

中国期刊方阵双效期刊

北方优秀期刊

辽宁省一级期刊

《中国学术期刊(综合评价数据库)来源期刊》
《中国学术期刊》、《中国学术期刊(光盘版)》
全文收录期刊

2007年第28卷第7期
(总第292期)
(1980年创刊)

主办单位:

辽宁省农业机械研究所

编辑出版:饲料工业杂志社

地址:沈阳市金沙江街16号6门

邮编:110036

电话:总编室(024)86391923

编辑一室(024)86391926(传真)

编辑二室(024)86391925(传真)

网络发行部(024)86391237

投稿信箱:tg@feedindustry.com.cn

网站:www.feedindustry.com.cn

总编辑:慕春野

副总编辑:沈桂宇 陈广鹏

责任编辑:刘殿波

广告承印代理:沈阳同兴广告有限责任公司

总经理:林勇

副总编辑:荣立南 于晓楠

业务内勤:刘占

地址:(110036)沈阳市长江街126号甲

B幢4单元16楼

电话:(024)86276137 86276627

传真:(024)86276127

邮箱:ggbb@feedindustry.com.cn

印刷:辽宁省印刷技术研究所

国内发行:辽宁省报刊发行局

国外发行:中国国际图书贸易总

公司(北京399信箱)

出版日期:每月5日、20日出版

国外代号:M4290

国内统一连续出版物号:CN21-1169/S

国际标准连续出版物号:ISSN 1001-991X

邮发代号:8-1463

发行范围:国内外发行

广告许可证:辽广字(01)042号

开户行:中信银行沈阳分行皇姑支行

帐号:72214101826000548-49

每份定价:6.00元

如需转载本刊文章及图片,请注明

摘自《饲料工业》杂志,并寄样刊。

饲料

SILIAO GONGYE

工业

(半月刊)

目次

专家论坛

■ 1 饲料配方基础和关键点,兼谈日标规划在饲料配方中的应用

熊易强

工艺设备

■ 7 基于灰色关联的饲料螺杆膨化机加工参数优化

舒服华

■ 11 谈温度自动控制系统在饲料稳定器上的运用

唐定邦 陈宝云

肽营养

■ 13 小肽饲料营养价值及评价方法

郭玉东 张洋 张均国

营养研究

■ 17 影响肌肉生成的调控因子

刘燕 杨琳

谭琼 张彬

李长强 闫益波 高士争

试验研究

■ 30 不同乳糖添加量对早期断奶仔猪全价料中

营养物质消化率和仔猪生产性能影响的研究

魏晓致 陆伟 王博等

■ 34 不同能量水平对朗德鹅生长曲线的影响研究

曹爱青 毛宗林 胡骏鹏等

检测技术

■ 38 凯氏定氮法测定饲料中粗蛋白含量的不确定度分析

施远国

■ 40 不确定度评定在饲料卫生学霉菌检验中的应用

卢安根 莫建光 杜美春

反刍动物营养

■ 42 不同生产阶段奶牛群体营养代谢状况的评价

李太刚 王加启

■ 45 改善牛乳脂中共轭亚油酸含量的研究

于安乐 高巍

兽医兽药

■ 48 奶牛慢性乳房炎病原菌的分离鉴定及药敏试验

刘萍 侯西成 郝满良等

■ 52 奶牛乳房炎病原菌的分离及药敏试验

齐永华 董永军 陈桂香等

资源开发

■ 55 野山菜蒲公英在动物生产中的应用

刘进 刘敏跃 于德强等

问题探讨

■ 58 泌乳母猪采食量降低的原因和改善措施

刘涛 孙强

专题论述

■ 61 瘤胃微生物来源的纤维降解酶及其应用

陈振明 张朝晖 刘建新

信息采集

■ 39 鱼塘混养技术

行业新闻

■ 中国首届“牧羊杯”颗粒机操作技能大赛在扬州圆满结束

企业标识展示



江苏中仁
人力资源派遣
(0519)7309867



通城集团
(028)85188888



江苏牧羊
(0514)7848811



江苏北方
(0412)3430018
(024)88080022



BUHLER
布勒(常州)
(0519)7966666



FDSF
江苏四方
(0519)8309888



东阳自动化
(0515)3719406



东阳自动化
(0515)3719406



Dabaitai Victory
迪高维尔
(029)87035008



KINS
杭州康德
(0571)86433111



比克
广东中山比克
(0760)3113061



比克
广东中山比克
(0760)3113061



海大
新泰食品机械
(0538)7427566



海大
新泰食品机械
(0538)7427566



海大
广东佛山
(020)84661699



海大
广东佛山
(020)84661699

饲料配方基础和关键点， 兼议目标规划在饲料配方中的应用

熊易强

1 饲料配方基础和关键点

目前饲料界普遍采用的最低成本饲料配方模型,也是最基本的配方模型,是以单位(千克或吨)饲料成本最低为目标函数,在已知原料营养成分和给定的饲料原料市场价格情况下,根据线性规划原理,借助计算机求解满足所设定的约束条件下的“最佳”配方。

线性规划(LP)是最优化问题中重要的领域之一,很多运筹学中的实际问题都可以用线性规划问题来表述。在约束和目标都既定的前提下,如何优化整个系统,以最小输入得到最大输出,是线性规划的主要研究内容。线性规划在经济学、管理学及各个技术、经济领域中均有广泛应用。线性规划是应用数学的一个专门领域,有关其原理和算法的深入讨论已不属本文范围,读者如有兴趣,可查阅有关专著。但笔者在此需要指出两点:第一,用线性规划解决实际问题的模型的目标函数和约束条件的约束值或右侧常数(RHS)必须是线性的,如模型本身不属线性,则只有将原始模型转变为线性模型,才能按线性模型算法求解。第二,线性规划是一个十分有力的工具,但它不能取代实际问题的内涵。许多实际问题是经过简化后,再建立的线性规划模型,因此该线性规划模型解所提供的信息,未必全适用原实际问题的具体分析。

用于求解最低成本配方的线性规划的基本模型表述如下:

1) 目标函数

$$\min f(c_1X_1, X_2, \dots, X_n) = c_1X_1 + c_2X_2 + \dots + c_nX_n \quad (1)$$

式中: X_1, X_2, \dots, X_n ——各原料及其在配方中所含比例(%), $X_1 + X_2 + \dots + X_n = 100\%$;

c_1, c_2, \dots, c_n ——各原料的单价。

2) 约束条件

① 营养约束条件

$$a_{i1}X_1 + a_{i2}X_2, \dots, a_{in}X_n \begin{cases} \leq \\ \geq \end{cases} b_i, i=1, \dots, m \quad (2)$$

熊易强,饲料科技国际顾问,博士,教授,100091,北京市圆明园西路88号院17楼4单元401。

收稿日期:2007-02-26

式中: $a_{i1}, a_{i2}, \dots, a_{in}$ ——营养成分 i 在各原料中的含量。

② 饲料原料约束条件

$$X_1, X_2, \dots, X_n \begin{cases} \leq \\ \geq \\ = \end{cases} d_j \text{ 或 } \text{urs}(\text{无约束}) \quad (3)$$

$$X_1, X_2, \dots, X_n \geq 0$$

在饲料配方或线性规划的文献中,模型表述一般不包含式(3)。但在饲料配方的实践中,对饲料原料(使用量)的约束条件十分重要,笔者认为应将其列入基本模型之内。

市售饲料配方软件,甚至通用线性规划求解软件如 EXCEL 的“规划求解”软件,均可迅速准确地筛选出给定条件下的最低成本配方。至于配方的优劣或使用效果的好坏,则全在于约束条件的设定是否得当和所提供的饲料原料的数据(如营养成分)是否准确。

饲料配方的约束条件包括对营养成分的约束和对饲料原料的约束两个方面。一方面,约束条件设定的愈多,可供选择的机会愈少,或选出的配方成本愈趋于上升;另一方面,对于必需的约束条件不予设定,则达不到预期的饲料质量和饲养效果。因此,设定约束条件的基本原则是:对非必需的约束条件绝对不设;对必需的约束条件一定要设。总之,计算机配程序本身是一个忠实高效的“奴隶”,它只是执行“主人”也就是营养配方师的“指令”,即求解约束条件下的最低成本配方。至于所得到配方的优劣或使用效果则完全取决于“主人”所给的“指令”,即约束条件是否得当。由此可见,营养配方师的学识与经验以及对有关信息的掌握,对饲料配方的质量与效果起决定作用。深入研讨不同畜禽品种的营养需要和配方技术,已不属本文范围。此处介绍的是笔者对饲料配方的基本认识与经验体会。

营养成分的约束包括对有效能量、蛋白、氨基酸、各种矿物质、维生素等的约束设定。对于配方营养成分约束的设定,可参考有关饲养标准。需要指出的是,“饲养标准”一词用语并不确切,它仅仅是设定饲料配方营养成分的指南,而绝非必须执行的“标准”。一些国家采用“营养需要(nutrient requirements)”一词,并在文中明确指出,所提供的信息仅作为指南。例如美

国 NRC 家禽营养需要一书中提出的产蛋鸡营养需要量是以每千克饲料含代谢能 (ME) 12.122 MJ 为基础,同时明确指出其它营养成分应随代谢能设定的改变而相应调整。在我国目前条件下,机械地按每千克饲料含代谢能 (ME) 12.122 MJ 这一水平配方,既不现实也不合算。比较合理的做法是以 NRC 的营养需要为基础,在较低的能量水平上,按比例设定其它营养成分的约束水平。实际工作中经常遇到的一个问题是,按 NRC 蛋白与能量的比例关系所设定的蛋白水平与市场上所见产品比较总是偏低。对此应从两个方面分析:一方面,NRC 提出的蛋白质需要量是按美国典型的玉米-豆粕日粮,根据氨基酸供应量得到满足并相对平衡的基础提出的,同时饲料数据库有关氨基酸的资料也比较完整可靠。在我国配方中可能含有较多有效营养成分不够稳定的饼粕类或其它加工副产品,同时饲料数据库某些方面可能尚不够完善,营养师提出较大的安全系数,往往是必要的。另一方面,则是出于满足用户心理或市场销售的需要。饲料法规要求标明蛋白含量,但不要求标明有效能量浓度。粗蛋白分析简易快速,而有效能量测定则需要动物实验。尽管有一些体外测定方法或根据常规分析推算有效能量的回归公式,但尚未普遍用于生产。长期以来饲料用户存在着“只认蛋白不认能量”的观念,这也是导致市场上出现高蛋白-低能量配方这一不正常现象的重要原因。蛋白对能量的比例过高造成蛋白饲料资源浪费,增加环境污染,而且从两个方面导致配方成本增高:①蛋白饲料原料价格一般高于淀粉类能量饲料原料;②蛋白饲料原料能量浓度一般低于能量饲料原料,其所占据的配方空间往往迫使计算机选入价格高昂的油脂类高能量饲料原料来满足配方的能量需要。如何解决饲料配方的科学性和习惯势力及客户心理的非科学性之间的矛盾,这的确是饲料销售和技术推广上普遍存在的一个问题。原则上说,一方面要适应市场的现实,一方面要不断说服教育用户采用科学配方。结合技术讲座,通过典型示范让客户目睹新技术及科学配方的好处,可能是一个有效的办法。

至于营养成分约束条件的具体内容以及详细程度,则很大程度上要由饲料原料所提供的信息和对象动物而定。例如,许多试验均证明,用“有效氨基酸”配方的效果好,但如果饲料成分表中没有或没有可靠的氨基酸有效性的信息,用有效氨基酸配方就没有意

义。可能出现的另一问题是,营养师未将参选原料的相关营养成分如实地输入。这必然会影响线性规划模型的优化结果。也就是说,计算机根据不真实的信息所筛选出的配方,实际上并非该配方约束条件下的最优配方。一个最常见的例子是在输入工业(化学合成或发酵)生产的氨基酸时未输入其所含的蛋白质和有效能量。市售的工业生产的氨基酸一般不列入饲料成分表,但需要在饲料配方优化中作为参选原料如实地输入所有约束条件所要求的信息。氨基酸的自身营养价值除氨基酸本身外还包含蛋白质和能量。例如,市售赖氨酸产品一般含 78% 赖氨酸,其蛋白质含量,在忽略赖氨酸分子中 N 的实际比例情况下,按平均折算率 6.25 计,可定为 78%;市售 DL 蛋氨酸一般含 99% 蛋氨酸,其蛋白质含量,可按同一分析,定为 99%。至于相应产品所含能量,可在其很高的消化率基础上做一个留有余地的估计。例如按 95% 消化率推算蛋白质的消化能、代谢能等等。有人认为这类工业生产的氨基酸价格高,在配方中的添加量少,其对配方蛋白质及能量的贡献可以忽略。但根据配方运算的实际经验,输入蛋白及能量与否,会直接影响该氨基酸原料是否被选入配方。既然蛋白质和能量已经被列入为配方的(营养)约束条件,而氨基酸自身含有蛋白质和能量,不将这两项营养成分列入,就意味着没有向计算机提供该产品价值的真实信息,或者说低估了其影子价格(熊易强,2006)。

关于根据对象动物设定约束条件的问题,可以过瘤胃蛋白质或过瘤胃氨基酸为例加以说明。过瘤胃蛋白质或过瘤胃氨基酸的概念已用于反刍动物饲料与饲养,将其列入高产奶牛或快速生长的幼畜配方的营养约束条件中往往带来良好效果。但对于育肥牛、低产奶牛及干奶期母牛来说,则意义不大;因为瘤胃合成的微生物蛋白或氨基酸已可满足动物的需要。

饲料原料的约束指的是规定某种原料在配方中不得低于或不得超过多少或必须等于多少。对饲料原料的约束需要考虑的方面往往更多,包括饲料的安全性、营养特性、工艺特性、饲料原料的供应情况,以及客户心理或对产品的特殊要求等。出于饲喂安全考虑限制棉、菜籽粕等含毒饲料原料的用量已成为饲料界的共识。需要指出的是,原料的品种来源与加工方法的差别,对象动物的不同,以及营养师对安全系数的掌握分寸,均影响配方的约束量。对于菜籽粕在四大家鱼饲料中添加量的安全上限,仍尚无定论。添

加少量油脂可减少环模磨损,但一般说来,添加量超过 2%,在没有外喷涂设备的条件下,会明显影响颗粒饲料的稳定度(durability)。一方面,在配方中加入一定量的次粉或面粉则可提高颗粒稳定度,这与小麦淀粉的糊化特性和面筋蛋白的功能特性密切相关;另一方面,次粉作为一种加工副产品,其供应量和质量的稳定性往往较差,可考虑在配方中设上限或定量加入。饲料原料的工艺特性在饲料配方中的重要作用对于某些产品如液体饲料来说,尤为突出(Xiong, 2006)。

营养学研究已经证明,对于大多数畜禽饲料的配方来说,通过补充必需氨基酸(如赖氨酸、蛋氨酸)、维生素(如维生素 B₁₂)及微量元素(如硒)实现必需营养成分平衡,可以用豆粕或其它饼粕类产品取代鱼粉。但不少饲养户根据他们的传统习惯或经验,总希望在购入的配合饲料中有一些鱼粉。一方面,鱼粉的市场价格往往高于其“影子价格”(熊易强, 2006)。为了销售的需要,营养配方师就要将鱼粉设定为一项饲料原料约束条件(例如设定鱼粉在配方中 $\geq 1\%$),迫使计算机将其纳入配方。另一方面,鱼粉的市场价格个别情况下也出现过短暂的下滑,显著低于其影子价格。例如,某年的几个月内,在不设上限的条件下,计算机可在禽料配方中入选 7%~8%的鱼粉。也就是说,在当时的市场条件下,采用计算机选定含 7%~8%鱼粉的配方成本最低。但笔者对有关饲料公司当时提出的建议是:限制鱼粉在配方中的加入量不超过 2%~3%。理由是:①鱼粉在世界范围内属短缺资源,当时的价格下滑必定是一个十分短暂的现象,近期内极可能回升。饲养户如习惯于使用高鱼粉日粮,届时将可能迫使饲料配方成本上升或因鱼粉在配方中的含量急剧降低而影响销售或畜禽采食。②配方中鱼粉过多,往往会导致畜产品出现明显的鱼腥味。与此同时,作者还建议,在资金和贮藏条件许可的情况下,尽量多购入一些鱼粉,以便鱼粉价格上涨时自用或出售。就此处所举鱼粉一例而言,考虑到各方面的因素,包括客户传统习惯对鱼粉的需求及对市场动态的分析,可对鱼粉的用量采取双向约束:约束条件设为 $\geq 1\% < 2\%$ (或 3%)。双向约束比之固定约束(如将鱼粉的用量定为 1%),可给计算机以较多机会降低配方成本。当然单向约束比双向约束降低成本的机会更多,而单向约束降低成本的机会又不如不设约束。往往需要设双向约束条件的还有钙。对钙设定下限是为了保证营养需要,设定上限的目的则是防止配方中钙含量过高而可

能引起的矿物质营养不平衡。石粉(碳酸钙)是最廉价的饲料原料,不设上下限,计算机在满足其它约束条件的情况下,会尽可能多地选用石粉,来实现“单位饲料成本最低”这一目标函数。

需要提及的是石粉这类矿物质原料在制粒作业上的特殊功能。尽管学术界存在不同见解,在生产实践中有厂家在畜禽生产的最后阶段如育肥的最后一周,从配方中撤掉全部维生素和矿物质添加剂以降低成本。但随即发现,按这类配方制作颗粒饲料时,环模总是打滑,颗粒难以从模孔中压出。在一次现场解难的技术服务中,笔者提出在配方中加入 2% 的石粉,这一问题随即得到了解决。美国大型一条龙养禽业的饲料厂往往专门选用含 21% 以上的磷酸二氢钙,理由是该产品比起含磷低(如含 17.5% 的磷酸氢钙)的产品可提高制粒产量。这对生产规模大的饲料厂的效益颇为重要。

预混料经常是以原料形式按固定量(例如 1%)设定约束条件。这是因为预混料经常是事先制作甚至定量包装好的,在配料工序中定量加入便于使用。至于各种微量营养成分和药物性添加剂的选择及在预混料中的含量则均由营养师专门设计。

最近美国 IOWA 大学的研究证明,提高配合饲料中粗纤维的含量,可显著降低粪便中氮的释放(Watt poultry e-news, June 22, 2006)。随着人们对环境污染的关注,这一发现或许会被营养配方师列入高度集约化饲养场的饲料配方的约束条件。

总之,在设定饲料配方的约束条件时,要从营养需要、原料特性与供应情况、加工工艺、产品销售以及资源环境等多方面因素加以综合考虑。对于不必要的或可设可不设的约束条件,决不要设;而对于必须设定的约束条件,则一定要设。设定哪些约束条件,约束量多少,单向约束还是双向约束,或是定量约束,都必须有充分的依据。一个合格的营养配方师,应当不断吸取动物营养学的新成果,不断丰富原料和加工工艺的知识,观察和研究市场的动态和需求,并将所有这些信息融会贯通,运用到饲料配方实践中去。一个学识丰富、功底深厚、经营观念强又熟悉市场的营养配方师,是饲料企业的一笔重要财富。笔者在本文中使用的“营养配方师”一词,是有意将营养师与配方师的功能集于一身。培养一个能操纵计算机软件的配方师,一般要求相当于高中毕业的程度,花费数周的时间。从大学毕业开始,培养一个动物营养硕士一般需要

2~3年,培养一个动物营养博士一般需要5~6年。配方师都是在营养师的指导下工作的,也有兼营养师与配方师于一身的情况。一个有规模有信誉的饲料公司往往规定,在公司品牌下的配方,必须经主管的高级营养师签字批准。

在以LP模型进行饲料配方优化过程中,偶尔会出现无解的情况。这时要找出相互冲突的约束条件,并相应地对其进行必要的调整。例如,美国一家饲料公司生产的一种乳猪料配方中尽管使用了优质粘合剂Lignin 2X(配方中用量为1%),仍然存在颗粒稳定度(PDI)低,含粉量过高的问题。经分析,该配方中外加油脂高达2.5%是PDI低的主要原因所在。笔者根据现有经验,在配方模型中增设油脂添加量约束 $\leq 1.5\%$, (并以5%的次粉取代1%的Lignin 2X,以提供较多的配方空间并降低成本),计算机随即显示出“无解”信号。这显然是由于配方所设营养约束的高能量($ME \geq 13.355 \text{ MJ/kg}$)与原料约束的油脂添加量($\leq 1.5\%$)之间的矛盾所致。笔者将ME的约束值逐步下调至 13.125 MJ/kg ,配方出现最优解。在较低的能量水平下,相应降低原配方中蛋白质、氨基酸的比例,对进一步降低成本提供了空间。制粒试验结果表明,新配方的PDI提高了7.4个百分点。随后的饲养试验表明,ME降低了 0.2299 MJ/kg 的新配方与原配方比较,对乳猪的生产表现无显著影响(日增重: $P=0.5051$,饲料转化率: $P=0.4519$),而且可以推断,乳猪饲养期间的微小差异可在生长育肥期间得到补偿(Xiong, 1995)。据此,可以从技术上认可这一新配方。但是还存在一个新配方能否被客户接受的问题。如果销售方面存在问题,可能的选择是:①将超过1.5%的油脂部分,通过“后喷涂”技术包被在颗粒表层;②增加Lignin 2X用量并相应地进一步提高油脂在配方中的添加量(Xiong, 1994)。这两个选择均将导致成本在原配方基础上增加。本例从分析排除配方无解到建立新配方的过程,再次说明了制定或修改一个饲料配方,必须从营养需要、加工工艺、产品销售等多方面综合分析,甚至要进行必要的试验研究。

饲料配方会依约束条件的改变而不同。即使约束条件不变,计算机选择的最低成本配方也会因饲料价格的改变而改变。需要注意的是,应避免配方的急剧变化。配方急剧改变不仅会影响销售,而且可能影响动物采食。一般来说,成年动物对饲料配方的变化更

为敏感,有时,仅仅是料型的改变也会影响进食。

建立并不断更新自己的饲料数据库对于确保配方质量、降低配方成本至关重要。公开出版的饲料成分表其数据所反映的是不同地区、不同年份的大量样品的平均值,因此每一数值都包含着品种(遗传)、地区(土壤、气候)、年份(气候)及种植条件(施肥、灌水...)等多种因素的变异。有的饲料成分表中注明了取得每个数据的样品数量和标准差,这样营养配方师就有可能以统计学为依据,通过提供安全系数对饲料的营养价值予以一定的保证,但为此所付出的代价往往较大。Nott和Combs(1967)建议在平均值基础上让出0.5个标准差(即平均数减0.5个标准差)作为线性规划配方的数据基础,其所提供的安全系数为69%(即69%的样品 \geq 平均值)。Routh等(1996)指出,用于线性规划配方的应是营养成分的变量(方差)即“标准差的平方”而不是标准差,其算法应是非线性的。以标准差为安全系数采用线性规划算法违背了“线性规划解决的实际问题的模型的目标函数和约束条件的约束值必须是线性的”这一前提,因而是不妥当的。其结果是,引入0.5个标准差按LP算出的为69%安全系数的配方(LP69)的安全系数,实际上是78%而不是69%。对于安全系数69%来说,是“配方过度(over-formulation)”,导致配方成本上升。用Zhang(1999)提出的非线性的随机规划模型(stochastic programming, SP)可以得到准确的安全系数为69%的配方(SP69),从而相应降低配方成本。但这只是规划模型应用是否恰当的问题或两种规划模型算法所得结果的差异问题。从产品销售上说,可以视为一个同一安全系数(或对客户的饲料营养成分的保证系数)下的配方成本的差异问题。SP以方差为衡量,较为客观地将饲料原料的变异作为评价饲料在配方中的实际价值纳入运算之中。但SP没有解决,也不可能解决原料营养成分本身的变异,以及由此导致的对动物生产表现的影响问题,或相应的配方成本上升的问题。也就是说,营养成分在产品中的变异(或标准差)愈大,为保证动物良好的生产表现而造成的配方成本上升的幅度愈高。因此减少饲料原料成分的变异对确保产品质量和降低成本至关重要。一个有规模、有信誉的饲料公司,应当对自己实际使用的饲料原料,尤其是主要的饲料原料的主要营养成分,进行分析化验,并逐渐建立自己的饲料原料数据库。较为切实可行的做法是,先从做好对主要原料

