

文章编号: 1006-267X(1999)04-0017-12

饲喂玉米型日粮的生长绵羊 限制性氨基酸研究

王洪荣, 卢德勋

(内蒙古畜牧科学院动物营养研究室, 内蒙古 呼和浩特 010030)

摘要: 本实验采用 9 只安装有瘤胃、十二指肠和回肠瘘管的生长羯羊, 采用随机区组试验设计, 研究了饲喂以玉米、玉米蛋白粉和青干草为基础日粮的绵羊消化道不同部位营养物质流通量, 以及由十二指肠瘘管按“递减法”灌注不同氨基酸 [A: 减赖氨酸 (Lys); B: 减蛋氨酸 (Met); C₁: 全量; D: 减苏氨酸 (Thr); E: 减组氨酸 (His); C₂: 全量; F: 减精氨酸 (Arg); G: 减色氨酸 (Trp); C₃: 全量] 对绵羊体内氮沉积、血浆尿素氮 (PUN)、血浆游离氨基酸 (FAA) 浓度等指标的影响。结果表明: 饲喂玉米型日粮的绵羊瘤胃食糜流通速率 (K_p) 为 5.09%~6.15%/h, 进入十二指肠中微生物蛋白占总氮的比例为 17.79%~30.43%。绵羊十二指肠中 Met、Lys、His 和 Arg 流量偏低, 而 Leu 的流量较高。与对照组 (C₁、C₂、C₃) 相比, 减少 Lys、Met、Thr、His、Arg 和 Trp 组的绵羊体内沉积氮 (g/kg W^{0.75}) 分别下降 23.50%、46.67%、28.66%、15.00%、17.33% 和 15.89%; 日增重分别下降 37.04%、53.17%、36.83%、8.61%、42.84% 和 39.59%; 十二指肠灌注氨基酸会使绵羊 PUN 浓度升高 (P<0.05)。减少氨基酸组绵羊 PUN 浓度在灌注氨基酸后第 4 天和第 7 天比对照组升高。FAA 浓度随灌注氨基酸减少而使相应游离氨基酸浓度下降, 减少氨基酸组都比对照组绵羊血浆游离氨基酸中甘氨酸与其它氨基酸比值 (Gly/OAA) 升高。综合评定饲喂玉米型日粮的生长绵羊的 6 种限制性氨基酸为 Met、Thr、Lys、Arg、Trp 和 His。

关键词: 生长绵羊; 玉米; 日粮; 限制性氨基酸

中图分类号: S 826.5; Q517 **文献标识码:** A

进入小肠的氨基酸数量和组成比例是决定反刍动物生产性能的重要限制因素。本世纪 70 年代以来, Smith (1969)、Nimrick 等 (1970)、Richardson 和 Hatfield (1978)、Storm 和 Ørskov (1984) 和 Fraser 等 (1991) 等由真胃和十二指肠灌注氨基酸或酪蛋白实验结果表明, 通过灌注提高了动物的氮沉积及其生产性能指标。Storm 和 Ørskov (1984) 给绵羊真胃灌注瘤胃分离微生物蛋白质试验证实, 微生物蛋白中的限制性氨基酸为蛋氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸。这些实验说明在特定的实用日粮条件下, 进入反刍动物十二指肠的氨基酸中可能存在限制性氨基酸, 而且各种限制性氨基酸的相对限制程度不同。本实验目的在于在测定饲喂玉米型日粮的绵羊小肠可消化氨基酸流通量的基础上, 采用十二指肠中连续灌注合成氨基酸的方法, 确定生长绵羊在玉米型日粮条件下的限制性氨基酸次序和相对限制程度, 为建立绵羊理想氨基酸

收稿日期: 1998-08-16

模式以及为限制性氨基酸的生产和营养调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

选用 9 只 1 岁 (体重为 25 ~ 34kg) 的中国美利奴 × 高加索杂交后代羯羊, 安装永久性瘤胃瘘管、十二指肠近端瘘管和回肠末端瘘管, 待羊恢复体质后进行试验。

1.2 基础日粮与饲养管理

试羊日粮配制参照中国美利奴绵羊饲养标准, 即能量维持需要 (M) 为 $450\text{kJ}/\text{kg } W^{0.75}$, 蛋白质维持需要为 $350\text{mgN}/\text{kg } W^{0.75}$, 每日代谢能供给量为 1.4M、蛋白质为 2.0M, 代谢能满足 50g 日增重需要, 蛋白质可满足 50g 日增重需要的 80%。试验羊每日饲喂混合精料 300g、优质青干草 500 ~ 600g (自由采食)。基础日粮中的混合精料由玉米 81.5%, 玉米蛋白粉 15%, 骨粉 1%, 尿素 1%, 食盐 0.5%, 矿物质和多维 1%。日粮组成见表 1。试验羊单笼饲养, 每日分别在 7:00 和 16:00 饲喂混合精料, 自由饮水, 每日记录试羊的采食量。每期试验前后对试验羊空腹称重, 预饲期为 15 天, 试验期为 10 天。

1.3 试验设计与处理

1.3.1 试验羊十二指肠中氨基酸流通量测定

1.3.1.1 食糜标记物: 采用 Cr_2O_3 为食糜标记物测定食糜流通量, 在采样前 4 天开始从瘤胃瘘管分四次投入, 连续投 7 天。每隔 6 小时投放一次 (每次剂量为 1g), 每日投放总剂量为 4g, 启动投置剂量为 2g。

1.3.1.2 采样程序: 从瘤胃投放 Cr_2O_3 的第 4 天开始, 由试羊采集瘤胃和十二指肠食糜样本, 每日每隔 6 小时采瘤胃食糜 50ml, 十二指肠食糜 30ml, 每日的采样点交替变化, 每日采 4 次, 连续采 3 天。使 3 天的采样点分布于不同时间内, 即第一天为 01:00、07:00、13:00、19:00; 第二天为 03:00、09:00、15:00、21:00; 第三天为 05:00、11:00、17:00、23:00。在第 8 天停止投入 Cr_2O_3 , 然后连续 3 天在不同时间点采集瘤胃食糜样本, 冷冻保存备用。将前 3 天不同时间内采集的瘤胃和十二指肠食糜按等量混合分别制成混合样本, 取一份瘤胃和十二指肠混合样冻干以备测定 DM、 Cr_2O_3 浓度、RNA 含量、总 N、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和氨基酸含量, 另取一份用于分离微生

