

# 氮源和水平对肉牛体外瘤胃发酵特性的影响

陈智亮 王之盛\* 薛 白 邹华围

(四川农业大学动物营养研究所, 动物抗病营养教育部重点实验室, 雅安 625014)

**摘 要:** 为研究氮源和水平对肉牛瘤胃发酵特性的影响, 本试验利用体外培养法研究不同水平(0、50、100 和 200 mg/L)的尿素、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸对培养液 pH、氨态氮、微生物蛋白质、挥发性脂肪酸的影响。结果表明: 在体外培养条件下, 以亮氨酸和异亮氨酸为氮源, 培养液 pH 和微生物蛋白质浓度分别显著低于和显著高于以尿素为氮源( $P < 0.05$ ), 以支链氨基酸为氮源培养液氨态氮浓度显著低于以尿素为氮源( $P < 0.05$ ), 以异亮氨酸为氮源培养液总挥发性脂肪酸、乙酸和丙酸浓度都显著高于其他氮源( $P < 0.05$ ); 随着氮水平的提高, 培养液 pH 以及氨态氮、微生物蛋白质和丙酸的浓度都显著的升高( $P < 0.05$ ); 氮源和水平对各指标均存在显著的互作效应( $P < 0.05$ )。结果提示, 亮氨酸作为氮源更有利于微生物蛋白质的合成; 200 mg/L 的氮水平有利于瘤胃微生物的发酵; 氮源和水平对瘤胃发酵存在互作效应。

**关键词:** 尿素; 支链氨基酸; 氮源; 氮水平; 瘤胃发酵

**中图分类号:** S823

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1006-267X(2012)06-1150-07

支链氨基酸 (branched chain amino acid, BCAA) 包括亮氨酸 (Leu)、异亮氨酸 (Ile) 和缬氨酸 (Val), 是一组在碳链上具有支链结构的脂肪族中性必需氨基酸。BCAA 具有氧化供能、促进蛋白质合成和抑制蛋白质降解、促进糖的异生等生理功能, 已成为营养学研究的热点之一<sup>[1]</sup>。随着人们对反刍动物蛋白质营养以及瘤胃微生物研究的深入, 人们逐渐认识到不同的氨基酸或不同类别的氨基酸亚组, 如芳香氨基酸亚组、BCAA 亚组等可以刺激瘤胃微生物的生长并可能产生不同的效果<sup>[2]</sup>, 而王梦芝等<sup>[3]</sup>利用特定氨基酸缺省底物培养混合瘤胃微生物发现, BCAA 的缺失对瘤胃微生物的生长限制性最大。研究表明不同的微生物类群对氨、肽、氨基酸的代谢利用不同<sup>[4]</sup>。Kajikawa 等<sup>[5]</sup>的研究结果表明, 亮氨酸和缬氨酸是瘤胃细菌生长不可缺少的氨基酸。晏向华等<sup>[6]</sup>对饲料原料和瘤胃培养残渣氨基酸组成差异的比较发现缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸在瘤胃中可能有良好的抗降解作用。王洪荣等<sup>[7]</sup>研究表明, 全量必

需氨基酸培养组中缺省 BCAA 时, 其微生物蛋白质 (MCP) 的产量显著降低。前人研究表明, BCAA 在瘤胃中有着重要的作用, 而针对单一 BCAA 作为氮源与尿素的比较研究, 及对它们的添加水平的研究则较少。为此, 本研究采用尿素和单一 BCAA 作为氮源, 旨在比较氮源和水平对体外瘤胃发酵特性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物及瘤胃液的采集

选用 3 头体况良好、平均体重为 (300 ± 30) kg 安装有永久性的瘤胃瘘管的宣汉黄牛作为瘤胃液供体动物。饲粮精粗比为 4:6, 粗饲料为苜蓿草、小麦秸和白酒糟, 精饲料组成及营养水平见表 1。在每天的 08:00 和 16:00 等量饲喂, 自由饮水。试验开始当天晨饲前抽取瘤胃液, 4 层纱布过滤, 滤液置于预先充有 CO<sub>2</sub> 且温度控制在 39 ℃ 的保温瓶中。

