

利用体外产气法研究植物精油对瘤胃体外发酵 和甲烷生成的影响

金恩望^{1,2} 王加启^{1*} 卜登攀¹ 周凌云¹ 孙鹏¹ 姜雅慧¹ 包万华¹ 史浩亭^{1,2} 李发弟²

(1. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所/动物营养学国家重点实验室,北京 100193;

2. 甘肃农业大学 动物科学技术学院,兰州 730070)

摘要 为探讨植物精油对瘤胃体外发酵的影响,采用体外产气法分析不同添加水平的茶树油、肉桂油和丁香油对瘤胃发酵模式、发酵产气量及动力学参数和瘤胃氮代谢的影响。与对照组相比结果表明:1)添加各剂量的茶树油和肉桂油对微生物蛋白(MCP)含量无显著影响,但氨氮(NH₃-N)浓度均有降低趋势,其中添加300和1500 mg/L肉桂油显著降低了NH₃-N浓度($P < 0.05$)。2)添加1000 mg/L的茶树油或1500 mg/L的肉桂油显著降低了总挥发性脂肪酸(TVFA)和丙酸浓度($P < 0.05$),而50和100 mg/L茶树油处理组丁酸浓度显著升高($P < 0.05$),300和500 mg/L的肉桂油处理组支链脂肪酸浓度显著升高($P < 0.05$)。3)添加100 mg/L的茶树油和丁香油均可显著提高理论最大发酵产气量(b),并且所有植物精油添加组甲烷(CH₄)体积分数均有降低。添加100 mg/L的茶树油或100和300 mg/L的肉桂油有助于改善瘤胃微生物发酵。

关键词 植物精油; 体外产气法; 瘤胃体外发酵; CH₄

中图分类号 S 823; S 816.7

文章编号 1007-4333(2013)03-0120-08

文献标志码 A

Effects of essential oil on rumen fermentation and methanogenesis *in vitro* gas production

JIN En-wang^{1,2}, WANG Jia-qi^{1*}, BU Deng-pan¹, ZHOU Ling-yun¹, SUN Peng¹,
JIANG Ya-hui¹, BAO Wan-hua¹, SHI Hao-ting^{1,2}, LI Fa-di²

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition/Institute of Animal Science,
Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science and Technology Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract An *in vitro* cumulative gas production trial was conducted to study the effects of tea tree oil, cinnamon oil, and clove bud oil on subsequent 72 h rumen fermentation and methanogenesis at different dose. The results showed that, 1) there were no effect on the production of microbial crude protein, but the concentration of ammonia N were decreased with added tea tree oil and cinnamon oil, especially when the cinnamon oil at the dose of 300 or 1500 mg/L ($P < 0.05$). 2) the production of total volatile fatty acid (TVFA) and concentration of propionic acid were decreased by adding 1000 mg/L tea tree oil or 1500 mg/L cinnamon oil. At dose of 50 and 100 mg/L, the tea tree oil increased the concentration of butyrate acid. The production of iso-butyrate and iso-valerate acid were increasing with 300 and 500 mg/L cinnamon oil. 3) At 100 mg/L, tea tree oil and clove bud oil were significant different on the theory maximum gas production compared with the control groups. All treatments tended to decrease the methane concentration ($P < 0.05$). In general, the tea tree oil at the level of 100 mg/L and cinnamon oil at the 100 and 300 mg/L may be allowed to manipulation of rumen microbial fermentation.

Key words essential oil; *in vitro* gas production; rumen fermentation *in vitro*; methane

收稿日期: 2012-09-10

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划课题(2012BAD12B02-5); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(XDA01010301)

第一作者: 金恩望, 硕士研究生, E-mail: jinenwang3515@126.com

通讯作者: 王加启, 研究员, 博士生导师, 主要从事反刍动物营养与牛奶质量改良研究, E-mail: wang-jia-qi@263.net

反刍动物摄入饲料总能的 8%~12% 是通过 CH₄ 形式损失^[1], 奶牛 75%~85% 的氮损失是以粪和尿形式排出^[2], 所以瘤胃发酵过程伴随着能量的损失并加重温室效应。一些研究致力于调控瘤胃中微生物菌群的组成, 以提高瘤胃中能量和蛋白质的利用效率^[3]。抗生素离子载体等已经成功地用于降低瘤胃中能量和蛋白质的损失。由于抗生素在乳和肉中残留及其对人类健康影响的风险, 公众越来越重视抗生素等促生长剂在畜禽生产中使用^[4]。因此, 开发天然的瘤胃调控剂对提高反刍动物生产性能和保护环境均有重大意义。

