

瘤胃微生物体外利用赖氨酸对有关酶和尿素氮的影响

李吕木, 胡良卫, 刁 欢, 凌 俊

(安徽农业大学 动物科技学院, 安徽 合肥 230036)

[摘 要] 为了测定体外培养条件下瘤胃微生物的赖氨酸消化率及赖氨酸降解过程中谷氨酸脱氢酶(GDH)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)、谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)和尿素氮(UN)的变化及其相关关系,经瘤胃瘘管取成年山羊瘤胃液混匀后分装至 12 个血清瓶中,每瓶 40 mL,同时每瓶加入淀粉 20 mg;血清瓶随机均分为 2 组,其中一组每瓶再注入 8 mL 0.25 mmol/L 的 L-赖氨酸作为赖氨酸组,另一组每瓶再注入等体积的去离子水作为对照,一并放入 39 °C 培养箱培养 16 h,并于培养的 0、8 和 16 h 取培养液测定 GDH、 γ -GT、GOT、GPT、UN 和游离氨基酸。结果表明,底物中添加赖氨酸时,培养液中 UN 浓度可保持稳定,否则培养 16 h 后的 UN 浓度极显著升高;GDH 活性在赖氨酸的降解代谢过程中随培养时间的延长而增加;培养时间的长短显著影响 GDH、 γ -GT 活性及 UN 的含量($P \leq 0.05$)。在不添加赖氨酸的条件下,培养 16 h 的 γ -GT 与 16 h 的 GPT 和 UN 均呈极显著正相关($R=0.95$; $R=0.92$)。当底物中添加赖氨酸时,培养 0 h 的 GDH 与培养 8 h 的 γ -GT 显著相关($R=0.88$);而培养 8 h 的 γ -GT 又与 8 h 的 UN 显著相关($R=0.86$);培养 0、8 和 16 h 的赖氨酸浓度与培养 0 h 的 GDH 呈负相关,与培养 8 h 的 GDH 呈极显著负相关($R=-0.94$)。对照组培养 8 和 16 h 的赖氨酸消化率分别为 31.64% 和 63.59%,赖氨酸组培养 8 和 16 h 的赖氨酸消化率则分别为 49.24% 和 74.55%,均极显著高于对照组培养 8 h 的消化率。提示在氮源缺乏的条件下,瘤胃微生物可能通过 γ -GT、GPT 和 GOT 的共同作用增加尿素氮的积累以维持生长,瘤胃微生物的赖氨酸降解本质上属于酶解。

[关键词] 成年山羊;瘤胃微生物;谷氨酸脱氢酶(GDH); γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT);谷草转氨酶(GOT);谷丙转氨酶(GPT);尿素氮(UN);赖氨酸;消化率

[中图分类号] S827.1; S816.32

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)12-0043-05

Changes and their relationships of enzymes, urea nitrogen and lysine concentrations during mixed rumen microorganisms by using lysine *in vitro*

LI Lü-mu, HU Liang-wei, DIAO Huan, LING Jun

(School of Animal Sciences and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: *In Vitro* studies were conducted to examine the changes and their relationships of NADP-linked glutamate dehydrogenase (GDH), γ -glutamy transpeptidase (γ -GT), glutamic-oxalacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT), urea nitrogen (UN) and lysine concentrations during mixed rumen microorganisms degrading lysine. Rumen fluids were collected from fistulated goats, then mixed and poured into 12 serum bottles. The 12 bottles were divided into two treatments (control and lysine). Each treatment had 6 bottles. Each bottle contained 40 mL of rumen fluid and 20 mg of starch. Bottles with or without 0.42 mmol lysine was respectively lysine and control treatment, and both were anaerobically incubated at 39 °C for 16 h. Free lysine and UN concentration, and GDH, γ -GT, GPT, GOT activities

* [收稿日期] 2006-11-20

[基金项目] 合肥市 2005 年重点农业科研资助项目(2005-1011)

