

罗志斌, 欧慧敏, 李建中, 等. 体外发酵法评估呼伦贝尔羊瘤胃对过瘤胃蛋氨酸的生物利用率及过瘤胃蛋氨酸对瘤胃微生物的影响[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(5): 874-880.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.05.012

体外发酵法评估呼伦贝尔羊瘤胃对过瘤胃蛋氨酸的生物利用率及过瘤胃蛋氨酸对瘤胃微生物的影响

罗志斌^{1,2}, 欧慧敏^{1,2}, 李建中², 谭支良¹, 焦金真¹

(1.中国科学院亚热带农业生态研究所/亚热带农业生态过程重点实验室/畜禽养殖污染控制与资源化技术国家工程实验室/湖南省动物营养生理与代谢过程重点实验室, 湖南 长沙 410125; 2.湖南师范大学生命科学学院/动物肠道功能湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410081)

摘要: 为了探究呼伦贝尔羊瘤胃体外发酵体系对过瘤胃蛋氨酸(RPMet, 由玉米淀粉和棕榈油包被)的生物利用率及过瘤胃蛋氨酸对瘤胃微生物类群的影响, 取4只装有瘘管的雌性呼伦贝尔羊的瘤胃液进行体外发酵试验, 在发酵起始阶段与发酵后2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h测定发酵体系中的RPMet降解率。每个发酵时间节点设置5个平行处理, 在以上7个时间节点取发酵液并进行16S rDNA测序分析。结果表明, 在体外发酵体系中, RPMet在发酵后8 h的降解率小于30.0%, 说明该产品的包被效果较好。测序结果显示, 发酵24 h后的Simpson指数显著低于发酵12 h后的Simpson指数($P < 0.05$)。主坐标分析(PCoA)能够显示物种的 β -多样性, 本研究结果显示, 各时间点的聚类结果皆存在显著差异($P < 0.05$)。拟杆菌门、瘤胃球菌属、普雷沃氏菌属的相对丰度在发酵后8 h内显著上升, 发酵12 h后显著下降($P < 0.05$)。厚壁菌门、广古菌门、甲烷杆菌属、解琥珀酸菌属、颤螺菌属的相对丰度在发酵后12 h内显著下降, 之后显著上升($P < 0.05$)。综上所述, 研究中所用的RPMet的包被效果较好, 且发酵前期主要是普雷沃氏菌属、瘤胃球菌属微生物降解玉米淀粉包被层, 而RPMet的过度降解显著提高了甲烷杆菌属微生物的相对丰度。

关键词: 过瘤胃蛋氨酸; 绵羊; 体外发酵; 16S rDNA; 微生物

中图分类号: S852.23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)05-0874-07

Evaluation for bioavailability of rumen protected methionine and its effects on rumen microorganisms in Hulun Buir sheep by *in vitro* fermentation

LUO Zhibin^{1,2}, OU Huimin^{1,2}, LI Jianzhong², TAN Zhiliang¹, JIAO Jinzhen¹

(1. Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences/Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region/National Engineering Laboratory for Poultry Breeding Pollution Control and Resource Technology/Hunan Key Laboratory of Animal Nutritional Physiology and Metabolic Process, Changsha 410125, China; 2. College of Life Sciences, Hunan Normal University/Hunan Provincial Key Laboratory of Animal Intestinal Function and Regulation, Changsha 410081, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the bioavailability of rumen-protected methionine (RPMet, coated with corn starch and palm oil) in the rumen *in vitro* fermentation system of Hulun Buir sheep and the effects of rumen-protected methionine on rumen microbial groups. The rumen fluids of four female Hulun Buir sheep with fistulas were taken for *in vitro* fermentation test. The degradation rate of RPMet in the fermentation system was determined at the initial stage of fermentation and 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h and 24 h after fermentation. Five parallel treatments were set up at each fermentation time node, and the fermentation broth was taken at the above seven time nodes for 16S rDNA sequencing analysis. The results showed that the degradation rate

收稿日期: 2023-06-13

基金项目: 中国科学院国际伙伴计划项目(161343KYSB20200015)

作者简介: 罗志斌(1999-), 男, 湖南娄底人, 硕士研究生, 从事反刍动物营养研究。(E-mail) 1851375407@qq.com

通讯作者: 焦金真, (E-mail) jjz@isa.ac.cn

tation and 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h and 24 h after fermentation. Five parallel treatments were set up at each fermentation time node, and the fermentation broth was taken at the above seven time nodes for 16S rDNA sequencing analysis. The results showed that the degradation rate

