

猪肠道微生物对不同分子结构蛋白质饲料源 氨基酸消失率的差异性

胡红 刘金艳* 孙卫忠 孙志洪 唐志如**

(西南大学动物科技学院,生物饲料与分子营养实验室,重庆 400715)

摘要: 本试验旨在研究猪肠道微生物对不同分子结构蛋白质饲料源(大豆蛋白质、大豆肽、单体氨基酸)氨基酸消失率的差异性。选取3头30 kg左右的健康生长猪,屠宰后分别无菌取50 mL空肠、回肠和盲肠内容物置于500 mL厌氧基础培养基中,梯度离心获得相应肠道微生物悬混液。在250 mL锥形瓶中加入50 mL厌氧基础培养基,先取5 mL空肠微生物悬混液接种于50 mL预热的培养基中培养4 h后取5 mL培养液用于氨基酸含量和酶活性测定,再加入5 mL回肠微生物悬混液继续培养4 h后取5 mL培养液用于氨基酸含量和酶活性测定,最后加入5 mL盲肠微生物悬混液继续培养4 h后取5 mL培养液用于氨基酸含量和酶活性测定。试验分为3组,分别为大豆蛋白质组(基础培养基+大豆蛋白质+微生物)、大豆肽组(基础培养基+大豆肽+微生物)和单体氨基酸组(基础培养基+单体氨基酸+微生物),另设1个负对照组(基础培养基+微生物),3个正对照组(基础培养基+大豆蛋白质、基础培养基+大豆肽和基础培养基+单体氨基酸),每组设3个重复。结果表明:空肠、回肠、盲肠中微生物对3种不同分子结构蛋白质饲料源的赖氨酸脱羧酶、精氨酸脱羧酶、组氨酸脱羧酶、甘氨酸脱羧酶、酪氨酸脱羧酶、谷草转氨酶、谷丙转氨酶和腺苷脱氨酶活性均有显著或极显著影响($P<0.05$ 或 $P<0.01$),单体氨基酸组酶活性整体上高于其他2组,3组间酶活性大小与氨基酸的消失率高低并不完全一致。不同分子结构蛋白质饲料源在加入不同肠道的微生物培养后氨基酸消失率存在极显著差异($P<0.01$)。大豆蛋白质组的氨基酸消失率由高到低依次为:盲肠、空肠、回肠,结构较为简单的大豆肽组和单体氨基酸组的氨基酸消失率由高到低依次为:回肠、盲肠、空肠,大豆蛋白质组的总氨基酸消失率最高。综上,在肠道微生物体外培养下,3种不同分子结构形式的蛋白质饲料源之间氨基酸的消失率存在较大差异,肠道微生物对大豆蛋白质的分解更活跃。

关键词: 氨基酸消失率;蛋白质饲料源;猪;肠道微生物;微生物脱羧酶

中图分类号:S816.4

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2019)12-5672-10

猪在消化过程中将蛋白质分解为氨基酸,利用氨基酸来合成机体蛋白质,因此饲料蛋白质的有效性取决于其氨基酸组成,猪真正需要的是氨基酸,而不是蛋白质本身^[1]。除宿主对氨基酸的代谢利用外,肠道微生物也能代谢利用氨基

酸^[2-5]。肠道微生物可降解氨基酸生成氨,氨在肠道中的浓度主要取决于微生物对氨利用和合成的净差^[6-7]。研究发现,添加抗生素能降低空肠和回肠中的微生物数量,减少微生物对氨基酸的代谢利用,使更多的氨基酸进入血液;也能增加进入大

收稿日期:2019-05-10

基金项目:国家自然科学基金(31772610,31872370);国家重点研发计划(2018YFD0501000);重庆市留学人才创新计划重点项目(cx2017024)

作者简介:胡红(1996—),女,重庆酉阳人,硕士研究生,研究方向为应用微生物。E-mail: 1064901695@qq.com

* 同等贡献作者

** 通信作者:唐志如,研究员,博士生导师,E-mail: tangzhiru2326@sina.com

肠的氨基酸数量,大肠微生物分解氨基酸产生大量有害物质,进而影响大肠健康^[8-9]。肠道微生物利用脱羧酶对谷氨酸脱羧产生代谢产物,如神经活性调节物质 γ -氨基丁酸^[2,5-6,9-10]。肠道微生物在肠道氨基酸代谢中十分重要。猪饲料不同分子结构蛋白质饲料氮源因营养代谢存在差异,进而改变猪的肠道微生物多样性^[10],使得肠道微生物各类代谢相关酶的活性和氨基酸的消失率产生差异,最终改变氮的排放量及饲料的有效利用率。印遇龙^[11]认为,可以在体外通过模拟动物的生理过程来预测机体的氨基酸消失量,氨基酸消失量与机体的代谢体重成恒定比例,消化道损失量与饲料干物质摄入量呈线性相关,并受肠腔内饲料蛋白质结构的影响^[12]。本试验通过分离猪肠道微生物体外研究猪肠道微生物对不同分子结构蛋白质饲料源(大豆蛋白质、大豆肽、单体氨基酸)氨基酸消失率的差异性响应规律。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验动物为 30 kg 左右的健康杜×长×大三元杂交猪。谷草转氨酶(glutamic-oxalacetic transaminase, GOT)、谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, GPT)、腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)生化试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。常规生化试剂购于上海生工生物工程股份有限公司。