[作者简介] 李吕木(1956—),男,安徽和县人,研究员,博士,主要从事饲料与动物营养研究。E-mail:llm56@ahau.edu.cn

in the supernatants of the incubation for 0, 8, 16 h were analyzed. UN concentration kept stand in suspension with lysine, while UN concentration was significantly high ($P < 0.05$) at incubation for 16 h. Activities of GDH increased with incubation time. Interaction of lysine concentration and incubation time significantly influenced ($P < 0.05$) activities of GDH and γ -GT of rumen microorganisms. Incubation time factor influenced ($P < 0.05$) activities of GDH, γ -GT and UN concentration. Activity of γ -GT for 16 h had highly significantly positive relation with GPT and UN for 16 h in culture suspension without lysine treatment ($R = 0.95$; $R = 0.92$). GDH at 0 h with γ -GT for 8 h had a significantly positive relation in suspension with lysine treatment ($R = 0.88$), the latter was significantly positively related with UN for 8 h ($R = 0.86$). Lysine concentrations for 0, 8, 16 h in two treatments were negatively related with GDH for 0 h. However, there was a highly significantly negative relation with GDH in adding lysine treatment for 8 h ($R = -0.94$). Digestibilities of lysine in culture suspension with and without adding lysine for 8 and 16 h were 31.64%, 49.24%, and 63.59%, 74.55%, respectively. The digestibilities of lysine in adding lysine group for 8 and 16 h were all highly significantly higher ($P < 0.01$) than that of in control group for 0 h. These results implied that rumen microorganisms probably increased UN accumulation through cooperation of γ -GT, GPT and GOT to keep growth under the lack of nitrogen sources. Degradation of lysine was an enzymic degradation essentially.

Key words: adult goat; rumen microorganisms; NADP-linked glutamate dehydrogenase (GDH); γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT); glutamic-oxalacetic transaminase (GOT); glutamic-pyruvic transaminase (GPT); urea N (UN); lysine; digestibility

赖氨酸是动物的必需氨基酸,同时也是反刍动物的限制性氨基酸^[1],但由于瘤胃微生物的利用或发酵降解,反刍动物不能像单胃动物那样通过日粮供给赖氨酸来满足其需要,因此,研究瘤胃赖氨酸代谢的有效调控方法就成为提高反刍动物赖氨酸利用率的一项重要内容。研究表明,赖氨酸在瘤胃内被瘤胃微生物利用或被瘤胃微生物分泌的酶降解,动物的采食行为和日粮的氨基酸水平影响瘤胃微生物对赖氨酸的利用^[2]。NADP 依赖型谷氨酸脱氢酶 (GDH) 和谷丙转氨酶 (GPT) 在瘤胃厌氧真菌的氨基酸代谢中发挥着重要作用^[3],但赖氨酸在瘤胃代谢过程中与有关氨基酸降解酶的关系尚不清楚。因此,揭示瘤胃微生物赖氨酸降解与有关赖氨酸降解酶的关系,可为调控瘤胃赖氨酸降解提供重要的理论依据。虽然赖氨酸在瘤胃内的降解速度比体外要快 1.5 倍,但两者存在着显著线性关系^[4],因而可用简便的体外代谢结果来解释体内代谢。此外,氨基酸代谢的终产物之一——尿素也在瘤胃液中存在^[5],但其与赖氨酸降解代谢的关系也不清楚。为此,本研究通过瘤胃微生物的体外利用赖氨酸试验,以揭示混合瘤胃微生物在利用赖氨酸时血液和瘤胃液中赖氨酸 (Lys)、谷氨酸脱氢酶 (GDH)、谷草转氨酶 (GOT)、谷丙转氨酶 (GPT)、 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 和尿素氮 (UN) 的变化及其相关关系,从而为调

控赖氨酸的代谢提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物与瘤胃液的采集

以 3 头装有永久性瘤胃瘘管的成年萨能公羊为采集瘤胃液的供体动物。羊的精料混合料配方和饲养管理方法与文献[6]相同,饲养 6 个月以后开始本试验。瘤胃液于晨饲前采集,用改装的塑料洗液瓶经瘘管吸取 3 头瘘管山羊的瘤胃液,并等量混合后用 4 层医用卫生纱布挤滤,然后按 Lee 等^[7]的方法去除饲料颗粒,通入氮气后具塞压盖密封备用。

