

氨基酸和蛋白质对瘤胃细菌生长的影响*

Effect of Amino acids and Protein on Rumen Microbial Growth

钟 诚

Zhong Cheng

(广西农业大学畜牧兽医系 南宁市秀灵路 13号 530005)

(Dept. of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Guangxi

Agricultural University, 13 Xiuling Road, Nanning, Guangxi, 530005)

摘要 用经洗涤的瘤胃细菌稀释液在体外作培养,确定不同的氨基酸刺激瘤胃细菌生长的效果。添加或不添加酪蛋白,由各种氨基酸组成的混合氨基酸对细菌的生长具有刺激作用。不管是否添加酪蛋白或水解酪蛋白,不同组合的氨基酸均不能刺激细菌的生长。当氨作为唯一的氮源时,它对细菌的生长无刺激性。瘤胃细菌的生长与培养基内的碳水化合物含量存在线性函数关系。结果显示,氨基酸和蛋白质对瘤胃细菌的刺激作用,决定于所提供的氨基酸和蛋白质种类的多少,而不是取决于某些特殊的限制性氨基酸。

关键词 瘤胃细菌 氨基酸 发酵

Abstract Effect of amino acid on rumen microbial growth was determined with washed cell suspensions in vitro. Rumen microbial growth was stimulated by complete amino acid mixtures with or without casein, but could not be stimulated by subgroups of amino acids with or without casein or casein hydrolysates. There was little growth apparent when ammonia as a sole nitrogen source. Rumen microbial growth was a linear function of amount of carbohydrate. Experiments demonstrated that the rumen microbial growth stimulation from both amino acids and proteins was subjected to the number of amino acids in a given mixture rather than the specific growth-limiting amino acids.

Key words ruminal microorganism, amino acid, fermentation

对反刍动物而言,瘤胃微生物不仅明显地影响瘤胃发酵的效率,而且也是重要的蛋白质来源之一。当瘤胃微生物生长速度缓慢的时候,可以引起瘤胃发酵效率下降,并可导致动物对低能量的饲料的采食量下降。研究表明^[1],饲料中的蛋白质在反刍动物瘤胃经过降解和消化后,其中一部分蛋白质可以产生氨基酸、蛋白多肽、挥发性脂肪酸和氨。在瘤胃微生物中,82%的微生物可以利用氨作为唯一的氮源而合成蛋白,25%的微生物在没有氨的状态下不能生长,56%的微生物既可以利用氨也可以利用氨基酸作为氮源而合成蛋白质^[2]。无论是体内或体外,无论是使用一种细菌培养或多种细菌混合培养,都说明某些氨基酸

可以很快的被细菌利用,而另外一些氨基酸则难以被细菌利用,即瘤胃微生物对某些氨基酸具有优先选择利用的可能性^[3,4]。蛋白质的组成的影响也是重要的,因为不同的氨基酸组合可以刺激瘤胃细菌的生长而可能产生不同的效果^[5,6]。因此,本实验的目的是使用混合的瘤胃细菌并在有氨存在的条件下进行培养,确定不同的氨基酸、水解酪蛋白和酪蛋白在培养基里刺激瘤胃细菌生长的效果。

1 材料和方法

1.1 实验动物和管理

本实验使用健康成年泌乳奶牛,体重 800 kg,每天饲喂 2 次 (8:00 和 16:00),饲料配方: 50% 苜蓿干草饼, 14% 全棉籽, 35% 混合谷物 (碎麦粒,碎玉米粒,棉籽粉,动物脂肪) 以及 1% 微量元素和维生素,每天二次泌乳后提供青料,青料和水自由采食

1995-11-16收稿

* 本研究由美国爱荷华州养牛协会资助,实验在爱荷华州立科技大学动物科学系反刍动物营养研究所完成。

1.2 瘤胃细菌接种培养液的制备

瘤胃细菌接种培养液是缓冲液,其组成和用量列于表 1 缓冲液配制后先调至 pH 中性,加热煮沸去氧冷却,使用前每升缓冲液加入碳酸钠 4 g,同时加入气体二氧化碳,直至碳酸钠完全溶解,最后再加入硫化钠 0.5 g

