

# 发酵玉米秸秆粉对肉鸡肠道消化酶及微生物区系的影响

王平, 党晓伟, 王朋朋, 左瑞雨, 常娟, 袁林, 尹清强\*

(河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 为了研究日粮中添加米曲霉发酵玉米秸秆粉代替等量玉米对鸡肠道微生物和消化酶的影响, 选择25只6周龄AA肉鸡, 随机分成5组, 正处理组设添加4%、8%和12% 3个水平的发酵秸秆代替基础日粮中等量玉米, 用基础日粮(对照组)和8%未发酵秸秆(负处理组)替代基础日粮中等量玉米作对比。结果显示: 与负处理组和对照组相比, 日粮中添加8%发酵玉米秸秆粉使回肠和盲肠中的乳酸菌和米曲霉的数量显著增加( $P < 0.05$ ), 大肠杆菌数显著降低( $P < 0.05$ ); 纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶活力显著提高( $P < 0.05$ )。

**关键词:** 肉鸡; 米曲霉; 发酵玉米秸秆粉; 肠道微生物; 消化酶活性

**中图分类号:** S816.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)03-0108-04

## Effects of Corn Straw Fermented with *Aspergillus oryzae* on Digestive Enzyme Activities and Gut Microbes of Broilers

WANG Ping, DANG Xiao-wei, WANG Peng-peng, ZUO Rui-yu, CHANG Juan,

YUAN Lin, YIN Qing-qiang\*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** A total of twenty five AA broilers at six week of age were randomly assigned to five groups to study the effects of corn straw fermented with *Aspergillus oryzae* instead of corn on digestive enzyme activities and gut microbes of broilers. For control groups, broilers were basal diet or added 8% unfermented corn straw instead of corn. The other three experimental groups were added 4%, 8% and 12% fermented corn straw instead of corn, respectively. The results showed compared with the control groups, three diets containing fermented corn straw increased both lactic acid bacteria and *Aspergillus oryzae* amount ( $P < 0.05$ ) and decreased *E. coli* amount in ileum and cecum of broilers ( $P < 0.05$ ). The intestinal digestive enzyme activities such as cellulase, protease and amylase were significantly increased ( $P < 0.05$ ) by the fermented corn straw. The optimal level of fermented corn straw instead of corn was 8%.

**Key words:** Broiler; *Aspergillus oryzae*; Fermented corn straw; Gut microbes; Digestive enzyme activities

我国每年约产6亿t农作物秸秆, 绝大部分被直接还田或焚烧, 既浪费资源又造成了环境污染<sup>[1,2]</sup>。因此, 发展秸秆畜牧业具有巨大的生态价值和经济价值。如何开发秸秆资源, 提高饲料利用

率, 已是一个世界性的研究课题<sup>[3,4]</sup>。采取微生物发酵技术对农作物秸秆进行处理, 可以提高和改善饲料营养价值。发酵秸秆已用于牛、羊等反刍动物的饲养, 并带来了巨大的经济效益和社会效益。由

收稿日期: 2009-11-03

基金项目: 河南省科技成果转化资金项目(082201180001)

作者简介: 王平(1985-), 女, 河南柘城人, 在读硕士研究生, 研究方向: 饲料生物技术。

\*通讯作者: 尹清强(1964-), 男, 河南南阳人, 教授, 博士, 主要从事动物营养与生物技术研究。E-mail: QQZ22@yahoo.com.cn

于鸡本身消化系统的特点, 将秸秆用于鸡饲料中还是一个有争议的问题。但是目前发酵玉米秸秆粉饲喂鸡的试验已有报道。张桂荣等<sup>[5]</sup>将发酵玉米秸秆粉饲喂肉鸡, 虽然对肉鸡的生长速度没有影响, 但能提高雏鸡成活率, 降低饲料成本。陈秀为等<sup>[6]</sup>利用复合菌剂发酵的秸秆粉代替 10% 的混合饲料饲喂肉鸡, 对肉鸡体质量的增加没有影响, 但降低了饲料成本。