of RPMet was less than 30.0% at 8 h after fermentation in the *in vitro* fermentation system, indicating that the coating effect of the product was good. The sequencing results showed that the Simpson index at 24 h after fermentation was significantly lower than that at 12 h after fermentation ($P < 0.05$). Principal coordinate analysis (PCoA) could show the β -diversity of species. The results of this study showed that there were significant differences in the clustering results at each time point ($P < 0.05$). The relative abundance of Bacteroidetes, *Ruminococcus* and *Prevotella* increased significantly within 8 h after fermentation, and decreased significantly after 12 h of fermentation ($P < 0.05$). The relative abundance of Firmicutes, Euryarchaeota, *Methanobrevibacter*, *Succinivibrio* and *Oscillibacter* decreased significantly within 12 h after fermentation, and then increased significantly ($P < 0.05$). In summary, the coating effect of the RPMet product is good. The *Prevotella* and *Ruminococcus* act as main genera to degrade the coating layer of corn starch during the early fermentation period, while excessive degradation of RPMet significantly increase the abundance of *Methanobrevibacter*.

Key words: rumen protected methionine; sheep; *in vitro* fermentation; 16S rDNA; microorganism

对反刍动物而言,氨基酸是其重要的营养来源之一,然而在实际生产中,大部分氨基酸在反刍动物瘤胃中就会被微生物分解利用,只有少量到达小肠并被机体吸收利用。在反刍动物后肠段,氨基酸等营养物质对其新陈代谢、繁衍生殖、机体免疫等生理活动都起着重要的支撑作用^[1]。因此,在实际生产中,通常会对氨基酸进行包被,使大部分氨基酸通过反刍动物瘤胃时不被降解。蛋氨酸是反刍动物体内不可或缺的甲基供体,与细胞的信号传递、核酸和蛋白质的合成等多项生理反应过程有密切关联^[2]。蛋氨酸是反刍动物所需的主要限制性氨基酸之一,对反刍动物的正常生理活动及机体的免疫、健康等有关键作用^[3]。近年来,过瘤胃蛋氨酸(RPMet)在反刍动物养殖中的应用逐渐成为研究热点。

研究发现,在肉羊饲料中补充1头8.0 g/d的RPMet,对肉羊生长发育、对营养物质的消化率有显著改善效果^[4]。在泌乳肉牛的日粮中添加1头9.5 g/d的RPMet,可改善犊牛的表现纤维消化率和饲料利用效率,加快新生牛犊的生长速度^[5]。在奶牛饲料中组合添加1头25.0 g/d的RPMet和1头30.0 g/d的过瘤胃赖氨酸(RPLys),可以提高奶牛乳中的乳脂率、乳蛋白含量,减少乳中的体细胞数^[6]。然而也有研究发现,在黔北麻羊的低蛋白饲料中添加占饲料质量分数0.2%或0.4%的RPMet,不会对其生长发育、血液免疫指标及瘤胃的发酵状态产生显著影响^[7]。引起上述研究结果不一致的原因主要有以下几个方面:(1)RPMet的包被方式及生物利用率不一样;(2)RPMet的添加量不一样;(3)动物的日龄、日粮及个体存在差异。

有研究发现,在可降解蛋白质、可发酵碳水化合物适当平衡的饲料水平下,尽管只有10%的RPMet在奶牛瘤胃中释放,但仍会提高产前奶牛瘤胃液中溶糊

精琥珀酸弧菌(*Succinivibrio dextrinosolvens*)、解淀粉琥珀酸单胞菌(*Succinimonas amylolytica*)及产琥珀酸丝状杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)的相对丰度^[8],说明瘤胃微生物可能对RPMet的精准释放起到重要作用。遗憾的是,关于瘤胃消化RPMet过程中微生物类群的变化尚不清楚。因此,本研究拟以呼伦贝尔羊为研究对象,采用体外发酵法评估瘤胃对RPMet的生物利用率,并探究RPMet对瘤胃微生物区系结构与多样性的影响,旨在为RPMet在呼伦贝尔羊中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

过瘤胃蛋氨酸,购自杭州康德权饲料有限公司,外层由玉米淀粉、棕榈油包被(玉米淀粉含量>80%),蛋氨酸含量 $\geq 75\%$,水分含量 $\leq 5\%$ 。从4只装有瘘管的雌性呼伦贝尔羊的瘤胃中取得瘤胃内容物,将内容物用6层纱布进行过滤,得到瘤胃液。

1.2 试验动物及饲料

以体重相近为原则,选取4只体重为 (30.0 ± 2.0) kg的成年雌性呼伦贝尔羊进行试验,每只试验羊都安装有稳定的瘤胃瘘管,为体外发酵提供瘤胃液。在试验过程中,每只羊单笼饲养且可自由饮水。饲料包括粗饲料和精饲料,其中粗饲料为稻草,精饲料由47.00%玉米粉、24.00%豆粕、22.00%麦麸、4.00%预混料、2.23%石粉和0.77%食盐组成,饲料的精粗比为1:1(重量比)。饲料的营养水平(计算值)如下:干物质(DM)含量85.61%,代谢能(ME)7.15 MJ/kg,粗蛋白(CP)含量12.13%,中性洗涤纤维(NDF)含量41.64%,酸性洗涤纤维(ADF)含量27.92%,粗脂肪(EE)含量2.00%,钙(Ca)含量0.77%,磷(P)含量0.32%。在试验期