厌氧基础培养基组分^[13]:每升溶液含有 0.6 g KCl, 0.6 g NaCl, 0.2 g CaCl₂ · 2H₂O, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 1 mL 刃天青溶液, 10 mL 微量矿物质溶液, 10 mL 氯化血红素溶液, 10 mL 脂肪酸溶液, 50 mL 碳酸氢盐溶液, 4 g 葡萄糖, 0.1 g NH₄Cl, 1.46 g KH₂PO₄, 3.55 g Na₂HPO₄。各溶液配方如下(除碳酸氢盐溶液外,所有储备溶液均储存于 4 ℃,各溶液均用蒸馏水配制)。

刃天青溶液:将 100 mg 刃天青溶解在 100 mL 水中。

微量矿物质溶液:依次添加 25 mg MnCl₂ · 4H₂O、20 mg FeSO₄ · 7H₂O、25 mg ZnCl₂、25 mg CuCl₂ · 2H₂O、50 mg CoCl₂ · 6H₂O、50 mg SeO₂、250 mg NiCl₂ · 6H₂O、250 mg Na₂MoO₄ · 2H₂O、31.4 mg NaVO₃、250 mg H₃BO₃ 至 20 mL 0.02 mol/L 盐酸溶液中,然后加入水定

容到 1 L。

氯化血红素溶液:将 100 mg 氯化血红素溶解在 5 mL 0.05 mol/L NaOH 溶液中,然后加入沸水(连续用 CO₂ 充气)制备氯化血红素溶液,加入水定容到 1 L。

脂肪酸溶液:将 6.85 mL 乙酸、3.00 mL 丙酸、1.84 mL 丁酸、0.55 mL 戊酸加入到 0.2 mol/L NaOH 溶液中,加入水定容到 1 L。

碳酸氢盐溶液:现配现用,将 8.2 g Na₂CO₃(无水)溶解在 100 mL 沸水(连续用 CO₂ 充气)中。

维生素/磷酸盐溶液:将 20.4 mg 生物素、20.5 mg 叶酸、164 mg D-泛酸钙、164.0 mg 烟酰胺、164.0 mg 核黄素、164.0 mg 硫胺-HCl、164.0 mg 吡哆醇-HCl、20.4 mg 对氨基苯甲酸、20.5 mg 氰钴胺素(维生素 B₁₂)加入到 1 L 含有 54.7 g KH₂PO₄ 的溶液中。使用前,过滤灭菌(通过 0.22 μm 过滤器)到无菌螺帽管中。

还原剂溶液:将 20.5 g Na₂S · 9H₂O 溶解在 1 L 沸水(用 CO₂ 连续充气)中,使用前高压灭菌。

1.2 试验方法

选取 3 头 30 kg 左右的健康杜×长×大三元杂交生长猪,屠宰后将其放置于手术台的无菌桌布上,用酒精消毒其皮肤表面,打开腹腔,找到空肠、回肠、盲肠位置,在空肠和回肠的中间部位选取 20~30 cm 长度,用无菌棉线将所需肠段两端打结,盲肠与回肠连接处打结,然后剪断结扎处外侧(不需要的肠段一侧),将空肠、回肠、盲肠 3 段组织分别放置于无菌白瓷盘内,在超净工作台内用无菌手术剪剪破肠段开一个小口,双手固定肠段,使内容物直接流入(或轻轻挤压)无菌容器内得到样本。然后取 50 mL 空肠、回肠、盲肠内容物分别置于 500 mL 厌氧基础培养基中梯度离心得到相应微生物悬混液。在 250 mL 锥形瓶中加入 50 mL 厌氧基础培养基,先取 5 mL 空肠微生物悬混液接种于 50 mL 预热的培养基中,培养 4 h 后取 5 mL 培养液用于氨基酸含量和酶活性测定;再加入 5 mL 回肠微生物悬混液继续培养 4 h 后,取 5 mL 培养液用于氨基酸含量和酶活性测定;最后加入 5 mL 盲肠微生物悬混液继续培养 4 h 后,取 5 mL 培养液用于氨基酸含量和酶活性测定。试验分为 3 组,分别为大豆蛋白质(soybean protein, SPT)组(基础培养基+大豆蛋白质+微生物)、大豆肽(soy-

bean peptide, SPP)组(基础培养基+大豆肽+微生物)、单体氨基酸(monomeric amino acid, MAA)组(基础培养基+单体氨基酸+微生物),另设1个负对照组(基础培养基+微生物),3个正对照组(基

础培养基+大豆蛋白质、基础培养基+大豆肽、基础培养基+单体氨基酸),每组设3个重复。各组培养基的氨基酸含量见表1,试验流程见图1。

表1 各组培养基的氨基酸含量

Table 1 Amino acid contents in culture medium of each group

mg/mL

项目 Items	大豆蛋白质组 SPT group	大豆肽组 SPP group	单体氨基酸组 MAA group
天冬氨酸 Asp	10.2	10.3	10.3
苏氨酸 Thr	3.7	3.5	3.6
丝氨酸 Ser	4.6	4.6	4.6
谷氨酸 Glu	15.6	16.4	16.0
甘氨酸 Gly	3.8	3.7	3.8
丙氨酸 Ala	4.0	3.9	4.0
半胱氨酸 Cys	1.1	1.1	1.1
缬氨酸 Val	4.2	4.3	4.3
蛋氨酸 Met	1.2	1.1	1.1
异亮氨酸 Ile	4.4	4.6	4.5
亮氨酸 Leu	7.4	7.8	7.6
酪氨酸 Tyr	3.2	3.7	3.5
苯丙氨酸 Phe	4.9	5.1	5.0
赖氨酸 Lys	5.7	5.7	5.7
组氨酸 His	2.6	2.5	2.6
精氨酸 Arg	7.4	7.8	7.6
脯氨酸 Pro	5.5	5.3	5.4
总氨基酸 TAA	89.7	91.4	90.6

