

# 芳香族和脂环族化合物在反刍家畜 消化道中的释放代谢机制

龙瑞军<sup>1,2</sup>, 董世魁<sup>3</sup>, 王元素<sup>2</sup>, 马向丽<sup>2</sup>, J PA GELLA<sup>4</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2 甘肃农业大学草业学院, 甘肃 兰州 730070;  
3 北京师范大学环境科学学院, 北京 100875; 4 Universidad Nacional de La Pampa, Argentina)

**摘要:** 芳香族和脂环族化合物(异生物素)在反刍动物体内的消化代谢水平主要取决于瘤胃的消化代谢能力,而这种能力是由瘤胃微生物决定的;瘤胃微生物在厌氧环境下具有降解芳香族异生物素的潜力,咀嚼有助于植物细胞壁脂化酚酸及其内容物的酚化合物的释放,释放后的代谢物大部分在瘤胃内被微生物代谢;瘤胃微生物糖酶的作用,使与细胞壁结合的酚酸以可溶性酯—糖单元的形式从牧草中释放出来,在肠道内微生物水解活动可引起植物中自然存在的结合态酚酸释放成游离态;细胞壁酯化的 *p*-香豆酸含量与体内细胞壁消化率、体外干物质消化率和半体内瘤胃纤维降解率呈显著负相关,草本植物的木质素含量与细胞壁降解率也常为负相关;异生物素对动物和微生物具有毒害作用,但在瘤胃的厌氧微生物作用下,通过水解、还原、取代和脱羧等反应,异生物素发生生物转化和矿化,其还原代谢产物的毒性远低于其前体物。芳香族化合物在反刍家畜消化道中的释放代谢机制的研究,为其代谢物在尿液中的排泄含量作为反刍动物采食量的预测指标的可行性和机理从代谢水平上奠定基础。

**关键词:** 异生物素; 释放; 瘤胃微生物; 水解反应; 还原代谢

**中图分类号:** S823    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004-5759(2004)05-0018-08

\* 反刍家畜尿液中芳香族化合物代谢物的含量具有预测反刍动物采食量的潜力<sup>[1,2]</sup>。芳香族和脂环族化合物在尿液中存在的形态与含量不仅取决于饲料中芳香族化合物的种类和多少,而且取决于这些化合物在动物体内的消化水平和代谢途径。对反刍动物而言,芳香族和脂环族化合物的消化代谢水平主要取决于瘤胃的消化代谢能力。笔者综述了植物饲料中芳香族和脂环族化合物在瘤胃内的释放途径、消化代谢特点及过程,从代谢水平上揭示以尿液中芳香族化合物代谢物含量为指标预测反刍动物采食量的机理和可行性。

## 1 消化道内芳香族和脂环族化合物释放和吸收

在饲料消化过程中,植物细胞内容物中的酚化合物(phenolic compounds)和羟基环己烷羧酸(hydroxycyclohexanecarboxylic acids)可能随着动物对植物细胞膜的咀嚼和瘤胃微生物降解而在消化道内释放出来<sup>[3]</sup>。牧草碎片在瘤胃内的消化主要发生于微生物附着细胞壁的过程,因此,动物咀嚼饲料的机械撕裂作用对植物细胞壁与瘤胃微生物的充分接触具有重要的作用,瘤胃内 75% 的微生物活动伴随着食糜的颗粒化(particulate phase of digesta)而发生<sup>[5]</sup>。当饲料颗粒通过绵羊的消化道时,随着细胞壁的酯化,会释放出一定量的酚酸(phenolic acids)<sup>[3,4]</sup>,同时观察到在前胃中有大量的细胞壁酯化酚单体(cell wall-esterified phenolic monomers)消失<sup>[4,6]</sup>。

在肠道内由于微生物水解活动可能引起植物中自然存在的结合态酚酸释放成游离态<sup>[3]</sup>。由于瘤胃微生物酯酶(microbial esterase)的活动,会导致大部分酚酸脱离牧草细胞壁<sup>[4]</sup>。瘤胃微生物细胞外酶(extracellular enzymes)能裂解阿魏酸(ferulic acid)和 *p*-香豆酸(*p*-coumaric acid)与细胞壁成分之间的脂链<sup>[9]</sup>。细胞壁内通过酯链(而非碳-碳键或醚键)束缚的酚酸易于受瘤胃微生物酶的作用而游离出来<sup>[7]</sup>。同时,一些瘤胃微生物本身能产生阿魏酸酯酶(feruloyl esterases)和 *p*-香豆酸酯酶(*p*-coumaroyl esterases),迫使细胞壁释放阿魏酸和 *p*-香豆酸酯酶<sup>[8,9]</sup>。研究发现,酚酸酯酶的活动与瘤胃细菌 *F. succinogenes* 和 *B. butyrivibrio fibrisolvens* 有关<sup>[10]</sup>。瘤胃真菌产生的酚酸酯酶,具有从阿拉伯糖基木聚糖(arabinoxylans)上分离阿魏酸和 *p*-香豆酸的功能<sup>[8]</sup>。

\* 收稿日期: 2003-08-20

基金项目: 中科院“百人计划”资助; 高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划资助(TRAPOYT)。

作者简介: 龙瑞军(1964-), 男, 吉林农安人, 教授, 博士, 博士生导师。E-mail: longruijun@sina.com

以含有 C<sup>14</sup> 标记的羟基桂皮酸 (hydroxycinnamic acids) 的植物细胞壁材料作为底物, 用瘤胃真菌进行体外 (*in vitro*) 培养, 发现这些酸具溶解性<sup>[10, 11]</sup>。

