

日粮与缓冲液 pH 对奶牛瘤胃液 CLA 含量的影响

薛秀恒^a, 王菊花^b, 王志耕^a, 梅 林^a

(安徽农业大学 a 茶与食品学院, b 动物科技学院, 安徽 合肥 230036)

[摘 要] 【目的】研究体外培养条件下日粮与缓冲液 pH 对奶牛瘤胃液共轭亚油酸(CLA)含量的影响,筛选能提高奶牛瘤胃 CLA 含量的最佳条件。【方法】选择日粮中粗料比例、精料中植物油种类及比例、棉粕质量分数与豆粕质量分数比值(以下简称棉粕与豆粕比例)、缓冲液 pH 值、硫酸铜作为影响因素,采用五因素二次正交旋转组合设计,对泌乳荷斯坦奶牛瘤胃液进行体外培养,测定奶牛瘤胃中 CLA 含量。【结果】各因素对 CLA 含量的影响作用从大到小依次为:pH 值平方项>粗料比例>植物油种类及其比例平方项(达 1%显著水平)>粗料比例与 pH 值交互项(达 2.5%显著水平)>棉粕与豆粕比例平方项>pH 值(达 5%显著水平)。在其他条件一定时,日粮中添加 5%葵花籽油、粗料比例为 70%、棉粕与豆粕质量分数分别为 14%与 11%、pH 值为 7.0 时,奶牛瘤胃液 CLA 的含量最高。【结论】日粮中粗料比例、植物油种类及其比例、缓冲液 pH 值、棉粕与豆粕比例是影响奶牛瘤胃液 CLA 含量的主要因素,筛选得到了提高奶牛瘤胃中 CLA 含量的最佳条件。

[关键词] 共轭亚油酸;体外培养;日粮;奶牛;瘤胃液

[中图分类号] S823.9⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)02-0075-05

Effect of different diets and buffer pH on conjugated linoleic acid content of rumen cultivate liquor

XUE Xiu-heng^a, WANG Ju-hua^b, WANG Zhi-geng^a, MEI Lin^a

(a College of Tea and Food, b College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: 【Objective】In this experiment the rumen liquor was collected and cultivated to study the effect of different diets on conjugated linoleic acid content of rumen cultivate liquor *in vitro* to select the best factors to increase the CLA content of rumen liquor. 【Method】The five factors quadratic rotary combination design was used and conjugated linoleic acid content of rumen cultivate liquor was detected. 【Result】Effect orders of various factors on CLA content are: the square terms of pH value>forage addition>the square terms of vegetable oil ($P<0.01$)>the interaction terms of forage addition and pH value ($P<0.025$)>the square terms of nitrogen ratio>pH value ($P<0.05$). The proportion of rumen cultivate liquor conjugated linoleic acid was greatest with 5% sunflower oil diet, 70% forage, 11% soybean meal and 14% cottonseed meal in diets with pH 7.0. 【Conclusion】The main factors to enhance CLA content of cultivate liquor were percentage of forage, percentage of soybean meal and cottonseed meal, sunflower oil in diets and buffer pH. The best factors to increase the CLA content of rumen liquor was the supplementation with 5% sunflower oil, 70% forage, 11% soybean meal and 14% cottonseed meal in diets with pH 7.0.

Key words: conjugated linoleic acid; *vitro* culture; different diets; cow; rumen liquor

共轭亚油酸(Conjugated linoleic acid, CLA)是一系列含有共轭双键、在位置和空间构型上不同的

* [收稿日期] 2010-06-18

[基金项目] 科技部科技人员服务企业行动项目(2009GJC30016)