的常规分析着手,必需氨基酸或限制性氨基酸的含量,可根据常规分析结果,按比例以现有饲料成分表为基础推算。需要注意的是,有些新选育的作物品种类型,其蛋白质的氨基酸组成会有明显改变,简单的“按比例外推”会导致相当严重的误差。例如对于高油玉米来说,由于胚在籽粒中的比例上升,赖氨酸及其它必需氨基酸在蛋白质中的比例明显增加。用普通玉米蛋白质的氨基酸组成外推高油玉米的赖氨酸及其它必需氨基酸含量,显然过低估计了这些组分的实际含量或营养价值。最为理想的办法是,采用近红外等快速分析技术,对饲料原料成分进行在线分析,并据此对配方做相应调整。

2 关于在饲料配方中应用目标规划问题

有些饲料配方文献引入了多目标规划(multi-objective programming)中的目标规划(goal programming)以期帮助初学者避免 LP 配方模型出现无解面临的困惑,还有作者认为目标规划是“比 LP 更优越的方法,可以完全包容和取代”LP。对此,笔者认为值得商榷。

首先,多目标规划是针对单目标规划(single-objective programming)而言的。单目标规划指决策人面对的问题仅是一个目标函数;多目标规划面对的问题是决策人需要同时考虑两个以上目标函数。由于多个目标函数之间存在共同最优解的机会极微,决策人需要在各个单目标规划的最优解之间选取一个最佳的折衷可行解(范玉妹等,2004)。对于决策者来说,处理单目标规划问题比处理多目标规划问题简单,而 LP 又是单目标规划中最为简捷的规划模型。许多复杂的模型经过适当处理,都可以通过 LP 解决,这也是何以 LP 得到广泛应用的原因。用于处理多目标规划的数学方法,包括目标规划法,基本上都是先将多目标函数转化为单目标函数后再求解的数学规划模型。“目标规划法”模型的建立包括:①从原多目标规划模型中确定系统约束(刚性约束)和目标约束(柔性约束);②对各目标约束给予一个期望值并引入相关的偏差变量,包括正偏差 d_i^+ (有的文献用 p_i 表示)和负偏差 d_i^- (有的文献用 η_i 表示);③根据对期望值性质的分析,确定各目标约束的目标函数(达成函数)是 $\min d_i^+$ (如要求第 i 个目标允许低于其期望值但又要尽可能地避免超过期望值),还是 $\min d_i^-$ (如要求第 i 个目标允许超过其期望值但又要尽可能地避免低于其期望值),或是 $\min d_i^-, d_i^+$ (如希望偏差变量尽可能接近期望值);

④在建立优先等级或权系数基础上,以各目标约束的达成函数总和最小为模型的目标函数。这里笔者想指出一个语言翻译上的问题:英语中的 objective 和 goal 的中文翻译都用的是“目标”一词,但其英文本意完全不同。Objective 指的是在刚性约束条件下对面临的问题或目标函数求最优解: \max 或 \min , 因此可能出现无解的情况。Goal 指的目标规划法对柔性约束设立的期望值,其所面临的问题或目标函数是尽可能接近期望值($\min d$),因此一般说来不存在无解情况。

将 LP 的饲料配方模型转化为目标规划模型,是把原本是简单的问题复杂化。目标规划自身带有的灵活性和模糊性,对于解决简单的单目标问题,未必是优点。如模型建立不当,还可能出现不合理的配方,导致资源浪费,增加环境污染和配方成本。

目标规划模型在饲料配方上可能出现的建模不当问题包括:①把原本是依存变量关系的各营养成分作为独立变量处理;②未考虑目标约束单位的不同及同一单位不同营养成分约束对配方成本的影响在灵敏度上的差异(熊易强,2006);③目标规划模型中各目标约束间的优先等级安排不当。以下分两种情况进行讨论。

LP 存在最优解:如果将单位原料成本目标值的约束优先等级放在高于营养约束或与之相同的地位,同时又存在上述①、②两个问题,往往出现不合理的配方。只有在用目标规划法设定配方的单位原料成本目标期望值等于 LP 的最优解的单位饲料原料成本的条件下,目标规划法才可得到与 LP 相同的最优解。如目标规划法设定配方的单位原料成本目标期望值明显偏离(低于或高于)LP 的最优解,目标规划法得到的“最优解”,将不同于 LP 的最优解,所得到的配方会出现某些营养成分比例失调的情况,从而导致资源浪费,增加环境污染。因此,该目标规划模型所得到的“最优解”并非“事实上的最优解”。“事实上的最优解”只有一个,即 LP 的最优解。

如果将营养约束放在高优先等级,配方的单位原料成本目标值的约束放在低优先等级,由于原 LP 模型存在最优解,目标规划模型的“高成本目标”与“低成本目标”所得到的最优解,必与 LP 模型最优解无异。其目标规划模型的达成函数值,应分别为“高成本目标”与“低成本目标”的各自的期望值与 LP 解的目标函数值之差。

LP 无解: 这是一些作者在饲料配方中引用目标规划的初衷。至于应用目标规划解决 LP 配方模型出现无解问题的实例, 笔者在饲料企业的运作中尚未见到。如前所述, 当出现因约束条件相互冲突导致 LP 无解的情况时, 只要找出相互冲突的约束条件, 进行合理调整即可。

如果一定要采用目标规划, 就前面所举的为解决制粒质量而限制油脂添加, 导致配方无解的实例而言, 为了避免由于将各营养成分作为独立变量处理导致的配方营养成分比例失调的不合理情况, 应将能量及其它营养成分的约束作为依存变量(dependent variable)处理。具体地说: 设能量(如 ME, 偏差变量 d_1^- 、 d_1^+)与配方的单位原料成本(偏差变量 d_2^- 、 d_2^+)为目标约束(柔性约束), 能量目标值的约束放在高优先等级, 单位饲料原料成本目标值的约束放在低优先等级。至于其它营养成分, 则按与 ME 固定比例关系设为系统约束(刚性约束)。饲料原料约束, 也设为刚性约束。目标函数(达成函数)为 $\min d_1^-, d_2^+$ 。如此建立的目标规划模型的最优解, 应与通过合理调整约束条件的 LP 模型的最优解一致。但过程未免繁琐, 且不能取代相关的饲养试验和销售中需要探讨的问题及可能提供的选择。

对于优先等级的设定, 不应视为是绝对的。例如, 在饲料企业的运营中, 销售部门甚至企业领导可能对营养配方师提出要求: 设计一个单价尽可能不超过某一竞争对手, 而质量上又有明显竞争力的相应的饲料配方。如采用目标规划解决这一决问题, 可将配方的单位原料成本的目标约束放在能量(如 ME)优先等级之上。其它营养成分, 仍应按与 ME 固定比例关系设为刚性约束。为了减少配方优化的模糊性, 也可以将配方成本(从销售价格中扣除相关的包装、贮运、营销费及利润)设为唯一的柔性约束, 以竞争对手的相关配方成本为期望值, 偏差变量 d^-, d^+ , 目标函数 $\min d^+$ 或 $\min d^-, d^+$ 。依照其它营养成分与能量按比例挂钩的原则, 在预期对象动物的生产表现满意的前提下, 对能量给予双向约束, 按刚性约束处理。如目标函数(达成函数)定为 $\min d^+$, 当期望值落在能量浓度的双向约束值的配方成本之间时, 将出现一个从 d^- 到 $d^+=0$ 的可供选择的可行解域, 即一组成本不超过竞争对手的不同营养浓度的配方。当期望值落在能量浓度高限的配方成本以外或等于能量浓度高限的配方成本时, 则

只有一个可行解。如目标函数定为 $\min d^-, d^+$, 则不管期望值落在何处, 只有一个可行解。

当然, 这一问题完全可以用 LP 模型解决: 在上述营养浓度范围内, 用逼近法找出单价低于、等于或尽可能少超过竞争对手的配方。按以上原则所建立的目标规划筛选的配方和 LP 所筛选的配方应当是一致的。

写到这里, 笔者愿引用下面两句话: “模型建立的差异会导致不同的结果”; “建模的一条最重要法则是: 永远不要将自己限制起来”(Georgia Institute of Technology System Realization Laboratory)。

以单位饲料成本最低为目标函数的 LP 模型是当前饲料行业中应用最广的饲料配方模型。饲料饲养界目前使用的配方模型还有: 以(在其它营养成分按比例与能量挂钩的前提下)单位有效能(如 ME)配方成本最低为目标的参数配方(或最佳营养浓度配方)模型(Bushman, 1997; 吴金龙等, 2006), 以单位畜产品成本最低为目标函数的简化最大收益配方模型或以动物饲养过程的投入产出为基础的更为全面的最大收益配方模型(熊易强、裴鑫德, 1987)。这些模型本身都是非线性的, 但都只有一个目标函数。针对多目标问题的目标规划法对解决这些单目标问题似均不存在优势。事实上, 这些单目标非线性模型都是通过适当处理, 借助 LP 解决的。

随着人们对资源与环境关注的加深, 饲料配方的目标将不只限于求单一的“最低成本”或“最大收益”, 还要考虑与资源、环境有关的问题。例如, 对于一个资源限制型国家, 利用作物秸秆发展草食家畜生产, 除了“单位畜产品饲料费用最低”以外, 还有必要考虑“单位畜产品精饲料(或粮食)消耗最低”这一目标(孟庆翔等, 1990)。对于集约化经营的饲养业, 还需要考虑“粪便污染物排放最少”这一目标(Coelli 等 2006)。它们之间一般均不存在共同的最优解。这样一来, 饲料配方问题就成了多目标规划问题。处理多目标规划问题的一些数学方法包括目标规划法, 对于决策者选取最佳的折衷可行解, 并据此制定相关政策, 将是有帮助的。(致谢: 本文承蒙清华大学经济管理学院吴峨教授, 中国人民大学环境学院张象枢教授审阅, 并提供宝贵的评述意见。笔者在此表示诚挚的感谢。)

(参考文献 14 篇, 刊略, 需者可函索)

(编辑: 崔成德, cuiengde@tom.com)

基于灰色关联的饲料螺杆膨化机加工参数优化

舒服华

摘要 对饲料螺杆膨化加工工艺参数的优化提出了灰色关联分析模型。根据评价样本与比较样本的关联度大小判断工艺方案的优劣,从而确定最佳工艺方案。针对传统灰色关联分析模型权重分配和确定存在的问题,采用加权灰色关联度的形式,用权重的形式体现各评价指标对评价目标的影响程度,利用标度矩阵判断法确定权重,并采用最优传递矩阵的改进措施,避免一致性检验。

关键词 饲料;膨化;工艺参数;灰色关联度;权重

中图分类号 TH1112

膨化饲料以其适口性好、易于消化吸收、营养利用率高、耐储藏等优点越来越多地被一些养殖户所采用,尤其是在水产和宠物饲养上。饲料膨化是通过膨化机对物料进行一系列的复杂连续处理后使其发生物理、化学反应而形成的多孔状组织物质。饲料膨化加工的关键是选择和确定加工工艺参数,它对产品的质量、生产率、能源消耗等具有重要的影响。优化组合膨化加工工艺参数,是饲料膨化生产的首要问题。目前,对饲料膨化加工工艺参数的优化问题研究较多且方法也趋于成熟,一般采用试验获得相应的数据,然后运用回归分析得到数学模型,最后采取目标规划的方法确定。这些优化的工艺参数是指导加工生产的依据和基础,但是,由于受生产条件和技术水平的限制,有时生产中并不能同时满足这些工艺条件的要求。那么,根据现有可能提供的条件确定一个较优的工艺方案就显得特别重要,而单凭经验和主观意愿是很难得到客观、科学的结果。灰色系统理论主要研究系统模型不明确、行为信息不完全、运行机制不清楚这些系统的建模、预测、决策和控制等问题。用灰色理论来处理非确定性量,能更加逼真地描述客观事物运行规律。本文提出了用灰色关联分析法优化饲料膨化加工工艺参数,其基本思想是根据系统动态过程发展态势及有关统计数据序列曲线的几何形状的相似程度来判断各方案与模式指标列的关联度,从中选取一个最佳方案。

1 膨化工艺参数优化的灰色关联度模型

1.1 灰色关联度分析基本原理

灰色关联度分析实质上是通过比较数据序列的曲线几何形状的接近程度来判断其联系紧密程度。一

般来说,几何形状越接近,变化趋势也就越接近,关联度就愈大,反之就愈小。灰色关联度评价方法是通过计算关联因素变量的数据序列(评价数列)和系统特征变量数据序列(比较数列)的灰色关联度,进行优势分析,得出评价结果。

设 $x_0 = \{x_0(k); k=1, 2, \dots, n\}$ 为评价数列, $x_i = \{x_i(k); k=1, 2, \dots, n; i=1, 2, \dots, m\}$ 为比较数列,则 $x_i(k)$ 与 $x_0(k)$ 灰色关联系数 ξ_{α} 为:

$$\xi_{\alpha}(k) = \frac{\min_i \min_k \Delta_i(k) + \rho \max_i \max_k \Delta_i(k)}{\Delta_i(k) + \rho \max_i \max_k \Delta_i(k)} \quad (1)$$

式中: $\Delta_i(k) = |x_0(k) - x_i(k)|$;

$\min_i \min_k \Delta_i(k)$ —— 两极最小差;

$\max_i \max_k \Delta_i(k)$ —— 两极最大差;

ρ —— 分辨系数, $\rho \in [0, 1]$, ρ 值越小,分辨力越大,一般取 $\rho=0.5$ 。

灰色关联度为:

$$r_{\alpha} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \xi_{\alpha}(k) \quad (2)$$

全体灰色关联度 r_{α} 值构成总关联度 $R = (r_{\alpha 1}, r_{\alpha 2}, \dots, r_{\alpha n})$ 。总关联度中,哪个灰色关联度最大,就说明评价数列与哪个比较数列越接近。

1.2 膨化工艺参数灰色关联优化分析

饲料膨化最佳工艺参数组合一般可通过实验或数学的方法确定,以此来指导生产无疑是最好的。然而,有时由于客观因素的制约,无法全部满足这些工艺参数所要求的条件,而只能根据现场情况提供一些与它们相近的工艺条件。灰色关联分析优化膨化工艺参数,其实质就是对这些候选工艺参数进行评价。评价的原则是它们与最佳工艺参数的相似程度,与最佳工艺参数越接近则工艺方案越优。即确定评价工艺参数的指标数据列,以评价工艺参数的指标数据列为参

舒服华,武汉理工大学机电工程学院,博士,430070,湖北省武汉市武昌区纺织村373号。

收稿日期:2006-12-18

考,计算比较工艺参数样本与评价工艺参数样本的关联度,根据关联度的大小确定各评价工艺参数的优劣,选择一个关联度最大工艺参数作为优化工艺参数。

基本灰色关联度分析法是采用等权重的形式求取关联度,即认为各影响因素对评价目标的贡献率相等,权重均为 $1/n$,而事实并非如此。由于各评价指标性质和特点的差异,它们对评价目标的影响程度不同。所以,本文采用非等权重的形式求取关联度,以体现不同的评价因素对评价目标的影响程度。

目前常用确定权重集的方法有经验法和判断矩阵分析法。本文采用 1~9 比率标度判断矩阵法来求出权重集,方法如下:若因素集中有 n 个评价因素 u_1, u_2, \dots, u_n , 由专业人员两两比较各元素间的相对重要性,构造一个判断矩阵 $C=(c_{ij})_{n \times n}$, C 中的元素 c_{ij} 标度值为 1~9 及其倒数,取值按下述方法进行:

若 u_i 与 u_j 相比

同样重要
稍微重要
明显重要
特别重要
绝对重要

,则 $c_{ij} = \begin{bmatrix} 1 \\ 2 \\ 3 \\ 4 \\ 5 \end{bmatrix}$, 并且, $c_{ji} = 1/c_{ij}$ 。

若 u_i 与 u_j 相比重要程度属于它们各级之间,可用 2、4、6、8 及 $1/2$ 、 $1/4$ 、 $1/6$ 、 $1/8$ 标度。

计算判断矩阵 C 的最大特征值 λ_{\max} 和对应特征向量 (p_1, p_2, \dots, p_n) , 对其作归一化处理,这便是同集中元素 u_1, u_2, \dots, u_n 的权重集 (a_1, a_2, \dots, a_n) 。即:

$$a_i = \frac{p_i}{\sum_{i=1}^n p_i}$$

最大特征值的特征向量也可以利用乘幂法近似求出。即:

$$\rho_i = \left(\prod_{j=1}^n c_{ij} \right)^{1/n}$$

确定出权重集后,要对其进行一致性检验,这样才能保证评价结果的真实可靠。由于在权重集的确定中带有一个人为的因素,难免存在片面性与主观性,造成比较判断矩阵不一定具有客观一致性,因此通常需要一致性检验,若不能通过检验,需要凭借大致的估计来调整判断矩阵。为此,本文利用最优传递矩阵对常规的模糊综合评价法进行改进,使之自然满足一致性要求,不需要进行一致性检验。具体方法如下:

- ① 按照标度法构造判断矩阵 $C=(c_{ij})_{n \times n}$;
- ② 作矩阵 C 的反对称矩阵 $C'=(c'_{ij})_{n \times n}$, 其中

$$c'_{ij} = \lg c_{ij};$$

- ③ 求 C 的拟优矩阵 $C^*=(c^*_{ij})_{n \times n}$, 其中 $c^*_{ij} = 10^{d_{ij}}$, $d_{ij} =$

$$\sum_{k=1}^n \frac{c'_{ik} - c'_{jk}}{n};$$

- ④ 计算拟优矩阵 C^* 的最大特征向量对应的特征值,进行归一化即为所求权重。

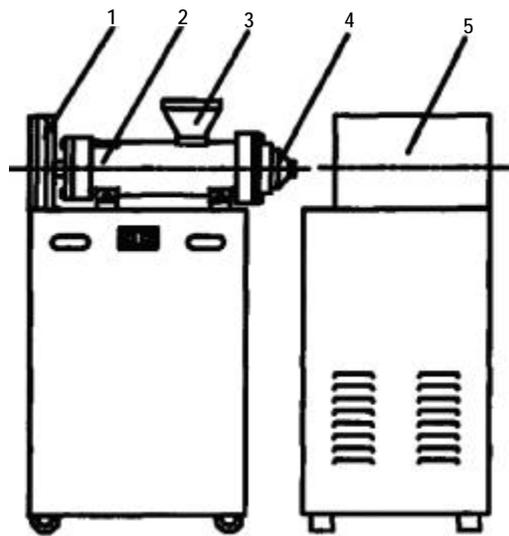
改进的灰色关联度为:

$$r_{\alpha} = \sum_{k=1}^m \xi_{\alpha}(k) \cdot w_k \tag{3}$$

2 优化实例分析

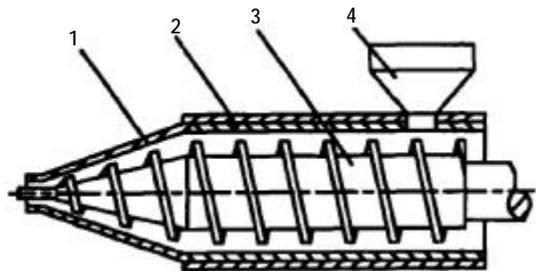
2.1 饲料螺杆挤压膨化原理

以小型单螺杆挤压膨化机新民 SDP-45 膨化大豆粕为例,单螺杆挤压膨化机结构如图 1 所示。它主要由传动装置、喂料装置、膨化装置、成型装置、切割装置及温控、调质等附属装置组成。其中,膨化装置是整个挤压膨化机的中心工作部件,主要由挤压螺杆、套筒和模板等组成,结构如图 2 所示。



1.传动装置 2.膨化装置
3.喂料装置 4.成型装置 5.切割装置

图 1 单螺杆膨化机的结构



1.模头 2.套筒 3.螺杆 4.料斗

图 2 膨化装置结构

膨化工作原理为:疏松的豆粕原料从料斗进入机筒内,随着螺杆的转动,沿着螺槽方向向前输送。由于受到机头的阻力作用,固体物料逐渐压实,同时物料受到来自机筒的外部加热以及物料在螺杆与机筒的强烈搅拌、混合、摩擦、剪切等作用,温度升高,压强增大,变成熔融状态。由于挤压腔端部螺槽容积变小,物料继续升温、升压,使物料发生淀粉糊化,脂肪、蛋白质变性等一系列复杂的生化反应,组织进一步均匀化。然后从一定形状的模孔瞬间挤出,由于物料的高温、高压突然降至常温、常压,其中游离水分在此压力差下急剧汽化,从物料组织结构中蒸发出来,使物料瞬间产生膨胀,从而获得疏松、多孔的物料结构。在挤压过程中将物料加温、加压,使淀粉糊化、蛋白质变性,并使储藏期间能导致产品劣变的各种酶的活性钝化,一些自然形成的毒性物质,例如大豆中的胰蛋白酶抑制因子、脲酶、脂肪氧化酶也被破坏,最终使产品中微生物的数量减少。挤压膨化使物料加热的有利影响(改进消化性)趋于最大,而使有害影响(褐变、各种维生素和必需氨基酸的破坏、不良风味的产生等)趋于最小。

2.2 膨化工艺参数优化

影响饲料膨化结果的工艺参数有螺杆转速、加工温度、喂料速度、模口直径、螺杆构型、物料含水量等;衡量物料膨化效果的指标有膨化率、糊化度、生产率、耗电量等。本文选取物料含水率 $W(\%)$ 、螺杆转速 $n(r/min)$ 、机筒温度 $T(^{\circ}C)$ 三个挤压膨化加工工艺参数为优化对象,其它工艺参数根据生产实际和经验确定。以糊化度和每小时产量指标为饲料膨化加工优化目标。根据正交实验及回归分析优化得到的工艺参数为 $W=35\%$ 、 $n=125 r/min$ 、 $T=210^{\circ}C$ 。根据现有生产条件拟定的5组加工工艺参数见表1,使用灰色关联分析方法从中选择一个较优的工艺方案。

表1 拟定膨化加工工艺参数

项目	含水量 $W(\%)$	螺杆转速 $n(r/min)$	机筒温度 $T(^{\circ}C)$
1	30	120	220
2	35	130	215
3	40	110	200
4	35	120	210
5	40	125	220

2.2.1 确定评价数列和比较数列

比较数列为: $x_i(k) = \{x_{i1}, x_{i2}, x_{i3}\}$

x_{ik} 表示第 i 个比较工艺方案的第 k 个工艺指标值。 $i=1, 2, \dots, 5$ 分别代表工艺方案 1, 2, 3, 4, 5; $k=1, 2, 3$ 分别表示工艺参数评价指标物料含水率、螺杆转速、机筒温度。

评价数列为: $x_0(k) = \{x_{01}, x_{02}, x_{03}\}$

x_{0k} 表示理想工艺参数的第 k 个工艺指标值。 $k=1, 2, 3$ 。

根据评价样本和比较样本得到原始数据见表2。

表2 原始数据系列

项目	1(%)	2(r/min)	3(^{\circ}C)
$x_0(k)$	35	125	210
$x_1(k)$	30	120	220
$x_2(k)$	35	130	215
$x_3(k)$	40	110	200
$x_4(k)$	35	120	210
$x_5(k)$	40	125	220
$\bar{x}_i(k)$	35.83	121.67	212.50

2.2.2 数据无量纲化处理

由于评判指标相互间通常具有不同的量纲和量级,因此不能直接进行比较。为使它们具有可比性,需要对原始数据进行无量纲化处理。处理的方法比较多,它们有各自的优点和不足,且不同的处理方法对评价结果会产生不同影响。常用的有:

① 极小化处理

$$b_i(k) = \frac{a_i(k)}{a_{\max}(k)} \tag{4}$$

② 极差化处理

$$b_i(k) = \frac{a_i(k) - a_{\min}(k)}{a_{\max}(k) - a_{\min}(k)} \tag{5}$$

③ 均值化处理

$$b_i(k) = \frac{a_i(k)}{\bar{a}_i(k)} \tag{6}$$

式中: $b_i(k)$ ——无量纲化数据;

$a_i(k)$ ——为原始数据;

$a_{\min}(k)$ 、 $a_{\max}(k)$ ——对应指标的最小、最大值;

$\bar{a}_i(k)$ ——对应指标的均值。

这些不同的原始数据处理方法改变了数据系列的离散性,从而影响参考系列与比较系列的最小差和最大差,导致关联度的逆序,即排列结果各种各样。从强调被分析对象之间的差异体现得越明显越好的基本原则,本文采用均值化处理,按式(6)对原始数据作无量纲化处理,结果见表3。