Borneman 和 Akin 报道, 瘤胃真菌产生的 *p*-香豆酸酯酶和阿魏酸酯酶远远大于瘤胃纤维素分解细菌所产生的<sup>[8]</sup>。Akin 等<sup>[10]</sup>发现, 瘤胃真菌似乎对木质纤维素 (lignocellulose) 的降解具有酶解潜力, 而这正是瘤胃纤维消化细菌所缺少的, 瘤胃纤维素分解细菌被认为几乎没有或完全没有产生 *p*-香豆酸酯酶和阿魏酸酯酶的能力<sup>[8]</sup>。然而, 体外培养试验证实, 个体瘤胃细菌表现出了明显的酚酸酯酶活性, 促使阿魏酸和 *p*-香豆酸从玉米茎细胞壁中释放出来<sup>[9]</sup>。研究表明, 阿魏酸酯酶不同于 *p*-香豆酸酯酶<sup>[10]</sup>, 但控制酚酸酯酶合成和活动机制尚不清楚<sup>[12]</sup>。

由于瘤胃微生物糖酶 (carbohydrases) 的作用, 与细胞壁结合的酚酸也能以可溶性酯-糖单元的形式从牧草中释放出来<sup>[4]</sup>。据报道, 在用碳水化合物与商用糖酶进行的体外培养中, 伴随纤维素和半纤维素脱裂活动, 阿魏酸酯酶和 *p*-香豆酸从植物细胞壁中以可溶性复杂碳水化合物形式分离出来<sup>[13, 14]</sup>。木质素和非纤维素多聚糖之间的共价键能够被瘤胃微生物释放的阿魏酸酯酶和 *p*-香豆酸酯酶所水解<sup>[8]</sup>。

体外比较培养试验表明, 商用糖酶对木质纤维素物质的降解率低于瘤胃液的培养结果<sup>[15]</sup>。Martin 把这些不一致性归因于商用酶可能受到释放的酚酸和相关化合物的抑制或被瘤胃微生物作用而失活。另一种解释是, 瘤胃微生物除了产生能切断纤维素和半纤维素聚合物的糖酶外, 还能产生切断连接简单酚酸和其他细胞壁成分的酯键酶。由于缺乏芳香基酯酶 (aryl esterase) 的活动, 并且考虑到 *p*-香豆酸和阿魏酸能够起到木质半纤维素 (ligninemicellulose) 交叉联合的桥梁, 商用糖酶有希望被用于植物细胞壁的低能量降解。Theander 等 在用体外法培养牧草样品时发现, 瘤胃液比商用糖酶对从细胞壁中分离 *p*-香豆酸和阿魏酸的作用更有效。

表 1 对体外、体内 (*in vivo*) 和半体内 (*in sacco*) 消化研究的结果进行了总结。有报道显示, 在反刍动物消化道内植物细胞壁酯化过程中分离出的阿魏酸比 *p*-香豆酸多<sup>[6, 7, 13, 17, 18, 21]</sup>。Borneman 和 Akin 报道用瘤胃真菌酯酶培养牧草样品时, 从细胞壁释放的阿魏酸比 *p*-香豆酸高<sup>[8]</sup>。相同的结果也出现在其他体外培养试验<sup>[3, 9, 15, 19]</sup>和半体内消化试验的研究中<sup>[11, 14, 20]</sup>。体内试验研究表明, 与细胞壁结合的 *p*-香豆酸和阿魏酸的释放分别与酸性洗涤木质素 (acid detergent-lignin)<sup>[18]</sup> 和阿拉伯糖 (arabiose)<sup>[6]</sup> 的消失直接相关。这是对 *p*-香豆酸属难分解的主要细胞壁酯化成分 (如木质素) 阿魏酸为半纤维素酯化成分这一假说的有力支持<sup>[6]</sup>。

研究发现, 细胞壁酯化的 *p*-香豆酸含量与体内细胞壁消化率、体外干物质消化率 (DMD) 和半体内瘤胃纤维降解率呈显著负相关<sup>[22]</sup>。同样, 草本植物的木质素含量与细胞壁降解率也常为负相关<sup>[23]</sup>。由于酚酸存在于植物细胞壁和细胞内容物中, 因此英国学者 McDonald 和 O rskov 曾建立指数方程模型来描述日粮酚酸在瘤胃中的释放动态<sup>[20]</sup>。一般认为细胞壁可皂化 (saponifiable) 酚酸的总量在瘤胃消化过程中可全部降解<sup>[20]</sup>。但某些因素会影响细胞壁组织中的可皂化酚酸的释放, 当将猫尾草 (*Phleum pratense*) 样品与瘤胃液进行体外培养时, 发现酚酸从细胞壁中的释放量随着牧草的成熟而减少, 而且对 *p*-香豆酸的影响高于阿魏酸<sup>[15]</sup>。当绵羊饲喂苜蓿干草和磨碎谷物时, 从细胞壁中释放出酚酸的量随绵羊采食量的增加或精料比例的提高而减少<sup>[6]</sup>。

芳香族和脂环族化合物一旦从植物组织中释放出来, 可能途经不同的瘤胃消化代谢过程。游离酚酸和羟基环己烷羧酸可能象短链脂肪酸 (short chain fat acid) 一样被消化道吸收<sup>[3, 4]</sup>。消化道中游离的酚酸能与食糜中未被利用的蛋白质和脂类结合, 一起随粪便排出体外<sup>[24]</sup>, 这种现象被视为动物的防卫机制, 以便减少有毒物质对动物的生理影响或降低对有毒植物次生代谢物的吸收<sup>[25]</sup>。动物的这种防卫机制是应对植物的进化对策, 因为植物的芳香族等次生化合物是植物与草食动物的长期作用中进化出的防御武器, 以阻碍动物的采食和消化代谢<sup>[26]</sup>。如果这些异生物素 (xenobiotics) 既没有被吸收, 也没有与食糜结合, 则可能被瘤胃微生物通过其他途径代谢了。