1.3 氨基酸脱羧酶和转氨酶活性的测定

赖氨酸脱羧酶、精氨酸脱羧酶、组氨酸脱羧酶、甘氨酸脱羧酶、酪氨酸脱羧酶活性的测定参照唐志如等^[14]和赖星等^[15]的方法进行。根据南京建成生物工程研究所的试剂盒说明,用紫外分光光度计,采用比色法测定 GOT、GPT、ADA 活性。

1.4 氨基酸含量的测定

1.4.1 样品的前处理

准确称取培养液样品 100 mg 于 15 mm × 150 mm 试管中,向盛有样品的试管中加入 10 mL 6 mol/L HCl,振荡混匀。用酒精喷灯把该试管口下 1/3 处拉细到 4~6 mm,抽真空 10 min 后封管。处理过的试管置(110±1) °C 恒温烘箱中沙浴水解 22 h,拿出冷却至室温,摇匀过滤,取 1 mL 滤液于 50 mL 烧杯中,用 60 °C 恒温水浴蒸干滤液,加入 0.02 mol/L HCl 稀释 6 倍,用 0.22 μm 滤膜过滤上机分析。

1.4.2 分析条件

采用日立 L-8800 型全自动氨基酸分析仪测定氨基酸含量。1 个样品的分析周期为 53 min,配有 1) 分离柱: 4.6 mm × 60 mm,洗脱液流速 0.4 mL/min,柱温 70 °C,柱压 12.627 MPa; 2) 反应柱: 茚三酮及茚三酮缓冲液流速 0.35 mL/min,柱温 135 °C,柱压 1.078 MPa。

1.5 数据统计与分析

采用 SAS 9.0 统计软件对测量数据进行单因素方差分析和显著性检验,试验结果用平均值和标准误(SE)表示, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。氨基酸消失率(Dt)的计算公式^[5]如下:

$$D_t(\%) = \{ [AA_0] - [AA_t] - ([PC_0] - [PC_t]) - ([NC_0] - [NC_t]) / [AA_0] \} \times 100.$$

式中: D_t 为 t h 游离氨基酸的消失率; AA_0 为 0 h 试验组游离氨基酸含量; AA_t 为 t h 试验组游离氨基酸含量; PC_0 为 0 h 正对照组游离氨基酸含

量; PC_t 为 t h 正对照组游离氨基酸含量; NC_0 为 0 h 负对照组游离氨基酸含量; NC_t 为 t h 负对照组游离氨基酸含量。

2 结果与分析

2.1 不同分子结构蛋白质饲料源对猪肠道微生物酶活性的影响

由表 2 可知,接种空肠微生物培养 4 h 后,除 GOT 和 GPT 活性存在显著差异 ($P < 0.05$) 外,各组其他酶活性均存在极显著差异 ($P < 0.01$)。单体氨基酸组的精氨酸、甘氨酸、赖氨酸、组氨酸、酪氨酸脱羧酶和 ADA 活性均极显著高于大豆肽组和大豆蛋白质组 ($P < 0.01$);大豆蛋白质组除组氨酸脱羧酶外其他酶活性均显著高于大豆肽组 ($P < 0.05$)。因此空肠微生物氨基酸脱羧酶活性从高到低依次为:单体氨基酸组、大豆蛋白质组、大豆肽组。

接种回肠微生物培养 4 h 后,各组各种酶活性均存在极显著性差异 ($P < 0.01$)。大豆肽组的组氨酸、甘氨酸、酪氨酸脱羧酶和 GOT、GPT 活性均极显著高于单体氨基酸组和大豆蛋白质组 ($P < 0.01$);单体氨基酸组的组氨酸、甘氨酸脱羧酶和 GOT、GPT、ADA 活性均极显著高于大豆蛋白质组 ($P < 0.01$)。因此回肠微生物氨基酸脱羧酶和转氨酶活性从高到低依次为:大豆肽组、单体氨基酸组、大豆蛋白质组。回肠微生物 ADA 活性从高到低依次为:单体氨基酸组、大豆肽组、大豆蛋白质组。

接种盲肠微生物培养 4 h 后,单体氨基酸组和大豆肽组的精氨酸脱羧酶和 GOT 活性均显著高于大豆蛋白质组 ($P < 0.05$)。因此盲肠微生物部分酶活性从高到低依次为:单体氨基酸组、大豆肽组、大豆蛋白质组。

