

DOI:10.11686/cyxb2024485

http://cyxb.magtech.com.cn

卢琦, 覃继肖, 班一鸣, 等. 不同水平紫玉米花青素提取物对肉牛体外产气和瘤胃发酵的影响. 草业学报, 2025, 34(10): 202-212.

LU Qi, QIN Ji-xiao, BAN Yi-ming, *et al.* Effect of different levels of purple maize anthocyanin extract on *in vitro* gas production and rumen fermentation in beef cattle. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(10): 202-212.

## 不同水平紫玉米花青素提取物对肉牛体外产气和瘤胃发酵的影响

卢琦<sup>1,2</sup>, 覃继肖<sup>1,2</sup>, 班一鸣<sup>1,2</sup>, 高成成<sup>1,2</sup>, 杨蓉<sup>3</sup>, 李培瑶<sup>1,2</sup>, 许一清<sup>1,2</sup>, 谢双龙<sup>1,2</sup>, 陈睿<sup>1,2</sup>, 周迪<sup>3\*</sup>, 田兴舟<sup>1,2\*</sup>

(1. 贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州省种畜禽种质测定中心, 贵州 贵阳 550018)

**摘要:**为研究紫玉米花青素提取物对肉牛体外产气和瘤胃发酵的影响,采用完全随机试验设计,在底物中添加0、0.2%、0.4%、0.6%和0.8%的紫玉米花青素提取物,测定总产气量、动力学参数、挥发性脂肪酸、甲烷产量、纤维素酶活性及营养物质降解率等瘤胃发酵参数。结果表明:1)发酵72 h后,对照组总产气量显著高于0.6%花青素组( $P<0.05$ )。2)对快速发酵部分的产气量,0.4%花青素组显著高于对照组( $P<0.05$ );产气速率随花青素添加水平的增加呈线性和二次曲线降低( $P<0.05$ ),且对照组显著高于其他4个花青素组( $P<0.05$ )。3)乙酸和丁酸含量随花青素添加水平的增加均呈线性和二次曲线下降( $P<0.05$ ),且对照组均显著高于0.4%、0.6%和0.8%花青素组( $P<0.05$ );丙酸含量随花青素添加水平的增加呈线性和二次曲线上升( $P<0.05$ ),且对照组均显著低于花青素组( $P<0.05$ );乙酸/丙酸和甲烷产量均随花青素添加水平的增加呈线性或二次曲线降低( $P<0.05$ ),且花青素组均显著低于对照组( $P<0.05$ )。4)羧甲基纤维素酶和纤维二糖酶在12 h随花青素添加水平的增加均呈线性和二次曲线升高( $P<0.05$ ),且0.8%花青素组显著高于其他4组( $P<0.05$ );同时,0.2%、0.4%、0.6%花青素组木聚糖酶在24 h显著高于对照组( $P<0.05$ )。5)蛋白质降解率和酸性洗涤纤维降解率随花青素添加水平的增加均呈线性和二次曲线升高( $P<0.05$ ),且花青素组蛋白质降解率显著高于对照组( $P<0.05$ )。综上可知,紫玉米花青素提取物可改善肉牛瘤胃发酵模式,提高丙酸含量、纤维素酶活性及营养物质降解率,降低瘤胃甲烷产量。本试验条件下,在肉牛饲料中添加紫玉米花青素提取物适宜水平是0.4%。

**关键词:**花青素;体外产气;瘤胃发酵;肉牛

## Effect of different levels of purple maize anthocyanin extract on *in vitro* gas production and rumen fermentation in beef cattle

LU Qi<sup>1,2</sup>, QIN Ji-xiao<sup>1,2</sup>, BAN Yi-ming<sup>1,2</sup>, GAO Cheng-cheng<sup>1,2</sup>, YANG Rong<sup>3</sup>, LI Pei-yao<sup>1,2</sup>, XU Yi-qing<sup>1,2</sup>, XIE Shuang-long<sup>1,2</sup>, CHEN Rui<sup>1,2</sup>, ZHOU Di<sup>3\*</sup>, TIAN Xing-zhou<sup>1,2\*</sup>

1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountains Regions, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. Testing Center for Livestock and Poultry Germplasm, Guiyang 550018, China

收稿日期:2024-12-04;改回日期:2025-01-23

基金项目:国家自然科学基金项目(32260849,32302779),贵州省农业农村厅项目(关岭牛优异种质资源的发掘与利用;黔财农[2024]号),贵州省科技厅科技支撑计划项目(黔科合支撑[2022]重点033),贵州省基础研究计划(自然科学)青年引导项目(黔科合基础-[2024]青年106),贵州省教育厅高等学校自然科学研究项目青年科技人才成长项目(黔教技[2024]33号)和贵州大学基础研究项目(贵大基础[2023]16号)资助。

作者简介:卢琦(1988-),女,河南焦作人,博士。E-mail: luqi2556728@163.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: dizhouz@163.com; tianxingzhou@yeah.net

