

银合欢叶粉中抗营养因子 DHP 在牛瘤胃中降解的研究^{*}

冯定远¹ P. P. Atreja²

(1 华南农业大学动物科学系, 广州 510642; 2 印度国家奶业研究院营养系)

摘要 6头从未接触过银合欢叶粉饲料且装有永久瘘管的杂交黄牛被用于研究抗营养因子 DHP 的瘤胃中的代谢降解。试验牛第 1~26 d 日采食 2 kg 银合欢叶粉, 27~29 d 增加至 4 kg, 30 d 以后日采食量达 7 kg。试验第 1、8、15、22、28 和 31 d 为瘤胃液采样日期, 采样时间为投喂银合欢叶粉后的第 0、2、4、6、8、12 和 24 h。瘤胃液样本经过处理后, 测定 3, 4-二羟吡啶(DHP)、总挥发性脂肪酸、各种挥发性脂肪酸的比例。试验结果表明: 试验牛瘤胃微生物开始时并不具有降解 DHP 的能力, 但经过 3 周的适应期后, 瘤胃微生物开始具有分解 DHP 为其他化合物的能力; DHP 并不影响瘤胃的发酵程度。

关键词 银合欢; DHP; 降解; 牛

中图分类号 S 816. 43

银合欢(*Leucaena leucocephala*)是一种蛋白质含量很高的热带、亚热带豆科木本饲料, 饲料营养价值高, 质量好, 已经受到人们的广泛重视。但是, 银合欢茎叶粉中含有一种非蛋白质氨基酸—含羞草素(Mimosin), 它是一种抗营养因子。Hegarty 等(1976)的研究表明, 反刍动物瘤胃微生物能够把含羞草素降解为 3, 4-二羟吡啶(DHP), 但 DHP 是另一种抗营养因子, 它是一种致甲状腺肿大的化合物, 影响甲状腺中碘与含碘化合物的结合。Jagjivan 等(1993)的试验显示, 原来认为饲喂银合欢的动物甲状腺肿大和食欲下降是含羞草素造成的, 其实质是 DHP 造成的结果, Jones 等(1983)发现: 夏威夷山羊的瘤胃微生物具有把 DHP 进一步降解为其它无毒化合物的能力。本试验通过分析银合欢中含羞草素的代谢产物 DHP 在牛瘤胃中降解以及对瘤胃发酵能力的影响, 了解 DHP 代谢规律, 为银合欢叶粉的科学利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物及其日粮组成

6头装有永久瘤胃瘘管的成年瑞士褐牛与沙希瓦黄牛的杂交后代被选为试验动物, 平均体重为(275±12) kg, 试验牛在试验前从未采食过银合欢叶粉饲料(LLM), 试验牛在试验的第 1 至 26 d 期间, 每日一次性饲喂 2 kg LLM 和 10 kg 玉米青贮; 第 27 至 29 d 日喂 4 kg LLM 和 5 kg 玉米青贮; 第 30 至 31 d 只喂 7 kg LLM。

1.2 瘤胃液的收集

在试验的第 1、8、15、22、28 和 31 d 收集瘤胃液, 每天收集瘤胃液的时间分别是投喂 LLM 后的 0、2、4、6、8、12 和 24 h。瘤胃液过滤后, 每 40 mL 加入 1.6 mL 6 mol/L 盐酸, 中止微生物的活动, 制成瘤胃滤液(SRL)。

1.3 测定项目

1.3.1 DHP 瘤胃滤液使用 0.45 μm 的过滤器再次过滤, 使用 Waters 公司的高效液相色谱(HPLC Model 510)测定 DHP, 根据 Tangendjaja 等(1980)的测定方法, 使用 0.2%正磷酸作为洗脱液, 流速为 2 mL/min, 在 254 nm 的波长上测定, 使用 Sigma 公司提供的 DHP 作为标准样。

