

## 不同DCAD水平对采食后崂山奶山羊瘤胃pH、NH<sub>3</sub>-N及酶活性变化的影响

王利华, 冯 强

(青岛农业大学动物科学与技术学院, 山东青岛 266109)

**摘要:**采用4×4拉丁方设计研究日粮中不同DCAD值对崂山奶山羊瘤胃pH、NH<sub>3</sub>-N及瘤胃酶活性的影响。日粮干物质的DCAD值分别为0、50、100、200 mEq/kg。从各采样点的平均值可以看出,日粮DCAD值对瘤胃氨态氮浓度、瘤胃pH、纤维素酶活性有显著影响( $P<0.05$ ),对 $\alpha$ -淀粉酶活性、中性蛋白酶活性无显著影响( $P>0.05$ )。综合不同指标测定结果,可推断干物质含量100 mEq/kg的DCAD值对非哺乳妊娠的成年崂山奶山羊较适宜。

**关键词:**DCAD; 崂山奶山羊; 瘤胃pH; NH<sub>3</sub>-N; 酶活

中图分类号:S816.71 文献标识码:A

### Effects of Different Dietary Cation-anion Difference on Ruminal pH, NH<sub>3</sub>-N and Enzyme Activity of Laoshan Dairy Goats

Wang Lihua, Feng Qiang

(Qingdao Agricultural University, Animal Science and Technology College, Qingdao Shandong 266109)

**Abstract:** The present experiment was conducted to determine effects of different DCAD in diets on ruminal fluid pH, protein degradation and activity of three kinds of digestion enzyme in rumen of Laoshan dairy goats. A 4×4 Latin square design was adopted in this experiment. DCAD in different groups was 0, 50, 100, 200mEq/kgDM, respectively. The means of different sampling points showed that DCAD of diet could significantly influence the ruminal pH, content of NH<sub>3</sub>-N and activity of carboxymethyl cellulase ( $P<0.05$ ), and there were no effects of DCAD on activity of  $\alpha$ -amylase and neutralprotease( $P>0.05$ ). It could be concluded from results that the DCAD of 100mEq/kgDM was advantaged to non-pregnancy, non-lactation Laoshan dairy goat.

**Key words:** DCAD, Laoshan dairy goat, ruminal fluid pH, NH<sub>3</sub>-N, enzyme activity

在反刍动物瘤胃内栖息着大量的微生物,畜体为微生物的生长提供栖的环境,微生物为反刍动物提供蛋白质、维生素和短链有机酸<sup>[1]</sup>。反刍动物不同日粮组成在瘤胃中被微生物降解的速度及生成的产物不同,同时也给瘤胃微生物发酵提供了不同的底物。这些底物的不同反过来又会影响到瘤胃微生物的种类、微生物分泌酶的活性。日粮阴阳离子差(dietary cation-anion difference, DCAD即每千克干物质Na<sup>+</sup>K-C1的毫摩尔当量)可以调控瘤胃pH<sup>[2]</sup>。反刍动物的瘤胃pH对瘤胃发酵有重要的作用,当瘤胃pH<6.0时,

瘤胃中水解纤维素的pH敏感菌会受到抑制<sup>[3]</sup>。瘤胃内环境的变化会影响瘤胃微生物的种类及数量,微生物发生变化时,相应的酶活会发生改变。此试验的目的就是利用瘤胃瘘管山羊研究不同DCAD日粮对崂山奶山羊瘤胃pH、NH<sub>3</sub>-N及酶活性变化的影响。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 试验动物及饲养管理

试验从2007年6月至9月于青岛农业大学动物房进行。选取4只装有永久性瘤胃瘘管的非哺乳妊娠崂山奶山羊,每日饲喂两次全价混合日粮。日粮组成为

基金项目:校内基金“高产奶牛TMR生产和饲喂技术的研究”资助(项目编号610634)。

第一作者简介:王利华,女,1971年出生,青岛农业大学动物科技学院,副教授,研究方向:动物营养与饲料配合。通信地址:266109 山东省青岛市城阳区青岛农业大学动物科技学院, Tel: 0532-86080734, E-mail: lhwang@qau.edu.cn。

