

复合植物提取物对荷斯坦奶牛体外瘤胃发酵的影响

郭晨阳¹ 张腾龙¹ 徐腾腾¹ 敖长金^{1*} 王丽芳^{2*}

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

摘要: 本试验旨在研究饲料中添加复合植物提取物对奶牛瘤胃发酵的影响。选取4头健康、泌乳期相同、体况相近的荷斯坦奶牛进行口腔瘤胃液采集,作为瘤胃液的供体。复合植物提取物为蒲公英、连翘、益母草和金银花的醇提物,按质量比1:1:1:1进行配制。称取2.0 g精粗比为4:6的风干全混合日粮(TMR)于人工瘤胃培养瓶中,分别向其中添加0(对照组)、0.03%、0.30%和3.00%复合植物提取物(干物质基础),分别在2、4、6、8、12和24 h测定培养液的pH和菌体蛋白(MCP)、氨态氮(NH₃-N)、挥发性脂肪酸(VFA)浓度及干物质降解率,并应用多项指标综合指数(MFAEI)进行评定。结果表明:1)各时间点各组之间pH均无显著差异($P>0.05$)。在8 h时,0.03%、3.00%剂量组NH₃-N浓度显著高于其余2组($P<0.05$)。在2 h时,0.03%剂量组MCP浓度显著低于对照组和0.30%、3.00%剂量组($P<0.05$);在12 h时,0.30%和3.00%剂量组MCP浓度显著低于对照组($P<0.05$)。2)在8 h时,0.03%、0.30%和3.00%剂量组总挥发性脂肪酸(TVFA)浓度显著高于对照组($P<0.05$),0.03%、0.30%和3.00%剂量组丙酸浓度显著高于对照组($P<0.05$)。3)在4 h时,0.03%和0.30%剂量组干物质降解率均显著高于对照组($P<0.05$)。4)在6 h时,3.00%剂量组产气量显著高于对照组和0.03%、0.30%剂量组($P<0.05$);在8 h时,0.30%和3.00%剂量组产气量显著高于对照组和0.03%组($P<0.05$);在12 h和24 h时,0.03%、0.30%和3.00%剂量组产气量均显著高于对照组($P<0.05$)。5)MFAEI自高到低排序为0.30%剂量组>3.00%剂量组>0.03%剂量组。由此可见,在体外培养条件下,添加蒲公英、连翘、益母草和金银花的复合植物提取物可以有效调节荷斯坦奶牛瘤胃发酵,且适宜添加量为0.30%。
关键词: 复合植物提取物;体外批次培养;瘤胃发酵;荷斯坦奶牛

中图分类号:S823

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2020)08-3698-10

植物提取物是一类来源于天然植物且具有1种或多种生物学功效的活性物质,其添加在饲料中能起到促生长、抗菌、抗炎、抗氧化、增强免疫力等多种功能。植物提取物含有多种生物活性成分,主要包括多糖、黄酮、皂苷、单宁、核苷酸和生物碱及其衍生物等。不同植物的提取物所含活性物质有较大差异,而不同的活性成分对机体的作用机理也不尽相同。与此同时,同一种生物活性成分对动物所处生长阶段也有不同的效果。研究表明,可作为瘤胃发酵调节剂的植物提取物包括

单宁含量高的儿茶素、黄酮含量高的蒲公英、皂甙含量高的茶皂素和月桂酸植物精油等,但在实际生产中普遍存在造价高、适口性不好等使用限制。复合植物提取物是植物提取物经一系列复杂工序提取得到的混合物^[1]。在当前高度关注畜产品品质及实现畜牧业可持续发展的政策下,植物提取物以其天然性、安全性、营养性、无污染、无残留、无抗药性等优势,作为抗生素的有效替代品在动物饲料中被广泛应用^[2]。研究表明,作为一种新型绿色饲料添加剂,植物提取物可调控瘤胃发酵,

收稿日期:2020-02-28

基金项目:内蒙古农牧业科学院创新基金(2017CXJMM09);内蒙古科技成果转化项目(CGZH2018159)

作者简介:郭晨阳(1994—),女,内蒙古呼和浩特人,硕士研究生,动物营养与饲料科学专业。E-mail: 1132074935@qq.com

* 通信作者:敖长金,教授,博士生导师,E-mail: changjiniao@aliyun.com;王丽芳,研究员,E-mail: wanglifang100008@163.com

改变瘤胃发酵模式,减少甲烷气体排放,提高氮存留率,抗菌抑菌,提高饲粮营养成分的利用率,促进动物生长性能,还可减少抗生素残留,已经被畜牧业广泛高度重视^[3]。

“营养活性物质组学”理论表明,植物提取物对反刍动物瘤胃的调控作用可能是由于其具有多种活性物质协同作用。因此,通过添加复合植物提取物在维持反刍动物机体健康及调控其生产性能等方面有着非常广阔的应用前景。但目前关于蒲公英、连翘、益母草和金银花这4种复合植物提取物综合调控奶牛瘤胃发酵,研究其对奶牛生产性能、免疫及抗氧化方面影响的报道较少,因此有必要进行进一步的研究。鉴于此,本试验选用天然、高效、无毒副作用、资源丰富以及生物学作用较多的蒲公英、连翘、益母草和金银花这4种植物的醇提物,按质量比1:1:1:1混合后,研究其对荷斯坦奶牛体外瘤胃发酵的影响,筛选适宜添加量,