1.3.2 总挥发性脂肪酸(TVFA), 各种挥发性脂肪酸(FVFA) TVFA 的测定是根据 Barnett 等(1957)推荐的凯氏方法; FVFA 的测定是根据 Cottyn 等(1968)的气相色谱方法。

2 结果与讨论

2.1 DHP 的瘤胃中的降解

不同采样日期在每天投喂 LLM 后的不同采样时间所收集的瘤胃液分析测定的 DHP 浓度见表 1。

表 1 不同采样日期投喂 LIM 后不同采样时间瘤胃液 DHP 水平

采样日期	瘤胃液 DHP 水平/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$							
	0 h	2 h	3 h	4 h	6 h	8 h	12 h	24 h
第 1 d	10.75	103.43	220.66	362.03	293.46	262.21	261.27	197.08
第 8 d	205.36	556.01	665.87	698.65	540.80	409.40	350.67	190.86
第 15 d	188.17	539.62	631.74	702.66	572.89	425.64	369.82	226.03
第 22 d	98.20	467.16	577.20	402.05	305.65	202.84	152.74	190.22
第 28 d	108.67	789.57	1 090.43	750.89	570.46	400.28	350.00	216.45
第 31 d	151.79	875.67	1054.93	924.55	930.65	980.02	480.52	364.84

饲喂 LLM 第 1 d 的 DHP 水平较低, 这是由于瘤胃微生物对含羞草素分解能力还未完全建立起来的缘故, 第 8 d 和第 15 d 的 DHP 水平及其变化趋势很相似, 经检验, 两个采样日期同一采样时间之间结果差异不显著 ($P>0.05$), DHP 水平变化规律与含羞草素的一个显著不同之处是含羞草素浓度有一个明显的峰值, 然后迅速下降, 而 DHP 浓度则维持在一个稳定水平的时间很长, 直至喂后 8 h, 仍维持在 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上, 峰值出现于投喂 LLM 后 4 h。

当试验牛从开始采食银合欢叶粉至第 3 周以后, 瘤胃的 DHP 浓度及其变化规律开始出现与前段时间不同的特点, 第 22 d 在投喂 LLM 后 4 h 的 DHP 浓度由第 8 d 和第 15 d 的 698.64 和 702.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下降至 402.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (下降了 42%), 其余各采样时间点的 DHP 浓度均比前两次同一采样时间点的 DHP 浓度低, 经检验, 差异极显著 ($P<0.01$), 这一结果表明: 当试验牛在适应银合欢 3 周时间以后, 瘤胃微生物逐渐具备了降解 DHP 的能力, 可以将 DHP 进一步分解为其它代谢产物, 这种分解 DHP 能力的形成, 可能是在适应银合欢叶粉饲喂的过程中瘤胃微生物群落的调整与建立或者微生物酶体系调整的结果。

以前的报道一般认为, 普通的反刍动物瘤胃微生物并不具备降解 DHP 的能力, 只是某

些特定地区的反刍动物瘤胃微生物可以分解 DHP。Hutton(1983)指出, 在夏威夷、印尼、巴西和菲律宾以及 Sobale 等(1978)报道在印度部分地区的地方品种反刍动物能够依靠银合欢作为唯一的饲料而生长正常, Jones 等(1983)把这些反刍动物瘤胃微生物接种到澳大利亚的反刍动物瘤胃中, 使瘤胃微生物获得了克服 DHP 毒性的问题, 并通过接种使原来不具有这种能力的反刍动物获得这种降解有毒化合物的能力。Lowry(1982)发现, 山羊喂高量的银合欢日粮, 开始时尿中的 DHP 浓度很高, 但经过 4 个月的适应, 无需接种特定的菌种即可有效地分解 DHP, 他的结果认为, 微生物对银合欢经过一段时间的适应, 可以使瘤胃微生物获得降解 DHP 的能力, 本试验结果同样证明, 牛可以经过一段时间的适应而建立起分解 DHP 的微生物群落, 但与 Lowry(1982)的结论的最大差异是适应期所需的时间——山羊需 4 个月时间, 而本研究的试验牛则只需 3 周时间, 这可能反映了不同种反刍动物瘤胃微生物群落的差异以及适应能力的差异。