植物精油是从植物中萃取的芳香物质, 是植物的次生代谢产物。植物精油主要由较强抗菌活性的亲脂化合物组成^[5], 能有效抑制瘤胃中的某些有害菌的生长发育^[6]。一些植物精油能通过减少瘤胃中蛋白质的降解和氨的产生来调控瘤胃氮代谢。Jahani-Azizabadi 等用批次培养法研究了植物精油对瘤胃发酵特性的影响^[7], 表明添加 20 μL/L 发酵液的茴茴油、牛至油和肉桂油等能显著降低 NH₃-N 浓度和 CH₄ 产量。另据 Chion 等报道^[8], 饲料中添加植物精油能为乳产品中提供额外的营养价值, 从而提高乳产品的感官和营养特性。植物精油的种类繁多, 不同研究者研究植物精油对瘤胃发酵和 CH₄ 生成的结果不同, 且各种植物精油不同添加剂量的

作用效果没有统一的定论。本试验用体外产气法研究 3 种植物精油的不同添加水平对瘤胃体外发酵的影响, 筛选出有利于瘤胃发酵或抑制 CH₄ 生成的植物精油种类和添加水平, 旨在为丰富和发展反刍动物瘤胃调控、开发天然的瘤胃调控剂提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 供体动物及瘤胃液的采集

在中国农业科学院北京畜牧兽医研究所昌平动物试验基地选取 3 头重(558±10)kg, 泌乳日龄为(136±37)d, 头胎、健康且装有永久性瘤胃瘘管和十二指肠瘘管的荷斯坦奶牛作为瘤胃液供体牛。奶牛每天饲喂 2 次(7:00 和 19:00), 自由饮水。于晨饲前 1 h 通过瘤胃瘘管采集瘤胃内容物, 混合后装于保温瓶迅速带回实验室, 用 4 层纱布过滤(过滤同时通入 CO₂), 整个操作于 39 °C 水浴中进行, 操作应在尽量短的时间内完成。

1.2 植物精油和饲料样品制备

肉桂油(含肉桂醛 85%)和丁香油(含丁子香酚 85%)购于吉安市海瑞天然植物有限公司, 茶树油购于广州市美然化妆品厂。发酵所用饲料与供体动物所饲喂的饲料一致, 饲料原料粉碎并过 2 mm 筛, 按配方制成颗粒料, 风干后备用。饲料组成及营养成分见表 1。

表 1 日粮组成和营养水平(干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of dietary(DM basis)

日粮组成 Composition	质量分数/% Mass fraction	营养水平 ^② Nutrient levels	含量 Content
羊草 Chinese wildrye	3.7	w(DM)/%	55.78
苜蓿干草 Alfalfa hay	28.4	w(CP)/%	16.67
全株玉米青贮 Corn silage	26.7	w(EE)/%	2.24
玉米 Corn	22.6	w(NDF)/%	44.18
豆粕 Soybean meal	11.8	w(ADF)/%	26.06
全棉籽 Cottonseed fuzzy	5.1	w(ASH)/%	7.74
磷酸氢钙 CaHPO ₄	0.6	w(Ca)/%	0.82
食盐 NaCl	0.5	w(P)/%	0.31
预混料 ^① Premix	0.6	NE _L /(MJ/kg)	4.07
合计 Total	100.0		

注:①每 kg 预混料(DM)含有 VA 2 000 000 IU、VD 600 000 IU、VE 10 800 mg、Fe 5 500 mg、Cu 4 080 mg、Mn 4 989 mg、Zn 17 500 mg、I 180 mg、Se 110 mg 和 Co 8 805 mg。②NE_L 为计算值, 其他为实测值。

Note:① One kilogram of premix(DM) contained the following VA 2 000 000 IU、VD 600 000 IU、VE 10 800 mg、Fe 5 500 mg、Cu 4 080 mg、Mn 4 989 mg、Zn 17 500 mg、I 180 mg、Se 110 mg 和 Co 8 805 mg。② NE_L was a measured value, and the others were calculated values.

