

纤维分解酶与异丁酸对犊牛瘤胃液酶活力和纤维分解菌菌群的影响

许倩倩 侯 明 王 聪* 刘 强 张延利 裴彩霞 王永新 郭 刚 霍文婕

(山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘 要: 为研究饲料补充纤维分解酶与异丁酸及其混合物对断奶前后犊牛瘤胃液酶活力和纤维分解菌菌群的影响, 试验选取 30 日龄体重 $[(48.5 \pm 0.3) \text{ kg}]$ 近似、发育正常的荷斯坦犊牛 36 头, 随机分为 4 组, 60 日龄断奶, 对照组哺乳/饲喂犊牛料+苜蓿干草, 纤维分解酶组(FE 组)、异丁酸组(IB 组)和复配组(IBFE 组)分别补饲纤维分解酶 1.83 g/d (包含滤纸酶活力 160 U 和木聚糖酶活力 4 000 U)、异丁酸(99%) 6 g/d 和二者混合物, 并于 45、90 日龄在晨饲前采集瘤胃液, 测定瘤胃发酵指标、酶活力和纤维分解菌的量。结果表明: 45 和 90 日龄与对照组相比, 试验组总挥发性脂肪酸、丙酸、乙酸浓度显著提高($P < 0.05$); IB 和 IBFE 组氨态氮浓度显著降低($P < 0.05$); FE、IB 及 IBFE 3 组均显著增加犊牛瘤胃液羧甲基纤维素酶、滤纸酶、纤维二糖酶及木聚糖酶的活力($P < 0.05$), IBFE 较其他组增幅最大; FE、IB 及 IBFE 3 组均显著提高了犊牛瘤胃液产琥珀酸丝状杆菌、白色瘤胃球菌、黄色瘤胃球菌及溶纤维丁酸弧菌的量($P < 0.05$), IBFE 组增幅最大。综合以上结果分析, 6 g/d 异丁酸与 1.83 g/d 纤维分解酶对瘤胃发酵有促进作用, 二者混合添加效果更好。

关键词: 纤维分解酶; 异丁酸; 瘤胃发酵; 酶活力; 纤维分解菌

中图分类号: S816.7; S823

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2015)09-2841-08

犊牛瘤胃发育及功能的完善对犊牛的健康和生产性能有重要的作用^[1]。在瘤胃发酵中适当补充挥发性脂肪酸(VFA)对瘤胃发酵有至关重要的影响, 不仅为上皮组织和肌肉收缩提供能量, 而且直接影响薄壁细胞的增殖和分化。研究表明丁酸、乙酸和丙酸在一定程度上对瘤胃发酵有化学刺激作用^[2-3]。与丁酸和丙酸一样, 支链挥发性脂肪酸(BCVFA)包括异丁酸、异戊酸和 2-甲基丁酸都是瘤胃发酵的产物。体外试验发现补充 BCVFA 能够增强纤维素的发酵^[4]和干物质的消化。体内试验研究结果显示 BCVFA 可以改善瘤胃发育^[5-7]、瘤胃微生物酶的活力^[8-9]、纤维分解菌的数量^[10]与养分的消化^[11]。同时, 近年来人们对纤

维分解酶研究增多, 通过体外^[12]、半体外^[13]和体内试验^[14]得知添加纤维分解酶通过提高纤维素的分解率, 进而改善饲料效率、泌乳期奶牛的产奶量^[15]和肉牛的平均日增重^[14]。据了解, 关于犊牛饲料中同时添加纤维分解酶与异丁酸对犊牛瘤胃发酵的研究较少。因此, 本试验旨在研究纤维分解酶、异丁酸及其混合物对断奶前后犊牛瘤胃发酵指标、酶活力和纤维分解菌数量的影响, 为进一步研究犊牛断奶前后胃肠道发育奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验犊牛选择与分组

选取 30 日龄体重 $[(48.5 \pm 0.3) \text{ kg}]$ 近似、发

收稿日期: 2015-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272471); 山西省高校“131”领军人才项目(2013); 山西农业大学学术带头人项目(2012)

