

不同类型纤维对活体外瘤胃发酵和共轭亚油酸形成的影响

李艳玲^{1,2} 孟庆翔^{1,2}

(1. 动物营养学国家重点实验室, 北京 100094; 2. 中国农业大学 动物科学技术学院/ 肉牛研究中心, 北京 100094)

摘要 研究不同类型的纤维添加向日葵油对活体外瘤胃发酵和共轭亚油酸 (CLA) 形成的影响。以等量的玉米秸细胞壁、甜菜渣细胞壁和微晶纤维素作为底物, 分别代表木质化纤维、易消化纤维和纯纤维素, 添加相同水平 (占底物 DM 的 4.76%) 的向日葵油, 用混合瘤胃微生物进行活体外发酵培养 24 h。结果表明, 添加向日葵油进行活体外发酵培养时, 不同纤维类型显著影响活体外瘤胃发酵特性 ($P < 0.01$), 并影响发酵液脂肪酸组成和 CLA 的比例。木质化纤维显著地增加 ($P < 0.05$) 活体外瘤胃微生物对 *cis9*, *trans11*-CLA 的合成。

关键词 共轭亚油酸; 纤维类型; 活体外瘤胃发酵

中图分类号 S 816.5

文章编号 1007-4333(2006)05-0041-05

文献标识码 A

Effect of different types of fiber on rumen fermentation and production of conjugated linoleic acids in vitro

Li Yanling^{1,2}, Meng Qingxian^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Beijing 100094, China; 2. College of Animal Science and Technology/ Beef Cattle Research Center, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract An in vitro study was conducted to determine the effect of different types of fiber supplemented with sunflower oil on rumen fermentation and formation of conjugated linoleic acids (CLA) by mixed ruminal microorganisms. Cell wall components extracted from corn stover and beet pulp, and avicel were used as substrates, representing lignified fiber, easily digestible fiber and purified cellulose, respectively. Sunflower oil was supplemented at the same level (4.76% of substrate DM) for all three types of fiber. After 24 h of incubation, rumen fermentation parameters and the concentration of fatty acids (FA) in the culture fluid were determined. Results showed that the type of fiber significantly influenced ($P < 0.01$) rumen fermentation traits in vitro. Composition of FA and profile of CLA were altered by the fiber type. Compared to the digestible fiber and purified cellulose, lignified fiber significantly increased ($P < 0.05$) the production of *cis9*, *trans11*-CLA by rumen microorganisms.

Key words conjugated linoleic acids; fiber type; rumen fermentation in vitro

共轭亚油酸 (conjugated linoleic acids, CLA) 是亚油酸的一组位置和几何异构体, 有重要的生理功能, 包括抗氧化、促进生长、调节免疫等。其中具有主要生理活性的 CLA 异构体为 *cis9*, *trans11*-CLA 和 *trans10*, *cis12*-CLA。通常, 反刍动物肉和奶中的 CLA 主要有 2 个来源: 一是通过亚油酸在瘤胃中的生物氢化形成, 该过程需要亚油酸异构酶的催化; 另一个是组织内源合成, 乳腺组织中的 δ^9 -脱氢酶可

以使十八碳单烯酸 (*trans11*-C_{18:1}) 脱氢转化成 *cis9*, *trans11*-CLA^[1]。

日粮因素是影响反刍动物体内 CLA 合成的主要因素, 包括日粮的脂类底物 (如动物油、植物油和高油植物种籽等) 及日粮条件 (如日粮的精粗比、缓冲液和非结构性碳水化合物水平等)。Kelly 等^[2] 报道, 日粮中添加植物油可以明显地增加乳脂中的 CLA 含量, 而且与植物油中的亚油酸含量关系密

收稿日期: 2006-04-17

基金项目: 国家杰出青年基金资助项目 (30125033)

作者简介: 李艳玲, 博士研究生, E-mail: yanl.li@163.com; 孟庆翔, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事动物营养与饲料研究, E-mail: qxmeng@cau.edu.cn