表 1 试验羊饲料组成和营养成分 (风干样为基础)

Table 1. Composition and nutrient level of the diet fed to the tested sheep (%)

混合精料 Diet composition	
玉米 Corn	30.56
玉米蛋白粉 CGM	5.62
尿素 Urea	0.38
骨粉 Bone meal	0.38
食盐 Salt	0.19
矿物质 + 多维 M + V Premix	0.38
青干草 Hay	62.50
营养水平 Nutrient levels	
粗蛋白 CP	11.44
代谢能 ME (MJ/kg)	7.53
结构性碳水化合物 SC	46.71
非结构性碳水化合物 NSC	34.41
钙 Ca	0.48
磷 P	0.26

矿质预混料由 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 31200mg/kg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1500mg/kg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 17500mg/kg; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7800mg/kg; 碘钙粉 (含 1% KI) 17000mg/kg; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3mg/kg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1030mg/kg 和沸石粉组成。

维生素预混料中每公斤含 V_A 5400 万 IU、 V_{D3} 1080 万 IU、 V_E 18000IU、 V_{K3} 5g、 V_{B1} 2g、 V_{B2} 15g、 V_{B12} 0.03g、 V_{B5} 35g、泛酸钙 25g、叶酸 0.5g、抗氧化剂 0.2g。

物蛋白质。

1.3.2 氨基酸灌注实验设计

1.3.2.1 动物分组: 在测定饲喂基础日粮绵羊十二指肠氨基酸流通量后, 在开始灌注氨基酸试验前用 9 只羊进行 7 天氮平衡试验, 根据测得的每公斤代谢体重沉积氮量按随机区组试验设计, 将 9 只羊分为 3 组(每组 3 只重复), 然后分三期进行十二指肠灌注氨基酸试验, 每期 10 天, 两期间隔 10 天过渡期。每期设两个试验组和一个对照组, 对照组灌注 6 种合成氨基酸混合物, 使进入绵羊十二指肠的各种氨基酸(日粮氨基酸 + 灌注氨基酸)达到绵羊肌肉蛋白质中氨基酸模式, 试验组按“递减法”依次灌注从对照组中减少相同比例(21.5%)某一种氨基酸后的合成氨基酸混合物, 减少的氨基酸氮用谷氨酸钠补充, 以保证灌注氨基酸混合物有相同的含氮水平。各组羊的灌注剂量用氨基酸增量模型计算, 见表 2。具体分组如下:

- A 组(减 Lys): 灌注减少 21.5%Lys 的混合氨基酸。
 B 组(减 Met): 灌注减少 21.5%Met 的混合氨基酸。
 C₁ 组: 全量灌注(Lys、Met、Thr、His、Arg、Trp)
 D 组(减 Thr): 灌注减少 21.5%Thr 的混合氨基酸。
 E 组(减 His): 灌注减少 21.5%His 的混合氨基酸。
 C₂ 组: 全量灌注(Lys、Met、Thr、His、Arg、Trp)。
 F 组(减 Arg): 灌注减少 21.5%Arg 的混合氨基酸。
 G 组(减 Trp): 灌注减少 21.5%Trp 的混合氨基酸。
 C₃ 组: 全量灌注(Lys、Met、Thr、His、Arg、Trp)。

1.3.2.2 灌注方法: 将试验羊放入消化代谢笼内饲喂基础日粮, 整个试验期内饲喂量和饲养程序不变。将试验羊每日灌注的混合氨基酸溶解在 700ml 的生理盐水中, 用 4N 盐酸将 pH 值调至 6.50; 在 4℃ 下保存备用, 待灌注时水浴加热至 37℃。将每只羊的灌注氨基酸液体装入输液瓶内, 挂在代谢笼上方, 用输液器改制的塑料软管与十二指肠瘘管相连, 通过阀门调节流速(0.58ml/min 或 9 滴/分钟), 每日连续灌注 20 小时, 连续灌注 10 天。

1.4 样品处理及分析方法

1.4.1 样品处理方法

表 2 十二指肠灌注氨基酸剂量(克/日·只)

Table 2. Composition and infusion rate of amino acid mixtures into the duodenum of sheep (g/day/sheep)

处理 Treatments	赖氨酸 Lys - HCl	蛋氨酸 Met	苏氨酸 Thr	组氨酸 His	精氨酸 Arg	色氨酸 Trp	谷氨酸钠 Na - Glu	总氮量 TN
A(减 Lys)	2.24	1.21	1.01	1.42	1.25	0.26	5.41	1.71
B(减 Met)	4.35	0.80	1.01	1.42	1.25	0.26	0.66	1.71
D(减 Thr)	4.35	1.21	0	1.42	1.25	0.26	2.01	1.71
E(减 His)	4.35	1.21	1.01	0.96	1.25	0.26	2.13	1.71
F(减 Arg)	4.35	1.21	1.01	1.42	0.30	0.26	5.19	1.71
G(减 Trp)	4.35	1.21	1.01	1.42	1.25	0.07	0.44	1.71
C(对照 control)	4.35	1.21	1.01	1.42	1.25	0.26	0	1.71