作者简介: 许倩倩(1992—), 女, 山西洪洞人, 硕士研究生, 从事反刍动物营养与饲料科学研究。E-mail: qq897839804@163.com

* 通信作者: 王 聪, 教授, 硕士生导师, E-mail: wangdx0321@163.com

育正常和体况良好的荷斯坦哺乳公犊 36 头,随机分为 4 组,每组 9 头。对照组饲喂基础饲粮,纤维分解酶组 (FE 组)、异丁酸组 (IB 组) 和复配组 (IBFE 组) 分别在基础饲粮中添加 1.83 g/d 纤维分解酶 (山东思诺拜特生物科技有限公司, 包含滤纸酶酶活力 160 U 和木聚糖酶酶活力 4 000 U)、6 g/d 异丁酸 (99%) 和 1.83 g/d 纤维分解酶与 6 g/d 异丁酸的混合物。犊牛于 60 日龄断奶,断奶后以苜蓿和混合精料 (精粗比 40:60) 为基础饲粮。分别于断奶前 15 天 (45 日龄) 和断奶后 30 天 (90 日龄) 从各组随机抽取 4 头,晨饲前进行采样。

表 1 奶、犊牛料和苜蓿干草的营养水平 (风干基础)

Table 1 Nutrient levels of milk, concentrate of calves and alfalfa hay (air-dry basis)			%
项目 Items ¹⁾	奶 Milk ²⁾	犊牛料 Concentrate of calves ³⁾	苜蓿干草 Dried alfalfa hay
干物质 Dry matter	12.86	94.32	91.21
代谢能 ME/(MJ/kg)	—	13.90	9.10
粗蛋白质 Crude protein	3.15	19.41	17.53
中性洗涤纤维 Neutral detergent fibre	—	25.01	52.84
酸性洗涤纤维 Acid detergent fibre	—	13.49	39.86
钙 Calcium	—	0.71	1.35
磷 Phosphorus	—	0.68	0.31

¹⁾ 代谢能根据 NRC (2001) 制定, 为计算值, 其余为实测值。ME was calculated according to NRC (2001), and was a calculated value, while the and others were measured values.

²⁾ “—” 表示未测定。‘—’ meant undetected.

³⁾ 每千克犊牛料含 One kg of diet for calves contained the following: Fe 100 mg, Mn 60 mg, Cu 16 mg, Zn 60 mg, Co 0.2 mg, I 0.6 mg, Se 0.6 mg, VA 10 000 IU, VD 2 000 IU, VE 75 IU。

1.3 样品的采集、处理与测定

1.3.1 样品采集

分别从 45 和 90 日龄各组随机抽取 4 头犊牛, 于晨饲前利用负压装置及胃管采集瘤胃液^[16], 4 层纱布过滤, -20 ℃ 保存。

1.3.2 瘤胃液 pH、氨态氮 (NH₃-N) 和 VFA 浓度的测定

取瘤胃液解冻, 用 PHS-2C 型酸度计测定瘤胃液 pH, 用靛酚比色法^[17] 测定 NH₃-N 浓度。采用气相色谱仪测定 VFA 浓度, 取瘤胃液 5 mL, 加入 1 mL 25% 偏磷酸溶液, 混合均匀, 冰水浴 30 min, 10 000×g 离心 10 min, 取上清液, 用 GC-102-AF 气相色谱仪测定 VFA 浓度, 色谱柱为 φ4 (外) ×2 m 玻璃柱, 固定相 PEG-20M, 涂布浓度为 3%, 载体为 Chromsorb WAW DMCS; 色谱柱温 160 ℃, 气化室温度 200 ℃; 空气压力 0.12 MPa,

1.2 试验饲粮及饲养管理

断奶前的犊牛采取单栏饲养, 每日 07:00、12:00 和 18:00 饲喂, 每次饲喂 2 kg 奶, 纤维分解酶与异丁酸添加于奶中饲喂, 自由饮水。断奶后的犊牛以苜蓿干草和犊牛料 (熟玉米 65%, 发酵豆粕 32%, 矿维 3%) 为基础饲粮, 每日 07:00、12:00 和 18:00 饲喂精料 1.0 kg, 苜蓿干草 1.5 kg, 先精后粗, 纤维分解酶与异丁酸添加于精料中饲喂, 自由饮水。奶、犊牛料和苜蓿干草的营养水平见表 1。

氢气压力 0.06 MPa, 氮气压力 0.08 MPa; 载气 (载气) 流速 30 mL/min, 氢气流速 60 mL/min, 空气流速 360 mL/min; 灵敏度 10⁻¹⁰, 衰减 16; 进样量 1 μL。采用外标法定量分析测定 VFA 的浓度。

1.3.3 瘤胃液纤维分解酶活力的测定

瘤胃液滤纸酶、羧甲基纤维素酶、木聚糖、纤维二糖酶、淀粉酶和蛋白酶的活力按照 Agarwal 等^[18] 的方法进行测定。滤纸酶活力定义为 1 g 酶水解反应中每分钟生成 1 μmol 葡萄糖的酶量。羧甲基纤维素酶活力定义为一定条件下每分钟从 1 g 羧甲基纤维素钠中降解 1 μmol 还原糖所需的酶量。木聚糖酶活力定义为一定条件下每分钟催化分解 1 g 木聚糖产生 1 μmol 木糖所需的酶量。纤维二糖酶活力定义为 1 g 酶水解反应中每分钟生成 1 μmol 还原糖所需的酶量。淀粉酶活力定义为每分钟水解 1 mL 淀粉生成 1 μmol 还原糖所需的