[作者简介] 薛秀恒(1971—),男,内蒙古乌兰察布人,讲师,博士,主要从事畜产品加工与食品安全研究。

[通信作者] 王志耕(1956—),男,安徽合肥人,教授,硕士生导师,主要从事畜产品加工研究。

十八碳二烯酸同分异构体的混合物,具有抗癌、抗动脉粥样硬化、降低胆固醇和增强机体免疫力等生理功能^[1-2]。牛乳是 CLA 的主要来源,奶牛可以通过瘤胃微生物对日粮中不饱和脂肪酸的不完全氢化作用及乳腺、肝脏的内源途径合成 CLA。但普通牛乳及其制品中的 CLA 含量较低,达不到其发挥功能所需的含量,因此如何提高牛奶中的 CLA 含量,使其达到对人体产生功能性作用的水平,是目前动物营养领域的研究重点之一。

反刍动物瘤胃中氢化细菌分泌的亚油酸异构酶能使日粮中的亚油酸转化为 CLA,如果日粮中亚油酸含量增加,瘤胃中的 CLA 含量也会增多,乳中 CLA 含量相应升高。因此,许多研究者通过在日粮中直接添加含亚油酸与亚麻油酸多的植物油(如豆油、亚麻油、菜籽油、向日葵油等)及饼粕类饲料来提高乳中的 CLA 含量^[3-5]。然而,由于奶牛瘤胃是一个极其复杂的微生物系统,不仅日粮中的亚油酸含量会影响 CLA 的合成,瘤胃发酵环境、瘤胃微生物体系、日粮纤维水平及各营养物质的比例等均对乳脂中的 CLA 含量有一定影响^[6-7]。因此,在奶牛日粮中添加富含亚油酸与亚麻油酸的植物油的同时,还应 对奶牛日粮纤维水平、饲料组成、瘤胃环境等因素进行调控,使反刍动物瘤胃中的亚油酸最大限度地转化为 CLA,从而达到提高牛奶 CLA 含量的目的。随着瘤胃发酵调控研究的日益全面、系统,瘤胃

微生物体内、体外调控技术逐渐成熟,利用体外培养法对瘤胃微生物进行综合调控,筛选瘤胃 CLA 合成的最佳条件成为一条有效的途径。为此,本试验通过对奶牛瘤胃微生物进行体外培养,对影响瘤胃 CLA 合成的日粮因素与缓冲液 pH 值进行调控,以期提高瘤胃 CLA 含量,为我国 CLA 功能乳的开发及其功能特性的理论研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

CLA,青岛澳海生物有限公司提供;混合精料与粗料,安徽六安市花园乳业集团小华山奶牛场提供;葵花籽油、大豆油与菜籽油,上海金龙鱼有限责任公司生产。

1.2 试验设计

采用旋转正交设计进行试验,筛选最佳日粮组合。试验采用五因素(1/2 实施)二次正交旋转组合设计,以培养液中 CLA 含量为目标函数,选择日粮中粗料比例(X_1)、精料中植物油种类及比例(X_2)、棉粕质量分数与豆粕质量分数比值(以下简称棉粕与豆粕比例, X_3)、缓冲液 pH 值(X_4)、硫酸铜(X_5)作为影响因素进行试验,每处理重复 3 次。以 1、2、3、4、5 分别代表植物油中添加 5%大豆油、2%大豆油+3%葵花籽油、5%葵花籽油、2%菜籽油+3%葵花籽油和 5%菜籽油,各因素水平编码见表 1。

表 1 试验各因素水平的编码

Table 1 Coding of factors chosen for trials

编码 Code	日粮粗料比例/% Forage level X_1	植物油 Vegetable oil X_2	棉粕与豆粕比例 Cottonseed meal : Soybean meal X_3	缓冲液 pH 值 pH value X_4	硫酸铜/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) CuSO_4 X_5
+2	70	5	18 : 7	8.0	50
+1	65	4	16 : 9	7.5	40
0	60	3	14 : 11	7.0	30
-1	55	2	12 : 13	6.5	20
-2	50	1	10 : 15	6.0	10