表3 无量纲化数据系列

项目	1	2	3
$x_0(k)$	0.976 8	1.027 4	0.988 2
$x_1(k)$	0.837 3	0.986 3	1.035 3
$x_2(k)$	0.976 8	1.068 5	0.941 2
$x_3(k)$	1.116 4	0.904 1	1.011 8
$x_4(k)$	0.976 3	0.986 3	0.988 2
$x_5(k)$	1.116 4	1.027 4	1.035 3

2.3 计算关联系数

计算各比较数列与评价数列的差,结果见表4。

表4 数据绝对差系列

项目	1	2	3
$ x_1(k)-x_i(k) $	0.139 5	0.041 1	0.047 1
$ x_2(k)-x_i(k) $	0	0.041 1	0.047 2
$ x_3(k)-x_i(k) $	0.139 6	0.123 3	0.023 6
$ x_4(k)-x_i(k) $	0	0.041 1	0
$ x_5(k)-x_i(k) $	0.139 6	0	0.047 0

两极最小差 $\min_i \min_k \Delta_i(k)=0$, 两极最大差 $\max_i \max_k \Delta_i(k)=0.139 6$ 。取 $\rho=0.5$,按式(1)计算比较样本的关联系数,结果见表5。

表5 关联系数系列

项目	1	2	3
$\xi_{01}(k)$	0.333 5	0.629 4	0.597 1
$\xi_{02}(k)$	1	0.629 4	0.597 6
$\xi_{03}(k)$	0.333 3	0.361 5	0.737 7
$\xi_{04}(k)$	1	0.629 4	1
$\xi_{05}(k)$	0.333 3	1	0.597 6

2.4 确定权重值

根据正交实验及回归分析可知,影响大豆膨化效果的工艺参数的因素主次顺序为:螺杆转速>物料含水率>膨化温度。由此确定标度值见表6。

$$R = \begin{pmatrix} r_{01} \\ r_{02} \\ r_{03} \\ r_{04} \\ r_{05} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0.333 5 & 0.629 4 & 0.597 1 \\ 1 & 0.629 4 & 0.597 6 \\ 0.333 3 & 0.361 5 & 0.737 7 \\ 1 & 0.629 4 & 1 \\ 0.333 3 & 1 & 0.597 6 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} 0.384 \\ 0.424 \\ 0.192 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0.509 6 \\ 0.765 6 \\ 0.422 9 \\ 0.842 8 \\ 0.666 6 \end{pmatrix}$$

即 $r_{01}=0.509 6, r_{02}=0.765 6, r_{03}=0.422 9, r_{04}=0.842 8, r_{05}=0.666 6$ 。

由 $r_{04}>r_{02}>r_{05}>r_{01}>r_{03}$,得到5种拟定工艺参数的优劣的排序为:4、2、5、1、3。

由此可见,工艺方案4相对较优,它与理想的工艺参数较接近。

3 结语

膨化加工工艺参数对饲料膨化的质量、生产率、经济效益具有决定性意义。饲料膨化加工工艺是复杂多变的,即使确定了最优工艺方案,由于客观原因,实际生产中有时也未必能够实现。根据实际情况确定可行的、较佳的工艺参数是十分重要的。在众多的候选工艺方案中选择一个最佳的方案,其核心就是对各个工艺参数进行科学合理的评价。饲料膨化工艺参数评价

表6 标度值确定

项目	含水率	螺杆转速	机筒温度
含水率	1	1/2	2
螺杆转速	2	1	3
机筒温度	1/2	1/3	1

标度矩阵为C:

$$C_3 = \begin{pmatrix} 1 & \frac{1}{2} & 2 \\ 2 & 1 & 3 \\ \frac{1}{2} & \frac{1}{3} & 1 \end{pmatrix}$$

C反对称矩阵为:

$$C' = \begin{pmatrix} 0 & -0.389 & 0.389 \\ 0.389 & 0 & 0.519 \\ -0.389 & -0.519 & 0 \end{pmatrix}$$

C_3 的拟优称矩阵为:

$$C^* = \begin{pmatrix} 1 & 0.408 & 2.449 \\ 0.408 & 1 & 3.303 \\ 0.408 & 3.303 & 1 \end{pmatrix}$$

利用乘幂法求得 C' 的特征向量为(0.999 7、1.105 0、0.498 1),作归一化处理得权重为 $A=(0.384、0.424、0.192)$ 。

2.5 计算灰色关联度

由式(2)关联度计算公式和矩阵运算法则计算评价样本的关联度:

$$\begin{pmatrix} 0.509 6 \\ 0.765 6 \\ 0.422 9 \\ 0.842 8 \\ 0.666 6 \end{pmatrix}$$

涉及到许多模糊性、随机性的因素,灰色关联度评价法能够处理系统中的部分确定和不确定信息,为饲料膨化工艺参数评价和优化问题提供了新的途径。它能定量地处理评价中的灰色因素,所有评价指标有效数据对评价结果均产生影响,评价过程没有丢失信息现象,评价结果直观、可靠,弥补了传统评判法的不足。针对基本灰色关联度分析模型权重分配和确定不恰当对评价结果产生的影响,本文采用加权灰色关联度评价方法进行改进,充分反映各评价指标对目标的影响程度,利用标度矩阵判断法权重,使得对饲料膨化加工工艺进行评价和优化结果更科学、合理。

(参考文献5篇,刊略,需者可函索)

(编辑:崔成德, cuicengde@tom.com)

谈温度自动控制系统在虾料稳定器上的运用

唐定邦 陈宝云

虾料的水中稳定性是非常关键的一个指标,一般要求达到 60 min(本文只讨论纯天然的、没有添加黏合剂的虾料生产过程)。如果控制不理想,20 min 料就已经溶失了,不但造成虾的采食率低,而且影响水质,因此,虾料的后熟化非常关键。

目前国内饲料行业生产虾料选用的后熟化器大多是稳定干燥组合系统,由稳定仓和干燥段两部分组成。黄海粮油饲料厂选用的是国产的卧式稳定干燥机,使用手动阀门控制稳定器中的温度,在使用中发现,生产时间较长时,稳定仓的温度难以控制,产生糊料,从而导致生产停顿。

1 工艺介绍

在制粒机开机之前,一般需要对稳定仓进行 40 min 的预热。关闭稳定仓下液压翻板,打开手动阀门对稳定仓添加蒸汽(蒸汽压力 0.3 kgf/cm²)。通过直接和间接两种加热方式对稳定仓加热,当温度达到 82 ℃(在稳定仓空仓的情况下,很难将温度提得更高)时,制粒机开机,生产的颗粒料经溜管和关风器进入稳定仓,饲料在直接蒸汽和间接蒸汽的作用下加热熟化。随着饲料热量的带入,稳定仓的温度将会持续升高,达到甚至超过 100 ℃。这时候,需要调整阀门的开度,降低蒸汽的添加量。

饲料在稳定仓的停留时间大约是 15~20 min。当料厚度达到稳定仓料位器的高度时,液压翻板打开,饲料在重力的作用下离开稳定仓,在布料器的作用下,均匀分布在干燥段的网带上,干燥段的温度一般设定为 80 ℃左右(70~90 ℃是理想的温度区间),在干

燥段停留的时间大约是 12 min(不同粒径要求停留的时间不同)。在干燥段经过加热空气的高温烘焙,饲料的水分部分蒸发,得到进一步熟化。经过熟化的虾料,其水中稳定性能够达到 1 h。但是手动调节蒸汽的方式仅能进行小规模生产,一次可以连续生产 20 t,超过就会产生糊料,造成生产停顿。这就需要对稳定仓的温度控制系统进行改造。

2 现象分析

随着虾料产量的增大,我们发现连续生产 9 h 时,稳定仓的温度难以控制,从而产生糊料,并且产品的水中稳定性较差,生产难以顺利进行。经我们跟踪观测发现:由于使用国产减压阀,减压后的蒸汽压力不稳定,稳定仓的温度难以较精确的控制。尽管在接近仓内温度的上限时,手动关闭了蒸汽阀门,但仓内的余热还是使料的温度达到或超过了熟化所需要的温度上限(102 ℃),从而产生糊料;在温度较低时又难以及时提升仓内的温度,使仓内温度较低,这样又造成产品的水中稳定性较差。为了更好地控制仓内的温度,需要有一套温度控制系统,在仓内温度接近或达到温度的上限时能及时关小或关闭蒸汽阀门;在温度接近或达到温度的下限时能及时打开蒸汽阀门,蒸汽阀门的开关程度随仓内温度的变化而变化,就可以解决问题。

3 系统使用介绍

根据稳定仓的温度控制要求,在手动蒸汽阀上再并联安装一套自动调节阀,原手动阀门管线作为旁通,对稳定仓预热的时候使用,见图 1。

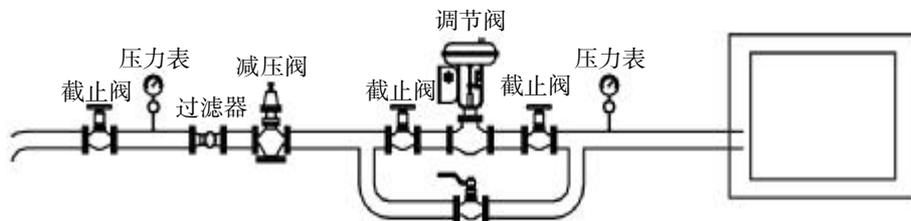


图1 控制系统

唐定邦,黄海粮油工业(山东)有限公司饲料部,工程师,276808,山东省日照市岚山港北。

陈宝云,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-01-23

该系统为单回路控制系统,被控参数为稳定仓的温度,控制参数为加热蒸汽量。因为设计温度要求控制在 98~102 ℃之间,所以对控制阀的控制精确度要求很高,我们采用的温度控制阀是德国某公司的产

品,该阀带有电-气阀门定位器,能够利用负反馈的原理来改善调节阀的定位精度和灵敏度,使调节阀能按控制器传来的控制信号实现准确定位,控制精确度非常高。

在生产时,预热过程同前。我们设定仓内温度的上限 102 ℃,工作时,温度传感器将采集的温度数据实时传输到控制器,参数的整定采用工程整定法中 4:1 衰减曲线法计算,计算精确度非常高。通过调整

压缩空气量来调整蒸汽阀门的开度,温度越接近设定温度上限,阀门开动的速率越小,直到温度达到设定的上限,阀门关闭,非常及时有效地控制了仓内的温度,从而杜绝了糊料的产生。在阀门关闭一定时间,仓内温度有所下降时,阀门就自动打开,越接近下限,阀门开启的速率越大,及时提高仓内的温度,使虾料充分熟化,从而保证虾料的水中稳定性。系统参数设置见表 1。

表 1 系统参数设置(蒸汽压力 0.3 kgf/cm²;制粒机产量 2 t/h)

项目	参数	项目	参数
进稳定仓前料的水分含量	13.1%	上层输送带电机频率	35 Hz
稳定器温度范围	98~102 ℃	下层输送带电机频率	45 Hz
稳定时间	15 min	干燥时间	12 min
干燥箱温度	80 ℃(70~90 ℃)	出干燥箱后料的水分含量	12.5%

在以上参数控制的条件下,生产的产品颜色均匀,水中稳定性达到 1 h。当然,受蒸汽质量、原料水分、制粒产量等多种因素的影响,参数的设定并不是一成不变的,需根据实际情况灵活处理。

4 使用效果

自从 2006 年 6 月份安装使用以来,系统工作一直非常正常,方便可靠,满足了生产工艺的要求,稳定仓的温度控制非常稳定,保证了虾料的品质,提高了

虾料的出成率,使我厂虾颗粒料的出成率从 2005 年的 75%提高到 88%。2006 年共生产虾料 2 000 t,减少回机料 260 t,每吨虾料的回机成本是 400 元左右,降低生产成本约 10 万元。同时,虾料的稳定性也大为提高,溶失时间从 30 min 提高到 60 min;虾料的颜色也更加均匀,为虾料的销售提供了有力的保障。

(编辑:崔成德, cuichengde@tom.com)

“小肽营养,全球共享”有奖征文

肽作为动物消化道蛋白质的主要酶解产物,是迅速吸收的氨基酸供体,并且能够调节机体的生命活动。活性肽在调节动物消化系统、神经系统、内分泌、免疫机能的活性作用等方面有着重要的作用。近年活性短肽在动物蛋白质营养中的作用越来越受到关注,对生物活性肽功能的认识及其生产日益广泛。开发利用这些生物分子作为饲料添加剂,调控动物的营养代谢机制,提高畜禽生产性能和效益,在新世纪将成为新的研究热点,具有广阔的前景。

2007 年美国华达(VBC)广州技术中心与饲料工业杂志社共同发起“小肽营养,全球共享”有奖征文活动。旨在报道小肽类产品的研究和应用状况,推动小肽领域向更高层次发展。本栏目将重点介绍国内外小肽领域的最新研究进展(包括小肽最新定量与定性检测方法的研究,小肽类产品的最新实际应用试验及新的生产制备工艺等相关知识)。并结合饲养试验报告,探讨动物在最佳生产性能状况下小肽和游离氨基酸的比例、小肽优化饲料配方设计技术,进一步探讨小肽吸收代谢及其作用形式,研究小肽对动物生长和免疫调节的作用机理,为蛋白质营养研究开辟一条新途径,以充分利用蛋白质资源提高生产效益和维护生态文明。

“小肽营养,全球共享”有奖征文,于 2007 年 1~12 月共刊发 12 期,为鼓励大家积极参与,回报作者的辛勤付出,凡投稿本栏目者均可获得华达生化科技饲料(湖北)有限公司设立的纪念奖一份;通过三审后刊登的稿件除《饲料工业》杂志社给予相应稿酬外均可获得华达公司提供的鼓励奖(500 元人民币/篇),同时刊登的稿件可参与年度优秀稿件的评选活动。主办方本着公平、公正的原则评奖,评委由《饲料工业》杂志社、美国 VBC 小肽专家委员会专家组担任,评选结果将在《饲料工业》第 24 期公布,获奖者将获取奖金并颁发荣誉证书。奖项金额如下:

一等奖(1名)奖金 5000 元;二等奖(3名)奖金各 1000 元;
鼓励奖(12名)奖金各 500 元;纪念奖(若干名)纪念品一份。

热诚欢迎业内仁人志士踊跃赐稿! 来稿请发至 tg@feedindustry.com.cn (请注明有奖征文) 联系电话: (024) 86391926



小肽营养 全球共享

美国华达 (VBC) 中国广州技术中心



[本栏目由美国华达 (VBC) 中国广州技术中心协办]

小肽饲料营养价值及评价方法

郭玉东 张 洋 张均国

摘 要 小肽一般是指二肽或三肽,小肽饲料就是通过化学或生物方法将本来不适合动物利用的蛋白原料分解,制成含有大量小肽的饲料产品。小肽饲料的营养价值在于小肽的吸收优势和其自身的质量。根据影响小肽营养价值的因素,可以选取小肽的总含量、平均肽链长度、特定小肽的含量、特定氨基酸的含量作为评价小肽饲料营养价值的指标。目前小肽含量的测定方法主要有双缩脲法、福林-酚法、三氯乙酸法、甲醛滴定法、凯氏定氮法、紫外光吸收法、消光系数法、考马斯亮兰法、层析比色法、高效凝胶色谱法、高效液相色谱法和 CE-ESI-MS 联用法。

关键词 小肽;营养价值;评价指标

中图分类号 S816.15

The evaluation method for nutrition of small peptide feed

Guo Yudong, Zhang Yang, Zhang Junguo

Abstract Generally, small peptide includes dipeptide and tripeptide. Small peptide feed, which contains a lot of small peptide, is produced with bad protein material by chemical or biological technique. The nutritional value of small peptide feed includes its advantage in absorption and its quality. Based on the facts which affect the small peptide feed's value, we choose total content of small peptide, average peptide length (APL), content of special peptide, and content of special amino acid as the index to evaluate the small peptide feed. The main assay methods include Biuret method, Lowry method, trichloroacetic acid method, formol-titration method, Kjeldahl determination method, UV absorption Spectrum, extinction coefficient method, Bradford method, chromatography and spectrophotometry, HPGC, HPLC and CE-ESI-MS.

Key words small peptide; nutrition; assessment index

传统的代谢模型认为蛋白质必须水解成氨基酸后才能被吸收利用,饲料中氨基酸比例符合理想蛋白质模型就能获得最大的营养效果。但近些年的研究表明,不同来源的饲料氨基酸利用率存在差异,而且在给动物喂以按理想氨基酸模式配制的纯合日粮或低蛋白质氨基酸平衡日粮时,不能获得最佳生产性能。现代研究认为,蛋白质在动物消化酶作用下的水解终产物大部分是由 2 个或 3 个氨基酸残基组成的小肽,它们以完整的形式被吸收进入循环系统而被组织利用。以此理论为基础,很多饲料企业开发了小肽饲料,做为饲料添加剂应用于动物饲料中。但是到目前为止,小肽市场仍十分混乱,小肽产品良莠不齐,这归根

结底是由于缺乏小肽营养标准。而科学的营养价值评价方法是营养标准的前提,本文对制定合适的小肽营养价值评价方法进行了一些探索,综述了评价小肽营养价值的指标和测定方法。

1 小肽和小肽饲料的概念

评价小肽饲料的营养价值,首先要对小肽和小肽饲料的概念有一个明确的定义。肽是氨基酸的线性聚合物,含氨基酸残基 50 个以上的通常称为蛋白质,低于 50 个氨基酸残基的称为肽。最简单的肽由两个氨基酸残基组成,称为二肽 (dipeptide),其中含一个肽键。含 3 个、4 个、5 个氨基酸残基的肽分别称为三肽、四肽、五肽。通常把含几个至十几个氨基酸残基的肽链统称为寡肽 (oligopeptide),更长的肽链称为多肽 (polypeptide)。有的学者把超过 12 个而不多于 20 个氨基酸残基的称寡肽,含 20 个以上氨基酸残基的称为多肽。在动物营养学上一般认为“含 2 个或 3 个氨基酸残基的肽为小肽”。小肽饲料是一种功能营养性添

郭玉东,东北农业大学动物科学技术学院,150030,哈尔滨市东北农业大学 316 信箱。

张洋、张均国,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-12-18

加剂,也称为小肽营养素。小肽饲料的产生是基于现代营养学的研究成果。研究者认为,蛋白质在消化道中的消化终产物的大部分往往是小肽而不是游离氨基酸(FAA)。小肽能完整地通过肠粘膜细胞进入体循环。小肽的吸收具有转运速度快、耗能低、载体不易饱和等优点,且各种肽之间转运无竞争性与抑制性。小肽也是组织内氨基酸的重要来源之一,动物组织可以直接利用小肽中的氨基酸合成组织蛋白。根据这些研究结果,可以确定小肽是一种更优质的氮源。于是人们开始研究如何生产小肽饲料。在当前的生产工艺下,小肽饲料就是通过化学或生物方法将本来不适合动物利用的蛋白原料分解,制成的含有大量小肽的饲料产品。现在生产小肽饲料的方法主要有酸解法、酶解法、微生物发酵法三条途径。酸解法通过强酸、强碱的作用分解大分子蛋白为小分子肽,由于强酸、强碱具有腐蚀性,该法会带来大量的污染;酶解法利用酶的定向分解的特性将大分子蛋白分解为小分子肽;微生物发酵法是利用微生物的生化反应将蛋白转化为肽。仅就制备小肽来说还有化学合成法、重组 DNA 法等,但目前仍不适合商业化生产。

目前市场上很多小肽饲料并不符合小肽的定义,简单地把寡肽甚至分子量较小的多肽称为小肽,这样做忽略了小肽和寡肽、多肽的区别。肽链的长度是影响肽吸收的原因之一,肽转运主要限于二肽、三肽,对长链肽大量转运的可能性很小,这样的饲料产品其实并不具有小肽在吸收方面的特点。

2 影响小肽饲料营养价值的因素

作为一种饲料产品,小肽饲料的营养价值一方面在于小肽在吸收方面相对于 FAA 的巨大优势,另一方面取决于饲料本身的质量。

2.1 影响小肽吸收的因素

2.1.1 肽链的长度

目前的研究认为,二肽和三肽能被完整的吸收,但三肽以上的寡肽是否能完整吸收还有争议。Grimble 等报道,肠道对大于三肽的寡肽吸收慢于小肽,肠道内胰蛋白酶、肽酶对其进一步水解可能是寡肽吸收的主要限速反应。当蛋白质水解产物中的寡肽和 FAA 所占比例较高时,寡肽能诱导肠肽酶的分泌,在肠肽酶的进一步作用下水解释放出 FAA,使 FAA 的浓度提高,从而加剧 FAA 吸收的竞争抑制,进一步减慢肽的吸收速率。但是,反刍动物瘤胃细菌对大分子肽的摄取速度比小分子肽和氨基酸摄取速度快,且利用效率更高,虽然细菌对低分子量的蛋白质降解产物(小分子量的肽和氨基酸)发酵较快,但大分子肽更容易转化为菌体蛋白质。

2.1.2 肽的氨基酸残基组成

肽的氨基酸残基组成是影响肽吸收的另一个重要因素。当赖氨酸(Lys)与甘氨酸(Gly)形成二肽时,Lys 处于 N 端比处于 C 端吸收得更快;而 Lys 与谷氨酸(Glu)形成二肽时,Lys 处于 C 端时吸收更为迅速。L 型小肽比 D 型小肽更易被动物吸收,中性小肽比酸、碱性小肽更易被动物吸收。当肽是由疏水性且体积较大的底物如 Met 和 Phe 构成时,载体对肽就有较高的亲合力,因而转运速度较快;而亲水性且带电荷的小肽,载体对其亲合力较小,所以转运速度较慢。乐国伟等研究发现,含疏水性的苯丙氨酸的肽类对肽载体的亲和力高,以肽形式吸收可能是苯丙氨酸吸收本身的需要。

Broderick 等研究了混合瘤胃微生物对中性肽的代谢,发现含有 3 个丙氨酸残基的肽代谢最快,其次是 Leu(Gly)₂、Gly(Ala)₂,然后是其它中性三肽、二肽代谢速度相似,但 Gly-Pro 较慢,(Ala)₂ 代谢较 Gly-Pro 快;在由丙氨酸残基构成的肽中,三肽代谢速度大于四肽,然后是五肽,二肽最慢。由此可见,肽链的氨基酸序列对肽的利用率也有影响。通过研究 Lys-Pro 肽、Lys-Ala 肽、Met-Ala 肽的效应发现,前两种肽的代谢速度比后一种肽慢 4 倍。

2.1.3 肽的来源

程茂基等通过体外培养发现,反刍动物对瘤胃液肽的摄取量和摄取率显著高于大豆肽(P<0.05)和玉米肽(P<0.05),表明肽来源不同能影响其吸收和利用。

2.2 决定小肽饲料质量的因素

2.2.1 小肽饲料中小肽的含量

小肽是小肽饲料中的有效成分。不同生产工艺下小肽饲料中小肽的含量是不同的,小肽含量的高低决定了小肽饲料的营养价值。小肽含量既要求饲料中要有足够的肽,又对这些肽的分子量有要求。

2.2.2 小肽饲料中高价值氨基酸的含量

小肽最终是要进入动物体内充当动物组织蛋白的氨基酸残基。不同的氨基酸在体内的重要性大不相同。以赖氨酸、蛋氨酸等限制性氨基酸的残基为主要组成成分的小肽必然具有更高的营养价值。另外,一些氨基酸之间存在拮抗作用,包含这些氨基酸残基的小肽其营养价值也会高于其它小肽。

2.2.3 小肽饲料的特殊功能

除了作为蛋白饲料应具有的营养价值外,小肽饲料还有许多其它的功能。首先,小肽能促进微量元素的吸收。以小肽为主要配体的微量元素螯合物,利用小肽的吸收转运机制和特点,可能以整体的形式被转运,因而能够促进微量元素的吸收,更有利于微量元

素生物学效价的提高。大量的研究表明,小肽络合物形式的矿物离子更易被机体吸收,而且小肽螯合物的稳定性较氨基酸螯合盐(AAC)更高。其次,小肽能促进动物对其它营养物质的消化率。Siddons(1975)通过在绵羊日粮中添加不同水平的小肽蛋白替代植物蛋白(各处理组总蛋白水平相同),发现动物对能量的利用率有显著的提高($P<0.05$)。再次,小肽能提高动物的生产性能。施用晖等报道,在蛋鸡基础日粮中添加肽制品后,其产蛋率和饲料转化率显著提高,蛋壳强度也有提高的趋势。曹志军等试验结果表明,荷斯坦牛日粮中添加小肽比不添加小肽能较明显地提高乳蛋白率($P<0.05$),同时添加保护性小肽比添加普通小肽产奶量提高 10.91%。王恬等试验表明,添加小肽营养素后,无论是乳蛋白还是乳脂率,试验组均比对照组有所提高,且随着小肽营养素添加浓度的增加有提高的趋势,小肽营养素对乳品质的提高具有一定的促进作用。不同小肽在这些生理功能中的贡献是不一样的,因此某些特定种类的小肽的含量决定了小肽饲料的特定功能。