切。然而,日粮的低粗料水平会降低瘤胃的脂解和生物氢化^[3],从而影响瘤胃中 CLA 的合成。粗饲料中的纤维类型对瘤胃 CLA 的合成影响目前还未见报道。本试验旨在研究不同来源的纤维,如木质化纤维(如玉米秸)、易消化纤维(如甜菜渣)和纯纤维素(如微晶纤维素)对活体外瘤胃发酵和 CLA 形成的影响。

1 材料与方法

1.1 试验原料

本试验采用 3 种来源的纯纤维,玉米秸细胞壁、甜菜渣细胞壁和微晶纤维素(Avicel PH-101, Fluka),化学成分见表 1。试验用向日葵油的组成见表 2,用超声波细胞破碎仪制备向日葵油的乳化液。

表 1 供试纤维材料的化学成分

Table 1 Chemical component of experimental fiber materials

w(纤维成分)/ %(DM)	玉米秸 细胞壁	甜菜渣 细胞壁	微晶纤 维素
纤维素	35.3	35.9	100
半纤维素	57.3	60.7	0
木质素	4.9	2.0	0

表 2 向日葵油的脂肪酸组成

Table 2 Fatty acid composition of sunflower oil

m(脂肪酸) m(总脂肪酸)/(g/100g)				
棕榈酸 C _{16:0}	硬脂酸 C _{18:0}	硬脂油酸 C _{18:1-cis9}	亚油酸 C _{18:2-cis9 cis12}	亚麻油酸 C _{18:3-cis9 cis12 cis15}
7.0	5.6	19.6	67.7	0.1

1.2 活体外瘤胃发酵

玉米秸细胞壁、甜菜渣细胞壁和微晶纤维素作为发酵底物,每个处理设 8 个重复,均添加 4.76% (占底物 DM) 的乳化向日葵油,按照 Menke 等^[4]的方法进行活体外发酵培养。

分别准确称取 0.4 g(DM) 3 种纤维原料于培养管中,培养前 1 h 向每个培养管中加入 1 mL 向日葵油乳化液。晨饲前采集 6 头带有瘤胃瘘管的本地黄牛的瘤胃液。供体牛的日粮由 75% 的粗料(玉米秸压块和苜蓿颗粒)和 25% 精料混合料组成,每天饲喂 2 次。取出的瘤胃内容物混合后经 4 层纱布过滤,迅速加入装有经 CO₂ 饱和和预热(39℃)的缓冲液的玻璃瓶中,配制成混合培养液(瘤胃液与缓冲液配比为 1:2)。然后,用自动加液器向各培养管中加入

约 50 mL 混合培养液,记录初始刻度值(mL)后迅速放入 39℃ 的人工瘤胃水浴培养箱(TCYQ,太仓市实验设备厂)中培养 24 h,记录培养管的刻度值。产气量用空白(只加入瘤胃液,没有底物)做校正。

1.3 采样与样本分析

活体外培养 24 h 后,测定发酵液的 pH。并取出 10 mL 发酵液离心(10 000 g, 15 min),取 1 mL 上清液加入 25 g/100 mL 偏磷酸溶液 0.2 mL,混匀,用于挥发酸(VFA)的测定;另取 1 mL 上清液用于氨态氮(NH₃-N)的测定。剩余未离心的样品发酵液留待进行脂肪酸(FA)的测定。所有待测样品 -20℃ 保存。

向日葵油和活体外发酵培养液中的脂肪根据 Folch 等^[5]的方法提取,脂肪酸的甲酯化按照 Kramer 和 Zhou^[6]的推荐方法进行。脂肪酸甲基酯用气相色谱(6890 N, Agilent)分离,采用 100 m 的毛细管柱(Supelco SP 2560; 0.25 mm × 0.20 μm),用十七烷酸(C_{17:0})作为内标进行定量分析。

1.4 统计分析

本试验按照单因子试验设计。所有试验数据采用 SAS(SAS 8.01)广义线性模型(GLM)进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 活体外瘤胃发酵