收稿日期: 2011-12-14

基金项目: 现代农业 (肉牛) 产业技术体系专项经费资助 (CARS-38); 四川农业大学“双支计划”基金

作者简介: 陈智亮 (1985—), 男, 山东德州人, 硕士研究生, 从事反刍动物营养与饲料研究。E-mail: chenzhiliang006@163.com

\* 通讯作者: 王之盛, 教授, 博士生导师, E-mail: wangzs007@yahoo.com.cn

表 1 精饲料组成及营养水平(风干基础)  
Table 1 Composition and nutrient levels of  
the concentrate (air-dry basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	62.02
麦麸 Wheat bran	33.43
碳酸氢钠 NaHCO <sub>3</sub>	1.34
食盐 NaCl	1.34
预混料 Premix <sup>1)</sup>	1.87
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels <sup>2)</sup>	
粗蛋白质 CP	11.63
综合净能 NEmf/(MJ/kg)	5.93
钙 Ca	0.52
磷 P	0.30

<sup>1)</sup> 预混料为每千克饲粮提供 Premix provided the following per kilogram of diet: VA 2 200 IU, VD 275 IU, VE 50 ~ 100 IU, 烟酸 nicotinic acid 50 mg, Co (CoCl · 6H<sub>2</sub>O) 0.1 mg, Cu (CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O) 10 mg, I (KI) 0.5 mg, Fe (FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) 50 mg, Mn (MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O) 20 mg, Se (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) 0.1 mg, Zn (ZnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O) 30 mg。

<sup>2)</sup> 营养水平为计算值。Nutrient levels were calculated values.

1.2 试验设计

采用 4 × 3 试验设计,对照组不另添加氮源,试验组分别采用尿素、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸 4 种氮源,并分别以 50、100 和 200 mg/L 3 个水平进行添加,共 13 组,每组 6 个重复,每个重复 1 支发酵管。

1.3 体外培养

体外培养参照 Menke 等<sup>[8]</sup>的方法进行,将配制好的人工唾液和瘤胃液按照 2:1 的比例混合,通入 CO<sub>2</sub> 并且放入 39 ℃ 的水浴摇床上等待培养。准确称取发酵底物[可溶性淀粉:纤维二糖:木糖为 1:1:1(质量比)<sup>[9]</sup>] 200 mg,并分别添加不同水平的等氮尿素和 BCAA,置于发酵管底部,最后加入用 CO<sub>2</sub> 饱和的培养液,于 39 ℃ 的水浴摇床上培养。

1.4 样品的采集

在培养的 16 h 终止发酵,收集培养液,即时测定 pH,随后于 -20 ℃ 冻存并测定氨态氮(NH<sub>3</sub>-N)、微生物蛋白质和挥发性脂肪酸(VFA)浓度。

1.5 测定指标及方法

培养液 pH 使用雷磁 PHS-3D 型 pH 计测定;氨态氮浓度的测定参照冯宗慈等<sup>[10]</sup>的方法进行;采用 Czerkawshi<sup>[11]</sup> 和 Martin-Orue 等<sup>[12]</sup>的方法分离细菌和原虫;用王宁娟<sup>[13]</sup>的方法测定和计算微生物蛋白质浓度;挥发性脂肪酸浓度采用瓦里安 CP-3800GC 气相色谱仪测定。

1.6 统计分析

试验数据采用 SAS 8.0 软件中的 GLM 过程进行方差分析,以氮源和水平作为主效应,并用 Duncan 氏法进行多重比较,结果以平均值 ± 标准误差表示,以 P < 0.05 作为差异显著性判断标准。