内,每天分别于08:00、17:00进行饲喂,每次各投喂精料、粗料 150 g(干物质基础)。

1.3 体外发酵

参考 Menke 等^[9]的方法制备3 000 ml 人工瘤胃缓冲液,不断向配制好的溶液中输入纯 CO₂以保证其处于无氧状态,将水浴锅温度设置为 39.5 ℃,使人工瘤胃缓冲液保持恒温。在试验羊进食前,通过瘘管取得瘤胃内容物,用 6 层脱脂纱布挤压内容物并过滤,得到1 000 ml 瘤胃液,将其与无氧、恒温的人工瘤胃缓冲液混匀,即获得体外发酵所需的人工瘤胃培养液。参照 Wang 等^[10]的方法,称取 2 g 左右过瘤胃氨基酸样品放入发酵瓶中,并加入 50 ml 瘤胃培养液,即得 1 个发酵体系。将发酵液于 39.5 ℃摇床恒温水浴箱中分别发酵 2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h,每个发酵时间节点设置 5 个平行发酵体系。在每个发酵时间点(包括起始阶段),摇匀发酵瓶并吸取 2 ml 发酵液至离心管中,于-80 ℃保存以备后续测定 16S rDNA。借助真空泵,用蒸馏水对发酵体系进行洗涤抽滤,将发酵剩余产物在 65 ℃烘干 24 h,并测定氨基酸含量。

1.4 RPMet 生物降解率的测定

称取 0.2 g 左右的发酵剩余产物,加入 1 ml 6.00 mol/L 盐酸,通过匀浆机将发酵剩余的过瘤胃氨基酸颗粒充分混匀粉碎,随后将混合物转移至 100 ml 容量瓶中,加纯水至刻度线定容并充分混匀,再取 100 μl 定容后的溶液与 900 μl 0.06 mol/L 盐酸混匀,过 0.22 μm 孔径的滤膜后注入测定瓶中。使用全自动氨基酸分析仪(日立公司产品,型号为 L8900)对待测液进行检测,样液用离子交换柱吸附后分离,再与茚三酮溶液进行反应,用分光光度计对反应溶液进行测定,以比色法计算样液中氨基酸的含量。参照以下公式计算瘤胃中 RPMet 的降解率:

$$X = [1 - C \times 50 \times F \times V / (M \times 10^9 \times 1\,000 \times A)] \times 100\%$$

式中: X 为发酵剩余产物中的氨基酸含量, g/kg; C 为处理后待测液中的氨基酸含量, ng/μl; 50 表示处理后待测液中的氨基酸含量, ng/ml; F 为处理后待测液的稀释倍数; V 为水解后定容体积, ml; M 为发酵剩余产物的重量, g; 10^9 表示将氨基酸含量的单位由 ng 换算成 g 的系数; 1 000 表示将氨基酸含量的单位由 g 换算成 kg 的系数; A 为过瘤胃氨基酸中起始的氨基酸含量, g/kg。

1.5 瘤胃微生物多样性及组成分析

1.5.1 瘤胃微生物 DNA 的提取 取各体外发酵时间点结束后的发酵液 2 ml,用 DNA 试剂盒(购自张家口赛诺生物科技有限公司)提取发酵液中的总 DNA。制备 2% 琼脂糖凝胶,在电泳仪中对提取的 DNA 进行电泳,检测 DNA 的可用性。

1.5.2 扩增子测序 DNA 样品 PCR 操作由北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行,从而对 DNA 样品进行扩增纯化,后续再进行 Miseq 文库的构建,并完成对纯净 PCR 产物的测序。使用特定引物(上游引物: 3'-CCTAYGGGRBGCASCAG-5',下游引物: 3'-GGACTACNNGGTATCTAAT-5',其中 R = A/G, S = G/C, Y = C/T, B = G/C/T, N = A/G/C/T)对扩增子 16S rRNA 区域的基因 V3&V4 进行目标序列的扩增。采用德国(Qiagen)的 Qiagen 凝胶提取试剂盒对 PCR 产生的混合产物进行进一步纯化。构建测序 DNA 文库所用的试剂盒为美国 Illumina 库的 TruSeq® DNAPCR 试剂盒,在创建文库的同时完成索引代码的编辑。测序文库的检测用 Qubit® 2.0 荧光计(ThermoScientific)完成,并使用安捷伦生物分析仪 2100 系统对结果进行可视化操作。用 IlluminaNovaSeq 平台对通过质检的文库进行测序,最终获得 250 bp 配对的末端读码。