酶量。蛋白酶活力定义为 1 mL 液体酶一定条件下每分钟水解酪素产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量。

1.3.4 瘤胃液纤维分解菌定量分析

采用珠磨-溴化十六烷三甲基铵(CTAB)法提取瘤胃微生物 DNA^[19],由 BeckmanDU-7500 分光光度计在 260 nm 下测定 DNA 浓度。在 Gen-Bank 上查找产琥珀酸丝状杆菌(*F. succinogenes*)、黄色瘤胃球菌(*R. flavefaciens*)、白色瘤胃球菌(*R. albus*)和溶纤维丁酸弧菌(*B. fibrisolvens*)的 16S rDNA 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,交由北京六合华大基因科技股份

有限公司合成,引物序列信息见表 2。采用 Chromo 4™型荧光定量 PCR 仪进行定量分析。PCR 反应体系 20 μL:10 μL SYBR Premix Taq™ II,0.8 μL PCR Forward Primer,0.8 μL PCR Reverse Primer,0.4 μL ROX Reference Dye(50×),2.0 μL DNA 模板,6.0 μL dH₂O。反应条件:95 ℃,3 min;95 ℃,30 s;60 ℃,34 s;95 ℃,45 个循环,15 s;60 ℃,1 min;95 ℃,15 s。随后以 0.1 ℃/s 变化速度从 65 ℃升至 95 ℃,每隔 3 s 记录 1 次荧光值,获得循环阈值(CT)。

表 2 引物序列信息
Table 2 Primer sequence information

纤维分解菌 Cellulolytic bacteria	产物大小 Product size/bp	引物序列 Sequence of primer (5'—3')	退火温度 Annealing temperature/℃
白色瘤胃球菌 <i>R. albus</i>	176	F:CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG R:CCTCCTTGCGGTTAGAACA	60
黄色瘤胃球菌 <i>R. flavefaciens</i>	173	F:ATTGTCCCAGTTCAGATTGC R:GGCGTCCTCATTGCTGTTAG	60
产琥珀酸丝状杆菌 <i>F. succinogenes</i>	204	F:GGCGGGATTGAATGTACCTTGAGA R:TCCGCCTGCCCCTGAACTATC	60
溶纤维丁酸弧菌 <i>B. fibrisolvens</i>	136	F:TAACATGAGAGTTTGATCCTGGGCTC R:CGTTACTCACCCGTCGCCG	60

1.4 数据处理与分析

试验数据采用 SPSS 17.0 统计软件中的 ANOVA 程序进行方差分析和 Duncan 氏法多重比较。

2 结果与分析

2.1 纤维分解酶和异丁酸对犊牛瘤胃发酵指标的影响

由表 3 可知,与对照组相比,45 和 90 日龄 IB 及 IBFE 组瘤胃液 pH 和 NH₃-N 浓度及丙酸/总挥发性脂肪酸均显著降低($P<0.05$),试验组 TVFA、乙酸、丙酸浓度及乙酸/总挥发性脂肪酸均显著提高($P<0.05$)。IBFE 较其他组显著降低了 NH₃-N 浓度($P<0.05$),显著提高了 TVFA、乙酸、异丁酸浓度及乙酸/丙酸($P<0.05$)。45 日龄犊牛瘤胃液 pH 及丙酸/总挥发性脂肪酸显著高于 90 日龄($P<0.05$),而瘤胃液 TVFA、乙酸、丙酸浓度,乙酸/总挥发性脂肪酸,乙酸/丙酸及 NH₃-N 浓度均显著低于 90 日龄($P<0.05$)。

2.2 纤维分解酶和异丁酸对犊牛瘤胃液纤维分解酶活力的影响

由表 4 可知,与对照组相比,45 和 90 日龄 FE、IB 及 IBFE 3 组均显著增加犊牛瘤胃液羧甲基纤维素酶、滤纸酶、纤维二糖酶及木聚糖酶的活力($P<0.05$),IBFE 较其他组增幅最大。45 日龄犊牛瘤胃液羧甲基纤维素酶、滤纸酶酶、纤维二糖酶、蛋白酶、淀粉酶及木聚糖酶的活力显著低于 90 日龄($P<0.05$);对照组与 FE 组断奶前犊牛瘤胃液果胶酶活力显著高于断奶后($P<0.05$)。