3 小肽营养价值的评价指标及测定方法

3.1 评价小肽饲料价值的指标

根据小肽的概念和影响其价值的因素,我们可以把小肽饲料的营养品质分成以下几个方面进行考虑。

3.1.1 小肽的总含量

所有的小肽饲料都含有载体、稀释剂等成分,其比例根据产品的生产方式、厂家及市场定位而有所不同。小肽是饲料中的有效成分,它在饲料中所占的比例是影响小肽饲料质量的最重要因素,因此必须测定饲料中小肽的总含量。

3.1.2 平均肽链长度

小肽指的是二肽或三肽,大于三肽的并不容易被动物机体吸收。许多小肽饲料中的肽其实是寡肽和多肽,这些肽分子仍然要经过消化后才能吸收,饲料中平均肽链长度是影响小肽质量的一个重要因素,反映了饲料中有效小肽所占的比例。

3.1.3 特定小肽的含量

小肽由 20 多种氨基酸残基中的两个或三个构成,这些氨基酸残基的任意一种组合都是一种特定的小肽,再加上不同的分子构象,小肽的家族非常庞大。不同小肽被吸收的能力、营养价值和生理功能并不相同。因此测定特定小肽的含量也是评价小肽营养价值的重要指标。

3.1.4 特定氨基酸的含量

对动物机体来说,不同的氨基酸具有不同的价值。小肽作为动物体内蛋白质的氨基酸来源,其所包

含的氨基酸决定了饲料的价值,因此小肽饲料中特定氨基酸的含量也是一个非常重要的指标。

3.2 小肽饲料价值指标的测定方法

3.2.1 小肽总含量的测定方法

3.2.1.1 双缩脲法

双缩脲法的原理是利用蛋白质和肽分子中含有的肽键(CO-NH-)具有双缩脲反应的特性。在碱性溶液中蛋白质或肽与 Cu^{2+} 形成紫红色的络合物,络合物颜色的深浅与其浓度成正比。所以它是蛋白质和肽类物质的特异性测定方法。双缩脲法测定灵敏度不高,一般测试浓度在 1~10 mg/ml 之间。此法尤其适合于肽类物质的测定,但只能测定二肽以上的肽,造成测定结果偏低。对于小肽来说,双缩脲法会把三肽以上的肽也算在小肽里面,因此只适合可以确定饲料中只含有三肽的饲料。

3.2.1.2 福林-酚法(Lowry 法)

福林-酚法是在双缩脲法的基础上发展起来的。首先是在碱性溶液中蛋白质与 Cu^{2+} 形成紫红色的络合物,然后该络合物再与还原磷钼酸-磷钨酸试剂反应产生深蓝色溶液。此法适合于蛋白类的定量分析,灵敏度较高,检测低限为 5 μg ,通常测定范围在 20~250 μg 之间,但专一性不强。同双缩脲法一样,此法也只适合可以确定饲料中只含有三肽的小肽饲料的检测。

3.2.1.3 三氯乙酸(TCA)法

三氯乙酸法的原理是利用大分子的蛋白质在 TCA 溶液中沉淀,除去酸不溶蛋白质,然后测定酸溶蛋白含量。国外大量资料表明,在蛋白质酶水解的研究中测定水解度,通常在酶解液中加入 TCA 溶液,使未水解的大分子蛋白质沉淀,而与小分子的酸溶蛋白成分,即肽类和 FAA 离开,测定酸溶蛋白占总蛋白的含量,求得水解度,即酸溶蛋白占总蛋白的百分比。日本某公司将 TCA 可溶蛋白做为大豆肽的常规检测方法。大豆肽粉行业标准中酸溶蛋白质的测定方法就是将肽粉经酸沉处理后用国家标准(GB14771-1993)的方法测定酸溶蛋白,游离氨基酸含量测定方法采用 GB/T14965 食物中氨基酸的测定方法,酸溶蛋白质含量减游离氨基酸含量即为大豆肽含量。

3.2.2 平均肽链长度的测定

测定平均肽链长度需要测定 α -氨基氮($\alpha\text{-NH}_2\text{-N}$)含量和总氮(TN)含量。用甲醛滴定法测定 $\alpha\text{-NH}_2\text{-N}$ 含量,总氮用凯氏定氮法测定。然后计算平均肽链长度,公式如下:

$$\text{平均肽链长度(APL)} = \frac{\text{TN}}{\alpha\text{-NH}_2\text{-N}}$$

3.2.3 特定小肽和氨基酸含量的测定

3.2.3.1 紫外光吸收法

分子中含有芳香族氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸、组氨酸等)的肽,在 280 nm 处有最大吸收峰。肽在最大吸收峰 λ_{\max} 波长处的吸光值的强弱与蛋白的浓度成正比。这种方法适合对分子中含有芳香族氨基酸的肽进行定量分析,对不含芳香族氨基酸的肽灵敏度较低。

3.2.3.2 消光系数法

分子中含有芳香族氨基酸残基的肽,在 280 nm 处有特定吸光值。肽分子中所含氨基酸数量不同,它们在 280 nm 处吸光值的强弱就有差异。因此,每一种纯的单一肽在 280 nm 处有一个特定的消光系数。如果已知某个小肽的消光系数,只要在 280 nm 处测定出该蛋白吸光值就可以计算出其相应的含量。

3.2.3.3 考马斯亮兰法(Bradford 法)

1976 年由 Bradford 建立的考马斯亮兰法,是根据蛋白质与染料相结合的原理设计的。这种蛋白质测定法具有超过其它几种方法的突出优点,因而正在得到广泛的应用。这一方法是目前灵敏度最高的蛋白质测定法。考马斯亮兰 G-250 染料,在酸性溶液中与蛋白质结合,使染料的吸收峰位置由 465 nm 变为 595 nm,溶液的颜色也由棕黑色变为蓝色。经研究后人们认为,染料主要是与蛋白质中的碱性氨基酸(特别是精氨酸)和芳香族氨基酸残基相结合。在 595 nm 下测定的吸光度值 A_{595} ,与蛋白质浓度成正比。Bradford 法的突出优点是:①灵敏度高,据估计比 Lowry 法约高 4 倍;②测定快速、简便,只需加一种试剂,完成一个样品的测定只需要 5 min 左右;③干扰物质少,此法可以用来测定含碱性氨基酸的肽的含量。

3.2.3.4 层析比色法

通过层析柱将不同分子量的肽或氨基酸一一分开,用比色法测定其浓度,再采用已知分子量的肽类和氨基酸做标准曲线,从而计算出一定分子量范围内肽类的含量。该方法与以前的方法相比有很大的进步,但基本上仍属化学法,操作繁琐,人为误差较大。

3.2.3.5 高效凝胶色谱法(HPGC)

该法在层析比色法的基础上,进行了仪器自动化的改进,准确性高、重现性好、数据处理科学,能真实地表示出蛋白质和肽类的分子量分布。分子量分布的测定不但能定性地鉴定肽类产品的优劣、真伪,而且能定量的表示出不同分子量范围的肽的百分含量。国家药品标准《转移因子溶液》WS1—XG—036—2000 中,将该方法做为转移因子(一种肽类)的标准分析方法。

3.2.3.6 高效液相色谱法(HPLC)

高效液相色谱法是 20 世纪 60 年代发展起来的一种新型分离分析技术,随着不断改进与发展,目前已成为应用极为广泛的重要化学分离分析手段,是常用的小肽分析方法。高效液相色谱法分为两种;一种用反相 C18 柱,用乙腈和 0.1% TFA 或高氯酸的水溶液进行梯度洗脱分离,有的还需加入十二烷基磺酸钠;另一种是以分离氨基酸的经典反相高效液相色谱(HPLC)条件,对小肽进行柱前或柱后衍生化来进行测定。邹娟娟等研究了反相 HPLC 分离分析化学合成的 O₆ 肽的方法。欧宇认为 HPLC 测定小肽含量简便、准确,结果稳定,可以用来测定已知小肽在瘤胃中的释放情况。冯健等使用 HPLC 法测定草鱼血浆肽和虾蛋白肽中小肽总量。但是该法成本高、耗时长,不适用一般饲料企业的快速测定。刘庆生等研究了新型离子色谱的氨基酸分析系统和积分脉冲安培检测对小肽的检测,结果发现此方法无需衍生,可以直接分离测定小肽和氨基酸,而且操作简单、重现性好,其流动相为水、氢氧化钠和醋酸钠溶液,有环境污染小、危险性小和排放少等优点。

3.2.3.7 CE-ESI-MS 联用法

毛细管电泳(CE)作为一种高效、快速的分离方法,样品用量少,已被广泛应用于小肽和蛋白质的分离分析。质谱(MS)能够进行微量鉴定,并提供精确的分子量和结构信息,使其成为小肽和蛋白质检测及序列测定强有力的支撑技术之一。其中的电喷雾(ESI)质谱作为一种软电离技术,易与常规的高分辨率分离方法如高效液相色谱、毛细管电泳等实现在线联用,具有分离效率高、检测灵敏度高和样品定性方便等特点,因而在小肽和蛋白质的测定中得到广泛的应用。梁振等研究了 CE-ESI-MS 联用测定小肽混合物的技术,其检测限可达 4.2-33 pg。

4 总结

随着小肽制品商业化的不断深入,制定科学、统一的小肽标准,对小肽饲料进行营养价值的评定已非常必要。科学的测定方法是小肽标准的制定和使用的保证。明确小肽的概念,了解影响小肽饲料营养价值的因素是评定小肽价值的前提,在此基础上我们要选择必要的测定指标,然后筛选相应的测定方法。目前,测定小肽含量的方法有很多种,但从中发展出一套科学有效的测定方法做为小肽标准的尺度仍是一个艰难的任务,有待进一步的研究。

(参考文献 38 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:张学智, mengzai007@163.com)

影响肌肉生成的调控因子

刘燕 杨琳

肌肉组织是胚胎发育过程中最早形成的组织之一,研究肌肉发生(myogenesis)对于理解胚胎发育的全过程具有重要意义。肌肉发生主要是指在胚胎发育的过程中,体节细胞经过一系列的增殖、迁移、分化,最终形成肌肉组织的过程,还包括成体表型的维持与组织再生。有关肌肉发生分子机制的研究取得了重要进展,以 bHLH(basic helix-loop-helix)家族肌肉发生调控因子(myogenic regulatory factors, MRFs)为核心的信号传导网络在肌细胞分化过程中的作用已得到公认。早期实验推测, bHLH 家族因子 MyoD、Myogenin、Myf5 与 MRF4 可以完全启动肌细胞的特异性与分化,并且 4 种因子间可相互替代。而近期实验表明,在肌肉发生的各阶段,不同的 MRFs 发挥各自不同的作用。此外, MRFs 控制肌肉发生还依赖于细胞间相互作用及与其它相关因子间的作用。因此本文就影响肌肉生成的调控因子加以阐述。

1 生肌调节因子

自从 1987 年 Davis 等人用差减克隆(substraction-cloning)法证明了肌肉发生决定基因 MyoD 的存在以来,随着研究的深入,人们逐渐发现了 MyoD、Myf5、Myogenin、MRF4 四个肌肉专一的生肌调节因子,共同称为 MyoD 家族。MyoD 基因家族主要在骨骼肌肌肉细胞中表达,而且作为主控基因而存在,可激活肌肉基因转录,促进肌肉分化,所以整个 MyoD 家族成员在肌肉发生与分化过程中起着重要的作用。

MyoD 家族有着相似的结构特征,即都有一个高度同源的特异性的碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构域。通过对 MyoD-DNA 晶体结构的研究结果表明:bHLH 的 α 螺旋的功能是使蛋白质之间形成二聚体,碱性区则提供与靶 DNA 的识别位点, MRFs 识别的靶 DNA 具有共同序列 -CAN-NTG(N 代表任何一种碱基),称为 E-box。MRFs 通过与 E 蛋白家族的另一类 bHLH 形成异二聚体识别靶 DNA 上的 E-box 并结合,从而活化肌肉特异性蛋白的

表达。与其它 bHLH 相比, MRFs 在 bHLH 的碱性域及绞链区具有 3 个保守的氨基酸 Ala、Thr 和 Lys, 它们在蛋白质间的识别以及构象形成上具有重要的作用。

MyoD 家族对肌肉发生起重要调节作用,可激活肌肉基因转录,促进细胞分化,抑制细胞生长,使很多非肌细胞转化为肌细胞,这些细胞包括:成纤维母细胞、脂肪细胞、黑素瘤细胞、肝细胞瘤细胞、成神经细胞瘤细胞、骨肉瘤细胞和畸胎瘤细胞,以及原代培养的软骨细胞、平滑肌细胞、视网膜色素细胞和脑细胞等。

MyoD 家族成员结构的同源性决定了功能的相似性,但每种 MRFs 又具有独特功能。例如: MyoD 或 Myf5 的表达对于鼠骨骼肌的形成是足够的,如阻止 MyoD 表达, Myf5 出现代偿性高表达,小鼠肌肉的发生仍相对正常;如阻止 Myf5 表达,则不能形成早期肌节,随后 MyoD 被激活,肌肉仍可生成,但这些小鼠出生时因肋骨缺陷而死亡,可能是由于缺乏肌节与生骨节之间的相互作用。MyoD 和 Myf5 均缺乏的小鼠既不能生成骨骼肌,也无前体成肌细胞群。因此认为 Myf5 和 MyoD 能够相互补充和共同在 Myogenin 和 MRF4 基因通路上游启动所有的骨骼肌生成,决定肌细胞的生成。Myf5 是 MRFs 中最早表达的,它比肌节形成的 MyoD 的激活早 2 d。Myogenin 基因与 MRF4 基因参与了骨骼肌肌肉细胞的终末分化过程。据报道 Myogenin 可能对肌肉分化起重要作用,缺乏 Myogenin 的鼠无肌纤维生成,但肌母细胞可能正常。MRF4 减少的小鼠虽有骨骼肌形成,但因肋骨生长缺陷而在出生时死亡。

2 MEF2

MEF2 属于 MADS(MCM1, agamous, deficiens, serum-response factor) 框转录因子家族。MEF2 蛋白由一组四个基因编码,且与包括血清应答因子在内的 MAD 区域家族蛋白有进化上的联系。MEF2 在三种肌肉类型以及神经组织中高表达,在其它组织中也有表达。转录因子 MEF2 的 DNA 结合位点是一段保守的 DNA 序列 CTA(A/T)TAG, 该序列广泛存在于肌肉组织特异性表达基因的调控区,因此, MEF2 在肌肉发生中发挥重要作用。

MEF2(myocyte enhancer-binding factor 2) 家族的 4 个成员 MEF2A-D 的表达有助于肌肉特异性基因的

刘燕,华南农业大学动物科技学院,510640,广州市天河区五山镇。

杨琳,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-12-18

激活,它们与 MyoD 基因家族成员具有正协同作用。在小鼠中已经证实,Myogenin 中含有 MEF2 转录因子的结合位点,MyoD 家族的其它成员中尚未见相关报道。Kaushal、Molkentin 曾报道,MEF2A~D 与 MyoD 基因家族的共表达,增加了非肌肉细胞转变为肌肉细胞的效率,而且有报道说 MEF2 蛋白也可以单独诱导非肌肉细胞形成肌肉,但是至今没有人对此观点给出充分的证据。果蝇中的研究也支持这一点,在幼虫和成体中有多重功能的 MEF2 基因控制了所有的肌肉生成,在缺少 MEF2 表达的突变体中,骨骼肌、心肌和平滑肌都无法发育。

MEF2 基因表达的上游调控机制尚不十分清楚,已知 MEF2 基因的 5' 非翻译区包含 bHLH 家族 MRFs 的 DNA 结合序列 E 框元件,MRFs 通过结合于这一序列诱导 MEF2 基因的表达。而 MEF2 又可以结合于 MRFs 基因启动子区内的 MEF2 序列,启动 MRFs 的基因表达。这两类调控因子的相互作用构成循环。由于在肌肉发生中,MEF2 的表达在时间上滞后于 MRFs,因此认为,MRFs 启动 MEF2 表达,而 MEF2 的作用是放大和维持 MRFs 的表达水平。

MEF2 可以激活多种肌肉发生相关基因的表达,这些基因的表达产物对于肌肉组织的分化、维持和再生等有重要作用。例如,肌球蛋白(myosin)与肌动蛋白(actin)是引起肌肉收缩与舒张的主要蛋白质;原肌球蛋白(tropomyosin, Tm)与肌钙蛋白(troponin)的多种同工型构成复合体,在调节肌球蛋白与肌动蛋白引起的肌肉收缩、舒张中起主要作用;波形蛋白(一种中间丝)与 cofilin(一种肌动蛋白调节蛋白)在细胞分化过程中的细胞骨架重组中至关重要。

事实上,在肌肉发生中,MEF2 受到上游信号通路的调节,同时它又直接调控着它的下游靶基因的表达,如肌肉组织中结构蛋白和信号传导分子基因的表达,而实现其调控肌肉生长发育的生物学功能。

3 肌肉生长抑制因子(Myostatin)

Myostatin 基因,又称 GDF28,是 β 生长调节因子超级家族中的一员,是肌肉生长发育过程中所必需的负调控因子。McPherron 等(1997)采用简并 PCR 技术首次在小鼠中鉴别出 Myostatin 基因,该基因在胚胎发育过程和成年个体中表达。在胚胎发育的早期,该基因的表达局限于发育体节的肌节区,此后在躯体的很多不同的肌肉中表达。

目前,双肌现象逐步引起人们的注意,尤其在双肌牛的研究上,双肌牛具有骨量少、体脂含量少、肌肉

含量多及牛肉中优质切块多的优点,双肌犊牛的初生重一般比普通牛大(可高出 30%)。研究证实 Myostatin 基因的突变是双肌性状形成的主要原因。McPherron 等通过同源性定位的方法,将老鼠胚胎干细胞中 Myostatin 基因加以破坏,结果发现:Myostatin 基因突变鼠的体重比正常鼠大 30%,而且这种差异在成年鼠中不受年龄和性别的影响。成年突变鼠体态不正,胸部和臀部异常肥大。当去皮以后,可以很明显地看到突变鼠的肌肉大于正常鼠,单个肌肉块的重量前者是后者 2~3 倍。同时 McPherron 等根据小鼠 Myostatin 基因序列对牛的 Myostatin 基因进行了克隆分析,结果发现:比利时蓝白花双肌牛 Myostatin 基因在第三外显子处有 11 个核苷酸的缺失;皮埃蒙特双肌牛 Myostatin 基因在第三外显子处有一错义突变(1 个核苷酸 G 突变为 A),在蛋白质成熟区酪氨酸替代了胱氨酸,致使 Myostatin 丧失了抑制肌肉生长的活性,从而引起牛表现出双肌性状。由此表明,Myostatin 基因在肌肉形成过程中起到了负调控作用。

4 Pax 基因

Pax 基因是进化上保守的一个基因家族。最初发现的 Pax 基因是控制果蝇早期发育的分节基因,即 paired(prd)、gooseberry-distal(gsb-d)、gooseberry-proximal(gsb-p)。它们均编码含三个 α 螺旋的 128 个氨基酸的保守结构域,迄今为止发现人和小鼠的 Pax 基因各有 9 个,按基因发现时序,分别定名为 Pax1~Pax9。

Pax 基因编码的蛋白是一类重要的转录调控因子,各自发挥着重要作用。其中,Pax-3、Pax-7、Pax-9 均表达于生皮肌节细胞,而 Pax-3 对脊椎动物四肢肌肉的形成起重要作用。在 Pax-3 蛋白缺失的突变小鼠中,轴上肌肉系统相对正常,但四肢肌肉系统缺损。Pax-7 的表达还出现在从生皮肌节(Dermamyotome)到骨骼肌组织的形成过程中。同时,有人证明 Pax-3 以直接的方式激活 MyoD 基因,并在肌肉发育的早期阶段表达。然而有关实验证明,Pax-7 在 C2C12 成肌细胞内表达,而在 C2C12 成肌细胞诱导分化成为肌管时,其表达即被抑制,联系到 Pax 基因能使 NIH3T3 细胞发生转化并在裸鼠中形成肿瘤等特性,推测 Pax-7 有可能在成肌细胞 C2C12 的体外诱导分化中起负调控作用,因此,Pax-7 的调控作用还有待于进一步的实验分析。

5 LIM 蛋白

LIM 蛋白是一类富含半胱氨酸且分子结构中有一个或多个锌指结构的蛋白质家族,该家族中的蛋

白质分子都有特征性的氨基酸保守序列,即结构域。目前发现的已有60多种,它们参与多种基因的转录调控和细胞的发育与分化。LIM基因突变和缺陷可以引起神经、肌肉、垂体、造血和心血管等组织细胞分化和发育障碍。

根据氨基酸序列的同源性不同,将LIM蛋白分为四类,即LIM-HD、LIM-K、LIM-only和仅在c-端含LIM结构域的LIM蛋白,其中LIM-HD、LIM-K和LIM-only主要作为转录因子和转录因子复合物中的一种成分定位于细胞核。这四种蛋白各自又包括众多成员,但功能各异,其中有许多因子参与肌肉生成的调节。

据报道,LIM-HD中的Apterous对神经轴突的延伸及肌肉的形成有影响,其缺失可造成肌肉和神经束形成障碍。LIM-only中的FHL1/SLM1和FHL3/SLM2主要分布在骨骼肌,都具有肌源性调节作用。CRPs是一类富含半胱氨酸的LIM-only蛋白,包括CRP1、CRP2/SmLIM、CRP3/MLP和CRIP。CRPs家族主要表达于肌组织,其中CRP3/MLP属于双细胞定位蛋白,它既作为肌细胞生成的调控因子定位于核内,又存在于胞质参与心肌和骨骼肌细胞骨架的形成。多种肌细胞的大量研究证实,CRP3/MLP是成肌分化的正调控因子,但CRP3/MLP不能启动细胞分化,而是作为辅助因子参与肌特异性基因表达的调控。

因此,LIM蛋白家族因子与肌肉的形成有一定复杂的相关性,更深入的联系和作用机制还有待研究。

6 神经生长因子(NGF)

马焰等应用肌细胞无血清培养技术,观察了碱性成纤维生长因子(bFGF)和神经生长因子(NGF)对体外培养的骨骼肌成肌细胞(Myoblast)的增殖影响。结果表明,NGF实验组对成肌细胞增殖作用产生显著正效应,这与报道一致。Baron P L等在体外培养的人类胎儿及成人的成肌细胞中检测到了低亲和力神经生长因子受体(LNGFR),认为NGF和LNGFR系统在肌细胞的生长、发育及再生过程中有广泛的生理作用。Wheeler E F的研究结果表明:NGF和LNGFR在生肌过程中起了重要作用。他观察到,NGF和LNGFR的表达,主要存在于成肌细胞增殖、分化期,而在成肌细胞融合形成肌管后,NGF和LNGFR就中止表达。因此,NGF在成肌细胞的生长发育中确有重要作用。

胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)是目前发现的在体外支持运动神经元最有效的神经营养因子之一,对脊髓运动神经元等多种神经元具有促进生长、

分化,减缓其变性和坏死等作用。Suzuki等发现GDNF在人神经肌肉性疾病的肌纤维再生中有较高的表达,从而证明了GDNF在骨骼肌再生中起调控作用。Lie等发现去神经损伤的肌肉GDNF表达比正常者高。

苏剑斌等以往的实验已经证明,HSV(单纯疱疹病毒)-GDNF可高效率地转染体外培养的大鼠骨骼肌细胞并表达有活性的GDNF。Bcl-2及其相关蛋白是目前发现的最重要的抑制凋亡的蛋白,Bcl-2过量表达能延长细胞生存,也可抑制包括坏死在内的非凋亡细胞死亡,同时又具有促进肌细胞增殖的功能。它在肌细胞中的表达可以确定细胞处于发育的早期阶段。

