

发酵饲料桑粉对宁乡花猪抗氧化性能和肠道功能的影响

丁鹏¹ 丁亚南¹ 曾青华^{1,2} 李霞³ 宋泽和¹ 范志勇¹ 贺喜^{1*}

(1.湖南农业大学动物科学技术学院,饲料安全与高效利用教育部工程研究中心,湖南畜禽安全生产协同创新中心,长沙 410128;2.湖南楚沅香农业有限公司,长沙 410005;3.湖南省蚕桑科学研究所,长沙 410127)

摘要: 本试验旨在研究饲料添加发酵饲料桑粉对宁乡花猪其血清和肝脏抗氧化性能、肠道组织形态和肠道菌群的影响。选用平均体重为 30 kg 左右的宁乡花猪 90 头,随机分为 5 个组,每组 3 个重复(栏),每个重复 6 头猪。对照组饲喂基础饲料,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ组分别在基础饲料中添加 9%、12%、15% 饲料桑粉的全发酵料和 9% 饲料桑粉的未发酵料。试验分为 2 个阶段,中猪阶段(第 1~50 天)和大猪阶段(第 51~75 天)。结果表明:1)与对照组相比,Ⅲ组宁乡花猪中期血清总抗氧化能力(T-AOC)显著提高($P < 0.05$);饲喂添加饲料桑粉组宁乡花猪肝脏丙二醛(MDA)含量有下降的趋势($P > 0.05$),且随着饲料桑粉添加量的提高,下降愈为明显。2)与对照组相比,所有试验组宁乡花猪空肠绒毛高度显著降低($P < 0.05$);Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ组宁乡花猪空肠绒毛高度/隐窝深度(V/C)值显著降低($P < 0.05$);与Ⅳ组相比,Ⅰ组宁乡花猪十二指肠绒毛高度有升高的趋势($P > 0.05$),空肠和回肠 V/C 值显著提高($P < 0.05$)。3)对宁乡花猪回肠微生物进行 16S rDNA 测序发现:所有样品一共得到 496 489 条 Tags,平均每个样品 35 463 条,Tag 平均长度为 252 bp,共产生 257 个操作分类单位(OTU)。全发酵料组宁乡花猪回肠菌群 Alpha 多样性指数相比未发酵料组,OTU 和 Chao 指数有提高的趋势,但差异不显著($P > 0.05$);各组间香农(Shannon)指数和辛普森(Simpson)指数均无显著差异($P > 0.05$)。由此可知,饲料桑粉可有效提高宁乡花猪机体抗氧化性能并改善其肠道微生态环境;对饲料桑粉进行发酵处理后饲喂宁乡花猪可有效降低饲料桑粉对宁乡花猪肠道的负面影响。

关键词: 发酵饲料桑粉;宁乡花猪;抗氧化;肠道功能

中图分类号:S816

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2019)09-4303-11

近年来,桑资源的开发应用受到畜牧业的广泛关注,我国利用桑叶养蚕已有上千年的历史,现经过我国科研人员人工选育,培育出了新型抗逆性品种——饲料桑,该品种具有适应性强、产量高、营养丰富等特点,具有极大的开发潜力^[1]。研究表明,在商品育肥猪饲料中添加 10% 左右的饲料桑粉对其生长性能没有不良影响^[2];本课题组前期研究表明,在宁乡花猪饲料中添加 9% 发酵饲

料桑粉对宁乡花猪生长性能有一定的促进作用,发酵饲料桑粉添加量达到 12% 时亦无不良影响,且饲料桑含有多种活性成分,主要包括黄酮类(桑酮、桑酮醇)、甾类、生物碱等,黄酮类物质在肠道中可代谢成对雌马酚等益生物,可提高肠道中双歧杆菌和乳杆菌的数量^[3-4],且这些活性成分具有抗炎及抗氧化功能^[5-6]。但由于饲料桑含有单宁、植物凝集素等抗营养因子,且具有一定的涩

收稿日期:2019-01-02

基金项目:国家重点研发计划(2017YFD0500506);湖南省科技计划项目(2016NK2124);国家重点研发计划(2016YFD0501209);湖南农业大学“双一流”建设项目(SYL201802015)

作者简介:丁鹏(1993—),男,湖南常德人,博士研究生,研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail: 694041110@qq.com

*通信作者:贺喜,教授,博士生导师,E-mail: hexi111@126.com

味,大剂量添加至动物饲料中会导致适口性下降,畜禽采食量降低^[7],限制了饲料桑在饲料中的应用。研究发现,发酵工艺能有效降低或去除饲料桑中的抗营养因子,且能降解粗纤维和大分子蛋白质等物质,提高其饲用价值^[8-9]。宁乡花猪作为中国四大名猪品种之一,具有耐粗饲、肉质鲜嫩的优势,但其存在瘦肉率低、肥膘厚等缺点。为了更好地利用饲料桑资源,本试验旨在利用发酵工艺改善饲料桑粉品质后饲喂地方品种宁乡花猪,探讨饲料桑粉对宁乡花猪血清及肝脏抗氧化性能、肠道组织形态和肠道菌群的影响,为饲料桑在畜牧生产中的应用提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

饲料桑粉由湖南省蚕桑科学研究所提供,经实验室检测营养成分含量为:粗蛋白质 22.96%、

粗脂肪 6.26%、粗纤维 9.18%、粗灰分 13.90%、钙 4.37%和磷 0.46%。添加饲料桑粉的发酵试验组采用全发酵方式(将不同比例的饲料桑粉添加至饲料中后,对其进行发酵处理),将乳酸菌、酵母菌和枯草芽孢杆菌按 2:1:1 的比例制成混合菌种,活菌数 $\geq 3 \times 10^9$ CFU/g,进行固态发酵处理。发酵设备及试验饲料由湖南楚沅香农业有限公司提供。