经过瘤胃微生物 24 h 的活体外培养,测定了玉米秸细胞壁、甜菜渣细胞壁及微晶纤维素活体外培养发酵参数(表 3)。甜菜渣细胞壁组和微晶纤维素组的产气量间没有差异($P = 0.23$),但都显著高于玉米秸细胞壁组($P < 0.0001$)。与之一致的是,甜菜渣细胞壁组和微晶纤维素组 24 h 发酵培养液的 pH 间也没有差异($P = 0.16$),但都显著低于($P = 0.04$, $P = 0.002$)玉米秸细胞壁组。各纤维组间 NH₃-N 的质量浓度和总 VFA 浓度差异显著($P < 0.0001$)。其中, NH₃-N 质量浓度的排序为:玉米秸细胞壁 > 甜菜渣细胞壁 > 微晶纤维素;而总 VFA 浓度的排序为:玉米秸细胞壁 < 甜菜渣细胞壁 < 微晶纤维素。对于发酵液中各种 VFA 的水平,各纤维组间乙酸和丙酸摩尔分数差异显著($P < 0.0001$)。其他几种 VFA,包括异丁酸、丁酸、异戊酸和戊酸的摩尔分数在各组间也存在显著差异($P < 0.0001$)。

通常,产气量和总 VFA 产量间存在正相关^[7],在本试验中也观察到了类似的结果。这几种纤维消

化率的差异,造成了产气量和总VFA的差异。易消化纤维的产气量和总VFA水平最高;反之,木质化纤维的产气量和总VFA水平最低。

培养液中总VFA浓度的增加必然伴随着pH的下降。本试验中各组的pH在6.54~6.87间,说明培养液处于正常的瘤胃发酵状态。 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的质量浓度是瘤胃蛋白降解产生的氨和微生物用于蛋白合成的氨之间平衡的结果。尽管纤维底物的添加水平一致,但由于不同类型纤维的可利用能不同,就造

成了微生物蛋白合成效率的差异。

随着日粮精料水平的增加,瘤胃液中总VFA浓度以及丙酸的摩尔分数增加,而乙酸的摩尔分数下降^[8]。这可能与精料的消化率高有关。本试验中,从木质化纤维到易消化纤维再到纯纤维素,随纤维消化率的提高,培养液中总VFA浓度和丙酸摩尔分数提高,而乙酸摩尔分数下降,这与以上规律相符合。以上结果表明,相同水平不同类型的纤维添加等量的向日葵油,活体外发酵模式完全不同。

表3 供试纤维添加向日葵油活体外24 h培养的瘤胃发酵参数

Table 3 Fermentation parameters of experimental fiber supplemented with sunflower oil in culture fluid after 24 h of incubation *in vitro*

项 目	纤维来源			SEM	P
	玉米秸细胞壁	甜菜渣细胞壁	微晶纤维素		
24 h 产气量/ (mL/ 200 mg, DM)	33.2 b	50.2 a	54.2 a	2.29	<0.000 1
pH	6.87 a	6.67 b	6.54 b	0.06	0.006
氨氮 $\text{NH}_3\text{-N}$ / (mg/ dL)	13.2 a	11.0 b	4.3 c	0.37	<0.000 1
总挥发酸/ (mmol/ L)	52.7 c	64.2 b	74.6 a	2.43	<0.000 1
乙酸摩尔分数/ %	69.5 a	66.9 b	57.0 c	0.28	<0.000 1
丙酸摩尔分数/ %	19.1 c	22.4 b	34.7 a	0.23	<0.000 1
异丁酸摩尔分数/ %	1.0 a	0.9 b	0.9 b	0.02	<0.000 1
丁酸摩尔分数/ %	7.7 a	7.5 a	5.7 b	0.21	<0.000 1
异戊酸摩尔分数/ %	1.7 a	1.2 b	1.3 b	0.06	<0.000 1
戊酸摩尔分数/ %	0.9 b	1.2 a	0.5 c	0.05	<0.000 1
乙酸/ 丙酸	3.7 a	3.0 b	1.6 c	0.03	<0.000 1