**Abstract:** The object of this study was to investigate the effect of purple maize anthocyanin extract on *in vitro* gas production and rumen fermentation in beef cattle. A completely randomized design was used. Levels of 0, 0.2%, 0.4%, 0.6%, and 0.8% purple maize anthocyanin extract were added to the substrate, and total gas production, gas production kinetic parameters, volatile fatty acid, methane production, cellulase activity, and nutrient degradation rate were measured. It was found that: 1) Total gas production after fermentation for 72 h tended to be reduced where anthocyanin was added, and gas production at 72 h for the 0.6% anthocyanin group was significantly lower ( $P < 0.05$ ) than that of the control group. 2) By contrast, gas production from the immediately soluble fraction tended to be higher with anthocyanin present and was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in the 0.4% anthocyanin group than in the control group. The gas production rate constant decreased with increase in the purple maize anthocyanin extract supplemental level, and the control group was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the other four anthocyanin groups, and the curve defining the trend across anthocyanin levels had both linear and quadratic significant ( $P < 0.05$ ) terms. 3) The contents of acetic and butyric acid at 24 h decreased with increase in added anthocyanin, with significant ( $P < 0.05$ ) linear and quadratic terms for the fitted curve. Accordingly, the contents of acetic and butyric acids in the control group were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than those of the 0.4%, 0.6%, and 0.8% anthocyanin groups. In contrast, the content of propionic acid increased with increase in supplemental purple maize anthocyanin extract, with both linear and quadratic terms of the fitted curve being significant ( $P < 0.05$ ), and accordingly, the content of propionic acid in the control group was significantly lower ( $P < 0.05$ ) than other anthocyanin groups. The acetic:propionic acid ratio and methane production both decreased with increase in the level of anthocyanin extract and in both cases the fitted curve had significant ( $P < 0.05$ ) linear and quadratic terms. Accordingly, acetic:propionic acid ratio and methane production in the anthocyanin groups were significantly lower ( $P < 0.05$ ) than that of the control group. 4) At 12 h fermentation time, carboxymethyl cellulose and cellobiase were increased with increase in the supplemental anthocyanin extract level and both linear and quadratic terms were significant ( $P < 0.05$ ). Accordingly carboxymethyl cellulose and cellobiase levels in the 0.8% anthocyanin group were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in the other four groups. Meanwhile, the values of xylanase in the 0.2%, 0.4%, and 0.6% anthocyanin groups were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than those in the control group at 24 h fermentation time. 5) Both crude protein degradation rate and acid detergent fiber degradation rate increased with increase in supplemental anthocyanin extract level, and linear and quadratic terms of the fitted curves were significant ( $P < 0.05$ ) increasing. Accordingly, the crude protein degradation rate in the anthocyanin groups was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that of the control group. Taken together, purple maize anthocyanin extract had the ability to improve rumen fermentation mode, increase propionic acid, cellulase activity, and nutrient degradation rate, and decrease methane production of beef cattle. Under the conditions of this experiment, the optimal purple maize anthocyanin extract level was 0.4%.

**Key words:** anthocyanins; *in vitro* gas production; rumen fermentation; beef cattle

植物提取物以其天然、无抗药性、多功能等优点,成为反刍动物新型饲料添加剂研究的热点<sup>[1]</sup>。Alexander 等<sup>[2]</sup>报道,植物提取物可提高反刍动物饲料中能量与氮的利用效率,具有作为饲料添加剂的潜力。此外,植物提取物可降低奶牛瘤胃中乙酸/丙酸,提升丙酸浓度,抑制甲烷(methane, CH<sub>4</sub>)产生<sup>[3]</sup>。

花青素是植物体内重要的次级代谢产物,具有重要的生理功能和开发应用前景。研究表明,花青素具有抗氧化、清除自由基、抗应激、促生长、免疫调节等生物学作用,是反刍动物优良天然抗氧化剂<sup>[4]</sup>。田亚原等<sup>[5]</sup>研究指出,富含花青素紫玉米(*Zea mays*)秸秆青贮饲料可提升奶山羊的营养物质消化能利用率,增强血浆抗氧化参数,改善机体健康。Tian 等<sup>[6]</sup>报道,在饲料中添加紫玉米花青素提取物可显著提升丙酸与总挥发性脂肪酸(total

volatile fatty acid, TVFA)含量,降低乙酸/丙酸,改善瘤胃发酵参数。Suong等<sup>[7]</sup>发现,肉羊饲喂富含花青素的黑甘蔗(*Saccharum sinense*),可显著降低瘤胃产甲烷菌,提高血液抗氧化能力,缓解机体的氧化应激状态。由此可见,花青素作为反刍动物优良天然饲料添加剂,可改善机体的健康<sup>[8]</sup>。

紫玉米是禾本科玉蜀黍属一年生植物,含有丰富的花青素,具有较高的开发利用价值<sup>[9]</sup>。关岭牛作为贵州典型的喀斯特山区黄牛品种,是全国农产品地理标志,有肉质鲜美、耐粗饲、风味独特等优点,具有较高的研究价值<sup>[10]</sup>。然而,目前鲜见花青素对肉牛瘤胃发酵影响的研究报道。因此,本试验通过体外发酵试验探究不同紫玉米花青素提取物添加水平对关岭黄牛累积产气量、动力学参数、瘤胃发酵参数、CH<sub>4</sub>产量、纤维素酶及营养物质降解率的影响,为花青素作为天然抗氧化剂饲料添加剂在肉牛饲料中的合理利用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间与地点

体外产气试验于2024年7—11月在贵州大学动物科学学院动物营养与饲料研究所进行。

### 1.2 试验材料

试验方案通过贵州大学实验动物伦理分委员会(编号:EAE-GZU-2024-E027)审核,严格按照相关规则制度进行。紫玉米花青素提取物购于西安锐禾生物工程技术有限公司,经检测,其总花青素含量为2619 μg·g<sup>-1</sup><sup>[11]</sup>。

### 1.3 瘤胃液供体动物及饲养管理

在关岭自治县关岭牛投资发展有限责任公司,选择3只体况良好、体重相近[(425.0±12.15) kg]的关岭黄牛公牛作为瘤胃液供体。试验牛单栏栓系饲养,试验饲料为全混合日粮,精粗比为40:60,精料以玉米、豆粕、菜籽饼、麦麸为主,粗料为稻草(*Oryza sativa*)与皇竹草(*Pennisetum sinense*)(表1)。每天08:00和17:00各饲喂1次,牛只自由采食,自由饮水。于晨饲前通过负压真空泵(VP30,北京莱伯科泰有限公司)连接胃管式采样器从供体牛口腔抽取瘤胃液,丢弃前100 mL瘤胃液。每头牛采集400 mL瘤胃液,经4层纱布过滤后迅速装入预热的39 °C保温瓶中,盖严瓶口,迅速带回实验室进行体外发酵试验。

### 1.4 底物与发酵残渣营养成分的测定

采用GB/T 6435-2014<sup>[12]</sup>的方法测定底物(与基础饲料相同)及其发酵残余物干物质(dry matter, DM)含量,采用GB/T 6432-2018<sup>[13]</sup>的方法使用全自动凯氏定氮仪(KF1100,济南海能仪器股份有限公司,济南,中国)测定

表1 全混合日粮组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the total mixed ration (air dry basis, %)