收稿日期:2008-12-02, 修回日期:2009-01-07。

地瓜蔓 60%、玉米 24%、大豆粕 7.2%、小麦麸 7.4%、CaHPO<sub>4</sub> 0.4%、CaCO<sub>3</sub> 0.4%、NaCl 0.2%、预混料 0.4%；每千克预混料中含有 FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 79.32 g, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 17.92 g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 60.83 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 41.62 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.20 g, KI 0.14 g, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.11 g, VA 8.52 g, VD<sub>3</sub> 1.16 g, VE 77.50 g。日粮中含 ME 14 MJ/kg、粗蛋白 11.8%、钙 0.48%、磷 0.28%。

### 1.2 试验设计

采用4×4拉丁方设计,在保证饲喂日粮营养水平一致的前提下,通过额外添加NaHCO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、来改变日粮的DCAD水平,调整日粮干物质DCAD水平分别为:A组 0 mEq/kg, B组 50 mEq/kg, C组 100 mEq/kg, D组 200 mEq/kg。

### 1.3 瘤胃液 pH 及氨态氮的测定

正试期第一天早晨 7:00 饲喂,饲喂前采集瘤胃液作为 0 h 样品进行分析,同时按饲喂后 2、4、6、8、10、12 h 分别采集瘤胃液样品,每次约 50 ml 左右。采集的瘤胃液立即测定 pH 后,用四层纱布过滤,一部分

于-20℃冻存,用于测定选择α-淀粉酶、中性蛋白酶和羧甲基纤维素酶酶活,一部分滤液在 4000 r/min 的转速下离心 15 min,用移液管移取上清液 0.5 ml 置于预先装有 4.5 ml 0.2 M 盐酸的采样瓶中,摇匀用来测定氨氮(N-NH<sub>3</sub>)。N-NH<sub>3</sub>的测定采用苯酚-次氯酸钠比色法测定。

### 1.4 数据处理

试验数据应用 SAS 软件中的一般线性模型(GLM)进行方差分析,然后用 Duncan 氏的极大复差法(RRS)进行各试验组的多重比较,检验误差为 5% 水平,试验数据以“±s”表示。

## 2 试验结果与分析

### 2.1 不同 DCAD 水平对瘤胃液 pH 的影响

从表 1 可以看出,随着日粮 DCAD 水平的增大,同一时间点的瘤胃液 pH 呈现增大趋势,奶山羊瘤胃液的 pH 呈先减小后增大的趋势,采食后 4 h 达到最低值,处理 D 组 pH 除了采食后 2 h 这一时间点外,其它各时间点均与处理 C 间无显著差异(P>0.05),均显著高于处理 A 组(P<0.05)。

表 1 不同 DCAD 水平对瘤胃液 pH 的影响

采样时间/h	处理			
	A组	B组	C组	D组
0	6.51±0.16 <sup>c</sup>	6.61±0.04 <sup>bc</sup>	6.67±0.03a <sup>b</sup>	6.75±0.05 <sup>a</sup>
2	6.47±0.03 <sup>b</sup>	6.45±0.04 <sup>b</sup>	6.50±0.03 <sup>b</sup>	6.60±0.08 <sup>a</sup>
4	6.20±0.05 <sup>c</sup>	6.31±0.04 <sup>b</sup>	6.38±0.05 <sup>ab</sup>	6.41±0.04 <sup>a</sup>
6	6.35±0.03 <sup>b</sup>	6.37±0.02 <sup>b</sup>	6.45±0.04 <sup>a</sup>	6.43±0.04 <sup>a</sup>
8	6.32±0.03 <sup>b</sup>	6.41±0.05 <sup>a</sup>	6.41±0.03 <sup>a</sup>	6.46±0.02 <sup>a</sup>
10	6.40±0.02 <sup>b</sup>	6.47±0.02 <sup>ab</sup>	6.47±0.07 <sup>ab</sup>	6.48±0.06 <sup>a</sup>
平均值	6.51±0.16 <sup>c</sup>	6.61±0.04 <sup>bc</sup>	6.67±0.03 <sup>ab</sup>	6.75±0.05 <sup>a</sup>

注:表中数据以平均数±标准差表示,同列数据字母相同、相邻和相间分别表示差异不显著(P>0.05)、显著(P<0.05)和极显著(P<0.01)。下表同。

表 2 不同 DCAD 水平对瘤胃液氨态氮的影响

(mg/100ml)