1.2 试验分组与取样

取 120 mL 血清瓶 12 个,每瓶装 20 mg 淀粉及去除饲料颗粒的瘤胃液上清 40 mL,充入氮气后加胶塞压盖密封。血清瓶随机均分为 2 组,其中一组为赖氨酸组,即每瓶再用 1 次性注射器注入 8 mL L-赖氨酸 (含 0.25 mol/L),另一组每瓶注入 8 mL 去离子水作为对照,一并放入 39 °C 培养箱中培养,同时取样作为 0 h 培养样,然后于培养 8 和 16 h 时再分别取样 1 次。取样时先将培养液摇匀,然后用一次性注射器抽取 2 mL 培养液。其中用于测定氨基酸的 1 mL 样,在取出后立即加入 1 mL 40 mg/L 的磺基水杨酸^[8],过夜后离心 15 min (12 000 r/min),取上清液置 -20 °C 冰箱中存放待测。

1.3 测定项目及其方法

测定指标有 GDH、 γ -GT、GPT、GOT、UN 和赖氨酸,其中 γ -GT、GPT、GOT 和 UN 采用终点法测定^[9],GDH 采用速率法测定^[10]。本次试验测定的 GDH 是 NADH 依赖型 NADH-GDH,酶活国际单位用在 340 nm 波长处测得的 NADH 消耗的物质 的量(μmol)表示,测定仪器为山东高密彩虹分析仪器有限公司生产的 GF-D800 型半自动生化仪,测试试剂盒均由长春汇力生物科技有限公司生产,有关操作按试剂盒说明书进行。氨基酸用安捷伦 1100 型高效液相色谱仪测定,有关试剂均购自安捷伦公司。

1.4 数据统计与分析

赖氨酸 8 h 和 16 h 的消化率为各组 0 h 赖氨酸

表 1 底物赖氨酸处理时间对成年公羊瘤胃液中 GDH、 γ -GT、GPT、GOT 活性和 UN、赖氨酸浓度的影响

Table 1 Changes of GDH, γ -GT,GPT,GOT activities,and UN,lysine concentrations in buck ruminal at different incubation time

项目 Item	对照 Control			赖氨酸组 Lysine		
	0 h	8 h	16 h	0 h	8 h	16 h
GDH/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	118.48 $\pm$ 4.83 A	166.68 $\pm$ 10.43 B	322.07 $\pm$ 8.48 C	89.17 $\pm$ 9.08 E	108.50 $\pm$ 26.06 Ab	203.40 $\pm$ 10.47 D
UN/(mmol $\cdot$ L ⁻¹)	0.81 $\pm$ 0.04 Aa	0.81 $\pm$ 0.13 Aa	1.01 $\pm$ 0.17 Bb	0.92 $\pm$ 0.06 bc	0.91 $\pm$ 0.10 abc	0.94 $\pm$ 0.05 bc
γ -GT/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	44.67 $\pm$ 1.80 ABa	40.66 $\pm$ 1.50 A	40.88 $\pm$ 5.17 A	55.68 $\pm$ 7.78 Bb	41.34 $\pm$ 2.33 A	38.97 $\pm$ 2.68 A
GPT/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	27.03 $\pm$ 2.72 A	29.16 $\pm$ 5.71 C	36.91 $\pm$ 4.71 B	35.85 $\pm$ 13.37 B	27.92 $\pm$ 1.82 A	39.09 $\pm$ 11.37 B
GOT/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	69.43 $\pm$ 11.65 a	69.61 $\pm$ 6.91 a	66.45 $\pm$ 7.02 ab	69.19 $\pm$ 28.90 a	61.53 $\pm$ 3.03 ab	55.58 $\pm$ 5.64 b
Lys/(mmol $\cdot$ L ⁻¹)	0.24 $\pm$ 0.07 a	0.16 $\pm$ 0.04 a	0.12 $\pm$ 0.05 a	30.39 $\pm$ 2.12 b	11.13 $\pm$ 1.01 c	7.79 $\pm$ 1.40 d

注:同行后标不同大写字母者表示差异极显著($P<0.01$),标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。

Note:Different capital letters in a row indicate greatly significant difference ($P<0.05$);different small letters indicate significant difference ($P<0.05$).