以期在研究复合植物提取物对奶牛生产性能、免疫及抗氧化影响的试验并进一步在奶牛饲养生产中应用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

蒲公英、益母草、金银花、连翘4种植物提取物的提取工艺流程为:在提取温度为95℃条件下,用浓度为55%乙醇提取2h,乙醇提取后以质量比1:1:1:1混合成复合植物提取物^[4]。

试验开始前,4种植物提取物的活性成分含量由武汉迈特维尔生物科技有限公司采用广泛靶向代谢组学方法进行测定,测得蒲公英、益母草、金银花、连翘的主要生物活性物质为脂质类、黄酮及其衍生物、核苷酸及其衍生物、氨基酸及其衍生物、有机酸及其衍生物等^[4]。4种植物提取物中主要活性成分含量见表1。

表1 4种植物提取物中主要活性成分含量(风干基础)

Table 1 Contents of main active ingredients in 4 kinds of plant extracts (air-dry basis)

%

项目 Items	黄酮及其衍生物 Flavonoids and their derivatives	核苷酸及其衍生物 Nucleotides and their derivatives	氨基酸及其衍生物 Amino acids and their derivative	脂质类 Lipids	有机酸及其衍生物 Organic acids and their derivatives
蒲公英 Dandelion	8.90	10.88	7.23	25.45	21.35
连翘 <i>Forsythia suspense</i>	11.89	2.97	5.69	15.68	20.83
金银花 Honeysuckle	21.02	15.59	5.88	5.97	7.53
益母草 Motherwort	23.96	12.33	10.66	23.96	18.76

1.2 瘤胃体外发酵试验设计及方法

1.2.1 瘤胃液采集

选取4头健康、泌乳期相同、体况相近的荷斯坦奶牛进行口腔瘤胃液采集,作为瘤胃液的供体,并装入事先预热至39℃并充满二氧化碳(CO₂)的保温瓶内,采样完毕后迅速带回实验室经4层纱布过滤后封口放入液氮中备用。

1.2.2 瘤胃缓冲液的制备

按照Maia等^[5]的方法制备瘤胃液缓冲液,试验开始前1天配制瘤胃液缓冲液,各组分包括:蒸馏水400 mL、A液200 mL(39 g NaHCO₃和2 g NH₄CO₃,溶于1 L蒸馏水)、B液0.1 mL(13.2 g CaCl₂·2 H₂O、10 g MnCl₂·4H₂O、1 g CoCl₂·6 H₂O和8 g FeCl₃·6 H₂O,溶于100 mL蒸馏水)、C液200 mL(5.7 g Na₂HPO₄、6.2 g

KH₂PO₄和0.6 g MgSO₄·7H₂O,溶于1 L蒸馏水)、刃天青溶液1 mL以及还原剂溶液40 mL(95 mL蒸馏水、4 mL NaOH和0.625 g Na₂S·9H₂O)。各溶液配制好后依次加入蒸馏水、微量元素溶液、碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、刃天青指示剂和还原液。充分混匀后持续通入CO₂,置于39℃水浴锅中预热,直至溶液颜色由粉红色变淡或无色时即可使用。

1.2.3 体外发酵培养

人工瘤胃体外培养发酵底物为风干全混合日粮(TMR),粉碎后混合均匀并密封贮存于干燥柜内的广口瓶中备用。体外培养发酵底物的组成见表2。瘤胃体外发酵试验参照Cherdthong等^[6]的方法。在体外发酵条件下,将体外培养发酵底物原料按精粗比4:6配制成TMR,经65℃烘干粉碎

过滤,精确称取 2.0 g 于人工瘤胃培养瓶中,分别向其中添加 0(对照组)、0.03%、0.30%和 3.00%复合植物提取物(干物质基础)。将过滤后备用的瘤胃液与配制好的缓冲液(需预热)按照 1:2 的比例混匀加入在水浴锅中加热达 39 °C 并持续通入 CO₂ 的三角瓶中,制成人工瘤胃培养液,待由红色逐渐变浅成无色时,再抽取 200 mL 人工瘤胃培养液分装于各个装有不同剂量复合植物提取物培养底物并预热达到 39 °C 的培养瓶中,通入 CO₂ 排尽空气,保持无氧环境,盖紧瓶塞,放于 39 °C 水浴摇床上开始厌氧培养。

表 2 体外培养发酵底物的组成(干物质基础)

Table 2 Composition of substrates for *in vitro* fermentation (air-dry basis) %

原料 Ingredients	含量 Content
全株玉米青贮 Whole plant corn silage	28.00
羊草 <i>Leymus chinensis</i>	12.00
苜蓿 Alfalfa hay	20.00
玉米 Corn	23.20
麸皮 Wheat bran	2.00
豆粕 Soybean meal	1.20
棉籽粕 Cottonseed meal	2.00
干啤酒糟 Distiller's grains	8.00
干酒糟及其可溶物 DDGS	1.60
预混料 Premix	0.80
食盐 NaCl	0.48
磷酸氢钙 CaHPO ₄	0.60
碳酸钠 Na ₂ CO ₃	0.12
合计 Total	100.00