按需要量 21.5%比例减少各种氨基酸。盐酸赖氨酸、蛋氨酸和苏氨酸为饲料级, 其它氨基酸为 L-型生化级氨基酸。

从灌注氨基酸的第 5~10 天于每天 8:00 和 20:00 分两次采集粪、尿样本,连续采集 6 天粪、尿样本(粪样取 10%,尿样按 10%取样),装入棕色瓶内,并在瓶内加 4ml 浓 H_2SO_4 (使尿液 pH 值在 1.5 以下)和 5 滴氯仿,在 4℃ 下保存以备分析。最后将粪、尿样分别按试验羊个体混合制成混合样。在灌注氨基酸的第 2~4 天采十二指肠食糜样,每天采样 3 次,3 天的时间分布不同。分别在第 4、7、10 天抽取试羊颈静脉血样 10ml,加入盛有抗凝剂(125 IU 肝素)的试管内,将采集的颈静脉血样在 $800 \times g$ 下离心 15 分钟,分离出血浆,取血浆样 2ml 加入 2ml 5% 的磺基水杨酸溶液沉淀血浆蛋白,在 $10,000 \times g$ 下离心 20 分钟,将离心出的血浆在 -20℃ 下保存,以备测定血浆游离氨基酸和血浆尿素氮指标。将灌注氨基酸期间不同时间点采集的十二指肠食糜按等比例混合成混合样本,冷冻干燥后用于测定氨基酸含量。将氮平衡试验期收集的粪样于 55℃ 下烘干,测定初水分后制成风干样用于总氮测定(烘干前按每 100g 鲜粪样加入 5ml 4N H_2SO_4 以保存氨氮)。

瘤胃和十二指肠食糜中微生物的分离方法:取 200ml 瘤胃或十二指肠食糜,加入适量 0.85% 的生理盐水,在振荡器上振荡 1 分钟后,用 4 层乳酪布过滤,弃掉饲料残渣后,取滤液 150ml,在 $150 \times g$ 下离心 10 分钟,以除去饲料颗粒和部分原虫,将上清液在 $20,000 \times g$ 下离心 20 分钟,弃掉上清液,用 0.85% 生理盐水冲洗沉淀物两次,再于 $20,000 \times g$ 下离心 20 分钟,弃掉上清液,将沉淀物(细菌细胞)用蒸馏水洗到铝盒内,冷冻干燥后供分析 RNA 和总氮用。

1.4.2 样品分析方法

1.4.2.1 RNA 的分析方法(嘌呤碱基法):按 Zinn 和 Owens(1986)的方法测定。

1.4.2.2 氨基酸的分析

食糜样本在 6N 盐酸下水解 22 小时,然后减压蒸干,用 0.02N HCl 重新溶解定容后在日立 835 型氨基酸自动分析仪上测定氨基酸。上机分析条件为:分析柱 $4.0 \times 150\text{mm}$,柱温 53℃,缓冲溶液为柠檬酸和柠檬酸钠溶液,显色剂为茚三酮。色氨酸用 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 碱液水解 15 小时后,用高效液相色谱仪(HPLC)分析。色谱条件:检测波长 E_x 为 285nm, E_m 为 345nm,流速为 1.0ml/min,泵压为 $31 \sim 38\text{kg/cm}^2$,柱温为 29℃。

1.4.2.3 血浆尿素氮(PUN)的测定:用二乙酰-肟显色法测定。

1.4.2.4 尿中尿素氮(UUN)分析:同血浆尿素氮。

1.4.2.5 Cr_2O_3 分析方法(比色法):按高民等(1991)的方法进行分析。

1.5 计算和统计分析方法

1.5.1 食糜流通量的计算

瘤胃食糜流通量:先拟合出瘤胃食糜标记物 Cr_2O_3 浓度与时间的递降曲线 $C = C_0 e^{-kt}$,计算出停止投标记物时瘤胃食糜中标记物初始浓度 C_0 和瘤胃食糜流通速度常数 K_p 值(即曲线的 K 值),按下式计算出食糜流通量:

$$\text{瘤胃食糜流通量 } Q_r = \frac{Q_T \times 0.96}{C_0}$$

式中 Q_T 为标记物 Cr_2O_3 的每日投量(4g);0.96 为 Cr_2O_3 的回收率。

十二指肠内食糜流通量(Q_d):可用标记物 Cr_2O_3 的每日投量直接除以十二指肠混合食糜中 Cr_2O_3 的浓度(C_d),即:

$$Q_d = \frac{Q_T \times 0.96}{C_d}$$

十二指肠中氨基酸流通量 (FDAA_i) 为十二指肠食糜中氨基酸浓度 (CAA_i) 乘以十二指肠食糜流通量 (Q_d) 即:

$$FDAA_i = CAA_i \times Q_d$$

$$\text{微生物氮 (MN)} = R \times Q = \frac{\text{食糜中 RNA 含量}}{\text{食糜中总氮含量}} \times \frac{\text{微生物中氮含量}}{\text{微生物中 RNA 含量}} \times \text{食糜中总氮流通量}$$

1.5.2 灌注氨基酸增量模型的计算

本实验通过绵羊十二指肠瘘管灌注合成氨基酸混合物的方法, 将由基础日粮提供进入绵羊十二指肠的各种氨基酸组成模式调整为一种目标模式 (如肌肉模式)。所需添加的各种氨基酸数量采用以下数学模型计算:

$$\frac{D_i (Q_i + X_i)}{D_i Q_i + \sum_{i=1}^n D_i X_i} = R_i$$

上述模型可转化为:

$$\frac{D_i}{R_i} X_i - \sum_{i=1}^n D_i X_i = D_i Q_i - \frac{D_i Q_i}{R_i}$$

其中: D_i ——第 i 种氨基酸在绵羊小肠消化率 (%) ; Q_i ——第 i 种氨基酸在绵羊十二指肠流量 (g/d) ;

D ——进入绵羊小肠总氨基酸的消化率 (%) ; Q ——进入绵羊十二指肠中各种氨基酸总流量 (g/d) ;

X_i ——第 i 种氨基酸所需的灌注量 (g/d) ; R ——第 i 种氨基酸在肌肉蛋白中所占比例。

上述模型中的各种参数由氨基酸在绵羊小肠消化率、食糜流通量和氨基酸流通量来估测, 然后组成 $i \times (i+1)$ 阶矩阵, 借助微机编制 Basic 程序解出 X_i 。如果求得 $X_i > 0$, 表示需添加 (灌注) X_i 后才能满足给定的肌肉氨基酸模式需要; 如果 $X_i < 0$, 则表示该种氨基酸过量, 不需添加补充。本实验选择 6 种必需氨基酸进行研究, 其 X_i 值均大于零, 所以必需添加。

$$\text{氨基酸的相对限制程度} = \frac{\text{对照组效应值} - \text{递减组效应值}}{\text{对照组效应值}} \times 100\%$$

