

苹果酸对山羊瘤胃发酵的影响

庞学东, 唐海翠, 庄 苏, 王 恬*, 刘 强

(南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘 要: 以 4 头装有永久性瘤胃瘘管的本地山羊为试验动物, 采用 4×4 拉丁方设计, 研究苹果酸 (0、5、10 和 15 g/d) 对山羊瘤胃发酵的影响。结果表明, 日粮中添加苹果酸显著提高了瘤胃 pH 和丙酸比例 ($P < 0.05$), 并显著降低了 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、乳酸浓度和乙丙比 (A/P) ($P < 0.05$)。添加苹果酸后 8 h 时, 5 g/d 和 10 g/d 处理组的乳酸浓度分别比对照组降低了 31% ($P < 0.05$) 和 29% ($P < 0.05$); 添加苹果酸后 2 h 时, 10 g/d 和 15 g/d 处理组的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度均比对照组降低了 30% ($P < 0.05$)。10 g/d 和 15 g/d 处理组乙丙比日平均值分别比对照组降低了 12% ($P < 0.05$) 和 22% ($P < 0.01$); 但各处理组总挥发性脂肪酸浓度 (TVFA) 未见明显变化。结果提示, 日粮添加苹果酸可以改变瘤胃发酵类型, 明显提高丙酸比例, 促进乳酸和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的利用。

关键词: 苹果酸; 山羊; 瘤胃; 发酵; 酸中毒

中图分类号: S826.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)11-1236-05

Effect of Malate at Different Concentration on Rumen Fermentation of Goats

PANG Xue-dong, TANG Hai-cui, ZHUANG Su, WANG Tian*, LIU Qiang

(College of Animal Science and Technology,

Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Four goats with permanent rumen fistulae in 4×4 Latin square design were used to study the effect of malate (0, 5, 10, 15 g/d) on rumen fermentation of goats. The results showed that the pH and propionate percentage increased significantly in rumen ($P < 0.05$), and the $\text{NH}_3\text{-N}$, lactate concentration and acetate to propionate ratio (A/P) decreased significantly in rumen ($P < 0.05$). The lactate concentration in 5 g/d and 10 g/d malate groups decreased respectively by 31% ($P < 0.05$) and 29% ($P < 0.05$) at 8 h compared with the control. Both of 10 g/d and 15 g/d malate groups decreased the $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration by 30% ($P < 0.05$) at 2 h compared with the control. Compared with the control, 10 g/d and 15 g/d malate groups decreased respectively average daily acetate to propionate ratio by 12% ($P < 0.05$) and 22% ($P < 0.01$). Average daily total volatile fatty acid (TVFA) concentration of all malate groups had no significant change compared with the control. The results suggested that based diets supplemented with malate could improve rumen fermentation type and increase the use of lactate and $\text{NH}_3\text{-N}$.

Key words: malate; goats; rumen; fermentation; acidosis

离子载体抗生素添加剂, 由于它们可以提高精料日粮条件下反刍动物的饲料利用率和日增重, 在

反刍动物生产中得到广泛的研究。但抗生素的使用也产生了负效应, 如耐药性和残留问题等。欧盟于

收稿日期: 2005-11-02

基金项目: 农业部农业结构调整重大技术研究专项 (2003-09-01B)

作者简介: 庞学东 (1979-), 男, 河南焦作人, 硕士, 主要从事反刍动物营养生理学研究

* 通讯作者: 王 恬 (1958-), 男, 江苏常州人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物营养与饲料科学等方面的研究工作

2002年5月25日决定在2006年之前,在动物饲料中禁用全部饲用抗生素^[1]。鉴于抗生素给人类和动物健康产生负效应的风险,许多研究集中在安全生长促进剂(如有机酸等)的使用。

苹果酸作为一种四碳二羧酸,普遍存在于生物体组织中,同时也是三羧酸循环的中间体^[2]。体外试验研究表明,苹果酸具有类似离子载体抗生素的作用,能够改善瘤胃发酵类型。到目前为止,还没有报道苹果酸的使用对反刍动物和人类存在负作用,苹果酸能否作为反刍动物离子载体型抗生素添加剂的替代品值得注意。本试验旨在研究苹果酸在反刍动物体内的应用效果,为寻求一种新型的瘤胃发酵调控剂提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物