预混料为每千克饲料提供 The premix provided the following per kg of the diet: VA 460 000 IU, VD₃ 180 000 IU, VE 6 000 IU, Se (as sodium selenite) 16 mg, I (as potassium iodide) 100 mg, Cu (as copper sulfate) 600 mg, Mn (as manganese sulfate) 3 000 mg, Zn (as zinc sulfate) 4 000 mg, Co (as cobalt chloride) 40 mg。

1.2.4 样品采集及指标测定

分别发酵至 2、4、6、8、12、24 h 时,记录体外产气量,将各时间点各组培养液进行收集标记并立即用便携式 pH 计测定 pH 后,将发酵液用 4 层纱布过滤,将滤渣称重后全部转移入坩埚中置于 65 °C 烘箱中烘干,待测定干物质降解率。收集滤液,去除残渣。收集好的滤液经 4 000 × g 离心 10 min 后用移液枪吸出 0.5 mL 上清液,置于预先装好 4.5 mL 0.2 mol/L HCl 的 10 mL 离心管中,

并摇匀放入 -20 °C 冰箱,待测氨态氮(NH₃-N)浓度;再用 5 mL 移液枪吸取 4 mL 上清液,移入预先装有按体积比 3:1 配制 1 mL 25% 偏磷酸和乙酸混合液的 10 mL 离心管中, -20 °C 保存,待测挥发性脂肪酸(VFA)浓度;剩余上清液缓慢吸入 20 mL 离心管中, -20 °C 保存,待测菌体蛋白(MCP)浓度。采样过程中,每次样品采集结束后,该时间点培养瓶弃用。

瘤胃液 NH₃-N 浓度测定采用分光光度计比色法,按照冯宗慈等^[7]的方法测定。MCP 浓度测定采用考马斯亮蓝法^[8],即使用紫外分光光度计测定吸光值,根据测定的吸光值和标准曲线回归公式计算出 MCP 浓度。VFA 浓度的测定是按照胡伟莲^[9]的内标法,即在样品中加入 2-乙基丁酸(2-EB)作为内标物,使用气相色谱仪测定瘤胃液中乙酸、丙酸浓度。

干物质降解率计算公式为:

$$A = 100 \times (B - C) / B;$$

式中:A 为干物质降解率(%);B 为待测物降解前干物质含量(g);C 为待测物降解后干物质含量(g)。

多项指标综合指数(MFAEI)为各指标单项组合效应指数(SFAEI)之和,SFAEI 计算公式如下:

$$SFAEI = \frac{\sum_n^n = 1 (A_2 - A_1) / n}{A_3}。$$

式中:A₁ 为参照各时间点各指标数值;A₂ 为各组各时间点各指标数值;A₃ 为每个时间点 A₂ 总和的平均值;n 为时间点数。

1.3 数据统计与分析

试验数据用 Excel 2010 进行初步整理统计后运用 SPSS 23.0 软件进行方差分析,组间采用 Duncan 氏法进行多重比较,并以 P < 0.05 为差异显著性判定标准。

2 结果

2.1 复合植物提取物对奶牛体外培养瘤胃液 pH 以及 NH₃-N、MCP 浓度的影响

由表 3 可知,随着培养时间的延长,各时间点各组之间 pH 均无显著差异(P > 0.05),且均在正常范围(6.0~7.5)内。在 8 h 时,0.03%、3.00% 剂量组 NH₃-N 浓度显著高于其余 2 组(P < 0.05),其余各时间点各组之间 NH₃-N 浓度均无显著差异(P > 0.05)。各时间点对照组 MCP 浓度均高于其他 3 组,其中,在 2 h 时,0.03% 剂量组 MCP 浓度

显著低于对照组和 0.30%、3.00% 剂量组 ($P < 0.05$); 在 12 h 时, 0.30% 和 3.00% 剂量组 MCP 浓

表 3 复合植物提取物对奶牛体外培养瘤胃液 pH 以及 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、MCP 浓度的影响
Table 3 Effects of compound plant extracts on pH and $\text{NH}_3\text{-N}$ and MCP concentrations in rumen fluid of dairy cows *in vitro* culture

项目 Items	时间 Time/h	复合植物提取物添加水平 Compound plant extracts supplemental level/%				SEM	P 值 P-value
		0(对照 Control)	0.03	0.30	3.00		
pH	2	7.06	7.07	7.08	7.04	0.03	0.629
	4	7.05	7.06	7.04	7.03	0.02	0.511
	6	7.00	6.97	6.99	6.95	0.02	0.089
	8	6.94	6.92	6.92	6.90	0.02	0.166
	12	6.86	6.86	6.86	6.85	0.02	0.979
	24	6.76	6.73	6.79	6.78	0.02	0.092
$\text{NH}_3\text{-N}$ / (mg/dL)	2	14.07	14.90	13.59	13.08	0.40	0.190
	4	14.71	13.88	12.06	13.71	0.40	0.102
	6	13.67	14.63	13.28	13.47	0.45	0.389
	8	14.74 ^a	16.73 ^b	14.77 ^a	17.12 ^b	0.39	0.011
	12	17.20	18.27	18.36	17.12	0.35	0.279
	24	26.73	27.47	25.67	27.25	0.41	0.055
菌体蛋白 MCP/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2	1 010.04 ^a	371.91 ^b	832.20 ^a	902.64 ^a	1.25	0.036
	4	1 231.46	1 033.87	882.06	877.05	0.66	0.102
	6	1 355.61	827.99	907.67	884.87	0.92	0.113
	8	1 422.12	1 043.44	948.10	1 102.36	0.40	0.272
	12	1 637.69 ^a	1 273.00 ^{ab}	1 207.46 ^b	1 050.09 ^b	1.58	0.039
	24	1 703.55	1 388.66	1 647.82	1 523.79	1.34	0.677