2.3 纤维分解酶和异丁酸对犊牛瘤胃液纤维分解菌量的影响

由表 5 可知,与对照组相比,45 和 90 日龄 FE、IB 及 IBFE 3 组均显著提高了犊牛瘤胃液产琥珀酸丝状杆菌、白色瘤胃球菌、黄色瘤胃球菌及溶纤维丁酸弧菌的量($P<0.05$),IBFE 组增幅最大。45 日龄犊牛瘤胃白色瘤胃球菌、黄色瘤胃球菌的量显著低于 90 日龄($P<0.05$)。

表 3 纤维分解酶和异丁酸对犊牛瘤胃发酵指标的影响

Table 3 Effects of fibrolytic enzymes and isobutyrate on ruminal fermentation indices in calves

项目 Items	组别 Groups				标准误 SEM	P 值 P-value
	对照 Control	FE	IB	IBFE		
pH						
45 日龄 45 days of age	7.42 ^{aA}	7.15 ^{bA}	6.81 ^{cA}	6.51 ^{dA}	0.078	0.021
90 日龄 90 days of age	6.94 ^{aB}	6.76 ^{aB}	6.40 ^{bB}	6.36 ^{bB}	0.109	0.033
总挥发性脂肪酸 TVFA/(mmol/L)						
45 日龄 45 days of age	79.51 ^{cB}	90.04 ^{bB}	91.32 ^{bB}	102.66 ^{aB}	2.746	0.001
90 日龄 90 days of age	99.81 ^{dA}	114.56 ^{cA}	138.77 ^{bA}	156.76 ^{aA}	6.616	0.001
乙酸 Acetate/(mmol/L)						
45 日龄 45 days of age	43.32 ^{cB}	49.19 ^{bB}	52.08 ^{bB}	60.92 ^{aB}	1.919	0.001
90 日龄 90 days of age	63.35 ^{dA}	73.88 ^{cA}	95.92 ^{bA}	106.35 ^{aA}	5.164	0.002
丙酸 Propionate/(mmol/L)						
45 日龄 45 days of age	21.66 ^{bB}	24.43 ^{aB}	23.01 ^{aB}	25.10 ^{aB}	0.455	0.001
90 日龄 90 days of age	25.14 ^{cA}	28.37 ^{bA}	29.31 ^{bA}	34.90 ^{aA}	1.067	0.039
丁酸 Butyrate/(mmol/L)						
45 日龄 45 days of age	10.30 ^b	11.46 ^{ab}	11.27 ^{ab}	11.71 ^a	0.221	0.001
90 日龄 90 days of age	8.35 ^c	8.46 ^c	9.25 ^b	10.71 ^a	0.296	0.001
异丁酸 Isobutyrate/(mmol/L)						
45 日龄 45 days of age	1.42 ^b	1.45 ^b	1.53 ^b	1.73 ^a	0.039	0.037
90 日龄 90 days of age	0.93 ^c	1.00 ^b	1.28 ^a	1.31 ^a	0.051	0.041
其他挥发性脂肪酸 Other VFAs/(mmol/L)						
45 日龄 45 days of age	2.81 ^{bA}	3.51 ^{aA}	4.42 ^{aA}	3.19 ^{aA}	0.022	0.013
90 日龄 90 days of age	2.04 ^{cB}	2.83 ^{bB}	3.02 ^{aB}	3.47 ^{aB}	0.016	0.028
乙酸/总挥发性脂肪酸 Acetate/TVFA						
45 日龄 45 days of age	0.545 ^{cB}	0.546 ^{cB}	0.570 ^{bB}	0.593 ^{aB}	0.007	0.025
90 日龄 90 days of age	0.635 ^{dA}	0.645 ^{cA}	0.691 ^{aA}	0.678 ^{bA}	0.009	0.031
丙酸/总挥发性脂肪酸 Propionate/TVFA						
45 日龄 45 days of age	0.272 ^{aA}	0.271 ^{aA}	0.252 ^{bA}	0.245 ^{bA}	0.005	0.032
90 日龄 90 days of age	0.252 ^{aB}	0.247 ^{bB}	0.211 ^{cB}	0.223 ^{bcB}	0.006	0.029
乙酸/丙酸 Acetate/propionate						
45 日龄 45 days of age	2.00 ^{bB}	2.01 ^{bB}	2.36 ^{aB}	2.42 ^{aB}	0.060	0.046
90 日龄 90 days of age	2.52 ^{bA}	2.60 ^{bA}	3.27 ^{aA}	3.05 ^{aA}	0.006	0.024
氨态氮 NH ₃ -N/(μg/mL)						
45 日龄 45 days of age	24.36 ^{aB}	20.64 ^{bB}	19.74 ^{bB}	11.50 ^{cB}	1.435	0.021
90 日龄 90 days of age	35.38 ^{aA}	34.87 ^{abA}	33.18 ^{bA}	28.83 ^{cA}	0.795	0.011

其他酸包含戊酸和异戊酸。同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 同列数据肩标不同大写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下表同。

Other VFAs contained valerate and isovalerate. In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$); in the same column, values with different capital letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same as below.