选用4只体重(30±5) kg相近,装有永久性瘤

胃瘻管的本地阉割山羊,羊只健康无病。试验在南京农业大学农业部生理生化重点实验室动物房进行。

1.2 试验设计

试验采用4×4拉丁方设计。苹果酸(南京市食品添加剂厂提供,纯度99%)按每只羊每天0,5,10,15 g分两次与精料混合均匀一起饲喂,其中0 g为对照组,其它为试验组。整个试验分4期,每期试验期为13 d,其中预试期为10 d,正试期为3 d。

1.3 日粮组成及饲养制度

1.3.1 动物供给日粮一致。日粮粗蛋白和消化能参照《湖羊饲养标准》^[3]制定。日粮组成及每只羊每日饲喂量见表1。

1.3.2 试验动物均单栏舍饲,从预试期起每日上午09:00和晚21:00定量饲喂,每次精料300 g,青干草200 g。饲喂时,先将事先添加苹果酸的精料倒入饲槽内,待精料吃净后再饲喂青干草。自由饮水。

表1 山羊日粮配方

Table 1 The feed formula for the goats

	玉米 Corn	麸皮 Wheat bran	豆粕 Soybean meal	青干草 Hay	干物质/% Dry matter	粗蛋白/% Crude protein	消化能/(MJ/kg) Digestible energy
日粮组成 Ingredients/g	336	180	84	400	87	15.7	13.52

每只羊每日另补饲NaCl 6 g。Per goat fed 6 g NaCl daily

1.4 样品的采集与处理

在正试期期间,第一天早上饲喂前(0 h)、饲喂后6、12、18 h采集瘤胃液,第2天早上饲喂后2、8、14、20 h采集瘤胃液,第3天早上饲喂后4、10、16、22 h采集瘤胃液。瘤胃液通过四层纱布过滤,立即测定pH。然后将其置于-25℃冰柜冷冻保存,备用。

1.5 测定指标

pH值的测定采用便携式pH计测定;氨氮浓度的测定参照Weathburn等的方法^[4];VFA的测定参照秦为琳的方法进行^[5];乳酸浓度的测定采用比色法^[6]。

1.6 试剂与仪器

除VFA标准品为色谱级外,其他均为分析纯。主要仪器:便携式pH计(哈纳HI9025C),气相色谱仪(岛津GC-14B)和紫外分光光度计(UV-120-02)。

1.7 数据分析

所有数据经Excel(2003)初步整理后,采用SPSS(11.5)软件进行拉丁方统计分析,并用LSD法进行

多重比较,数据均为平均数±标准误($\bar{X} \pm SD$)。

2 结果与分析

2.1 瘤胃液pH的变化

由图1可见,试验各组饲喂后的瘤胃液pH昼夜动态变化趋势相似。试验各组pH在晨饲后开始下降,6 h达到最低值,然后逐渐回升,12 h恢复至饲喂前水平;试验各组pH在晚饲后4 h达到最低值,10 h恢复至饲喂前水平。其中10 g/d和15 g/d苹果酸处理组的pH值始终高于6.0。各处理组pH日平均值分别为:6.03(对照组)、6.12(5 g/d)、6.24(10 g/d)和6.35(15 g/d),以对照组最低,10 g/d和15 g/d处理组与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。日粮中添加苹果酸能够维持瘤胃微生物所需的正常pH范围,有利于瘤胃微生物对有机物的消化,同时也缓减了反刍动物因采食高精料日粮而导致瘤胃pH下降。

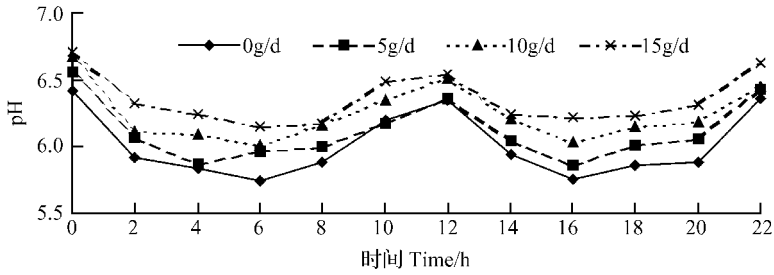


图1 苹果酸对瘤胃液 pH 的影响

Fig. 1 Effect of malate on pH in rumen liquid

2.2 瘤胃液中乳酸浓度的变化

由图2可见,试验各组饲喂后的瘤胃乳酸浓度昼夜动态变化趋势相似。晨饲后,瘤胃乳酸浓度降低,4 h达到最低,然后逐渐上升,12 h恢复至饲喂前水平。每个处理组夜间和白天乳酸浓度变化趋势