1.5.3 统计分析: 实验数据利用 SAS (1987) 系统中的平衡实验设计方差分析过程 (ANOVA) 和非平衡实验设计方差分析过程 (GLM) 进行统计分析, 均值的多重比较用 Duncan 法进行。

2 结果与讨论

2.1 饲喂玉米型日粮的绵羊消化道食糜流通量的变化

在氨基酸灌注前测得 3 组羊间食糜中干物质、氮以及各种氨基酸流通量差异不显著 ($P > 0.05$); 瘤胃食糜流通速度常数 K_p 在 5.01% ~ 6.51%h 之间, 但各组间差异不显著 ($P > 0.05$)。进入十二指肠总氮和各种氮的组分在各组间无显著差异 ($P > 0.05$), 但 3 组的十二指

肠内总氮流量都高于氮进食量。这是由于反刍动物消化道内有大量内源氮周转而造成的,类似的结果也被 Cecava 等 (1990)、Demjanec 等 (1995)、Urbaniak、Przybecki (1995) 和 Willms 等 (1991) 等研究者所证实。进入绵羊十二指肠内的氨基酸流量在 3 组间差异不显著 ($P > 0.05$)。由表 3 可见,在饲喂玉米蛋白粉型日粮条件下,进入十二指肠的 Met、Lys、His 和 Arg 流量较低,特别是 Met 流量更低,但 Leu 流量较高。这也许因玉米蛋白粉中瘤胃非降解蛋白质含量较高 (65%),致使日粮中有较高比例的非降解蛋白进入绵羊十二指肠,而玉米蛋白粉中所含的 Lys、Met 相对较低,但 Leu 含量却很高,可见, Lys、Met、Leu、Lys、Met、Arg、His、Trp 和 Thr 很可能成为玉米蛋白粉日粮的主要限制性氨基酸,这一结果被随后进行的氨基酸灌注实验结果所证实。

2.2 绵羊十二指肠灌注不同氨基酸混合物对氮平衡和日增重的影响

本实验按“递减法”分 3 期灌注含 Lys、Met、Thr、Arg、His 和 Trp 以及 Glu - Na 不同组成的氨基酸混合物,其试验结果见表 4。从表 4 可看出,各组间绵羊进食氮量和粪氮排出量差异不显著 ($P > 0.05$)。但尿氮排出量有一定差异 ($P = 0.274$ 和 $P = 0.124$)。其结果为各组间沉积氮 (g/d 或 $\text{g/kg W}^{0.75}$) 和沉积 N 与可消化 N 之比有显著差异 ($P < 0.001$),尿中尿素氮排出量差异显著 ($P = 0.042$)。尿中尿素氮/尿氮比是反映机体氨基酸氧化的重要指标,各组间 UUN/UN 比差异不显著 ($P = 0.183$),但从数值上看,B 组的 UUN/UN 比最大 (71%),其次为 D 组 (66%) 和 E 组 (63%)。各组氮沉积 ($\text{g/kg W}^{0.75}$) 随灌注必需氨基酸的降低而显著下降。

由表 4 可知,与对照组相比,减少蛋氨酸组 (B 组) 较对照组 (C_1) 氮沉积量下降的幅度最大,为 46.67%;其次为减少苏氨酸组 (D 组),下降 28.66% 和减少赖氨酸组 (A 组),下降 23.50%;而以减少组氨酸组 (E 组) 氮沉积下降的幅度最小,为 15.00%。从日增重结果来看,各组间日增重结果有显著差异 ($P = 0.0003$),其中以减少蛋氨酸组 (B 组) 日增重下降幅度最大,下降 53.17%,其次为减少精氨酸组 (F 组),下降 42.84% 和减少赖氨酸组 (A 组),下降 37.04%。所以,从氮沉积指标 ($\text{g/kg W}^{0.75}$) 来分析,饲喂玉米型日粮生长绵羊的限制性氨基酸次序为蛋氨酸、苏氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸和组氨酸,相对限制程度分别为 46.67%、28.66%、23.50%、17.33%、15.89 和 15.00% (见图 1),即第一、二、三限制性氨基酸分别为蛋氨酸、苏氨酸和赖氨酸。

第二期对照组 (C_2) 的氮平衡结果比第一期和第三期 (C_1 和 C_3) 有所降低,这可能因气温较高使绵羊由汗腺分泌排出氮增加所致。国外的一些研究者,如 Storm 和 Ørskov (1984)、Schelling 等 (1973)、Nimrich 等 (1970)、Richarson 等 (1978) 在纯合或半纯合日粮下研究证实蛋氨酸和赖氨酸通常为生长牛和绵羊的限制性氨基酸。本研究以实用日粮为基础,通过“递减法”灌注氨基酸。实验条件和所采用日粮种类不同,这也许是出现不同限制性氨基酸次序的主要原因。因进入反刍动物小肠吸收的氨基酸主要来源于微生物蛋白质、饲料非降解蛋白质和内源蛋白质,其中前两项的影响是主要的,所以研究不同降解率和不同氮源日粮的限制性氨基酸在生产中显得更有价值。

2.3 十二指肠灌注氨基酸对绵羊血浆尿素氮 (PUN) 的影响

十二指肠灌注氨基酸对绵羊血浆尿素氮 (PUN) 的影响结果见表 5。

表 3 氨基酸灌注前绵羊消化道不同部位食糜流量(g/d)

Table 3. Nutrient flows at different sites of the digestive tract of the sheep before duodenal amino acid infusion