2 结果

2.1 氮源和水平对培养液 pH、氨态氮和微生物蛋白质的影响

由表 2 可知,以尿素为氮源培养液 pH 显著高于以亮氨酸和异亮氨酸为氮源(P < 0.05);以尿素为氮源的培养液氨态氮浓度显著高于以 BCAA 为氮源(P < 0.05);亮氨酸和异亮氨酸作为氮源时,培养液微生物蛋白质的浓度显著高于以尿素和缬氨酸作为氮源(P < 0.05)。随着氮水平的提高,培养液 pH 逐步提高,以 200 mg/L 浓度添加时培养液 pH 显著高于其他水平(P < 0.05);氨态氮浓度显著提高(P < 0.05);微生物蛋白质浓度逐步提高,在 100 和 200 mg/L 添加水平时出现显著差异(P < 0.05),氮源和水平对培养液 pH、氨态氮浓度和微生物蛋白质浓度的影响存在显著的互作效应(P < 0.05)。

2.2 氮源和水平对培养液挥发性脂肪酸的影响

由表 3 可知,异亮氨酸为氮源培养液总挥发性脂肪酸的浓度显著高于以尿素为氮源(P < 0.05),其他氮源无显著变化(P > 0.05);以缬氨酸和亮氨酸为氮源时,培养液乙酸浓度显著低于以尿素为氮源(P < 0.05),且以缬氨酸为氮源时,丙酸浓度显著降低(P < 0.05),异亮氨酸为氮源培养液乙酸和丙酸浓度均显著升高(P < 0.05);与尿素相比,以缬氨酸为氮源时培养液乙酸/丙酸显著的升高(P < 0.05),其他氮源培养液无显著变化(P > 0.05)。随着氮水平的提高,总挥发性脂肪酸和丙酸浓度有升高的趋势,而乙酸浓度呈现先降低后升高的趋势(P < 0.05),丙酸浓度则先升高后降低(P < 0.05)。

表 2 氮源和水平对培养液 pH、氨态氮和微生物蛋白质的影响  
Table 2 Effects of nitrogen source and level on pH, NH<sub>3</sub>-N and MCP of the culture medium

项目 Items	氮水平 Nitrogen level/( mg/L)	pH	氨态氮 NH <sub>3</sub> -N/( mg/dL)	微生物蛋白质 Microbial protein/( mg/mL)
尿素 Urea	0	6.15 ± 0.03	4.07 ± 0.27	2.40 ± 0.26
	50	6.11 ± 0.04	5.92 ± 0.33	2.32 ± 0.30
	100	6.28 ± 0.03	7.81 ± 0.27	3.02 ± 0.30
	200	6.36 ± 0.03	12.43 ± 0.27	2.81 ± 0.30
缬氨酸 Valine	50	6.26 ± 0.03	5.86 ± 0.27	2.63 ± 0.26
	100	6.22 ± 0.03	6.30 ± 0.27	2.11 ± 0.23
	200	6.15 ± 0.03	7.52 ± 0.27	3.31 ± 0.21
亮氨酸 Leucine	50	6.14 ± 0.03	6.00 ± 0.33	3.67 ± 0.26
	100	6.12 ± 0.03	6.11 ± 0.29	3.58 ± 0.26
	200	6.22 ± 0.03	7.86 ± 0.27	2.85 ± 0.21
异亮氨酸 Isoleucine	50	6.22 ± 0.03	5.54 ± 0.27	1.91 ± 0.23
	100	6.13 ± 0.03	5.87 ± 0.27	3.48 ± 0.23
	200	6.20 ± 0.03	7.09 ± 0.29	4.41 ± 0.26
尿素 Urea	合计 Total	6.22 ± 0.02 <sup>a</sup>	7.56 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.64 ± 0.14 <sup>b</sup>
缬氨酸 Valine	合计 Total	6.19 ± 0.01 <sup>ab</sup>	5.94 ± 0.13 <sup>b</sup>	2.61 ± 0.12 <sup>b</sup>
亮氨酸 Leucine	合计 Total	6.16 ± 0.01 <sup>b</sup>	6.01 ± 0.15 <sup>b</sup>	3.12 ± 0.12 <sup>a</sup>
异亮氨酸 Isoleucine	合计 Total	6.17 ± 0.01 <sup>b</sup>	5.64 ± 0.14 <sup>b</sup>	3.05 ± 0.12 <sup>a</sup>
合计 Total	0	6.15 ± 0.02 <sup>b</sup>	4.07 ± 0.13 <sup>d</sup>	2.40 ± 0.13 <sup>b</sup>
合计 Total	50	6.18 ± 0.02 <sup>b</sup>	5.83 ± 0.15 <sup>c</sup>	2.64 ± 0.13 <sup>b</sup>
合计 Total	100	6.19 ± 0.01 <sup>b</sup>	6.52 ± 0.14 <sup>b</sup>	3.05 ± 0.13 <sup>a</sup>
合计 Total	200	6.23 ± 0.01 <sup>a</sup>	8.73 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.34 ± 0.12 <sup>a</sup>
P 值 P-value				
氮源 Nitrogen source		<0.05	<0.05	<0.05
氮水平 Nitrogen level		<0.05	<0.05	<0.05
氮源 × 氮水平		<0.05	<0.05	<0.05
Nitrogen sources × nitrogen level				