## 2 瘤胃微生物对芳香族和脂环族异生物素的反应

羟基环己烷羧酸对有机体的毒性很弱, 但酚酸对植物体本身、微生物以及动物都具有毒害作用, 体外试验表明, 酚酸对瘤胃微生物有抑制作用<sup>[10]</sup>, 主要表现为抑制瘤胃微生物的活力, 如对纤维颗粒的附着、细胞外和细胞膜的酶解活动以及细胞营养吸收功能等<sup>[16]</sup>, 其结果导致细胞膜损坏、细胞内容物的外渗和细胞功能衰竭<sup>[3, 4]</sup>。另外, 单体酚化合物 (monomeric phenolic compounds) 通过缩短电子跃迁梯度抑制微生物细胞膜的主动运输作用, 同时具有抑制重要微生物酶活性的功能<sup>[27]</sup>。

表 1 饲料消化中碱不稳定羟基桂皮酸的释放

Table 1 Release of alkali-labile hydroxycinnamic acids from forages during digestion

饲草料 Feed	释放的 阿魏酸 Ferulic acid release <sup>1)</sup>	释放的 <i>p</i> -香豆酸 <i>p</i> -coumaric acid release <sup>1)</sup>	测定环境 Measuring condition	文献 Reference
苜蓿干草 <i>M edicago sativa</i> hay	0.92	0.79	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[17]
苜蓿干草(营养期) <i>M. sativa</i> hay (immature period)	0.96	0.87	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[4]
苜蓿干草(成熟期) <i>M. sativa</i> hay (mature period)	0.83	0.58	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[4]
苜蓿干草 精料 <i>M. sativa</i> hay concentrate 0.75 0.25 <sup>9)</sup>	0.58	0.39	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[6]
苜蓿干草 精料 <i>M. sativa</i> hay concentrate 0.75 0.25 <sup>10)</sup>	0.72	0.51	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[6]
苜蓿干草 精料 <i>M. sativa</i> hay concentrate 0.25 0.75 <sup>9)</sup>	0.38	0.34	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[6]
苜蓿干草 精料 <i>M. sativa</i> hay concentrate 0.25 0.75 <sup>10)</sup>	0.73	0.47	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[6]
苜蓿干草 精料 <i>M. sativa</i> hay concentrate 0.90 0.10	0.74	0.05	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[18]
苜蓿干草 燕麦壳 精料 <i>M. sativa</i> hay <i>Avena sativa</i> hulls concentrate 0.70 0.20 0.10	0.72	0.23	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[18]
苜蓿干草 燕麦壳 精料 <i>M. sativa</i> hay <i>A. sativa</i> hulls concentrate 0.50 0.40 0.10	0.57	0.15	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[18]
苜蓿干草 燕麦壳 精料 <i>M. sativa</i> hay <i>A. sativa</i> hulls concentrate 0.30 0.60 0.10	0.55	0.28	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[18]
多年生黑麦草(不同生长期) <i>Lolium perenne</i> (in different growing periods)	0.95~0.82	0.76~0.41	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[13]
羊茅(营养期) <i>Festuca arundinacea</i> (immature period)	0.78	0.65	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[4]
羊茅(成熟期) <i>F. arundinacea</i> (mature period)	0.54	0.39	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[4]
羊茅(营养期) <i>F. arundinacea</i> (immature period)	0.75	0.51	<i>In vivo</i> <sup>3)</sup>	[4]
羊茅(成熟期) <i>F. arundinacea</i> (mature period)	0.56	0.30	<i>In vivo</i> <sup>3)</sup>	[4]
羊茅干草 <i>F. arundinacea</i> hay	0.82	0.55	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[21]
鸭茅干草(日粮DM的0.60)+精料	0.73	0.42	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[6]
<i>Dactylis glomerata</i> hay (0.60 of diet)+concentrate 鸭茅干草(日粮DM的0.96)+精料	0.79	0.51	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[6]
<i>D. glomerata</i> hay (0.96 of diet)+concentrate 鸭茅干草 <i>D. glomerata</i> hay	0.78	0.50	<i>In vitro</i> <sup>2)</sup>	[21]
鸭茅薄壁组织 <i>D. glomerata</i> herbage parenchyma	0.93	0.69	<i>In vitro</i> <sup>4)</sup>	[19]
鸭茅厚壁组织 <i>D. glomerata</i> herbage sclerenchyma	0.84	0.64	<i>In vitro</i> <sup>4)</sup>	[19]
梯牧草(不同生长期)	0.97~0.90	0.93~0.71	<i>In vitro</i> <sup>4)</sup>	[15]
<i>Phleum pratense</i> hay (in different growing periods) 大麦秸秆(测定细胞壁)	0.50	0.50	<i>In vivo</i> <sup>5)</sup>	[14]
<i>Hordeum vulgare</i> straw (measured on CW) 十字马唐(测定细胞壁)	0.71	0.71	<i>In vivo</i> <sup>5)</sup>	[14]
<i>Digitaria sanguinalis</i> (measured on CW) 狗尾草(测定细胞壁) <i>Setaria viridis</i> (measured on CW)	0.57	0.57	<i>In vivo</i> <sup>5)</sup>	[14]
甘蔗(测定细胞壁)	0.56	0.56	<i>In vivo</i> <sup>5)</sup>	[14]
<i>Saccharum officinarum</i> (measured on CW) <i>Urochloa</i> spp. 干草 <i>Urochloa</i> spp. hay	0.95	0.95	<i>In vivo</i> <sup>2)</sup>	[7]
青贮玉米 <i>Zea Mays</i> Silage	0.62	0.62	<i>In vitro</i> <sup>5)</sup>	[11]
青贮玉米 <i>Z. Mays</i> Silage	0.59	0.59	<i>In vitro</i> <sup>4)</sup>	[3]
玉米茎秆(测定细胞壁) <i>Z. Mays</i> stems (measured on CW)	0.12	0.12	<i>In vitro</i> <sup>6)</sup>	[9]
玉米茎秆(测定细胞壁) <i>Z. Mays</i> stems (measured on CW)	0.20	0.20	<i>In vitro</i> <sup>7)</sup>	[9]
玉米茎秆(测定细胞壁) <i>Z. Mays</i> stems (measured on CW)	0.19	0.19	<i>In vitro</i> <sup>8)</sup>	[9]