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同或无字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

2.2 复合植物提取物对奶牛体外培养瘤胃液 VFA 浓度的影响

由表 4 可知, 在 8 h 时, 0.03%、0.30% 和 3.00% 剂量组总挥发性脂肪酸 (TVFA) 浓度显著高于对照组 ($P < 0.05$), 0.03%、0.30% 和 3.00% 剂量组丙

酸浓度显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其余各时间点各组之间 TVFA 和丙酸浓度均无显著差异 ($P > 0.05$)。各时间点各组之间乙酸浓度及乙酸/丙酸均无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 4 复合植物提取物对奶牛体外培养瘤胃液 VFA 浓度的影响

Table 4 Effects of compound plant extracts on concentrations of VFA in rumen fluid of dairy cows *in vitro* culture

项目 Items	时间 Time/h	复合植物提取物添加水平 Compound plant extracts supplemental level/%				SEM	P 值 P-value
		0(对照 Control)	0.03	0.30	3.00		
总挥发性 脂肪酸 TVFA/ (mmol/L)	2	18.45	11.83	19.01	16.64	1.18	0.053
	4	20.27	18.13	18.59	18.97	0.70	0.816
	6	17.53	16.45	21.55	18.10	1.12	0.738
	8	17.23 ^a	28.07 ^b	26.59 ^b	26.03 ^b	1.57	0.001
	12	38.70	31.41	27.12	29.97	2.09	0.255
	24	36.78	37.67	42.59	39.06	1.23	0.396

续表 4

项目 Items	时间 Time/h	复合植物提取物添加水平 Compound plant extracts supplemental level/%				SEM	P 值 P-value
		0(对照 Control)					
		0.03	0.30	3.00			
乙酸 Acetic acid/ (mmol/L)	2	3.90	4.34	7.70	7.61	1.97	0.215
	4	7.24	7.26	7.95	8.69	1.49	0.739
	6	7.99	6.68	6.68	7.53	1.37	0.724
	8	7.71	12.16	9.90	11.46	1.85	0.159
	12	16.07	12.10	12.42	11.70	2.65	0.381
	24	19.74	19.77	20.86	17.70	3.13	0.835
丙酸 Propionic acid/ (mmol/L)	2	5.57	3.89	5.61	4.91	0.29	0.098
	4	5.79	5.62	5.45	5.54	0.18	0.961
	6	6.06	4.83	6.14	5.36	0.28	0.416
	8	5.06 ^a	8.29 ^b	7.53 ^b	7.40 ^b	0.41	0.001
	12	11.04	7.95	7.48	7.36	0.63	0.216
	24	11.42	11.70	11.45	10.87	0.43	0.946
乙酸/丙酸 Acetic acid/ propionic acid	2	1.40	1.11	1.49	1.55	0.68	0.182
	4	1.45	1.29	1.46	1.56	0.04	0.082
	6	1.40	1.38	1.48	1.40	0.02	0.196
	8	1.52	1.47	1.75	1.54	0.42	0.056
	12	1.61	1.53	1.67	1.57	0.03	0.095
	24	1.71	1.67	1.82	1.65	0.03	0.074

2.3 复合植物提取物对奶牛体外培养干物质降解率的影响

由表 5 可知,随着培养时间的延长,各组的干物质降解率均呈上升趋势。在 4 h 时,0.03% 和

0.30% 剂量组干物质降解率均显著高于对照组 ($P < 0.05$),其余各时间段各组之间干物质降解率均无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 5 复合植物提取物对奶牛体外培养干物质降解率的影响

Table 5 Effects of compound plant extracts on dry matter degradation rate of dairy cows *in vitro* culture

项目 Item	时间 Time/h	复合植物提取物添加水平 Compound plant extracts supplemental level/%				SEM	P 值 P-value
		0(对照 Control)					
		0.03	0.30	3.00			
干物质降解率 Dry matter degradation rate	2	22.79	31.96	26.30	24.61	4.94	0.391
	4	24.07 ^a	35.64 ^b	30.61 ^b	29.82 ^{ab}	2.74	0.019
	6	34.25	36.99	30.60	36.07	1.63	0.291
	8	37.48	41.23	39.54	40.82	1.95	0.019
	12	48.68	49.39	46.10	45.87	4.83	0.843
	24	67.51	66.56	67.21	68.07	3.50	0.977