注:同一行字母不同的数据差异显著($P < 0.05$),下同; $n = 8$ 。

2.2 体外培养液中脂肪酸的产生

调整日粮组成以及改变瘤胃发酵会使反刍动物产品中脂肪酸的水平发生改变。据报道,乳脂中的CLA含量会随日粮中不饱和植物油的添加而提高^[2],也会随日粮粗料水平的改变而改变^[9]。植物油如向日葵油、豆油、玉米油、堪诺拉菜籽油、亚麻籽油和花生油等,亚油酸含量较高,通常能够增加乳脂中的CLA含量。本试验选择的向日葵油富含不饱和脂肪酸,亚油酸(*cis*9, *cis*12- $\text{C}_{18:2}$)和油酸(*cis*9- $\text{C}_{18:1}$)分别占总脂肪酸约68%和20%。

日粮粗料水平能影响CLA的产生,纤维类型是否会影响瘤胃中CLA的形成?3种来源的纤维在体外培养24 h后,培养液中FA的质量浓度见表4。主要的FA是 $\text{C}_{18:0}$ 和*trans*11- $\text{C}_{18:1}$,表明向日葵油中的不饱和脂肪酸在瘤胃微生物的作用下发生了生物氢化。

本试验中,对于培养液中的饱和脂肪酸,豆蔻酸($\text{C}_{14:0}$)、十五烷酸($\text{C}_{15:0}$)、棕榈酸($\text{C}_{16:0}$)、硬脂酸($\text{C}_{18:0}$)和花生酸($\text{C}_{20:0}$)的质量浓度在3种纤维组间均存在显著差异($P < 0.05$)。对于十八碳不饱和脂肪酸,油酸、反-11十八碳单烯酸(*trans*11- $\text{C}_{18:1}$)、亚油酸和亚麻油酸(*cis*9, *cis*12, *cis*15- $\text{C}_{18:3}$)的质量浓度在3种纤维组间也存在显著差异($P < 0.05$)。而棕榈油酸(*cis*9- $\text{C}_{16:1}$)质量浓度在各纤维组间差异不显著($P > 0.05$)。

十八碳二烯酸的异构体主要是日粮中亚油酸($\text{C}_{18:2, n-6}$)异构化的产物。本试验中,检测出4种CLA的异构体(包括*cis*9, *trans*11; *trans*10, *cis*12; *trans*9, *trans*11和*cis*9, *cis*11)。培养液中玉米秸细胞壁组的*cis*9, *trans*11-CLA质量浓度显著高于($P < 0.05$)另2个纤维组,而甜菜渣细胞壁组和微晶纤维素组的*cis*9, *trans*11-CLA质量浓度没有显著差异