2.2 牛饲喂银合欢叶粉的瘤胃发酵

2.2.1 总挥发性脂肪酸(TVFA)浓度 试验牛不同瘤胃液采样日期及不同采样时间的 TVFA 浓度见表 2。TVFA 的峰值出现于饲喂银合欢叶粉后 8 h, 平均峰值浓度为 10.63 meq/100 mL SRL, 每天早上饲喂银合欢叶粉前的 TVFA 浓度为 5.67 meq/100 mL SRL, 不同采样日期的 TVFA 浓度曲线规律是相似的, 说明了含羞草素及 DHP 并不影响瘤胃的正常发酵。

表 2 饲喂银合欢叶粉后不同时间的瘤胃 TVFA 浓度(meq/100 ml)

采样日期	瘤胃 TVFA 浓度/ meq·mL							
	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h	24 h
第 1 d	4.59	5.19	5.54	5.82	9.60	11.84	10.84	7.28
第 8 d	5.56	7.75	7.21	5.82	8.95	10.73	9.03	6.15
第 15 d	5.28	6.67	7.32	5.50	8.48	10.88	8.48	6.28
第 22 d	5.32	6.71	7.06	5.76	9.00	10.57	8.18	6.43
第 28 d	6.17	8.00	9.35	8.13	8.35	9.65	7.92	6.34
第 31 d	7.11	9.06	10.66	7.83	8.80	10.13	7.60	5.78

2.2.2 各种挥发性脂肪酸(FVFA)的比例 各种挥发性脂肪酸(FVFA)的克分子比例见表 3。表中结果可以看出, 在所有的试验采样日期里, 银合欢叶粉投喂后的第 0、1、2 和 4 h 的乙酸、丙酸和丁酸的克分子浓度比例是基本一样的, 但喂后 6 h 的 FVFA 比例对于不同日粮的情况有差异, 前 3 周的 3 种 FVFA 比例值分别是乙酸 61.17%, 丙酸 18.45% 和丁酸 17.50%, 而第 4 周以后则分别是 70.32%, 18.70% 和 7.27%, 这种差异可能与饲喂玉米青贮有关, 而含羞草素及 DHP 并不影响瘤胃的发酵类型, 但 Kapoor 等(1987)用水牛饲喂银合欢的试验中发现, 试验组与对照组比较, 丁酸的克分子比例以及 pH 值和原虫数差异不显著, 而两组之间乙酸与丙酸的比例及细菌数目差异明显。

3 结语

初次接触银合欢叶粉的瑞士褐牛与沙希瓦黄牛杂交后瘤胃微生物只有经过 3 周的适应后才出现降解 DHP 的能力。DHP 这种抗营养因子并不影响瘤胃微生物的发酵能力。

表 3 饲喂银合欢叶粉后不同时间的瘤胃 FVFA 比例

时间/h	FVFA	瘤胃 FVFA 比例/(%)					
		第 1 d	第 8 d	第 15 d	第 22 d	第 28 d	第 31 d
0	乙酸	61.90	64.67	72.65	64.77	69.98	69.42
	丙酸	25.17	23.98	17.67	22.08	18.01	20.45
	丁酸	9.96	8.01	6.72	10.48	9.00	6.90
1	乙酸	65.24	73.64	69.85	70.63	76.00	69.59
	丙酸	24.54	20.14	20.93	20.89	15.91	21.53
	丁酸	6.98	5.55	5.88	5.73	5.00	6.22
2	乙酸	66.81	75.66	69.57	71.45	72.84	70.94
	丙酸	23.56	18.28	21.57	19.49	18.69	20.88
	丁酸	6.34	5.40	5.83	6.40	5.46	5.90
4	乙酸	69.32	71.59	70.74	69.87	76.31	70.02
	丙酸	20.89	19.98	20.57	20.58	15.62	20.31
	丁酸	7.06	6.43	6.81	6.87	5.09	7.00
6	乙酸	62.07	61.79	58.46	62.35	70.79	69.85
	丙酸	18.45	18.26	20.12	16.99	17.76	19.63
	丁酸	16.82	16.62	18.88	17.66	8.46	6.14
8	乙酸	56.52	66.58	63.16	59.58	66.27	70.66
	丙酸	17.55	13.80	15.87	16.81	17.98	19.41
	丁酸	22.40	16.96	19.31	20.94	12.75	6.93
12	乙酸	60.48	68.99	59.74	62.93	69.72	70.35
	丙酸	19.38	16.10	17.91	18.78	17.69	18.90
	丁酸	17.46	12.57	19.12	15.98	9.26	7.95
24	乙酸	65.29	72.48	66.63	68.41	74.73	70.59
	丙酸	23.26	19.11	20.74	19.98	15.48	19.09
	丁酸	8.77	6.40	9.19	8.84	6.11	6.32