1.3 培养液的制备

培养底物由混合精料和粗料组成,其中粗料占日粮的比例为 50%~70%(表 1)。精料组成(质量分数)为:玉米 45%,豆粕与棉粕 25%,麸皮 8%,植物油 5%,棉籽 5%,酒精粉(DBES)6%,食盐 1%,添加剂预混料 1%,石粉 1%,磷酸氢钙 2%,小苏打 1%。粗料组成(质量分数)为:苜蓿干草 18%,青贮玉米 38%,酒糟 14%,苹果粕 5%,发酵山芋 25%。

参考文献[8]配制缓冲液,每 L 缓冲液中各种物质的含量为:NaHCO₃ 8.75 g,NH₄HCO₃ 1.00 g,Na₂HPO₄ 1.43 g,KH₂PO₄ 1.55 g,MgSO₄ · 7H₂O

0.15 g,Na₂S 0.52 g,CaCl₂ · 2H₂O 0.017 g,MnCl · 4H₂O 0.015 g,CoCl₃ · 6H₂O 0.002 g,FeCl₃ · 6H₂O 0.012 g。

选用泌乳期荷斯坦奶牛,用导管取瘤胃液备用。将预先配制好的缓冲液,反复充入 CO₂,直至 pH 值达到 6.0~8.0,并在 39 ℃水浴中预热约 30 min。取 2 g 培养底物、20 mL 瘤胃液和 40 mL 缓冲液于 100 mL 具塞的经过灭菌的塑料离心管中,摇匀,充入 CO₂ 约 1 min,然后置于 39 ℃水浴摇床上连续培养 24 h,用双层纱布滤去大块饲料残渣,取滤液(即培养液)备用。

1.4 培养液中 CLA 含量的测定

1.4.1 培养液脂肪的提取 将 10 mL 样品在 4 000 r/min 的条件下,离心 30 min,取上层沉淀于玻璃管中,加入 50 mL 正己烷和异丙醇的混合溶液($V(\text{正己烷}):V(\text{异丙醇})=2:3$),振摇 30 s,加入 6 mL 丙酮,缓慢混匀搅拌成乳浊液,然后再加入适量的无水 Na_2SO_4 ,振摇 30 s,2 000 r/min 离心 5 min,静置分层。取上层有机相,用无水 Na_2SO_4 干燥(每 10 mL 样品加入 1 g Na_2SO_4),用定量分析滤纸过滤后,在 40 ℃ 水浴上干燥 12 h。

1.4.2 样品甲酯化及 CLA 含量的测定^[9] 准确称取 1~2 g 样品进行甲酯化,然后放入 25 mL 容量瓶中,用正己烷定容,紫外分光光度计测定其吸光度,按照标准曲线计算 CLA 含量。

1.5 统计分析

采用 SAS(V6.12 版)统计软件对试验数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 日粮中各因素与奶牛瘤胃培养液中 CLA 含量回归模型的建立

将试验所得数据用 SAS 软件处理,建立瘤胃 CLA 含量与各因素之间的回归模型。通过显著性检验,剔除不显著项(X_5),对模型进行简化,得到如下模型: $Y=0.356+0.059X_1-0.023X_2+0.021X_4+0.011X_1X_4-0.038X_2^2-0.018X_3^2-0.067X_4^2$, $R^2=87.41\%$ 。

根据 t 检验,得到各因素对 CLA 含量影响作用

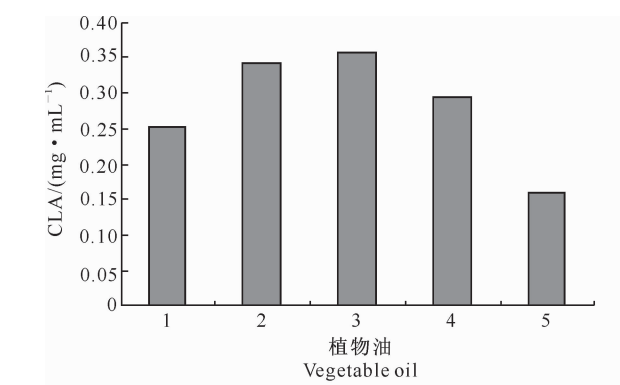


图 1 日粮中不同植物油对奶牛瘤胃培养液中 CLA 含量的影响

Fig.1 Effect of dietary vegetable oil on the conjugated linoleic acid content of rumen liquor *in vitro*