3 讨 论

3.1 纤维分解酶和异丁酸对犊牛瘤胃发酵指标的影响

犊牛饲料中添加异丁酸和纤维分解酶有效改善了瘤胃发酵,具体表现为乙酸/丙酸和 TVFA 浓

度的增加。乙酸/丙酸的增加主要是由于在犊牛饲料中添加纤维分解酶与异丁酸后乙酸/总挥发性脂肪酸迅速增加且乙酸/丙酸未增加或增加缓慢导致的。研究发现,饲料中添加纤维分解酶能够改善瘤胃发酵,增加 TVFA 和乙酸浓度,乙酸/丙酸也有所增长^[10]。犊牛饲料中添加异丁酸增加

瘤胃液乙酸的产量,这与早期饲喂试验的研究结果一致^[20]。IB组瘤胃液 pH 和 NH₃-N 浓度降低,TVFA 浓度增加,这与 Liu 等^[11]的研究结果一致,研究表明随着异丁酸添加量的增加 TVFA 浓度呈直线上升趋势。丁酸是刺激瘤胃发酵的主要影响因素^[2-3],试验中添加纤维分解酶刺激丁酸的产生

进而刺激瘤胃的发育并刺激纤维分解菌的产生。纤维分解菌中的氮主要来源于 NH₃-N^[21],FE、IB 及 IBFE 3 组瘤胃液 NH₃-N 浓度降低表明有更多的氮转变为微生物蛋白。体内外发酵试验表明随纤维素酶的增加 NH₃-N 浓度减少,微生物蛋白质的合成增加^[7,11]。

表 4 纤维分解酶和异丁酸对犊牛瘤胃液纤维分解酶活力的影响

Table 4 Effects of fibrolytic enzymes and isobutyrate on ruminal fluid fibrolytic enzyme activities in calves						
项目	组别 Groups				标准误	P 值
Items	对照 Control	FE	IB	IBFE	SEM	P-value
羧甲基纤维素酶 CMCase/[μmol/(g · min)]						
45 日龄 45 days of age	0.027 ^{bB}	0.035 ^{aB}	0.036 ^{aB}	0.038 ^{aB}	0.001	0.016
90 日龄 90 days of age	0.076 ^{cA}	0.101 ^{bA}	0.100 ^{bA}	0.126 ^{aA}	0.007	0.003
滤纸酶 Filter paper enzyme/[μmol/(g · min)]						
45 日龄 45 days of age	0.027 ^{bB}	0.038 ^{aB}	0.041 ^{aB}	0.042 ^{aB}	0.002	0.001
90 日龄 90 days of age	0.062 ^{cA}	0.118 ^{bA}	0.130 ^{aA}	0.131 ^{aA}	0.009	0.001
纤维二糖酶 Cellobiase/[μmol/(g · min)]						
45 日龄 45 days of age	0.028 ^{bB}	0.035 ^{aB}	0.036 ^{aB}	0.040 ^{aB}	0.001	0.030
90 日龄 90 days of age	0.067 ^{bA}	0.089 ^{aA}	0.097 ^{aA}	0.102 ^{aA}	0.005	0.014
木聚糖酶 Xylanase/[μmol/(g · min)]						
45 日龄 45 days of age	0.054 ^{cB}	0.120 ^{bB}	0.126 ^{bB}	0.136 ^{aB}	0.010	0.001
90 日龄 90 days of age	0.147 ^{cA}	0.162 ^{bA}	0.160 ^{bA}	0.179 ^{aA}	0.004	0.001
蛋白酶 Protease/[μg/(mL · min)]						
45 日龄 45 days of age	2.176 ^B	2.372 ^B	2.075 ^B	2.271 ^B	0.141	0.001
90 日龄 90 days of age	4.729 ^A	4.796 ^A	4.922 ^A	5.018 ^A	0.069	0.003
淀粉酶 Amylase/[g/(mL · min)]						
45 日龄 45 days of age	0.037 ^B	0.041 ^B	0.045 ^B	0.047 ^B	0.002	0.001
90 日龄 90 days of age	0.063 ^A	0.071 ^A	0.076 ^A	0.077 ^A	0.003	0.001
果胶酶 Pectase/[μmol/(g · min)]						
45 日龄 45 days of age	0.221 ^A	0.237 ^A	0.239 ^B	0.237 ^B	0.003	0.008
90 日龄 90 days of age	0.207 ^{cB}	0.230 ^{bB}	0.244 ^{bA}	0.274 ^{aA}	0.006	0.014