1.2 试验设计

选取 90 头平均体重为 30 kg 左右的宁乡花猪,随机分为 5 个组,每组 3 个重复(栏),每个重复 6 头猪。对照组饲喂基础饲料,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ组分别饲喂添加 9%、12%、15%饲料桑粉的全发酵料和 9%饲料桑粉的未发酵料。试验于 2016 年 7~9 月在湖南宁乡大龙畜牧科技有限公司猪场进行,试验分为 2 个阶段,中猪阶段(试验期第 1~50 天)和大猪阶段(试验期第 51~75 天)。饲料组成及营养水平见表 1 和表 2。

表 1 第 1~50 天饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the diets from 1 to 50 days (air-dry basis)

%

项目 Items	组别 Groups				
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	对照 Control
原料 Ingredients					
玉米 Corn	65.00	65.00	65.00	65.00	65.00
豆粕 Soybean meal	15.00	13.00	11.00	15.00	17.00
小麦麸 Wheat bran	7.00	6.00	5.00	7.00	14.00
磷酸氢钙 CaHPO ₄	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
石粉 Limestone	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22
饲料桑粉 Forage mulberry powder	9.00	12.00	15.00	9.00	
预混料 Premix ¹⁾	2.66	2.66	2.66	2.66	2.66
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels ²⁾					
消化能 DE/(MJ/kg)	12.52	12.38	12.24	12.52	12.88
粗蛋白质 CP	13.85	13.69	13.52	13.85	14.41
钙 Ca	0.69	0.75	0.81	0.69	0.50
总磷 TP	0.37	0.36	0.34	0.37	0.43
赖氨酸 Lys	0.47	0.44	0.41	0.47	0.57
蛋氨酸 Met	0.17	0.16	0.15	0.17	0.19

¹⁾ 预混料为每千克饲料提供 The premix provided the following per kg of the diets: Fe 66 mg, Cu 6 mg, Zn 54 mg, Mn 15 mg, I 0.24 mg, Se 0.18 mg, VA 18 000 IU, VD 35 000 IU, VE 35 IU, VK 5 mg, VB₁ 5 mg, VB₂ 10 mg, VB₁₂ 35 μg, 烟酸 nicotinic acid 40 mg, 泛酸 pantothenic acid 20 mg, 叶酸 folic acid 1.5 mg。表 2 同 The same as Table 2。

²⁾ 营养水平均为计算值,表 2 同。Nutrient levels were all calculated values. The same as Table 2。

表2 第51~75天饲粮组成及营养水平(风干基础)

Table 2 Composition and nutrient levels of the diets from days 51 to 75 (air-dry basis)

%

项目 Items	组别 Groups				
	I	II	III	IV	对照 Control
原料 Ingredients					
玉米 Corn	67.00	67.00	67.00	67.00	67.00
豆粕 Soybean meal	9.00	8.00	7.00	9.00	11.00
小麦麸 Wheat bran	11.00	9.00	7.00	11.00	18.00
石粉 Limestone	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
饲料桑粉 Forage mulberry powder	9.00	12.00	15.00	9.00	
预混料 Premix ¹⁾	2.80	2.80	2.80	2.80	2.80
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels ²⁾					
消化能 DE/(MJ/kg)	12.34	12.21	12.07	12.34	12.71
粗蛋白质 CP	12.45	12.29	12.13	12.45	12.67
钙 Ca	0.68	0.75	0.81	0.68	0.49
总磷 TP	0.36	0.34	0.33	0.36	0.42
赖氨酸 Lys	0.37	0.34	0.31	0.37	0.45
蛋氨酸 Met	0.15	0.14	0.13	0.15	0.17

1.3 饲养管理与采样

根据猪场常规程序进行饲养管理。预试期3 d,自由采食、饮水。试验期的第50天,空腹12 h后,各重复(栏)随机选取1头试验猪进行前腔静脉采集血液(10 mL×2),3 000 r/min离心10 min后收集血清,-20 ℃冻存待测;试验期第75天时,各重复(栏)随机选取1头试验猪进行屠宰,采集血液制备血清待测。试验结束后进行屠宰试验,称取0.1 g左右肝脏组织样品,加入9倍体积的生理盐水后使用匀浆机制成10%的组织匀浆液,再将其在4 ℃下3 000 r/min离心10 min,取上清液待用;分离肠道,收集回肠食糜,封装在5 mL塑料离心管内,-80 ℃冻存,用于回肠微生物测定;将十二指肠、空肠、回肠内容物清除干净后,再用生理盐水冲洗肠道,分别剪取各肠段2 cm置于甲醛固定液中,用于肠道组织形态测定。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 血清抗氧化指标

测定2个阶段(第50天和第75天)血清中丙二醛(MDA)含量、总超氧化物歧化酶(T-SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性以及总抗氧化能力(T-AOC)。测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,并按照试剂盒说明书进行指标测定。

1.4.2 肝脏抗氧化指标

测定肝脏中MDA含量、T-SOD和GSH-Px活性以及T-AOC。测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,并按照试剂盒说明书进行指标测定。

1.4.3 肠道组织形态

制作肠道组织切片,观察肠道组织结构,具体测量十二指肠、空肠、回肠的绒毛高度和隐窝深度,并计算绒毛高度与隐窝深度比(V/C)。

1.4.4 肠道菌群

利用粪便基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司),按试剂盒说明书提取试验猪回肠食糜DNA。对DNA样品进行检测,检测合格的样品构建文库委托华大基因完成,内容包括:回收目的Amplicon片段,用T4 DNA聚合酶、Klenow DNA聚合酶和T4多核苷酸激酶(PNK)将打断形成的黏性末端修复成平末端,再通过3'端加碱基“A”,使得DNA片段能与3'端带有“T”碱基的特殊接头连接;或者设计合成含有测序接头的双Index融合引物,以基因组DNA为模板,进行融合引物PCR,磁珠筛选目的Amplicon片段,最后,用合格的文库进行cluster制备和测序。数据经过数据过滤,滤除低质量的reads,剩余高质量的clean data方可用于后期分析;通过reads之间的overlap关系将reads拼接成Tags;在给定的相似度