相似。与对照组相比,5、10和15 g/d处理组的乳酸浓度在0~22 h内均有降低的趋势。8 h时,5 g/d和10 g/d处理组的乳酸浓度分别比对照组降低了31% ($P < 0.05$)和29% ($P < 0.05$)。

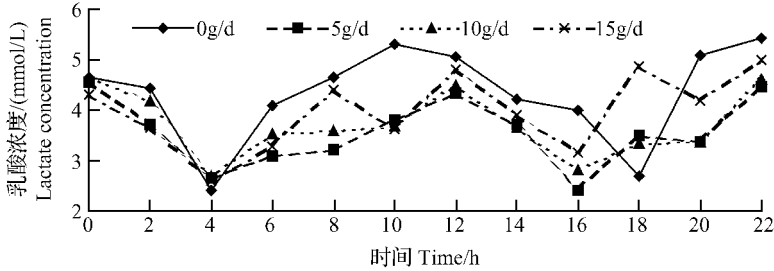


图2 苹果酸对瘤胃液乳酸浓度的影响

Fig. 2 Effect of malate on lactate concentration in rumen liquid

2.3 瘤胃液中氨氮浓度的变化

由图3可见,试验各组瘤胃液 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度24 h动态变化均表现为饲喂后升高趋势。4种处理的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度饲喂后2 h达到最大值,此后逐渐下降,6 h达到饲喂前水平,并保持到下次饲喂时间。试验各组与对照组相比,瘤胃液 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度有下降趋势,其中,5、10和15 g/d处理组在2 h显著低于对照组,分别比对照组降低了9% ($P > 0.05$)、30% ($P < 0.05$)和30% ($P < 0.05$),10 g/d和15 g/d在14 h显著低于对照组,分别比对照组降低了38% ($P < 0.05$)和37% ($P < 0.05$)。试验各组瘤胃液 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度日平均值分别为: 23.64 ± 5.50 mg/100 mL(对照组)、 19.41 ± 5.57 mg/100 mL(5 g/d)、 15.21 ± 4.35 mg/100 mL(10 g/d)和 14.22 ± 3.76 mg/100 mL(15 g/d),以对照组最高,其中10 g/d和15 g/d处理组与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。日粮中添加

苹果酸能够维持瘤胃内相对稳定的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度,有利于维持正常的瘤胃内环境,从而有利于促进瘤胃菌群对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的利用。

2.4 瘤胃液中各挥发性脂肪酸浓度及其比例的变化

不同剂量苹果酸对瘤胃液中乙酸(Acetate)、丙酸(Propionate)、丁酸(Butyrate)和总挥发性脂肪酸(TVFA)日平均值的影响见表2。与对照组相比,3个处理组A/P明显下降,呈一定的剂量效应 ($P < 0.05$)。5 g/d处理组A/P有所降低但未达到显著水平;10 g/d和15 g/d处理组A/P分别比对照组下降12.94% ($P < 0.05$)和22.33% ($P < 0.01$);但各处理组TVFA未见明显变化。A/P下降主要是丙酸比例增加所致,10 g/d和15 g/d处理组的丙酸较对照组升高11.79% ($P < 0.05$)和22.95% ($P < 0.01$)。

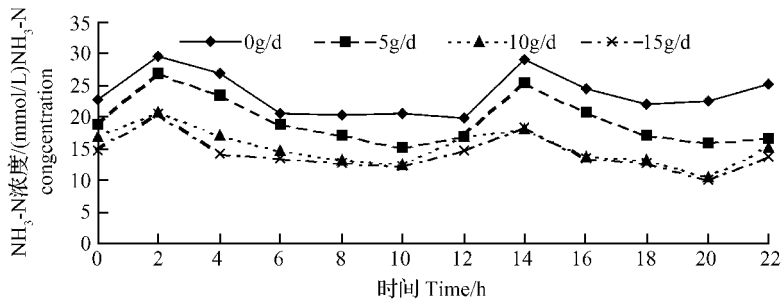
图3 苹果酸对瘤胃液 NH₃-N 浓度的影响Fig. 3 Effect of malate on NH₃-N concentration in rumen liquid