1.3 体外发酵

体外发酵装置采用中国农业大学研制的“AGRS-Ⅲ型64通路微生物发酵微量产气全自动记录装置与软件系统^[9]”。准确称取约0.5 g饲料样品于150 mL厌氧发酵瓶中,每个瓶中分别加入相应种类和量的植物精油。接种时迅速将每个瓶中加入预热的液体培养基50 mL和经4层纱布过滤的新鲜瘤胃液25 mL,液体培养基采用文献^[10]的方法配制,并向瓶中持续通入CO₂ 5 s后,立即加上瓶塞,并将每个发酵瓶与产气装置的每个传感器相连接,于39 ℃下连续培养72 h。同时接种一批相同处理和重复的体系,用采气袋与每个发酵瓶连接,收集发酵产生的气体用于CH₄成分的测定。

1.4 试验设计

采用完全随机设计,3种植物精油的4个添加水平随机分为12个组,同时设不添加植物精油为空白对照组,每组5个重复。茶树油和丁香油的50、100、300和1 000 mg/L以及肉桂油的100、300、500和1 500 mg/L发酵液的添加水平分别表示为Tea₅₀、Tea₁₀₀、Tea₃₀₀、Tea_{1 000}、Clo₅₀、Clo₁₀₀、Clo₃₀₀、Clo_{1 000}及Cin₁₀₀、Cin₃₀₀、Cin₅₀₀和Cin_{1 500}。

1.5 样品采集及制备

发酵72 h后结束发酵程序,从发酵瓶中采集发酵液。按与发酵液相应的比例添加25%的偏磷酸溶液,混匀后于-20 ℃冷冻保存,用于挥发性脂肪酸(VFA)和NH₃-N指标的测定。对剩余的发酵液进行150g离心15 min,采集2管8 mL上清液用于微生物蛋白(MCP)的测定。液体采集后充分混匀发酵液的固相和液相,经4 000g离心10 min,弃上清,收集全部的发酵液固体,用于体外干物质降解率(IVDMD)的测定。

1.6 样本分析及计算

1.6.1 发酵液固、液相指标的分析

发酵结束后立即用pH计(Sartorius, PB-10)测定发酵液的pH。瘤胃液中NH₃-N浓度利用靛酚比色法^[11]测定。VFA浓度利用气相色谱(Agilent 6890N GC system, Agilent, America)以外标法测定。发酵液MCP的测定通过差速离心法提取MCP,再用全自动凯氏定氮仪(FOSS KieldAHL2003)测定含氮量。干物质(DM)测定参照GB6435-86,根据发酵前后的DM质量关系计算体外干物质降解率。

1.6.2 发酵气体指标的测定及产气动力学模型分析

通过AGRS-Ⅲ型64通路微生物发酵微量产气全自动记录装置与软件系统时时记录产气量。气体中CH₄含量利用气相色谱(Agilent 6890N GC system, Agilent, America)测定。

参照指数模型对不同日粮累积产气量数据进行非线性拟合^[12]。

$$GP_t = a + b \times (1 - e^{-c})$$

式中:GP_t为t时间点记录到的累积产气量,mL/g(DM);a为发酵初始时间点的产气量,设定为0,b为饲料体外发酵的最大产气量理论值,mL/g(DM);c为饲料体外发酵动态产气速率,h⁻¹。

1.7 统计分析

对数据使用Excel 2007进行初步整理后,采用SAS 9.0软件中的MIXED模型进行统计分析,显著水平为P<0.05,并采用Tukey方法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 植物精油添加水平对瘤胃微生物发酵参数的影响

从表2可以看出,添加Tea_{1 000}处理组发酵液pH显著升高(P<0.01),其余处理组pH均有升高的趋势。添加植物精油的所有处理组中,除Clo₅₀和Clo₁₀₀组之外的处理组NH₃-N浓度均有降低趋势,其中Cin₃₀₀和Cin_{1 500}组NH₃-N浓度降低显著(P<0.01)。添加Clo₁₀₀降低了MCP含量(P<0.05),其余处理组对MCP含量均未产生显著影响。添加最高剂量的茶树油、丁香油和肉桂油均显著降低了IVDMD(P<0.01)。

2.2 植物精油添加水平对VFA浓度的影响

由表3可知,添加不同水平的茶树油和肉桂油对发酵液中VFA浓度均有影响,而丁香油对各种VFA浓度均未产生显著影响。与对照组相比,添加Tea₅₀和Tea₁₀₀均使丁酸浓度升高了12.2%(P<0.05),并有提高TVFA、乙酸、丙酸和支链脂肪酸浓度的趋势(P>0.05),而添加Tea_{1 000}却降低了TVFA和丙酸浓度(P<0.01)。添加Cin₁₀₀有提高TVFA、乙酸、丙酸、丁酸和戊酸浓度的趋势,而添加Cin_{1 500}却显著降低了各VFA浓度(P<0.05)。Cin₅₀₀处理组丙酸和丁酸浓度显著降低(P<0.01),而Cin₃₀₀和Cin₅₀₀处理组支链脂肪酸浓度显著升高