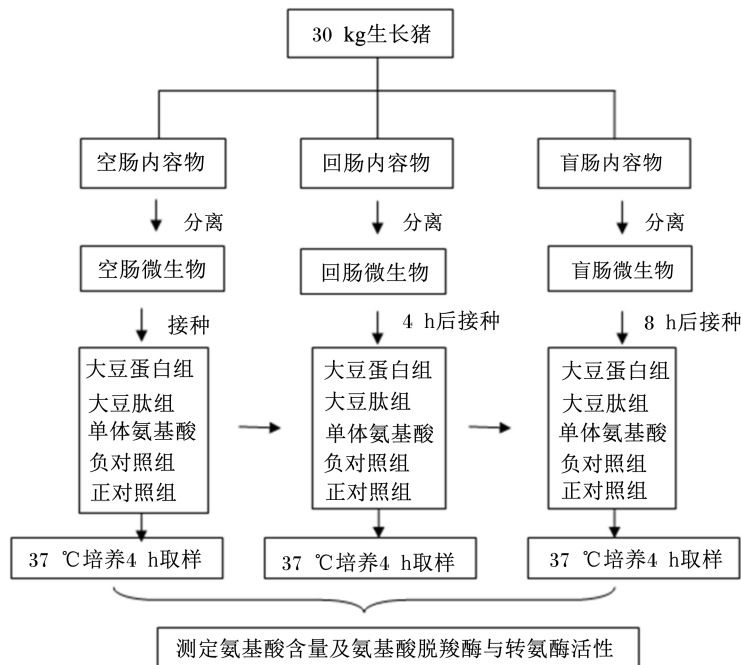


图 1 试验流程

Fig.1 Experiment procedure

2.2 不同分子结构蛋白质饲料源对猪肠道氨基酸消失率的影响

由表 3 可知,接种空肠微生物培养 4 h 后,大豆蛋白质组氨基酸均出现消失,其中蛋氨酸、异亮氨酸、缬氨酸消失程度最大。除单体氨基酸组的脯氨酸外,单体氨基酸组和大豆肽组的其他氨基

酸未出现消失。不同蛋白质饲料源氨基酸在空肠微生物作用下的消失率由高到低依次为:大豆蛋白质组、单体氨基酸组、大豆肽组。

接种回肠微生物培养 4 h 后,各组的氨基酸消失率均存在极显著差异 ($P < 0.01$)。单体氨基酸组除谷氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、赖氨酸、组氨

酸几种氨基酸的消失率极显著低于大豆肽组 ($P < 0.01$) 外, 单体氨基酸组的其他几种氨基酸及总氨基酸消失率均极显著高于大豆肽组 ($P < 0.01$), 特别是酪氨酸消失率。与空肠各氨基酸消失率相比, 在回肠中, 大豆肽组的各氨基酸的消失率均有

提高; 大豆蛋白质组只有半胱氨酸表现出有所消失, 但是消失率较低。不同蛋白质饲料源氨基酸在回肠微生物作用下的消失率由高到低依次为: 单体氨基酸组、大豆肽组、大豆蛋白质组。

表 2 不同分子结构蛋白质饲料源对猪肠道微生物酶活性的影响

Table 2 Effects of protein feed sources with different molecular structure on intestinal microbial enzyme activities of pigs ($n = 3$)

项目 Items	大豆蛋白质组 SPT group	大豆肽组 SPP group	单体氨基酸组 MAA group	SE	P 值 P -value
加空肠微生物培养 4 h 后 Jejunal microbial was inoculated and cultured for 4 h					
赖氨酸脱羧酶 Lys decarboxylase	0.285 ^B	0.027 ^C	0.748 ^A	0.043	<0.01
精氨酸脱羧酶 Arg decarboxylase	0.415 ^B	0.052 ^C	1.362 ^A	0.014	<0.01
组氨酸脱羧酶 His decarboxylase	0.477 ^{Ba}	0.441 ^{Ba}	2.184 ^A	0.224	<0.01
甘氨酸脱羧酶 Gly decarboxylase	0.124 ^B	0.012 ^C	0.444 ^A	0.009	<0.01
酪氨酸脱羧酶 Tyr decarboxylase	0.040 ^B	0.007 ^C	0.075 ^A	0.007	<0.01
谷草转氨酶 GOT	32.273 ^a	4.768 ^c	15.425 ^b	4.618	<0.05
谷丙转氨酶 GPT	53.470 ^a	3.420 ^c	28.340 ^b	8.898	<0.05
腺苷脱氨酶 ADA	45.960 ^B	9.720 ^C	157.990 ^A	10.516	<0.01
加回肠微生物培养 4 h 后 Ileum microbial was inoculated and cultured for 4 h					
赖氨酸脱羧酶 Lys decarboxylase	0.179 ^{Aa}	0.051 ^B	0.232 ^{Aa}	0.024	<0.01
精氨酸脱羧酶 Arg decarboxylase	0.505 ^A	0.139 ^{Ba}	0.224 ^{Ba}	0.028	<0.01
组氨酸脱羧酶 His decarboxylase	0.040 ^C	4.010 ^A	1.735 ^B	0.138	<0.01
甘氨酸脱羧酶 Gly decarboxylase	0.040 ^C	0.166 ^A	0.090 ^B	0.003	<0.01
酪氨酸脱羧酶 Tyr decarboxylase	0.036 ^{Ba}	0.125 ^A	0.044 ^{Ba}	0.011	<0.01
谷草转氨酶 GOT	18.850 ^C	60.350 ^A	29.800 ^B	0.756	<0.01
谷丙转氨酶 GPT	12.600 ^C	46.650 ^A	18.700 ^B	1.554	<0.01
腺苷脱氨酶 ADA	14.600 ^C	110.400 ^B	134.600 ^A	4.630	<0.01
加盲肠微生物培养 4 h 后 Cecal microbial was inoculated and cultured for 4 h					
赖氨酸脱羧酶 Lys decarboxylase	0.184 ^B	0.144 ^C	0.108 ^A	0.011	<0.01
精氨酸脱羧酶 Arg decarboxylase	0.144 ^C	0.172 ^A	1.149 ^B	0.079	<0.01
组氨酸脱羧酶 His decarboxylase	1.220 ^b	1.223 ^b	1.846 ^a	0.135	<0.05
甘氨酸脱羧酶 Gly decarboxylase	0.074 ^b	0.138 ^a	0.123 ^{ab}	0.015	<0.05
酪氨酸脱羧酶 Tyr decarboxylase	0.092 ^{Ba}	0.157 ^A	0.084 ^{Ba}	0.010	<0.01
谷草转氨酶 GOT	3.500 ^b	22.330 ^a	19.500 ^a	3.778	<0.05
谷丙转氨酶 GPT	2.300 ^{Ba}	12.800 ^{Ba}	46.430 ^A	5.218	<0.01
腺苷脱氨酶 ADA	44.430 ^{Aa}	23.600 ^B	58.500 ^{Aa}	5.109	<0.01

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letter superscripts mean extremely significant difference ($P < 0.01$). The same as below.