采样时间/h	处理			
	A组	B组	C组	D组
0	30.80±1.12 <sup>a</sup>	27.74±0.57 <sup>b</sup>	25.04±0.97 <sup>c</sup>	22.13±1.10 <sup>d</sup>
2	23.86±1.03 <sup>a</sup>	17.07±0.39 <sup>c</sup>	15.03±0.52 <sup>d</sup>	21.76±0.38 <sup>b</sup>
4	15.19±0.39 <sup>a</sup>	11.93±0.31 <sup>c</sup>	7.72±0.99 <sup>d</sup>	13.60±0.58 <sup>b</sup>
6	10.17±0.64 <sup>a</sup>	10.00±0.74 <sup>a</sup>	8.33±0.36 <sup>b</sup>	9.52±0.39 <sup>a</sup>
8	27.83±0.54 <sup>a</sup>	16.57±0.51 <sup>c</sup>	13.52±0.59 <sup>d</sup>	18.02±0.52 <sup>b</sup>
10	14.85±0.47 <sup>b</sup>	21.99±0.65 <sup>a</sup>	13.24±0.66 <sup>c</sup>	14.82±0.46 <sup>b</sup>
平均值	30.80±1.12 <sup>a</sup>	27.74±0.57 <sup>b</sup>	25.04±0.97 <sup>c</sup>	22.13±1.10 <sup>d</sup>

### 2.2 不同 DCAD 水平对瘤胃液氨态氮浓度的影响

从表 2 可知,随着 DCAD 水平增加,同一时间点瘤胃内 NH<sub>3</sub>-N 浓度有降低趋势,在食后 6 h 后达到最低

值,而后升高。处理组 C,除食后 6 h 外,其余各个时间点,瘤胃内 NH<sub>3</sub>-N 浓度均显著低于其他各处理组(P<0.05)。

### 2.3 不同DCAD水平对瘤胃液中 $\alpha$ -淀粉酶的活性的影响

不同DCAD值瘤胃液中 $\alpha$ -淀粉酶活性指标的测定数据见表3。 $\alpha$ -淀粉酶活性平均值表明,日粮不同DCAD水平对崂山奶山羊瘤胃液中 $\alpha$ -淀粉酶的活性无显著的影响( $P>0.05$ )。 $\alpha$ -淀粉酶在食后4 h开始上升,食后6 h达到最大。处理组D的 $\alpha$ -淀粉酶活性在食后

4 h、8 h显著低于其他各处理组( $P<0.05$ )。

### 2.4 不同DCAD水平对瘤胃液中性蛋白酶活性的影响

不同DCAD水平瘤胃液中性蛋白酶的活性见表4。瘤胃液中性蛋白酶活性的均值表现为,日粮不同DCAD水平对崂山奶山羊瘤胃液中中性蛋白酶的活性无显著的影响( $P>0.05$ )。中性蛋白酶的活性在食后4 h开始上升,在食后6 h达到最大值。

表3 不同处理日粮瘤胃液中 $\alpha$ -淀粉酶的活性的影响

(U/ml)

采样时间/h	处理			
	A组	B组	C组	D组
0	0.27±0.06 <sup>ab</sup>	0.27±0.05 <sup>b</sup>	0.28±0.04 <sup>a</sup>	0.30±0.06 <sup>a</sup>
2	0.22±0.05 <sup>b</sup>	0.26±0.04 <sup>a</sup>	0.24±0.05 <sup>a</sup>	0.25±0.04 <sup>a</sup>
4	0.28±0.05 <sup>a</sup>	0.30±0.06 <sup>a</sup>	0.31±0.04 <sup>a</sup>	0.26±0.05 <sup>b</sup>
6	0.33±0.05 <sup>a</sup>	0.32±0.05 <sup>a</sup>	0.36±0.09 <sup>a</sup>	0.34±0.02 <sup>a</sup>
8	0.29±0.05 <sup>a</sup>	0.31±0.05 <sup>a</sup>	0.30±0.06 <sup>a</sup>	0.26±0.06 <sup>b</sup>
10	0.30±0.04 <sup>a</sup>	0.28±0.06 <sup>ab</sup>	0.32±0.04 <sup>a</sup>	0.31±0.04 <sup>a</sup>
平均值	0.28±0.04 <sup>a</sup>	0.29±0.03 <sup>a</sup>	0.30±0.04 <sup>a</sup>	0.29±0.04 <sup>a</sup>

表4 不同DCAD水平对瘤胃液中性蛋白酶的活性的影响

(U/ml)