徐忠涛等应用外源性GDNF及HSV-GDNF病毒转染的方法,观察二者对体外培养发育的大鼠骨骼肌卫星细胞Bcl-2表达的影响。他们发现GDNF和HSV-GDNF孵育组的阳性肌细胞数量及阳性表达强度均高于同一培养时间点的对照组,而GDNF和HSV-GDNF两组之间无差异。因此实验结果提示:GDNF和HSV-GDNF具有影响发育中的肌细胞的增殖、分化等生理功能。

7 成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)

成纤维细胞生长因子是广泛存在于机体组织细胞的一类生长因子,已有很多报道证明它能促进肌肉细胞的增殖。Dimario J等(1989)报道,在鼠肌肉营养不良时,肌肉星形细胞的数量和再生活性都较正常鼠有显著的提高,同时bFGF在细胞内基质中的含量也比正常鼠高,当时猜测肌肉星形细胞的增殖可能和bFGF含量的提高有一定的关系。William R D等(1991)证实,bFGF可促进生肌细胞增殖,但对生肌细胞的分化起抑制作用。金曼林等(1994)也证明,bFGF是一种很强的促生肌细胞增殖因子,在很低浓度(1 ng/ml)即有作用。Willkie R S等(1995)报道,aFGF和bFGF都可以促进离体鸡肌肉星形细胞增殖的能力,而且bFGF促进肌肉星形细胞合成DNA的能力比aFGF强500倍。Clegg等(1987)报道,在鸡生肌细胞体外培养实验中,从培养介质中撤走FGF,结果使增殖停留在细胞周期的G1期。这些研究结果表明,bFGF和aFGF对肌肉具有一定的营养作用,它们促进生肌细胞增殖的作用是通过影响DNA的合成而实现的;bFGF抑制生肌细胞的分化,使子代生肌细胞直接进入有丝分裂。

8 胰岛素样生长因子(IGFs)

IGFs是一类结构上类似于胰岛素原的多肽,主要包括IGF-1和IGF-2。大量研究表明,IGF-1能够介导生长激素的促生长作用,激活RNA聚合酶的活性。促

进非组蛋白硫酸化,增加 mRNA 的水平,从而刺激 DNA 和 RNA 的合成以及细胞的生长分化。

胰岛素样生长因子轴被认为在肌肉细胞的分化和生长过程中具有重要正向调控作用,IGFs 在次级纤维的形成过程中分子表达量增加,它的作用是刺激成肌细胞增殖,维持肌纤维的分化。

9 c-ski

1986,Ed.stavnezer 在鸡 DNA 中发现了 v-ski 的细胞内的同源物 c-ski,进一步研究表明,c-ski 还表达于未感染病毒的鸡胚细胞,提示这个基因具有功能性的调节作用。c-ski 在不同的物种间和组织内分布极为广泛,小鼠所有的组织中均检测到了它的表达,以神经和肌肉组织表达最为丰富,提示可能对神经和肌肉的发育和功能具有重要调节作用。

有人报道,在肌肉组织中,c-ski 的表达与肌肉的特殊表型有关。在快缩肌中表达较高,而在慢缩肌(横膈和比目鱼肌)中表达较低。快缩肌的肌肉肥厚与 IIb 纤维有关,研究发现,肌肉肥厚往往伴随 c-ski 的升高和肌球蛋白重链的转录增加,控制 IIb 纤维的生成,可抑制 c-ski 的表达和肌肉肥大,提示 IIb 纤维可能提供了 c-ski 高表达的环境,从而诱导肌肉肥大。

据报道,c-ski 的过量表达主要影响已形成的肌肉,c-ski 引起快缩肌纤维的肥厚,还对骨骼肌细胞的终末分化起着一定的作用,而在细胞向生肌细胞系的细胞分化决定中并不起作用。

MyoD 和 Myogenin 调节脊椎动物肌肉特异基因的表达。ski 可诱导 MyoD 和 Myogenin 的表达,提示这些肌肉调节基因的活化可能是 ski 诱导生肌过程的关键步骤。在成年大鼠,MyoD 在快缩肌中积聚,尤其在 IIb/IIx 型肌纤维中,而 Myogenin 主要表达在慢缩肌的 I 型肌纤维中。在 v-ski 的转基因鼠中(MSV 启动子和增强子控制),MyoD-E12 和 MSV 增强子的结合比 Myogenin-E12 和 MSV 增强子的结合具有更高的亲和力和协同性,导致 v-ski 基因在 IIb 型肌纤维中的积聚,从而使 IIb 型快缩肌纤维优先肥厚。

最近研究还发现,c-ski 转基因鼠的快缩肌中蛋白质的降解率下降,而蛋白质的合成率不变,这一变化伴随着溶酶体途径相关基因和 ATP-泛酸依赖的蛋白质降解通路中相关基因的表达下降,提示蛋白质降解减慢也是 c-ski 导致肌肉肥厚的原因之一。

实验证明,鹌鹑的胚胎细胞(QECs)在转染了 v-ski 后,开始表达 MyoD 和 Myogenin,使细胞向成肌细胞转化,具有向骨骼肌管分化的能力。同时,v-ski 还可以刺

激 QECs 增殖,诱导形态学上的转化和非控制的生长。c-ski 的生物活性和 v-ski 的生物活性很相似,当高水平表达时,也能诱导 QECs 形态学的转化和肌肉分化。

因此,c-ski 在对促进肌肉肥厚和肌肉分化方面起着很重要作用,但其作用机制还有待进一步研究。

10 巢蛋白(nestin)

巢蛋白是近年发现的神经元中间丝蛋白,它的表达开始于胚胎期神经板的形成时,在神经迁移及神经分化开始后逐渐消失,被认为是神经干细胞的特异性抗原,然而,有迹象表明 nestin 也有可能非神经系统表达。

周长满等在离体条件下运用免疫组织化学方法,观察了 nestin 在肌卫星细胞中的表达和发育,同时为证明所研究的细胞为肌卫星细胞,进行了 actin 和 desmin 免疫反应,作为同期对照。结果发现,actin、desmin、nestin 三组间在同一培养时间点上的阳性肌卫星细胞数量无差异($P>0.05$),但在时间点之间的比较上,4 h 组较 2 h 组的阳性肌卫星细胞数量有所增加($P<0.05$),其余各时间组的阳性肌卫星细胞数量则显著高于 2 h 组、4 h 组($P<0.01$)。这提示,nestin 在体外培养的骨骼肌卫星细胞发育过程中有表达,对骨骼肌的发育有一定作用,然而目前人们对 nestin 在骨骼肌发育过程中所起的作用还不清楚,还有待进一步研究。

11 肌酸

磷酸肌酸是肌肉快速供能的能量储存库,肌酸是合成磷酸肌酸的重要原料,因此肌酸作为营养补充剂已在运动训练过程中广泛应用。肌酸应用在其它方面也有报道,健康老人每天补充肌酸可以增强肌肉机能,并对年龄老化、无活动能力和许多疾病等原因引起的肌肉萎缩和肌肉机能下降也具有重要的意义。

高淑杰等研究了健康大学生外固定腿 2 周使肌肉愈接近废用性萎缩,并在固定期和恢复期 10 周过程中连续补充肌酸和抗阻训练,测定股外侧肌组织化学和生物化学的变化,同时测定了骨骼肌表达的生肌调节因子 MyoD、Myogenin 和 Myf5 的变化。他们发现:补充肌酸使股外侧肌废用性肌肉萎缩后恢复期各亚型肌纤维增粗,II 型肌纤维较 I 型肌纤维增粗显著;同时,与对照组相比,补充肌酸和抗阻训练结合比单纯抗阻训练 12 周使骨外侧肌截面积各亚型的截面积均增加,这一发现证明补充肌酸可以引起肌肉肥大。实验结果还显示,骨骼肌表达的生肌调节因子 MyoD、Myf5 的变化与股外侧肌各亚型的增粗具有一致的结

果,Myogenin 变化不显著。分析认为,可能是因为恢复期 II 型肌纤维比 I 型肌纤维增粗的幅度更显著,而在快肌纤维比在慢肌纤维 MyoD 和 Myf5 蛋白水平显著增高,相反在慢肌纤维 Myogenin 蛋白具有最高的水平。

因此,可推测肌酸能通过影响肌肉调节因子来引起肌肉的肥大,对医学治疗肌萎缩等疾病有深远的意义。

12 5-氮杂胞苷(5-Aza)

5-Aza 是一种 DNA 甲基化抑制剂,在肿瘤治疗中可抑制细胞的增殖,诱导细胞分化。Ferrari 等报告,将骨髓中的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)植入小鼠体内,发现其可分化为肌细胞并促进肌肉再生。但 MSCs 在此分化过程中的相关机制尚未见报道。王劲等研究 5-Aza 体外诱导 MSCs 向肌细胞分化的相关机制。研究发现,它可与 DNA 共价结合形成复合物从而导致 DNA 甲基在细胞分裂周期中进行性丢失,发挥去甲基化作用;而甲基化对于基因印记维持是必需的,5-Aza 作用后产生去甲基化作用可使印记丢失,使某些相关等位基因得以表达。由于 MSCs 具有向肌细胞分化的潜能,因此推测其可能在甲基化位置中含有一个调控成肌分化的位点并处于转录失活阶段,当 5-Aza 作用后,可能使 MSCs 的相关基因发生去甲基化,促使成肌分化的相关调控基因表达,启动向肌细胞的定向分化。

研究还发现,5-Aza 的诱导作用与其浓度和作用时间有直接关系。1、3 $\mu\text{mol/l}$ 5-Aza 对细胞增殖无明显影响,20 $\mu\text{mol/l}$ 5-Aza 对细胞有毒性作用,影响其增殖。10 $\mu\text{mol/l}$ 5-Aza 诱导后 6 h, MSCs 表达 Myf5, 9 h 达最高;5 $\mu\text{mol/l}$ 5-Aza 诱导后 9 h, MSCs 表达 Myf5, 12 h 达高峰。10 $\mu\text{mol/l}$ 5-Aza 诱导后 24 h, MSCs 表达 Myogenin, 48 h 达最高;5 $\mu\text{mol/l}$ 5-Aza 诱导后 6 d, MSCs 表达 Myogenin, 且为高峰。10 $\mu\text{mol/l}$ 5-Aza 诱导后 7 d, 部分细胞表达 desmin(肌间线蛋白);14 d 部分细胞表达 myosin。10 $\mu\text{mol/l}$ 5-Aza 诱导后 9 d, 部分细胞胞体明显增粗,14~16 d 后可见有肌管样细胞出现。

13 p38

体内正常成肌细胞的分化过程与包括 MAPK、PKC、PI3K 及 Ca^{2+} 通道等多种信号通路有关,p38 是 MAPK(mitogen activated protein kinase, 丝裂素活化蛋白激酶)中的一条重要信号转导通路。

王劲等研究证实,在 5-Aza-CR 诱导 MSCs 向肌细胞分化的全过程中,p38 呈逐渐增强趋势,利用其

特异抑制剂 SB203580 抑制后,其表达水平明显下降;同时 RT-PCR 结果显示,此时 Myf5 的表达时相由 6 h 延迟至作用后的 9 h,说明 p38 受抑导致 MSCs 向成肌细胞的分化受阻,从而证实 p38 是 MSCs 成肌分化的一条重要的正向信号转导通路,也说明 p38 对体内肌细胞的分化起着一定作用。

14 Vgl-2

Maeda T 等(2002)在哺乳动物中分离了 3 个类似 Vestigial 的基因 Vgl(Vestigial-like genes)-1、Vgl-2 和 Vgl-3,其中 Vgl-2 在胚胎发育过程中表达在分化的体节中,而在成体中表达在骨骼肌肌肉细胞中。而且有证据表明,在肌肉细胞分化的过程中,Vgl-2 mRNA 的表达水平以及 Vgl-2 蛋白从细胞质到细胞核的转移都有所增加。另外,哺乳动物的体内和体外实验都证明 Vgl-2 能够与 MEF2 结合。这些充分证明 Vgl-2 是哺乳动物肌肉分化过程中的一个新元素。

15 Akt2

Akt2 是 Akt/PKB 家族的成员之一,在骨骼肌细胞的分化过程中,Akt2 的表达量增加,anti-Akt2 与 Akt2 的相互作用可以明显抑制肌肉的形成,由此而证明 Akt2 在肌肉分化过程中起到一定的作用。MyoD 转录水平上调节 Akt2 的活性,但 Akt2 可以反式激活 MyoD-MEF2 的活性。Akt2 的启动子包括 9 个 E-boxes, MyoD 可以与其中的 8 个位点结合。MyoD 的表达能明显提高 Akt2 激活 MyoD-MEF2 转录活性后诱导 Myogenin 的表达。因此我们可以推测,在肌肉分化过程中,Akt2 与 MyoD-MEF2 中可能存在 1 个正反馈的调节环,这对 MyoD 诱导的肌肉生成具有重要的作用。

16 SHH

由骨髓和底板(神经管)产生的 SHH(Sonic hedgehog)在控制体节和神经管模式及分化中起着诱导和营养信号的作用。现在已有实验证明,SHH 在肌肉发生决定基因 MyoD 和 Myf5 的早期活化中起着重要的作用。

17 信号通路因子

Myogenin 基因的表达在转录水平上受到 MAPK(丝裂原激活的蛋白激酶)信号通路、 Ca^{2+} -CaM 依赖的蛋白激酶信号通路、钙调磷酸酶信号通路的调节,Myogenin 启动子附近的 3 个顺式作用元件(E-box、MEF2、MEF3)与此 3 条途径相关,此 3 条途径的作用是平行但并非冗余的,任何一种信号的抑制都会降低或消除 Myogenin 的表达及随后分化事件的发生。

18 ID 蛋白

ID(inhibitors of DNA binding)蛋白具有螺旋-环-

螺旋(helix-loop-helix, HLH)结构,缺乏 DNA 结合域,可与一些转录因子(主要是 bHLH 蛋白)形成非活性异二聚体,使其不能与 DNA 上的 E 基序结合,从而负向调控细胞分化,因而被称为“分化抑制因子(inhibitor of differentiation)”。

MyoD 家族是肌细胞分化发生的核心成分,是一种含有 bHLH 结构的转录调节蛋白,一旦 MyoD 基因获得表达,即可以通过正反馈调节的方式维持其表达,保证肌细胞分化的进行,因此 ID 蛋白通过结合 MyoD 家族形成二聚体抑制肌细胞的分化。

有人还报道, ID 蛋白对细胞生长有促进作用,此功能对细胞周期的运行是必需的。在果蝇和小鼠中,静止期细胞 ID 蛋白低水平表达或不表达,而在受促有丝分裂信号刺激后, ID 蛋白可在 1~2 h 内被快速诱导表达,在整个 G1 期 ID 蛋白表达水平下降,进入 S 期后表达水平上调。

总之, ID 蛋白阻止细胞分化,促进细胞增殖,进而影响着肌肉的生成。这在肿瘤的发生中也证实了这一点,并说明它与肿瘤的发生有关。ID 基因具有癌基因的特性,正常组织和细胞中 ID 蛋白低表达或不表达,而在肿瘤组织中 ID 蛋白过高表达。同时肿瘤浸润和转移与肿瘤细胞产生基质降解酶相关,基质降解酶有利于肿瘤细胞向邻近组织浸润, ID 蛋白参与肿瘤的浸润和转移。实验证明,乳腺上皮细胞的 ID 蛋白基因过表达,不仅可以阻止细胞分化及促进细胞增生,而且还可使乳腺上皮细胞向基底膜浸润和转移,这与明胶酶被激活有关。

19 雌激素

雌激素在多种动物上的最终效应是抑制生长。17 β -雌二醇(E2)是一种效力较高的天然雌激素。赵宝全等探讨 17 β -雌二醇对斑马鱼初期胚胎的毒性作用,他们观察了染毒后体节成熟的变化及 MyoD 基因表达强度的变化。胚胎从 3 hpf 开始染毒(0、10 μ mol/l E2)。于 12、24 和 36 hpf 固定,进行原位杂交,计数体节数。结果发现:12 hpf 染毒组和对照组的体节数分别是 6.8 和 9.4,两者之间虽无显著差异但有减少的趋势;至 24 hpf,对照组和染毒组的体节数分别是 32.5、25.2,染毒组显著低于对照组;在 36 hpf,对照组和染毒组的体节数分别是 32.6、25.4,染毒组显著低于对照组;各组内 24 hpf 和 36 hpf 之间差异不显著;而 MyoD 基因无论是在对照组还是在染毒组都延脊索走向表达,两者在 12 hpf 未能发现有明显差异,而在 36 hpf,染毒组的表达明显减弱。这表明 E2 染毒对体节的形

成有一定的抑制作用,而体节生成障碍可能是由于 E2 对 MyoD 基因的影响所致。

然而,有人报道某些雌激素对动物生长的调节作用与它的剂量有关。大豆黄酮属异黄酮植物雌激素。朱晓梅等研究大豆黄酮对雄性大鼠肌肉生长、内分泌水平的影响,分别设计高、低两个剂量(50、100 mg/kg)组,结果发现,与对照组相比,50 mg/kg 大豆黄酮组睾酮含量提高 23.89%($P<0.05$),生长激素含量上升 15.07%($P<0.05$)。在体内,睾酮水平的提高可明显促进肌肉的生长,同时表明大豆黄酮可以通过上调 GH 的含量,间接促进动物的生长。实验还证实,50 mg/kg 大豆黄酮组腓肠肌重量和对照组相比有显著的提高,这可能是因为大豆黄酮促进肌细胞的生长,从而使腓肠肌重量上升。50 mg/kg 大豆黄酮组腓肠肌肌纤维直径大小提高 14.49%($P<0.05$);肌密度上升 1.21%($P>0.05$);脂肪细胞直径大小下降 8.78%($P>0.05$);脂肪细胞密度上升 5.45%($P>0.05$)。在以上数据中,腓肠肌直径与对照组相比有显著的提高,这说明大豆黄酮的促肌生长作用,主要是肌纤维的肥大,而并不是加速卫星细胞繁殖的结果。实验表明:给大鼠每日灌注 100 mg/kg 的大豆黄酮,与对照组相比,睾酮含量下降 51.25%($P<0.01$),GH 下降 13.38%($P<0.05$);腓肠肌体重比有下降趋势,但与对照组相比无显著性差异。这说明大豆黄酮对大鼠肌肉生长和内分泌的影响有剂量关系,含量高时能起抑制作用。

20 twist

目前,实验证明有两种机制来解释 twist 对肌肉发生的抑制作用:一是 twist 与 E-蛋白竞争,与生肌决定因子形成二聚体,从而抑制了生肌决定因子与 DNA 的高活性结合;二是 twist 直接干扰 E2F(生肌决定因子)复合体的形成,从而抑制生肌决定因子的转录激活作用。然而,果蝇中 twist 基因的作用与脊椎动物不同,其体节肌肉的发生需要高水平的 twist 表达。

综上所述,肌肉生成的分子机制是一个复杂的调控网络,其中 MyoD 家族成员是主调控因子,其它因子直接或间接作用于肌肉的生成;同时,所有因子相互之间又联系、影响,共同形成一个复杂精细的调控网络,来调节肌肉的生成发育,使之达到一个正常平衡态。肌肉生成调控因子复杂繁多,本文只限于几个因子的阐述,更多的因子还有待探索讨论。

(参考文献 66 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

金属硫蛋白与动物应激

谭琼 张彬

摘要 金属硫蛋白是一类低分子量、富含半胱氨酸的金属结合蛋白,它与应激及应激性疾病有关。文章就应激对金属硫蛋白合成的诱导,金属硫蛋白对应激的保护作用及其机制等问题做了简单介绍,说明金属硫蛋白在动物养殖业中具有广阔的应用前景。

关键词 金属硫蛋白;应激;抗氧化

中图分类号 S513

Metallothionein and animal emergency

Tan Qiong, Zhang Bin

Abstract Metallothionein(MT)is a group of conjugated proteins which are rich in cystein.and low molecular weight.Metallothionein relate to emergency and irritability disease. this article make the simple introduction with emergency induce Metallothionein synthesis, the protective function and the mechanism. All explained Metallothionein has the broad application prospect in the animal breeding and poultry raising.

Key words metallothionein;emergency;antioxidant

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一类低分子量、富含半胱氨酸、可被金属诱导的特异蛋白质。1957年 Margoshe 和 Valle 首次在马肾中发现并分离出 MT,以后发现 MT 广泛存在于各种生物体中,到 1997 年第四届国际 MT 会议时,被发现并确定氨基酸序列的 MT 共有 170 多种。MT 的生物学功能涉及生物体微量元素代谢,解除重金属的毒性,清除自由基以及机体生长、发育、生殖、衰老、肿瘤发生、免疫、应激等各个方面。因此,MT 对动物的生长、健康和提高畜产品的质量也具有重要意义。特别是近年来对 MT 抗氧化和抗应激方面的研究显示了开发和利用 MT 的诱人前景。

金属元素、糖皮质激素等多种因素均可诱导 MT 合成,各种生理、病理或心理应激也能诱导 MT 的合成,故 MT 被认为是一种急性期蛋白。因此,MT 必然与应激及应激性疾病有紧密联系。

1 应激反应对金属硫蛋白合成的诱导

1.1 生理性应激因子

有研究表明,低温暴露大鼠肝脏、肾脏可诱导合成 MT。Beattie 观察了冷暴露棕色脂肪组织中 MT-I 基因的表达。实验结果表明,大鼠冷暴露(6℃)6 h 后棕色脂肪组织(BAT)中 MT-mRNA 增加;冷暴露 24 h 后大鼠肝、肾 MT-I 分别较常温组(25℃)增加 3 倍和

1.4 倍;BAT 中诱导合成的 MT-I 含量增加 16 倍。可见冷暴露可诱导 BAT 中 MT-I 的合成。

Hidalgo J 等的研究也表明,成年鼠在一定应激的状况下,让其饥饿或口渴,不仅肝脏内的 MT 含量增加,而且脑部和心脏中 MT 的含量也有显著的增加。

1.2 外伤性应激因子

Sasaqawa S 等切除了大鼠背部的皮肤,大鼠创伤后 6 h 肝 MT 含量较对照组增加 6 倍,过氧化物阴离子产物增加 2.3 倍;创伤后 24 h 降至正常水平。大鼠剖腹术后肝脏中 Zn-MT 含量增加。Brady 推测应激因素诱导肝脏 MT 合成可能是肝脏再生结的结果。MT 合成的诱导被认为由激素、生长因子或其它因子介导。

周志博等发现老鼠在烧伤后 24 h,肝脏中谷胱甘肽抗氧化酶浓度明显增加,活性也有所增强。程义勇观察了大鼠在遭遇应激时,其体内 5 种矿物元素的代谢变化,测定了肝脏金属硫蛋白含量的改变。结果显示,应激反应都使大鼠肝组织中 MT 水平大幅度上升。尤其是具有病理性损害的创伤时,引起肝 MT 变化更大。这些结果的一致性,表明了 MT 在机体的应激反应过程中具有重要的生物学作用。

1.3 金属元素

重金属的浓度不仅是决定组织中金属硫蛋白水平的主要因素,而且对于在对 MT 的诱导上也发挥了极其重要的作用。Kreppel 给老鼠注射不同剂型的砷制剂,结果显示,不同剂型的砷制剂在注射不同的剂量时,肝脏中 MT 的增加最显著,肾脏、脾脏、胃、小肠、心脏和肺中的 MT 都有增加。当动物消除 MT 基因后,对氧化应激及有毒重金属的敏感性明显升高(Sato 等,1996)。

谭琼,湖南农业大学动物科学技术学院,410128,湖南长沙。

张彬,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-12-04

李丽立等的实验表明,高剂量的锌能诱导 MT 在杜×长×大三元杂交猪肝脏内大量合成,最佳累计锌诱导剂量为 330 mg/kg。在对家兔的诱导实验中也得到了相似的结果,诱导后兔肉、血浆、肝、肾、肺和小肠中的 MT 含量与对照组比较均有较大的提高($P < 0.05$),小肠 MT 提高幅度最大,兔肝 MT 含量为最高,达到 5.42 mg/g。张建鹏等和柴春彦等的研究表明,同一剂量下锌诱导 MT 合成效果比铁和铜诱导 MT 合成效果好,比镉和银诱导 MT 合成效果差,但镉和银诱导合成的 Cd-MT 和 Ag-MT 结合比较牢固,其它金属不能置换 Cd-MT 和 Ag-MT 中的 Cd 和 Ag,因而不能起到重金属解毒的功能。而锌诱导生成的 Zn-MT 能被多种金属置换,在重金属解毒方面起着重要作用;同时结合在 MT 中的 Zn 还能够行使其它生物学功能,因此锌被公认为最安全、最有效的 MT 诱导剂。