	A、D、F	B、E、G	C ₁ 、C ₂ 、C ₃	X ±SEM	显著性
干物质进食量 Dry matter intake(DMI)	00713 ±35.76	0663 ±132.10	00761 ±66.40	00712 ±39.94	NS
氮进食量 Nitrogen intake(NI)	013.8 ±0.43	13.2 ±1.58	014.4 ±0.79	013.8 ±0.48	NS
瘤胃干物质流量 DM flow in the rumen	00646 ±73.86	0613 ±146.09	00686 ±48.93	00648 ±30.0	NS
瘤胃 K _p Ruminal K _p (%/h)	06.51 ±0.65	5.09 ±1.19	05.11 ±0.54	05.94 ±1.19	NS
十二指肠干物质流量 DM flow in the duodenum	00502 ±46.85	0487 ±62.33	00498 ±54.56	00496 ±7.53	NS
十二指肠总氮流量 Total N flow in the duodenum	017.0 ±2.18	17.6 ±2.60	016.3 ±1.52	017.0 ±0.61	NS
微生物氮流量 Microbial N flow	3.80	3.13	4.96	03.96 ±0.93	NS
非微生物氮流量 Non - microbial nitrogen flow	13.22	14.41	11.37	13.00 ±1.03	NS
进入十二指肠氨基酸流量 Amino acids flow into the duodenum					
赖氨酸 Lys	04.26 ±0.33	04.58 ±0.48	04.15 ±0.40	04.33 ±0.22	NS
蛋氨酸 Met	00.88 ±0.01	00.81 ±0.14	00.69 ±0.03	00.79 ±0.08	NS
苏氨酸 Thr	04.22 ±0.24	03.10 ±0.61	03.87 ±0.33	03.93 ±0.21	NS
组氨酸 His	00.71 ±0.15	00.82 ±0.11	00.68 ±0.09	00.74 ±0.06	NS
精氨酸 Arg	03.29 ±0.45	03.39 ±0.47	02.87 ±0.31	03.18 ±0.23	NS
亮氨酸 Leu	10.96 ±1.15	10.71 ±1.86	10.70 ±0.33	10.79 ±0.12	NS
异亮氨酸 Ile	02.36 ±0.32	02.45 ±0.48	02.44 ±0.16	02.42 ±0.04	NS
缬氨酸 Val	07.83 ±0.77	07.70 ±1.75	07.47 ±0.38	07.67 ±0.15	NS
苯丙氨酸 Phe	03.71 ±0.49	03.67 ±0.75	03.82 ±0.21	03.73 ±0.06	NS
色氨酸 Trp	00.65 ±0.06	00.59 ±0.08	00.61 ±0.06	00.62 ±0.02	NS
必需氨基酸 EAA	38.87 ±3.81	39.30 ±6.54	37.30 ±1.73	38.49 ±0.86	NS
非必需氨基酸 NEAA	44.76 ±3.77	46.68 ±7.53	43.24 ±4.03	44.90 ±1.41	NS
总氨基酸 TAA	83.64 ±7.58	85.98 ±14.04	80.54 ±5.25	83.39 ±2.23	NS

* 非微生物氮 = 日粮非降解氮 + 内源氮, NS 表示 $P > 0.05$ 。

从表 5 可看出,在灌注氨基酸的第 4 天各组间血浆 PUN 浓度差异显著 ($P = 0.042$),灌注的第 7、10 天各组间 PUN 浓度差异不显著 ($P > 0.05$)。在灌注第 7 天,减少氨基酸组(A、B、D、E、F)绵羊 PUN 分别比对照组(C_1 、 C_2 、 C_3)的 PUN 提高,减少色氨酸(G 组),在灌注第 10 天的 PUN 比对照组(C_3)提高。可见,因绵羊体内限制性氨基酸不足或氨基酸不平衡会使体内血浆尿素氮浓度提高。血浆尿素氮(PUN)是反映机体氮代谢的一个重要指标。通常,机体血浆代谢库中 PUN 浓度较稳定,它一般受进食氮的影响较大,同时也受机体内源氮分泌的影响。

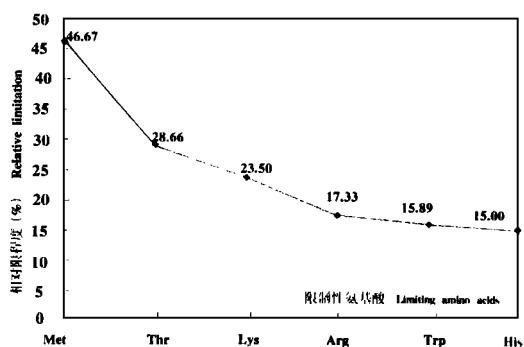


图 1 饲喂玉米型日粮生长绵羊限制性氨基酸的相对限制程度(%)

Fig. 1 Amino acid limitation in the sheep fed corn based diet (%)

表 4 十二指肠灌注氨基酸混合物对绵羊氮平衡和增重的影响

Table 4. Effects of duodenal amino acid infusion on nitrogen balance and body weight gain of the sheep

	A	B	C ₁	D	E	C ₂	F	G	C ₃	SEM	P
进食 N Nitrogen intake (g/d)	13.14	11.59	15.37	12.02	12.63	15.01	12.83	13.45	15.56	3.33	0.825
粪 N Fecal N (g/d)	3.09	3.35	4.05	2.94	3.46	5.52	2.70	3.65	4.12	1.94	0.798
尿 N Urine N (g/d)	4.13 ^{ab}	4.27 ^b	3.93 ^{ab}	4.89 ^b	4.51 ^{ab}	5.25 ^c	3.64 ^{ab}	3.40 ^b	3.99 ^{ab}	0.95	0.274
尿 N Urine N (g/kg W ^{0.75})	0.30 ^b	0.35 ^b	0.32 ^b	0.37 ^b	0.40 ^b	0.43 ^c	0.32 ^b	0.30 ^b	0.35 ^b	0.06	0.124
可消化 N Digested N (g/d)	10.05 ^a	8.24 ^a	11.31 ^a	9.08 ^a	9.17 ^a	10.64 ^a	10.13 ^a	9.80 ^a	11.43 ^a	1.85	0.475
沉积 N Retained N (g/d)	5.92 ^{abc}	3.98 ^c	7.39 ^a	4.19 ^c	4.66 ^{bc}	5.39 ^{bc}	6.49 ^{ab}	6.40 ^b	7.45 ^a	1.16	0.009
沉积 N Retained N (mg/d)	459 ^{bc}	320 ^d	600 ^b	308 ^d	367 ^d	432 ^{cd}	494 ^b	503 ^a	598 ^a	60	0.0001
沉积氮下降	- 23.50	- 46.67	-	- 28.66	- 15.00	-	- 17.33	- 15.89	-	-	-
Retained N decline(%)											
沉积氮/可消化氮 RN/DN (%)	59.67 ^b	46.27 ^c	65.16 ^a	45.29 ^d	50.73 ^{bc}	54.07 ^c	65.16 ^a	64.87 ^a	65.14 ^a	5.80	0.0003
尿中尿素氮	1.99 ^{bc}	3.09 ^b	2.28 ^{abc}	3.26 ^a	2.87 ^b	2.85 ^{ab}	1.87 ^{bc}	1.34 ^c	1.90 ^{bc}	0.70	0.042
Urine urea nitrogen (g/d)											
尿中尿素氮/尿氮 UUN/UN (%)	50 ^b	71 ^a	52 ^{ab}	66 ^{ab}	63 ^{ab}	54.3 ^{ab}	53 ^{ab}	40 ^b	48 ^b	12.36	0.183
尿中尿素氮/进食 N	15	22	16	28	24	19	15	10	12	-	-
UUN/NI (%)											
日增重 Body weight gain (g/d)	60.5 ^{bc}	45 ^{bc}	96.1 ^a	37.4 ^c	54.1 ^{bc}	59.2 ^{bc}	66.7 ^b	70.5 ^b	116.7 ^a	14.65	0.003
日增重下降	- 37.04	- 53.17	-	- 36.82	- 8.61	-	- 42.84	- 39.59	-	-	-
Bodyweight gain decline(%)											