表4 活体外24 h培养的脂肪酸质量浓度

Table 4 Concentration of fatty acids in culture fluid after 24 h of incubation

脂肪酸质量浓度/(mg/L)	纤维种类			SEM	P
	玉米秸细胞壁	甜菜渣细胞壁	微晶纤维素		
豆蔻酸 C ₁₄ 0	3.18 c	40.99 a	17.15 b	2.42	<0.000 1
十五烷酸 C ₁₅ 0	3.24 b	1.68 b	22.11 a	0.63	<0.000 1
棕榈酸 C ₁₆ 0	33.04 a	34.67 a	15.23 b	2.04	<0.000 1
棕榈油酸 C ₁₆ 1 ⁻ cis9	1.32	0.84	0.91	0.32	0.54
硬脂酸 C ₁₈ 0	166.05 a	141.44 b	168.05 a	7.63	0.02
反-11 十八碳单烯酸 C ₁₈ 1 ⁻ trans11	89.18 a	68.21 b	73.42 b	3.57	0.002
油酸 C ₁₈ 1 ⁻ cis9	23.63 a	20.50 b	16.90 c	0.75	<0.000 1
亚油酸 C ₁₈ 2 ⁻ cis9, cis12	1.64 b	9.37 a	2.41 b	1.02	<0.000 1
顺-9,反-11 共轭亚油酸 C ₁₈ 2 ⁻ cis9, trans11	5.38 a	3.64 b	3.96 b	0.38	0.01
反-10,顺-12 共轭亚油酸 C ₁₈ 2 ⁻ trans10, cis12	0.30 b	0.13 c	0.52 a	0.05	0.000 2
反-9,反-11 共轭亚油酸 C ₁₈ 2 ⁻ trans9, trans11	0.19 a	0.27 a	0.09 b	0.03	0.002
顺-9,顺-11 共轭亚油酸 C ₁₈ 2 ⁻ cis9, cis11	1.33 ab	1.50 a	0.92 b	0.15	0.03
总共轭亚油酸 Total CLA *	7.20 a	5.55 b	5.49 b	0.47	0.03
亚麻油酸 C ₁₈ 3 ⁻ cis9, cis12, cis15	1.12 a	0.85 b	0.003 c	0.05	<0.000 1
花生酸 C ₂₀ 0	7.04 a	2.77 b	3.36 b	0.54	<0.000 1

注: * Total CLA = C₁₈ 2⁻ cis9, trans11 + C₁₈ 2⁻ trans10, cis12 + C₁₈ 2⁻ trans9, trans11 + C₁₈ 2⁻ cis9, cis11。

($P = 0.56$)。trans10, cis12-CLA 的质量浓度在各组间差异显著 ($P < 0.05$), 其中, 微晶纤维素组的最高。对于培养液中总的 CLA 质量浓度 (4 种检测到的 CLA 质量浓度总和), 玉米秸细胞壁组显著高于 ($P < 0.05$) 另 2 个纤维组, 而甜菜渣细胞壁组和微晶纤维素组间没有显著差异 ($P = 0.93$)。以上结果表明, 不同类型的纤维可以影响瘤胃中脂肪酸的组成以及 CLA 的比例。

Cis9, trans11-CLA 是反刍动物乳脂和肉中 CLA 的主要异构体。在本试验的活体外瘤胃发酵液中, cis9, trans11-CLA 也是一种主要的 CLA 异构体, 占总 CLA 的比例分别为 74.7%、65.6% 和 72.1%。与其他 2 种纤维类型相比, 培养液中玉米秸细胞壁组的 cis9, trans11-CLA 和总 CLA 浓度最高。作为易消化纤维来源, 甜菜渣细胞壁和微晶纤维素对于活体外 CLA 的形成, 有类似的影响效果, 二者的 cis9, trans11-CLA 和总 CLA 质量浓度都没有显著差异。由此可以认为, 与易消化纤维相比, 木质化纤维发酵可以产生更多的 cis9, trans11-CLA。另外, Beaulieu 等^[10]报道, 高精料日粮中添加植物油, 可以增加 trans10, cis12-CLA 的产量。本试验中, 微晶纤维素组产生的 trans10, cis12-CLA 质量浓度最高, 显著高于另 2 组。分析原因可能是底物

的消化率高有利于 trans10, cis12-CLA 的产生。但究竟纤维中的哪些化学成分分别对不同 CLA 异构体的形成起主要作用? 这还需要未来的工作继续去研究。

3 结 论

不同类型的纤维 (木质化纤维、易消化纤维和纯纤维素) 供给相同水平的向日葵油 (占底物 DM 的 4.76%) 会影响活体外瘤胃发酵模式, 并影响 CLA 和其他脂肪酸的产生。与易消化纤维和纯纤维素相比, 木质化纤维显著地增加活体外瘤胃微生物对 cis9, trans11-CLA 的合成。进一步的研究需要找出影响 CLA 形成的主要纤维成分, 并且研究纤维成分影响瘤胃 CLA 产生的机制。

参 考 文 献

- [1] Corl B A, Baumgard L H, Dwyer D A, et al. The role of Δ^9 -desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA [J]. J Nutr Biochem, 2001, 12:622-630
- [2] Kelly M L, Berry J R, Dwyer D A, et al. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows [J]. J Nutr, 1998, 128:881-885