从表 1 还可看出,赖氨酸组瘤胃液中 UN 浓度不因培养时间的变化而发生显著改变,而对照组培养 16 h 的 UN 浓度(1.01 mmol)极显著高于 0 h (0.81 mmol)和 8 h(0.81 mmol)。赖氨酸组发酵 0 和 16 h 的 UN 浓度显著高于对照组 0 和 8 h 的浓度。赖氨酸组和对照组瘤胃液中赖氨酸浓度均随培养时间延长而降低,但对照组在 16 h 培养期内的变化不显著,而赖氨酸组随培养时间的延长显著降低。

表 1 还表明,对照组的瘤胃液中 γ -GT 活性在不同培养时间之间差异不显著,但赖氨酸组 0 h 的 γ -GT 活性(55.68 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$)极显著高于培养 8(41.34 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$)和 16 h(38.97 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$)的活性。此外,赖氨酸组 0 h 的 γ -GT 活性还显著或极显著高于对照组不同培养时间的 γ -GT 活性。从表 1 不难看出,对照组和赖氨酸组的 γ -GT 活性均有随培养时间的延长而降低的趋势。

GPT 活性的变化在对照组和赖氨酸组不同培

含量与 8 h 或 16 h 赖氨酸含量之差再除以 0 h 赖氨酸含量的百分比。试验结果按照 6 重复随机因子设计,应用 SAS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 底物赖氨酸培养不同时间对成年公羊瘤胃液中有关酶活性和 UN、Lys 浓度的影响

表 1 表明,对照组和赖氨酸组 GDH 活性均随培养时间的改变而发生极显著变化,其活性均随培养时间的增加而增大,增加幅度以对照组最大,发酵 16 h 较 0 h 增加了 171.8%;而赖氨酸组增幅相对较小,发酵 16 h 的 GDH 活性较 0 h 增加 128.1%。

养时间之间存在显著差异,但两组 GPT 活性的变化方式不同。对照组 GPT 活性随培养时间的增加而增强,而赖氨酸组的变化则是波动的,培养 0(35.85 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$)和 16 h(39.09 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$)的 GPT 活性均极显著高于 8 h(27.92 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$)。

由表 1 可见,GOT 活性的变化在对照组不同培养时间之间差异不显著,但在赖氨酸组间差异显著,0 h 活性最高(69.19 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$),以后随培养时间的延长,活性逐渐降低,16 h 时的活性为 55.58 $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$,显著低于 0 h 时的 GOT 活性。

2.2 成年公羊瘤胃液中 GDH、 γ -GT、GPT、GOT 和 UN 间的相关性分析

相关分析结果表明,在对照组,培养 16 h 的 γ -GT 与 GPT、UN 均极显著相关($R=0.95$; $R=0.92$),与 GOT 显著相关($R=0.84$);培养 16 h 的 UN 与 GPT、GOT 显著正相关($R=0.86$; $R=$

0.87)。

在赖氨酸组,0 h 的 GDH 与 8 h 的 γ -GT 显著相关($R=0.88$),而 8 h 的 γ -GT 又与 8 h 的 UN 显著相关($R=0.86$);0 h 的 GPT 与 16 h 的 GOT 显著相关($R=0.81$);培养 16 h 的 UN 浓度与 0 h 的 GDH 呈极显著负相关($R=-0.94$);培养 0,8 和 16 h 的赖氨酸浓度与 0 h 的 GDH 负相关,与 8 h 的 GDH 呈极显著负相关($R=-0.94$);而 0 h 的赖氨酸浓度则与 0 h 的 GOT 显著正相关($R=0.85$),8 h 的赖氨酸浓度与 16 h 的 γ -GT 极显著正相关($R=0.96$)。

2.3 成年公羊瘤胃液中赖氨酸的消化率

统计分析表明,对照组培养 8 和 16 h 的赖氨酸消化率分别为 31.64% 和 63.59%;赖氨酸组培养 8 和 16 h 的赖氨酸消化率则分别为 49.24% 和 74.55%,均极显著高于对照组培养 8 h 的消化率;各组赖氨酸消化率均随培养时间的延长而显著增加。可见,是否添加赖氨酸和培养时间的长短,均对赖氨酸的消化率有显著影响。