同行数字右上角标注不同字母者差异显著。

另外,进入绵羊小肠吸收氨基酸平衡与否,会直接影响 PUN 值。一些限制性氨基酸对机体氮代谢状况影响较大,从而也会影响到 PUN 值的变化。所以,PUN 值可作为动物限制性氨基酸研究的一个间接指标。

2.4 十二指肠灌注氨基酸对绵羊血浆中游离氨基酸浓度的影响

十二指肠灌注氨基酸对绵羊血浆中游离氨基酸浓度的影响见表 6。

由表 6 可见,减少 Lys 组绵羊血浆中 Lys 浓度较对照组 C₁ 有所下降 ($P > 0.05$),减少 Met 组血浆中 Met 有所下降 ($P > 0.05$),对其它氨基酸浓度无显著影响。减少 Thr 组绵羊血浆中 Thr 浓度较对照组 C₂ 有所升高 ($P > 0.05$)。减少 His 组的血浆中 His 有所降低,而减少 Arg 组血浆中 Arg 浓度显著下降 ($P < 0.05$),Lys、Pro 浓度升高 ($P > 0.05$)。减少 Lys、Thr、His 组分分别都比对照组 (C₁, C₂, C₃) 的甘氨酸与其它氨基酸比 (Gly/OAA) 值升高 ($P > 0.05$)。Egan (1972) 指出:如果 Gly/OAA 值升高则说明绵羊蛋白质营养状况不良。血浆 FAA 的含量在低氮日粮条件下较稳定。减少某种氨基酸对绵羊血浆中 FAA 的影响取决于该种氨基酸的相对限制程度。本实验研究结果表明:对于相对限制程度较大的氨基酸(大约 20%),减少该种氨基酸时,血浆中该种氨基酸浓度不发生显著下降,甚至有时会升高;而对相对限制程度较小的氨基酸(小于 20%),如减少其灌注量反而引起血浆中 FAA 浓度下降。这可能因动物体内的自我调控使血流量加快以及细胞与组织液之间氨基酸周转率加快所致。

2.5 十二指肠灌注氨基酸后绵羊体内氮平衡随时间的变化

表 5 十二指肠灌注氨基酸对绵羊血浆尿素氮(PUN)的影响 (mg/100ml)

Table 5. Effects of duodenal amino acid infusion on plasma urea nitrogen of the sheep

处 理 Treatments	灌注前 Before infusion	灌注后 After infusion			平均值 Average
		4 天 4day	7 天 7 day	10 天 10 day	
A(减 Lys) Lys deletion	14. 43	17. 36 ^a	14. 68 ^a	16. 32	16. 12 ±1. 34 ^d
B(减 Met) Met deletion	10. 60	14. 90 ^b	12. 35 ^b	13. 37	13. 54 ±1. 28 ^b
D(减 Thr) Thr deletion	-	13. 24 ^{abc}	14. 01 ^{ab}	19. 74 ^d	15. 66 ±2. 90 ^g
E(减 His) His deletion	-	7. 47 ^a	12. 14 ^b	13. 51 ^{ab}	11. 04 ±2. 58 ^b
F(减 Arg) Arg deletion	-	12. 99 ^{bc}	12. 22 ^b	15. 45 ^b	13. 55 ±1. 38 ^b
G(减 Trp) Trp deletion	-	10. 47 ^c	11. 16 ^b	14. 24 ^b	11. 96 ±1. 64 ^b
C ₁ (全量) Control C ₁	12. 36	17. 42 ^a	11. 37 ^b	10. 21	13. 00 ±3. 03 ^a
C ₂ (全量) Control C ₂	-	8. 66 ^{bc}	9. 95 ^d	11. 40 ^d	10. 00 ±1. 12 ^b
C ₃ (全量) Control C ₃	-	11. 64 ^{abc}	11. 81 ^{ab}	13. 31 ^{ab}	12. 25 ±0. 75 ^b
P	0. 456	0. 042	0. 589	0. 062	0. 056
SEM	3. 61	3. 37	2. 23	4. 31	2. 31

同列数字肩标字母不同者差异显著。

表 6 十二指肠灌注不同氨基酸对绵羊血浆中游离氨基酸浓度的影响 (μ mol/100ml)

Table 6. Effects of duodenal amino acid infusion on plasma free amino acid concentration of the sheep