1) 碱性不稳定酸消化损失的比例 Proportion of the original content of alkali-labile acid lost upon digestion; 2) 在绵羊总消化道中的损失 Losses in the whole digestive tract of sheep; 3) 在绵羊瘤胃、网胃、瓣胃和真胃中的损失量 Losses in section comprising rumen, reticulum, omasum and abomasum of sheep; 4) 用绵羊瘤胃液培养的损失量 Losses by incubation with rumen fluid from sheep; 5) 绵羊瘤胃内尼龙袋培养的损失量 Losses by incubation with nylon bags in the rumen of sheep; 6) 瘤胃细菌 (*Fibrobacter succinogenes* S85) 培养时的损失量 Losses by incubation with rumen bacterium (*Fibrobacter succinogenes* S85); 7) 瘤胃细菌 (*Ruminooccus albus* 20) 培养时的损失量 Losses by incubation with rumen bacterium (*Ruminooccus albus* 20); 8) 瘤胃真菌 (*Neocallimastix frontalis* MCH3) 培养时的损失量 Losses by incubation with rumen fungus (*Neocallimastix frontalis* MCH3); 9) 高采食水平的处理 Treatment defined as high level of feed intake; 10) 低采食水平的处理 Treatment defined as low level of feed intake CW: 细胞壁 Cell wall; *In vivo*: 体内消化试验; *In vitro*: 体外消化试验。

如前所述,大多数体外试验证明了酚酸对瘤胃微生物的活动有抑制作用,而且这些代谢物的浓度已远超过了动物生理临界水平,因此无需再用体内试验来验证这一点<sup>[28]</sup>。当日粮中阿魏酸和 *p*-香豆酸的含量大约为 90 mmol/d 或向瘤胃内每天注入 103 mmol 阿魏酸时,不会影响动物对饲料干物质的采食量和瘤胃降解率<sup>[7]</sup>。由于酚酸普遍存在于反刍动物的天然饲草中,瘤胃微生物在适应和进化过程中可能已具备了对这类有毒物质的适应和解毒机制。Lowry 也证实,日粮酚酸在瘤胃内的释放和代谢过程中并未对微生物产生明显的抗性作用。此外,肠道微生物代谢植物酚类化合物的另一个主要作用是影响尿代谢物的生成<sup>[29]</sup>。

由于瘤胃微生物具有种类多、分布广、种群复杂、进化历史长、代谢途径多样以及对环境变化反应快等特点,对缓解植物与草食动物间的相互作用潜力巨大<sup>[30]</sup>。瘤胃微生物对于植物次生代谢物质包括自然酚化合物有明显的解毒作用<sup>[25]</sup>。消化道中的共生微生物在屏蔽植物酚化合物副作用方面具有很强的选择性<sup>[31]</sup>。这些微生物通过不断进化,可能产生了较强的适应性以使它们能够应付环境中酚酸的抑制作用,加之动物组织层面上解毒能力的相应进化和完善,使草食动物特别是反刍动物对采食大量常见植物中所含的酚化合物具有很强的耐受性,一般不会中毒<sup>[32]</sup>。

### 3 芳香族和脂环族异生物素的瘤胃代谢特点

由瘤胃生态系统的性质决定了酚酸在瘤胃中不具备抗性(antiquality)作用。瘤胃环境是一个氧含量低于  $10^{-22}$  mol/L 的产甲烷系统(methanogenic system)<sup>[33]</sup>。瘤胃的 pH 值(5.5~7.5)及氧化还原电位(redox potential)(-200~-400 mV)能阻止酚化合物转化为氧化态,而这种转化过程的受限正是大多数有害生物活动得以避免的原因<sup>[34]</sup>。尽管芳香族化合物的厌氧微生物代谢机理还远未搞清楚,异生物素类化合物如酚酸可以看作是厌氧微生物代谢活动所必需的电子受体<sup>[35]</sup>。研究证明,瘤胃内的液体和固体内容物中已存在不同的微生物菌团,一般起解除日粮酚酸毒性的作用<sup>[36]</sup>。瘤胃细菌具有代谢酚酸的能力,而瘤胃真菌则不然<sup>[37]</sup>。然而在用瘤胃真菌进行体外接种培养时,明显观察到 *p*-香豆酸和阿魏酸的生物转化现象<sup>[9]</sup>。