采样时间/h	处理			
	A组	B组	C组	D组
0	2.54±0.55 <sup>a</sup>	2.76±0.33 <sup>a</sup>	2.87±0.63 <sup>a</sup>	2.62±0.22 <sup>a</sup>
2	1.89±0.63 <sup>b</sup>	2.31±0.24 <sup>a</sup>	2.28±0.49 <sup>a</sup>	2.11±0.43 <sup>b</sup>
4	2.35±0.13 <sup>a</sup>	2.51±0.48 <sup>a</sup>	2.65±0.52 <sup>a</sup>	2.48±0.44 <sup>a</sup>
6	2.76±0.63 <sup>ab</sup>	2.65±0.41 <sup>ab</sup>	3.02±0.37 <sup>a</sup>	2.61±0.41 <sup>b</sup>
8	2.55±0.34 <sup>ab</sup>	2.55±0.26 <sup>ab</sup>	2.81±0.33 <sup>a</sup>	2.46±0.33 <sup>ab</sup>
10	2.60±0.61 <sup>a</sup>	2.43±0.52 <sup>b</sup>	2.63±0.44 <sup>a</sup>	2.72±0.43 <sup>a</sup>
平均值	2.45±0.30 <sup>a</sup>	2.54±0.16 <sup>a</sup>	2.71±0.25 <sup>a</sup>	2.50±0.22 <sup>a</sup>

表5 不同DCAD水平对瘤胃液羧甲基纤维素酶的活性的影响

(U/ml)

采样时间/h	处理			
	A组	B组	C组	D组
0	12.28±2.34 <sup>b</sup>	12.55±1.66 <sup>ab</sup>	13.23±2.01 <sup>a</sup>	12.82±1.45 <sup>ab</sup>
2	10.15±1.76 <sup>b</sup>	10.28±1.64 <sup>ab</sup>	11.21±1.10 <sup>a</sup>	10.84±1.65 <sup>a</sup>
4	8.97±0.96 <sup>ab</sup>	9.24±1.45 <sup>a</sup>	9.73±2.37 <sup>a</sup>	9.33±0.63 <sup>a</sup>
6	9.03±1.32 <sup>b</sup>	9.65±1.86 <sup>a</sup>	10.13±1.22 <sup>a</sup>	9.70±3.01 <sup>a</sup>
8	10.83±1.58 <sup>a</sup>	10.64±1.46 <sup>a</sup>	11.01±1.33 <sup>a</sup>	10.57±0.67 <sup>a</sup>
10	11.66±1.04 <sup>ab</sup>	11.97±1.76 <sup>a</sup>	12.45±2.43 <sup>a</sup>	11.37±2.63 <sup>b</sup>
平均值	10.49±1.36 <sup>b</sup>	10.72±1.30 <sup>ab</sup>	11.29±1.34 <sup>a</sup>	10.77±1.25 <sup>a</sup>

### 2.5 不同DCAD水平对瘤胃液中羧甲基纤维素酶活性的影响

不同DCAD水平瘤胃液羧甲基纤维素酶的活性见表5。不同DCAD影响羧甲基纤维素酶的活性( $P<0.05$ )。处理C、D组的酶活性显著高于A组( $P<0.05$ ),

与B组间差异不显著。各采样点羧甲基纤维素酶活性没有规律性变化,B组和C组间的羧甲基纤维素酶活性变化趋势一致且两组间无显著差异( $P<0.05$ )。各处理组羧甲基纤维素酶的活性均随采集时间呈现先降后增的变化趋势,食后4 h达到最低值。

### 3 讨论

#### 3.1 DCAD 水平对瘤胃液 pH 的影响

动物采食饲料后,碳水化合物在瘤胃中被发酵产生挥发性脂肪酸的速度较快、数量较多,而瘤胃上皮对挥发性脂肪酸的吸收及流出慢于产生的速度,所以瘤胃中挥发性脂肪酸的浓度逐渐升高,导致 pH 下降<sup>[4]</sup>。韩正康<sup>[5]</sup>和 Murphy<sup>[6]</sup>等指出,瘤胃内 pH 变动范围为 5.0~7.5,呈现有规律形式变动,一般于饲喂后 2~6 h 达到最低值。此次试验中各组的瘤胃液 pH 均在 6.2~6.8 之间变动,而且各组瘤胃液 pH 在食后 4 h 达到最低。DCAD 值为 100 和 200 mEq/kg 的 C 组和 D 组瘤胃 pH 波动最小,说明对瘤胃液缓冲效果最好。