($P < 0.01$)。添加不同浓度植物精油对乙酸/丙酸 (A : P) 值均有不同程度的影响, 其中 Tea₅₀、Tea₁₀₀₀、

Cin₅₀₀、Cin₁₅₀₀、Clo₅₀、Clo₁₀₀ 和 Clo₁₀₀₀ 组 A : P 值均显著升高 ($P < 0.05$)。

表 2 植物精油添加水平对瘤胃微生物发酵参数的影响

Table 2 Rumen microbial fermentation parameters affected by essential oil addition level

添加物 Additive	添加量/(mg/L) Dose	pH	NH ₃ -N/ (mg/dL)	MCP(N)/ (mg/mL)	ω(IVDMD)/ %
茶树油 Tea tree oil	0	6.87 b	61.2	0.173	59.8 a
	50	6.90 b	58.2	0.170	59.3 a
	100	6.88 b	58.0	0.158	60.9 a
	300	6.87 b	60.7	0.168	61.1 a
	1 000	6.97 a	57.3	0.158	41.8 b
	SEM	0.010	0.100	0.004	0.020
	<i>P</i>	<0.01	0.74	0.64	<0.01
肉桂油 Cinnamon oil	0	6.87	61.2 a	0.173	59.8 a
	100	6.93	60.1 a	0.171	62.4 a
	300	6.90	54.9 b	0.188	54.6 a
	500	6.93	57.9 ab	0.156	59.9 a
	1 500	7.00	46.0 c	0.133	26.7 b
	SEM	0.022	1.470	0.009	0.030
	<i>P</i>	0.05	<0.01	0.38	<0.01
丁香油 Clove oil	0	6.87	61.2	0.173 a	59.8 a
	50	6.91	61.2	0.173 a	64.3 a
	100	6.88	61.9	0.150 b	64.4 a
	300	6.90	59.4	0.164 ab	65.0 a
	1 000	6.90	58.5	0.153 ab	46.3 b
	SEM	0.010	0.750	0.003	0.020
	<i>P</i>	0.83	0.57	0.05	0.03

注: 同列不同字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$), 相同或无字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下表同。

Note: In the same column, 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 in following table.

表 3 植物精油添加水平对挥发性脂肪酸的影响

Table 3 Volatile fatty acid affected by essential oil addition level

添加物 Additive	添加量/ (mg/L) Dose	<i>c</i> (挥发性脂肪酸)/(mmol/L)					支链脂肪酸 Branched chain fatty acid	乙酸/丙酸 A : P
		总挥发性脂肪酸 TVFA	乙酸 Acetate	丙酸 Propionate	丁酸 Butyrate	戊酸 Valerate		
茶树油 Tea tree oil	0	61.9 a	41.2 ab	13.4 a	0.43 b	2.13	4.65	3.06 c
	50	68.4 a	46.1 a	14.2 a	0.49 a	2.38	5.25	3.26 b
	100	68.2 a	45.6 a	14.5 a	0.49 a	2.39	5.25	3.15 bc
	300	63.7 a	42.7 a	13.5 a	0.44 ab	2.17	4.95	3.18 bc
	1 000	54.8 b	36.6 b	10.2 b	0.43 b	2.16	5.41	3.62 a
	SEM	1.440	0.980	0.400	0.009	0.045	0.098	0.046
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	0.03	0.17	0.18	<0.01	

续表

添加物 Additive	添加量/ (mg/L) Dose	c (挥发性脂肪酸)/(mmol/L)					支链脂肪酸 Branched chain fatty acid	乙酸/丙酸 A:P
		总挥发性脂肪酸 TVFA	乙酸 Acetate	丙酸 Propionate	丁酸 Butyrate	戊酸 Valerate		
肉桂油 Cinnamon oil	0	61.9 ab	41.2 ab	13.4 a	0.43 ab	2.13 ab	4.65 b	3.06 c
	100	66.2 a	44.1 a	14.2 a	0.47 a	2.31 a	5.06 ab	3.10 bc
	300	60.5 ab	39.9 ab	12.5 ab	0.39 bc	1.97 b	5.72 a	3.20 bc
	500	55.1 b	36.2 b	10.9 b	0.37 c	1.91 b	5.78 a	3.34 b
	1 500	30.7 c	22.1 c	5.5 c	0.16 d	0.69 c	2.27 c	4.03 a
	SEM	2.970	1.840	0.720	0.025	0.131	0.304	0.083
	P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
丁香油 Clove oil	0	61.9	41.2	13.4	0.43	2.13	4.65	3.06 b
	50	66.0	44.2	13.9	0.47	2.35	5.08	3.18 a
	100	65.9	44.3	13.8	0.47	2.31	5.05	3.20 a
	300	62.5	41.7	13.4	0.44	2.15	4.80	3.12 ab
	1 000	57.5	38.6	12.0	0.39	1.91	4.56	3.21 a
	SEM	1.370	0.920	0.290	0.011	0.057	0.104	0.017
	P	0.22	0.22	0.20	0.06	0.06	0.42	0.03