- [3] Latham M J, Storry J E, Sharpe M E. Effect of low-roughage diets on the microflora and lipid metabolism in the rumen[J]. Appl Microbiol, 1972, 24:871-877
- [4] Menke K H, Raab L, Salewski A, et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro[J]. J Agric Sci Camb, 1979, 93:217-222
- [5] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. J Biol Chem, 1957, 226:497-509
- [6] Kramer J K G, Zhou J Q. Analytical techniques for conjugated linoleic acid (CLA) analysis[J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2001, 103:594-632
- [7] Blümmel M, Steinga H, Becker K. The partitioning of *in vitro* fermentation products and its bearing for the prediction of voluntary feed intake[C]. Proceedings of the British Society for Nutrition and Physiology, 1994, 3:123
- [8] Kalscheur K F, Teter B B, Piperova L S, et al. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of *trans*-C_{18:1} fatty acids and milk fat production in dairy cows[J]. J Dairy Sci, 1997, 80:2104-2114
- [9] Dhiman T R, Anand G R, Satter L D, et al. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets [J]. J Dairy Sci, 1999, 82:2146-2156
- [10] Beaulieu A D, Drackley J K, Merchen N R. Concentrations of conjugated linoleic acid (*cis*-9, *trans*-11 octadecadienoic acid) are not increased in tissue lipids of cattle fed a high concentrate diet supplemented with soybean oil [J]. J Anim Sci, 2002, 80:847-861

科研简讯

“高活菌无抗生素饲养用饲料呼吸膜固态发酵新技术研究”通过专家鉴定

2006年8月25日,由我校动物科技学院李德发教授、陆文清博士等主持完成的“高活菌无抗生素饲养用饲料呼吸膜固态发酵新技术研究”成果通过了专家鉴定。该项成果立足于现代食品安全的需求,研制出一套利用微生物发酵生产饲料的新方法,其中多项技术具有独创性,形成了利用高活菌生产无抗生素饲养用饲料的技术和饲养技术体系。该项成果研制出的利用高活性微生物生产优质饲料的新方法可广泛利用轻工副产品和农副产品,生产技术实用、投资少、产品附加值高、保质期长,符合我国国情,适合在我国推广应用。经北京和河北等地5家大型养殖场的生猪中试饲养试验证明,在不增加饲养成本的条件下,在生猪配合饲料中添加15%~30%的微生物发酵饲料就可以实现生猪从15kg至出栏的全程无抗生素饲养,猪肉的品质达到欧盟安全肉要求。该项成果为提高我国肉类产品的国际竞争力、保障人民群众食品安全,带动养殖业及相关产业发展等方面都有着十分重要的意义。

“化学杂交剂BAU-9403的研究与开发”通过专家鉴定

2006年8月26日,教育部组织有关专家对我校主持的国家“十五”科技攻关项目“化学杂交剂BAU-9403的研究与开发”进行了成果鉴定。我校于20世纪80年代中期由陈万义教授和黄铁城教授提出化学杂交剂的研究课题,并组建跨学科(化学与育种)的研究小组,从事化学杂交剂的仿制和应用研究。90年代初,在陈万义教授、王道全教授、张爱民教授的主持下,在国家“八五”科技攻关专题基金的资助下,开展了新化合物的合成和诱导小麦雄性不育活性的筛选研究,并于1994年发现具有优良的诱导小麦雄性不育的“化学杂交剂BAU-9403”。其后,对其合成路线进行了细微的研究,使之适应工业化生产,并在全国数个省市开展了应用技术研究。于2000年和2003年与河北新兴化工有限责任公司合作,分别在国家“九五”和“十五”科技攻关专题的资助下,先后完成了BAU-9403中试生产研究及其70t/年规模的产业化开发。其中BAU-9403及其中间体吡喃酮的合成方法,分别获得国家发明专利。

(科学技术处供稿)