酚酸和羟基环己烷羧酸在瘤胃微生物酶的作用下发生水解和还原反应进而被代谢<sup>[7]</sup>,酚酸的还原反应产物对微生物的毒性远低于其前体化合物<sup>[9]</sup>。微生物代谢可导致环酸(cyclic acid)的部分降解[生物转化(biotransformation)],最终可能完全降解[矿化(mineralisation)]<sup>[12]</sup>。生物转化反应包括酯(ester)、糖甙(glucoside)、葡糖苷酸(glucuronide)以及氨基偶联物(amide conjugates)的水解、脂肪族(aliphatic)侧链碳-碳双键的氢化作用(hydrogenation)、脱羧作用(decarboxylation)、脱烷基化(*o*-dealkylation)和脱羟基化(dehydroxylation)反应<sup>[38]</sup>,这些反应中的苯环裂变(benzene ring fission)或环己烷(cyclohexane)裂变将分别导致芳香族(aromatic)或脂环族(alicyclic)化合物的矿化<sup>[39]</sup>。不论是否发生环断裂,—OH、—OCH<sub>3</sub>、—COOH 以及脂肪族侧链部位都可被厌氧微生物所代谢<sup>[40]</sup>。当然,苯环取代反应的速度要远快于苯环裂变的速度<sup>[41]</sup>。

酚酸未饱和侧链的还原反应由微生物细胞内的脱氢酶(dehydrogenase)参与来完成。加氢反应属极速生物转化,在瘤胃环境中清除日粮对瘤胃微生物构成潜在毒害作用的化合物<sup>[20]</sup>。当发生多种甲氧基(methoxy)取代邻近位置(vicinal positions)时,说明产生了广泛的酚酸氧化脱甲基(*o*-demethylation)反应,通过对瘤胃细菌的分离培养,也证实了酚酸甲氧基衍生物的脱甲基反应<sup>[38]</sup>。在对瘤胃液主要接种体的厌氧微生物菌团培养中,发现 *o*、*m*-和 *p*-甲氧基苯甲酸(*o*-, *m*-, *p*-methoxybenzoic acid)发生了快速脱甲基反应<sup>[39]</sup>。

从酚化合物中去掉—OH 取代基似乎是瘤胃微生物系统在厌氧条件下频繁发生的反应<sup>[39]</sup>。Scheline 曾先观察到了肠道微生物参与植物酚酸的脱羟反应,厌氧微生物引起的酚酸脱羟反应主要发生在羟基桂皮酸和羟基-3-苯丙酸(hydroxy-3-phenylpropionic acid)等侧位上一个—OH 环取代物的部位,伴随着较低的脱羟率,酚酸类脂肪侧链长度得以缩减<sup>[42]</sup>。哺乳动物体内酚化合物发生的脱羧反应完全是由于微生物酶作用的结果,老鼠由于缺乏肠道微生物,咖啡酸(caffeic acid)的脱羧反应不会在鼠肠道发生<sup>[38]</sup>。体内试验表明,当绵羊的瘤胃灌注羟基桂皮酸和羟基-3-苯丙酸时,这些酸会发生强烈的脱羟反应,而皱胃则不然,揭示了瘤胃微生物对酚酸脱羟反应的作用<sup>[29]</sup>。

酚酸在 *p*-羟基化合物(*p*-hydroxylated compounds)参与时可发生强烈的脱羧作用<sup>[38]</sup>,当有其他取代物存在

时反应速率减慢, *o*-羟基化合物的存在甚或导致反应终止<sup>[42]</sup>。当一个—OCH<sub>3</sub> 环替代物逼近一个—OH 或—COOH 基团时, 脱羟反应受到抑制。羟基苯甲酸的脱羧率最大<sup>[38]</sup>, 但在较长脂肪侧链酚酸存在时反应过程逐渐减慢; 对于羟基-3-苯丙酸, 已观察到了被忽略的脱羧作用<sup>[42]</sup>, 瘤胃微生物脱羧酶被认为主导着上述生物转化过程<sup>[43]</sup>。以上这种常规代谢模式已通过向绵羊消化道内灌注酚酸的体内试验获得证实, 绵羊尿液中出现单元酚 (simple phenols) 是酚酸脱羧作用的结果<sup>[29]</sup>。

#### 4 瘤胃微生物对苯和环己烷的裂变作用

微生物在厌氧条件下具有降解芳香族化合物的潜力已得到证实<sup>[33, 41, 44]</sup>。Tarvin 和 Buswell<sup>[45]</sup>首次报道了简单酚类化合物的甲烷发酵过程。体外试验表明, 适应性强的厌氧微生物菌团能够完全降解单环芳香族化合物<sup>[46]</sup>, 并在一定程度上降解与木质素相关的低聚化合物 (lignin-related oligomers)<sup>[47]</sup>。

然而, 苯环的化学属性使微生物的降解作用受到热力学限制。苯环抵御微生物进攻的能力与苯环结构周围  $\pi$  电子分布带来的高热稳定性有关<sup>[9]</sup>。苯核 (benzene nucleus) 具有的这种高中介能 (high mesomeric energy, 大约 160 kJ/mol) 表明抗环裂变能力相对较高<sup>[41]</sup>。苯甲酸 (benzoic acid) 环上—OH 和—OCH<sub>3</sub> 取代基的存在导致环分裂方式的不同<sup>[40]</sup>。连接在苯环上的诸如—OH 等取代基的存在影响了  $\pi$  电子系统的稳定性, 并且有助于提供苯环裂变的能量。一般来讲, 失去电子 (electron-withdrawing) 或提供取代基能使苯环结构易受亲电子 (electrophilic) 和亲核 (nucleophilic) 攻击而发生键分裂<sup>[36]</sup>。

