94	0.97	0.679
C _{18:2} , t11t13-CLA	-	0.15	0.04 [*]	0.015
TSFA	23.13	16.57	26.63	2.958
TMUFA	7.98	19.19	13.71	5.761
TPUFA	38.63	52.8	47.36	5.518
Ttrans	1.45	3.09	2.95	0.631
TCLA	0.56	1.04	1.02	0.627
Tn-3PUFA	2.02	4.5	13.81	3.213
Tn-6PUFA	35.74	47.21	32.46	5.944

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

从表 2 中可以看出,添加 LSO 对发酵液中的一些中长链脂肪酸(C15:0-C17:0)没有显著影响,同样发酵液中长链脂肪酸(C18:0)的含量,也没有显著变化,但是随着 LSO 添加量的增加,C18:0 的含量有增加的趋势;同样,添加 LSO 对发酵液中 C18:1、t11-TVA 和 C18:1, C11 的含量也没有达到显著影响;对照组发酵液中 C18:1, C9 的含量极显著($P < 0.01$)高于 5% LSO 添加组,显著($P < 0.05$)高于 10% LSO 添加组;对照组发酵液中没有检测到共轭亚油酸的两种同分异构体(C18:2, c9t11-CLA 和 C18:2, t11t13-CLA),而添加 LSO 处理中这两种同分异构体的含量较为丰富;添加 LSO 对 C18:2, c9t11-CLA 的含量没有显著影响,5% LSO 添加组发酵液中 C18:2, t11t13-CLA 的含量显著($P < 0.05$)高于 10% LSO 添加组;添加 LSO 对 TSFA、TMUFA、TPUFA、Ttrans、TCLA、Tn-3PUFA 和 Tn-6PUFA 的含量均没有显著影响,但是 LSO 添加组中发酵液中的

TMUFA、TPUFA、Ttrans 和 TCLA 含量高于对照组。

3 讨论

在本研究中,富含多不饱和脂肪酸的 LSO 降低了总产气量和甲烷生成量,随着添加剂量的增加,抑制总气体和甲烷产量的效果也显著增强(图 1、图 2I),但是氢气的产量却是增加的(图 2II)。Wanapat 等^[8]综述了前人所报道的一些体内和体外试验,认为当日粮添加植物油时,对瘤胃发酵和甲烷的生成均有显著影响。本研究与上述报道一致。反刍动物采食饲料后,饲料经过瘤胃微生物降解可生成挥发性脂肪酸和氢气。在本研究中,添加亚麻籽油增加了氢气的产量,这可能是由于亚麻籽油中的不饱和脂肪酸对甲烷菌的抑制,减少了甲烷菌对氢的利用,导致了氢气产量的增加。

本研究中富含多不饱和脂肪酸的 LSO 显著改变了瘤胃发酵类型,不同剂量添加组显著增加了总

挥发性脂肪酸含量 ($P < 0.01$), 降低了 ($P < 0.01$) 乙酸比例, 提高了 ($P < 0.01$) 丙酸比例, 降低了 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 乙酸丙酸比例。Pilajun 和 Wanapat^[9] 也观察到了类似的结果。添加 LSO 发酵 48 h 后 pH 显著被降低, 这可能是因为添加的 LSO 经过微生物作用, 释放出自由脂肪酸以及发酵液中挥发性脂肪酸的增加所导致。本研究中添加 LSO 显著降低了发酵液中的铵态氮浓度, Jalc 等^[10] 进行的体外发酵试验, 添加亚麻酸处理组也观察到了类似的结果。这可能是由于不饱和脂肪酸抑制发酵液中的瘤胃原虫和细菌所造成的。

瘤胃中脂肪代谢是瘤胃微生物首先将饲料中的糖脂、磷脂和甘油三脂等进行水解, 释放出自由的脂肪酸, 然后进行氢化、异构等过程。在本试验中, 添加 LSO 增加了发酵液中的饱和脂肪酸的比例 (C18:0), 而这是反刍动物日粮中补充植物油一个典型特征。对照组中 C18:1, C9 所占总脂肪酸比例显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 高于 LSO 添加组, 这可能是由于处理组中其他脂肪酸的含量增加, 因此 C18:1, C9 比例相对较低。对照组中没有检出两种共轭亚油酸 (cis9, trans11-CLA, trans11, trans13-CLA), 但是 LSO 添加组均有检测到这两种共轭亚油酸。Loor 等^[11] 在奶牛日粮中添加 LSO, 也发现增加了十二指肠流中的 cis9, -trans11-CLA 和 trans11, trans13-CLA 的含量。Flachowsky 等^[12] 给饲喂日粮 (精粗比为 70:30 干物质基础) 的奶牛每天补充 200 g LSO, 发现十二指肠流中 TMUFA、TPUFA、Ttrans 和 TCLA 的含量得到大幅度的提高。本研究中, 添加 LSO 组发酵液中也发现了类似的结果。

综上所述, 体外添加富含多不饱和脂肪酸的 LSO 显著抑制了甲烷生成, 瘤胃发酵模式向丙酸型发酵转变, 而且效果随着添加水平的增加而显著加强。同时, 添加 LSO 提高了发酵液中对人体有益的脂肪酸的含量, 有利于这些脂肪酸沉积到动物产品中, 改善动物产品的质量。

参考文献

- 1 Beauchemin KA, McGinn SM, Benchaar C, *et al.* Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk

- production. *J Dairy Sci*, 2009, 92:2118-2127.
- 2 Benchaar C, Romero-Pérez GA, Chouinard PY, *et al.* Supplementation of increasing amounts of linseed oil to dairy cows fed total mixed rations: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, protozoal populations, and milk fatty acid composition. *J Dairy Sci*, 2012, 95:4578-4590.
- 3 Goering HK, Van Soest PJ. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *Agric. Handbook*, 1970, No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.
- 4 Vanzant ES, Cochran RC. Performance and forage utilization by beef cattle receiving increasing amounts of alfalfa hay as a supplement to low-quality, tallgrass-prairie forage. *J Anim Sci*, 1994, 72:1059-1067.
- 5 Weatherburn MW. Phenol-Hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem*, 1967, 39:971-974.
- 6 Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys*, 1959, 37:911-917.
- 7 Ichihara K, Shibahara A, Yamamoto K, *et al.* An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids. *Lipids*, 1996, 31:535-539.
- 8 Wanapat M, Kongmun P, Pongchompu O, *et al.* Effects of plants containing secondary compounds and plant oils on rumen fermentation and ecology. *Trop Anim Health Pro*, 2012, 44:399-405.
- 9 Pilajun R, Wanapat M. Effect of coconut oil and mangosteen peel supplementation on ruminal fermentation, microbial population, and microbial protein synthesis in swamp buffaloes. *Livest Sci*, 2011, 141:148-154.
- 10 Jalc D, Certik M, Kundrikova K, *et al.* Effect of unsaturated C-18 fatty acids (oleic, linoleic and alpha-linolenic acid) on ruminal fermentation and production of fatty acid isomers in an artificial rumen. *Vet Med-Czech*, 2007, 52:87-94.
- 11 Loor JJ, Ueda K, Ferlay A, *et al.* Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage: concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *J Dairy Sci*, 2004, 87:2472-2485.
- 12 Flachowsky G, Erdmann K, Huther L, *et al.* Influence of roughage/concentrate ratio and linseed oil on the concentration of trans-fatty acids and conjugated linoleic acid in duodenal chyme and milk fat of late lactating cows. *Arch Anim Nutr*, 2006, 60:501-511.