下将 Tags 聚成操作分类单位 (OTU), 然后通过 OTU 与数据库比对, 对 OTU 进行物种注释; 基于 OTU 和物种注释结果进行样品物种复杂度分析以及组间物种差异分析。

1.5 数据处理与统计分析

采用 Excel 2007 和 SPSS 20.0 软件对数据进行整理, 数据以平均值±标准差表示, 所有组间进行方差分析, 添加 9% 饲料桑粉全发酵料组与添加 9% 饲料桑粉未发酵料组进行 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2 结果

2.1 发酵饲料桑粉对宁乡花猪血清抗氧化指标的影响

由表 3 可知, 相对对照组, 添加 15% 饲料桑粉发酵料组 (Ⅲ组) 宁乡花猪中期血清 T-AOC 提高了 27.6%, 差异显著 ($P < 0.05$); 其余各组间各阶段宁乡花猪血清 MDA 含量、T-SOD 和 GSH-Px 活性及 T-AOC 均无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 3 发酵饲料桑粉对宁乡花猪血清抗氧化指标的影响

Table 3 Effects of fermented forage mulberry powder on serum antioxidant indices of Ningxiang pigs

项目 Items	组别 Groups					P 值 P-value	
	I	II	III	IV	对照 Control	方差分析 ANOVA	t 检验 t test
中期 Metaphase							
丙二醛 MDA/(nmol/mL)	2.53±0.20	2.48±0.27	2.57±0.06	2.70±0.15	2.81±0.60	0.70	0.30
总超氧化物歧化酶 T-SOD/(U/mL)	69.14±3.54	72.95±9.18	73.43±10.22	67.72±10.9	68.53±3.39	0.86	0.84
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/mL)	387.96±29.54	414.54±41.73	430.48±5.47	419.71±11.88	396.48±5.26	0.25	0.16
总抗氧化能力 T-AOC/(U/mL)	2.59±0.11 ^b	2.65±0.19 ^b	3.19±0.47 ^a	2.71±0.15 ^b	2.50±0.15 ^b	0.05	0.34
末期 Telophase							
丙二醛 MDA/(nmol/mL)	2.57±0.41	2.54±0.10	2.54±0.11	2.67±0.11	2.83±0.51	0.74	0.71
总超氧化物歧化酶 T-SOD/(U/mL)	68.20±2.73	72.93±3.12	71.30±5.24	70.72±2.19	66.18±3.30	0.21	0.28
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-PX/(U/mL)	393.74±26.34	425.12±6.77	426.41±39.62	398.21±18.71	396.09±21.95	0.34	0.82
总抗氧化能力 T-AOC/(U/mL)	2.64±0.07	2.67±0.10	2.69±0.19	2.64±0.05	2.57±0.11	0.77	0.90

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。表 4、表 5 和表 8 同。

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts means no significant difference ($P > 0.05$), while with different letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$). The same as Table 4, Table 5 and Table 8.

2.2 发酵饲料桑粉对宁乡花猪肝脏抗氧化指标的影响

由表 4 可知, 相对对照组, 添加饲料桑粉组宁乡花猪肝脏 MDA 含量有所降低, 肝脏 T-SOD 和 GSH-Px 活性有所升高, 但差异均不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 发酵饲料桑粉对宁乡花猪肠道组织形态的影响

肠道组织形态切片见图 1。由表 5 可知, 与添加 9% 饲料桑粉未发酵料组 (IV 组) 相比, 添加 9%

饲料桑粉全发酵料组宁乡花猪十二指肠绒毛高度显著升高 ($P < 0.05$); 与对照组相比, 添加 9%、12%、15% 饲料桑粉全发酵料组及 9% 饲料桑粉未发酵料组宁乡花猪空肠绒毛高度分别降低了 20.18%、23.94%、29.37% 和 22.05%, 差异显著 ($P < 0.05$); 添加 12%、15% 饲料桑粉全发酵料组及 9% 饲料桑粉未发酵料组宁乡花猪空肠 V/C 值分别降低了 16.45%、26.11% 和 17.75%, 差异显著 ($P < 0.05$); 与添加 9% 饲料桑粉未发酵料组相比, 添加 9% 饲料桑粉全发酵料组宁乡花猪空肠 V/C

值提高了 18.10%, 差异显著 ($P < 0.05$); 与添加 9% 饲料桑粉未发酵料组相比, 添加 9% 饲料桑粉全发酵料组宁乡花猪回肠 V/C 值提高了 19.68%, 差异

显著 ($P < 0.05$)。其余各肠段肠道组织形态指标在各组间均无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 4 发酵饲料桑粉对宁乡花猪肝脏抗氧化指标的影响

Table 4 Effects of fermented forage mulberry powder on liver antioxidant indices of Ningxiang pigs

项目 Items	组别 Groups					P 值 P-value	
	I	II	III	IV	对照 Control	方差分析 ANOVA	t 检验 t test
丙二醛 MDA/(nmol/mg)	2.47±0.68	2.44±0.33	2.06±0.27	2.36±0.16	2.83±0.35	0.29	0.80
总超氧化物歧化酶 T-SOD/(U/mg)	94.25±5.82	92.43±2.62	99.52±3.81	94.89±1.47	91.40±8.73	0.41	0.86
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/mg)	382.02±13.46	384.28±14.87	384.41±13.77	384.70±10.93	357.00±22.74	0.21	0.80
总抗氧化能力 T-AOC/(U/mg)	0.82±0.11	0.86±0.10	1.06±0.44	0.76±0.10	0.81±0.11	0.52	0.57