芳香环厌氧分解的生物化学反应第 1 步是裂解破坏芳香族化合物的结构, 然后通过辅酶 A 参与  $\beta$ -氧化作用产生多香酸 (pimelic acid) 和己二酸 (adipic acid) 再进入中间新陈代谢过程<sup>[48]</sup>。在瘤胃这种缺氧的环境里, 苯环的裂解必须通过还原途径来完成。首先, 苯核被加氢还原, 同时氢原子又是环己烷核 (cyclohexane nucleus) 的电子供体<sup>[41]</sup>, 这是一个放能 (exergonic) 过程 (-100 kJ/mol)。苯核还原的关键步骤是第 1 个双键与氢结合 (还原), 即高吸能 (endergonic) 反应 (+60 kJ/mol), 但第 2 和第 3 双键的氢化 (还原) 属放能 (分别为 -90 kJ/mol, -70 kJ/mol) 过程<sup>[44]</sup>; 其次, 环己烷核通过水合作用分裂变成脂肪酸, 是一个放能过程; 最后, 脂肪酸通过新陈代谢形成更小的物质如甲酸 (formic acid)、乙酸 (acetic acid)、CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>, 这些基质最终转化成甲烷和水<sup>[49]</sup>。苯甲酸经吸能过程 (大约 +45.2 kJ/mol) 裂变成短链脂肪酸是一个耗能反应<sup>[33]</sup>。苯甲酸发酵降解成乙酸和 CO<sub>2</sub> 的过程中, 需要好氢 (hydrogen-utilising) 微生物参与以保持较低的氢分压 (hydrogen partial pressure) (大约 10<sup>-14</sup> Pa), 并释放能量。苯核发酵降解产生的电子很可能以 H<sub>2</sub> 形式排出, H<sub>2</sub> 与 CO<sub>2</sub> 发生还原反应形成甲烷气体<sup>[44]</sup>。

有机化合物的降解过程在缺氧条件下比富氧条件下所需的时间长<sup>[9]</sup>。微生物对芳香族化合物的矿化作用几乎不能完全彻底, 但长远的生态学意义很大<sup>[50]</sup>。苯环断裂反应在厌氧条件下异常缓慢<sup>[42]</sup>。各种芳香族化合物在厌氧降解过程中, 都能观察到微生物为适应基质特性所表现出的滞后期。用厌氧环境中的甲烷接种体对苯甲酸进行甲烷化降解, 需要 1~2 个月的适应期<sup>[48]</sup>。芳香族化合物在瘤胃厌氧环境中被完全降解所需的时间, 远长于食糜驻留瘤胃的时间<sup>[12]</sup>, 同时, 芳香族化合物获得完全降解, 需要由不同微生物群落的共同参与才能完成<sup>[33]</sup>。也就是说, 达到完全降解, 只能在混合微生物种群的作用下才能实现, 因为这一过程也遵循热力学的能量守恒定律 (energy conservation)<sup>[49]</sup>。

Schink 等得出结论<sup>[41]</sup>, 苯环的甲烷化降解过程包括多个耗时的生化阶段, 为了适应不断变化的基质, 微生物还需要一个相对较长的适应期。源于瘤胃液的接种体对芳香环降解过程的不断适应仅仅表明了微生物适应基质的潜在能力, 而非自然状态下的真正结果<sup>[44]</sup>。从生物能的角度看, 环己烷的厌氧降解显然要比苯环容易。因此, 在瘤胃厌氧环境中, 植物酚酸甲烷化降解过程中的主要生化抑制作用发生在苯环的不饱和反应阶段。

#### 5 结语

植物饲料的芳香族和脂环族化合物释放途径及瘤胃微生物对芳香族化合物的作用特点表明, 瘤胃微生物与饲料芳香族化合物之间存在着互作效应, 这是芳香族化合物之所以成为反刍动物采食量最佳预测指标的理论基础。当然, 用芳香族化合物建立预测反刍动物采食量的关系模型, 一方面需要对不同草食家畜展开研究, 如国内有学者开始了绵羊<sup>[51]</sup>、牦牛<sup>[52]</sup>、马鹿等家畜的相关研究<sup>[53]</sup>; 另一方面还需要进一步研究常见的芳香族和脂环族化