1.5.3 微生物多样性及组成分析 去除下机的原始读数的标签序列(Barcode)和引物序列并进行质量控制,得到可用于后续分析的有效序列,用 FLASH 软件拼接两端测序数据。用 USEARCH 软件中的 Unoise3 方法对数据进行筛选,随后对序列进行去噪操作,设置参数相似度大于 99%。得到特征序列(ASVs)后,将每条特征序列与 Silva 数据库中的序列进行比对,可信阈值设置为 0.8,从而完成对每条 ASVs 的微生物类别信息注释。得到其在各个分类水平(界、门、纲、目、科和属)的绝对丰度信息,再整理并生成相对丰度统计结果表。用 R 的 vegan 包的 adonis 函数对微生物群落的 α 多样性、β 多样性进行置换多元方差分析(PERMANOVA),使用的距离矩阵、置换检验次数分别是 Bray-curtis、999。

1.6 数据分析

用 Excel 软件统计体外发酵体系中呼伦贝尔羊瘤胃对 RPMet 的生物利用率并制成折线图,α 多样性指数 β 多样性指数使用 R 的 vegan 包计算并制

图。用 SPSS 27 软件对微生物门、属水平的相对丰度进行单因素方差分析,并用 Excel 2021 制图。

2 结果与分析

2.1 体外发酵条件下瘤胃对 RPMet 的消化率

如图 1 所示,在呼伦贝尔羊瘤胃液进行体外发酵的过程中,随着发酵时间的增加 RPMet 逐渐被消化。发酵 4 h、6 h、8 h, RPMet 分别被消化 12.6%、21.3%、29.4%。发酵 24 h 后,有 70.0% 的 RPMet 在体外发酵体系中被消化。

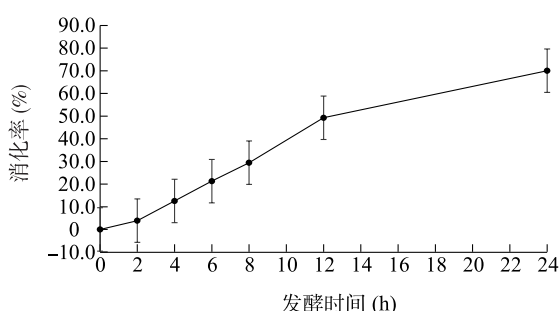


图 1 体外发酵体系中瘤胃对过瘤胃蛋氨酸的消化率

Fig.1 Digestibility of rumen protected methionine in rumen during in vitro simulation

2.2 体外发酵条件下瘤胃中微生物群落的 α 多样性分析

如图 2 所示,Chao1 指数、Shannon 指数、基于丰度的覆盖率估计指数 (ACE 指数) 在呼伦贝尔羊瘤胃液体外发酵的各个时间点间均无显著差异 ($P > 0.05$)。而呼伦贝尔羊瘤胃液进行体外发酵 24 h 的 Simpson 指数显著高于发酵 12 h 的 Simpson 指数 ($P < 0.05$),其余时间点间的 Simpson 指数无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 体外发酵条件下瘤胃中微生物群落的 β 多样性分析

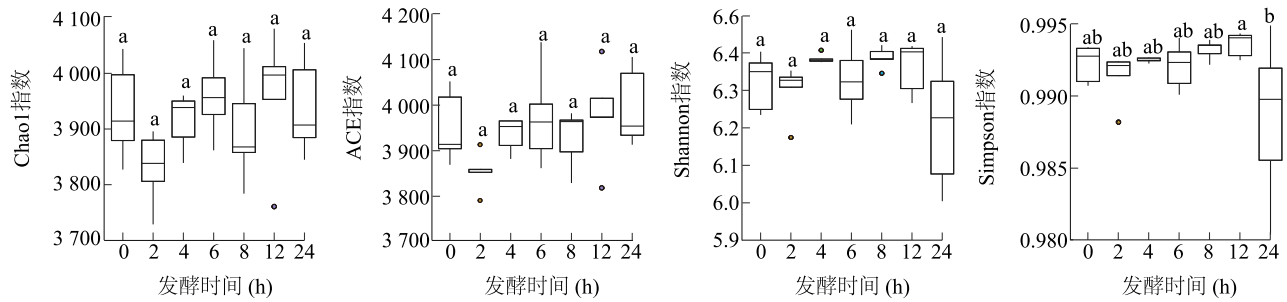
基于 Bray-Curtis 距离矩阵的主坐标分析 (PCoA) 结果 (图 3) 表明,在呼伦贝尔羊瘤胃液进行体外发酵的过程中,每个时间点都有其独特的微生物组成。主坐标分析 1 (PCoA1) 和主坐标分析 2 (PCoA2) 分别可以解释差异的 31.49% 和 22.28%。在发酵起始阶段至发酵后 24 h 间存在显著的聚类差异 ($P < 0.05$),其中以发酵起始阶段与发酵 24 h 间的聚类差异最大 ($P < 0.05$),但发酵 6 h 与发酵 2 h、4 h、8 h 间的聚类差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 体外发酵条件下门水平的瘤胃微生物群落结构分析