FAA	减 Lys	减 Met	全量 C ₁	减 Thr	减 His	全量 C ₂	减 Arg	减 Trp	全量组 C ₃
Lys	015. 72	025. 42	016. 16	008. 80	009. 53	009. 76	025. 61	024. 67	019. 23
Met	007. 57	006. 98	007. 12	004. 98	004. 29	004. 51	009. 66	011. 00	008. 43
Thr	043. 07	035. 54	033. 24	037. 12	027. 95	035. 18	038. 13	029. 74	032. 47
His	009. 63	006. 70	006. 19	003. 82	003. 66	004. 76	007. 33	005. 97	007. 01
Arg	014. 50	015. 47	011. 89	011. 60	010. 90	014. 69	011. 93	013. 74	013. 32
Leu	009. 72	010. 71	011. 5	012. 71	012. 06	015. 01	012. 99	012. 90	011. 95
Ile	007. 42	007. 44	006. 97	009. 31	088. 89	008. 49	009. 36	008. 13	008. 82
Val	019. 17	019. 40	023. 11	019. 54	019. 23	021. 83	020. 04	024. 49	021. 73
Phe	005. 56	005. 25	005. 06	005. 9	005. 92	006. 14	005. 59	005. 62	004. 91
EAA	132. 36	132. 91	121. 35	113. 77	102. 41	120. 36	140. 64	135. 26	127. 88
NEAA	155. 64	096. 83	101. 11	177. 43	159. 81	167. 37	083. 18	072. 26	098. 08
Gly/OAA	037. 92	033. 23	030. 15	047. 24	047. 54	046. 56	025. 70	022. 17	020. 98

十二指肠灌注氨基酸后绵羊体内氮平衡随灌注氨基酸时间的变化见表 7。由表 7 可见 ,灌注氨基酸后较灌注前尿氮排出量增加 ,同时氮沉积与 RN/ DN 比率也增加 ,灌注氨基酸 1~ 4 天绵羊 UN、RN、RN/DN 和 UUN 指标均不稳定 ,大多数指标逐渐升高 ,直到灌注后 5~ 10 天才处于较稳定状态。卢德勋 (1995) 指出 ,由于动物体内存在自我营养调控功能而对体内的氮代谢起调节作用。绵羊体内氨基酸代谢的稳恒控制主要通过机体内的投入与产出体系 (例如通过改变蛋白质进食量、改变消化道内含氮物质利用率和改变粪氮和尿氮排出量等途径)、瘤胃微生物蛋白合成和降解体系以及内源含氮物质的周转体系来实现。灌注氨基酸后 1~ 2 天 ,绵羊的尿氮排出量发生较大变化 ,这是机体的一种适应性反应。随着灌注天数的增加 ,机体通

过氨基酸稳恒控制而建立新的平衡,只有当这种新的稳恒状态建立后,灌注氨基酸的效应才会显示出来。从本实验结果可知,利用十二指肠灌注氨基酸进行氮平衡实验的最佳收取粪、尿样期应为灌注氨基酸后 5~10 天。

3 小结

饲喂以玉米蛋白粉为蛋白质补充料的玉米型日粮的绵羊瘤胃食糜流通速率 (K_p) 为 5.09%~6.15%/h,进入十二指肠的微生物蛋白为 3.13~4.96g/d,占十二指肠总氮量的 17.79%~30.43%,其中饲料非降解氮和内源氮所占的比例较大。绵羊十二指肠中 Met、Lys、His 和 Arg 的流量较低,而 Leu 的流量较高。

按“递减法”灌注混合氨基酸试验表明:减少 Lys、Met、Thr、Arg、His 和 Trp 对绵羊进食氮、粪氮排出量无显著影响 ($P>0.05$),而尿氮排出量不同 ($P>0.05$);沉积氮和沉积氮/可消化氮有显著差异 ($P<0.001$);尿中尿素氮 (UUN) 排出量有所不同 ($P>0.05$)。与对照组相比,减少 21.5%的蛋氨酸时绵羊氮沉积 ($\text{g/kg} \cdot \text{W}^{0.75}$) 下降 46.67%,减少相同比例的苏氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸和组氨酸使绵羊体内沉积氮分别下降 28.66%、23.50%、17.33%、15.89%和 15.00%;使绵羊日增重分别下降 53.17%、36.82%、37.04%、42.84%、39.59%和 8.61%。本实验沉积氮结果表明:饲喂玉米型日粮的生长绵羊 6 种限制性氨基酸次序为蛋氨酸、苏氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸和组氨酸。

十二指肠灌注氨基酸结果使绵羊血浆中尿素氮 (PUN) 浓度升高 ($P<0.05$)。在灌注氨基酸的第 4 天和第 7 天,减少氨基酸组的绵羊 PUN 浓度都比对照组提高。血浆游离氨基酸浓度 (FAA) 随灌注氨基酸的减少而使相应 FAA 降低;减少 Lys、Thr 和 His 组分别比对照组绵羊的 FAA 中甘氨酸与其它氨基酸比值 (Gly/OAA) 升高。

在氨基酸灌注期间绵羊体内氮平衡状况发生变化,在 1~4 天内尿氮排出量呈上升趋势

表 7 十二指肠灌注不同氨基酸对绵羊氮平衡随时间的变化

Table 7. Changes of nitrogen balance with time duodenally infusion of amino acids in sheep

处 理	N 平 衡	灌注前	灌注氨基酸时间				
Treatments	Nitroogen balance	Before infusion	Infused amino acid time (d)				
			2	3~4	5~6	7~8	9~10
A (减 Lys) Lys deletion	NI (g/d)	16.26	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97
	UN (g/d)	04.01	05.46	05.65	05.01	05.30	05.48
	RN ($\text{g/W}^{0.75}$)	00.30	00.43	00.35	00.41	00.45	00.42
	RN/DN (%)	45.01	54.86	48.74	55.57	56.51	56.81
B (减 Met) Met deletion)	NI (g/d)	12.84	16.17	15.87	17.97	17.03	15.62
	UN (g/d)	03.79	04.07	04.84	05.03	04.95	04.13
	RN ($\text{g/W}^{0.75}$)	00.36	00.39	00.31	00.44	00.39	00.38
	RN/DN (%)	57.29	57.61	47.36	55.22	54.52	53.16
C (全量组) Control	NI (g/d)	15.36	17.37	17.37	17.67	16.47	17.37
	UN (g/d)	04.62	03.84	03.58	04.43	04.03	03.04
	RN ($\text{g/W}^{0.75}$)	00.53	00.64	00.58	00.56	00.58	00.64
	RN/DN (%)	61.12	69.63	69.17	63.42	63.38	74.23