接种盲肠微生物培养 4 h 后, 大豆肽组和单体氨基酸组大多数氨基酸及总氨基酸的消失率极显著低于大豆蛋白质组 ($P < 0.01$)。不同蛋白质饲料源氨基酸在盲肠微生物作用下的消失率由高到低依次为: 大豆蛋白质组、单体氨基酸组、大豆肽组。

综合空肠、回肠、盲肠中各氨基酸消失率可得出: 大豆蛋白质组的氨基酸在空肠和盲肠均有消失, 并且消失率都是最高, 消失程度表现为空肠小于盲肠; 大豆肽组的氨基酸除谷氨酸、半胱氨酸、赖氨酸外, 其他氨基酸在回肠、盲肠中均是逐渐消

失的;单体氨基酸组的氨基酸消失基本在回肠,在 盲肠中也有消失,但是只是部分氨基酸。

表 3 不同分子结构蛋白质饲料源对猪肠道氨基酸消失率的影响

Table 3 Effects of protein feed sources with different molecular structures on amino acid disappearance rates of pig intestines ($n=3$)

项目 Items	大豆蛋白质组 SPT group	大豆肽组 SPP group	单体氨基酸组 MAA group	SE	P 值 P-value
加空肠微生物培养 4 h 后 Jejunal microbial was inoculated and cultured for 4 h					
天冬氨酸 Trp	24.47	ND	ND	—	—
苏氨酸 Thr	33.48	ND	ND	—	—
丝氨酸 Ser	24.86	ND	ND	—	—
谷氨酸 Glu	19.62	ND	ND	—	—
甘氨酸 Gly	33.58	ND	ND	—	—
丙氨酸 Ala	37.86	ND	ND	—	—
半胱氨酸 Cys	37.59	ND	ND	—	—
缬氨酸 Val	42.85	ND	ND	—	—
蛋氨酸 Met	40.41	ND	ND	—	—
异亮氨酸 Ile	42.87	ND	ND	—	—
亮氨酸 Leu	34.51	ND	ND	—	—
酪氨酸 Tyr	31.06	ND	ND	—	—
苯丙氨酸 Phe	32.76	ND	ND	—	—
赖氨酸 Lys	29.35	ND	ND	—	—
组氨酸 His	34.12	ND	ND	—	—
精氨酸 Arg	27.61	ND	ND	—	—
脯氨酸 Pro	29.04 ^A	ND	48.12 ^B	1.83	<0.01
总氨基酸 TAA	29.82	ND	ND	—	—
加回肠微生物培养 4 h 后 Ileum microbial was inoculated and cultured for 4 h					
天冬氨酸 Trp	ND	16.32 ^B	39.59 ^A	0.793	<0.01
苏氨酸 Thr	ND	18.12 ^B	33.59 ^A	0.781	<0.01
丝氨酸 Ser	ND	18.97 ^B	80.85 ^A	0.723	<0.01
谷氨酸 Glu	ND	13.94 ^A	3.16 ^B	0.713	<0.01
甘氨酸 Gly	ND	17.24 ^B	20.63 ^A	0.743	<0.01
丙氨酸 Ala	ND	17.22 ^A	11.68 ^B	0.753	<0.01
半胱氨酸 Cys	1.16 ^C	10.66 ^B	27.05 ^A	0.693	<0.01
缬氨酸 Val	ND	15.01 ^A	13.03 ^B	0.773	<0.01
蛋氨酸 Met	ND	11.06 ^B	16.83 ^A	0.761	<0.01
异亮氨酸 Ile	ND	15.64 ^B	21.77 ^A	0.793	<0.01
亮氨酸 Leu	ND	16.52 ^A	15.24 ^B	0.691	<0.01
酪氨酸 Tyr	ND	17.19 ^B	234.89 ^A	0.723	<0.01
苯丙氨酸 Phe	ND	16.55 ^B	17.97 ^A	0.793	<0.01
赖氨酸 Lys	ND	17.81 ^A	13.06 ^B	0.793	<0.01
组氨酸 His	ND	17.27 ^A	14.87 ^B	0.734	<0.01
精氨酸 Arg	ND	19.80 ^B	21.45 ^A	0.756	<0.01
脯氨酸 Pro	ND	17.06 ^B	37.72 ^A	0.736	<0.01
总氨基酸 TAA	ND	16.54 ^B	27.95 ^A	0.693	<0.01
加盲肠微生物培养 4 h 后 Cecal microbial was inoculated and cultured for 4 h					
天冬氨酸 Trp	69.64 ^B	4.51 ^C	84.55 ^A	0.321	<0.01
苏氨酸 Thr	66.69 ^A	17.64 ^C	35.42 ^B	0.381	<0.01
丝氨酸 Ser	68.42 ^B	12.56 ^C	81.17 ^A	0.331	<0.01
谷氨酸 Glu	72.15 ^A	ND	7.04 ^B	0.343	<0.01