#### 3.2 DCAD 水平对瘤胃液氨态氮浓度的影响

反刍动物瘤胃液 NH<sub>3</sub>-N 是瘤胃氮代谢中外源蛋白质和内源含氮物质降解的重要产物,它同时也是瘤胃微生物合成菌体蛋白的原料。大多数瘤胃微生物能够利用氨作为氮源进行微生物蛋白质的合成。NH<sub>3</sub>-N 浓度在一定程度上反映了瘤胃微生物分解含氮物质产 NH<sub>3</sub> 的速度及其对 NH<sub>3</sub> 的摄取利用情况。Kang-Meznarich<sup>[7]</sup>研究发现氨浓度在 3.3~8.5 mg/100ml 之间是微生物最大生长范围。试验结果表明干物质汇总 DCAD 值为 100 mEq/kg 的 C 组在食后 6 h 氨氮浓度 8.33 mg/100ml,在瘤胃微生物蛋白质合成所需的最佳范围。

#### 3.3 日粮不同 DCAD 水平对瘤胃酶活的影响

嗜淀粉瘤胃杆菌、牛链球菌、丁酸梭菌均有产生较强 α-淀粉酶的能力。试验中不同的 DCAD 对 α-淀粉酶的活性没有影响,试验日粮中蛋白质来源以大豆粕为主,由于大豆粕在瘤胃中的降解较为迅速,可能会因肽和氨基酸的迅速分解而引起过量氨的产生,影响了发酵非结构性碳水化合物(Nonstructure carbohydrate, NSC)细菌的快速生长,故表现为试验中瘤胃中 α-淀粉酶的活性明显低于已报导的以膨化大豆为蛋白质来源的日粮<sup>[8]</sup>。

从瘤胃液中分离出的细菌中,30%~50%有降解胞外蛋白的酶活性。目前人们对蛋白质降解菌的研究主要集中在嗜淀粉拟杆菌、溶纤维丁酸弧菌和栖瘤胃普雷沃氏菌<sup>[9]</sup>。在瘤胃中,瘤胃微生物主要利用的氮是氨,一些报道也证实,在无蛋白质和氨基酸的培养基中

也仍有蛋白酶的产生。在一般情况下,蛋白质水解酶的活性是比较稳定的,而且难于调控<sup>[9]</sup>。Blackburn<sup>[10]</sup>研究发现,培养基组成成分对嗜淀粉拟杆菌产生的蛋白酶活性基本没有影响,但对细菌的生长速度略有影响,在低生长速度下,产生的酶活性反而更高。试验研究中四种不同处理的 DCAD 对瘤胃微生物中性蛋白酶的活性没有显著的影响。

瘤胃中的细菌、真菌及原虫可以分泌纤维降解酶<sup>[1]</sup>。纤维素的分解受 pH 的影响较大,因此稳定瘤胃内环境是保证纤维分解的关键。纤维素的酶活在不同时间点的变化规律同瘤胃 pH 的变化趋势大致相同,由此推断瘤胃 pH 在瘤胃降解过程中可能发挥着重要的作用。不同处理组 DCAD 通过影响瘤胃 pH 进而影响瘤胃纤维素酶的活性。

### 参考文献

- [1] Russell J B and Rychlik J L. Factors that alter rumen microbial ecology [J]. *Science*, 2001, 292(55):19:1-13.
- [2] Russell J B. Another theory for the action of ruminal buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production [J]. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76:826-830.
- [3] Russell J B and Wilson D B. Why Are Ruminal Cellulolytic Bacteria Unable to Digest Cellulose at Low pH [J]. *Journal of Dairy Science*, 1996, 79: 1503-1509.
- [4] Kajikawa H and Kudo H. Degradation of benzyl ether bonds lignin by ruminal microbes [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2000, 187: 15-20.
- [5] 韩正康,陈杰.反刍动物瘤胃的消化和代谢[M].北京:科学出版社,1988.
- [6] Murphy J and Kennelly J. Effect of protein concentrate and protein source on the degradability of dry matter and protein in situ [J]. *Journal of Dairy Science*, 1987, 70:1841-1849.
- [7] Kang-Meznarich J H and Broderick G A. Effects of incremental urea supplementation on ruminal ammonia concentration and bacterial protein formation [J]. *Journal of Animal Science*, 1980, 51: 422-431.
- [8] 孙宏选.不同来源的蛋白质和非结构性碳水化合物对泌乳奶牛瘤胃微生物酶活性的影响[D].北京:中国农业科学院,2006:21-22.
- [9] 冯仰廉主编.反刍动物营养学[M].北京:科学出版社,2004, 548-595.
- [10] Blackburn T H. Protease production by *Bacteroides amylophilus* strain H18 [J]. *Gen. Microbiol.* 1968, 53: 27-36.