合物在瘤胃中的代谢特点和过程,这将在以后的连载文章中详细报道。

### 参考文献:

- [1] 龙瑞军,董世魁,王元素,等.反刍家畜采食量的概念与研究方法[J].草业学报,2003,12(5):8-17.
- [2] 龙瑞军,王元素,董世魁,等.以芳香族化合物估测反刍动物采食量的潜力[J].草业学报,2004,13(2):13-22.
- [3] Jung H G, Fahey G C Jr. Nutritional implications of phenolic monomers and lignin: A review [J]. Journal of Animal Science, 1983, 57: 206-219.
- [4] Jung H G, Fahey G C Jr. Interactions among phenolic monomers and *in vitro* fermentation [J]. Journal of Dairy Science, 1983, 66: 1255-1263.
- [5] Patterson J A. Rumen microbiology [A]. In: Lederberg Encyclopedia of Microbiology (Volume 3) [M]. San Diego, USA: Academic Press, 1992. 623-642.
- [6] Bourquin L D, Titgemeyer E C, Merchen N R, *et al*. Forage level and particle size effects on orchardgrass digestion by steers. I Site and extent of organic matter, nitrogen, and cell wall digestion [J]. Journal of Animal Science, 1994, 72: 746-758.
- [7] Lowry J B. Metabolic and nutritional significance of the cell wall phenolic acid fraction [A]. In: Akin D E, Jungdahll G, Wilson J R, *et al*. Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants [M]. New York, USA: Elsevier, 1990. 119-126.
- [8] Borneman W S, Akin D E. Lignocellulose degradation by rumen fungi and bacteria: Ultrastructure and cell wall degrading enzymes [A]. In: Akin D E, Jungdahll G, Wilson J R, *et al*. Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants [M]. New York, USA: Elsevier, 1990. 325-339.
- [9] Besle J M, Fonty G. Hydrolysis and degradation of esterified phenolic acids from maize cell wall by rumen microbial species [A]. In: Evolution of the Rumen Microbial Ecosystem, Symposium Abstracts [C]. Aberdeen, UK: Rowett Research Institute and NRA, 1997. 25.
- [10] Akin D E, Borneman W S, Rigby L L, *et al*. *p*-Coumaroyl and feruloyl arabinoxylans from plant cell walls as substrates for ruminal bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59: 644-647.
- [11] Gordon A J, Neudoerffer T S. Chemical and *in vivo* evaluation of a brown midrib mutant of *Zea mays* I fibre, lignin, and amino acid composition and digestibility for sheep [J]. Journal of Science in Food and Agriculture, 1973, 24: 565-577.
- [12] Weimer P J. Microbial and molecular mechanisms of cell wall degradation - session synopsis [A]. In: Jung H G, Buxton D R, Hatfield R D, *et al*. Forage Cell Wall Structure and Digestibility [C]. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, 1993. 485-498.
- [13] Hartley R D. *p*-Coumaric and ferulic acid components of cell walls of ryegrass and their relationships with lignin and digestibility [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1972, 23: 1347-1354.
- [14] Ford C W, Elliott R. Biodegradability of mature grass cell walls in relation to chemical composition and rumen microbial activity [J]. Journal of Agricultural Science, 1987, 108: 201-209.
- [15] Theander O, Udén P, Aman P. Acetyl and phenolic acid substituents in timothy of different maturity and after digestion with rumen microorganisms or a commercial cellulase [J]. Agriculture and Environment, 1981, 6: 127-133.
- [16] Martin S A. Effect of phenolic compounds on fiber-degrading enzymes from rumen bacteria [A]. In: Akin D E, Jungdahll G, Wilson J R, *et al*. Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants [M]. New York, USA: Elsevier, 1990. 289-300.
- [17] Fahey G C Jr, Al-Haydari S Y, Hinds F C, *et al*. Phenolic compounds in roughages and their fate in the digestive system of sheep [J]. Journal of Animal Science, 1980, 50: 1165-1172.
- [18] Titgemeyer E C, Cameron M G, Bourquin L D, *et al*. Digestion of cell wall components by dairy heifers fed diets based on alfalfa and chemically treated oat hulls [J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74: 1026-1037.
- [19] Grabber J H, Jung G A. *In Vitro* disappearance of carbohydrates, phenolic acids, and lignin from parenchyma and sclerenchyma cell walls isolated from cocksfoot [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1991, 57: 315-323.
- [20] Chesson A. Mechanistic models of forage cell wall degradation [A]. In: Jung H G, Buxton D R, Hatfield R D, *et al*. Forage

- Cell Wall Structure and Digestibility [C]. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, 1993: 347-376
- [21] Chesnut A B, Fahey G C Jr, Berger L L, *et al* Effects of sulfur fertilization on composition and digestion of phenolic compounds in tall fescue and orchardgrass [J]. *Journal of Animal Science*, 1986, 63: 1926-1934
- [22] Goto M, Maysuoka J, Sato T, *et al* Brown midrib mutant maize with reduced levels of phenolic acids ether-linked to the cell walls [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1994, 48: 27-38
- [23] Van Soest P J. *Nutritional Ecology of the Ruminant* [M]. 2nd ed. Ithaca, New York, USA: Cornell University Press, 1994
- [24] Marvin H J P, Krechting C F, Van Loo E N, *et al* Relationship between phenolic acids formed during rumen degradation of maize samples and *in vitro* digestibility [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1996, 71: 111-118
- [25] Launchbaugh K L. Biochemical aspects of grazing behaviour [A]. In: Hodgson J, Illius A W. *The Ecology and Management of Grazing Systems* [C]. Wallingford, Oxon, UK: Commonwealth Agricultural Bureaux International, 1996: 159-184
- [26] 李俊生, 宋延龄, 曾治高. 反刍动物的食物选择及其影响因素 [J]. *兽类学报*, 2003, 23(1): 60-73
- [27] Hugo W B. Mode of action of non-antibiotic antibacterial agents [A]. In: Hugo W B, Russell A D. *Pharmaceutical Microbiology* [M]. London, UK: Blackwell Scientific Publications, 1989: 281-287
- [28] Fukushima R S, Dehority B A, Loerch S C. Modification of a colorimetric analysis for lignin and its use in studying the inhibitory effects of lignin on forage digestion by ruminal microorganisms [J]. *Journal of Animal Science*, 1991, 69: 295-304
- [29] Martin A K. The origin of urinary aromatic compounds excreted by ruminants II The metabolism of phenolic cinnamic acids to benzoic acid [J]. *British Journal of Nutrition*, 1982, 47: 155-164
- [30] Krischick V A, Jones C G. Prologue: Microorganisms, the unseen mediators [A]. In: Barbosa P, Krischick V A, Jones C G. *Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interactions* [M]. New York, USA: John Wiley and Sons, Inc., 1991: 1-6
- [31] Schultz J C, Hunter M D, Appel H M. Antimicrobial activity of polyphenols mediates plant-herbivore interactions [A]. In: Hemingway R W, Laks P E. *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties and Significance* [M]. New York, USA: Plenum Press, 1992: 621-637
- [32] Singleton V L. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods [J]. *Advances in Food Research*, 1981, 27: 149-242
- [33] Young L Y. Anaerobic degradation of aromatic compounds [A]. In: Gibson D T. *Microbial Degradation of Organic Compounds* [M]. New York, USA: Marcel Dekker, Inc., 1984: 487-523
- [34] Appel H M. Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1993, 19: 1521-1552
- [35] Drasar B S, Barrow P A. *Intestinal Microbiology* [M]. Wokingham, Berkshire, UK: Van Nostrand Reinhold (UK), 1985
- [36] Stewart C S, Acamovic T, Gurung H, *et al* Manipulation of the rumen flora for degradation of plant antinutrient compounds [A]. In: Shazly K E. *Manipulation of Rumen Microorganisms* [M]. Alexandria, Egypt: A lphagraph, 1994: 150-157
- [37] Krumholz L R, Bryant *Eubacterium oxidoreducens* sp. nov. requiring H<sub>2</sub> or formate to degrade gallate, pyrogallol, phloroglucinol and quercetin [J]. *Archives of Microbiology*, 1986, 144: 8-14
- [38] Scheline R R. *Mammalian Metabolism of Plant Xenobiotics* [M]. London, UK: Academic Press, 1978
- [39] Balba M T, Evans W C. The methanogenic fermentation of *ω*-phenylalkane carboxylic acids [J]. *Biochemical Society Transactions*, 1979, 7: 403-405
- [40] Sleat R, Robinson J P. The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic compounds [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1984, 57: 381-394
- [41] Schink B, Brune A, Schnell S. Anaerobic degradation of aromatic compounds [A]. In: Winkelmann G. *Microbial Degradation of Natural Products* [M]. Weinheim, Germany: VHC, 1992: 219-242
- [42] Prins R A. Rumen microbial metabolism of plant secondary compounds, xenobiotics and drugs [A]. In: Ooms L A A, Degryse A D, Van Miert A S. *Physiological and Pharmacological Aspects of the Reticulo-Rumen* [M]. Dordrecht, The

- Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 199-225
- [43] Goodwin B L. Handbook of Intermediate Metabolism of Aromatic Compounds[M]. London, UK: Chapman and Hall, 1976
- [44] Evans W C, Fuchs G. Anaerobic degradation of aromatic compounds[J]. Annual Review of Microbiology, 1988, 42: 289-317.
- [45] Tarvin D, Buswell A M. The methane fermentation of organic acids and carbohydrates[J]. Journal of the American Chemistry Society, 1934, 56: 1751-1755
- [46] Grbic-Galic D. *O*-demethylation, dehydroxylation, ring-reduction and cleavage of aromatic substrates by Enterobacteriaceae under anaerobic conditions[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1986, 61: 491-497.
- [47] Chen W, Supanwong K, Ohmura K, *et al*. Anaerobic degradation of veratrylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether and guaiacoxycetic acid by mixed rumen bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 50: 1451-1456
- [48] Harder W. Enrichment and characterization of degrading organisms[A]. In: Leisinger T, Hütter R, Cook A M, *et al*. Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds[M]. London, UK: Academic Press, 1981. 77-96
- [49] Zeikus J G. Fate of lignin and related aromatic substrates in anaerobic environments[A]. In: Kirk T K, Higuchi T, Chang H M. Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications (Volume 1)[M]. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 1980. 101-109
- [50] Fewson C A. Biodegradation of aromatics with industrial relevance[A]. In: Leisinger T, Hütter R, Cook A M, *et al*. Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds[M]. London, UK: Academic Press, 1981. 141-179
- [51] 刘金祥, 胡自治, 任继周, 等. 高山草原绵羊放牧生态及消化代谢研究 IV 采食量和消化代谢季节动态[J]. 草业学报, 2001, 10(3): 65-71.
- [52] Long R J, Dong S K, Chen X B, *et al*. Preliminary studies on urinary excretion of purine derivatives and creatinine in yaks (*Bos grunniens*) [J]. The Journal of Agricultural Science, Cambridge, 1999, 133: 427-431.
- [53] 侯扶江, 李广, 常生华, 等. 肃南鹿场甘肃马鹿生产性能研究[J]. 草业学报, 2004, 13(1): 94-100

### Metabolism of aromatic and alicyclic compounds in the digestive tract of ruminants

LONG Rui-jun<sup>1,2</sup>, DONG Shi-kui<sup>3</sup>, WANG Yuan-su<sup>2</sup>, MA Xiang-li<sup>2</sup>, J PA GELLA<sup>4</sup>

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Grassland Science College, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

3. Institute of Resources Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

4. Universidad Nacional de La Pampa, Argentina)

**Abstract:** The level of metabolizing aromatic and alicyclic compounds in ruminant body depends on the metabolizing capacity of rumen where microorganisms play an important role. Under anaerobic condition in rumen, microbial metabolism is the main pathway by which xenobiotics were degraded. Aromatic xenobiotics released after mastication have three fates in the digestive tract—absorbed, bounded to unavailable proteins and lipids of the digesta leading to excretion in the faeces, and mostly metabolized in rumen by microbial activities and reactions such as hydrolysis, reduction, decarboxylation, *O*-dealkylation, dehydroxylation and hydrogenation. Besides, cell wall (CW) bound phenolic acids can also be released from forages as soluble esters with carbohydrates due to the action of carbohydrases from rumen microorganisms. Subsequently, the xenobiotics are partial degraded (biotransformation) and complete degraded (mineralisation) and, as a result, the toxicity become far less from their precursors. It has also found that the content of CW-esterified *p*-coumaric acid has significant negative correlations with CW digestibility *in vivo*, dry matter digestibility (DMD) *in vitro* and ruminal cellulose degradability (so does as the lignin content) *in sacco*. The review and summary of rumen metabolism of aromatic xenobiotics provide a base for predicting feed intake of grazing ruminants according with their contents in urine.

**Key words:** xenobiotics; release; rumen microorganisms; hydrolysis; reduction metabolism