2.4 复合植物提取物对奶牛体外培养产气量的影响

由表 6 可知,随着培养时间的延长,各组产气量呈上升趋势。在 6 h 时,3.00% 剂量组产气量显

著高于对照组和 0.03%、0.30% 剂量组 ($P < 0.05$); 在 8 h 时,0.30% 和 3.00% 剂量组产气量显著高于对照组和 0.03% 组 ($P < 0.05$); 在 12 和 24 h 时,0.03%、0.30% 和 3.00% 剂量组产气量均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 6 复合植物提取物对奶牛体外培养产气量的影响

Table 6 Effects of compound plant extracts on gas production of dairy cows *in vitro* culture

项目 Item	时间 Time/h	复合植物提取物添加水平 Compound plant extracts supplemental level/%				SEM	P 值 P-value
		0(对照 Control)	0.03	0.30	3.00		
		产气量 Gas production	2	31.00	31.33		
	4	52.33	52.33	60.67	54.33	5.06	0.364
	6	87.33 ^a	87.00 ^a	91.67 ^a	104.00 ^b	4.30	0.013
	8	123.33 ^a	126.33 ^a	138.67 ^b	142.33 ^b	5.82	0.030
	12	152.33 ^a	184.00 ^b	185.33 ^b	189.67 ^b	6.87	0.002
	24	199.00 ^a	254.67 ^b	245.33 ^b	243.00 ^b	7.21	0.001

2.5 复合植物提取物对奶牛体外培养 MFAEI 的评定

剂量组>3.00% 剂量组>0.03% 剂量组。由此可见, 饲料中添加复合植物提取物适宜添加量为0.30%。

由表7可见, MFAEI自高到低排序为0.30%

表 7 奶牛体外培养 MFAEI

Table 7 MFAEI of dairy cows *in vitro* culture

项目 Items	复合植物提取物添加水平 Compound plant extracts supplemental level/%		
	0.03	0.30	3.00
单项组合效应指数	-0.001 44	0.000 24	-0.002 89
SFAEI	0.122 80	0.160 47	0.163 01
	0.103 11	0.031 88	0.037 71
	-0.037 61	0.041 75	-0.001 28
多项指标综合指数 MFAEI	0.186 86	0.234 34	0.196 55

3 讨论

天然植物提取物中富含大量活性营养成分, 具有抗炎、抗菌、抗病毒等作用, 在提高动物生长性能及免疫抗氧化方面也有显著效果^[10]。大量研究表明, 金银花提取物具有抗炎、抗氧化等功效。唐志文^[11]研究发现, 围产期奶牛基础饲料中添加 1 和 2 g/kg 金银花提取物降低了炎症相关指标浓度, 缓解了炎症, 奶牛采食量显著增加。连翘提取物具有抗菌、抗炎、抗氧化及免疫增强等功能^[12]。胡竞一等^[13]研究发现, 连翘提取物主要成分连翘多酚具有显著的抗炎、解热和抗氧化的作用。蒲公英资源丰富, 其提取物提取方便, 抗炎抗氧化作用明显, 具有良好的应用前景。熊莺等^[14]通过试验证明, 益母草作为一种传统中药, 含有生物碱、挥发油、多糖、黄酮等多种化学成分, 具有降脂、护

肝、保护心肌和增强机体抗氧化等作用。益母草提取物对动物主要具有抗氧化、抑菌、抗炎镇痛的作用^[15]。

反刍动物的消化特点是前胃(瘤胃、网胃、瓣胃)以微生物消化为主, 动物食入的饲料主要在瘤胃内靠大量微生物分解消化, 其中 70%~85% 的干物质和 50% 以上的粗纤维被消化。瘤胃是一个复杂的厌氧发酵体系, 瘤胃微生物对营养物质的发酵是导致反刍动物与非反刍动物消化代谢特点不同的根本原因, 这是瘤胃与微生物相互选择的结果。瘤胃与微生物间存在共生关系, 即瘤胃为微生物发酵提供营养和适宜的环境条件, 而微生物在瘤胃中降解粗饲料中纤维的过程又为反刍动物提供能量和蛋白质。微生物不断利用可溶性碳水化合物和其他营养成分作为营养物质, 使其自身生长繁殖, 与此同时不断产生低级脂肪酸、甲烷、

氢、CO₂等代谢产物,也不断产生纤维分解酶。在纤维分解酶的作用下,进入瘤胃中粗饲料的纤维被降解为MCP。同时,发酵过程中也伴随着气体的产生和能量的损失。因此,合理调控反刍动物的瘤胃内环境已经成为了动物营养学家高度关注的一个研究领域^[16]。作为饲料添加剂,植物提取物的种类、添加量都会对瘤胃微生物产生影响,而瘤胃内环境的大量细菌、原虫也会受其影响,所以确定植物提取物的适宜添加量及开发其适当剂型非常必要。

3.1 复合植物提取物对奶牛体外培养瘤胃液pH及NH₃-N、MCP浓度的影响

奶牛瘤胃是一个复杂的大环境,维护瘤胃内环境稳定对奶牛营养生理至关重要。反刍动物的瘤胃液pH受唾液分泌、瘤胃内有机酸积聚以及饲料精粗比的影响^[17],在一定程度上反映瘤胃消化代谢情况,其过高或过低均对瘤胃微生物的繁殖和发酵有不利影响。在本试验中,与对照组相比,复合植物提取物对奶牛体外培养瘤胃液的pH影响不显著,均在正常值范围内。