同一因素(氮源或水平)、同列数据肩标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),相同字母或无字母肩标表示差异不显著( $P > 0.05$ )。下表同。

In the same column, values of the same factor (sources or level of nitrogen) with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ ). The same as below.

### 3 讨论

#### 3.1 氮源和水平对培养液 pH 的影响

pH 是反映培养体系中微生物发酵状况的综合指标。而本研究培养液 pH 在 6.1 ~ 6.5 范围内变化,变化幅度较小,适合瘤胃微生物的生长<sup>[14]</sup>。本研究中,以尿素为氮源时的培养液 pH 高于以 BCAA 为氮源,与王梦芝等<sup>[15]</sup>的研究结果一致,该研究中报道游离氨基酸组的 pH 低,可能是微生物对氨基酸的脱氨等代谢产生有机酸而影响 pH 所致。

#### 3.2 氮源和水平对培养液氨态氮的影响

氨态氮是瘤胃微生物生长的重要氮源,本研究中以尿素为氮源培养液氨态氮浓度显著高于以 BCAA 为氮源。氨态氮浓度是微生物对饲料氮降解和氨利用的综合指标。尿素组由于所有氮源均来自于非蛋白氮,降解速度快,氨态氮浓度较高。培养液中氨基酸的存在可降低氨态氮浓度,减少氨基酸氮(AA-N)以氨态氮形式的损失。由于氨基酸被微生物摄取,使得氨态氮的生成量减少,因此,微生物对氨基酸的摄取速率可能限制了氨态氮的产生速率<sup>[16]</sup>;另外,有研究报道氨基酸有利于

氨态氮利用菌的活力的提高<sup>[17]</sup>。而王梦芝等<sup>[3]</sup>研究报道 BCAA 缺省组的氨态氮浓度相对较高,推测其原因一是 BCAA 的缺省可能限制了部分微生物的生长,尤其是瘤胃球菌、产琥珀酸丝状杆菌等氨态氮利用菌的生长;另外可能由于该组底物引起了微生物区系的变化,提高了脱氨基作用较高

的微生物区系或区系内类群的活力,使得游离氨基酸迅速脱氨基。这也可以说明在 BCAA 存在时,氨态氮浓度较低,而提高氮源水平,氨态氮浓度有所提高,这可能是由于微生物未能完全利用这几种氮源造成的。