1.4 其它因素

在心理应激条件下,王冬兰等观察了大鼠组织中 MT 水平的变化,应激诱导导致了动物脑和肝脏 MT 含量的增加。

Suzuki Y 用酒精(4 g/kg)对老鼠进行处理,结果发现,处理后 12 h,大脑中 MT 的总量增加至 1.29 倍,18 h 后,大脑中 MT 的总量大约是 1.27 倍,所以推测这可能与酒精引起的氧化应激和代谢有关。

电离辐射和紫外线照射后细胞和组织中 MT 含量增加;所产生的自由基可导致 DNA 损伤,并伴随 MT 基因信号的放大。

Satoh 等将老鼠放置于静电磁场中,然后用 CCl_4 进行处理,肝脏中的 MT 显著增加;Hernandez 发现,腹腔注射内毒素(LPS, 1 mg/kg)后,大鼠肝脏组织中 MT 水平较对照组升高 8 倍。Gasull 的实验结果类似。

2 金属硫蛋白对动物应激的保护作用及其机制

应激可使机体脂质过氧化反应增强,继而通过产生自由基造成组织损伤。而 MT 能被应激诱导合成,因此可能具有应激保护作用。

2.1 抗氧化作用

羟自由基是通过攻击生物膜多不饱和脂肪酸、DNA、蛋白质和其它生物大分子,引发细胞和组织氧化损伤,细胞组织裂解,酶和氧化强化剂释放,导致生物体病变、生命力和生产力下降,甚至死亡。由于自由基的氧化作用,肌肉中细胞膜及亚细胞膜被氧化损伤,肌肉中的肌红蛋白被氧化成次肌红蛋白,同时膜被破坏,细胞内液体渗出,畜禽屠体的颜色由红色变成褐色,降低鲜肉产品质量,降低口感;还会导致动物的生长速度减缓,蛋鸡的产蛋率、母畜的繁殖力、机体

抵抗力下降,疫病的发生率提高等。羟自由基引起的氧化、应激,还会使奶牛发生乳房炎和繁殖性能低下,这不仅会降低奶牛的生产性能,还会因为氧化产物的积累导致牛奶产生异味(Bosi, 1999),从而降低奶的品质和卫生质量。MT 通过清除羟自由基,增强抗氧化酶的活性,阻断脂质过氧化链式反应,减少脂质过氧化损伤,减少 DNA 损伤等作用,可以减缓氧化速度,增强抗氧化机能,减少疾病发生,延长动物利用年限,提高生产力。

帖建科(1995)报道 MT 中富含半胱氨酸的巯基,清除羟基自由基能力是谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)的 100 倍,为超氧化物歧化酶(SOD)的 1 000 倍。MT 的抗氧化作用除表现为能直接清除·OH 外,还能显著提高 SOD、GSH-Px 的活性。MT 在体内像血红蛋白运送氧气一样,对各种金属离子的结合与释放具有可逆性。Cu、Zn、Mn、Fe、Se 等微量元素,是机体内 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶系的组成成分,MT 参与微量元素的储存、运输及代谢,及时提供 SOD 等抗氧化酶系所需的金属微量元素,从而增强这些抗氧化酶的活性。MT 与不同的金属相结合,其抗氧化能力不同。郑军恒(1999)报道,Zn-MT 比 Cd-MT 的抗氧化能力要强。

魏涛等用低、中和高三个剂量的 Zn-MT 饲喂 10 月龄的昆明小鼠,测定各项抗氧化指标,结果表明,与对照组相比,低剂量 MT 能够提高 SOD 活力 9%;中剂量 MT 能提高小鼠谷胱甘肽过氧化酶活力 10%,降低肝脏过氧化脂质含量 18%,提高肝脏 SOD 活力 14%;高剂量 MT 能够提高小鼠谷胱甘肽过氧化酶活力 15%,降低肝脏过氧化脂质含量 18%,降低心肌脂褐质含量 9%。

刘湘新等还通过应激实验对猪体内抗氧化酶活性的影响来阐述这些影响与其应激保护、清除自由基的作用之间的关系。实验结果表明,MT 对谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)活性的影响无显著性,但却能增强超氧化物歧化酶活性。超氧化物歧化酶广泛地分布于生物体内,能催化超氧阴离子自由基发生歧化反应,从而清除体内多余的超氧阴离子自由基,维持体内自由基的平衡,维护细胞膜的完整性和线粒体超微结构及其正常功能。在应激反应中,MT 和超氧化物歧化酶协调发挥抗氧化作用,从而预防氧化性应激损伤。并且应激也使血清中乳酸脱氢酶(LDH)的活性增加,这进一步说明应激可使肝细胞受损或通透性增加,使血清中酶活性升高。金属硫蛋白对应激状态下的肝脏功能具有保护作用,但其机理还有待进一步研究。

2.2 金属硫蛋白抗氧化损伤的可能机制

Wang 等证实,MT 抗 DOX 的心肌损伤作用可能通过抑制线粒体 CytC 的释放及细胞凋亡酶 caspase-3 的活化,进而抑制心肌细胞凋亡而实现的,在不同时间,向转 MT 基因新生小鼠和非转基因对照小鼠的心肌细胞加入临床浓度(1.0 mmol/l)的 DOX,发现后者出现明显的心肌细胞凋亡,而前者这种凋亡效应明显受抑。同时,用荧光共聚焦显微镜发现,DOX 处理后的非转基因小鼠心肌细胞线粒体活性氧(ROS)显著增加,而在 MT 过表达小鼠心肌中则几乎完全抑制 ROS 的增加。因此,MT 抑制 DOX 诱导的心肌细胞凋亡,至少部分是通过抑制线粒体 CytC 介导的凋亡途径实现的。

有研究表明,MT 抗氧化损伤的机制还可能与激素的代谢有关。应激、组织损伤或感染时所释放的糖皮质激素、胰高血糖素等均可诱导大鼠 MT 合成。肾上腺切除的大鼠肝、肾 MT 含量增加;而在饮水中加入皮质酮可使该效应完全逆转,说明糖皮质激素对两种组织 MT 调节有抑制作用。研究结果提示,糖皮质激素可能参与应激时大鼠 MT-I 的调节。新近研究发现,MT 基因 5'端基因启动区存在一个被称为 HRE (Hotmone regulatory element,激素调控元件)的基因调控片段,与糖皮质激素诱导 MT 合成有关;提示机体激素代谢的变化可能是 MT 应激保护作用的机制之一。其它研究表明,应激条件下 MT 的保护作用可能还与细胞因子的合成、微量元素代谢改变或神经内分泌系统功能调节有关。其详细机制尚待进一步研究。

3 金属硫蛋白的应用前景

随着国内集约化养殖场的不断增加,而畜禽的自我调控能力有限,动物的生产性能和健康对环境的依赖性很大,各种应激产生的危害也越来越多,对动物产生了巨大的影响。因而严重影响了养殖效益的发挥。在经济动物的驯化过程中,应激反应比一般家畜、家禽更明显。MT 通过清除自由基,可增强抗氧化酶的活性,阻断脂质过氧化链式反应,减少膜脂质过氧化和 DNA 的损伤,因而将金属硫蛋白应用于动物,完全有可能达到提高生长速度,减少疾病发生,减缓鲜肉氧化速度,延长动物利用年限,提高经济效益的目的。

金属硫蛋白作为食品、饲料以及美容化妆品的添加剂和某些疾病的治疗药物,在医学、食品加工、营养学等多个领域也已广泛应用,但国内外有关 MT 在畜禽尤其是经济动物的应用研究还很少。在畜禽和经济动物体内的代谢规律、代谢途径和生理作用的研究还不够深入,这些研究将为 MT 在经济动物和畜禽生产中的研究和应用提供一定的理论依据。对金属硫蛋白

在经济动物和畜禽的系统研究,将有助于解决平衡家畜的新陈代谢、增强家畜免疫力和抗应激能力、提高家畜的健康水平和生产性能、改善畜产品的质量和保护生态环境等重大问题,为促进养殖业可持续发展提供科学依据。

参考文献

- Dingier P, Jelen M, Muszczynska B, et al. Role of metallothionein expression in non-small cell lung carcinomas [J]. *Rocs Aced Med Bialys*, 2004,49(Suppl 1):43-45
- 茹炳根.第四届国际金属硫蛋白会议简介[J].*生命科学*,1998,10(3):157-158
- Beattie J H, Black D J, Wood A M, et al. Cold induced expression of the metallothionein-I gene in brown adipose tissue of rats. *Am J Physiol*, 1996,270(5):971
- Hidalgo J, Borrás M, et al. Liver, brain, and heart metallothionein induction by stress. *J Neurochem*,1990,55(2):651-654
- Sasaqawa S, Matsubara J, et al. Stress-related induction of hepatic metallothionein synthesis and increase in peripheral polymorphonuclear leukocytes in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*,1993,15(2-3):217-226
- Zhou Z B, Ding H Q, et al. Effect of Zn7-metallothionein on oxidative stress in liver of rats with severe thermal injury. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(8):764-770
- 程义勇,王冬兰.不同应激反应对金属硫蛋白和矿物元素代谢的影响[J].*营养学报*,1996,18(3):317-320
- Kreppel H, Bauman J W, et al. Induction of metallothionein by arsenicals in mice. *Fundam Appl Toxicol*,1993,20(2):184-189
- 李丽立,张彬,等.猪肝金属硫蛋白的诱导效果[J].*广西农业生物科学*,2004,23(4):270-273
- 张建鹏,仲燕,任诸义,等.诱导大鼠肝脏 MT 基因表达研究[J].*第二军医大学学报*,2003,24(2):184-187
- 柴春彦,刘国艳,石发庆.铜缺乏对奶牛肝脏 MT 代谢影响[J].*畜牧兽医*,2002,34(3):14-16
- Koterov A N, Filippovich I V. The radiobiology of metallothioneins. *Radiats Biol Radioecol*, 1995,35(2):162
- Satoh M, Tsuji Y, et al. Metallothionein content increased in the liver of mice exposed to magnetic fields. *Arch Toxicol*,1996,70(5):315-318
- Hernandez J, Giralt M, et al. Interactions between metallothionein inducers in rat liver and primary cultures of rat hepatocytes. *Chem-Biol Interact*,1996,100(1):27
- Green E M, Adams H R. New perspectives in circulatory shock: pathophysiologic mediator of the mammalian response to endotoxemia and sepsis. *J. of Am. Vet. Med.*,1992,200(12):36
- 刘云华,张彬.金属硫蛋白在养殖业中的应用前景[J].*家畜生态学报*,2004,25(4):179-182
- 郑军恒,李海洋,茹刚,等.金属硫蛋白清除羧自由基功能的研究[J].*北京大学学报(自然科学版)*,1999,35(2):573-576
- 魏涛,唐粉芳,等.金属硫蛋白抗氧化及增强免疫作用的研究[J].*中国食品添加剂*,2000(2):74-77
- 刘湘新,李丽立,等.金属硫蛋白对应激猪血清中某些酶活性的影响[J].*中国兽医杂志*,2005,41(12):7-8
- Liu J, Liu Y P, Sendelbach L E, et al. Endotoxin induction of hepatic metallothionein is mediated through cytokines. *Toxicol Appl Pharmacol*,1991,109(2):235 (编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

猪的肌内脂肪生成及其调控

李长强 闫益波 高士争

摘要 肌内脂肪含量是猪肉食用品质的主要决定因素,尤其对肉的嫩度、风味和多汁性有着重要的影响。肌内脂肪的生成主要受到营养和基因的调控。文中就猪的肌内脂肪的生成及其影响因素作一综述。

关键词 肌内脂肪;营养;基因;调控

中图分类号 S591.5

The generation of IMF and its influencing factors in porcine

Li Changqiang, Yan Yibo, Gao Shizheng

Abstract Intramuscular fat(IMF)content is a major determinant of the eating quality of pork. It has a very important effect on the tenderness, flavor and juiciness. The generation of IMF are mainly regulated by nutrition and gene. This paper reviews the generation of IMF and its influencing factors.

Key word intramuscular fat; nutrition; gene; regulation

随着人们生活水平的不断提高,人们对肉品质提出了更高的要求,不仅要求肉质鲜嫩、口味好,而且要求肉品质符合绿色食品的标准,因此世界各国对肉品质进行了广泛的研究。脂肪不仅是动物体能量来源,其中的肌内脂肪与肌肉的风味品质和食用价值有很大的关系。在猪肉的生产中,肌内脂肪正引起人们越来越大的兴趣,因为它影响肉质的嫩度和多汁性,特别是肉的多汁性^[1]。研究肌内脂肪的生成,对改善肉食香味、提高猪肉的食用价值以及生产有利于人体健康的肉产品具有重要意义。

1 肌内脂肪的概述

1.1 肌内脂肪的成分

肌肉脂肪通常被分为肌间脂肪和肌内脂肪(Intramuscular fat, IMF)。从组织形态上看,除去肌间脂肪,肌肉主要由肌细胞和脂肪细胞组成。肌肉中的脂类包括磷脂、甘油三酯、甘油一酯、甘油二酯、胆固醇酯和鞘类酯等,其中磷脂和甘油三酯是肌内脂肪的主要成分。以总脂类数为基础,沉积在猪肌肉组织中的这种脂类比例高达20%~25%,肌内脂类只占胴体脂类

的1%~2%。磷脂是细胞膜的组成物质,而组成磷脂的脂肪酸主要是C:16和C:18的脂肪酸,其它脂肪酸含量很少(Flachowsky等,1997)^[2]。Kondracki(2000)在研究中发现C:16和C:18的含量达到98.5%。饱和脂肪酸中最常见的是软脂酸(16:0)和硬脂酸(18:0),含量约占40%~50%;不饱和脂肪酸中含量最多的是油酸(18:1),约占40%~50%,另外不饱和脂肪酸中还有亚油酸(18:2)、亚麻酸(18:3)和花生四烯酸(20:4)及不饱和度更高的脂肪酸,这几种脂肪酸含量在5%以下。

1.2 肌内脂肪的生成及分布

肌内脂肪存在于肌外膜、肌束膜甚至肌内膜上。当营养良好的时候,先在肌肉的大血管周围蓄积脂肪,然后按肌外膜、肌束膜的顺序蓄积脂肪;在营养非常好的时候,肌内膜周围及其毛细血管上也蓄积脂肪,使肌肉横断面上呈大理石状花纹,是非常理想的肉质。

研究者认为,脂肪细胞是由间质细胞经增殖因子的刺激,逐渐成熟,数量增加,然后随脂肪的合成,细胞质内出现脂肪滴,并扩大充满整个细胞,形成丰满的卵圆形脂肪细胞。肌内脂肪的含量取决于脂肪的体细胞(多小室脂肪细胞)的数量和脂肪合成蓄积的能力。研究者认为,脂肪前体细胞(生成脂肪细胞的细胞)数量决定于家畜出生前,而合成、蓄积能力则受出生后各种因素的影响。因此,脂肪细胞的数量在家畜出生前和生长发育的早期就已被固定,在肥育期仅仅通过脂肪细胞体积的增大和重量增加来完成脂肪的沉积。

肌内脂肪的分布受两个情况的影响:一是解剖学部位的影响。胴体肌肉中脂肪的含量在不同部位存在

李长强,云南农业大学动物营养与饲料重点实验室,650201,云南昆明。

闫益波,云南农业大学动物科技学院。

高士争(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-30

★ 云南省自然科学基金项目:云南优良地方品种猪肉品质性状形成的营养代谢机理研究(编号:2005C0008Z)。

着差别,并与生理学因素有关。一般来讲,明显有红色特性的肌肉都富含脂类。有研究表明,横隔肌(红肌肉)的脂肪含量要比背最长肌和腰大肌分别多2倍和3倍,后两种肌肉都属于白肌型或中间型。股四头肌(红肌型)比背最长肌(白肌型)含有更多的脂类。在对背最长肌、腹横肌和股二头肌的研究中,并未发现中性脂类含量有大的差别。但极性脂类在富含线粒体和细胞膜的红肌型中占有比例很大。二是脂肪酸结构与肌肉类型极其相关,如红肌型(股四头肌)比白肌型(背最长肌)多不饱和脂肪酸含量高6%~7%,而且胆固醇比例也比白肌型高,但胆固醇酯在任何肌肉中的含量是没有差别的。

2 肌内脂肪与肉品质的关系

肌内脂肪含量与猪肉的食用品质密切相关,可影响猪肉的嫩度、风味、肉色、系水力及大理石纹评分,是影响猪肉品质的重要因素。含量适中且分布均匀的大理石纹能使肉品味美多汁、口感良好;含量过少则肉品干硬乏味;含量过多或分布不均,却对猪肉营养品质不利,因为这使单位肉重热量增加,蛋白质含量减少。

Patrici等^[9]对丹麦商品猪肉质进行研究后发现,肉的风味多汁性随肌内脂肪含量的增加而持续改善,提高肌内脂肪将会使肉的嫩度和多汁性相应改进。Bejerholm(1986)认为肌内脂肪和肉质呈正相关,影响肉的嫩度、风味和多汁性,特别是肉的嫩度^[1]。肌内脂肪含量增加,改善猪肉嫩度,是通过两方面作用,一是切断了肌纤维束间的交联结构,二是有利于咀嚼过程中肌纤维的断裂,这样就改变了肉品的感官品质^[4]。Ellis等(1999)^[9]研究发现,杜洛克猪生长快、适应性强,肌内脂肪含量相对较高,而肌内脂肪与口感呈正相关。有研究认为,肌肉中脂肪含量增加,可改善肌肉系水力。但肌肉肌内脂肪中多不饱和脂肪酸(不包括亚油酸)含量高则肌肉易被氧化、酸败,使肉品质下降。Van Laack R L等(2001)^[6]研究表明,猪肉肌内脂肪的含量对剪切力存在着一定的影响,而且随着储存时间的增加影响程度有所变化,在杜洛克猪中增加尤为明显。

许多研究表明^[1,6],2%~3%的肌内脂肪含量是新鲜猪肉产品的一个理想标准。肌内脂肪与瘦肉率间呈负相关,且遗传相关较低(-0.30~-0.25),而肌内脂肪的遗传力较高(0.50~0.76),这就表明同时选择提高肌内脂肪和瘦肉率是可能的。Suzuki K等(2005)^[4]研究结果显示,随着选育的进行,IMF与结缔组织的遗传相关性增加;猪肉性状间的遗传相关性表明,随着IMF

的增加,肉的系水力提高且肉色逐渐变浅。

3 营养对肌内脂肪的调控

营养在很大程度上影响着肌内脂肪的生成,如适宜的饲料能量和蛋白质水平除对动物的生长肥育性能、胴体瘦肉率和降低饲料成本起关键作用,还对肉的风味、嫩度、多汁性等特性产生影响。

3.1 日粮能量水平对肌内脂肪生成的影响

肌内脂肪组织是发育中最后的脂肪沉积部位,相对其它脂肪组织可能对日粮有不同的反应方式。有研究发现,与饲喂良好的猪相比,经受饥饿的猪脂肪组织的关键生脂基因的转录水平降低了。而在生脂过程中,固醇调节因子连接蛋白(SREBP-1)被证明作为关键的转录因子发挥作用。在Gondret和Lebret(2002)的研究中,限饲猪比对照组猪和低蛋白低能日粮猪骨骼肌SREBP-1 mRNA降低了12%,但没有达到显著水平。

在日粮对肌肉组织含量的调节中,蛋白质(氨基酸)与能量之比决定了猪机体蛋白质和脂肪沉积的比例。低的蛋白与能量水平可导致更高的胴体和肌内脂肪水平,对肉质产生正面影响。而Gondret和Lebret(2002)的研究中,低能低蛋白(DE 12.96 MJ/kg, CP 13.1%)日粮和标准日粮相比,增加了肌内脂肪含量而没有过多的胴体脂肪沉积。他们认为低能低蛋白日粮是增加猪肌内脂肪含量而不增加胴体脂肪沉积的有效的方式。Goerl等(1995)^[9]研究日粮蛋白质水平对猪肉品质的影响,结果发现,随日粮蛋白质水平增加,28~104 kg猪胴体背膘下降,瘦肉率增加,同时肌肉大理石纹减少,肉嫩度下降;而当日粮蛋白质不足时,能显著提高猪肉食用品质,原因可能是肌内脂肪含量升高和日粮中低蛋白促使体内蛋白质周转加快所致。

Da Costa N等(2004)^[9]给仔猪饲喂9~12周传统的日粮和试验日粮(缺乏20%蛋白质和7%的能量)后,研究骨骼肌基因表达的不同,结果显示,限饲导致了红肌和白肌中肌内脂肪的显著累积,以及在底物周转(包括蛋白质、糖原和脂肪)、翻译和线粒体功能基因表达的增加,糖酵解和氧化磷酸化电势的升高。Leheska J M等(2002)^[10]研究表明,限饲和禁食可使猪有更长的背最长肌,更深的肌肉颜色(P<0.05)和更高的大理石纹评分。

3.2 甜菜碱对肌内脂肪生成的影响

甜菜碱分子中的“有效甲基”是一种最容易参与生物体内合成肉碱、肌酸等必需物质的生化反应系统的甲基。有研究表明,另一个提高肌内脂肪比较有效

的途径是在商品饲料中添加甜菜碱。景绍红^[11]试验表明,在生长肥育猪饲料中添加 1 500 mg/kg 甜菜碱能提高眼肌肌内脂肪含量 18.45%,大理石纹肉评分提高 8.0%,显著改善了肉质。Cadogan 等(1993)发现甜菜碱对日增重和饲料转化率并无影响,但减少背膘厚度 14%,提高了胴体瘦肉率和增加了肌内脂肪的含量。汪以真等^[12]的研究表明,饲料中添加 1 000 mg/kg 甜菜碱使试验组猪背最长肌中肌红蛋白、肌内脂肪和肌苷酸含量比不添加甜菜碱的对照组分别提高了 14.88%($P<0.05$)、17.66%($P<0.05$)和 21.79%($P<0.05$)。

3.3 矿物质对肌内脂肪生成的调控

铬是胰岛素的协同因子,虽然胰岛素和铬在动物体内表现不同的生理功能,但均可调节机体碳水化合物、蛋白质和脂肪的代谢。胰岛素促进血糖进入肝脏、骨骼肌和脂肪细胞,分别转化为糖原和甘油三酯。铬虽然不能取代胰岛素,但它作为葡萄糖耐受因子(GTF)中的一种辅助因子,为活化胰岛素,促进葡萄糖从循环系统进入外周组织所必需。Page 等(1993)在生长育肥猪饲料中补加 0.2 mg/kg 吡啶羧酸铬,显著改善了胴体品质,增加了瘦肉率,提高了眼肌面积,降低了第十肋骨处背膘厚度。Boleman(1995)^[13]报道,补铬不仅增加了肉的嫩度,增加了背最长肌中酸性肌内脂肪,还改善了胴体品质。

3.4 维生素对肌内脂肪生成的调控

维生素 A 和维生素 E 与肥育前期和中期肌内脂的形成呈较强的负相关,饲喂低维生素 A 和维生素 E 的饲料,能提高肌肉内脂肪的含量;而对肥育后期肌肉内脂肪的形成无太大的影响,相反有可能由于维生素的不足导致一些疾病,造成更大的损失。

3.5 环境因素对肌内脂肪生成的调控

环境因素同样对肌内脂肪的生成产生影响。Bee G 等^[14]研究冬季自由散养猪对肌纤维性状的特殊适应和对脂肪组织成分和肉质性状的影响,结果表明:散养对猪半腱肌肌内脂肪含量无影响($P>0.05$),但使背最长肌中肌内脂肪含量降低($P<0.01$),而股直肌中肌肉脂肪含量升高($P>0.05$);散养猪背部脂肪的外层 PUFA 含量升高作为对饱和脂肪酸和 MUFA 的代偿,而在网膜脂肪、背最长肌和半腱肌的颜色深的部分, MUFA 的含量降低($P<0.01$);在散养猪所有组织中,共轭亚油酸含量升高($P<0.01$), (n-6)和(n-3)的比值降低($P<0.01$)。