1.3 瘤胃液的采集和细菌的分离

瘤胃液在每天下午第二次饲喂前,通过永久性瘤胃瘘管采集。瘤胃液采集后,先经 8 层棉纱布过滤后装入事先已加热 (39°C) 的保温瓶内送回实验室。在实验室内,采集的瘤胃液先冲二氧化碳气体,直至饱和,然后装入厌氧离心管内,离心 (4°C, 260 r/min, 10 min), 分离去掉饲料颗粒和纤毛虫后,再次离心 (4°C, 2300 r/min, 10 min) 收集细菌,已形成颗粒状的细菌使用接种液冲洗 2 次,最后加入适量的接种液使细菌颗粒溶解,并使细菌在接种液中的光学密度 (A600 nm) 达到 0.2

表 1 瘤胃细菌培养接种培养液

Table 1 Rumen buffer solution

成分 Ingredient	数量 Amounts (mg/L)
磷酸氢二钾 K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	240
磷酸钾 K ₂ HPO ₄	240
硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄	240
氯化钠 NaCl	480
硫酸镁 MgSO ₄ · 7H ₂ O	100
氯化钙 CaCl ₂ · 2H ₂ O	64
刃天青 Resazurin	1
氯化血红素 Hemin	1
1, 4-萘喹酮 1, 4-naphthoquinone	2.5
乙酸 Acetate	5
挥发性脂肪酸 VFA ¹	0.2 [*]
维生素和微量元素 ²	0.2 [*]

* mmol/L

1 挥发性脂肪酸包括: 丙酸、异丁酸、异戊酸、二甲基丁酸, 戊酸各 0.2 mmol/L

VFA contained 0.2 mmol each of propionate, isobutyrate, isovalerate 2-methyl butyrate and valerate in one liter of medium.

2 维生素和微量元素各 0.2 mmol/L

0.2 mmol each of vitamins and minerals in one liter of medium

1.4 实验一

本实验使用的氨基酸组合一共 5 组,其组成和用量列于表 2 不同组合的氨基酸在配制时,每一组合

均达到等量的摩尔数,并相等于每升含量 25 g 的酪蛋白溶液。在培养之前,厌氧培养管内先加入 0.1 mL 碳水化合物混合液(混合液每升含葡萄糖、纤维二糖、果胶和可溶性淀粉各 1 mg),然后设立:基础氨基酸、可利用氮氨基酸、芳香性氨基酸、中性氨基酸、含硫氨基酸、混合氨基酸和水解酪蛋白培养管以及空白对照管,共八组。仅含氨基酸或水解酪蛋白的培养管内,分别加入相应氨基酸或水解酪蛋白溶液各 0.5 mL,仅含混合氨基酸的培养管中,除了不含有可利用氮氨基酸以外,包括有其他四种氨基酸组合(总量 0.5 mL),同时含有氨基酸组合+水解酪蛋白、或氨基酸组合+胰蛋白酶、或氨基酸组合+酪蛋白三种不同组合的培养管内,则氨基酸组合和其他组合物各 0.25 mL,三种组合中的氨基酸含量相等。各培养管用无菌蒸馏水加至 2.6 mL,然后再加入含有细菌的细菌接种液 7.4 mL。培养管在 37°C 水浴锅内厌氧培