表 5 发酵饲料桑粉对宁乡花猪肠道组织形态的影响

Table 5 Effects of fermented forage mulberry powder on intestinal tissue morphology of Ningxiang pigs

项目 Items	组别 Groups					P 值 P-value		
	I	II	III	IV	对照 Control	方差分析 ANOVA	t 检验 t test	
十二指肠 Duodenum	绒毛高度 Villus height/ μm	700.11±81.80	613.84±10.29	567.88±44.18	544.12±62.53	657.60±113.26	0.12	0.06
	隐窝深度 Crypt depth/ μm	147.88±33.35	170.02±7.18	176.37±9.43	164.38±23.67	145.26±12.21	0.29	0.52
	绒毛高度/隐窝深度 V/C	4.96±1.63	3.61±0.13	3.23±0.37	3.32±0.23	4.53±0.66	0.09	0.16
空肠 Jejunum	绒毛高度 Villus height/ μm	520.18±52.76 ^b	495.66±30.94 ^b	460.30±14.20 ^b	507.98±83.40 ^b	651.66±78.34 ^a	0.02	0.84
	隐窝深度 Crypt depth/ μm	139.58±5.67	155.05±11.23	163.03±9.55	160.86±14.47	169.68±12.84	0.07	0.08
	绒毛高度/隐窝深度 V/C	3.72±0.23 ^a	3.20±0.08 ^b	2.83±0.09 ^b	3.15±0.27 ^b	3.83±0.30 ^a	<0.01	0.05
回肠 Ileum	绒毛高度 Villus height/ μm	540.35±64.57	514.41±71.62	552.33±109.87	553.30±100.00	527.73±66.25	0.97	0.86
	隐窝深度 Crypt depth/ μm	145.83±18.44	157.76±21.61	146.33±23.68	177.37±19.48	161.23±17.78	0.36	0.11
	绒毛高度/隐窝深度 V/C	3.71±0.07	3.26±0.05	3.82±0.92	3.10±0.22	3.33±0.79	0.49	0.01