2.3 植物精油添加水平对瘤胃发酵产气参数的影响

从表4可以看出, Tea₁₀₀和 Clo₁₀₀处理组升高了 b 值 ($P < 0.01$) 和 72 h 累积产气量 (GP_{72}) ($P > 0.05$), 3种植物精油的最高添加剂量组和 Cin₅₀₀组 GP_{72} 显著降低 ($P < 0.05$), 其余处理则对 GP_{72} 无显著影响。添加 Cin₁₅₀₀ 和茶树油、丁香油的所有水平均显著升高了产气速率 (c) 值 ($P < 0.01$), 而添加 Cin₃₀₀ 和 Cin₅₀₀ 则显著降低了 c 值 ($P < 0.05$)。

所有处理组较对照组相比均趋于降低 CH₄ 体

积分数, 其中高剂量组 (Tea₁₀₀₀、Cin₅₀₀、Cin₁₅₀₀ 和 Clo₁₀₀₀) CH₄ 体积分数显著降低 ($P < 0.05$)。3种植物精油降低 CH₄ 的程度均随着添加水平的增加而增大, 说明这 3种植物精油在降低 CH₄ 产量方面均存在剂量效应。3种植物精油相比较而言, 添加肉桂油降低 CH₄ 体积分数幅度最大, 其次是茶树油。与对照组相比, 茶树油和肉桂油的 4 种添加剂量使 CH₄ 体积分数分别降低 4.7%、11.8%、23.1%、47.6% 和 26.9%、26.8%、51.7% 和 67.8%。

表4 植物精油添加水平对瘤胃发酵产气参数的影响

Table 4 *In vitro* gas production parameters affected by essential oil addition level

添加物 Additive	添加量/(mg/L) Dose	GP_{72} (DM)/ (mL/g)	产气量理论值(DM)/(mL/g) Gas production theoretical value	产气速率/h ⁻¹ Gas production rate	$\varphi(\text{CH}_4)/\%$
茶树油 Tea tree oil	0	147.1 a	151.6 b	0.078 e	19.4 a
	50	145.9 a	148.4 c	0.091 b	18.5 a
	100	151.4 a	157.4 a	0.085 d	17.1 a
	300	144.5 a	151.0 b	0.087 c	15.0 ab
	1 000	114.3 b	123.0 d	0.100 a	10.2 b
	SEM		3.910 0	0.240 0	0.000 2
P		0.01	<0.01	<0.01	<0.01

续表

添加物 Additive	添加量/(mg/L) Dose	GP ₇₂ (DM)/ (mL/g)	产气量理论值(DM)/(mL/g) Gas production theoretical value	产气速率/h ⁻¹ Gas production rate	φ(CH ₄)/%
肉桂油 Cinnamon oil	0	147.1 a	151.6 a	0.078 b	19.4 a
	100	143.8 a	133.8 b	0.078 b	14.2 ab
	300	130.0 ab	128.6 c	0.071 c	14.2 ab
	500	118.7 b	120.5 d	0.065 d	9.4 b
	1 500	53.5 c	54.1 e	0.113 a	6.3 b
	SEM	7.930 0	0.350 0	0.000 3	1.430 0
	<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	0.03
丁香油 Clove oil	0	147.1 a	151.6 b	0.078 e	19.4 a
	50	138.8 ab	144.9 d	0.087 b	19.0 a
	100	150.3 a	154.0 a	0.086 c	18.9 a
	300	133.5 ab	146.6 c	0.085 d	17.9 a
	1 000	123.9 b	137.8 e	0.093 a	11.6 b
	SEM	2.990 0	0.170 0	0.000 1	1.000 0
	<i>P</i>	0.02	<0.01	<0.01	0.05