表 3 氮源和水平对培养液挥发性脂肪酸的影响					
Table 3 Effects of nitrogen source and level on VFA of the culture medium					
项目 Items	氮源水平 Nitrogen levels / (mg/L)	总挥发性脂肪酸 TVFA/ (mmol/L)	乙酸 Acetate/ (mmol/L)	丙酸 Propionate/ (mmol/L)	乙酸/丙酸 Acetate/ propionate
尿素 Urea	0	105.87 ± 2.11	79.91 ± 1.51	14.33 ± 0.53	5.29 ± 0.10
	50	104.68 ± 2.02	78.45 ± 1.51	14.60 ± 0.44	5.38 ± 0.10
	100	107.60 ± 2.02	80.10 ± 1.51	15.60 ± 0.44	5.15 ± 0.10
	200	105.24 ± 1.81	79.21 ± 1.35	14.68 ± 0.39	5.43 ± 0.09
缬氨酸 Valine	50	101.18 ± 2.47	76.41 ± 1.85	13.75 ± 0.48	5.68 ± 0.10
	100	109.46 ± 2.47	74.26 ± 1.58	13.78 ± 0.44	5.79 ± 0.09
	200	97.79 ± 2.33	72.38 ± 1.58	12.76 ± 0.45	5.70 ± 0.11
亮氨酸 Leucine	50	98.33 ± 2.47	68.98 ± 1.51	13.24 ± 0.42	5.38 ± 0.10
	100	100.05 ± 2.02	72.38 ± 1.45	13.22 ± 0.42	5.77 ± 0.09
	200	111.43 ± 1.87	83.29 ± 1.40	16.81 ± 0.40	4.98 ± 0.10
异亮氨酸 Isoleucine	50	107.46 ± 1.87	80.13 ± 1.40	15.65 ± 0.40	5.36 ± 0.11
	100	108.38 ± 2.47	83.17 ± 1.51	16.22 ± 0.45	5.25 ± 0.10
	200	113.82 ± 2.33	85.06 ± 1.66	16.89 ± 0.48	5.06 ± 0.11
尿素 Urea	合计 Total	105.85 ± 100 <sup>b</sup>	79.42 ± 0.74 <sup>b</sup>	14.80 ± 0.23 <sup>b</sup>	5.31 ± 0.05 <sup>b</sup>
缬氨酸 Valine	合计 Total	103.57 ± 1.18 <sup>b</sup>	75.74 ± 0.82 <sup>c</sup>	13.66 ± 0.24 <sup>c</sup>	5.61 ± 0.05 <sup>a</sup>
亮氨酸 Leucine	合计 Total	103.92 ± 1.06 <sup>b</sup>	76.14 ± 0.74 <sup>c</sup>	14.40 ± 0.22 <sup>b</sup>	5.35 ± 0.05 <sup>b</sup>
异亮氨酸 Isoleucine	合计 Total	108.88 ± 1.10 <sup>a</sup>	82.07 ± 0.76 <sup>a</sup>	15.77 ± 0.23 <sup>a</sup>	5.24 ± 0.05 <sup>b</sup>
合计 Total	0	105.87 ± 1.05 <sup>ab</sup>	79.91 ± 0.76 <sup>a</sup>	14.33 ± 0.27 <sup>b</sup>	5.29 ± 0.05 <sup>b</sup>
合计 Total	50	102.91 ± 1.11 <sup>b</sup>	75.99 ± 0.79 <sup>b</sup>	14.31 ± 0.22 <sup>b</sup>	5.45 ± 0.05 <sup>a</sup>
合计 Total	100	106.37 ± 1.13 <sup>a</sup>	77.48 ± 0.76 <sup>b</sup>	14.70 ± 0.22 <sup>ab</sup>	5.49 ± 0.05 <sup>a</sup>
合计 Total	200	107.07 ± 1.05 <sup>a</sup>	79.99 ± 0.75 <sup>a</sup>	15.29 ± 0.22 <sup>a</sup>	5.29 ± 0.05 <sup>b</sup>
P 值 P-value					
氮源 Nitrogen source		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
氮水平 Nitrogen level		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
氮源 × 氮水平 Nitrogen sources × nitro- gen level		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