表 5 纤维分解酶和异丁酸对犊牛瘤胃液纤维分解菌量的影响

项目 Items	组别 Groups				标准误 SEM	P 值 P-value
	对照 Control	FE	IB	IBFE		
45 日龄 45 days of age	0.228 ^c	0.278 ^b	0.273 ^{bB}	0.339 ^{aB}	0.016	0.033
90 日龄 90 days of age	0.229 ^c	0.295 ^b	0.301 ^{bA}	0.371 ^{aA}	0.015	0.002
白色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus albus</i>						
45 日龄 45 days of age	0.046 ^{bB}	0.070 ^{aB}	0.080 ^{aB}	0.084 ^{aB}	0.004	0.001
90 日龄 90 days of age	0.142 ^{cA}	0.164 ^{bA}	0.170 ^{bA}	0.185 ^{aA}	0.016	0.035
黄色瘤胃球菌 <i>Ruminococcus flavefaciens</i>						
45 日龄 45 days of age	0.055 ^{bB}	0.067 ^{aB}	0.065 ^{aB}	0.079 ^{aB}	0.004	0.047
90 日龄 90 days of age	0.120 ^{cA}	0.145 ^{bA}	0.169 ^{bA}	0.210 ^{aA}	0.012	0.039

续表 5

项目	组别 Groups				标准误	P 值
Items	对照 Control	FE	IB	IBFE	SEM	P-value
溶纤维丁酸弧菌 <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>						
45 日龄 45 days of age	0.200 ^c	0.266 ^b	0.257 ^b	0.320 ^a	0.011	0.001
90 日龄 90 days of age	0.220 ^c	0.261 ^b	0.259 ^b	0.320 ^a	0.009	0.001

3.2 纤维分解酶和异丁酸对犊牛瘤胃液纤维分解酶活力的影响

在犊牛饲料中添加 FE、IB 及 IBFE 增强了羧甲基纤维素酶、纤维二糖酶、木聚糖酶和果胶酶的活力,同时微生物活力也有所增强。羧甲基纤维素酶、纤维二糖酶、木聚糖酶和果胶酶的活力的增强可归结于纤维分解酶添加后 VFA 浓度的增加。Liu 等^[9]研究发现在犊牛饲料中添加异戊酸导致羧甲基纤维素酶与木聚糖酶活力呈直线增长。添加纤维分解酶^[22]或异丁酸^[8]改善了瘤胃消化率与中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、半纤维素和纤维素的消化率,刺激了羧甲基纤维素酶、纤维二糖酶和木聚糖酶的产生,进而提高了酶的活力。IB 组瘤胃液淀粉酶和蛋白酶的活力与对照组相比没有显著差异,这与 Liu 等^[9]人的研究结果一致。FE 与 IBFE 组瘤胃液淀粉酶和蛋白酶的活力与对照组相比也没有显著差异。断奶前犊牛果胶酶活力高于断奶后的原因有待进一步研究验证。

3.3 纤维分解酶和异丁酸对犊牛瘤胃液纤维分解菌量的影响

饲养试验中 FE、IB 及 IBFE 组瘤胃液中产琥珀酸珀丝状杆菌、白色瘤胃球菌、黄色瘤胃球菌和溶纤维丁酸弧菌的量增加,有研究表明添加纤维素酶后产琥珀酸丝状杆菌数量增加^[10]。Liu 等^[9]研究发现随着肉牛饲料中异位酸添加量的增加瘤胃主要纤维分解菌呈直线增长。添加异丁酸或纤维分解菌提高了瘤胃干物质的消化率^[22],IBFE 组的主要纤维分解菌量比 IB 组和 FE 组高,可能是异丁酸与纤维分解酶复合使用效果更好。断奶后主要纤维分解菌数量高于断奶后,这可能是由于断奶前后饲喂物质的不同导致的^[23],增加饲料纤维含量能够增加瘤胃液纤维分解菌与半纤维分解菌的活力^[24]。然而,Nsereko 等^[25]研究指出在泌乳奶牛饲料中添加纤维分解酶增加了瘤胃内分解纤维素和半纤维素的细菌量,但是对纤维分解菌