肠道微生物菌群是所有动物消化系统的一个重要组成部分。日粮成分和营养水平的变化对肠道微生物菌群的数量和种类具有显著影响<sup>[7,8]</sup>, 相应地会影响到肠道对营养物质消化吸收能力。鉴此, 本试验用米曲霉发酵玉米秸秆粉来代替鸡日粮中部分玉米, 通过测定肠道纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶活性和微生物数量来研究发酵玉米秸秆粉对肉仔鸡肠道菌群和消化酶的影响, 旨在探讨发酵秸秆对畜禽的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)菌株 由河南农业大学动物营养与生物技术实验室从牛瘤胃中分离所得。

1.1.2 供试动物 选用 25 只 6 周龄体质健康的 AA 肉鸡, 随机分成 5 组, 每组 5 只。

1.1.3 玉米秸秆粉 玉米秸秆为收获玉米后的优质、无霉变玉米秸秆, 烘干, 粉碎成直径为 1.25 mm 的颗粒, 保存备用。

1.1.4 PDA 培养基 可溶性淀粉 6 g、蛋白胨 5 g、酵母 2 g、葡萄糖 20 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.3 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1000 mL, 在 121℃下高压灭菌 15 min。

1.1.5 玉米秸秆粉固体发酵培养基 干物质组成: 玉米秸秆 90%+复合饲料 10% (玉米粉:豆粕粉:小麦麸=1:1:1); 营养液组成: 90%蒸馏水+10%矿物元素营养液((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 14 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 g/L, MgSO<sub>4</sub> 3 g/L, CaCl<sub>2</sub> 3 g/L, NaCl 5 g/L, FeSO<sub>4</sub> 0.05 g/L, MnSO<sub>4</sub> 0.016 g/L, ZnCl<sub>2</sub> 0.017 g/L, CoCl<sub>2</sub> 0.02 g/L)。干物质与营养液的比例为 1:1.5。

1.2 种曲的培养和制备

将米曲霉接种到 PDA 培养基中, 30℃条件下静止培养 3 d, 然后用无菌生理盐水冲洗平板, 轻轻将琼脂平面的孢子刮下, 转移到已经灭菌的三角瓶中, 按 10% (湿料质量) 的比例接入玉米秸秆粉固体

发酵培养基中。

1.3 试验分组

试验分为 5 组, 试验日粮分别为对照组: 基础日粮; 处理组 1: 添加 4% 的发酵秸秆替代基础日粮中的玉米; 处理组 2: 添加 8% 的发酵秸秆替代基础日粮中的玉米; 处理组 3: 添加 12% 的发酵秸秆替代基础日粮中的玉米; 负处理组: 添加 8% 的未发酵秸秆替代基础日粮中的玉米。试验鸡自由采食和自由饮水。试验日粮配方和营养水平见表 1。

表 1 日粮配方及营养水平

日粮组成	对照组	处理组 1	处理组 2	处理组 3	负处理组
玉米/ %	63.54	59.78	56.1	52.27	56.1
豆粕/ %	29.75	29.55	29.25	29.11	29.25
发酵玉米秸秆粉/ %	0.00	4.00	8.00	12.00	8.00
植物油(豆油)/ %	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
磷酸氢钙/ %	1.24	1.22	1.20	1.20	1.20
石粉/ %	1.13	1.10	1.08	1.04	1.08
食盐/ %	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
预混料/ %	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
赖氨酸/ %	0.01	0.02	0.03	0.04	0.03
蛋氨酸/ %	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04
营养成分	对照组	处理组 1	处理组 2	处理组 3	负处理组
粗蛋白/ %	18.06	18.07	18.05	18.08	18.05
代谢能/(MJ/kg)	12.20	11.77	11.35	10.93	11.35
钙/ %	0.81	0.80	0.80	0.80	0.80
有效磷/ %	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
总磷/ %	0.57	0.56	0.56	0.55	0.56
赖氨酸/ %	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89
蛋氨酸/ %	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30

注: 通过预混料向每千克饲料中添加: 维生素 A 15000IU, 维生素 D<sub>3</sub> 3900IU, 维生素 E 30IU, 维生素 K<sub>3</sub> 3mg, 维生素 B<sub>1</sub> 2.4mg, 维生素 B<sub>2</sub> 9mg, 维生素 B<sub>6</sub> 4.5mg, 维生素 B<sub>12</sub> 0.021mg, 泛酸 30mg, 烟酸 45mg, 叶酸 1.2mg, 生物素 0.18mg, 胆碱 700mg, CuSO<sub>4</sub> 8mg, ZnSO<sub>4</sub> 40mg, FeSO<sub>4</sub> 80mg, MnSO<sub>4</sub> 100mg, KI 0.35mg, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.30mg