3 讨论

3.1 不同植物精油及其添加水平对瘤胃微生物发酵参数的影响

pH 是一项反映瘤胃内环境稳态的指标,它受唾液分泌量、有机酸积累和日粮性质的影响。pH 过高或过低对瘤胃微生物的生长、发育和发酵均产生不利影响。本试验中只有 1 000 mg/L 茶树油添加组的发酵液 pH 显著升高,1 500 mg/L 肉桂油添加组发酵液 pH 呈升高趋势($P=0.054$),而且这两处理组均显著降低了 TVFA 浓度,可见茶树油和肉桂油对发酵液 pH 的影响主要是其导致了瘤胃中 VFA 产量的变化造成。

瘤胃中 NH₃-N 浓度是反映瘤胃氮代谢的重要指标,能间接反映瘤胃微生物分解饲料粗蛋白产生 NH₃-N 和利用 NH₃-N 合成微生物菌体蛋白的平衡情况^[13]。植物精油对瘤胃蛋白质代谢的影响一方面是影响氨基酸的降解程度,另一方面是抑制高活性氨基酸发酵菌活力^[14]。本试验中茶树油和肉桂油的所有添加水平均不同程度地降低 NH₃-N 浓度,可能是因为日粮蛋白降解受抑制或微生物蛋白合成量增加。然而,本试验中添加所有水平的茶树油和肉桂油均未对 MCP 产生显著影响,从而说明

了添加茶树油和肉桂油降低了日粮中蛋白的降解。肉桂醛是肉桂油的主要成分,其能降低影响脱氨基作用的普雷沃菌属的数量^[15],这进一步说明了肉桂油对 NH₃-N 浓度的影响主要与肉桂醛降低了脱氨基作用有关。

Fraser 等通过体外发酵试验表明^[16],添加 500 mg/L 的肉桂油能够显著降低 NH₃-N 的浓度,而本试验中添加同样剂量的肉桂油对 NH₃-N 浓度却未产生显著影响,这种结果的不同可能是由于发酵体系、日粮和 pH 等的不同造成。植物精油对 VFA 和氮代谢的影响随着植物精油的添加剂量、化学成分和其主要成分的化学结构的不同而不同^[17]。据 Busquet 等研究报道^[18],添加高质量浓度肉桂油(3 000 mg/L)使 NH₃-N 浓度显著降低,其他剂量组(3、30 和 300 mg/L)对 NH₃-N 浓度则没有显著影响,这与本试验结果基本一致,说明肉桂油对瘤胃氮代谢的影响有剂量效应。

体外干物质降解率(IVDMD)体现了饲料在发酵体系中被微生物的降解程度。本试验中只有 3 种植物精油的最高剂量显著降低了 IVDMD。Castillejos 等报道^[19],体外发酵试验中添加 5、50 和 500 mg/L 的丁香酚均未显著影响体外干物质降解率。这些结果可以说明 3 种植物精油的添加剂量

达到 1 000 mg/L 时能抑制饲料底物在瘤胃内的降解,而当添加剂量低于 1 000 mg/L 时对体外干物质降解率不产生显著影响,更具体的有效剂量范围有待于进一步的筛选。

3.2 不同植物精油及其添加水平对 VFA 浓度的影响

VFA 是反刍动物的主要能量来源,一般认为植物精油对微生物的抑制作用及其对细胞内酶的间接作用,经一定作用时间后会影响到瘤胃中 VFA 的浓度和比例。植物精油对乙酸、丙酸和丁酸摩尔浓度及比例的影响,因剂量和有效成分的不同而有所区别,也与 pH 具有很高相关性^[20]。添加最高剂量茶树油和肉桂油能显著降低 TVFA 和丙酸浓度,而低浓度添加对 TVFA 和丙酸浓度无显著影响。Busquet 等报道^[2],在体外批次瘤胃发酵试验中添加 3 和 30 mg/L 肉桂油、丁香油和茶树油对 TVFA 影响均不显著,当剂量达到 3 000 mg/L 时 3 种植物精油均显著降低了 TVFA。这些结果共同说明了茶树油和肉桂油对 VFA 的影响也存在剂量效应。