2.3 日粮中不同粗料比例对奶牛瘤胃培养液中 CLA 含量的影响

瘤胃内 CLA 的合成与日粮纤维含量有关,在满

的大小顺序为 pH 值平方项>粗料比例>植物油种类及其比例平方项(达 1% 显著水平)>粗料比例与 pH 值交互项(达 2.5% 显著水平)>棉粕与豆粕比例的平方项>pH 值(达 5% 显著水平)。由此可见,5 个因素中,除硫酸酮外,粗料比例、植物油种类及其比例、pH 值、棉粕与豆粕比例对奶牛瘤胃液中 CLA 含量的影响较大。

2.2 日粮中不同植物油对奶牛瘤胃培养液中 CLA 含量的影响

有研究表明,葵花籽油、大豆油中富含亚油酸(每 kg 总脂肪酸中分别含亚油酸 632,515 g),菜籽油富含油酸(每 kg 总脂肪酸中含油酸 560 g),葵花籽油与大豆油可增加合成 CLA 的底物,对瘤胃内 CLA 含量影响较大,而菜籽油对瘤胃内 CLA 含量影响较小^[10-11]。魏宏阳等^[12]研究表明,增加亚油酸的浓度,可使脂肪酸终产物反馈性地抑制异构酶的竞争性抑制作用,从而使反应的中间产物 trans-11C_{18:1} 与 CLA 的氢化率降低,增加了 CLA 在瘤胃内的积累,使乳中的 CLA 含量增加。所以,在日粮中添加富含亚油酸的油脂类饲料,调控亚油酸的氢化率,是提高 CLA 含量的主要措施。

本试验结果(图 1)表明,在其他条件相同的基础上,日粮中添加 5% 葵花籽油时,奶牛瘤胃液中的 CLA 含量最高,达到 0.36 mg/mL;添加 2% 大豆油+3% 葵花籽油次之,添加 5% 菜籽油最低;日粮中添加葵花籽油与大豆油和菜籽油的混合油时,其对瘤胃液 CLA 含量的提高效果较单纯添加大豆油、菜籽油好。说明日粮中添加葵花籽油有利于瘤胃液 CLA 的合成。

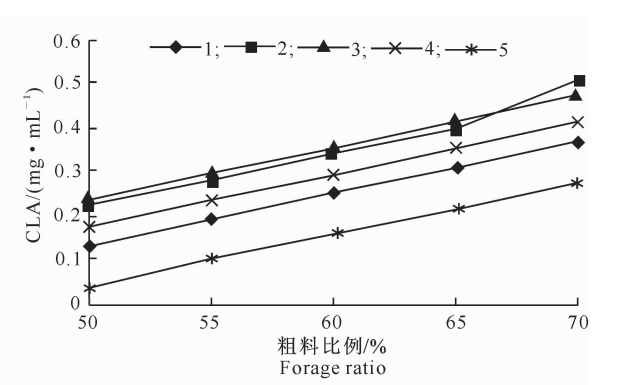


图 2 日粮中粗料比例对奶牛瘤胃培养液中 CLA 含量的影响

Fig.2 Effect of dietary forage percent on the conjugated linoleic acid content of rumen liquor *in vitro*

足奶牛营养需求的基础上,日粮纤维水平是维持正常的瘤胃发酵环境,提高产奶量、乳脂率及 trans-10C_{18:1} 含量的重要影响因素^[13-14]。日粮中亚油酸