表2 苹果酸对山羊瘤胃液中 VFA 的影响

Table 2 Effect of malate on VFA in rumen liquid

剂量/(g/d) Dosage	乙酸/% A/TVFA	丙酸/% P/TVFA	丁酸/% B/TVFA	总挥发性脂肪酸/(mmol/L) TVFA	乙酸/丙酸 A/P
0	75.43	15.86	8.71	116.92±8.32	4.79±0.73
5	75.32	16.00	8.54	120.85±9.25	4.71±0.52
10	73.90	17.73*	8.37	127.10±11.22	4.17±0.42*
15	72.50	19.50**	8.00	126.24±10.59	3.72±0.39**

与对照相比 * . $P < 0.05$, ** . $P < 0.01$ 。Compared with control * . $P < 0.05$, ** . $P < 0.01$

3 讨论

3.1 苹果酸对瘤胃 pH 和乳酸浓度的影响

集约化饲养的反刍动物,因追求其生产水平而采用高精料日粮饲喂方式,这就导致了瘤胃内乳酸积累,pH下降,最终发生亚临床瘤胃酸中毒(Subacute ruminal acidosis, SARA),而且乳酸过多的产生对于动物也是能量的一种浪费。关于该病发病率的报道很少,但其造成的危害极大,应给予足够的重视^[7]。乳酸是瘤胃中重要的中间产物,瘤胃酸中毒的发生与瘤胃内乳酸浓度的关系密切。因此,降低乳酸的浓度对于维持瘤胃 pH 的稳定和防治瘤胃酸中毒具有重要意义。

本试验结果表明,高精料日粮条件下,日粮中添加苹果酸能够稳定瘤胃 pH,并降低瘤胃乳酸浓度。Carro 等^[8]以不同谷物(玉米、大麦、小麦和高粱)作底物,研究苹果酸(0、4、7 和 10 mmol/L DL-苹果酸)对瘤胃液体外发酵的影响。随着苹果酸添加量的增加,所有底物发酵后的 pH 值均线性增加,乳酸浓度下降,本试验结果与其报道一致。瘤胃乳酸浓度的降低,其原因可能是苹果酸刺激反刍兽新月形单胞菌(*Selenomonas ruminantium*)对乳酸的利用^[9],并且乳酸浓度的降低与本试验苹果酸提高瘤

胃 pH 是一致的,说明乳酸浓度的降低也是瘤胃 pH 升高的一个因素。

一般认为二碳酸盐能增加 CO₂ 量,从而提高了瘤胃液的缓冲能力。据 Callaway 报道,苹果酸处理能够提高瘤胃 CO₂ 的浓度^[10],CO₂ 也是乳酸通过反刍动物 *S. ruminantium* 琥珀酸-丙酸途径发酵成丙酸的一种终产物^[11]。因此,苹果酸处理通过两种机制缓冲瘤胃内容物的酸度,即刺激反刍动物 *S. ruminantium* 对乳酸的利用和增加 CO₂ 的产生。另外,与抗生素相反,苹果酸减少亚临床瘤胃酸中毒的发生,是通过刺激而不是抑制瘤胃细菌(如 *S. ruminantium*)菌群来达到目的。

3.2 苹果酸对瘤胃 NH₃-N 浓度的影响

氨态氮既是饲料蛋白、NPN 和内源含氮物质的产物,同时又是瘤胃微生物合成菌体蛋白的原料,其浓度不仅受到饲料蛋白的影响,而且受饲料能量水平、氮在瘤胃内的吸收、微生物的利用以及瘤胃食糜进入后段消化道速度的影响。

瘤胃微生物需要一定浓度的氨,最佳浓度范围为 8.5 mg/100 mL~30 mg/100 mL。本试验结果表明,日粮添加苹果酸后瘤胃 NH₃-N 浓度相对稳定,并有所下降。产生此结果的原因有两种可能:一是苹果酸能够促进瘤胃微生物对 NH₃-N 的利用,