1.4 测定指标及方法

1.4.1 肠道菌群数量 饲喂 15 d 后, 颈动脉放血处死供试鸡, 迅速剖腹并结扎所取回肠、盲肠段, 用酒精棉球消毒各结扎口后, 放入已灭菌塑料袋中, 用冰盒保存, 带回实验室立即进行微生物计数。将各肠段食糜样品置于灭菌的 10 mL 离心管中, 混匀, 称取 0.5 g 放于盛有 4.5 mL 灭菌生理盐水的离心管中(10 倍稀释), 振荡 3 min, 取此稀释液 0.5 mL 于盛有 4.5 mL 灭菌生理盐水的离心管中, 依次进行 10<sup>-2</sup> ~ 10<sup>-8</sup> 倍比稀释。取适当稀释度, 用微量移液器吸取 0.1 mL 于培养基(每个稀释度 3 次重复)中, 用玻璃棒涂匀, 生化培养箱培养, 计算菌落数并换算成每克内容物所含菌落数。大肠杆菌采用伊红美兰培养基, 37℃有氧条件下培养 48 h; 乳酸菌采用

MRS 培养基, 37℃厌氧条件下培养 48 h; 米曲霉采用 PDA 培养基, 30℃有氧条件下培养 48 h。

1.4.2 肠道消化酶 将肠道内容物按适当的比例稀释, 离心, 保存备用。蛋白酶活力测定采用 Folin—酚法测定蛋白酶的活力<sup>[9]</sup>; 淀粉酶活力的测定采用碘定粉比色法<sup>[10]</sup>; 纤维素酶活力的测定采用 DNS 法<sup>[11]</sup>。

### 1.5 统计分析

利用 SAS 6.12 数据处理软件对所有的试验数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 饲料中添加米曲霉发酵玉米秸秆粉对肉鸡肠道微生物数量的影响

由表 2 可知, 处理组 2 回肠中乳酸菌的数量显

著高于对照组、处理组 1 和负处理组 ( $P < 0.05$ )。处理组 2 盲肠中的乳酸菌数量显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ), 其他各组间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。对照组盲肠中乳酸菌的数量高于回肠, 随着发酵秸秆添加量的增加, 回肠中乳酸菌的数量基本上与盲肠中相当。处理组 1、2、3 回肠和盲肠中大肠杆菌的数量显著低于对照组和负处理组 ( $P < 0.05$ ), 并且随着发酵秸秆添加量的增加逐渐降低; 对照组和负处理组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。处理组 1、2、3 回肠和盲肠中米曲霉的数量均显著高于对照组和负处理组 ( $P < 0.05$ ), 并且随着发酵秸秆添加量的增加米曲霉的数量逐渐增加 ( $P > 0.05$ ); 对照组和负处理组回肠和盲肠中米曲霉含量很低, 添加发酵秸秆后回肠中米曲霉的数量比盲肠中高。

表 2 饲料中添加米曲霉发酵玉米秸秆粉对肉鸡微生物数量的影响

cfu/g

菌体	器官	对照组	处理组 1	处理组 2	处理组 3	负处理组
乳酸菌	回肠	4.14±0.15 <sup>c</sup>	4.87±0.61 <sup>c</sup>	7.20±0.72 <sup>a</sup>	7.03±0.05 <sup>ba</sup>	6.34±0.08 <sup>b</sup>
	盲肠	6.48±0.01 <sup>b</sup>	6.30±0.30 <sup>b</sup>	7.21±0.19 <sup>a</sup>	6.10±0.17 <sup>b</sup>	6.26±0.24 <sup>b</sup>
大肠杆菌	回肠	6.10±0.17 <sup>a</sup>	5.26±0.24 <sup>b</sup>	5.16±0.14 <sup>b</sup>	5.05±0.06 <sup>b</sup>	6.39±0.36 <sup>a</sup>
	盲肠	8.82±0.04 <sup>a</sup>	7.84±0.31 <sup>b</sup>	7.54±0.13 <sup>cb</sup>	7.10±0.31 <sup>c</sup>	8.69±0.44 <sup>a</sup>
米曲霉	回肠	0.67±0.58 <sup>c</sup>	7.30±0.03 <sup>b</sup>	7.34±0.08 <sup>b</sup>	7.60±0.08 <sup>a</sup>	0.77±0.58 <sup>c</sup>
	盲肠	1.10±0.17 <sup>b</sup>	6.67±0.06 <sup>a</sup>	6.72±0.10 <sup>a</sup>	6.87±0.11 <sup>a</sup>	1.25±0.35 <sup>b</sup>