续表 3

项目 Items	大豆蛋白质组 SPT group	大豆肽组 SPP group	单体氨基酸组 MAA group	SE	P 值 P-value
甘氨酸 Gly	69.64 ^A	5.77 ^B	ND	0.311	<0.01
丙氨酸 Ala	68.11 ^A	4.83 ^B	ND	0.311	<0.01
半胱氨酸 Cys	53.05 ^A	ND	27.06 ^B	0.341	<0.01
缬氨酸 Val	67.78 ^A	22.31 ^B	2.04 ^C	0.331	<0.01
蛋氨酸 Met	70.75 ^A	53.66 ^B	3.01 ^C	0.391	<0.01
异亮氨酸 Ile	70.61 ^A	23.51 ^B	0.18 ^C	0.245	<0.01
亮氨酸 Leu	71.14 ^A	23.43 ^B	2.74 ^C	0.325	<0.01
酪氨酸 Tyr	69.27 ^A	21.36 ^B	ND	0.341	<0.01
苯丙氨酸 Phe	72.16 ^A	18.91 ^B	ND	0.399	<0.01
赖氨酸 Lys	68.43	ND	ND	-	-
组氨酸 His	67.29 ^A	6.71 ^B	ND	0.331	<0.01
精氨酸 Arg	70.83 ^{Ba}	9.47 ^C	18.20 ^{Ba}	0.367	<0.01
脯氨酸 Pro	65.33 ^A	4.20 ^B	ND	0.381	<0.01
总氨基酸 TAA	69.55 ^A	4.39 ^C	6.95 ^B	0.431	<0.01

ND 代表没有消失。ND indicates not disappeared.

由图 2 可知,大豆蛋白质组的总氨基酸消失率在空肠和盲肠中都远远高于大豆肽组和单体氨基酸组,在盲肠中最高接近 70%;而大豆肽组和单体氨基酸组的总氨基酸消失率最高也未达到 30%,在盲肠中未达到 10%。总体上大豆蛋白质组的总氨基酸消失率最高。

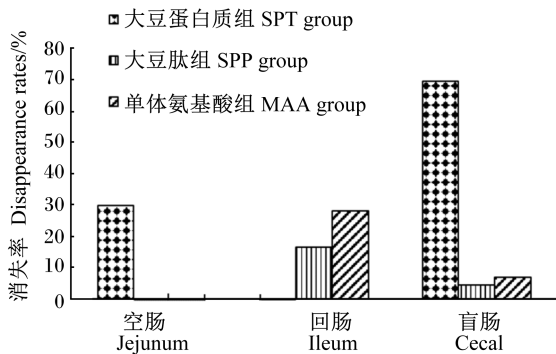


图 2 各组不同肠段总氨基酸消失率比较

Fig.2 Comparison of total amino acid disappearance rates in different intestinal segments of each group

3 讨论

对比微生物脱羧酶、转氨酶、脱氨酶活性和氨基酸消失率结果,可以发现:在空肠中,大豆蛋白质组的各脱羧酶活性处于中等水平,GOT 和 GPT 活性较高,但其氨基酸消失率却是最高,其他分子

结构相对简单的 2 组几乎没有氨基酸消失;到回肠后,大豆肽组和单体氨基酸组的各种酶活性和氨基酸消失率同时上升,而大豆蛋白质组的酶活性低且几乎没有氨基酸消失;到盲肠后,大豆蛋白质组的酶活性又达到最高,氨基酸消失率也处于最高水平,其他 2 组酶活性低,但是也有部分氨基酸消失,其氨基酸消失率远远低于大豆蛋白质组。本试验中,各种酶活性大小与氨基酸消失率高低并不完全一致,原因可能是除脱羧酶、转氨酶的作用外,氨基酸消失还有其他途径,可能被微生物直接吸收,或是脱氨酶等的作用^[16],微生物酶对氨基酸的代谢作用并非占主导地位,这一点还需要进一步研究^[17]。赖星等^[15]研究发现,饲料粗蛋白质水平显著影响肠道微生物酶活性,这是肠道微生物对氨基酸差异性降解和动物对蛋白质利用率低的原因之一,可见微生物酶与饲料蛋白质的利用存在很大关系^[18],本试验中大豆蛋白质组的总氨基酸消失率最高。对比不同肠段可以发现,氨基酸消失率存在肠段特异性,这与戴兆来^[19]的研究结果存在一致性。

结构较简单的两组氨基酸分解力度由高到低依次为:回肠、盲肠、空肠。环境中氨基酸存在时微生物才会产生相应的酶来分解该氨基酸,在初期,大豆肽组中游离氨基酸很少,因此空肠微生物的氨基酸脱羧酶活性还不高,并且酶活性受 pH

影响,有研究表明饲料成分等因素影响培养环境的 pH,且越到后肠道 pH 越高^[9],所以在空肠中大豆肽组的氨基酸基本上没有消失;到了盲肠,微生物多样性不同于空肠^[20],环境中的 pH 等影响酶发挥活性的因素也达到适合条件后,氨基酸才开始消失^[21]。但是,本试验中大豆肽组的氨基酸消失率一直都很低,在动物肠道中蛋白质和肽段并不是只有分解为氨基酸后才能进行消化吸收,邓敦等^[12]指出小肽的吸收具有速度快、耗能低及能避免与氨基酸竞争等特点,且可以直接通过转运系统吸收,因此对肽的吸收可能主要集中于转运系统而非微生物脱羧酶作用。对于单体氨基酸组,在各种氨基酸的刺激下,微生物快速产生大量氨基酸脱羧酶,在空肠时各种氨基酸脱羧酶的活性已经达到最大值,但是此时该处环境或许还未达到酶发挥活性的最佳条件,且受微生物多样性差异等的影响^[20],在空肠时酶活性虽然高,但却没有太多氨基酸消失;到回肠时,pH、渗透压等影响酶发挥活性的因素都达到适合条件,氨基酸才开始大量消失。小肠末端吸收的氨基酸高达饲料氨基酸摄入量的 35%,本试验中单体氨基酸组氨基酸基本在回肠消失,结果与前人研究存在一致性^[11,22-23]。总体上,单体氨基酸组的总氨基酸消失率大于大豆肽组。