Table 2 Different amino acid groups and amount

氨基酸组合 Amino acid group	组成 Composition	用量 Amount (mg/L)
基础氨基酸 Basic AA	赖氨酸 Lys	918.5
	精氨酸 Arg	453.9
	谷氨酰胺 Gln	734.8
	天冬酰胺 Asn	431.0
可利用氮氨基酸 Usable N A A	天冬氨酸 Asp	390.3
	天冬酰胺 Asn	431.0
	谷氨酸 Glu	1320.9
	谷氨酰胺 Gln	734.8
芳香性氨基酸 Aromatic AA	酪氨酸 Tyr	651.2
	苯丙氨酸 Phe	474.6
	组氨酸 His	376.7
	色氨酸 Try	146.5
中性氨基酸 Neutral AA	苏氨酸 Thr	213.7
	丝氨酸 Ser	605.0
	脯氨酸 Pro	702.6
	甘氨酸 Gly	243.0
	丙氨酸 Ala	288.1
	缬氨酸 Val	462.5
含硫氨基酸 Sulfur AA	异亮氨酸 Ile	518.2
	亮氨酸 Leu	801.3
	蛋氨酸 Met	268.0

N: 氮 Nitrogen; AA: 氨基酸 Amino acid

养 5 h 在培养期间, 每间隔 1 h 检查记录 1 次培养管的光学密度变化, 同时向培养管内添加 1 次混合碳水化合物溶液 (0.1 mL), 每种氨基酸组合同时培养 3 管 实验重复 2 次。

1.5 实验二

本实验使用的碳水化合物的含量为每升溶液中葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、纤维二糖和木糖各 4 g, 然后再分别稀释成 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL 溶液 氨基酸混合液含量为每升溶液每一种氨基酸 50 mg, 包括 19 种氨基酸和水解酪蛋白。胰蛋白酶溶液含量为每升 1 g 上述这两种溶液再分别稀释成 1.0, 10.0, 100.0 mg/mL 溶液 试验设计采用三因子混合试验: 四种氨基酸浓度, 空白、1.0 10.0 100.0 mg/mL; 四种胰蛋白酶浓度, 空白、1.0 10.0 100.0 mg/mL; 七种混合碳水化合物浓度, 空白、0.25 0.5 0.75 1.0 1.5 2.0 g/L; 共 112 支培养管 培养管先加无菌蒸馏水 3.0 mL, 经冲二氧化碳气体后密封, 保存在冰箱内过夜, 培养之前加入缓冲液 3.5 mL, 待刃天青分解后, 再加入 3.5 mL 已含细菌的细菌接种液。培养管在 37°C 条件下, 厌氧培养 6 h 后冰冻处理, 待作细菌 RNA 测定分析。整个试验重复 2 次。细菌 RNA 测定: 将含有细菌经冰冻处理的培养管在 25°C 条件下溶解, 每一培养管加入 1 mL 3.3 N 高氯酸, 混合充分, 酸化后的培养液转移到离心管中进行离心 (4°C, 5 000 r/min, 20 min), 离心后弃去离心管中的上清液, 加入 1.0 mL 0.3 N 氢氧化钾, 然后放置在室温中, 间隔性的摇荡使离心管中的细菌颗粒溶解 待细菌颗粒完全溶解后, 再放入 37°C 水浴锅中培养 1 h 最后, 试管放置在碎冰片中, 加入 0.4 mL 0.2 N 高氯酸, 10 min 后再次离心 (4°C, 5 000 r/min, 20 min), 离心后的上清液保留, 已形成颗粒的细菌颗粒用 2.0 mL 0.2 N 冰冷的高氯酸冲洗 1 次, 冲洗液与离心获得的上清液充分混合, 在分光光度计吸收波长为 260 nm 条件下测定细菌 RNA 的含量。

1.6 统计分析

实验一的结果, 采用方差分析比较各试验组合的差异显著性 实验二的结果, 采用回归分析的方法进行分析^[6]。

2 结果与分析

2.1 实验一的结果显示, 在刺激瘤胃细菌生长方面, 混合氨基酸比只含有氮的对照组和其它氨基酸组合具有较显著的差异性 ($P < 0.05$, 表 3), 在各氨基酸组合之间, 不存在显著性差异。与对照组比较,