注: 同行肩标小写字母相同者表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 不同者表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); 表中数据以对数均值 lg 表示

### 2.2 饲料中添加米曲霉发酵玉米秸秆粉对肉鸡肠道消化酶活性的影响

由表 3 可知, 饲料中添加米曲霉发酵玉米秸秆粉后, 处理组 2 和 3 回肠和盲肠中纤维素酶活性均显著高于对照组和负处理组, 且随着添加量的增加, 纤维素酶活性逐渐提高。除负处理组外, 各组盲肠中纤维素

酶活性均高于回肠。处理组 2 和 3 回肠中蛋白酶活性显著高于对照组和负处理组 ( $P < 0.05$ ), 且随着添加量的增加蛋白酶活性逐渐提高。盲肠中无蛋白酶检出。处理组 1、2、3 回肠和盲肠中淀粉酶活性均显著高于对照组和负处理组 ( $P < 0.05$ ), 处理组 2 显著高于处理组 1 ( $P < 0.05$ )。回肠中的淀粉酶活性高于盲肠。

表 3 饲料中添加米曲霉发酵玉米秸秆粉对肉鸡肠道消化酶活性的影响

U/g

测定指标	器官	对照组	处理组 1	处理组 2	处理组 3	负处理组
纤维素酶	回肠	0.13±0.08 <sup>b</sup>	0.48±0.12 <sup>b</sup>	1.03±0.08 <sup>a</sup>	1.07±0.62 <sup>a</sup>	0.26±0.08 <sup>b</sup>
	盲肠	0.20±0.05 <sup>c</sup>	1.41±0.06 <sup>c</sup>	1.75±0.40 <sup>b</sup>	2.38±0.05 <sup>a</sup>	0.09±0.05 <sup>f</sup>
蛋白酶	回肠	467.03±23.54 <sup>c</sup>	472.08±39.46 <sup>c</sup>	748.19±11.11 <sup>b</sup>	1000.62±22.90 <sup>a</sup>	375.38±51.10 <sup>d</sup>
	盲肠	—	—	—	—	—
淀粉酶	回肠	2085.37±98.39 <sup>c</sup>	2410.78±24.13 <sup>b</sup>	2807.45±5.78 <sup>a</sup>	2752.25±17.37 <sup>a</sup>	2141.85±44.59 <sup>c</sup>
	盲肠	36.62±0.52 <sup>c</sup>	82.98±3.65 <sup>b</sup>	94.72±6.01 <sup>a</sup>	72.14±2.27 <sup>c</sup>	55.89±3.76 <sup>d</sup>

注: 同行肩标小写字母相同者表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 不同者表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), “—”表示没检出

## 3 讨论

单胃动物和禽类的发酵主要在大肠(盲肠、结肠和直肠), 在此形成一个复杂的微生物区系, 有需氧

菌、兼性菌和严格厌氧菌, 其中厌氧菌约占 99%。粪便中微生物菌落 1010 ~ 1012 cfu/mL, 细菌种类有 400 种以上<sup>[12]</sup>。许多因素如食物成分和饲料添加剂都影响动物肠道菌群的组成及其活性。健康的

肠道菌群是一个有益菌占优势、有害菌比例和细菌总数均较少的微生物菌群。健康的肠道菌群能够使饲料中全部的营养潜力得到发挥,可使动物保持健康,降低食物中的有害微生物数量,减少腐败物的生成,可对营养、生产性能、动物福利、产品卫生和环境产生有利的影响。本试验结果显示,饲料中添加适量的米曲霉发酵秸秆粉能使肠道微生物区系发生变化,促进有益菌的生长,减少有害菌的生长,而添加未发酵秸秆组没有变化。米曲霉是需氧菌,生长环境要求不严格,虽不属于单胃动物正常菌群,但日粮中出现米曲霉时其能在肠道定植,并与大肠杆菌生长发生竞争,达到抑菌效果,从而降低了肠道疾病的发生。其发酵产物能选择性地激发肠道有益菌的活性,促进了乳酸菌的生长。若发酵玉米秸秆粉添加过多,肠道中米曲霉大量定植对乳酸菌也产生抑制作用。鸡的消化道短,一般饲料在采食 4 h 可排出,24 h 内可排出不能消化部分<sup>[13]</sup>,米曲霉在肠道前段的定植为纤维素的降解争取了时间。