在瘤胃微生物的作用下异构化为 c9、t11-CLA，而 c9、t11-CLA 又迅速转化为 trans-11C_{18:1}，其可再进一步氢化变成硬脂酸。随着日粮纤维水平的提高，瘤胃内 trans-11C_{18:1} 含量增加，反馈性地抑制 CLA 转化为 trans-11C_{18:1}，从而引起瘤胃中 CLA 的积累量增多。相反，当饲喂高精料低纤维日粮时，瘤胃中 trans-10C_{18:1} 异构体为主产物，代替了 trans-11C_{18:1}，潜在抑制 trans-11C_{18:1} 的产生比例，使得 CLA 合成的前体物——亚油酸含量减少，进而导致 CLA 在瘤胃的积累量减少。此外，随着日粮粗饲料的增加，瘤胃 pH 值提高，瘤胃微生物所产生的异构酶活性提高，日粮不饱和脂肪酸的异构化作用增强，使得 CLA 含量增加^[15-16]。

由图 2 可知，日粮中植物油的添加比例一定、日粮粗料添加比例为 50%~70% 时，奶牛瘤胃液 CLA 含量随着粗料添加比例的增加而增高，当粗料添加比例为 70% 时，瘤胃液中的 CLA 含量较高。

2.4 日粮中棉粕与豆粕比例对奶牛瘤胃培养液中 CLA 含量的影响

由图 3 可知，日粮中植物油的添加比例一定时，日粮中的氮源棉粕与豆粕比例对奶牛瘤胃培养液中的 CLA 含量有一定影响。当日粮棉粕与豆粕比例为 14:11 时，奶牛瘤胃培养液中的 CLA 含量最高，高于或低于该比例，瘤胃培养液中的 CLA 含量都会降低。这可能是由于棉粕、豆粕中分别含有一定量的棉籽油和豆油，而这些植物油总脂肪酸中又含有亚油酸和亚麻酸，当饲料中棉粕与豆粕比例为 14:

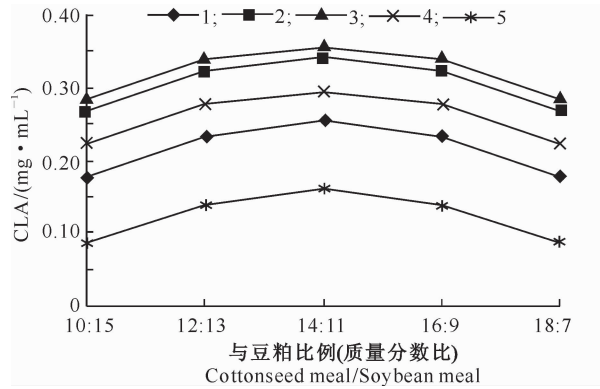


图 3 日粮中棉粕与豆粕比例对奶牛瘤胃培养液中 CLA 含量的影响

Fig. 3 Effect of dietary cottonseed meal/soybean meal on the conjugated linoleic acid content of ruman liquor *in vitro*