3 讨 论

3.1 底物赖氨酸在不同培养时间对成年公羊瘤胃液中有关酶活性和 UN 浓度的影响

无论是对照组还是赖氨酸组,GDH 活性均随培养时间的变化而变化,这表明 2 个处理组在发酵培养过程中 NADH 依赖型 GDH 的表现都很活跃,这与 Dijkerman 等^[11]对瘤胃厌氧真菌 *piromyces* sp. Strain E2 的研究报道基本一致。Dijkerman 等^[11]研究发现,在限制氮源的条件下,NADH 依赖型 GDH 和谷氨酸合成酶(GS)活性可提高 4~6 倍,以加速催化从氨基酸脱下的氨与酮戊二酸合成谷氨酸。但氨是通过何种途径从氨基酸上脱去的,其关键酶是什么并不清楚。从本试验的结果来看,在赖氨酸的脱氨反应中,GOT 和 GPT 可能充当了一定的角色(表 1),因为两者在 16 h 培养期内的酶活性均有显著改变,但作用方式显然不同,GOT 活性随培养时间的延长而降低,GPT 活性则是 8 h 显著低于 0 和 16 h,表明 GDH 在氨基酸的降解代谢中起着重要的间接调节作用^[12]。表 1 结果显示,添加赖氨酸将影响这种调节速率,使 GDH 活性极显著低于对照组,这可能是由于 2 种处理导致氨的来源和谷氨酸的去路不同所致。因为有研究表明,瘤胃厌氧真菌 *piromyces* sp. Strain E2 在氨浓度低于 10 mmol/L 时,NADP-GDH 活性受到抑制,当氨浓度

为 0.5 mmol/L 时,NADP-GDH 活性增加了 4 倍^[11]。但 2 种处理 GDH 活性均随培养时间的延长而极显著增强,这表明谷氨酸的合成量随培养时间的延长而增加,说明谷氨酸是氨基酸降解代谢中十分重要的中间产物。本试验不能判定谷氨酸的去路,不过从 GOT 和 GPT 的活性变化来看(表 1),添加赖氨酸后,GOT 和 GPT 的作用较对照发生了改变,表明赖氨酸有可能部分通过草酰乙酸和丙氨酸这一途径转氨,因为赖氨酸组 0 h 时的 GPT 活性显著高于对照组,GOT 活性在 8 和 16 h 之间也存在显著差异。

从 γ -GT 活性变化来看,谷氨酸是否被微生物直接利用^[13-14]或通过其他途径代谢,还有待进一步研究。由于 γ -GT 可催化 γ -谷氨酰化合物上 γ -谷氨酰基的转移^[15],而赖氨酸经 α -酮戊二酸途径代谢水解生成 L-谷氨酸^[16],因此从表 1 中赖氨酸组 γ -GT 活性 0 h 显著高于对照组来看,部分赖氨酸可能经 α -酮戊二酸途径水解生成谷氨酸后,在 γ -GT 的帮助下被直接转运至细胞内。大部分瘤胃微生物可用尿素作惟一氮源维持生长^[17],UN 在对照组中培养 16 h 后开始极显著升高,而氨基酸组的 UN 在培养期间未发生显著改变,这可能是对照组微生物经 16 h 培养后由于氮源不足的一种氮源增加方式。

3.2 成年公羊瘤胃液中 GDH、 γ -GT、GPT、GOT 和 UN 间的相关性

尽管本试验中 2 个处理因底物赖氨酸的差异而导致氨基酸代谢途径存在差别,但 2 组都存在 γ -GT 与 UN 的极显著或显著正相关,且未添加赖氨酸的对照组出现显著相关的时间是培养 16 h,较添加赖氨酸处理组(8 h)晚,可见, γ -GT 与 UN 在氨基酸的代谢中具有协同性。UN 在对照组培养 16 h 后与 GOT 和 GPT 显著正相关,表明这时 GOT 和 GPT 催化的转氨反应产生的氨可能主要转变成尿素,以提供微生物生长所需的氮源。

对照组 GDH、 γ -GT、GPT、GOT 和 UN 间未发现负相关,且 UN 与 16 h 时的 γ -GT、GPT 和 GOT 均呈显著正相关,这一结果暗示这 3 种酶协同作用以增加尿素产量来满足微生物生长对氮源的需求。但添加赖氨酸后有负相关出现,表明添加新的氮源后加速了氨基酸代谢进程。赖氨酸的添加引起 16 h UN 与 0 h GDH 的极显著负相关,表明 0 h GDH 的催化作用可能使得 16 h 后尿素的生成减少,进而影响到 UN 浓度的变化。

2 个处理的赖氨酸浓度与 GDH 均呈负相关,并

且赖氨酸组培养 8 h 的赖氨酸浓度与 8 h 的 GDH 极显著负相关($R=-0.94$),这一结果与 Dijkerman 等^[11]对厌氧真菌的研究结果相符。这进一步说明,赖氨酸的分解代谢与 GDH 密切相关,但调控 GDH 能否有效控制赖氨酸的降解还有待进一步研究。