肉桂油的最高添加剂量显著降低了 TVFA 和支链脂肪酸浓度,添加剂量为 300 mg/L 时支链脂肪酸浓度却显著升高,乙酸、丙酸和 TVFA 浓度无显著变化,Chaves 等报道^[17],体外发酵试验中添加 250 mg/L 的肉桂油对 TVFA 和乙酸浓度无显著影响,却显著升高了丁酸浓度。这进一步表明了肉桂油的添加剂量不大于 300 mg/L 时对瘤胃体外发酵产酸无不利影响或趋向有利于瘤胃发酵产酸,当肉桂油的添加剂量大于 300 mg/L 时会降低 TVFA 浓度。

影响 VFA 浓度及比例的因素很多。一方面是发酵底物结构,如纤维素和半纤维素发酵产生的乙酸比例较高,而淀粉等易发酵的碳水化合物发酵产生的丙酸比例较高^[21]。另一方面是各种微生物的发酵活性。本试验中发酵底物是相同的,所以茶树油和肉桂油对 VFA 浓度及比例不同程度的影响是由于改变了微生物活动或微生物酶活性造成的。而丁香油对各种 VFA 浓度均未产生显著影响,但显著提高了 A:P 值,说明丁香油对瘤胃微生物发酵的影响主要是使发酵模式倾向于乙酸型。

3.3 不同植物精油及其添加水平对瘤胃发酵产气参数的影响

瘤胃发酵的终产物是发酵酸和气体等,体外产气量可以反映出饲料在反刍动物瘤胃中的降解特性和微生物的降解活性^[22]。3 种植物精油的最高添加

剂量均显著降低了体外干物质降解率、GP₇₂ 和 *b* 值,而 100 mg/L 茶树油和丁香油的添加却升高了体外干物质降解率、GP₇₂ 和 *b* 值,说明这 3 种植物精油对瘤胃发酵产气性能的影响与剂量成正相关,同时也进一步证明了体外培养时的产气量与饲料降解率的正相关性,这一结论与 Menke 等的报道一致^[23]。

在本试验条件下,肉桂油降低 CH₄ 体积分数的程度与添加剂量成正相关,4 种添加剂量降低 CH₄ 体积分数的 26.9%~67.8%。Macheboeuf 等通过体外发酵试验表明^[24],添加 500 mg/L 的肉桂油降低 CH₄ 产量的 26%。另据 Jahani-Azizabadi 等报道^[7],批次培养试验中添加 1 000 mg/L 的肉桂油可降低 CH₄ 产量的 36.4%。植物精油能直接抑制产 CH₄ 菌活性或通过改变原虫群落从而减少产 CH₄ 菌数量^[25],茶树油的抗菌机制是破坏细胞膜结构的渗透系统,并且伴随着化学渗透^[26],肉桂醛的抗菌机制是通过其羰基与微生物酶结合使其失去活性^[27],而丁香酚的抗菌机制是通过抑制细胞糖分解酶的活性,导致微生物不能利用细胞内的葡萄糖^[28]。Chaves 等通过体外发酵试验表明^[17],添加 250 mg/L 的肉桂油显著降低了瘤胃产 CH₄ 菌活性,并且降低 CH₄ 体积分数的 70.9%,该报道进一步验证了肉桂油降低 CH₄ 产量是通过直接抑制瘤胃产 CH₄ 菌活性。同时本试验研究得出,丁香油的 4 种添加剂量分别降低 CH₄ 体积分数的 2.1%、2.6%、7.7% 和 40.2%。与本研究结果类似,Patra 等报道^[29],体外批次发酵试验中添加 1 650 mg/L 发酵液的乙醇提取的丁香油能降低 CH₄ 产量的 83%。

4 结论

3 种精油最高剂量的添加能抑制 CH₄ 生成并降低 NH₃-N 浓度,具有较高调控瘤胃发酵的能力,但同时也降低了乙酸和丙酸浓度,这 2 种脂肪酸分别是脂肪和葡萄糖合成的主要前体物,因此,从营养学角度讲对奶牛生产和泌乳性能不利。非最高剂量丁香油的添加对 CH₄ 产量、VFA 和 NH₃-N 浓度均未产生显著影响,故对瘤胃发酵无调节作用。综合分析,添加中等剂量的茶树油(100 mg/L)和肉桂油(100~300 mg/L)能不同程度地提高 TVFA 和支链脂肪酸浓度、降低 CH₄ 产量和 NH₃-N 浓度,同时对体外干物质降解率和 MCP 合成无负面影响,有