4 基因对肌内脂肪生成的调控

目前,认为影响猪肌内脂肪含量的候选基因存在

于 FABP 家族(FABP_s), FABP_s 是细胞质内的脂肪酸结合蛋白,存在于许多细胞质中^[15,16]。FABP 一般含有 126~137 个氨基酸,同时表现出氨基酸序列的同源性。它们的作用是转运脂类或参与脂类代谢,调整游离配位体的浓度(Veerkamp 等,1995)^[17]。FABP_s 是一类结构特殊的蛋白质,对脂肪酸具有特别的亲和力,它们可以结合多种配体。FABP_s 至少有十种结构上不同的类型,包括肝脏型、肠型、心脏型、脂肪细胞型、回肠型、表皮型、CABP I 和 II、CRABP I 和 II,不同类型的 FABP 在不同组织和细胞中表达,其中心脏脂肪酸结合蛋白(heart fatty acid binding protein, H-FABP)基因和脂肪组织脂肪酸结合蛋白(adipocyte fatty acid binding protein, A-FABP)在心脏和脂肪中沉积甘油三酯,有利于增加 IMF 含量,被认为是影响肌内脂肪含量的主要基因。

4.1 H-FABP 基因

H-FABP, 又称 FABP₃, 是 FABP 家族中最普遍的一种类型,分子量为 15 kDa, 主要在心肌、骨骼肌和泌乳的乳腺中表达(Veerkamp 等,1995)^[17]。Gerben 等(1997)^[18]利用两个独立的猪/啮齿动物细胞杂交系,将猪的 H-FABP 基因定位于 6 号染色体上。

Gerbens 等(1999)研究了 H-FABP 基因的遗传变异对杜洛克猪肌内脂肪含量变化遗传关系的研究表明,对于 H-FABP RFLP 而言,纯合基因型间肌内脂肪含量差异显著,aa/dd/HH 单倍体有最高的肌内脂肪含量^[19]。在其随后对梅山猪杂交群体的研究中,同样发现 H-FABP 基因对肌内脂肪含量存在着显著影响,并通过研究得出 IMF 含量的遗传变异与蛋白质的表达水平无关,而在 mRNA 水平上存在着显著差异。因此指出 H-FABP 基因的 mRNA 与肌内脂肪含量显著相关^[20]。林万华等(2003)^[21]对二花脸猪的研究也证实 H-FABP 基因与肌内脂肪含量间存在着一定的相关,并发现 MspI 和 HaeIII RFLP 位点具有明显的加性遗传效应。然而,Nechtelberger 等(2001)^[22]在对奥地利猪种的研究中却发现 H-FABP 基因多态性对肌内脂肪含量没有显著影响,这表明 H-FABP 基因对猪肌内脂肪含量的影响可能存在着一定的种群差异。

4.2 A-FABP 基因

A-FABP 全部在脂肪细胞中表达(Veerkamp 等,1995)^[17],其基因序列全长 8 144 bp。Gerben^[18]在 1997 年利用两个独立的猪/啮齿动物细胞杂交系,将猪的 A-FABP 基因定位于 4 号染色体上。

Gerbens 等(1998)所研究的两个杜洛克群体中共

出现 3 个等位基因 A1、A2 和 A3, 其中 A1A1 基因型对肌内脂肪含量产生最小的效应, A1A3 基因型相对于 A1A1 基因型则有明显高的肌内脂肪含量(1%)^[23]。可见, A-FABP 的遗传变异与肌内脂肪含量间存在一定的相关性。然而, 目前对猪 A-FABP 基因的研究, 仅仅停留在微卫星座位多态性的分析上, 因而有必要通过其它途径充分揭示 A-FABP 基因的多态性, 以便深入研究 A-FABP 基因与肌内脂肪含量的关系, 从而加以利用。2001 年, Gerbens^[24]又研究了 A-FABP 基因的 mRNA、蛋白质表达水平与肌内脂肪含量的关系, 结果表明, A-FABP 各基因型的 mRNA 和蛋白质水平没有显著差异, 但肌内脂肪含量差异与 mRNA 之间具有显著的相关性。

5 结束语

猪肉 IMF 含量的多少与肉的品质密切相关, 尤其与肉品风味有很大的相关性, 因此, 人们在要求降低背膘和腹脂的同时, 希望能提高肌内脂肪的含量。影响肌内脂肪含量的因素很多, 营养调控对肌内脂肪的含量有一定的作用, 但显著的提高肌内脂肪的含量比较困难。随着猪肌内脂肪主基因和候选基因的发现, 为我们更进一步地去认识肌内脂肪的遗传机制奠定基础, 同时也为加快猪肉品质的遗传改良提供了新途径。目前, 对肌内脂肪主基因的研究依然还处于萌芽阶段, 对影响肌内脂肪含量的主基因还没有完全确定, 有些候选基因研究也不够透彻。随着分子生物学技术的飞速发展, 调控肌内脂肪含量基因的研究将会更加深入, 必将成为研究影响猪肉品质因素的热点。

参考文献

- 1 Bejerholm C, Barton-Grade P A. Effect of intramuscular fat level on eating quality of pig meat [A]. Belgium:Ghent,1986.389-391
- 2 Flachowsky G. Jour of Animal physiology and Animal Nutrition, 1997,78:187-195
- 3 Patrici A.Eating quality of pork in Denmark [J].Pig Farming(supplement),1985(10):56-57
- 4 曾勇庆,孙玉民.莱芜猪肌肉组织学特性与肉质关系的研究.畜牧兽医学报,1998, 29(6):486-492
- 5 Ellis M. The effects of genetics and nutritional factors on pork quality[J].Asian-Aus J Anim Sci, 1999(12):261-270
- 6 Van Laack R L, Stevens S G, Stalder K J. The influence of ultimate pH and intramuscular fat content on pork tenderness and tenderization[J]. J. Anim. Sci., 2001,79(2):392-397
- 7 Suzuki K, Irie M, et al. Genetic parameter estimates of meat quality traits in Duroc pigs selected for average daily gain, longissimus muscle area, backfat thickness, and intramuscular fat content [J]. J. Anim. Sci., 2005,83(9):2 058-2 065
- 8 Goerl. Pork characteristics as affected by two populations of swine and six crude protein level[J]. J.Anim.Sci.,1995,73:3 621~3 626
- 9 Da Costa N, McGillivray C, et al. Restriction of dietary energy and protein induces molecular changes in young porcine skeletal muscles [J]. J. Nutr., 2004,134(9):2 191-2 199
- 10 Leheska J M, Wulf D M, Maddock R J. Effects of fasting and transportation on pork quality development and extent of post-mortem metabolism. J. Anim. Sci., 2002,80(12):3 194-3 204
- 11 景绍红.日粮营养水平对猪胴体品质调控的研究进展[J].肉质研究,2005(7):60-62
- 12 汪以真,许梓荣,冯杰.甜菜碱对猪肉品质的影响及机理探讨.中国农业科学,2000(1):91-99
- 13 Boleman S L. Effect of chromium picolinate on growth, body composition and tissue accretion in pigs[J].J. Anim.Sci.,1995,73:2 033-2 042
- 14 Bee G, Guex G, Herzog W. Free-range rearing of pigs during the winter: adaptations in muscle fiber characteristics and effects on adipose tissue composition and meat quality traits. J. Anim. Sci., 2004,82(4):1 206-1 218
- 15 Gerbens F, Verbury F J, Van Moerkerk H T B, et al.Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs. J. Anim. Sci, 2001,79:347-354
- 16 Treuner M, Hayes H, Suzuki T, et al.Cloning and characterization of the mouse gene encoding mammary derived growth inhibitor/heart fatty acid binding protein. Gene, 1994,147:237-242
- 17 Veerkamp J H, Maatman R G H J. Cytoplasmic fatty acid binding proteins: their structure and genes. Progress in Lipid Research, 1995,34:17-52
- 18 Gerbens F, Rettenberger G, Lenstra J A, et al. Characterization, chromosomal localization, and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene. Mammalian Genome, 1997, 8(5): 328-332
- 19 Gerbens F, ErpA J M van. Hardars F L, et al. Effect of genetic Variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs[J].J. Anim. Sci.,1999, 77(4): 846-852
- 20 Gerbens F.de Koning D J,Hardars F L, et al.The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs [J]. J. Anim. Sci., 2000, 78:552-559
- 21 林万华,任军,丁能水,等.H-FABP 基因型对二花脸猪相关性状影响的初步分析[J].畜牧兽医学报,2003, 34(4):318-324
- 22 Nechtelberger D, Pires V.Solkner J, et al. Intramuscular fat content and genetic variants at fatty acid-binding protein loci in Austrian pig[J]. J. Anim. Sci.,2001,79(11):2 798-2 804
- 23 Gerbens F,Jansen A,Anton J M,et al.The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs.Mammalian Genome,1998,9(12):1 022-1 036
- 24 Gerbens F, Verburg F J, van Moerkerk H T B, et al.Association of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs [J]. J. Anim.Sci.,2001,79(2): 347-354

(编辑:张学智, mengzai007@163.com)

不同乳糖添加量对早期断奶仔猪全价料中营养物质消化率和仔猪生产性能影响的研究

魏晓玫 陆伟 王博 何余湧

摘要 将6窝(共58头)1日龄长大哺乳仔猪分三个阶段进行试验,结果表明:7~21日龄阶段,两处理组间营养物质消化率差异不显著($P>0.05$),哺乳仔猪的平均日增重差异不显著($P>0.05$);22~40日龄阶段,2.0%乳糖组中营养物质消化率极显著低于4.0%乳糖组($P<0.01$),4.0%乳糖组仔猪平均日增重显著高于2.0%乳糖组($P<0.05$);在41~60日龄阶段,1.0%乳糖组蛋白质、粗纤维、总磷、铜和铁的消化率极显著低于3.0%乳糖组($P<0.01$),3.0%乳糖组仔猪平均日增重显著高于1.0%乳糖组($P<0.05$)。

关键词 仔猪;乳糖;消化率;生产性能

中图分类号 S816.31

Effect of different inclusion of lactose on nutrients digestibility of piglet diet and piglet performance

Wei Xiaomei, Lu Wei, Wang Bo, He Yuyong

Abstract 58 piglets aged 1day were allotted into two treatments to conduct a 3-phase trial, results showed: from 7th to 21st day, there was no significant difference ($P>0.05$) between this two treatments in terms of digestibility and average daily gain; from 22nd to 40th day, the digestibility of nutrient of 2.0% lactose-contained diet was significantly ($P<0.01$) lower than that of 4.0% lactose-contained diet; the average daily gain of piglets offered 4% lactose was significantly higher($P<0.05$) than that of piglets offered 2% lactose; From 41st to 60th day, the digestibility of nutrient of 1.0% lactose-contained diet was significantly ($P<0.01$) lower than that of 3.0% lactose-contained diet; the average daily gain of piglets offered 3% lactose was significantly ($P<0.05$) higher than that of piglets offered 1% lactose.

Key words piglet; lactose; digestibility; performance

乳糖是一种低能量的甜味物质,在消化道内可生成乳酸,乳酸具有促进肠道益生菌生长、产生酸性环境、促进微量元素吸收、降低氨等腐败物质含量的功能,所以乳糖在猪饲料中的使用越来越受到重视。

本试验研究不同乳糖添加量对不同生长阶段仔猪料中营养物质消化率和生产性能的影响,为探索降低猪排泄物中氮、磷、铜、锌和铁对环境的污染提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验动物与分组

选择品种、胎次及初生体重相近的6窝(58头)1日龄长大哺乳仔猪进行试验,将它们分成2组(每组3窝),处理I组共30头,处理II组共28头,组间公母数基本一致,平均体重差异不显著($P>0.05$)。

1.2 饲养管理、粪样收集及处理

所有哺乳仔猪于7日龄开始补料,自由饮水和采食。每个处理组均分三个阶段进行:7~21日龄、22~40日龄和41~60日龄,每个阶段喂不同乳糖含量的饲料,每日记录各栏喂料量和剩料量。每一阶段结束前5d对每栏猪进行粪样收集,粪样量为150g左右,然后将粪样放入4℃冰箱中保存,每一期试验结束后立即将粪样搅拌均匀、烘干并制样。分别于第7、22、41和61日龄早晨对试验猪进行空腹称重。

1.3 试验日粮组成及营养水平(见表1)

1.4 测定方法和测定指标

样品中水分、纤维、钙、磷、粗蛋白、铜、铁和锌含量按照AOAC(1990)的方法进行测定。

1.5 数据处理

所有数据用SAS 6.12软件进行单因素方差分析,差异显著者作邓肯氏法多重比较。

2 结果与讨论

2.1 饲料中蛋白质、钙、总磷、铜、铁和锌的含量(见表2)

魏晓玫,江西生物科技职业学院,330200,江西南昌。

陆伟、王博、何余湧(通讯作者),江西农业大学动物科学技术学院。

收稿日期:2006-12-18

表1 试验日粮组成及营养水平

项目	7~21 日龄		22~40 日龄		41~60 日龄	
	处理 I 组	处理 II 组	处理 I 组	处理 II 组	处理 I 组	处理 II 组
玉米(%)	50	50	51.4	50.4	55.2	54.4
次粉(%)	5.7	3.7	8	7	9	6
普通豆粕(%)	19	19	19	19	21	22
膨化大豆(%)	15	15	12	12	6	6
鱼粉(%)	3	3	3	3	3	4
乳糖(%)	2.5	4.5	2	4	1	3
石粉(%)	0.8	0.8	0.6	0.6	0.8	0.6
磷酸氢钙(%)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
食盐(%)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
酸化剂(%)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
预混料(%)	2	2	2	2	2	2
合计(%)	100	100	100	100	100	100
营养水平						
DE(MJ/kg)	13.71	13.75	13.71	13.75	13.59	13.67
CP(%)	20.61	20.50	19.90	19.76	19.80	19.72
Ca(%)	0.87	0.87	0.85	0.87	0.85	0.82
P(%)	0.71	0.70	0.71	0.70	0.70	0.72
Lys(%)	1.24	1.23	1.17	1.16	1.06	1.12
Met+Cys(%)	0.72	0.71	0.69	0.68	0.65	0.67

表2 饲料中蛋白质、钙、总磷、铜、铁和锌的含量

项目	7~21 日龄		22~40 日龄		41~60 日龄	
	处理 I 组	处理 II 组	处理 I 组	处理 II 组	处理 I 组	处理 II 组
水分(%)	11.18±0.11	11.07±0.11	11.40±0.10	11.05±0.07	11.31±0.10	11.34±0.13
蛋白质(%)	20.26±0.10	20.31±0.12	19.86±0.18	19.67±0.15	19.17±0.14	18.87±0.05
纤维(%)	3.69±0.03	3.42±0.05	3.90±0.04	3.42±0.03	3.33±0.02	3.38±0.03
钙(%)	1.37±0.04	1.47±0.05	1.31±0.05	1.36±0.03	1.32±0.05	1.23±0.02
磷(%)	0.61±0.03	0.65±0.03	0.74±0.02	0.70±0.02	0.78±0.02	0.74±0.02
铜(mg/kg)	128.3±1.50	127.5±0.65	127.0±2.25	126.8±1.55	121.5±0.90	121.0±0.40
铁(mg/kg)	606.7±3.90	600.2±2.95	595.1±9.10	599.5±5.50	602.5±3.80	599.0±8.00
锌(mg/kg)	1 187.5±3.50	1 188.0±13.00	1 171.0±14.00	1 165.2±8.00	1 143.0±0.10	1 140.5±12.50

2.2 粪便中蛋白质、钙、总磷、铜、铁和锌的含量(见表3)

2.3 饲料中蛋白质、纤维、钙、总磷、铜、铁和锌的消化率(见表4)

表3 粪便中蛋白质、钙、总磷、铜、铁和锌的含量

项目	7~21 日龄		22~40 日龄		41~60 日龄	
	处理 I 组	处理 II 组	处理 I 组	处理 II 组	处理 I 组	处理 II 组
水分(%)	7.95±0.16	8.15±0.09	8.33±0.09	8.43±0.12	12.95±0.14	11.31±0.12
蛋白质(%)	23.37±0.14	22.56±0.05	28.01±0.13	25.58±0.11	23.87±0.08	21.58±0.09
纤维(%)	13.88±0.17	12.97±0.04	12.73±0.09	12.23±0.06	11.32±0.06	11.22±0.10
钙(%)	3.04±0.07	2.73±0.06	3.31±0.06	3.00±0.03	2.84±0.10	2.82±0.05
磷(%)	1.34±0.06	1.39±0.04	1.76±0.03	1.55±0.02	1.89±0.03	1.87±0.03
铜(mg/kg)	259.3±1.05	255.1±1.30	236.9±4.70	265.0±2.30	246.4±3.15	279.5±1.50
铁(mg/kg)	1 186.8±14.00	1 199.5±13.50	1 139.5±22.00	1 250.0±3.00	1 258.5±12.50	1 349.5±2.50
锌(mg/kg)	2 135.6±11.00	2 167.5±33.50	2 129.5±1.50	2 284.0±8.00	2 121.0±16.00	2409.0±14.00

表4 饲料中蛋白质、纤维、钙、总磷、铜、铁和锌的消化率(%)

项目	7~21 日龄		22~40 日龄		41~60 日龄	
	处理 I 组	处理 II 组	处理 I 组	处理 II 组	处理 I 组	处理 II 组
蛋白质(%)	73.86±0.02 ^{BCb}	74.28±0.11 ^{BCb}	66.29±0.31 ^{Dd}	73.56±0.21 ^{BCb}	73.11±0.08 ^{Cc}	79.20±0.25 ^{Aa}
粗纤维(%)	19.23±0.49 ^{Dde}	19.08±0.84 ^{De}	20.60±0.14 ^{Dd}	26.87±0.13 ^{Bb}	23.95±0.15 ^{Cc}	36.96±0.09 ^{Aa}
钙(%)	60.96±0.01 ^{Aa}	60.49±0.56 ^{Aa}	47.75±0.54 ^{Dd}	57.90±0.46 ^{Bb}	55.10±0.27 ^{Cc}	56.60±0.14 ^{BCb}
磷(%)	53.68±0.02 ^{ABab}	54.07±0.44 ^{Aa}	40.87±0.60 ^{Dd}	54.39±0.30 ^{Aa}	45.58±0.48 ^{Cc}	51.75±0.21 ^{Bb}
铜(mg/kg)	56.67±0.31 ^{Aa}	57.36±0.01 ^{Aa}	53.62±0.10 ^{Bd}	57.24±0.24 ^{Aa}	54.64±0.12 ^{Bc}	56.19±0.38 ^{Ab}
铁(mg/kg)	58.05±0.25 ^{Aa}	57.42±0.26 ^{Aa}	52.39±0.20 ^{Ab}	57.36±0.20 ^{Bb}	53.27±0.04 ^{Aa}	57.27±0.49 ^{Bb}
锌(mg/kg)	61.45±0.33 ^{Aa}	61.13±0.16 ^{Aa}	54.80±0.50 ^{Cd}	59.94±0.05 ^{ABb}	58.49±0.20 ^{Bc}	59.84±0.21 ^{ABb}

注:肩标小写字母不同者表示差异显著(P<0.05),肩标大写字母不同者表示差异极显著(P<0.01),下同。

2.3.1 蛋白质消化率

7~21 日龄期间,两种试验料中的蛋白质消化率差异不显著($P>0.05$),因为这一阶段的仔猪仍以采食母乳为主,固体饲料进食量很小,还不足以对全部进食的蛋白质消化率产生显著影响,这说明 2.5%和 4.5%的乳糖用量对 7~21 日龄哺乳仔猪料中的蛋白质消化率没有显著影响。

22~40 日龄期间,2.0%乳糖组中蛋白质消化率极显著低于 4.0%乳糖组($P<0.01$)。断奶后,仔猪采食量很低,胃肠道中乳糖量很少,生成乳酸的量相应减少,加上采食断奶仔猪料(pH 值 5.8~6.5)后会使得胃内 pH 值高于 4.0(正常胃内 pH 值为 2.5~3.5),这既不利于胃蛋白酶原的激活,也不利于充分发挥胃蛋白酶活性。数据表明,在这一阶段用 4%的乳糖比使用 2%的乳糖可显著地提高日粮蛋白质的消化率。

蛋白质在 41~60 日龄阶段的消化情况与在 22~40 日龄阶段的情况类似。

2.3.2 粗纤维消化率

不同乳糖用量对 7~21 日龄阶段哺乳仔猪消化粗纤维的能力没有显著影响($P>0.05$),对 22~40 和 41~60 日龄阶段仔猪消化粗纤维的能力有显著影响。与 2%的乳糖用量相比,4%的乳糖用量能极显著地提高 22~40 日龄阶段仔猪消化粗纤维的能力($P<0.01$),我们在试验中发现,采食含 2%乳糖组日粮的断奶仔猪腹

泻次数和程度均比采食含 4%乳糖日粮组高。在 41~60 日龄阶段,3%乳糖组仔猪消化粗纤维的能力也极显著地高于 1%乳糖组仔猪($P<0.01$)。

2.3.3 矿物质元素消化率

钙、磷消化率总的趋势是钙的消化率高于磷的消化率。在 7~21 日龄,两种试验料中钙、磷消化率均差异不显著($P>0.05$);在 22~40 日龄,含 4%乳糖的试验料中钙、磷消化率极显著高于含 2%乳糖的试验料中钙、磷消化率($P<0.01$);钙、磷消化率随日龄增加表现出下降的趋势。

两种试验日粮中铜的消化率在 7~21 日龄阶段差异不显著($P>0.05$),但在 22~40 和 41~60 两个阶段均分别有极显著差异($P<0.01$);增加日粮的乳糖用量可提高日粮中铜的消化率。

铁的消化率随乳糖用量的增加也有增加的趋势,含 2.5%乳糖和含 4.5%乳糖日粮中铁的消化率差异不显著($P>0.05$)。其它两个阶段,不同乳糖添加量对铁的消化率有极显著的影响($P<0.01$)。

不同乳糖添加量对 7~21 日龄阶段仔猪日粮中锌的消化率没有显著影响($P>0.05$);但对 22~40 和 41~60 阶段日粮中锌的消化率分别为极显著($P<0.01$)或显著($P<0.05$)影响,其中乳糖添加量越大,日粮中锌的消化率越高,但锌的消化率有随仔猪日龄增加而降低的趋势。

2.4 营养物质采食量(见表 5)

表 5 营养物质采食量

项目	7~21 日龄		22~40 日龄		41~60 日龄	
	处理 I 组	处理 II 组	处理 I 组	处理 II 组	处理 I 组	处理 II 组
蛋白(g/d)	1.32±0.07 ^{Dd}	1.40±0.10 ^{Dd}	21.58±0.11 ^{Cc}	26.11±0.03 ^{Bb}	113.61±0.04 ^{Aa}	116.03±0.12 ^{Aa}
纤维(g/d)	0.25±0.02 ^{Dd}	0.27±0.06 ^{Dd}	4.07±0.14 ^{Cc}	4.93±0.08 ^{Bb}	19.05±0.03 ^{Aa}	19.46±0.14 ^{Aa}
钙(g/d)	0.11±0.05 ^{Cd}	0.12±0.03 ^{Cd}	1.65±0.02 ^{Bc}	2.00±0.06 ^{Bb}	8.12±0.11 ^{Aa}	8.30±0.08 ^{Aa}
磷(g/d)	0.04±0.01 ^{Cd}	0.04±0.03 ^{Cd}	0.77±0.06 ^{Bc}	0.94±0.10 ^{Bb}	4.46±0.13 ^{Aa}	4.56±0.11 ^{Aa}
铜(mg/d)	0.88±0.03 ^{Ee}	0.94±0.04 ^{Ee}	13.27±0.16 ^{Dd}	16.05±0.03 ^{Cc}	69.50±0.22 ^{Bb}	70.99±0.17 ^{Aa}
铁(mg/d)	4.18±0.18 ^{Cd}	4.45±0.10 ^{Cd}	62.16±0.21 ^{Bc}	75.22±0.08 ^{Bb}	344.66±0.17 ^{Aa}	352.01±0.13 ^{Aa}
锌(mg/d)	8.17±0.05 ^{Ee}	8.70±0.03 ^{Ee}	122.31±0.14 ^{Dd}	148.01±0.04 ^{Cc}	653.85±0.22 ^{Bb}	667.79±0.10 ^{Aa}

在 7~21 日龄阶段,两处理组间营养物质采食量差异不显著($P>0.05$);在 22~40 日龄阶段,4%乳糖组仔猪蛋白质、纤维、铜和锌的采食量均分别极显著高于 2%乳糖组仔猪($P<0.01$),钙、总磷和铁的采食量分别显著地高于 2%乳糖组仔猪($P<0.05$);在 41~60 日龄阶段,3%乳糖组仔猪只有铜和锌的采食量极显著高于 1%乳糖组仔猪($P<0.01$),其余营养物质的采食量差异不显著($P>0.05$)。

2.5 平均日增重(见表 6)