2.6 粗料比例与缓冲液 pH 值交互效应对奶牛瘤胃培养液中 CLA 含量的影响

奶牛瘤胃液中的 CLA 含量不仅受各因素单独

11 时，其中所含的亚油酸与亚麻酸的比例能使瘤胃产生较多的 CLA，因此可以提高瘤胃的 CLA 含量。

2.5 缓冲液 pH 值对奶牛瘤胃培养液中 CLA 含量的影响

奶牛瘤胃 pH 值是保证瘤胃内微生物菌群正常生长繁殖和消化分解各类营养物质的重要条件之一。Troegeler 等^[17]研究认为，瘤胃内脂肪氢化的最佳 pH 值为 6.8，pH 值较低会抑制脂解和氢化。这主要是由于 pH 值较低时，改变了瘤胃微生物的生态系统，从而使瘤胃微生物的氢化途径发生改变，瘤胃内容物合成了更多的顺 10 单烯酸或共轭二烯，从而使 trans-11C_{18:1} 的合成减少^[18-19]。当 pH 值为 6.8~7.0 时，这种接近中性的瘤胃环境才能保证微生物菌群的正常生长与繁殖，使瘤胃微生物对脂肪氢化率与活体一致，在瘤胃内合成较多的 trans-11C_{18:1}，使瘤胃内的 CLA 含量升高。另外，瘤胃 pH 值可以影响其中的亚油酸异构酶活性，一些瘤胃细菌亚油酸异构酶在 pH 为 5.5~8.5 时具有转化合成 CLA 的活性，但大多数瘤胃细菌异构酶最大活性的最适 pH 为 7.0~7.3^[20]。因此，保持中性的瘤胃环境，可以提高瘤胃细菌异构酶活性，从而提高亚油酸转化合成 CLA 的产量。

由图 4 可知，当日粮中添加 5% 大豆油、5% 葵花籽油、5% 菜籽油与 2% 菜籽油+3% 葵花籽油时，奶牛瘤胃液 CLA 的含量均在 pH 值为 7.0 时最高；而当日粮中添加 2% 大豆油+3% 葵花籽油时，奶牛瘤胃液 CLA 的含量在 pH 值为 7.3 时最大。

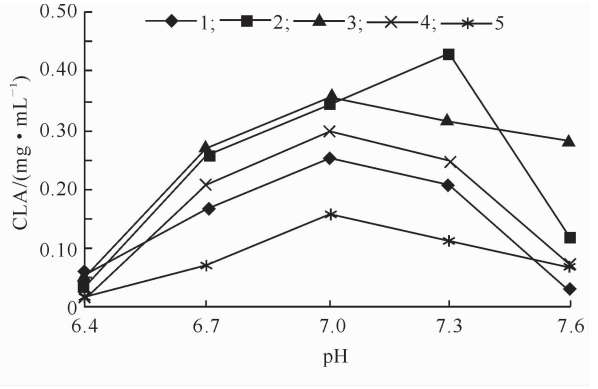


图 4 缓冲液 pH 值对奶牛瘤胃培养液中 CLA 含量的影响

Fig. 4 Effect of pH on the conjugated linoleic acid content of ruman liquor *in vitro*

作用的影响，而且还受各因素共同作用的影响。在本试验中，日粮粗料比例与瘤胃缓冲液 pH 值的交互作用对奶牛瘤胃培养液 CLA 的含量有显著影响。

由图 5 可知,瘤胃培养液 CLA 含量随日粮中粗料比例的增加而上升,随瘤胃缓冲液 pH 值的增加呈先增加后下降的趋势,在日粮中粗料比例为 70%、缓冲液 pH 值为 7.0 时,瘤胃液中 CLA 含量达到最大,为 0.5 mg/mL。

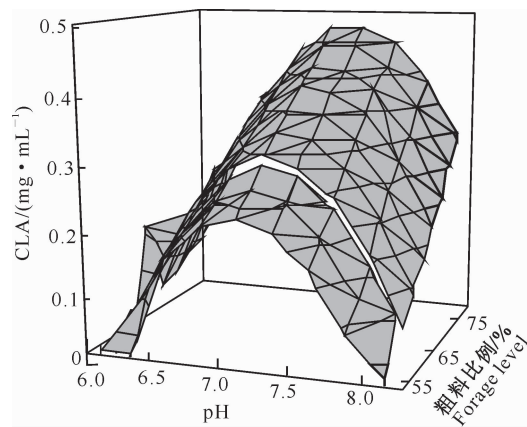


图 5 日粮中粗料比例与缓冲液 pH 值的交互作用对奶牛瘤胃培养液中 CLA 含量的影响

Fig. 5 Effect of dietary forage percent and pH their interactions on the conjugated linoleic acid content of ruman liquor *in vitro*