酪蛋白和水解蛋白也能明显地刺激瘤胃细菌的生长 ($P < 0.01$); 虽然芳香性氨基酸组合和中性氨基酸组合有统计差异性, 但这种差异不十分显著。从表 3 的实验结果还可以看到, 当在培养管内增加水解酪蛋白后, 不同的氨基酸组合, 包括混合氨基酸组合在内, 与单独使用水解酪蛋白比较, 均无差异性 当在培养液中增加了酪蛋白后, 混合氨基酸组合比任何其它氨基酸组合更能刺激瘤胃细菌的生长。

表 3 经 5 h 厌氧培养后, 瘤胃细菌生长的光学密度变化

Table 3 Optical density of bacterial growth after incubation for 5 hours

氨基酸组合 Amino acid group	光密度 Optical density			
	氨基酸 Amino acids	水解酪蛋白 Casein hydrolysate	胰蛋白酶 Trypsase	酪蛋白 Casein
基础组 Basic AA	0.54	0.65	0.56	0.50
可利用氮组 Usable N AA	0.54	0.65	0.56	0.52
芳香性组 Aromatic AA	0.55	0.64	0.56	0.55
中性组 Neutral AA	0.56	0.64	0.57	0.54
含硫组 Sulfur AA	0.55	0.63	0.55	0.54
混合组 Complete AA	0.62	0.62	0.56	0.59
水解酪蛋白 Casein hydrolysates	0.64	0.54	0.55	
氨 Ammonia ²	0.51	0.54	0.41	0.40

1 所测定的数值为三个培养管的平均值 Averages of three cultures; 2 所有的培养管均含氮, 这里是空白对照 Samples contained ammonia only.

N: 氮 Nitrogen; AA: 氨基酸 Amino acid.

2.2 实验二结果表明, 瘤胃细菌的生长, 一方面是与碳水化合物的含量直接相关的, 随着碳水化合物含量的增加, 细菌生长的速度也增加 另一方面氨基酸和水解酪蛋白能明显地促进细菌的生长, 是加速细菌生长的有效的刺激剂 与仅含氮的空白管相比较, 含氨基酸和水解酪蛋白的培养管均能显著地刺激瘤胃细菌的生长 (表 4), 最大量的氨基酸和水解酪蛋白, 可使瘤胃细菌产生最大的生长效率 其中, 每升 1 mg 含量的氨基酸组合或水解酪蛋白, 可使瘤胃细菌生长加速 2 倍, 每升 10 mg 和 100 mg 含量的氨基酸组合

或水解酪蛋白可使瘤胃细菌生长分别加快 3倍和 4倍 (图 1)。把实验结果作回归分析后可以发现,若以仅含氮的空白对照管比较, 10 mg/L水解酪蛋白 (加上 0或 1 mg/L氨基酸)可使瘤胃细菌的平均生长率大于 10 mg/L氨基酸 (加上 0或 10 mg/L水解酪蛋白),相应地,前者明显地增进细菌的生长量 ($21.0 \mu\text{g RNA/mg}$ 碳水化合物),大于后者 ($18.3 \mu\text{g RNA/mg}$ 碳水化合物) ($P < 0.1$) ($y = 45.1 + 21.0x, r = 0.994$)。氨基酸,特别是缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸和脯氨酸以及包含这些氨基酸的水解蛋白质,在瘤胃发酵中可以转变成挥发性脂肪酸 (乙酸、异丁酸、二甲基丁酸、戊酸、异戊酸)和氨,它们可以刺激瘤胃细菌的生长^[8]。本实验在细菌接种液中已提供了足量的挥发性脂肪酸和氨。氨基酸也可以经过发酵转变成能量,但瘤胃细菌在生长过程中利用能量是可以忽略不计的^[9]。从图 1的直线回归分析中可以看到,如果细菌在生长中利用了氨基酸作为能量来源,则回归直线的截距值将会变大,但实际情况是,氨基酸在明显地促进细菌生长后,其相应的回归直线的截距值并无改变。因此,瘤胃细菌是直接利用氨基酸和水解酪蛋白而被刺激生长的,而不是通过能量、挥发性脂肪酸和氨而间接利用氨基酸和水解酪蛋白的。