由于瘤胃微生物的作用,使反刍动物对蛋白质和其他含氮化合物的消化、利用与非反刍动物有很大差异。进入瘤胃的饲料蛋白质在瘤胃中的消化是依靠大量微生物进行分解,瘤胃微生物又能利用非蛋白氮为主要氮源合成MCP,MCP为机体提供氨基酸资源用以合成畜产品中的蛋白质,MCP含量可直接反映瘤胃中的细菌数量及MCP合成的效率。瘤胃微生物可以利用瘤胃发酵产生的氨基酸等合成MCP。由于合成MCP的瘤胃微生物生产效率很高,占反刍动物蛋白质总需要量的50%~80%,因此MCP的含量也可以反映瘤胃发酵的效果^[18]。本试验中,各时间点0.03%、0.30%和3.00%剂量组MCP含量均低于对照组,在2h时的0.03%剂量组和12h时的0.30%和3.00%剂量组显著低于对照组,可能机理是复合植物提取物的添加在一定程度上增加了瘤胃液中NH₃-N浓度,瘤胃微生物对于NH₃-N的利用有所减缓,从而导致MCP含量的下降。

NH₃-N是微生物合成MCP的前体物质,一般将NH₃-N浓度作为衡量瘤胃氮代谢效率的重要指标之一。NH₃-N浓度的变化影响着瘤胃中氮源降解率和瘤胃微生物对NH₃-N的利用率。植物提取物的种类和剂量不同,也会影响氮代谢和MCP的

合成。张双双^[19]在奶水牛的饲料中添加葵花籽油、茶油,结果表明,与对照组相比,试验组NH₃-N浓度均显著降低。陈丹丹^[20]试验报道,添加桑叶黄酮和白藜芦醇提高了瘤胃NH₃-N浓度,添加大蒜素和茶皂素降低了瘤胃NH₃-N浓度。瘤胃NH₃-N浓度的适宜范围为6.58~36.7 mg/dL。还有研究表明,在体外发酵的条件下,瘤胃微生物生长的适宜NH₃-N浓度为20~50 mg/dL^[21]。NH₃-N浓度取决于瘤胃微生物对饲料中粗蛋白质的降解率与微生物合成蛋白质时的氮利用率。在本试验中,添加一定剂量的复合植物提取物使NH₃-N浓度在正常范围内有升高趋势,在8h时,0.03%、3.00%剂量组NH₃-N浓度显著高于其余2组,其余各时间点各组之间NH₃-N浓度均无显著差异。原因可能是发酵前期,添加复合植物提取物促进了细菌、真菌等微生物的繁殖,使饲料中蛋白氮的降解速率加快。瘤胃发酵8h后基本结束,微生物对NH₃-N的摄取和利用保持平衡状态,NH₃-N浓度无显著变化。本试验结果表明,复合植物提取物可提高瘤胃内微生物活性,通过调控NH₃-N浓度达到促进瘤胃内微生物的分解,进而促进瘤胃发酵。这与试验干物质降解率结果相一致,添加复合植物提取物提高了奶牛瘤胃干物质降解率。综合来看,复合植物提取物可调控瘤胃发酵且无显著不良影响。

3.2 复合植物提取物对奶牛体外培养瘤胃液VFA浓度的影响

VFA是瘤胃厌氧消化过程的重要中间产物,在动物体内,对代谢最为重要的有直链乙酸、丙酸和丁酸,约占瘤胃发酵TVFA产量的95%,而乙酸产量最大,占70%~75%,其组成比例及浓度可直接反映瘤胃代谢活动水平。瘤胃发酵产生的VFA可氧化供能,乳牛体内中,50%乙酸、67%丁酸和25%丙酸都经氧化提供能量,因此测定VFA浓度对研究反刍动物瘤胃发酵有着重要的意义。VFA不仅可作为反刍动物能量代谢的表现形式,而且还具有许多调节功能。饲料中纤维物质与非纤维性碳水化合物经瘤胃微生物分解为丙酮酸。丙酮酸发生代谢转化,合成可被继续利用的营养物质,如乙酸、丙酸等VFA以及CO₂、氢气、甲烷。糖降解过程中丙酮酸转化为乙酸和丁酸时产生氢气,而氢气可用于丙酸生成。甲烷产量与瘤胃发酵产生的乙酸含量和乙酸/丙酸呈正相关,与丙酸含量

呈负相关^[22]。本试验中,与对照组相比,除在8 h时,各剂量组 TVFA 浓度、丙酸浓度显著升高,其余各时间段各组之间均无显著差异;各时间点各组之间乙酸浓度及乙酸/丙酸均无显著差异。这说明复合植物提取物可以影响瘤胃发酵产生的VFA组成,从而改变瘤胃发酵模式;通过增加丙酸浓度竞争性消耗氢气,降低乙酸/丙酸,调控瘤胃内甲烷生成。