原料 Ingredient	含量 Content	营养水平 Nutrient levels <sup>2</sup>	含量 Content
稻草 Rice straw	17.20	干物质 Dry matter	89.79
皇竹草 Hybrid giant napier	42.80	粗蛋白质 Crude protein	10.22
玉米 Corn	23.70	中性洗涤纤维 Neutral detergent fiber	40.32
豆粕 Soybean meal	5.80	酸性洗涤纤维 Acid detergent fiber	24.71
菜籽饼 Rapeseed meal	2.20	粗灰分 Ash	8.50
麸皮 Bran	5.60	钙 Calcium	0.51
磷酸氢钙 Dicalcium phosphate	0.50	磷 Phosphorus	0.37
食盐 Salt	0.50		
碳酸氢钠 NaHCO <sub>3</sub>	0.50		
预混料 Premix <sup>1</sup>	1.20		
合计 Total	100.00		

注: 1. 预混料每kg中含:维生素A 200 KIU, 维生素D<sub>3</sub> 100 KIU, 维生素E 600 IU, 铜550 mg, 铁1000 mg, 锌1000 mg, 锰1500 mg, 钴10 mg, 硒5 mg, 碘50 mg。2. 营养指标均为实测值。

Note: 1. The premix provided the following per kg: V<sub>A</sub> 200 KIU, V<sub>D<sub>3</sub></sub> 100 KIU, V<sub>E</sub> 600 IU, Cu 550 mg, Fe 1000 mg, Zn 1000 mg, Mn 1500 mg, Co 10 mg, Se 5 mg, I 50 mg. 2. Nutrient levels were measured values.

粗蛋白质(crude protein, CP)含量,采用 Van Soest 等<sup>[14]</sup>的方法使用全自动纤维分析仪(FT12, 格哈特, 德国)测定中性洗涤纤维(neutral detergent fiber, NDF)与酸性洗涤纤维(acid detergent fiber, ADF)含量。采用 GB/T 6438-2007<sup>[15]</sup>的方法测定底物粗灰分(Ash), 采用 GB/T 6436-2018<sup>[16]</sup>的方法测定钙含量, 采用 GB/T 6437-2018<sup>[17]</sup>的方法测定总磷含量。

### 1.5 体外发酵试验设计

采用单因素完全随机试验设计, 设置 0(对照组)、0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 共 5 个紫玉米花青素提取物添加水平, 每个添加水平 6 个重复, 设置 2、4、6、8、12、24、48、72 h 共 8 个发酵时间点。人工唾液根据 Menke 等<sup>[18]</sup>的方法制备, 按 1:2 向瘤胃液中加入人工唾液均匀混合, 并持续通入 CO<sub>2</sub>。称取 0.5 g 发酵底物(与基础饲料相同), 吸取 30 mL 人工瘤胃液注入至每个产气管中, 排净产气管中的空气, 在 39 °C 水浴摇床中培养, 分别在 8 个设置的发酵时间点读取产气量。同时设置空白管(未加底物), 将各发酵时间点的数值减去空白管数值, 从而计算出相应发酵时间点的产气量(gas production, GP)。

### 1.6 产气动力学参数

产气试验结束后, 将各底物不同发酵时间点产气量代入  $GP = a + b(1 - e^{-ct})$  模型<sup>[19]</sup>, 根据非线性最小二乘法原理, 求出 a、b、c 值, 式中: a 为饲料快速发酵部分的产气量, b 为慢速发酵部分的产气量, c 为 b 的速度常数(产气速率), a+b 为潜在产气量, t 为底物发酵时间, GP 为 t 时的产气量。

### 1.7 体外瘤胃发酵参数

在发酵培养 12 和 24 h 时, 立即取出产气管放入冰水浴中, 终止发酵。发酵液 pH 立即采用便携式酸度计(pH818, 希玛仪表, 东莞, 中国)测定。氨态氮(ammonia nitrogen, NH<sub>3</sub>-N)含量参考冯宗慈等<sup>[20]</sup>的比色法测定。4 种瘤胃液纤维素酶, 包括羧甲基纤维素酶、纤维二糖酶、木聚糖酶、滤纸纤维素酶活性测定方法参照王加启<sup>[21]</sup>的方法。

利用气相色谱(安捷伦科技有限公司, 加利福尼亚, 美国)测定瘤胃液挥发性脂肪酸(volatile fatty acid, VFA), 气相色谱参数: HP-INNOWAX 毛细管色谱柱(30 m × 250 μm × 0.25 μm; 安捷伦科技有限公司, 加利福尼亚, 美国), 进样口温度为 220 °C, 火焰离子化检测器温度为 250 °C, 柱温以 8 °C · min<sup>-1</sup> 速度从 80 °C 升高至 200 °C, 进样体积为 2 μL, 载气为氦气, 流速为 4.0 mL · min<sup>-1</sup>。VFA 包括乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸; 6 种酸的总和为 TVFA。此外, 根据乙酸、丙酸、丁酸浓度, 参照 Moss 等<sup>[22]</sup>方法计算 CH<sub>4</sub> 产量: CH<sub>4</sub> 产量(mmol · L<sup>-1</sup>) = 乙酸含量(mmol · L<sup>-1</sup>) × 0.45 - 丙酸含量(mmol · L<sup>-1</sup>) × 0.275 + 丁酸含量(mmol · L<sup>-1</sup>) × 0.4。

### 1.8 体外发酵营养物质降解试验

营养物质降解试验参考吴万成等<sup>[23]</sup>的方法。称取 0.5 g 底物装入已知重量无纺布滤袋中(53 mm × 53 mm, 孔径 18~25 μm, 四川众想未来科技有限公司, 绵阳, 中国), 用封口机(F-300, 许昌市绿蜻蜓电器有限公司, 许昌, 中国)进行封口, 将所有滤袋按不同处理转入到产气管中, 并加入 30 mL 人工瘤胃液, 在厌氧环境中发酵培养 24 h。待发酵完毕, 迅速将产气管放入冰水浴中终止发酵, 统一取出滤袋, 将滤袋放入清水中轻揉漂洗至水澄清, 不同处理的滤袋漂洗次数保持一致。将滤袋转入烘箱, 在 65 °C 中烘 48 h 至恒重, 测定干物质降解率(DM degradation rate, DMD), 进一步检测底物及发酵残余物中粗蛋白、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量, 计算营养物质降解率。每个添加水平设 6 个重复。底物样品干物质降解率(DMD)、粗蛋白质降解率(CP degradation rate, CPD)、中性洗涤纤维降解率(NDF degradation rate, NDFD)、酸性洗涤纤维降解率(ADF degradation rate, ADFD)计算公式如下: 底物样品某营养物质降解率(%) = [(底物样品某营养物质含量 - 底物残渣某营养物质含量) / 底物样品某营养物质含量] × 100。