势,在5~10天内尿氮排出量和沉积氮趋于稳定。可见,利用十二指肠灌注氨基酸进行氮平衡实验的最佳取粪、尿样时间为灌注后的5~10天。

参考文献

- 高 民等. 1993. 一种改进的铬的测定方法. 内蒙古畜牧科学, 3: 42~43
- 卢德勋等. 1991. 现代反刍动物营养研究方法和技术. 北京: 农业出版社
- 卢德勋. 1995. 动物机体自我营养控功能及其实践意义. 内蒙古畜牧科学, 1: 1~11
- 王洪荣. 1998. 生长绵羊限制性氨基酸和理想氨基酸模式的研究. 内蒙古农牧学院博士学位论文
- Cecave M J, N R Merchen, L L Berger, Fahey Jr. 1990. Intestinal supply of amino acids in sheep fed alkaline hydrogen peroxide - treated wheat straw - based diets supplemented with soybean meal of combination of corn gluten meal and blood meal. *J Anim. Sci.*, 88: 467
- Demjanec E, N R Merchen, J D Cremin Jr, C G Aldrich, L L Berger. 1995. Effect of roasting on site and extent of digestion of soybean meal by sheep: 1. Digestion of nitrogen and amino acids. *J Anim. Sci.*, 73: 824~834
- Egan A R. 1972. Plasma and urinary metabolites as indices of nitrogen utilization in sheep. *Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod.*, 32: 87
- Fraser D L, E R Ørskov, F G Whitelaw, M F Franklin. 1991. Limiting amino acids in dairy cows given casein as the sole source protein. *Livest. Prod. Sci.*, 28: 235~525
- Gibb D J, T J Klopfenstein, R A Britton, A J Lewis. 1992. Plasma amino acid response to graded levels of escape protein. *J Anim. Sci.*, 70: 2855~2892
- Nimrich K, E E Hatfield, J Kaminski, F N Owens. 1970. Qualitative assessment of supplemental amino acids needs for growing lambs fed urea as the sole nitrogen source. *J Nutr.*, 100: 1301~1306
- Richardson C R, E E Hatfield. 1978. The limiting amino acids in growing cattle. *J Anim. Sci.*, 46: 740~745
- Schelling G T, J E Chandler, G C Scott. 1973. Post-ruminal supplemental methionine infusion to sheep fed high quality diets. *J Anim. Sci.*, 37: 1035
- Storm E, E R Ørskov. 1984. The nutritive value of rumen microorganisms in ruminants. 4. The limiting amino acids of microbial protein in growing sheep determined by a new approach. *Br. J Nutr.*, 52: 613~620
- Urbaniak M, T Przybecki. 1995. Effect of dehydrated alfalfa on ruminal characteristics and amino acids flow through lambs duodenum. *Anim. Feed Sci. and Technol.*, 54: 121~131
- Willms C L, L L Berger, N R Merchen, G C Fahey Jr. 1991. Effects of supplemental protein source and level of urea on intestinal amino acid supply and feedlot performance of lambs fed diets based on alkaline hydrogen peroxide - treated wheat straw. *J Anim. Sci.*, 69: 4925~4938
- Zinn R A, F N Owens. 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Can. J Anim. Sci.*, 66: 157~166

致谢: 本项实验研究是王洪荣博士论文的一部分。在实验过程中得到张海鹰、赵秀英、羿静助理研究员、包赛娜副研究员、柏树讲师、乌日娜硕士和于朝晖研究实习员的大力帮助,在此表示衷心的感谢。

A STUDY ON LIMITING AMINO ACIDS FOR GROWING SHEEP FED A CORN BASED DIET

WANG Hong - rong, LU De - xun

(Inner Mongolian Academy of Animal Science , Huhhot 010030 , China)

ABSTRACT

Nine growing crossbred wethers fitted with permanent cannula in the rumen and T - type cannula at the proximal duodenum and terminal ileum in a random block design were fed a diet containing CGM as main nitrogen source to test nutrient flows at different sites of the digestive tract of sheep and amino acid flow to the duodenum of the sheep. Duodenally infused amino acid amount was based the amino acids flows in the small intestine of sheep according to an incremental model. Amino acid mixtures were infused into the duodenum by removal of each amino acid in turn from the AA mixtures of corresponding control group (A : removal of Lys ; B : removal of Met ; C₁ : control 1 ; D : removal of Thr ; E : removal of His ; C₂ : control 2 ; F : removal of Arg ; G : removal of Trp ; C₃ : control 3). The results of experiment showed that ruminal digesta passage rate (Kp) of sheep fed a corn based diet was 5.09 %/ h to 6.15 %/ h ; proportion of microbial N in total digesta nitrogen at the proximal duodenum was accounted for 17.79 % ~ 30.43 %. Flows of Met , Lys , His and Arg in the small intestine of sheep were lower , and that of Leu was higher than that of other amino acids. Compared with control groups , retained N (g/ kg $W^{0.75}$) for removal of Met , Thr , Lys , Arg , Trp and His treatments was decreased by 46.67 % , 28.66 % , 23.50 % , 17.33 % , 15.89 % and 15.00 % respectively ; Bodyweight gain were dropped by 53.17 % , 36.82 % , 37.04 % , 42.84 % , 39.59 % and 8.61 % when Met , Thr , Lys , Arg , Trp and His were removed in turn from the EAA mixture. Plasma urea nitrogen (PUN) concentration of sheep was increased when amino acids were infused into the duodenum ($P < 0.05$). Free amino acid (FAA) concentration in plasma of sheep was declined corresponding removal of AA from control group. Gly/ OAA values for removal AA group were higher than that of control group ($P < 0.05$). Therefore , the order of Met , Thr , Lys , Arg , Trp and His were identified as the first , second , third , fourth , fifth and sixth limiting amino acid in growing sheep. And extent of AA limitation were 46.67 % , 28.66 % , 23.50 % , 17.33 % , 15.89 % and 15.00 % , respectively.

Key words : limiting amino acids ; growing sheep ; corn ; diet