3.3 复合植物提取物对奶牛体外培养产气量的影响

产气量可评价饲料营养价值与可发酵程度,在一定程度上反映饲料被瘤胃微生物的利用程度,可体现瘤胃微生物活动的总趋势^[23]。瘤胃的产气量随着营养物质在瘤胃中发酵能力的增强和瘤胃微生物活性的提升而呈增加趋势;反之,饲料中可发酵的营养物质含量减少,瘤胃微生物的活性减弱,产气量也就相应减少。大量研究表明,植物提取物能降低反刍动物瘤胃发酵的产气量。白乌日汗^[24]在奶牛饲料中分别添加牛至油及其主要成分麝香草酚,在体外批次培养条件下测定甲烷产量,结果表明,添加麝香草酚和牛至油均降低了甲烷产量,麝香草酚效果更显著。而本试验结果显示,随着培养时间的延长,产气量逐渐增多。随着复合提取物添加量的提升,产气量也呈上升趋势。与对照组产气量相比,6 h时3.00%剂量组产气量显著升高,8 h时0.30%和3.00%剂量组产气量显著升高,12和24 h时0.03%、0.30%和3.00%剂量组产气量均显著升高。瘤胃中所产生的气体主要包括CO₂和甲烷,分别约占70%和20%。瘤胃中的原虫可产生大量氢气,而氢气是瘤胃中甲烷生成的主要底物。瘤胃中产气量的升高可能是由于复合植物提取物的活性成分抑制了瘤胃原虫的生长,减少了原虫的数量,使纤维物质在瘤胃内的降解率提高。王洪荣等^[25]通过体外法研究了皂苷对瘤胃内发酵参数的影响,结果表明,添加皂甙降低了瘤胃液中原虫数,使体外产气量提高,与本研究结果一致。

3.4 复合植物提取物对奶牛体外培养 MFAEI 的影响

饲料各成分间存在着广泛的组合效应,这对反刍动物消化吸收及生产都有影响作用。在评定反刍动物瘤胃发酵性能时有多种指标,如瘤胃NH₃-N、MCP、VFA浓度及产气量等,单一使用每

一项指标来衡量瘤胃发酵功能均带有一定的片面性,且不同的指标衡量的结果不完全相同。为了更客观、更综合的反映瘤胃发酵情况,综合各时间点各瘤胃发酵参数,采用MFAEI来评定饲料间的组合效应,可量化各指标间的综合效应,直接进行组合效应的大小评定,可作为体外发酵试验的评价体系^[26]。综合各时间点各瘤胃发酵参数后得到的多项指标综合指数可知,添加复合植物提取物的各发酵参数均呈正效应,说明添加复合植物提取物可有效调节瘤胃发酵,且MFAEI由高到低排序为0.30%剂量组>3.00%剂量组>0.03%剂量组,因此,在添加量为0.30%时复合植物提取物对瘤胃发酵性能的促进效果最佳。

4 结 论

① 复合植物提取物对奶牛体外瘤胃的pH、乙酸浓度及乙酸/丙酸均无显著影响,但能提高NH₃-N、丙酸浓度及干物质降解率。

② MFAEI分析表明,复合植物提取物可以有效调节奶牛体外瘤胃发酵,适宜添加量为0.30%。

参考文献:

- [1] WINDISCH W, SCHEDULE K, PLITZNER C, et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry [J]. *Journal of Animal Science*, 2008, 86 (14S): E140-E148.
- [2] 侯昆,童津津,熊本海,等.植物提取物防治奶牛乳房炎的应用进展[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(7): 3009-3015.
- [3] 张然,郑琛,闫晓刚,等.植物提取物对反刍动物瘤胃发酵和甲烷排放影响的研究进展[J]. *东北农业科学*, 2017, 42(5): 43-47.
- [4] 徐腾腾,张腾龙,王丽芳,等.复合植物提取物对奶牛生产性能及血清免疫、抗氧化指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(11): 5707-5718.
- [5] MAIA M R G, FONSECA A J M, OLIVEIRA H M, et al. The potential role of seaweeds in the natural manipulation of rumen fermentation and methane production [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32321.
- [6] CHERDTHONG A, WANAPAT M. *In vitro* gas production in rumen fluid of buffalo as affected by ureacalcium mixture in high-quality feed block [J]. *Animal Science Journal*, 2014, 85(4): 420-426.
- [7] 冯宗慈,高民.通过比色测定瘤胃液氨氮含量方法的改进[J]. *内蒙古畜牧科学*, 2010, 31(4): 40-41.