### 1.9 数据统计分析

使用社会科学统计软件包(statistical package for the social sciences, SPSS)18.0 软件分别通过 levene 检验与 Kolmogorov-smirnov 检验测试所有参数的方差齐性和正态性。此外, 所有数据用 SPSS 18.0 进行统计分析, 采用广义线性模型(generalized linear model, GLM)程序对不同紫玉米花青素提取物添加水平处理进行单因素方差分

析,并采用Duncan氏法进行多重比较。进一步用曲线估计程序进行线性(linear)和二次函数(quadratic)显著性检验。差异显著性标准为 $P<0.05$ ,结果用平均值±均值标准误(standard error of mean, SEM)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同紫玉米花青素提取物添加水平对体外发酵72 h累积产气量的影响

由表2可知,在2 h发酵时间点,各组间累积产气量差异均不显著( $P>0.05$ )。然而,在其他7个发酵时间点(4、6、8、12、24、48、72 h),随紫玉米花青素提取物添加水平提高,累积产气量均呈线性和二次曲线降低( $P<0.05$ )。此外,在4、6、8、12、24 h这5个发酵时间点,对照组产气量显著高于其他4个花青素组( $P<0.05$ )。在48 h发酵时间点,对照组产气量显著高于0.4%、0.6%和0.8%花青素组( $P<0.05$ )。在72 h发酵时间点,对照组与0.2%、0.4%和0.8%花青素组产气量差异不显著( $P>0.05$ ),但显著高于0.6%花青素组( $P<0.05$ )。

表2 不同紫玉米花青素提取物添加水平对体外发酵72 h累积产气量的影响

Table 2 Effect of different levels of purple maize anthocyanin extract on cumulative gas production at 72 h *in vitro* fermentation (mL)

时间 Time (h)	紫玉米花青素提取物添加水平 Purple maize anthocyanin extract supplemental level					标准误 SEM	P值 P-value		
	0	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%		处理 Treatment	线性 Linear	二次 Quadratic
2	9.83	10.67	9.67	9.50	8.33	0.834	0.421	0.116	0.174
4	21.17a	17.67b	15.50bc	13.17c	13.67c	1.019	<0.001	<0.001	<0.001
6	25.83a	22.50b	21.33bc	19.33c	19.17c	0.999	<0.001	<0.001	<0.001
8	29.50a	26.33b	24.67b	23.00b	23.17b	1.061	0.001	<0.001	<0.001
12	36.33a	32.50b	29.33c	28.17c	30.50bc	0.961	<0.001	<0.001	<0.001
24	57.33a	51.00b	43.17c	40.50c	43.33c	2.064	<0.001	<0.001	<0.001
48	73.33a	69.33ab	65.50bc	60.17c	62.50c	2.017	0.001	<0.001	<0.001
72	81.00a	80.00a	78.50a	70.17b	74.17ab	2.232	0.011	0.003	0.014

注:同行不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同。

Note: In the same row, different lowercase letters mean significant difference ( $P<0.05$ ). The same below.

### 2.2 不同紫玉米花青素提取物添加水平对体外发酵产气动力学参数的影响

与对照组相比,底物添加0.4%紫玉米花青素提取物可显著提高快速发酵部分的产气量( $P<0.05$ ,表3)。0.4%花青素组慢速发酵部分的产气量和潜在产气量显著高于( $P<0.05$ )0.6%和0.8%花青素组。产气速率随花青素添加水平的增加呈线性和二次曲线降低( $P<0.05$ ),且对照组显著高于其他4个花青素组( $P<0.05$ )。

表3 不同紫玉米花青素提取物添加水平对体外发酵产气动力学参数的影响

Table 3 Effect of different levels of purple maize anthocyanin extract on gas production kinetic parameters *in vitro* fermentation

项目 Item	紫玉米花青素提取物添加水平					标准误 SEM	P值 P-value		
	Purple maize anthocyanin extract supplemental level						处理 Treatment	线性 Linear	二次 Quadratic
	0	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%				
快速发酵部分的产气量 Gas production from the immediately soluble fraction (a, mL)	2.99b	3.83ab	4.84a	3.90ab	3.50ab	0.542	0.046	0.549	0.086
慢速发酵部分的产气量 Gas production from the insoluble fraction (b, mL)	78.79ab	79.36ab	83.24a	74.04b	75.42b	2.315	0.034	0.134	0.156
潜在产气量 Potential extent of gas production (a+b, mL)	81.78ab	83.20ab	88.08a	77.95b	78.92b	2.434	0.043	0.205	0.127
产气速率 Gas production rate (c, %·h <sup>-1</sup> )	0.050a	0.039b	0.029c	0.033bc	0.035bc	0.002	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 不同紫玉米花青素提取物添加水平对瘤胃发酵参数及甲烷产量的影响

底物添加不同水平花青素对 12、24 h 发酵液 pH 无显著影响 ( $P > 0.05$ , 表 4)。然而,  $\text{NH}_3\text{-N}$  含量随添加水平提高在 12 h 呈二次曲线上升 ( $P < 0.05$ ), 在 24 h 呈线性和二次曲线上升 ( $P < 0.05$ ); 0.4% 花青素组在 12、24 h 均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。对于 VFA 含量, 乙酸和丁酸含量随花青素添加水平提高均呈线性和二次曲线下降 ( $P < 0.05$ ), 且对照组乙酸和丁酸含量显著高于 0.4%、0.6% 和 0.8% 花青素组 ( $P < 0.05$ )。丙酸含量随花青素添加水平提高均呈线性和二次曲线上升 ( $P < 0.05$ ), 且对照组丙酸含量显著低于花青素组 ( $P < 0.05$ )。4 组间异丁酸、戊酸与异戊酸含量差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。此外, 各组间 TVFA 含量在 24 h 差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 但在 12 h 呈线性和二次曲线提高 ( $P < 0.05$ ), 且花青素组 TVFA 含量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。乙酸/丙酸随紫玉米花青素水平提高呈线性和二次曲线降低 ( $P < 0.05$ ), 且花青素组显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。 $\text{CH}_4$  产量随花青素水平添加呈线性和二次曲线降低 ( $P < 0.05$ ), 且对照组的  $\text{CH}_4$  产量显著高于花青素组 ( $P < 0.05$ )。