表 4 经 6 h 厌氧培养后, 瘤胃细菌生长后细菌 RNA含量的测定

Table 4 Determination of rumen microbial RNA concentration after incubation for 6 hours

氨基酸浓度 Amino acid concentration (mg/L)	胰蛋白酶浓度 Trypsin concentrations ¹ (mg/L)			
	0	1	10	100
	—— ($\mu\text{g RNA}$ 培养管 $\mu\text{g RNA/culture}$) ——			
0	110.0	170.9	219.5	267.0
1	169.7	185.6	216.3	262.5
10	197.4	199.3	225.0	267.6
100	262.8	268.8	272.8	296.7

1. 所测定的数值均为二个培养管的平均值, 所有培养管都含有氨
Means of duplicate cultures, all samples contained ammonia.

在实验一中,各种不同的氨基酸组合,并不能有效地刺激瘤胃细菌的生长,只有混合氨基酸组合才能明显地促进瘤胃细菌的生长,这与前人的实验结果是一致的^[10]。它说明,氨基酸对瘤胃细菌生长产生刺激作用的程度,并不取决于某组或某些特定的氨基酸,而是取决于有多少种类的氨基酸。在实验二中,极少量的氨基酸或水解酪蛋白就能明显地刺激瘤胃细菌

图 1 在不同的氨基酸组合及浓度、水解酪蛋白浓度和不同的碳水化合物浓度下, 细菌培养 6 h 后的生长量 ($\mu\text{g RNA/mg}$ 碳水化合物)

Fig. 1 Microbial growth ($\mu\text{g RNA/mg}$ carbohydrate) after 6 hours of incubation with different concentrations of amino acids plus casein hydrolysates at different carbohydrate concentrations.

碳水化合物 (mg 培养管) Carbohydrates (mg/culture)
x 氨作为单一的氮源 Ammonia as a sole N source.
混合氨基酸 Complete amino acid \diamond 1 mg/L, \square 10 mg/L, \triangle 100 mg/L.

的生长,这说明氨基酸和水解酪蛋白能有效地被瘤胃细菌利用,是影响瘤胃细菌生长的重要因素。从图 1 中可以看到,如果按 100 mg/L 的剂量在培养管内分别添加氨基酸和水解酪蛋白,经过转换计算,将可以产生 255 g 细菌/kg 碳水化合物和 20.4 g 氮/kg 碳水化合物。 ($27.3 \mu\text{g RNA/mg}$ 碳水化合物 \times $1 \mu\text{g}$ 细菌 / $0.107 \mu\text{g RNA} = 225 \mu\text{g}$ 细菌 / mg 碳水化合物; $255 \text{ g 细菌 / kg 碳水化合物} \times 0.08 (\text{N}) = 20.4 \text{ g N / kg 碳水化合物}$)。这一估计值的细菌量与前人的实验结果十分接近^[11]。相比较而言,如果仅以氨作为单一的氮源,相应地它只可以分别产生 64.5 g 细菌和 5.2 g 氮/kg 碳水化合物。综上所述,瘤胃细菌的生长与碳水化合物的发酵存在着线性函数关系,瘤胃细菌对氨基酸和水解酪蛋白具有亲合性,它们可以十分有效地利用氨基酸和水解酪蛋白。

致谢

广西畜牧兽医学会理事、广西农业大学邹隆树教授审阅了本文,特此致谢

参考文献

1 Chen G C, J Siniffen, J B Russell. Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle. *Ef-*

fects of protein quantity, protein solubility, and feeding frequency. *J Dairy Sci.* 1987, 70: 983-989.