**3.3 氮源和水平对培养液微生物蛋白质的影响**  
本研究中,以 BCAA 为氮源培养液微生物蛋白质浓度高于以尿素为氮源,尤其氮源为亮氨酸和异亮氨酸时,亮氨酸是影响大肠杆菌几个操纵子表达的调节因子<sup>[18]</sup>,加入它有可能增加某几种瘤胃细菌与细胞生长的有关的基因表达。试验证明,在快速降解碳水化合物来源充足的条件下,补

充氨基酸氮可以提高瘤胃微生物的产量<sup>[19]</sup>。Kajikawa 等<sup>[20]</sup>报道当亮氨酸或者其他的氨基酸从 20 种氨基酸中去除时,这种混合氨基酸对瘤胃微生物生长的促进效应就会降低,而徐爱秋等<sup>[2]</sup>的研究发现在 17 种全量氨基酸中去除 BCAA,不同程度地限制了嗜淀粉瘤胃杆菌、溶纤维丁酸弧菌和栖瘤胃普雷沃氏菌等瘤胃蛋白质降解菌的生长,所

以这有可能造成微生物对氮源利用的降低,从而影响微生物蛋白质的合成量。根据瘤胃细菌最佳生长的氨基酸需要量,可将瘤胃细菌分为2种:结构性碳水化合物(SC)发酵菌和非结构性碳水化合物(NSC)发酵菌<sup>[21]</sup>,SC发酵菌的生长依赖于氮,NSC发酵菌利用更多的依赖可利用氨基酸<sup>[22]</sup>,本研究中以BCAA为氮源的培养液微生物蛋白质的合成量的提高可能和NSC发酵菌更有利于微生物蛋白质的合成有关,而有关的机制需进一步的研究。另外,有报道研究在真核生物中,BCAA特别是亮氨酸通过影响雷帕霉素靶蛋白(mTOR)相关的通路,而有助于蛋白质的合成<sup>[23]</sup>,这一通路也可能在瘤胃中存在,而相关机制有待进一步研究。

本研究中,随着氮水平的提高,微生物蛋白质的浓度逐步提高。Argyle等<sup>[24]</sup>研究报道氨基酸加入量和细菌的生长呈线性关系。另外,平衡瘤胃微生物的可利用的能量和氮对提高氨基酸的利用有重要的影响<sup>[25]</sup>,本研究中200 mg/L BCAA的培养液微生物蛋白质的浓度达到最高值,说明此时的可利用的能量和氮比较平衡。在低氮水平时,微生物蛋白质的产量较低,这可能是由于氮不足时,培养液中的碳水化合物仍能发酵,但是因为能量解偶联使微生物生长受阻,导致每单位碳水化合物的微生物蛋白质产量降低<sup>[26]</sup>。

### 3.4 氮源和水平对培养液挥发性脂肪酸的影响

挥发性脂肪酸是饲料在瘤胃内被微生物发酵的重要终产物,除受饲料特性影响外,也受瘤胃微生物生长的影响<sup>[27]</sup>。挥发性脂肪酸是反刍动物的主要能量来源,也是瘤胃微生物增殖的主要碳架来源,其中丙酸转化成能量的效率要高于乙酸和丁酸<sup>[28]</sup>。本研究中,氮源对总挥发性脂肪酸无显著影响,缬氨酸作为氮源时,与尿素氮源比较,乙酸和丙酸浓度都显著降低,乙酸/丙酸显著升高,可能的原因是降解速率和能量转化率较低,缬氨酸未能被微生物有效利用,从而不利于有机物的发酵<sup>[29]</sup>。而异亮氨酸作为氮源时,乙酸和丙酸浓度都显著升高,这可能是由于它作为氮源有利于微生物对纤维素和有机物的发酵。