表 4 不同紫玉米花青素提取物添加水平对瘤胃发酵参数及甲烷产量的影响

Table 4 Effect of different levels of purple maize anthocyanin extract on rumen fermentation parameters and methane production *in vitro* fermentation

项目 Item	时间 Time (h)	紫玉米花青素提取物添加水平 Purple maize anthocyanin extract supplemental level					标准误 SEM	P 值 P-value		
		0	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%		处理 Treatment	线性 Linear	二次 Quadratic
pH	12	6.76	6.86	6.81	6.89	6.81	0.032	0.070	0.212	0.090
	24	6.64	6.75	6.73	6.69	6.68	0.054	0.654	0.858	0.433
氨态氮 Ammonia nitrogen ( $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ )	12	8.83bc	10.10a	10.34a	9.68ab	8.25c	0.414	0.007	0.331	0.001
	24	6.39c	7.47b	8.38a	8.02ab	8.40a	0.248	<0.001	<0.001	<0.001
乙酸 Acetate ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	12	39.55a	38.98ab	37.32bc	37.25bc	36.78c	0.596	0.011	0.002	0.007
	24	56.18a	53.90b	53.50b	48.67c	47.55c	0.675	<0.001	<0.001	<0.001
丙酸 Propionate ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	12	16.80d	22.13c	24.15b	26.05a	25.58a	0.437	<0.001	<0.001	<0.001
	24	22.67d	25.17c	29.52b	34.35a	33.03a	0.550	<0.001	<0.001	<0.001
丁酸 Butyrate ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	12	6.78a	5.58b	5.58b	5.48b	5.48b	0.116	<0.001	<0.001	<0.001
	24	11.02a	9.70b	8.45c	7.33d	7.15d	0.220	<0.001	<0.001	<0.001
异丁酸 Isobutyrate ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	12	2.13	2.10	2.04	2.06	2.15	0.073	0.807	0.971	0.483
	24	3.06	3.08	3.29	3.37	3.10	0.138	0.414	0.405	0.277
戊酸 Valerate ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	12	1.59	1.48	1.45	1.47	1.45	0.070	0.634	0.204	0.311
	24	2.14	2.23	2.09	2.11	2.04	0.090	0.630	0.236	0.440
异戊酸 Isovalerate ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	12	2.10	2.11	2.13	2.08	2.05	0.051	0.779	0.345	0.455
	24	2.77	3.01	2.88	3.00	2.91	0.099	0.432	0.414	0.382
总挥发性脂肪酸 Total volatile fatty acid ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	12	68.95b	72.38a	72.67a	74.39a	73.49a	0.610	<0.001	<0.001	<0.001
	24	97.83	97.09	99.73	98.82	95.78	0.979	0.074	0.491	0.096
乙酸/丙酸 Acetate/propionate	12	2.33a	1.79b	1.55c	1.43c	1.44c	0.056	<0.001	<0.001	<0.001
	24	2.48a	2.15b	1.82c	1.42d	1.44d	0.039	<0.001	<0.001	<0.001
甲烷产量 Methane production ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	12	15.64a	13.94b	12.38c	11.79c	11.71c	0.312	<0.001	<0.001	<0.001
	24	23.46a	21.21b	19.34c	15.39d	15.17d	0.319	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.4 不同紫玉米花青素提取物添加水平对体外发酵纤维素酶活性的影响

各组间 24 h 羧甲基纤维素酶、纤维二糖酶, 12 h 木糖酶, 以及 12 和 24 h 滤纸纤维素酶活性差异均不显著 ( $P > 0.05$ , 表 5)。然而, 在 12 h 发酵时间点, 羧甲基纤维素酶和纤维二糖酶活性随花青素添加水平增加呈线性和二次

曲线升高( $P < 0.05$ ),且0.8%花青素组显著高于其他4组( $P < 0.05$ )。在24 h发酵时间点,木聚糖酶活性随花青素添加水平增加呈二次曲线升高( $P < 0.05$ ),且0.2%、0.4%、0.6%花青素组显著高于对照组和0.8%花青素组( $P < 0.05$ )。

表5 不同紫玉米花青素提取物添加水平对外发酵纤维素酶活性的影响

Table 5 Effect of different levels of purple maize anthocyanin extract on cellulose activity *in vitro* fermentation

项目 Item	时间 Time (h)	紫玉米花青素提取物添加水平 Purple maize anthocyanin extract supplemental level					标准误 SEM	P值 P-value		
		0	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%		处理 Treatment	线性 Linear	二次 Quadratic
羧甲基纤维素酶 Carboxymethyl cellulose ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	12	3.28b	3.67b	4.21b	4.06b	5.39a	0.397	0.015	0.001	0.004
	24	5.87	4.04	3.42	4.92	3.92	0.772	0.223	0.246	0.235
纤维二糖酶 Cellobiase ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	12	3.87b	4.39b	4.31b	4.18b	6.36a	0.424	0.004	0.005	0.003
	24	4.03	4.77	2.98	2.81	3.29	0.670	0.248	0.120	0.281
木聚糖酶 Xylanase ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	12	15.86	14.97	12.96	14.70	14.51	1.674	0.810	0.567	0.597
	24	26.43b	53.07a	55.57a	53.22a	31.18b	5.328	0.001	0.692	<0.001
滤纸纤维素酶 Filter paper cellulose ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	12	3.80	3.90	3.51	4.43	4.27	0.479	0.677	0.330	0.568
	24	5.34	3.30	3.80	4.23	4.56	0.529	0.116	0.736	0.087

## 2.5 不同紫玉米花青素提取物添加水平对营养物质降解率的影响

底物添加紫玉米花青素提取物对DMD和NDFD均无显著影响( $P > 0.05$ ,表6)。然而,CPD随花青素添加水平增加呈线性和二次曲线升高( $P < 0.05$ ),且花青素组显著高于对照组( $P < 0.05$ )。ADFD随花青素添加水平增加呈线性和二次曲线升高( $P < 0.05$ ),且0.6%、0.8%花青素组显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