- 2 Bryant M P, I M Robinson. Some nutritional characteristics of predominant cultural ruminal bacteria. *J Bacteriol.* 1962, 84: 605-614.
- 3 Chalupa W. Degradation of amino acids by the mixed rumen microbial population. *J Anim Sci.* 1976, 43: 828-834.
- 4 Scheifinger C N Russel, W Chalupa. Degradation of amino acids by pure cultures of rumenbacteria. *J Anim Sci.* 1976, 43: 821-827.
- 5 Ben-Ghedalia, D N P McMeniman, D G Armstrong. The effect of partially replacing urea nitrogen with protein N on Ncapture in the rumen of sheep fed a purified diet. *Br J Nutr.* 1978, 39: 37-42.
- 6 Hume I D. Synthesis of microbial protein in the rumen III: the effect of dietary protein. *Aust J Agri Res.* 1970, 21:

305-310.

- 7 Nelder J R Mead. A simplex method for function minimization. *Comp J.* 1965, 7: 308-312.
- 8 Dehority B A, R R Johnson, O G Bentley et al. Studies on the metabolism of valine, proline, leucine and isoleucine by rumen microorganisms in vitro. *Arch Biochem Biophys.* 1958, 78: 15-23.
- 9 Russell J B, C J Sniffen, P J Van Soest. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumenbacteria. *J Dairy Sci.* 1983, 66: 763-771.
- 10 Maeng W J, C J Van Nevel, R L Baldwin et al. Rumen microbial growth rates and yields: Effect of amino acids and protein. *J Dairy Sci.* 1976, 59: 68-79.
- 11 Maeng W J, R L Baldwin. Factors influencing rumen microbial growth rates and yields: effects of urea and amino acids over time. *J Dairy Sci.* 1976, 59: 643-651.

(责任编辑 蒋汉明 邓大玉)

(上接第 61页 Continue from page 61)

度, 仅需 3~4 h 即可得出结果, 结果显示 G⁻菌组的血浆内毒素浓度不但明显高于正常对照组和无细菌感染组, 也明显高于非 G⁻菌感染组 (P 均 < 0.01), 这提示用 NCLA 测定血浆内毒素浓度的改变, 确实可以帮助诊断有无 G⁻菌的感染, 从而为临床选用抗生素提供了线索. 近年来发现, 引起肺炎, 尤其是医院内获得性肺炎的 G⁻菌是一些毒力相对低的菌群^[5], 机体受感染后常见的反应如发热、白细胞升高等往往表现不出来或表现不明显, 血浆内毒素也存在同样情况. 我们观察的 41 例 G⁻菌肺炎患者, 血浆内毒素浓度为 72.4 ± 36.1 Eu/L, 其中大于 115 Eu/L 8 例, 占 19.5%; 小于 115 Eu/L 33 例, 占 80.5%. 这意味着若使用凝胶法, 偶氮显色法等鲎试验, 将有约 80% 病例得不到阳性结果. NCLA 可检测出 2~6 Eu/L 的内毒素水平, 意味着毒力低的 G⁻菌感染也可以得到发现. 这显示 NCLA 不失为一种快

速、灵敏、有效的诊断方法。

参考文献

- 1 Jorgenson JH. Clinical application of the Limulus amoebocyte lysate test. In: Procter R A ed. Handbook of endotoxins. Vol 4. Elsevier science publishers Br. 1986. 127.
- 2 Piotrowicz BI, McCartney AC. Chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay for endotoxin: comparison of three commercial products. *Med Lab Sci.* 1987, 44: 89.
- 3 邓伟吾. 加强医院内获得性肺炎的防治研究. *中华结核和呼吸杂志*, 1994, 17 (2): 4.
- 4 Bates JH, Campbell GD, Barron AL et al. Microbial Etiology of Acute Pneumonia in Hospitalized Patients. *Chest.* 1992, 101 (4): 1005.
- 5 王爱霞, 贺联印. 重视免疫功能低下所致感染的诊断和治疗. *中华医学杂志*, 1991, 71 (12): 663.

(责任编辑 蒋汉明)