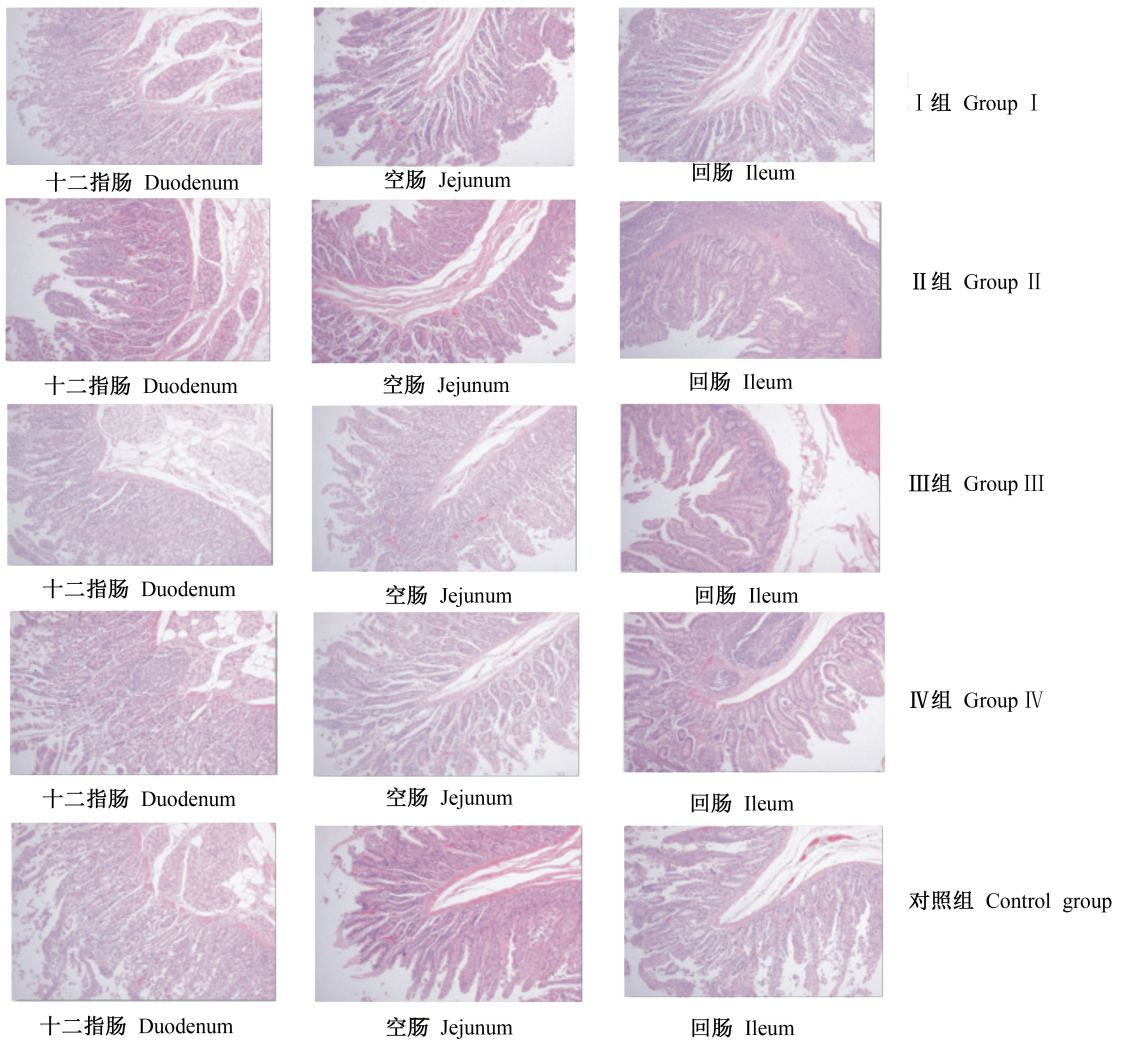


图 1 肠道组织形态切片

Fig.1 Slices of intestinal tissue morphology

2.4 发酵饲料桑粉对宁乡花猪肠道菌群的影响

通过 Illumina Hiseq/Miseq 平台进行 Paired-end 测序,下机数据经过去除低质量 reads,每个样品数据产出详细统计结果如表 6 所示。Paired End Reads 通过 reads 之间的 overlap 关系拼接成 Tags,所有样品一共得到 496 489 条 Tags,平均每个样品 35 463 条,菌群对数 (SD) 值为 197; Tag 平均长度为 252 bp,SD 值为 0。拼接的 Tags 经过优化后,在 97% 相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTU,统计每个样品在每个 OTU 中的丰度信息,OTU 的丰度初步说明了样品的物种丰富程度。所有样品共产生 257 个 OTU,每个样品 OTU 统计结果见表 7。

通过与数据库进行比对,对 OTU 进行物种分类并在门 (phylum) 和种 (species) 分类等级上分别

选取相对丰度排名前 13 的门类和相对丰度排名前 4 的种类绘制物种丰度的 profiling 面积图和柱状图 (图 2 和图 3)。如图 2 所示,在门水平上,厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 这 3 种门类的微生物占回肠菌群的 95% 以上。且在门水平上,添加 15% 饲料桑粉全发酵料相比其他组别回肠微生物中变形菌门所占比例有下降的趋势。如图 3 所示,在种水平上,各饲料桑粉全发酵料组相比未发酵料组罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 相对丰度所占比例更高。

通过对 Alpha 多样性数据的统计分析发现 (表 8),饲料桑粉全发酵料组宁乡花猪回肠菌群 Alpha 多样性指数相比未发酵料组,OTU 和 Chao 指数有所提高,但差异不显著 ($P > 0.05$);各组间香

农 (Shannon) 指数和辛普森 (Simpson) 指数均无显著差异 ($P>0.05$)。

表 6 样本测序数据分析
Table 6 Sample sequencing data statistics

组别 Groups	样品编号 Sample No.	Read 长度 Read length/bp	原数据 Raw data/ Mbp	N 基 N base/ %	低质量 Low quality/%	净数据 Clean data/Mbp	数据利用率 Data utilization ratio/%	原 reads Raw reads	净 reads Clean reads	Read 利用率 Read utilization ratio/%
I	1	250 :250	18.39	0.103	2.307	17.59	95.64	36 784×2	35 380×2	96.18
	2	250 :250	18.57	0.086	2.355	17.79	95.78	37 149×2	35 748×2	96.23
	3	250 :250	18.60	0.073	2.120	17.84	95.91	37 202×2	35 858×2	96.39
	4	250 :250	18.52	0.091	2.397	17.66	95.38	37 033×2	35 544×2	95.98
II	5	250 :250	18.61	0.082	2.237	17.82	95.77	37 214×2	35 829×2	96.28
	6	250 :250	18.41	0.077	2.518	17.52	95.18	36 813×2	35 234×2	95.71
III	7									
	8	250 :250	18.47	0.102	2.657	17.53	94.91	36 941×2	35 307×2	95.58
	9	250 :250	18.45	0.079	2.446	17.58	95.26	36 910×2	35 387×2	95.87
IV	10	250 :250	18.45	0.079	2.465	17.60	95.42	36 891×2	35 375×2	95.89
	11	250 :250	18.61	0.067	2.680	17.69	95.07	37 215×2	35 601×2	95.66
	12	250 :250	18.68	0.110	2.665	17.75	95.00	37 370×2	35 714×2	95.57
对照 Control	13	250 :250	18.42	0.099	2.234	17.64	95.76	36 843×2	35 480×2	96.30
	14	250 :250	18.40	0.106	2.187	17.61	95.69	36 806×2	35 422×2	96.24
	15	250 :250	18.52	0.090	2.306	17.69	95.52	37 038×2	35 592×2	96.10

样品 7 由于 DNA 降解,未进行分析检测。表 7、图 2 和图 3 同。

Sample 7 was not analyzed due to DNA degradation. The same as Table 7, Fig.2 and Fig.3.

表 7 样品 OTU 统计
Table 7 Sample OTU statistics

组别 Groups	样品编号 Sample No.	Tag 数量 Tag number	OTU 数量 OTU number
I	1	26 759	80
	2	26 083	92
	3	24 715	110
	4	26 954	188
II	5	26 319	155
	6	27 155	85
	7		
III	8	24 847	148
	9	27 264	73
	10	26 107	85
IV	11	29 017	106
	12	27 400	81
	13	25 749	84
对照 Control	14	25 737	110
	15	25 983	74

Tag 数量指样品中能 OTU 代表序列比对上,并且 OTU 具有注释结果的 Tag 的总数。

Tag number referred to the total number of tags in the sample that can be compared with the sequence of OTU, and OTU had annotation results.