表6 不同紫玉米花青素提取物添加水平对营养物质降解率的影响

Table 6 Effect of different levels of purple maize anthocyanin extract on nutrient degradation rate *in vitro* fermentation (%)

项目 Item	紫玉米花青素提取物添加水平 Purple maize anthocyanin extract supplemental level					标准误 SEM	P值 P-value		
	0	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%		处理 Treatment	线性 Linear	二次 Quadratic
干物质降解率 Dry matter degradation rate	30.27	30.04	30.04	30.17	30.46	0.354	0.913	0.640	0.602
粗蛋白降解率 Crude protein degradation rate	48.96b	56.66a	56.34a	59.37a	60.56a	2.315	0.034	0.003	0.008
中性洗涤纤维降解率 Neutral detergent fiber degradation rate	15.18	15.12	14.92	16.04	15.41	1.046	0.950	0.658	0.908
酸性洗涤纤维降解率 Acid detergent fiber degradation rate	8.63c	8.98bc	10.65abc	12.73a	11.94ab	0.962	0.041	0.004	0.016

## 3 讨论

### 3.1 不同紫玉米花青素提取物添加水平对累积产气量及动力学参数的影响

体外累积产气量可反映反刍动物饲料可发酵程度与瘤胃微生物活性。饲料在反刍动物瘤胃微生物发酵过程中,可产生一部分 $\text{CO}_2$ 、 $\text{CH}_4$ 等气体<sup>[24]</sup>。本研究发现,紫玉米花青素提取物在48 h内可降低瘤胃体外累积产气量,这可能与紫玉米花青素提取物抑制肉牛 $\text{CH}_4$ 产量有关(表4)。Tian等<sup>[25]</sup>报道,与黏玉米秸秆青贮饲料相比,紫玉米秸秆青贮饲料在2 h显示较低水平的累积产气量,本研究结果与之相似。产气量是评价反刍动物瘤胃健康状态的重要指标之一,可反映瘤胃微生物对底物的利用效率。一般来说,累积产气量越高,说明底物的可发酵碳水化

合物含量越高,瘤胃微生物发酵活性越强<sup>[26]</sup>。本研究中,在72 h时,0.2%、0.4%花青素组累积产气量与对照组差异不显著,说明添加0.4%以内的紫玉米花青素提取物对关岭牛的微生物发酵活性无副作用。

瘤胃动力学参数是用来描述饲料原料在瘤胃内营养物质降解过程的数学模型参数。瘤胃体外发酵的快速降解部分产气量是由微生物降解淀粉等产生,慢速降解部分产气量是由微生物降解纤维素等产生<sup>[27]</sup>。本研究表明,0.4%花青素组具有较高水平的a、b和a+b,表明0.4%花青素添加水平可能提高饲料中蛋白质和碳水化合物在肉牛中的降解效率,这在后续进一步营养物质降解率中也得以论证。

### 3.2 不同紫玉米花青素提取物添加水平对瘤胃发酵参数及甲烷产量的影响

反刍动物对饲料碳水化合物的吸收主要以VFA进行,VFA是反刍动物主要能量来源,约占机体吸收总能的70%<sup>[28]</sup>。Gao等<sup>[29]</sup>报道,饲料添加紫甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata rubra*)花青素提取物可显著提高肉牛瘤胃TVFA浓度,降低乙酸与丙酸的比例。相似地,Taethaisong等<sup>[30]</sup>试验发现,在肉羊饲料中添加富含花青素的紫印楝叶(*Azadirachta indica*),可显著提升瘤胃液TVFA含量。本研究发现,紫玉米花青素提取物可显著提高发酵液TVFA与丙酸含量。这可能是由于花青素以糖苷形式存在,其结构含有不同的碳水化合物,这些碳水化合物可能参与了瘤胃碳水化合物代谢,从而提升VFA含量<sup>[31]</sup>。然而,其机制还需进一步研究。

反刍动物瘤胃排放的CH<sub>4</sub>约占农业生产的28%,既导致饲料能量浪费,又造成环境污染<sup>[32]</sup>。研究表明,花青素可通过抑制产甲烷菌生长与活性,降低瘤胃CH<sub>4</sub>产生,提升反刍动物的能量利用效率<sup>[33]</sup>。Lu等<sup>[34]</sup>通过体外产气试验发现,花青素具有降低山羊CH<sub>4</sub>产量的作用。本研究发现,紫玉米花青素提取物可显著降低肉牛CH<sub>4</sub>产量,这可能是由于花青素可促进微生物蛋白质流动,改善饲料质量,从而降低瘤胃CH<sub>4</sub>的产生;此外,花青素可与其他营养物质(如蛋白质)结合形成复合物,可提高饲料利用效率,减少CH<sub>4</sub>排放<sup>[35]</sup>。Sinz等<sup>[36]</sup>通过体外发酵试验发现,饲料添加植物提取物可显著降低反刍动物7%~9%的CH<sub>4</sub>排放量,本研究结果与之相似。

### 3.3 不同紫玉米花青素提取物添加水平对纤维素酶活性的影响

通过测定瘤胃纤维素酶活性,可间接说明瘤胃微生物对特定饲料纤维素的分解能力。瘤胃作为强大的纤维分解发酵系统,瘤胃微生物可分泌和合成纤维分解酶<sup>[37]</sup>。研究表明,饲料添加提取物可显著提高奶山羊瘤胃纤维素分解菌的丰度<sup>[38]</sup>。相似地,Suong等<sup>[39]</sup>研究发现,饲料添加花青素提取物可显著上调反刍动物瘤胃内纤维降解菌的丰度。本试验发现,紫玉米花青素提取物可显著提高瘤胃液纤维素酶活性,这可能是由于多酚化合物增加了反刍动物瘤胃纤维素分解细菌的数量<sup>[40]</sup>。然而,本研究未检测微生物的变化,有待于进一步研究验证。此外,羧甲基纤维素酶、纤维二糖酶变化与木聚糖酶活性有所差异,这可能与三者的结构、空间构象变化及酸碱度等有关<sup>[41]</sup>。