参 考 文 献

Barnet A J G, Reid R L. 1957. Studies on the production of volatile fatty acids from grass by rumen liquor in an artificial rumen. J Agric Sci, 48: 315

Cottyn G B, Boucque C V. 1968. Rapid method for gas chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid. J Agric Food Chem, 16: 105

Hegarty M P, Court R D, Christie G S, et al. 1976. Mimosine in *Leucaena leucocephala* is metabolized to a goitrogen in ruminants. Aust Vet J, 52: 490

Hutton E M. 1982. Selection and breeding of *Leucaena* for very acid soils. In: *Leucaena* research in Asian Pacific Region. Proc. Workshop 23—26 Nov, Singapore IDRC, Ontario

Jaggiwan Ram, Atreja P P, Chopra R C, et al. 1993. Mimosine degradation in calves fed sole diet of *Leucaena*

- leucocephala* in India. Trop Anim Health Prod, 67: 45
- Jones R J, Meggarity R G. 1983. Comparative toxicity response of goat fed on *Leucaena leucocephala* in Australia and Hawaii. J Agric Res 34: 781
- Kapoor P D, Puri J P, Dwardanath P K. 1987. Effect of supplementation of *Leucaena leucocephala* on the rumen metabolism in buffalo. Indio J Anim Sci 53: 461
- Lowry J B. 1982. Detoxification of *Leucaena* by enzymic or microbial Processes. In: *Leucaena* research in Asian Pacific Region. Proc Workshop Nov , Singapore, IDRC, Ontario
- Sobale B N, Kharat S T, Prasad V J. 1978. Nutritive values of *Leucaena leucacophala* for growing bull calves. Trop Anim Health Prod, 10: 237
- Tangendjaja B, Willa R B H. 1980. Analysis of mimosine and 3-hydroxy-4(H)—Pyridone by HPLC. J Chromatography, 202: 317

DEGRADATION OF DHP FROM *Leucaena leucocephala* LEAF MEAL IN CATTLE RUMEN

Feng Dingyuan¹ P. P. Atreja²

(1 Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642;

2 Division of Cattle Nutrition, N. D. R. I., India)

Abstract

To study effect of gradual adaptation of *Leucaena leucocephala* feeding on degradation of DHP in the rumen, six adult crossbred cattle fitted with permanent rumen fistula were switched from sole diet of corn silage to 2 kg *Leucaena* leaf meal (LLM) and 10 kg corn silage for the first 26 d of experimental feeding period. From 27 to 29 d the animals received 4 kg LLM plus 5 kg corn silage followed by 7 kg LLM only from 30th day of experimental feeding period. Rumen liquor samples drawn at 0, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h after LLM feeding on 1, 8, 15, 22, 28 and 31 d. The results indicated that the ruminal microflora required about 3 weeks to acquire the ability to degrade DHP to other non—toxic metabolite. The level of total volatile fatty acids, fractional volatile fatty acids were within normal rumen fermentation range on forage diets.

Key words *Leucaena leucocephala*; DHP; degradation; cattle