大豆蛋白质组的氨基酸分解力度由高到低依次为:盲肠、空肠、回肠。在空肠中,由于缺少游离氨基酸刺激微生物生成脱羧酶,大豆蛋白质组的氨基酸脱羧酶活性低,氨基酸消失率也不高,但均高于其他两组;到回肠时反而没有氨基酸消失,原因可能是由于微生物的作用,氨基酸的合成与分解同时进行,形成动态平衡,所以基本上不能检测到氨基酸消失;到了盲肠,微生物多样性更丰富^[5],代谢更旺盛,氨基酸才开始大量分解^[11]。Dai 等^[22]研究认为,小肠中的细菌氨基酸代谢是高度区室化的,在小肠细菌中以种类和肠道依赖性方式对氨基酸进行代谢,空肠混合细菌和回肠混合细菌的氨基酸代谢是不同的,而盲肠属于大肠,与空肠、回肠的区别应该会更大,这种多样性可能有助于肠道内的氨基酸稳态。张福哲^[8]研究也发现,蛋氨酸和苯丙氨酸在盲肠的消失率要大于回肠,盲肠微生物代谢产生的短链脂肪酸量是最多的,说明盲肠微生物代谢的活跃,与本试验结果相似。

总体来说,从空肠、回肠到盲肠,越靠近后肠段微生物对各种氨基酸的代谢越高,这一结果与余凯凡等^[24]对蛋氨酸的体外代谢研究结果一致。戴求仲等^[25]认为,现行的猪回肠末端氨基酸真消化率可作为预测消化道氨基酸吸收的最佳方法,可见后肠道微生物对氨基酸代谢的重要性是公认的。刘颖^[26]对梅山猪的研究发现,不同肠段微生物优势菌存在差异,这对氨基酸的消失率也会带来影响。大豆蛋白质组的总氨基酸消失率最高,其原因可能是肠道微生物在长期的进化过程中,传统的饲料都是大豆蛋白质或其他蛋白质,并未直接饲喂单体氨基酸或者多肽。Lamendella 等^[27]对猪肠道微生物宏基因组研究发现,存在与抗生素和碳水化合物代谢抗性相关的基因,这表明猪肠道微生物组可以通过饲养方法形成,所以也存在肠道微生物的种类更适合对饲料蛋白质进行代谢,而对单体氨基酸和多肽并不敏感。Isaacson 等^[20]也认为肠道微生物组的细菌成分随着动物的进展而紧密地进化,这样做有助于动物的整体发育和代谢需要。

4 结 论

① 体外培养条件下,结构较复杂的蛋白质在盲肠中的氨基酸消失率最大,结构较简单的大豆肽和单体氨基酸主要在回肠消失。

② 总体上,大豆蛋白质组的总氨基酸消失率最高,肠道内微生物对蛋白质形式的大豆蛋白质分解代谢更旺盛。

③ 与前肠段相比,后肠段微生物对不同分子结构蛋白质饲料源的分解更旺盛。

参考文献:

- [1] HOLDEN P J, ENSMINGER M E. 养猪学[M]. 王爱国译. 7 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2007: 105-251.
- [2] WU G Y, BAZER F W, DAI Z L, et al. Amino acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond[J]. Annual Review of Animal Biosciences, 2014, 2(1): 387-417.
- [3] WU G Y, WU Z L, DAI Z L, et al. Dietary requirements of "nutritionally non-essential amino acids" by animals and humans[J]. Amino Acids, 2013, 44(4): 1107-1113.
- [4] WU G Y. Dietary requirements of synthesizable amino