助于改善瘤胃微生物发酵。因此茶树油和肉桂油具有开发为天然瘤胃调控剂的潜力,其对瘤胃微生物区系和产 CH_4 菌的影响及作用机制有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Boadi D, Benchaar C, Chiquette J, et al. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review[J]. Can J Anim Sci, 2004, 84: 319-333
- [2] Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, et al. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation[J]. J Dairy Sci, 2006, 89: 761-771
- [3] Tekippe J A, Hristov A N, Hristov K S, et al. Effects of plants and essential oils on ruminal *in vitro* batch culture methane production and fermentation[J]. Can J Anim Sci, 2012, 92: 395-408
- [4] Sallam S M A, Bueno I C S, Brigide P, et al. Investigation of potential new opportunities for plant extracts on rumen microbial fermentation *in vitro* [J]. Nutritional Foraging Ecology Sheep Goats, 2009, 85: 255-260
- [5] Bodas R, Prieto N, García-González R, et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites[J]. Anim Feed Sci Technol, 2012, 176: 78-93
- [6] Patra A K. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production[J]. Asian J Anim Vet Adv, 2011, 6: 416-428
- [7] Jahani-Azizabadi H, Mesgaran M D, Vakili A R, et al. Effect of various medicinal plant essential oils obtained from semi-arid climate on rumen fermentation characteristics of a high forage diet using *in vitro* batch culture[J]. Afr J Microbiol Res, 2011, 5(27): 4812-4819
- [8] Chion A R, Tabacco E, Giaccone D, et al. Variation of fatty acid and terpene profiles in mountain milk and "Tomapiemontese" cheese as affected by diet composition in different seasons[J]. Food Chem, 2010, 121: 393-399
- [9] 沈英, 宋正河, 杨红建, 等. 基于虚拟仪器技术的饲料体外发酵产气自动记录系统的研制[J]. 农业工程学报, 2006, 22(12): 159-163
- [10] Menke K H, Steingass H. Estimation of energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid[J]. Anim Feed Sci Technol, 1988, 28: 91-97
- [11] Broderick G A, Kang J H. Automated simultaneous determination of ammonia and amino acid[J]. J Dairy Sci, 1980, 32: 794-798
- [12] 杨红建, 黎大洪, 谢春元. 阿魏酸酯酶处理对羊草、玉米秸、稻秸及麦秸瘤胃体外发酵特性的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(1): 207-211
- [13] 王加启. 反刍动物营养学研究方法[M]. 北京: 现代教育出版社, 2011
- [14] McIntosh F M, Williams P, Losa R, et al. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 5011-5014
- [15] Ferme D, Calsamiglia S, Busquet M, et al. Structure changes in bacterial populations from the phylum *Bacteroidetes* upon the inclusion of monensin, cinnamaldehyde or garlic extract in a dual flow continuous culture system[J]. Proc Br Soc Anim Sci, 2004, 5
- [16] Fraser G R, Chaves A V, Wang Y, et al. Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems[J]. J Dairy Sci, 2007, 90(5): 2315-2328
- [17] Chaves A V, He M L, Yang W Z, et al. Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria[J]. Can J Anim Sci, 2008, 88: 117-122
- [18] Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, et al. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation[J]. J Dairy Sci, 2006, 89(2): 761-771
- [19] Castillejos L, Calsamiglia S, Ferret A. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow *in vitro* systems[J]. J Dairy Sci, 2006, 89: 2649-2658
- [20] 张骞, 赵国琦, 李文艳, 等. 香精油在反刍动物生产中的应用 [J]. 中国饲料, 2009(10): 27-30
- [21] 冯仰廉. 反刍动物营养学[M]. 北京: 科学出版社, 2004
- [22] 刘丽英. 饲草型全混合日粮的评价及配方筛选[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011
- [23] Menke K H, Raab L, Salewski A, et al. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with lumen liquor[J]. J Agric Sci, 1979, 93: 217-222
- [24] Macheboeuf D, Morgavi D P, Papon Y, et al. Dose-response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population[J]. Anim Feed Sci Technol, 2008, 145: 335-350
- [25] Ohene-Adjei S, Chaves A V, McAllister T A, et al. Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation[J]. Microbial Ecol, 2008, 56: 234-242
- [26] Cox S D, Mann C M, Markham J L, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)[J]. J Appl Microbiol, 2000, 88: 170-175
- [27] Burt S. Essential oils their antibacterial properties and potential applications in foods; A review[J]. Int J Food Microbiol, 2004, 94: 223-253
- [28] Gill A O, Holley R A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 5750-5755
- [29] Patra A K, Kamra D N, Agarwal N. Effects of extracts of spices on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds *in vitro* [J]. J Sci Food Agric, 2010, 90: 511-520