### 3.4 不同紫玉米花青素提取物添加水平对营养物质降解率的影响

营养物质瘤胃降解率反映了反刍动物对饲料的消化利用程度。研究发现,花青素可通过调节瘤胃微生物群改善营养物质的消化率<sup>[29]</sup>。Hosoda等<sup>[42]</sup>报道,在绵羊饲料中添加富含花青素的紫米(*Oryza sativa*)饲料可显著提高营养物质的表观消化率。本试验中,底物添加花青素可提高CPD,说明其可促进微生物对底物蛋白的利用。这可能是由于花青素与蛋白质结合形成复合物,改善了底物中CP的利用效率<sup>[35]</sup>。在纤维素表面有一层结构域、糖苷键等复杂结构的纤维素晶体,需纤维素分解菌产生的纤维素酶降解才能被动物利用<sup>[43]</sup>。本研究发现,花青素可显著提高ADFD,这可能是由于花青素通过上调瘤胃纤维降解菌的丰度<sup>[39]</sup>,增强了底物对碳水化合物的发酵。

## 4 结论

紫玉米花青素提取物可改善瘤胃发酵模式,提高TVFA、丙酸含量及纤维素酶活性,上调营养物质降解率,下调CH<sub>4</sub>产量,是关岭黄牛优质的饲料添加剂。在本试验条件下,肉牛饲料添加0.4%紫玉米花青素提取物效果最佳。

## 参考文献 References:

- [1] Bai Q C, Hao X Y, Xiang B W, et al. Effects of sea buckthorn flavone on gas production, rumen fermentation parameters and

- microflora population of sheep *in vitro*. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(3): 1405–1414.
- 白齐昌, 郝小燕, 项斌伟, 等. 沙棘黄酮对绵羊体外产气量、瘤胃发酵参数和微生物菌群的影响. 动物营养学报, 2020, 32(3): 1405–1414.
- [2] Alexander G, Singh B, Sahoo A, *et al.* *In vitro* screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets. Animal Feed Science and Technology, 2008, 145(1/2/3/4): 229–244.
- [3] Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, *et al.* Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science, 2006, 89(2): 761–771.
- [4] Purba R A P, Suong N T M, Paengkoum S, *et al.* Iron sulfate and molasses treated anthocyanin-rich black cane silage improves growth performance, rumen fermentation, antioxidant status, and meat tenderness in goats. Animal Bioscience, 2023, 36(2): 218–228.
- [5] Tian Y Y, Qin T, Zhang X L, *et al.* Effect of purple corn stover silage on energy utilization, plasma metabolites and antioxidant capacity parameters of heat-stressed dairy goats. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 36(8): 60–65.
- 田亚原, 覃谭, 张旭林, 等. 紫玉米秸秆青贮饲料对热应激奶山羊能量利用、血浆代谢和抗氧化参数的影响. 中国粮油学报, 2021, 36(8): 60–65.
- [6] Tian X Z, Xin H L, Paengkoum P, *et al.* Effects of anthocyanin-rich purple corn (*Zea mays* L.) stover silage on nutrient utilization, rumen fermentation, plasma antioxidant capacity, and mammary gland gene expression in dairy goats. Journal of Animal Science, 2019, 97(3): 1384–1397.
- [7] Suong N T M, Paengkoum S, Schonewille J T, *et al.* Growth performance, blood biochemical indices, rumen bacterial community, and carcass characteristics in goats fed anthocyanin-rich black cane silage. Frontiers in Veterinary Science, 2022, 9: 880838.
- [8] Zhou D, Wang Y C, Tian X Z, *et al.* Study of the mechanism of anthocyanins enhancing antioxidant capacity in ruminants. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2019, 50(8): 1536–1544.
- 周迪, 王胤晨, 田兴舟, 等. 花青素增强反刍动物抗氧化性能作用机制的研究. 畜牧兽医学报, 2019, 50(8): 1536–1544.
- [9] Jing P. Purple corn anthocyanins: Chemical structure, chemoprotective activity and structure/function relationships. USA: Ohio State University, 2006.
- [10] Zhou D, Zhao Z H, Wang F, *et al.* Screening and validation of the key genes for muscle growth and development in Guanling cattle based on transcriptome sequencing. Journal of Southern Agriculture, 2024, 55(3): 611–622.
- 周迪, 赵忠海, 王府, 等. 基于转录组测序的关岭牛肌肉生长发育关键基因筛选与鉴定. 南方农业学报, 2024, 55(3): 611–622.
- [11] Tian X Z, Li J, Luo Q, *et al.* Effects of purple corn anthocyanin on growth performance, meat quality, muscle antioxidant status, and fatty acid profiles in goats. Foods, 2022, 11: 1255.
- [12] General Administration of Quality Supervision, Spection and Quarantine of the People's Republic of China, China National Standardization Administration. Determination of moisture in feedstuffs: GB/T 6435-2014. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中水分的测定: GB/T 6435-2014. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [13] State Administration for Market Regulation, China National Standardization Administration. Determination of crude protein in feeds—Kjeldahl method: GB/T 6432-2018. Beijing: Standards Press of China, 2018.
- 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法: GB/T 6432-2018. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [14] Van Soest P J, Robertson J B, Lewis B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science, 1991, 74(10): 3583–3597.
- [15] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, China National Standardization Administration. Animal feeding stuffs-determination of crude ash: GB/T 6438-2007. Beijing: Standards Press of China, 2007.
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中粗灰分的测定: GB/T 6438-2007. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [16] State Administration for Market Regulation, China National Standardization Administration. Determination of calcium in feeds: GB/T 6436-2018. Beijing: Standards Press of China, 2018.