的量没有影响。Colombatto 等^[26]研究表明酶的增加会引起总活菌数的增加,但是对纤维分解菌数量没有影响。Mao 等^[10]研究发现添加纤维素酶对白色瘤胃液球菌和黄色瘤胃球菌的数量没有影响。这些研究结果不一致可能是因为添加酶的种类、动物的饲喂方式、酶的添加方法以及动物的生产水平不同导致的^[27]。

4 结 论

- ① 在断奶前后犊牛饲粮中添加 FE、IB 及 IBFE 能够增加瘤胃液的 TVFA 浓度并能转换瘤胃的发酵模式产生较多的乙酸。
- ② 瘤胃液 NH₃-N 浓度随着 FE、IB 及 IBFE 的添加而降低。
- ③ 随着添加 FE、IB 及 IBFE 的添加瘤胃液微生物酶活力也得到增强。
- ④ FE、IB 及 IBFE 的添加有效改善了瘤胃发酵和微生物酶活力,提高了纤维分解菌的量。
- ⑤ 添加 FE、IB 能够刺激瘤胃纤维分解菌,同时 IB 与 FE 在促进瘤胃液纤维分解菌增殖方面有协同作用。

参考文献:

[1] BALDWIN R L, MCLEOD K R, KLOTZ J L, et al. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and post-weaning ruminant [J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87: E55-E65.

[2] GÓRKA P, KOWALSKI Z M, PIETRZAK P, et al. Effect of method of delivery of sodium butyrate on rumen development in newborn calves [J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(11): 5578-5588.

[3] MENTSCHER J, LEISER R, MÜLLING C, et al. Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis [J]. Archiv für Tierernährung, 2001, 55(2): 85-102.

[4] KONE P, MACHADO P F, COOK R M. Effect of the combination of monensin and isoacids on rumen fer-

- mentation *in vitro* [J]. Journal of Dairy Science, 1989, 72(10): 2767–2771.
- [5] MISRA A K, THAKUR S S. Effects of dietary supplementation of sodium salt of isobutyric acid on ruminal fermentation and nutrient utilization in a wheat straw based low protein diet fed to crossbred cattle [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2001, 14(4): 479–484.
- [6] LIU Q, WANG C, HUANG Y X, et al. Effects of isobutyrate on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and digestibility in steers [J]. Archives of Animal Nutrition, 2008, 62(5): 377–388.
- [7] WANG C, LIU Q, PEI C X, et al. Effects of 2-methylbutyrate on rumen fermentation, ruminal enzyme activities, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers [J]. Livestock Science, 2012, 145(1/2/3): 160–166.
- [8] YANG C M J. Response of forage fiber degradation by ruminal microorganisms to branched-chain volatile fatty acids, amino acids, and dipeptides [J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85(5): 1183–1190.
- [9] LIU Q, WANG C, PEI C X, et al. Effects of isovalerate supplementation on microbial status and rumen enzyme profile in steers fed on corn stover based diet [J]. Livestock Science, 2014, 161: 60–68.
- [10] MAO H L, WU C H, WANG J K, et al. Synergistic effect of cellulase and xylanase on *in vitro* rumen fermentation and microbial population with rice straw as substrate [J]. Animal Nutrition and Feed Technology, 2013, 13: 477–487.
- [11] LIU Q, WANG C, HUANG Y X, et al. Effects of isovalerate on ruminal fermentation, urinary excretion of purine derivatives and digestibility in steers [J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2009, 93(6): 716–725.
- [12] KRUEGER N A, ADESOGAN A T, STAPLES C R, et al. Effect of method of applying fibrolytic enzymes or ammonia to Bermudagrass hay on feed intake, digestion, and growth of beef steers [J]. Journal of Animal Science, 2008, 86(4): 882–889.
- [13] LAMID M, PUSPANINGSIH N N T, MANGKOEDIHARDJO S. Addition of lignocellulolytic enzymes into rice straw improves *in vitro* rumen fermentation products [J]. Journal of Applied Environmental and Biological Sciences, 2013, 3(9): 166–171.
- [14] ROMERO J J, ZARATE M A, QUEIROZ O C M, et al. Fibrolytic enzyme and ammonia application effects on the nutritive value, intake, and digestion kinetics of bermudagrass hay in beef cattle [J]. Journal of Animal Science, 2013, 91(9): 4345–4356.
- [15] MOHAMED D E D A, BORHAMI B E, EL-SHZA-LY K A, et al. Effect of dietary supplementation with fibrolytic enzymes on the productive performance of early lactating dairy cows [J]. Journal of Agricultural Science, 2013, 5(6): 146–155.
- [16] JACOBSON D R, LINDAHL I L, MCNEILL J J, et al. Feedlot bloat studies. II. Physical factors involved in the etiology of frothy bloat [J]. Journal of Animal Science, 1957, 16: 515–524.
- [17] CHANEY A L, MARBACH E P. Modified reagents for determination of urea and ammonia [J]. Clinical Chemistry, 1962, 8(2): 130–132.
- [18] AGARWAL N, KAMRA D N, CHAUDHARY L C, et al. Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves fed on different microbial feed additives [J]. Letters in Applied Microbiology, 2002, 34(5): 329–336.
- [19] YU Z T, MORRISON M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples [J]. BioTechniques, 2004, 36(5): 808–812.
- [20] QUISPE M E, BARRADAS H, COOK R M. Effects of isoacids, urea and sulfur on ruminal fermentation in sheep fed pineapple tops [J]. Small Ruminant Research, 1991, 6(1/2): 49–54.
- [21] RUSSELL J B, O'CONNOR J D, FOX D G, et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets; I. Ruminal fermentation [J]. Journal of Animal Science, 1992, 70(11): 3551–3561.
- [22] SHOJAEIAN K, THAKUR S S. Effect of supplementing isobutyrate and fibrolytic enzymes on *in vitro* degradability of alkali treated wheat straw [J]. Indian Journal of Animal Nutrition, 2006, 23(4): 213–217.
- [23] LANE M A, BALDWIN R L, JESSE B W. Sheep rumen metabolic development in response to age and dietary treatments [J]. Journal of Animal Science, 2000, 78(7): 1990–1996.
- [24] MICHELLAND R J, COMBES S, MONTEILS V, et al. Rapid adaptation of the bacterial community in the growing rabbit caecum after a change in dietary fibre supply [J]. Animal, 2011, 5(11): 1761–1768.
- [25] NSEREKO V L, BEAUCHEMIN K A, MORGAVI D P, et al. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows [J]. Canadian Journal of Mi-