如图 4 所示,在呼伦贝尔羊瘤胃液进行体外发酵的过程中,拟杆菌门、厚壁菌门是优势菌门,二者相加的占比超过 80.0%。拟杆菌门 (Bacteroidetes) 在发酵起始阶段的相对丰度为 52.5%,至发酵 8 h 时,相对丰度显著增加至 57.7% ($P < 0.05$),但之后相对丰度显著降低 ($P < 0.05$)。厚壁菌门 (Firmicutes) 在发酵起始阶段的相对丰度为 39.9%,至发酵 6 h 时,相对丰度显著降至 34.1% ($P < 0.05$),之后相对丰度呈上升趋势。变形菌门 (Proteobacteria) 在发酵起始阶段的相对丰度为 1.9%,至发酵 6 h 时,相对丰度显著增加到 2.9% ($P < 0.05$),之后相对丰度降低。互养菌门 (Synergistetes) 在发酵起始阶段的相对丰度为 2.6%,至发酵 2 h 时,相对丰度显著降低至 1.9% ($P < 0.05$),之后在发酵 4 h 时,相对丰度上升至 2.5% 并保持稳定。广古菌门 (Euryarchaeota) 在发酵后 8 h 内的相对丰度相对稳定,均低于 1.0%,在发酵后 12 h 显著上升了 4 倍,达 2.0%,在发酵后 24 h,相对丰度显著增加了 29 倍,达 13.2% ($P < 0.05$)。未定名糖化菌门 (Candidatus_Saccharibacteria)、螺旋体菌门 (Spirochaetes) 和绿弯菌门 (Chloroflexi) 的相对丰度均未超过 0.5%,且在发酵过程中的变化不显著 ($P > 0.05$)。

2.5 体外发酵条件下属水平的瘤胃微生物群落结构分析

如图 5 所示,普雷沃氏菌属 (*Prevotella*)、解琥珀酸菌属的相对丰度较大,是发酵过程中的优势菌属。普雷沃氏菌属在发酵起始阶段的相对丰度为 18.4%,至发酵 6 h 时,其相对丰度显著提高至 25.2% ($P < 0.05$),之后呈下降趋势,在发酵 24 h 时,其相对丰度显著降低至 12.3% ($P < 0.05$)。解琥珀酸菌属 (*Succiniclasticum*) 在发酵起始阶段的相对丰度为 3.1%,至发酵 4 h 时显著降低至 2.7% ($P < 0.05$),之后其相对丰度回升并与发酵起始阶段相近且保持稳定。甲烷杆菌属 (*Methanobrevibacter*) 在发酵起始阶段的相对丰度为 0.4%,在发酵 2 h 时下降到 0.2%,但在发酵 24 h 时较发酵起始阶段的相对丰度显著增加了 32 倍,达到 13.1% ($P < 0.05$)。微动杆菌属 (*Fretibacterium*) 在发酵起始阶段的相对丰度为 2.5%,在发酵 2 h 时显著降低至 1.8% ($P < 0.05$),之后其相对丰度与发酵起



组间标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。圆点表示组内离群值。

图2 体外发酵条件下过瘤胃蛋氨酸对瘤胃液发酵体系中微生物群落 α 多样性的影响

Fig.2 Effects of rumen protected methionine on α diversity of microbial community in rumen fluid fermentation system under *in vitro* fermentation conditions

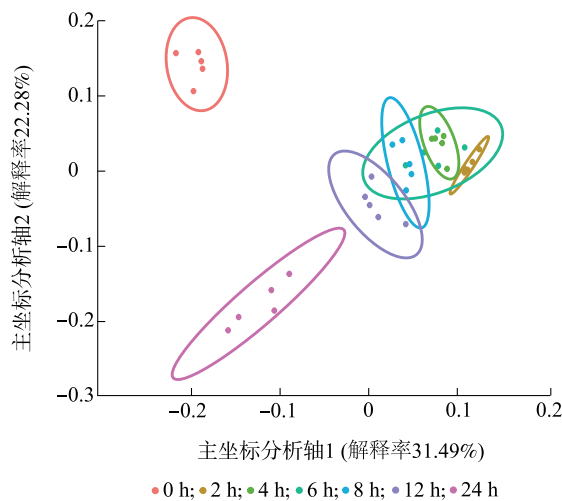


图3 体外发酵条件下过瘤胃蛋氨酸对瘤胃液发酵体系中微生物群落 β 多样性的影响

Fig.3 Effects of rumen protected methionine on β diversity of microbial community in rumen fluid fermentation system under *in vitro* fermentation conditions