- 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中钙的测定: GB/T 6436-2018. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [17] State Administration for Market Regulation, China National Standardization Administration. Determination of phosphorus in feeds—spectrophotometry: GB/T 6437-2018. Beijing: Standards Press of China, 2018.
- 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中总磷的测定 分光光度法: GB/T 6437-2018. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [18] Menke K H, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 1988, 28: 7–55.
- [19] Ørskov E R, McDonald I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 1979, 92(2): 499–503.
- [20] Feng Z C, Gao M. Improvement of the method for measuring ammonia nitrogen content in rumen fluid by colorimetry. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2010, 6: 37.
- 冯宗慈, 高民. 通过比色测定瘤胃液氨氮含量方法的改进. *畜牧与饲料科学*, 2010, 6: 37.
- [21] Wang J Q. *Methods in ruminant nutrition research*. Beijing: Modern Education Press, 2011: 145–148.
- 王加启. 反刍动物营养学研究方法. 北京: 现代教育出版社, 2011: 145–148.
- [22] Moss A R, Jouany J P, Newbold J. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Annales De Zootech*, 2000, 49(3): 231–253.
- [23] Wu W C, Ma T, Li W J, *et al.* Effects of resveratrol on *in vitro* gas production and fermentation parameters of different types of substrates and its metabolites research. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(1): 321–333.
- 吴万成, 马涛, 李文娟, 等. 白藜芦醇对不同类型底物体外产气和发酵参数的影响及其代谢产物的研究. *动物营养学报*, 2020, 32(1): 321–333.
- [24] Wu W C, Ma T, Liu N, *et al.* Effect of resveratrol on methane production, nutrient degradation and microbial community under different substrates. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(6): 1281–1294.
- 吴万成, 马涛, 刘娜, 等. 白藜芦醇对不同类型底物甲烷产生、养分降解及微生物区系的影响. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(6): 1281–1294.
- [25] Tian X Z, Paengkoum P, Paengkoum S, *et al.* Comparison of forage yield, silage fermentative quality, anthocyanin stability, antioxidant activity, and *in vitro* rumen fermentation of anthocyanin-rich purple corn (*Zea mays* L.) stover and sticky corn stover. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 17(9): 2082–2095.
- [26] Qi S, Jiao T, Li X X, *et al.* Effect of varying levels of stevioside supplementation on *in vitro* gas production and rumen fermentation in sheep. *Pratacultural Science*, 2024, 41(6): 1429–1440.
- 齐帅, 焦婷, 李雄雄, 等. 不同添加水平甜菊糖苷对绵羊体外产气参数及瘤胃发酵的影响. *草业科学*, 2024, 41(6): 1429–1440.
- [27] An J, Yang Y, Wu W X, *et al.* Feasibility evaluation on replacing dietary alfalfa protein with slow-release urea using *in vitro* gas production technique for goats. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(10): 6516–6525.
- 安靖, 杨艺, 吴文旋, 等. 体外产气法评价缓释尿素替代山羊饲粮中苜蓿蛋白的可行性. *动物营养学报*, 2023, 35(10): 6516–6525.
- [28] Tang Y C, Hu G H, Jiang H, *et al.* The effect of adding different concentrations of sodium caproate on rumen gas production and fermentation parameters in cows *in vitro*. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2023, 44(6): 28–33.
- 唐煜淳, 胡光辉, 蒋慧, 等. 添加不同浓度己酸钠对奶牛瘤胃体外产气及发酵参数的影响. *山东畜牧兽医*, 2023, 44(6): 28–33.
- [29] Gao J, Cheng B B, Liu Y F, *et al.* Effects of red cabbage extract rich in anthocyanins on rumen fermentation, rumen bacterial community, nutrient digestion, and plasma indices in beef bulls. *Animal*, 2022, 16(5): 100510.
- [30] Taethaisong N, Paengkoum S, Nakharuthai C, *et al.* Effect of purple neem foliage as a feed supplement on nutrient apparent digestibility, nitrogen utilization, rumen fermentation, microbial population, plasma antioxidants, meat quality and fatty acid profile of goats. *Animals*, 2022, 12: 2985.
- [31] Tian X Z, Paengkoum P, Paengkoum S, *et al.* Purple corn (*Zea mays* L.) stover silage with abundant anthocyanins transferring anthocyanin composition to the milk and increasing antioxidant status of lactating dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(1): 413–418.
- [32] Zu H C, Xu J, Cong Y Y. Reducing rumen methane emission through regulating rumen microorganisms by adding hydrogen-

consuming compounds. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(11): 4968—4973.

俎昊辰, 许静, 丛玉艳. 通过添加耗氢化合物调节瘤胃微生物实现甲烷减排. 动物营养学报, 2019, 31(11): 4968—4973.

- [33] Lazalde-Cruz R, Miranda-Romero L A, Tirado-González D N, *et al.* Potential effects of delphinidin-3-O-sambubioside and cyanidin-3-O-sambubioside of *Hibiscus sabdariffa* L. on ruminant meat and milk quality. *Animals*, 2021, 11: 2827.
- [34] Lu Q, Luo Q, Li J, *et al.* Evaluation of the chemical composition, bioactive substance, gas production, and rumen fermentation parameters of four types of distiller's grains. *Molecules*, 2022, 27(18): 6134.
- [35] Garcia E H C. Methane production in dairy cows. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences, 2017.
- [36] Sinz S, Marquardt S, Soliva C R, *et al.* Phenolic plant extracts are additive in their effects against *in vitro* ruminal methane and ammonia formation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2019, 32(7): 966—976.
- [37] Varga G A, Kolver E S. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127: 819—823.
- [38] Banakar P S, Kumar S, Varada V V, *et al.* Dietary supplementation of *Aloe vera* extract modulates rumen microbes and improves the functional food value of milk by altering phenolic content, antioxidant capacity, and fatty acid profile in lactating goats. *Animal Biotechnology*, 2023, 34: 3027—3038.
- [39] Suong N T M, Paengkoum S, Purba R A P, *et al.* Optimizing anthocyanin-rich black cane (*Saccharum sinensis* Robx.) silage for ruminants using molasses and iron sulphate: A sustainable alternative. *Fermentation*, 2022, 8: 248.
- [40] Ma T, Chen D D, Tu Y, *et al.* Effect of dietary supplementation with resveratrol on nutrient digestibility, methanogenesis and ruminal microbial flora in sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2015, 99: 676—683.
- [41] Sun H, Zhang Y Z, Jiang F. Comparison of synergistic effects between cellulase and xylanases from different sources// *Proceedings of the 3rd National Symposium on the Application of Enzyme Preparations in the Feed Industry*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2009: 403—407.
- 孙赫, 张玉枝, 姜飞. 纤维素酶与不同来源的木聚糖酶之间协同效果的比较//第三届全国酶制剂在饲料工业中的应用学术研讨会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009: 403—407.
- [42] Hosoda K, Matsuo M, Miyaji M, *et al.* Fermentative quality of purple rice (*Oryza sativa* L.) silage and its effects on digestibility, ruminal fermentation and oxidative status markers in sheep: A preliminary study. *Grassland Science*, 2012, 58: 161—169.
- [43] Klyosov A A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. *Biochemistry*, 1990, 29(47): 10577—10585.