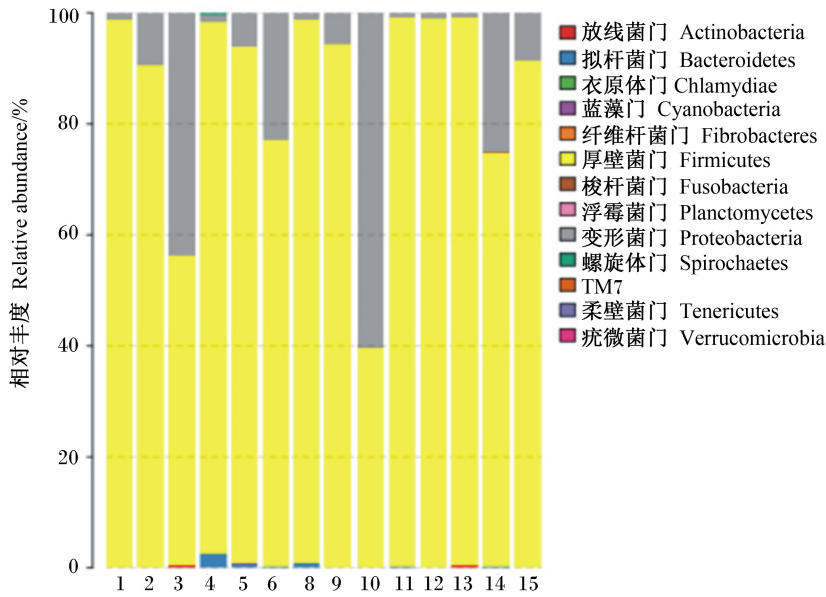


图 2 门水平上的菌群相对丰度柱形图

Fig.2 Histogram of relative abundance of flora at phylum level

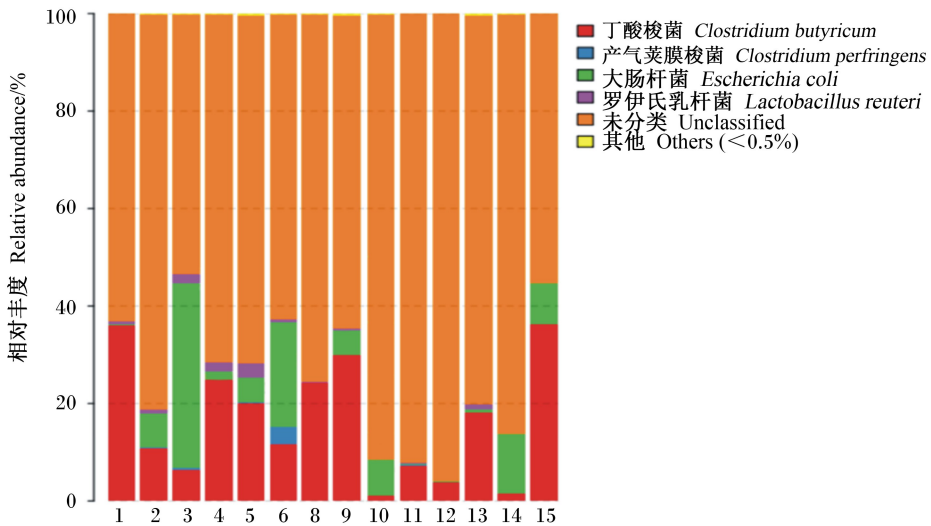


图 3 种水平上的菌群相对丰度柱形图

Fig.3 Histogram of relative abundance of flora at species level

表 8 Alpha 多样性指数

Table 8 Alpha diversity index

项目 Items	组别 Groups				对照 Control	P 值 P-value	
	I	II	III	IV		方差分析 ANOVA	t 检验 t test
操作分类单位 OTU	94.00±15.10	142.67±52.60	110.50±37.50	90.67±13.43	89.33±18.58	0.26	0.52
Chao 指数 Chao index	120.26±26.32	160.44±47.23	133.88±29.21	114.12±23.55	118.03±39.81	0.50	0.58
香农指数 Shannon index	2.55±0.30	2.63±0.26	2.29±0.07	2.13±0.33	2.28±0.07	0.13	0.27
辛普森指数 Simpson index	0.15±0.06	0.13±0.05	0.17±0.02	0.22±0.11	0.16±0.01	0.52	0.54

3 讨 论

3.1 发酵饲料桑粉对宁乡花猪机体抗氧化性能的影响

由于宁乡花猪特有的生理特点,其体脂含量相对较高,性质活泼的自由基可诱发体内不饱和脂肪酸的氧化,产生脂质过氧化反应,从而降低宁乡花猪肉品质。血清及肝脏中 MDA 含量、T-SOD 和 GSH-Px 活性以及 T-AOC 反映了动物机体抗氧化防御系统的水平^[10]。MDA 是动物机体由于自由基的氧化作用产生过氧化脂质后分解代谢的产物,其含量越高说明动物机体产生的过氧化脂质越多,机体氧化损伤越严重;T-SOD 是被称为动物机体抗氧化系统的第 1 道防线,可催化机体内超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)生成过氧化氢(H_2O_2), H_2O_2 进而与过氧化氢酶(CAT)反应生成水(H_2O)和氧气(O_2),是机体清除自由基的首要物质;GSH-Px 是动物机体内一种具有催化过氧化物分解的酶,可以特异性的催化还原谷胱甘肽,从而使谷胱甘肽与动物机体内的氢过氧化物发生还原反应,降低机体氧化损伤;T-AOC 是动物机体抗氧化系统功能状态的一个综合性指标,反映了动物机体抗氧化系统的总体水平。章丹丹等^[11]研究发现,在桑枝中提取的黄酮化合物在细胞试验和体外化学试验汇总均具有抗氧化活性,有很强的自由基清除能力。周林^[12]从桑枝中分离提纯出黄酮类化合物,通过体外模拟试验同样证明桑枝中黄酮类化合物具有抗氧化活性。本试验研究发现利用饲料桑粉饲喂宁乡花猪可有效提高其血清中 T-AOC,且添加 15% 饲料桑粉全发酵料组血清 T-AOC 显著高于对照组,这与黄静等^[13]利用桑叶粉饲喂胡须鸡研究结果相似,这可能与饲料桑粉中所含的黄酮类具有的抗氧化活性有关。陈玲玲等^[14]研究桑叶黄酮对糖尿病小鼠的影响中发现,桑叶黄酮可有效提高小鼠肝脏中超氧化物歧化酶活性,降低肝脏中 MDA 含量。本试验研究发现,饲料桑粉添加组宁乡花猪肝脏 MDA 含量相比对照组有降低的趋势,肝脏中 T-SOD、GSH-Px 活性和 T-AOC 相比对照组均有所提高,说明饲料桑粉可以有效提高宁乡花猪机体抗氧化水平,进而改善肉品质。