3 结 论

在本试验条件下,日粮中粗料比例(X_1)、植物油种类及其比例(X_2)、棉粕与豆粕比例(X_3)、pH 值(X_4)是影响奶牛瘤胃液 CLA 含量的主要因素。奶牛瘤胃液 CLA 含量(Y)与上述各因素之间的最佳回归模型为:

$$Y=0.356+0.059X_1-0.023X_2+0.021X_4+0.011X_1X_4-0.038X_2^2-0.018X_3^2-0.067X_4^2,R^2=87.41\%$$

日粮中添加 5% 葵花籽油,并调节日粮粗料比例为 70%、棉粕与豆粕质量分数分别为 14% 与 11%、缓冲液 pH 值为 7.0 时,奶牛瘤胃液中 CLA 含量最高。

[参考文献]

[1] 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(5): 881-885.
[2] Lourenco M, Van Ranst G, Vlaeminck B, et al. Influence of different dietary forages on the fatty acid composition of rumen digesta as well as ruminant meat and milk [J]. Anim Feed Sci Tech, 2008, 145(1/4): 418-437.
[3] Loor J J, Quinlan L E, Bandara A B P A, et al. Distribution of

trans-vaccenic acid and cis9, trans11-conjugated linoleic acid (ruminic acid) in blood plasma lipid fractions and secretion in milk fat of Jersey cows fed canola or soybean oil [J]. Anim Res, 2002, 51(2): 119-134.
[4] Loor J J, 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]. J Dairy Sci, 2004, 87: 2472-2485.
[5] Suksombat W, Chullanandana K. Effects of soybean oil or rumen protected conjugated linoleic acid supplementation on accumulation of conjugated linoleic acid in dairy cows' milk [J]. Asi-Aust J Anim Sci, 2008, 21(9): 1271-1277.
[6] Wallace R J, McKain N, Shingfield K J, et al. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria [J]. J Lipid Res, 2007, 48(10): 2247-2254.
[7] Martin C, Rouel J, Jouany J P, et al. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil [J]. J Anim Sci, 2008, 86(10): 2642-2650.
[8] Cone J W, Beuvinck J M W, Rodriguez M. Use and applications of an autoclated time related gas production test for the *in vitro* study of fermentation kinetics in the rumen [J]. Rev Prot Zootec, 1994, 1: 25-37.
[9] 薛秀恒,王菊花,王志耕.牛奶中共轭亚油酸的紫外分光光度测定方法 [J]. 食品工业科技, 2005, 26(7): 28-31.
Xue X H, Wang J H, Wang Z G. Analytical method using ultraviolet spectrophotometry to determine CLA content of the milk [J]. Science and Technology of Food Industry, 2005, 26(7): 28-31. (in Chinese)
[10] Shingfield K J, Ahvenjarvi S, Toivonen V, et al. Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows [J]. British Journal of Nutrition, 2008, 99(5): 971-983.
[11] Szolloskei G, Wagner L, Nemeth S. In sacco studies of conjugated linoleic acid production from various oils in the rumen of sheep [J]. Acta Vet Hung, 2005, 53(4): 411-423.
[12] 魏宏阳,王家启.添加游离不饱和脂肪酸或植物油对瘤胃微生物体外发酵及微晶纤维素降解的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(5): 491-497.
Wei H Y, Wang J Q. Effects of free unsaturated fatty acid mixture and vegetable oils on pure cellulose degradation and fermentation by mixed ruminal microbes *in vitro* [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2004, 35(5): 491-497. (in Chinese)
[13] Precht D, Hagemester H, Kanitz W, et al. Milk fat depression and the role of trans and CLA fatty acid isomers by feeding a high fibre diet with calcium soaps of fatty acids in early lactating dairy cows [J]. Milchwissenschaft, 2002, 57(9/10): 518-522.