crobiology, 2002, 48(1):14-20.

- [26] COLOMBATTO D, HERVÁS G, YANG W Z, et al. Effects of enzyme supplementation of a total mixed ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high and low pH[J]. Journal of Animal

Science, 2003, 81(10):2617-2627.

- [27] BEAUCHEMIN K A, COLOMBATTO D, MORGAN V D P, et al. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants[J]. Journal of Animal Science, 2003, 81(2S):E37-E47.

Effects of Fibrolytic Enzymes and Isobutyrate on Enzyme Activities and Cellulolytic Bacteria Flora in Rumen Fluid in Calves

XU Qianqian HOU Ming WANG Cong* LIU Qiang ZHANG Yanli PEI Caixia
WANG Yongxin GUO Gang HUO Wenjie

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: The objective of this study was to evaluate the effects of dietary fibrolytic enzymes and isobutyrate supplementation on enzyme activities and cellulolytic bacteria flora in pre- and post-weaning calves. Thirty-six healthy Holstein male calves with 30 days of age and similar body weight [(48.5±0.3) kg] were selected and allocated randomly to four groups. All calves were weaned at 60 days of age. Calves in control group were fed milk/diet for calves+dried alfalfa hay, and those in experimental groups were supplemented with fibrolytic enzymes (160 U filter paper enzyme and 4 000 U xylanase, 1.83 g/d, FE group), isobutyrate (99%, 6 g/d, IB group) and their mixture (IBFE group), respectively. Rumen fluid was collected in the morning before feeding at 45 and 90 days of age for determining rumen fermentation indices, enzyme activities and cellulolytic bacteria amount. The results showed that at 45 and 90 days of age, compared with control group, the concentrations of total volatile fatty acid, propionic acid and acetic acid in experimental groups were significantly increased ($P<0.05$); the concentration of ammonia nitrogen in IB and IBFE groups was significantly reduced ($P<0.05$); the activities of carboxymethyl cellulase, xylanase, filter paper enzyme and cellobiase in experimental groups were significantly increased ($P<0.05$), and the increasing extends were the highest in IBFE group; the amount of *F. Succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens* and *B. fibrisolvens* in experimental groups was significantly increased ($P<0.05$), and the increasing extend was the highest in IBFE group. Base on above results, 6 g/d isobutyric acid and 1.83 g/d fibrolytic enzymes have promoting effects on rumen fermentation, and the better is their combination. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(9):2841-2848]

Key words: fibrolytic enzyme; isobutyrate; rumen fermentation; enzyme activity; cellulolytic bacteria