本研究中,随着氮浓度的升高,乙酸的浓度先降低后升高,乙酸的生成是由慢速发酵饲料中纤维素生成的,从乙酸浓度的高低可以推断微生物降解纤维素的活力,BCAA浓度低时,乙酸的浓度较低,但低浓度的BCAA往往会导致纤维素分解

菌支链挥发性脂肪酸缺乏,进而使其生长受到抑制<sup>[30]</sup>,从而导致乙酸浓度较低。本研究中,随着氮水平的提高,丙酸的浓度逐步升高,乙酸/丙酸呈现先升高后降低的趋势,这可能归因于高氮水平有助于能量转化效率的提高。

## 4 结 论

① 亮氨酸作为氮源更有利于微生物蛋白质的合成。

② 200 mg/L的氮水平有利于瘤胃微生物的发酵。

③ 氮源和水平对瘤胃发酵存在互作效应。

## 参考文献:

- [1] 郭俊清. 亮氨酸及 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙对绒山羊免疫机能和生产性能[D]. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [2] 徐爱秋, 王梦芝, 王洪荣, 等. 体外培养条件下氨基酸对瘤胃蛋白质降解菌生长限制性的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(1): 88-92.
- [3] 王梦芝, 王洪荣, 曹恒春, 等. 特定氨基酸缺省底物对体外培养混合瘤胃微生物及其发酵的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(7): 2136-2142.
- [4] COTTA M A, HESPELL R B. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 52(1): 51-58.
- [5] KAJIKAWA H, MITSUMORIAND M, OHMOMO S. Stimulatory and inhibitory effects of protein amino acids on growth rate and efficiency of mixed ruminal bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85(8): 2015-2022.
- [6] 晏向华, 许梓荣, 王加启, 等. 饲料原料与瘤胃培养残渣(8、12、16小时)氨基酸组成差异的研究[J]. 动物营养学报, 2003, 15(2): 36-44.
- [7] 王洪荣, 徐爱秋, 王梦芝, 等. 氨基酸对体外培养瘤胃微生物生长及发酵的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(9): 1109-1116.
- [8] MENKE K H, STEINGASS H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid[J]. Animal Research and Development, 1998, 28: 7-55.
- [9] ATASOGLU C, VALDES C, NEWBOLD C J, et al. Influence of peptides and amino acids on fermentation rate and de novo synthesis of amino acids by mixed micro-organisms from the sheep rumen [J]. British