始阶段相近。丁酸弧菌属 (*Butyrivibrio*) 在发酵起始阶段的相对丰度为 1.5%, 在发酵 8 h 时显著降低至 1.0% ($P < 0.05$)。瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*) 在发酵起始阶段的相对丰度为 0.9%, 至发酵 6 h 时, 其相对丰度显著提高至 1.3% ($P < 0.05$), 之后回升并与发酵起始阶段相近。巴恩斯氏菌属 (*Barnesiella*)、颤螺菌属 (*Oscillibacter*) 及拟杆菌属 (*Bacteroides*) 的相对丰度均呈现先降低后升高的趋势 ($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

3.1 体外发酵条件下瘤胃中 RPMet 的降解率

在饲喂混合日粮的条件下, 育肥羊的固相食糜

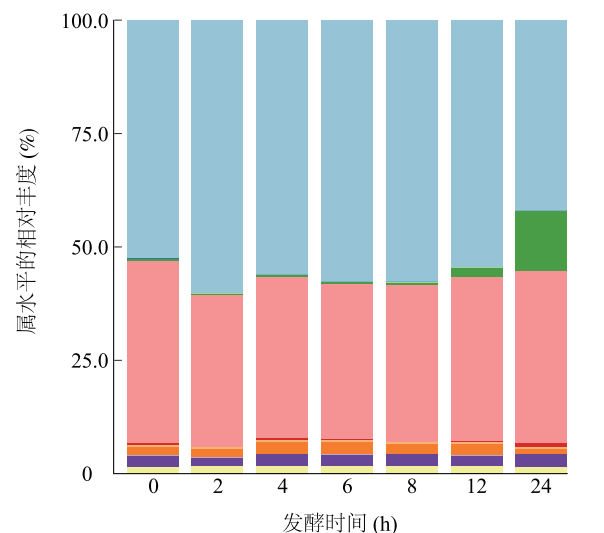


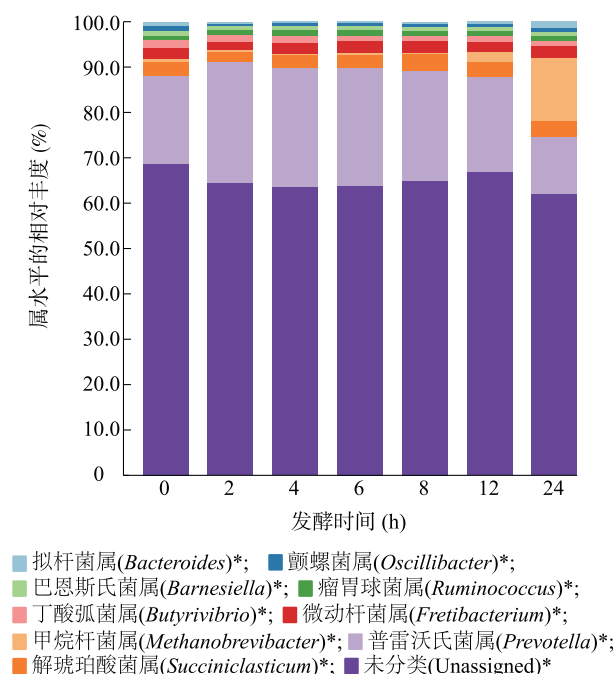
图4 体外发酵条件下过瘤胃蛋氨酸对瘤胃液发酵体系门水平微生物群落的影响

* 表示相对丰度在 0~24 h 有显著变化 ($P < 0.05$)。

图4 体外发酵条件下过瘤胃蛋氨酸对瘤胃液发酵体系门水平微生物群落的影响

Fig.4 Effects of rumen protected methionine on microbial community at phylum level in rumen fluid fermentation system under *in vitro* fermentation conditions

在瘤胃中的流通率近 1 h 7%^[11], 即在饲喂后 8 h 会有约 50% 的瘤胃食糜进入后肠道。有研究发现, 不经任何保护的蛋氨酸在进入瘤胃后 2~4 h 将被瘤胃中的微生物完全降解^[12]。在本研究中, 由玉米淀粉和棕榈油包被的过瘤胃蛋氨酸在体外瘤胃液发酵体系中发酵 4 h 的降解率为 12.6%, 发酵 8 h 的降解率



* 表示相对丰度在 0~24 h 有显著变化 ($P < 0.05$)。

图 5 体外发酵条件下过瘤胃蛋氨酸对瘤胃液发酵体系属水平微生物群落的影响

Fig.5 Effects of rumen protected methionine on microbial community at genus level in rumen fluid fermentation system under *in vitro* fermentation conditions