- [8] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [9] 胡伟莲. 皂甙对瘤胃发酵与甲烷产量及动物生产性能影响的研究 [D]. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [10] WALLMANN J, BOTTNER A, GOOSSENS L, et al. Results of an interlaboratory test on antimicrobial susceptibility testing of bacteria from animals by broth microdilution [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2006, 27(6): 482-490.
- [11] 唐志文. 金银花提取物对围产期奶牛健康状况及生产性能的作用效果研究 [D]. 硕士学位论文. 北京: 北京畜牧兽医研究所, 2018.
- [12] 卢婷, 朴香淑. 连翘提取物抗氧化活性的研究进展 [J]. *中国畜牧杂志*, 2009, 45(15): 57-60.
- [13] 胡竟一, 雷玲, 余悦, 等. 连翘的抗炎解热作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(3): 51-52.
- [14] 熊莺, 杨解人. 益母草碱对大鼠急性心肌缺血损伤血管舒缩功能及抗氧化作用的影响 [J]. *中国试验方剂学杂志*, 2008, 14(7): 34-37.
- [15] 钱海兵, 徐玉平, 罗魁. 益母草碱对实验性高脂血症大鼠的降脂作用 [J]. *华西药学杂志*, 2012, 27(5): 528-530.
- [16] STORM E, RSKOV E R. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms [J]. *The British Journal of Nutrition*, 1983, 50(2): 463-470.
- [17] 姜士凯. 不同类型日粮对泌乳奶牛体况、瘤胃发酵及生产性能的影响 [D]. 硕士学位论文. 郑州: 河南农业大学, 2013.
- [18] COLEMAN G S, SANDFORD D C. The uptake and utilization of bacteria, amino acids and nucleic acid components by the rumen ciliate *Eudiplodinium maggii* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 47(3): 409-419.
- [19] 张双双. 添加葵花籽油和茶油对奶水牛瘤胃发酵、脂肪酸组成以及相关瘤胃微生物数量的影响 [D]. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学, 2014.
- [20] 陈丹丹. 四种植物提取物对肉羊甲烷排放、物质代谢及瘤胃微生物区系的影响 [D]. 硕士学位论文. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2014.
- [21] SATTER D, SLYTER L L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro* [J]. *British Journal of Nutrition*, 1974, 32(2): 199-208.
- [22] CHALUPA W. Manipulating rumen fermentation [J]. *Journal of Animal Science*, 1997, 45(3): 585-599.
- [23] 崔振亮, 孟庆翔, 李德勇, 等. 植物蜕皮甾酮对体外瘤胃发酵及甲烷产量的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2014, 50(19): 66-70.
- [24] 白乌日汗. 植物精油及其它活性成分对奶牛瘤胃发酵功能影响的研究 [D]. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [25] 王洪荣, 陈旭伟, 王梦芝. 茶皂素和丝兰皂苷对山羊人工瘤胃发酵和瘤胃微生物的影响 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(8): 1710-1719.
- [26] 卢德勋. 系统动物营养学导论 [M]. 北京: 农业出版社, 2004.

Effects of Compound Plant Extracts on Rumen Fermentation of Holstein Cows *in Vitro*

GUO Chenyang¹ ZHANG Tenglong¹ XU Tengting¹ AO Changjin^{1*} WANG Lifang^{2*}

(1. College of Animal Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010031, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the effects of dietary compound plant extracts on rumen fermentation of Holstein cows *in vitro*. The rumen fluid was collected from 4 healthy Holstein cows with the same lactation period and similar body condition as the rumen fluid donor. The compound plant extracts were the alcohol extracts for dandelion, *Forsythia suspense*, honeysuckle and motherwort, which prepared according to the weight ratio of 1:1:1:1. Weighted 2.0 g air-dried total mixed ration (TMR) in artificial rumen culture bottle, then supplemented with 0 (control group), 0.03%, 0.30% and 3.00% compound plant extracts (dry matter basis), and the pH and concentrations of microbial protein (MCP), ammoniacal nitrogen (NH₃-N), volatile fatty acid (VFA) and dry matter degradation rate were measured at 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h, respectively, and the multiple-factors associative effects index (MFAEI) was used for evaluation. The results showed as follows: 1) there was no significant difference in pH among all groups at each time point ($P>0.05$). At 8 h, the NH₃-N concentration of 0.03% and 3.00% dosage groups was significantly higher than that of other two groups ($P<0.05$). At 2 h, the MCP concentration of 0.03% dosage group was significantly lower than that of 0.30% and 3.00% dosage groups ($P<0.05$); at 12 h, the MCP concentration of 0.30% and 3.00% dosage groups was significantly lower than that of the control group ($P<0.05$). 2) At 8 h, the total volatile fatty acid (TVFA) concentration of 0.03%, 0.30% and 3.00% dosage groups was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$), and the propionic acid concentration of 0.03%, 0.30% and 3.00% dosage groups was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). 3) At 4 h, the dry matter degradation rate of 0.03% and 0.30% dosage groups was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). 4) At 6 h, the gas production of 3.00% dosage group was significantly higher than that of 0.03% and 0.30% dosage groups ($P<0.05$); at 8 h, the gas production of 0.30% and 3.00% dosage groups was significantly higher than that of control group and 0.03% dosage group ($P<0.05$); at 12 and 24 h, the gas production of 0.03%, 0.30% and 3.00% dosage groups was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). 5) The order of MFAEI from high to low was 0.30% dosage group > 3.00% dosage group > 0.03% dosage group. Therefore, under *in vitro* culture condition, the addition of compound plant extracts of dandelion, *Forsythia suspense*, motherwort and honeysuckle can effectively regulate the rumen fermentation of Holstein cows, and the optimum additive amount is 0.30%. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(8):3698-3707]

Key words: compound plant extracts; batch culture *in vitro*; rumen fermentation; Holstein cows

* Corresponding authors: AO Changjin, professor, E-mail: changjinao@aliyun.com; WANG Lifang, professor, E-mail: wanglifang100008@163.com (责任编辑 武海龙)