- acids by animals: a paradigm shift in protein nutrition [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2014, 5: 34.
- [5] 张京. 猪小肠氨基酸代谢菌的分离和鉴定 [D]. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2009: 1-47.
- [6] 卫旭彪, 张璐璐, 斯大勇, 等. 肠道菌群对氨基酸的分解及其产物对宿主的作用 [J]. *饲料工业*, 2017, 38 (16): 41-44.
- [7] 谭碧娥, 王婧, 印遇龙. 仔猪肠道发育和氨基酸营养调控机制 [J]. *农业现代化研究*, 2018, 39 (6): 970-976.
- [8] 张福哲. 体外培养猪大肠微生物对蛋氨酸和苯丙氨酸的代谢特性研究 [D]. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2015: 1-21.
- [9] LOOFT T, ALLEN H K, CANTAREL B L, et al. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations [J]. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 2014, 8 (8): 1566-1576.
- [10] JI Y J, GUO Q P, YIN Y L, et al. Dietary proline supplementation alters colonic luminal microbiota and bacterial metabolite composition between days 45 and 70 of pregnancy in *Huanjiang* mini-pigs [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2018, 9: 18.
- [11] 印遇龙. 猪氨基酸营养与代谢 [M]. 北京: 科学出版社, 2008: 129-130.
- [12] 邓敦, 王米. 小肽在单胃动物中的研究与应用 [J]. *饲料研究*, 2005 (1): 1-3.
- [13] DAI Z L, ZHANG J, WU G Y, et al. Utilization of amino acids by bacteria from the pig small intestine [J]. *Amino Acids*, 2010, 39 (5): 1201-1215.
- [14] 唐志如, 邓欢, 孙志洪, 等. 一种快速定量检测氨基酸脱羧酶的比色方法: 中国, 201410444552 [P]. 2014-09-03.
- [15] 赖星, 石宝石, 刘金艳, 等. 日粮蛋白水平对生长育肥猪肠道微生物酶活性的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2017, 37 (2): 327-334.
- [16] 曹克飞. 不同氮源对猪肠道微生物多样性及主要产蛋白酶菌株的影响 [D]. 硕士学位论文. 长春: 吉林农业大学, 2016: 1-15.
- [17] TRÖSCHER-MUBOTTER J, TILOCCA B, STEFANSKI V, et al. Analysis of the bacterial and host proteins along and across the porcine gastrointestinal tract [J]. *Proteomes*, 2019, 7 (1): E4.
- [18] 杨宇翔. 消化道微生物对猪和大鼠氨基酸代谢的影响 [D]. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2016: 1-97.
- [19] 戴兆来. 猪小肠微生物氨基酸代谢的生态学分析 [D]. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2010: 1-118.
- [20] ISAACSON R, KIM H B. The intestinal microbiome of the pig [J]. *Animal Health Research Reviews*, 2012, 13 (1): 100-109.
- [21] 饶辉. 影响断奶仔猪胃肠道 pH 值及胃蛋白酶活性的因素 [J]. *猪业科学*, 2008 (6): 58-60.
- [22] DAI Z L, LI X L, XI P B, et al. Metabolism of select amino acids in bacteria from the pig small intestine [J]. *Amino Acids*, 2012, 42 (5): 1597-1608.
- [23] 武振龙, 伍国耀. 猪蛋白质营养与代谢研究的新发现和展望 [J]. *中国畜牧杂志*, 2018, 54 (7): 1-5.
- [24] 余凯凡, 张福哲, 朱伟云. 猪不同肠段微生物体外培养对蛋氨酸的代谢特性 [J]. *微生物学报*, 2018, 58 (5): 784-792.
- [25] 戴求仲, 印遇龙, 王康宁, 等. 生长猪内脏器官氨基酸代谢及其营养调控研究 [C] // 中国畜牧兽医学会儿动物营养学分会第九届学术研讨会. 重庆: 中国畜牧兽医学会儿, 2004: 250-260.
- [26] 刘颖. 梅山猪不同发育阶段肠道微生物变化及免疫调控机制分析 [D]. 博士学位论文. 扬州: 扬州大学, 2018: 91-102.
- [27] LAMENDELLA R, DOMINGO J W S, GHOSH S, et al. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut [J]. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 103.

Differences of Pig Intestinal Microbes on Amino Acid Disappearance Rates of Protein Feed Sources with Different Molecular Structure

HU Hong LIU Jinyan* SUN Weizhong SUN Zhihong TANG Zhiru**

(Key Laboratory for Bio-Feed and Molecular Nutrition, College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the differences of pig intestinal microbes on amino acid disappearance rates of protein feed sources (soybean protein, soybean peptide and monomeric amino acid) with different molecular structure. Three about 30 kg healthy growing pigs were selected and slaughtered, 50 mL jejunum, ileum and cecal digesta were sterile collected into 500 mL anaerobic basal medium, respectively, and jejunum, ileum and cecal microbial suspensions were got by gradient centrifugation. Firstly, 50 mL anaerobic basal medium were added into 250 mL conical flask, and 5 mL jejunal microbial suspension were inoculate into 50 mL preheated anaerobic basal medium. After cultured for 4 h, 5 mL jejunal culture medium were taken for the determination of amino acids contents and enzymes activities and 5 mL ileal microbial suspension were inoculate into the above culture medium. Secondly, after cultured for another 4 h, 5 mL ileal culture medium were taken for the determination of amino acid contents and enzyme activities and 5 mL cecal microbial suspension were inoculate into the above culture medium. After cultured for another 4 h, 5 mL cecal culture medium were taken for the determination of amino acid contents and enzyme activities. The experiment consisted of 3 groups, soybean protein group (basal medium+soybean protein+microbes), soybean peptide group (basal medium+soybean peptide+microbes) and monomeric amino acid group (basal medium+monomeric amino acid+microbes), and 1 negative control group (basal medium+microbes) and 3 positive control groups (basal medium+soybean protein, basal medium+soybean peptide and basic medium+monomeric amino acids) were also consisted, and each group had 3 replicates. The results showed that the activities of lysine decarboxylase, arginine decarboxylase, histidine decarboxylase, glycine decarboxylase, tyrosine decarboxylase, glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase and adenosine deaminase of protein feed sources with 3 different molecular structure were affected significantly by jejunum, ileum or cecal microbes ($P<0.05$ or $P<0.01$). The enzyme activities in monomeric amino acid group were higher overall than those in the other two groups. The enzyme activities in 3 groups were not completely consistent with the disappearance rate of amino acids. There were extremely significant differences in amino acid disappearance rates of protein feed sources with different molecular structure cultured in different intestinal microbes ($P<0.01$). The disappearance rate of amino acids in soybean protein group ranged from high to low: cecum, jejunum, ileum. The disappearance rate of amino acids in soybean peptide and monomeric amino acid groups with simple structure ranged from high to low: ileum, cecum, jejunum. The disappearance rate of total amino acids in soybean protein group was the highest. In conclusion, *in vitro* cultivation of intestinal microbes, the disappearance rate of amino acids among 3 protein feed sources with different molecular structure are different, and intestinal microbes are more active in protein decomposition of soybean. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31 (12): 5672-5681]

Key words: amino acid disappearance rates; protein feed sources; pig; intestinal microbes; microbial decarboxylase

* Contributed equally

** Corresponding author, professor, E-mail: tangzhiru2326@sina.com

(责任编辑 李慧英)