3.2 发酵饲料桑粉对宁乡花猪肠道组织形态的影响

小肠是动物机体消化吸收营养物质的主要部位,绒毛高度、隐窝深度及 V/C 值是反映小肠消化吸收功能的重要指标^[15]。小肠黏膜上有大量肠绒毛,绒毛高度越高则小肠对营养物质的吸收面积越大,消化吸收功能越强,绒毛萎缩引起绒毛高度的降低将导致小肠吸收功能的下降;隐窝深度的高低反映了肠上皮细胞的生成率,肠道隐窝的细胞不断的向绒毛处分化,替代补充脱落或损伤的绒毛细胞,隐窝处细胞生成率下降将使隐窝深度变浅,表明绒毛细胞成熟率上升,小肠营养吸收功能增强。有研究表明,隐窝深度还反映了肠上皮细胞的迁移率,隐窝深度降低则表明动物肠上皮细胞的迁移率降低^[16],动物肠上皮细胞的迁移率降低可以减少能量损失,从而有利于促进动物生产性能^[17]。小肠 V/C 值可以比较直观地反映小肠的消化吸收能力,V/C 值越高则代表小肠消化吸收能力越强。本试验研究发现,饲料桑粉添加组宁乡花猪空肠绒毛高度及 V/C 值相比对照组有所下降,这可能与饲料桑粉中所含的单宁及植物凝集素等抗营养因子损伤肠道上皮细胞有关,具体原因有待进一步研究;添加 9% 饲料桑粉全发酵料组相比添加 9% 饲料桑粉未发酵料组宁乡花猪空肠和回肠 V/C 值显著提高,且在本课题组前期试验结果表明添加 9% 饲料桑粉全发酵料对宁乡花猪生长性能有一定的改善作用,说明发酵工艺可能通过降低或清除饲料桑粉中的抗营养因子,从而降低饲料桑粉对宁乡花猪肠道的损伤,进而有益于其生产性能。

3.3 发酵饲料桑粉对宁乡花猪肠道菌群的影响

动物肠道菌群的稳态与宿主的肠道健康状况及生产性能密切相关,肠道菌群的变化也可直接影响动物肠道对营养物质的吸收代谢^[18]。Lamendella 等^[19]研究表明,猪肠道内的微生物中的厚壁菌门和拟杆菌门与机体对碳水化合物的代谢有一定相关。本试验研究发现,门水平上,厚壁菌门、变形菌门和拟杆菌门这 3 种门类的微生物占回肠菌群的 95% 以上;所有宁乡花猪回肠菌群共产生 257 个 OTU,肠道菌群相对丰度越高则越有利于维持动物肠道菌群的稳态,进而促进动物生产性能。吕月琴等^[20]和舒刚^[21]等利用发酵饲料分别在蛋鸡和肉鸡饲养试验中发现,饲喂发酵

饲料组相比未发酵饲料组,动物肠道中的乳酸菌等益生菌数量显著提高,大肠杆菌数量有效降低。Canibe 等^[22]利用发酵饲料和未发酵饲料饲喂生长猪试验发现,发酵饲料可有效提高动物肠道有益菌数量,有利于促进动物肠道菌群的稳态并提高菌群丰度。本试验研究表明,全发酵料组宁乡花猪回肠菌群 Alpha 多样性指数相比未发酵料组,OTU 和 Chao 指数有所提高,且各全发酵料组相比未发酵料组乳杆菌种的相对丰度更高,这可能与添加饲料桑粉饲料经发酵处理后,饲料 pH 降低,饲喂宁乡花猪后在肠道中提供了一个适合乳酸菌等喜酸益生菌种的大量繁殖的环境有关,此结果与邝哲师等^[23]利用发酵桑叶粉饲喂胡须鸡试验结果相似,具体原因有待进一步研究。

4 结 论

① 饲料添加 15% 饲料桑粉全发酵料能显著提高宁乡花猪血清 T-AOC。

② 发酵饲料桑粉较未发酵饲料桑粉可显著提高宁乡花猪空肠和回肠 V/C 值。

③ 发酵饲料桑粉较未发酵饲料桑粉有提高宁乡花猪回肠菌群相对丰度的趋势。

参考文献:

- [1] 杜周和,刘俊凤,左艳春,等.桑叶的营养特性及其饲料开发利用价值[J].草业学报,2011,20(5):192-200.
- [2] 杨静.饲料桑粉的营养价值评定及在生长育肥猪日粮中的应用研究[D].硕士学位论文.保定:河北农业大学,2014.
- [3] 梁文欧,赵力超,方祥,等.大豆异黄酮与肠道微生物相互作用研究进展[J/OL].食品科学,1-9[2019-03-08].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20180518.1511.012.html>.
- [4] NAKATSU C H, ARMSTRONG A, CLAVIJO A P, et al. Fecal bacterial community changes associated with isoflavone metabolites in postmenopausal women after soy bar consumption [J]. PLoS One, 2014, 9(10):e108924, doi:10.1371/journal.pone.0108924.
- [5] LI Y G, JI D F, ZHONG S, et al. Hybrid of 1-deoxyojirimycin and polysaccharide from mulberry leaves treat diabetes mellitus by activating PDX-1/insulin-1 signaling pathway and regulating the expression of glucokinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase in alloxan-induced diabetic mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 134(3):961-970.
- [6] 苏海涯,吴跃明,刘建新.桑叶中的营养物质和生物活性物质[J].饲料研究,2001(9):1-3.
- [7] 蒋美山,易兴友,李中伟.饲料桑的营养价值及其在畜禽日粮中的应用[J].当代畜牧,2015(24):31-32.
- [8] 罗玲,韩奇鹏,曲湘勇.微生物发酵饲料在动物生产上的应用研究进展[J].饲料与畜牧,2016(2):45-50.
- [9] 孙汝江,吕月琴,肖发沂.微生物发酵饲料的研究进展[J].山东畜牧兽医,2012(6):85-86.
- [10] SZCZUBIAŁ M, KANKOFER M, WAWRON W, et al. The dynamics of changes in erythrocyte glutathione peroxidase activity and serum selenium content during the periparturient period in sows [J]. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2004, 7(1):21-26.
- [11] 章丹丹,高月红,LI J T,等.桑枝总黄酮的抗氧化活性研究[J].中成药,2011,33(6):943-946.
- [12] 周林.桑枝黄酮提取分离及抗氧化活性研究[D].硕士学位论文.成都:西南大学,2011.
- [13] 黄静,邝哲师,廖森泰,等.桑叶粉和发酵桑叶粉对胡须鸡生长性能、血清生化指标及抗氧化指标的影响[J].动物营养学报,2016,28(6):1877-1886.
- [14] 陈玲玲,刘炜,陈建国,等.桑叶黄酮对糖尿病小鼠调节血糖的作用机制研究[J].中国临床药理学杂志,2010,26(11):835-838.
- [15] 李德发.猪的营养[M].2版.北京:中国农业科学技术出版社,2003.
- [16] WEISS L. Cell and tissue biology [M]. Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 1988.
- [17] RADECKI S V, KU P K, BENNINK M R, et al. Effect of dietary copper on intestinal mucosa enzyme activity, morphology, and turnover rates in weanling pigs [J]. Journal of Animal Science, 1992, 70(5):1424-1431.
- [18] 刘晨黎,高巍.鸡盲肠微生物微生态调控研究进展[J].中国家禽,2000,22(10):30-32.
- [19] LAMENDELLA R, DOMINGO J W, GHOSH S, et al. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut [J]. BMC Microbiology, 2011, 11:103.
- [20] 吕月琴,孙汝江,肖发沂,等.微生物发酵饲料对蛋鸡肠道菌群和氮磷排泄率的影响[J].家禽科学,2012(6):9-11.
- [21] 舒刚,梁娜,曾敏,等.发酵饲料对肉鸡生长性能和肠道菌群、pH 值的影响[J].中国畜牧杂志,2013,49

(13):51-54,64.

[22] CANIBE N, JENSEN B B. Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance [J].

Journal of Animal Science, 2003, 81(8):2019-2031.

[23] 邝哲师, 黄静, 廖森泰, 等. 桑叶粉和发酵桑叶粉对胡须鸡屠宰性能、肉品质及盲肠菌群的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(8):1989-1997.

Effects of Fermented Forage Mulberry Powder on Antioxidant Performance and Intestinal Function of *Ningxiang* Pigs

DING Peng¹ DING Yanan¹ ZENG Qinghua^{1,2} LI Xia³ SONG Zehe¹ FAN Zhiyong¹ HE Xi^{1*}

(1. Hunan Co-Innovation Center of Animal Production Safety, Engineering Research Center for Feed Safety and Efficient Utilization of Ministry of Education, College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Chuweixiang Agricultural Co., Ltd., Changsha 410005, China; 3. The Sericulture Science Institute of Hunan, Changsha 410127, China)

Abstract: This study was aimed to investigate the effects of fermented forage mulberry powder on antioxidant performance in serum and liver, intestinal tissue morphology and intestinal flora of *Ningxiang* pigs. Ninety *Ningxiang* pigs with average body weight of about 30 kg were randomly divided into 5 groups with 3 replicates (pens) per group and 6 pigs per replicate. Pigs in the control group were fed a basal diet, and the others in groups I, II, III and IV were fed the basal diets supplemented with 9%, 12% and 15% whole fermented forage mulberry powder and 9% non-fermented forage mulberry powder, respectively. The trial was divided into 2 stages, 1 to 50 days of earlier growth stage and 51 to 75 days of later growth stage. The results showed as follows: 1) compared with the control group, the serum total antioxidant capacity (T-AOC) of *Ningxiang* pigs in group III was significantly increased in metaphase period ($P < 0.05$); the liver malondialdehyde (MDA) content of *Ningxiang* pigs fed diets supplemented with forage mulberry powder was downward trend ($P > 0.05$), and the downward trend was more obvious when the forage mulberry powder supplemental level increasing. 2) Compared with the control group, the jejunal villus height of *Ningxiang* pigs was significantly decreased in all experimental groups ($P < 0.05$), the ratio of villus height to crypt depth (V/C) in jejunal of *Ningxiang* pigs in group II, III and IV was significantly decreased ($P < 0.05$); compared with group IV, the duodenal villus height of *Ningxiang* pigs in group I was rising trend ($P > 0.05$), and the V/C in jejunal and ileal of *Ningxiang* pigs was significantly increased ($P < 0.05$). 3) The 16S rDNA sequencing in ileal microorganism of *Ningxiang* pigs revealed that 496 489 Tags were obtained from all of the samples, with an average of 35 463 Tags per sample, the average length of Tag was 252 bp, and a total of 257 operational taxonomic units (OTU). Compared with the non-fermented forage mulberry powder group, the OTU and Chao index in whole fermented forage mulberry powder group was rising trend ($P > 0.05$), and there was no significant difference in Shannon index and Simpson index between all groups ($P > 0.05$). In conclusion, the forage mulberry powder can effectively improve the antioxidant performance and ameliorate intestinal micro environment of *Ningxiang* pigs. And the negative effects of feed mulberry powder on intestine of *Ningxiang* pigs can be effectively reduced after the feed mulberry powder is fermented. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(9):4303-4313]

Key words: fermented feed mulberry powder; *Ningxiang* pigs; antioxidant; intestinal function