为 29.4%, 这与 Rossi 等^[13]的研究结果相近, 说明该 PRMet 能达到较好的过瘤胃效果。

3.2 体外发酵条件下瘤胃中 RPMet 对发酵体系微生物多样性的影响

α 多样性能够反映微生物群落的丰富程度, 其中 Chao1 指数、ACE 指数显示微生物的丰度, 二者与微生物丰度之间的关系为正相关; 而 Shannon 指数、Simpson 指数是评价微生物类群多样性的指数, 其中 Simpson 指数与微生物类群多样性呈负相关, 而 Shannon 指数与微生物类群多样性呈正相关^[14]。在本研究中, 体外发酵 24 h 的瘤胃中微生物菌群的 Simpson 指数显著低于发酵 12 h 的, 提示在发酵至 24 h 时, 微生物多样性显著增加, 这与李焱青等^[15]对奶牛瘤胃液体体外发酵的研究结果相似。值得注意的是, β 多样性的分析结果表明, 发酵开始后, 在微生物附着 RPMet 并降解由玉米淀粉、棕榈油构成的包被层的过程中就出现显著的聚类差异, 说明发酵体系在降解包被材料时, 微生物区系就已经发生了改变, 且在发酵后 4~12 h 继续存在显著差异, 发酵

24 h 后的微生物菌群与其他各个时间段间均存在显著差异。可能由于在发酵过程中不同时间段主要分解的底物不同。结合体外发酵的食物降解率及瘤胃内食糜的流动速率, 可以初步将发酵过程分为 3 个阶段: 以降解玉米淀粉的包被物为主的发酵前期 (发酵后 8 h 内)、以降解由包被层转为蛋氨酸为主的底物的发酵中期 (9~11 h) 和以降解蛋氨酸为主的发酵后期 (发酵后 12~24 h)。

3.3 体外发酵条件下瘤胃中 RPMet 对发酵体系微生物组成的影响

对于体内瘤胃和体外发酵体系而言, 二者的微生物组成必然存在差异。在瘤胃体系中, 饲料通常是影响其微生物类群变化的主要因素。因此, 本研究选择无饲料因素影响、相对稳定且具有代表性的瘤胃液体体外发酵体系进行试验, 旨在分析绵羊瘤胃中与 RPMet 精准释放相关的微生物类群。研究发现, 在瘤胃液发酵体系中, 拟杆菌门、厚壁菌门的相对丰度较大^[16]。在本研究中, 拟杆菌门与厚壁菌门在发酵起始阶段的相对丰度之和为 92.4%, 且在发酵起始阶段普雷沃氏菌属与解琥珀酸菌属具有明显的丰度优势, 这与胡丹丹等^[17]对奶牛的研究结果相似。发酵前期的 RPMet 颗粒较为完整, 由玉米淀粉和棕榈油构成的包被层仍能包裹蛋氨酸, 因此此时主要降解包被层。拟杆菌门是瘤胃微生物降解非纤维性碳水化合物过程中占主导地位的菌门^[18], 因此其相对丰度在体外发酵过程中显著提高。变形菌门具有较强的抗压生长能力^[19], 从而使其相对丰度在发酵前期仍能小幅提升。瘤胃球菌属的相对丰度在发酵前期有所提升, 可能由于其有产生淀粉酶的能力^[20], 从而能分解利用包被层。普雷沃氏菌属能高效降解蛋白质, 同时还能降解利用淀粉^[21], 因此可观测到普雷沃氏菌属的相对丰度在前期显著升高。有研究发现, 解琥珀酸菌属^[22]和颤螺菌属^[23]在瘤胃内以分解纤维素为主, 因此认为解琥珀酸菌属、颤螺菌属的相对丰度在发酵前期呈下降趋势。由此推测, 普雷沃氏菌属和瘤胃球菌属在 RPMet 的精准释放中发挥了重要作用。在发酵后期, RPMet 颗粒呈细碎状, 包被层大部分被分解, 此时主要的发酵底物是蛋氨酸。值得注意的是, 甲烷杆菌属的相对丰度在发酵后期显著增加, 与发酵起始阶段相比增幅高达 32 倍, 提示 RPMet 在瘤胃中的过度降解会促进甲烷的排放^[24]。

4 结 论

过瘤胃蛋氨酸在发酵后 6 h、8 h 的体外降解率分别为 21.3%、29.4%，包被效果较好。在降解 RPMet 的过程中，微生物多样性和种群结构发生了显著变化。在发酵前期主要是普雷沃氏菌属、瘤胃球菌属菌降解玉米淀粉包被层，且 RPMet 的过度降解显著提高了甲烷杆菌属的相对丰度。