米曲霉是 FAO 和 WHO 公认的安全食品级菌种,在自然界的分布极为广泛,它具有生长快、产孢子量大、酶系丰富、不产毒素等特点,有多种活性强大的酶系,其中产纤维素酶和蛋白酶能力较强<sup>[14,15]</sup>。利用米曲霉发酵秸秆后,秸秆的营养价值提高,同时发酵产物中含有大量的纤维素酶和蛋白酶等多种酶,将其饲喂畜禽后,畜禽肠道内外源酶增加。本试验结果显示,饲料中添加米曲霉发酵玉米秸秆粉后,鸡肠道内纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶均显著提高( $P < 0.05$ )。随着发酵秸秆添加量的增加纤维素酶和蛋白酶活性逐渐增强,而淀粉酶活性在添加量为 8% 时最强。这说明发酵秸秆中纤维素酶和蛋白酶量较高,含淀粉酶量较低,同时由于外源酶的增加抑制了内源淀粉酶活性。添加未发酵秸秆对肠道消化酶无影响。鸡肠道中无纤维素酶,无降解纤维素的能力,饲喂发酵秸秆后,回肠和盲肠中纤维素酶活性显著增高,为饲料中纤维素的降解提供了条件。鸡采食了秸秆后饱感增加,使采食量降低,而肠道中蛋白酶和淀粉酶活性提高可使禽类更好地消化、吸收饲料中的蛋白质和淀粉类营养成分,提高饲料的利用率,满足营养需要。本研究中以饲料中

添加 8% 的发酵玉米秸秆粉效果为最佳。

#### 参考文献:

- [1] 徐保民, 苏加岱, 黄九柏. 论作物秸秆资源的开发利用[J]. 现代农业科技, 2009(1): 220-221.
- [2] 王芳. 禁烧农作物秸秆与推广秸秆综合利用[J]. 现代农业科技, 2009(13): 262, 267.
- [3] Sakka Kazuo, Testuy A K, *et al*. Molecular breeding of cellulolytic microbes[J]. Journal of Bioscience and Bio-engineering, 2000, 90(3): 227-233.
- [4] Bothaina A M, Aziz N H. Influence of  $\gamma$ -irradiation on the bioconversion of rice straw by *Trichoderma viride* into single cell protein[J]. CA T INIST, 1999, 97(386): 171-183.
- [5] 张桂荣, 秦广军, 王旭, 等. 肉仔鸡饲喂玉米秸秆粉发酵饲料初探[J]. 中国家禽, 2003, 25(14): 17-19.
- [6] 陈秀为, 张克强, 周可, 等. 一组复合菌发酵秸秆的理化效应及饲喂效果[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(2): 345-347.
- [7] Wanger D D, Thomas O P. Influence of diets containing rye or pectin on the intestinal flora of chicks[J]. Poultry Science, 1987, 57: 971-975.
- [8] Reid C A, Hillman K. The effects of retrogradation and amylose/ amylopectin ratio starches on carbohydrate fermentation and microbial populations in the porcine colon[J]. Animal Science, 1999, 68: 503-510.
- [9] 吴国峰, 李国全. 工业发酵分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 43-46.
- [10] 李影林, 卢淑文, 刘雅琴. 临床医学检验手册[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1987: 378-379.
- [11] 郝月, 杨翔华, 洪新. 秸秆纤维素分解菌的分离筛选试验[J]. 中国饲料, 2005(11): 15-17.
- [12] Eastwood M A. The physiological effect of dietary fibre: an up date[J]. Annual Reviews in the Nutrition, 1992, 12: 19-35.
- [13] 吴于明. 家禽营养与饲料[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1997.
- [14] 屈二军, 王晓涛, 李文建, 等. 一株高产纤维素酶的米曲霉菌种的选育[J]. 中国酿造, 2008, 27(14): 47-49.
- [15] 孟颖华. 沪酿 3.042 米曲霉的纯化复壮[J]. 中国调味品, 2001(7): 7-9.