赖氨酸消化率的变化结果表明,瘤胃液中的赖氨酸浓度对赖氨酸的消化有一定影响,当赖氨酸浓度增加时其消化速度加快,这种变化方式符合酶解反应的底物调控方式^[16]。这一结果暗示瘤胃微生物对赖氨酸的利用本质上属于酶解而不是微生物的直接利用,或者说以酶解为主,微生物的直接利用为辅。

从 2 个处理的相关分析不难看出,大多数相关都与 UN 有关,且相关的趋势都是使产物中尿素产量增加。这与大部分瘤胃微生物都能利用氨作为惟一氮源维持生长的研究结果一致^[17]。

4 结 论

瘤胃微生物对赖氨酸的利用本质上属于酶解,其降解速率受底物赖氨酸浓度的影响。GDH 活性与瘤胃液的游离赖氨酸浓度负相关,其可能通过催化谷氨酸的合成而在赖氨酸的代谢中起着重要的调节作用。底物赖氨酸浓度影响瘤胃微生物的消化率,当赖氨酸浓度增加时其消化率也增加。培养时间的长短显著影响 GDH、 γ -GT 活性及 UN 和赖氨酸的浓度。在氮源缺乏的条件下,瘤胃微生物可能通过 γ -GT、GPT 和 GOT 的共同作用增加尿素氮的积累,以维持生长。

[参考文献]

[1] Volden H, Harstad O M. Effects of duodenal amino acid and starch infusion on milk production and nitrogen balance in dairy cows[J]. Journal of Animal Science, 2002, 80(Suppl. 1): 320.

[2] 李吕木. 蛋氨酸的瘤胃代谢与调控研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.

[3] Dehority B A. Rumen Microbiology[M]. Nottingham, UK;

Nottingham University Press, 2003; 248.

[4] William C. Degradation of amino acids by the mixed rumen microbial population[J]. Journal of Animal Science, 1976, 43(4): 828-834.

[5] Wakita M, Hoshino S. A branched-chain amino acid aminotransferase from the rumen ciliate genus entodinium[J]. Journal of Protozool, 1975, 22(2): 281-285.

[6] 李吕木, 乐国伟, 施用晖. 蛋氨酸为氮、碳源对瘤胃微生物氨基酸代谢的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(7): 22-26.

[7] Lee S S, Ha J K, Cheng K J. Relative contribution of bacteria, protozoa, and fungi to *in vitro* degradation of orchard grass cell wall and their interactions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(9): 3807-3813.

[8] Or-Rashid M M, Onodera R, Wadud S. Studies on the utilization sulfoxide and methionine sulfone by rumen microorganisms *in vitro*[J]. Amino acid, 2003, 24: 135-139.

[9] 叶应妩, 王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版, 南京: 东南大学出版社, 1997.

[10] 张秀明, 李健斋, 魏明竟, 等. 现代临床生化检验学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001.

[11] Dijkerman R, Ledebor J, Verhappen A B M. The anaerobic fungus Piromyces sp. Strain E2: nitrogen requirement and enzymes involved in primary nitrogen metabolism[J]. Arch Microbiol, 1997, 166: 399-404.

[12] 张新民, 张鲁嘉, 苟志金, 等. γ -谷氨酰转肽酶产生菌的筛选和培养条件研究[J]. 生物加工过程, 2003, 1(2): 39-42.

[13] Gulati S K, Ashes J R, Gordon G L R, et al. Nutritional availability of amino acid from the rumen anaerobic fungus Neocallimastix sp. LM1 in sheep[J]. J Agric Sci, 1989, 113: 383-387.

[14] Marounek M, Vovk S J. Distribution of radioactivity of ^{14}C -amino acids added to the medium in cell and metabolites in cultures of rumen fungi[J]. Reprod Nutr Dev, 1992, 32: 129-133.

[15] Meister A, Tate S S. Glutathione and γ -glutamyl compound; Biosynthesis and utilization[J]. Annu Rev Biochem, 1976, 4: 559.

[16] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学: 下册[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.

[17] Masayuki K, Masahiko N. Reappraisal of the 20th-century version of amino acid metabolism[J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2003, 312: 205-208.