参考文献：

- [1] 杨志林,李蓓蓓,冯建芳. 过瘤胃氨基酸在反刍动物生产中的应用研究[J]. 饲料博览,2016(8):18-20.
- [2] 李莉,凌浩,雷坤,等. 过瘤胃蛋氨酸应用研究进展[J]. 中国奶牛,2019(8):16-19.
- [3] 卢玉飞,张雪元,马婷婷,等. 过瘤胃蛋氨酸在反刍动物中的营养研究进展[J]. 饲料工业,2014,35(17):13-18.
- [4] 苟红晶,高宪儒. 日粮添加过瘤胃蛋氨酸对肉羊生长性能、养分消化率及血液生化指标的影响[J]. 饲料研究,2021,44(7):21-24.
- [5] SILVA G M, CHALK C D, RANCHES J, et al. Effect of rumen-protected methionine supplementation to beef cows during the periconception period on performance of cows, calves, and subsequent offspring[J]. Animal,2021,15(1):100055.
- [6] 丁大伟,高许雷,滕乐帮,等. 过瘤胃蛋氨酸与过瘤胃赖氨酸不同组合对奶牛瘤胃微生物蛋白产量、产奶性能和氮排泄的影响[J]. 动物营养学报,2019,31(6):2716-2726.
- [7] 王菲,韩娥,任金朋,等. 低蛋白质水平饲料添加过瘤胃蛋氨酸对黔北麻羊生长性能、养分消化率、血浆生化和抗氧化指标及瘤胃发酵参数的影响[J]. 动物营养学报,2020,32(3):1262-1271.
- [8] ABDELMEGEID M K, ELOLIMY A A, ZHOU Z, et al. Rumen-protected methionine during the periparturient period in dairy cows and its effects on abundance of major species of ruminal bacteria[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology,2018,9(2):460-466.
- [9] MENKE K, RAAB L, SALEWSK A, et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content ofuminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*[J]. The Journal of Agricultural Science,1979,93(1):217-222.
- [10] WANG M, WANG R, YANG S, et al. Effects of three methane mitigation agents on parameters of kinetics of total and hydrogen gas production, ruminal fermentation and hydrogen balance using *in vitro* technique[J]. Animal Science Journal,2016,87(2):224-232.
- [11] 高新梅,郑猛,牛露,等. 育肥羊饲喂全混合日粮条件下瘤胃固相食糜外流速度及其有效降解率的评定[J]. 中国畜牧兽医,2017,44(2):456-462.
- [12] 郭玉琴. 蛋氨酸和赖氨酸过瘤胃保护及其效果评价研究[D]. 北京:中国农业科学院,2006.
- [13] ROSSI F, MAURIZIO M, FRANCESCO M, et al. Rumen degradation and intestinal digestibility of rumen protected amino acids: comparison between *in situ* and *in vitro* data[J]. Animal Feed Science and Technology,2003,108(1/2/3/4):223-229.
- [14] 吴琼,王思珍,张适,等. 基于 16S rRNA 高通量测序技术分析安格斯牛瘤胃微生物多样性和功能预测的研究[J]. 微生物学杂志,2020,40(2):49-56.
- [15] 李烨青,奚雨萌,曾涵芳,等. 基于 16S rRNA 测序分析奶牛体外发酵中瘤胃细菌多样性的变化[J]. 动物营养学报,2018,30(10):4059-4070.
- [16] SINGH K M, AHIR V B, TRIPATHI A K, et al. Metagenomic analysis of Surti buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen: a preliminary study[J]. Molecular Biology Reports,2012,39(4):4841-4848.
- [17] 胡丹丹,郭婷婷,李娜,等. 以 16S rDNA 高通量测序法研究果寡糖对奶牛瘤胃菌群结构及多样性的影响[J]. 中国畜牧兽医,2018,45(10):2761-2771.
- [18] BHATT V D, DANDE S S, PATIL N V, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiome in the forestomach fluid from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) [J]. Molecular Biology Reports,2013,40(4):3363-3371.
- [19] HRNCIROVA L, MACHOVA V, TRCKOVA E, et al. Food preservatives induce proteobacteria dysbiosis in human-microbiota associated Nod2-deficient mice[J]. Microorganisms,2019,7(10):383.
- [20] SUEN G, STEVENSON D M, BRUCE D C, et al. Complete genome of the cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 7 [J]. Journal of Bacteriology,2011,193(19):5574-5575.
- [21] RAMŠAK A, PETERKA M, TAJIMA K, et al. Unravelling the genetic diversity of ruminal bacteria belonging to the CFB phylum [J]. FEMS Microbiology Ecology,2000,33(1):69-79.
- [22] WANG Z, YU Y N, LI X Y, et al. Fermented soybean meal replacement in the diet of lactating holstein dairy cows: modulated rumen fermentation and ruminal microflora[J]. Frontiers in Microbiology,2021,12:625857.
- [23] LEE G H, KUMAR S, LEE J H, et al. Genome sequence of *Oscillatoria ruminantium* strain GH1, isolated from rumen of Korean native cattle[J]. Journal of Bacteriology,2012,194(22):6362.
- [24] CHRISTINE M E, MANUELA P, JULIAN T, et al. Archaea are interactive components of complex microbiomes[J]. Trends in Microbiology,2018,26(1):70-85.

(责任编辑:徐 艳)