以生产细菌蛋白,增加瘤胃细菌数量,同时可为动物本身提供氨基酸平衡性较好的微生物蛋白;二是瘤胃蛋白质降解减弱。Φrskov等^[12]报道,基础日粮类型对饲料蛋白质在瘤胃中的降解率有明显的影响,饲料蛋白质在以粗饲料为基础日粮条件下的降解率较高,但在以精饲料为基础日粮条件下则较低。瘤胃 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度降低的具体机理需要作进一步的研究。

3.3 苹果酸对瘤胃 VFA 浓度的影响

体外试验研究表明,发酵底物经苹果酸处理后,其最终发酵液的丙酸浓度和总挥发性脂肪酸浓度升高,乙丙比降低^[8]。本试验结果也表明,日粮中添加苹果酸可提高瘤胃液丙酸比例,降低瘤胃液乙丙比,改变瘤胃发酵类型。不像其它调控剂(如离子载体),是以消耗乙酸为代价来增加丙酸产量^[13]。有机酸,特别是苹果酸,能通过不同途径转化为丙酸和乙酸。因此,尽管日粮中添加苹果酸能够降低瘤胃乙丙比例($P < 0.05$)(与对照组相比),但瘤胃液中乙酸并不因日粮中添加了苹果酸而降低,这与 Russell等^[14]、Callaway等^[15]报道一致。

瘤胃液中丙酸比例的升高,有利于饲料能量利用率的提高。同时由于丙酸热效应(heat increment)比乙酸低^[16],所以丙酸更易于动物代谢利用^[17]。

4 结论

本试验结果表明,高精料日粮条件下添加苹果酸对反刍动物瘤胃发酵有一定的影响。另外,苹果酸是瘤胃微生物代谢途径的中间产物,可被微生物或其他生化反应所代谢利用,无残留,不存在微生物的耐药性、病原体抗药性转移和药物残留等问题。因此,苹果酸可以作为反刍动物(尤其是高产奶牛)离子载体型抗生素添加剂的替代品。

参考文献:

[1] McCartney E. Understanding EU feed additive regulations and a look into the future[A]. In Proceedings of the Alltech's 16th Annual European[C]. Middle Eastern and African Lecture Tour, 2002, 96~107.
 [2] Lehninger A L. Biochemistry[M]. 2nd Ed. New York: Worth Publishers, 1975.
 [3] 中国农业科学院兰州畜牧研究所. 湖羊饲养标准(试

行), 1986.

- [4] Weathburn M W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia [J]. *Analy Chem*, 1967, 39: 791~794.
 [5] 秦为琳. 应用气相色谱法测定挥发性脂肪酸的改进[J]. *南京农学院学报*, 1982, 5: 110~116.
 [6] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1997. 422~428.
 [7] Garrett E F, Pereira M N, Norlund K V. Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 1999, 82: 1 170~1 178.
 [8] Carro M D, Ranilla M J. Effect of the addition of malate on *in vitro* rumen fermentation of cereal grains[J]. *J Nut*, 2003, 89: 181~188.
 [9] Nisbet D J, Martin S A. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*[J]. *J Anim Sci*, 1991, 69: 4 628~4 633.
 [10] Callaway T R, Martin S A. Effects of organic acid and monensin treatment on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn[J]. *J Anim Sci*, 1996, 74: 1 982~1 989.
 [11] Gottschalk J. Bacterial Metabolism [M]. 2nd Ed. New York: Springer-Verlag, 1986.
 [12] Φrskov E R, McDonald I. The estimation of protein degradation in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage[J]. *J Agric Sci Camb*, 1979, 92: 499~503.
 [13] Russell J B, Strobel H J. Effects of ionophores on ruminal fermentation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55: 1~6.
 [14] Russell J B, Van Soest P J. *In vitro* ruminal fermentation of organic acids common in forage [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 47: 155~159.
 [15] Callaway T R, Martin S A. Effects of cellobiose and monensin on *in vitro* fermentation of organic acids by mixed ruminal bacteria[J]. *J Dairy Sci*, 1997, 80: 1 126~1 135.
 [16] Richardson L F, Raun A P, Potter E L, *et al.* Effect of monensin on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Anim Sci*, 1976, 43: 657.
 [17] Russel J B, Stroble H J. Effect of ionophores on ruminal fermentation [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 1~6.