- Journal of Nutrition, 1999, 81(4): 307–314.
- [10] 冯宗慈, 高民. 通过比色法测定瘤胃液氨氮含量方法的改进[J]. 内蒙古畜牧科学, 1993(4): 40–41.
- [11] CZERKAWSHI J W. Chemical composition of microbial matter in rumen [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1976, 27(7): 621–632.
- [12] MARTIN-ORUE S M, BALCELLS J, ZAKRAOUI F, et al. Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta; effect of detachment procedure [J]. Animal Feed Science and Technology, 1998, 71(3/4): 269–282.
- [13] 王宁娟. 人工瘤胃法研究矿物质元素及非蛋白氮对瘤胃发酵的影响[D]. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003.
- [14] BROWN M, PONCE C H, PULIKANTI R. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism [J]. Journal of Animal Science, 2006, 84: E25–E33.
- [15] 王梦芝, 喻礼怀, 王洪荣, 等. 不同分子形式氮源对瘤胃微生物发酵及蛋白合成的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(5): 20–24.
- [16] HINO T, RUSSELL J B. Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen microorganisms and their cell extracts [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 50(6): 1368–1374.
- [17] 冯仰廉. 反刍动物营养学[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [18] CALVO J M, MATTHEWS R G. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli* [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1994, 58(3): 466–490.
- [19] MAENG W J, BALDWIN R L. Factors influencing rumen microbial growth rates and yields; effect of amino acid additions to a purified diet with nitrogen from urea [J]. Journal of Dairy Science, 1976, 59(4): 648–655.
- [20] KAJIKAWA H, MITSUMORI M, TAJIMA K, et al. Short communication; amino acids antagonistic to the amino acids inhibitory for growth rate of mixed ruminal bacteria [J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(7): 2601–2603.
- [21] RUSSELL J B, O'CONNOR J D, FOX D G, et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. ruminal fermentation [J]. Journal of Animal Science, 1992, 70: 3551–3561.
- [22] 张洁, 陈旭伟, 徐爱秋, 等. 瘤胃微生物氨基酸代谢的研究进展[J]. 中国奶牛, 2008(5): 18–21.
- [23] CHIHARU T, KEN-ICHI Y, KAZUYOSHI Y. mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 313(2): 443–446.
- [24] ARGYLE J L, BALDWIN R L. Effects of amino acids and peptides on rumen microbial growth yields [J]. Journal of Dairy Science, 1989, 72(8): 2017–2027.
- [25] VAN KESSEL J S, RUSSELL J B. The effect of amino nitrogen on the energetics of ruminal bacteria and its impact on energy spilling [J]. Journal of Dairy Science, 1996, 79(7): 1237–1243.
- [26] 王贞贞. 不同氮源日粮对绵羊瘤胃纤维降解菌群及纤维降解的影响[D]. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007.
- [27] 苗朝华, 莫放, 岳文斌, 等. 微量元素钴对人工瘤胃挥发性脂肪酸产生量的影响[J]. 动物营养学报, 2008, 20(5): 522–526.
- [28] SPEARS J W, SCHLEGEL P, SEAL M C, et al. Bioavailability of zinc from zinc sulfate and different organic zinc sources and their effects on ruminal volatile fatty acid proportions [J]. Livestock Production Science, 2004, 90: 211–217.
- [29] CHALUPA W. Degradation of amino acids by the mixed rumen microbial population [J]. Journal of Animal Science, 1976, 43(4): 828–834.
- [30] 徐晓锋. 不同蛋白源日粮条件下绵羊瘤胃肽和游离氨基酸释放的研究[D]. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2004.

## Source and Level of Nitrogen Affect *in Vitro* Fermentation Characteristics of Beef Cattle

CHEN Zhiliang WANG Zhisheng\* XUE Bai ZOU Huawei

(Key Laboratory for Animal Disease-Resistance Nutrition of China Ministry of Education,  
Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** This study was conducted to investigate the effects of source and level of nitrogen on rumen fermentation characteristics of beef cattle. An *in vitro* culture method was applied for the determination of influences of different levels (0, 50, 100 and 200 mg/L) of urea, leucine (Leu), isoleucine (Ile) and valine (Val) on pH, ammonia nitrogen ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), microbial protein (MCP) and volatile fatty acids (VFA) of the culture medium. The results showed as follows: under the *in vitro* culture condition, pH of culture mediums using Leu and Ile as nitrogen sources was significantly lower than that using urea ( $P < 0.05$ ), MCP concentration of cultured mediums using these two nitrogen sources was significantly higher than that using urea ( $P < 0.05$ ), and  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration of culture medium using branched chain amino acid (BCAA) as nitrogen sources was significantly lower than that using urea ( $P < 0.05$ ). In addition, concentrations of total VFA, acetate and propionate of culture medium using Ile as nitrogen source were all significantly higher than those using the other nitrogen sources ( $P < 0.05$ ); what's more, with the increasing of nitrogen level, pH, concentrations of  $\text{NH}_3\text{-N}$ , MCP and propionate were increased significantly ( $P < 0.05$ ); there were significant interactions between source and level of nitrogen in all the indices ( $P < 0.05$ ). In conclusion, Leu is beneficial for synthesis of microbial protein; nitrogen level of 200 mg/L is good for rumen fermentation; nitrogen source and level have interaction effects on rumen fermentation. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(6):1150-1156]

**Key words:** urea; branched chain amino acids; nitrogen source; nitrogen level; rumen fermentation