表 6 平均日增重(kg/d)

项目	7~21 日龄	22~40 日龄	41~60 日龄
处理 I 组	0.20±0.01 ^a	0.07±0.01 ^b	0.48±0.01 ^b
处理 II 组	0.18±0.01 ^a	0.10±0.01 ^a	0.52±0.01 ^a

在 7~21 日龄阶段,两处理组间哺乳仔猪平均日增重差异不显著($P>0.05$);在 22~40 日龄阶段,由于采食含 2%乳糖日粮的仔猪腹泻比采食含 4%乳糖日粮的仔猪更严重,导致营养物质消化吸收减少,从而使该组仔猪平均日增重显著低于采食含 4%乳糖日粮

组仔猪($P<0.05$);在 41~60 日龄阶段,采食含 3%乳糖日粮的仔猪平均日增重显著高于采食含 1%乳糖日粮

的仔猪($P<0.05$)。

2.6 采食量和饲料转化率(见表 7)

表 7 采食量及料肉比

项目	平均采食量(g/d)			料肉比			
	7~21 日龄	22~40 日龄	41~60 日龄	7~21 日龄	22~40 日龄	41~60 日龄	7~60 日龄
处理 I 组	7.75±0.17 ^a	117.89±1.58 ^b	645.00±5.00 ^b	0.04±0.01 ^a	1.61±0.11 ^a	1.33±0.01 ^a	1.09±0.03 ^a
处理 II 组	8.25±0.50 ^a	142.66±5.23 ^a	658.75±6.25 ^a	0.05±0.00 ^a	1.43±0.10 ^b	1.27±0.01 ^a	1.06±0.01 ^a

仔猪在 7~21 日龄正处于哺乳期,试验中发现,所有受试仔猪均有充足的奶水供应,故其对固体饲料的采食量很有限,此阶段两处理组间仔猪采食固体饲料的量差异不显著($P>0.05$)。仔猪在 22 日龄断奶后,固体饲料是其唯一的食物来源,所以仔猪在饥饿的刺激下不得不采食固体饲料,但由于固体饲料在适口性和可消化性方面与母乳有较大差异,仔猪采食固体饲料的量仍然较低。两个处理组日粮中乳糖用量不同导致仔猪的采食量出现了差异,其中 4%乳糖组仔猪采食量显著高于 2%乳糖组仔猪($P<0.05$),这说明在这一阶

段,提高乳糖用量可提高断奶仔猪采食量。究其原因,一方面是因为增加乳糖用量可改善饲料的适口性;另一方面是因为增加乳糖用量增加了肠道中乳酸的量,促进了消化酶的分泌,提高了营养物质的消化速度,使食糜在消化道中的排空速度加快,从而使仔猪更易产生饥饿感。提高乳糖用量只显著改善了 22~40 日龄仔猪的饲料转化率,4%乳糖组仔猪的饲料转化率显著好于 2%乳糖组仔猪($P<0.05$)。

2.7 经济效益(见表 8)

本试验的数据说明,日粮中乳糖用量的增加并没

表 8 经济效益

项目	平均采食量(kg/头)			饲料成本 (元/头)	平均增重(kg/头)			总增重 (kg/头)	仔猪价格 (元/kg)	总收入 (元/头)
	7~21 日龄	22~40 日龄	41~60 日龄	7~60 日龄	7~21 日龄	22~40 日龄	41~60 日龄	7~60 日龄		
处理 I 组	0.11	2.24	12.90	45.92	3.00	1.33	9.60	13.93	16.00	222.88
处理 II 组	0.12	2.71	13.18	50.69	2.70	1.90	10.40	15.00	16.00	240.00

有降低养猪效益,到 60 日龄时处理 II 组的仔猪每头比处理 I 组仔猪要多收 17.12 元,这说明在一定范围内增加日粮中乳糖用量可提高养猪效益。

3 小结

3.1 不同乳糖用量对 7~21 日龄阶段哺乳仔猪开食料中营养物质消化率和仔猪生产性能没有显著影响,但在 22~40 和 41~60 日龄阶段提高乳糖用量可提高日粮中营养物质消化率和仔猪生产性能。

3.2 提高乳糖用量可提高饲料中营养物质消化率、降低粪便中营养物质的含量,有利于降低氮、磷和微量元素对环境的污染。

3.3 21 日龄前的哺乳仔猪料中乳糖用量可低于 22~40 日龄阶段仔猪日粮中乳糖用量。

参考文献

- 李振田,李德发,朴香淑,等.乳清粉对断奶仔猪生产性能的影响[J].饲料工业,2001(10):25~26
- 袁森泉.乳糖替代品在断奶仔猪日粮中的应用[J].湖南饲料,2001(3):18~20

- 陈凤庆,Kevin Halpin, Mike Trotter. 乳糖在断奶仔猪营养中的作用[J].养猪,2000(3):10
- 曹日亮,安英凤,马启军,等.复合酸化剂对仔猪消化器官发育及营养物质消化率的影响[J].中国饲料,2000(9):8~9
- 龚杰万.挑战仔猪早期断奶[J].广东饲料,2000(2):20~24
- 关受江,田有庆,胡明照,等.高铜添加剂对猪生长和屠体的影响.动物营养学报,1995,7(3):64~66
- 徐孝义,李杰,王安,等.仔猪早期断奶对 Fe、Cu、Mn、Zn 和 Se 需要量研究.动物营养学报,1995,7(3):1~7
- 杨立彬,李德发,谯仕彦,等.高铜、锌水平预混料对断奶仔猪促生长、防下痢效果比较.饲料研究,1999(12):1~3

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

·一句话新闻·

★雪灾发生后,辽宁省动物卫生监督局积极开展灾后自救和动物卫生安全监管工作,同时根据 2007 年辽宁省禽流感等重大动物疫病防控计划,从 3 月 10 日起,重大动物疫病春防工作全面启动,目前已经组织牲畜口蹄疫疫苗 4 422.6 万毫升,禽流感灭活疫苗 1.4 亿毫升,禽流感-新城疫二联疫苗 0.5 亿羽份,正在陆续下派到各地;各地禽流感等重大动物疫病免疫工作正在紧张有序地进行。

不同能量水平对朗德鹅生长曲线的影响研究

曹爱青 毛宗林 胡骏鹏 范卫星 何瑞国

摘要 在不同能量水平下,运用 Logistic 模型和 Gompertz 模型对朗德鹅 0~10 周龄生长曲线进行了分析和非线性曲线拟合研究。结果表明,不同生长阶段,朗德鹅公鹅、母鹅的适宜能量水平不同, Logistic 模型和 Gompertz 模型都能很好地拟合朗德鹅的生长曲线,但 Gompertz 模型在拟合度和预测体重效果方面相对较好。中等能量水平下,2 周龄前公鹅、母鹅的生长曲线基本一致,之后公鹅则明显高于母鹅,且保持较长时间的快速生长状态,公鹅的拐点体重显著高于母鹅,但拐点日龄的出现却晚于母鹅。

关键词 朗德鹅;生长曲线;拟合曲线;Logistic 模型;Gompertz 模型

中图分类号 S835

Effect of different energy levels on the growth curves of landes geese

Cao Aiqing, Mao Zonglin, Hu Junpeng, Fan Weixing, He Ruiguo

Abstract The growth curves of Landes geese of 10 weeks old were analyzed and fitted with two kinds of non-linear models in the different energy levels. The results indicated that the feasible energy requirements on male geese and were different in the different growth stages. The growth curves could be fitted by Logistic and Gompertz model for Landes geese. But Gompertz model was considered to be the better model to fit growth curves of Landes geese because of its higher fitness and less bias of predicted body weight on the given age. The male and female Landes geese had the same growth curve before 2 weeks old. And then, the males got a higher growth rate than females did. The live weight of inflexion of males was higher than the females notably, but the day of inflexion was late to the females relatively.

Key words landes geese; growth curve; curve model fitting; logistic model; gompertz model

朗德鹅,原产于法国西部的朗德省,是大型托罗士鹅和体型较小的玛瑟布鹅经过长期杂交选育而成,体型中等。朗德鹅适应性强,成活率高,抗病易养,能适应各种生活环境,产肥肝性好,容易育肥,被誉为“世界绿色食品”之王。然而目前还缺乏有关朗德鹅生长发育规律方面的资料。

动物生长一般均具有非线性的特性,故可以用非线性数学模型来描述动物的生长规律^[1]。生长曲线是反映动植物个体在生长过程某部分或整体的规律性的变化^[2]。因此,畜禽生长曲线的分析与拟合是研究畜禽生长发育规律的主要方法之一^[3]。而 Logistic 模型

和 Gompertz 模型不仅对畜禽生长曲线拟合效果好,而且其中的参数具体估值能够反映不同种群在生长率、最大体重方面的差异。应用数学模型的优点在于,它可以把一系列的日龄、体重数据压缩成为生长方程中的几个参数,有效地消除部分实验误差的影响^[4],具有实际参考意义,所以被广泛采用。国内外学者在家禽生长曲线研究方面做了大量的工作^[1,3,5-9],水禽生长曲线的研究却不多^[10-15],且关于引进的法国朗德鹅生长曲线的研究尚未见报道。

本文拟用 Logistic 模型和 Gompertz 模型对朗德鹅公鹅、母鹅在不同能量水平下生长曲线的分析与拟合,并加以比较,旨在更好地了解朗德鹅的生长发育和不同阶段的生长潜力,以及公鹅与母鹅对能量需要的差别,以期生产和进一步品种选育提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 试验动物及试验安排

选用 180 只 1 日龄朗德鹅,公母各半。将试验鹅随机分为三个处理组,即试验 I 组、试验 II 组、试验 III 组(即 ♂ I、♂ II、♂ III、♀ I、♀ II、♀ III),每个处理 2 组(公鹅组、母鹅组),每组 30 只,分栏饲养 70 d。朗德

曹爱青,华中农业大学动物科技学院,430070,湖北武汉。

毛宗林、胡骏鹏、范卫星、何瑞国(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-12-04

★ 基金项目:“十一五”湖北省科技攻关计划“主要畜禽良种培育及产业化关键技术研究与开发”重大专项项目的一部分(编号:2005AA205A08)

鹅均由华中农业大学动物科技学院鹅肥肝养殖繁育基地提供。

1.2 试验安排

本试验从2006年1月4日至2006年3月15日,为期10周。设计10.87、12.13、13.38 MJ/kg三种能量水平的日粮,粗蛋白水平约为20%,饲料为自制的玉米-豆粕型日粮,于华中农业大学动物科技学院饲料车间生产配制,营养水平见表1。

表1 试验日粮营养水平

项目	试验 I 组	试验 II 组	试验 III 组
代谢能(MJ/kg)	13.38	12.13	10.87
蛋白质(%)	19.1	19.4	19.6

1.3 饲养管理

试验鹅0~3周龄采用网上育雏,4~10周龄采用

地面平养,分栏饲养,每个栏面积为2 m×2 m。1周龄内24 h光照,以后逐渐减少光照时间,至20日龄采用自然光照。雏鹅试验阶段使用火炉和275 W红外灯供温。试验第一周保持室内温度在30℃以上,以后逐渐降温,湿度保持在65%左右。在每周末早上9:00空腹称重,连续10周。

1.4 统计方法

根据朗德公鹅、母鹅不同能量、不同周龄的体重资料,运用SAS8.2软件及CurveExpert1.3拟合模型参数的最佳估计值a、b、c,建立生长曲线模型,推算出拐点体重、拐点日龄和最大日增重,根据拟合度(R²)评价生长曲线模型。

1.5 生长模型及表达式、参数(见表2)

2 结果与分析

表2 两种拟合曲线模型的表达式及参数

曲线模型	表达式	拐点日龄	拐点体重	最大日增量
Logistic 曲线	$W_t = a/[1 + b \exp(-c \cdot t)]$	$-7 \ln(1/b)/c$	$a/2$	$axc/(14 \times e)$
Gompertz 曲线	$W_t = ax \exp[-\exp(b - c \cdot t)]$	$(b/c) \times 7$	a/e	$axc/(14 \times e)$

注:t为周龄,W₀为0周龄的体重,W_t为t周龄时的体重,a为成熟体重,c为生长速率参数,e=2.72,Gompertz模型中 $b = \ln(\ln a - \ln W_0)$,Logistic模型中 $b = a/W_0 - 1$ 。

2.1 生长曲线分析

2.1.1 公鹅的生长曲线分析(见图1)

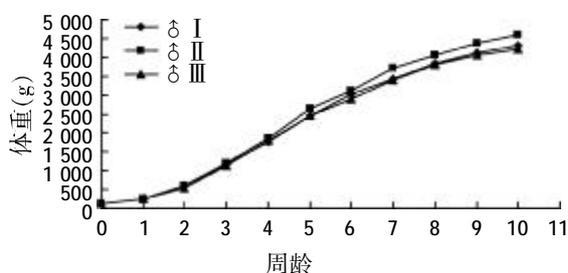


图1 公鹅0~10周龄的体重累积生长曲线

由图1可知,2周龄前,朗德鹅生长缓慢,3~7周龄生长最快,但♂II组高于♂I和♂III组,在第5周龄左右♂II组达到增重高峰期,随后减慢。2周龄前三个能量组生长曲线基本一致,2周龄后♂II组鹅的生长速度明显快于♂I组,而♂I组明显快于♂III组,且一直延续到观测结束。

2.1.2 母鹅的生长曲线分析(见图2)

由图2可知,2周龄前,朗德鹅生长缓慢,3~8周龄生长最快,但♀I组高于♀II和♀III组,在第5周龄左右♀I组达到增重高峰期,随后减慢,第8周龄生长速度再次加快。2周龄前三个能量组生长曲线基本一致,2周龄后♀I组的生长速度明显快于♀II组,而♀II组明显快于♀III组,且一直延续到观测结束。

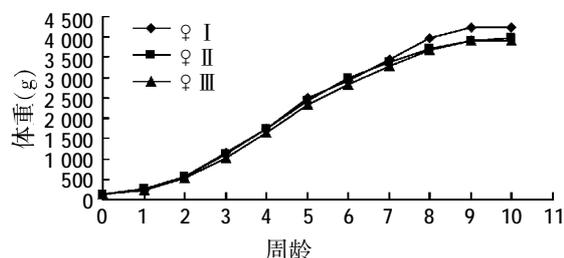


图2 母鹅0~10周龄的体重累积生长曲线

2.1.3 中等能量水平下公鹅、母鹅的生长曲线分析(见图3)

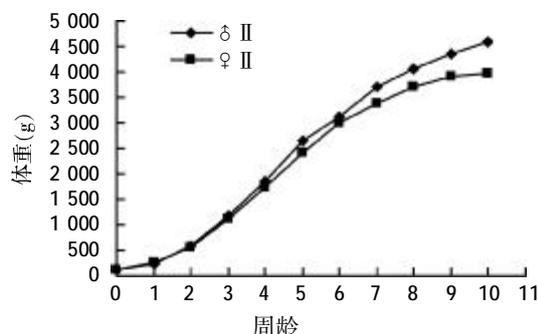


图3 中等能量水平时公鹅和母鹅0~10周龄的体重累积生长曲线

由图3可知,2周龄前,公鹅、母鹅的生长均缓慢,3~6周龄生长加快,5周龄左右生长速度达到高峰。3周龄前,公、母鹅生长曲线一致,而3周龄后公鹅的生

长速度明显快于母鹅,一直延续到观测结束。

各组试验鹅 Logistic 模型和 Gompertz 模型生长拟合参数估计值和拟合度(R²)见表 3。

2.2 生长模型的拟合

表 3 两种拟合曲线模型参数估计值和拟合度

试验组	生长模型	模型参数			拟合度 R ²	拐点体重(g)	拐点日龄	最大日增重(g)
		a	b	c				
♂ I	Logistic	4 365.4	20.533 8	0.643 1	0.998 8	2 182.70	32.89	73.72
	Gompertz	4 821.3	1.426 3	0.366 9	0.999 8	1 772.54	27.78	46.45
♂ II	Logistic	4 608.2	22.084 6	0.657 0	0.998 5	2 304.1	32.97	79.51
	Gompertz	5 069.0	1.503 9	0.377 5	0.999 7	1 863.60	27.89	50.25
♂ III	Logistic	4 272.4	20.603 4	0.647 9	0.998 3	2 136.20	32.69	72.69
	Gompertz	4 688.5	1.472 9	0.375 1	0.999 7	1 723.71	27.49	46.18
♀ I	Logistic	4 394.5	21.799 6	0.650 2	0.998 4	2 197.25	33.18	75.03
	Gompertz	4 826.2	1.495 9	0.374 6	0.999 0	1 774.34	27.95	47.48
♀ II	Logistic	4 032.2	23.219 1	0.705 9	0.999 4	2 016.10	31.19	74.75
	Gompertz	4 350.2	1.548 7	0.416 7	0.999 6	1 599.34	26.02	47.60
♀ III	Logistic	4 032.0	24.473 3	0.689 4	0.999 2	2 016.00	32.47	73.00
	Gompertz	4 379.8	1.572 4	0.403 1	0.999 3	1 610.22	27.31	46.36

由表 3 可知,Logistic 曲线和 Gompertz 曲线均能很好的拟合朗德鹅的生长曲线,拟合度(R²)均在 99% 以上。就每个试验组而言,Gompertz 模型的拟合效果均好于 Logistic 模型。

Logistic 模型中,就公鹅而言,♂ III 拐点日龄的出现早于 ♂ I,♂ I 拐点日龄的出现又早于 ♂ II;就母鹅而言,♀ II 的拐点日龄的出现早于 ♀ III,♀ III 早于

♀ I;中等能量和低能量水平下,母鹅的拐点日龄的出现早于公鹅,但高能量水平结果相反。Gompertz 模型中,拐点日龄出现的早晚顺序与 Logistic 模型一致。就两种模型而言,Gompertz 模型的拐点的出现早于 Logistic 模型,而拐点日龄出现的越晚,拐点体重越大,最大日增重也越大。

2.3 观测值与估计值比较(见表 4、表 5)

表 4 公鹅体重观测值与拟合曲线估计值比较

周龄	♂ I			♂ II			♂ III		
	测量值 Wt(g)	Logistic 曲线 W't(g)	Gompertz 曲线 W't(g)	测量值 Wt(g)	Logistic 曲线 W't(g)	Gompertz 曲线 W't(g)	测量值 Wt(g)	Logistic 曲线 W't(g)	Gompertz 曲线 W't(g)
0	130.00	202.72	66.07	130.00	199.62	56.36	130.00	197.77	59.80
1	253.76	370.14	246.73	247.18	370.17	231.91	241.86	362.73	234.00
2	592.00	654.107	614.75	582.34	664.48	611.69	546.71	643.56	597.58
3	1 170.00	1 096.14	1 157.20	1 180.00	1 130.36	1 189.32	1 130.00	1 081.66	1 138.20
4	1 748.20	1 700.06	1 793.70	1 845.84	1 775.79	1 876.16	1 800.67	1 679.93	1 772.23
5	2 461.36	2 393.14	2 430.14	2 648.81	2 522.47	2 564.44	2452.79	2 363.95	2 402.56
6	3 033.82	3 045.89	2 999.23	3 127.54	3 225.57	3 177.17	2 905.55	3 003.78	2 961.37
7	3 438.42	3 555.69	3 469.96	3 700.70	3 770.37	3 679.87	3 398.91	3 499.26	3 419.05
8	3 844.42	3 898.71	3 838.78	4 048.32	4 132.19	4 069.73	3 791.68	3 829.74	3 773.95
9	4 116.86	4 106.97	4 117.08	4 359.82	4 348.51	4 360.62	4 059.71	4 028.79	4 038.98
10	4 320.00	4 225.63	4 321.66	4 580.00	4 469.82	4 571.97	4 220.00	4 141.39	4 231.83

表 5 母鹅体重观测值与拟合曲线估计值比较

周龄	♀ I			♀ II			♀ III		
	测量值 Wt(g)	Logistic 曲线 W't(g)	Gompertz 曲线 W't(g)	测量值 Wt(g)	Logistic 曲线 W't(g)	Gompertz 曲线 W't(g)	测量值 Wt(g)	Logistic 曲线 W't(g)	Gompertz 曲线 W't(g)
0	120.00	192.74	55.62	120.00	166.49	39.36	120.00	158.28	35.39
1	235.85	355.02	224.30	252.65	323.55	195.61	228.71	303.56	175.04
2	566.25	633.33	585.10	559.18	605.56	562.94	509.41	562.79	509.37
3	1 160.00	1 071.92	1 131.20	1 110.00	1 062.94	1 130.04	1 020.00	984.92	1 040.00
4	1 729.45	1 678.67	1 779.90	1 739.93	1 694.90	1 788.92	1 636.21	1 579.52	1 675.67
5	2 490.84	2 382.60	2 430.78	2 423.90	2 399.01	2 421.62	2 325.92	2 266.12	2 304.72
6	2 924.00	3 050.18	3 011.67	2 996.43	3 017.95	2 956.66	2 821.94	2 898.45	2 851.83
7	3 462.72	3 572.65	3 489.75	3 374.01	3 458.42	3 372.51	3 294.51	3 370.45	3 288.06
8	3 971.97	3 923.43	3 861.79	3 708.54	3 726.95	3 678.14	3 690.99	3 670.43	3 616.16
9	4 221.73	4 135.35	4 140.35	3 924.56	3 875.50	3 894.62	3 909.88	3 842.05	3 853.47
10	4 230.00	4 255.31	4 343.46	3 980.00	3 953.29	4 044.25	3 920.00	3 934.38	4 020.67

表4和表5结果表明,2种模型对生长曲线的拟合度均较好,但Gompertz模型在拟合度,特别是估计朗德鹅体重方面更优。

3 讨论

3.1 能量水平对朗德鹅的生长速度的影响

此次试验中公鹅、母鹅在2周龄前均增重缓慢,从2周龄开始逐渐加速,5周龄左右达到增重高峰期,随后逐渐减慢。三种能量水平下,2周龄前生长速度基本一致,2周龄后逐渐分化,就公鹅而言,中等能量水平组的生长速度明显大于其它两种能量水平组;就母鹅而言,高能量水平组的生长速度明显大于其它两种能量水平组。实际生产中要充分利用快速生长阶段,选择适宜的能量水平,缩短生产周期,生产周期短可以缩短从投入到产出的时间,提高流动资金的周转速度,这在商品市场中特别具有竞争性,为以后鹅杂交选育提供理论依据,并为朗德鹅在我国的饲养标准的制定提供参考。

3.2 生长曲线拟合效果的比较

Logistic模型、Gompertz模型都能较好地拟合朗德鹅的生长规律,不论是哪种能量水平还是公鹅、母鹅,这两种曲线的拟合度基本上达99%以上。其中Gompertz模型在6个试验组的拟合中拟合度均达到最高,分别为0.999 8、0.999 7、0.999 7、0.999 0、0.999 6、0.999 3。这与葛剑等^[16]使用Logistic模型、Gompertz模型和Von Bertalanff模型对河北柴鸡的拟合结果一致。

3.3 中等能量水平下朗德鹅公鹅、母鹅生长曲线的比较

禽类生长曲线变化具有以下特点:刚出雏生长缓慢,2周龄后加速生长,然后出现一个拐点,此时生长率达到最大,拐点之后开始持续减慢,直到性成熟^[17]。因此在拐点时生长速度达到最大。就两种模型而言,Gompertz模型的拐点的出现早于Logistic模型,而拐点日龄的出现越晚,拐点体重越大,最大日增重也越大。本次试验中,母鹅拐点日龄的出现早于公鹅,拐点体重、最大日增重均小于公鹅,这与张红等^[18]关于溧阳鸡生长曲线分析的结果一致,表明公鹅早期生长相对缓慢,而母鹅早期就能快速达到最大生长率,后期公鹅的生长速度明显快于母鹅,一直延续到观测结束。因此在实际生产中,可以将公母分栏饲养,不同生长阶段提供适宜营养水平的饲料,满足其生长发育需要,确保其最佳经济效益。

参考文献

- 1 王志跃,陈伟亮,白群安,等.新扬州鸡生长模型比较研究[J].黑龙江畜牧兽医,2002(12):4-6
- 2 盛志廉,吴常信.数量遗传学[M].北京:中国农业出版社,1995. 114-115
- 3 刘旭光,高丽,赵益贤.淮南麻黄鸡生长曲线分析与拟合的研究[J].安徽农业大学学报,1997,24(4):362-365
- 4 Mignon G S, Beaumont C L, Bihan D E, et al. Genetic parameters of growth curve parameters in male and female chickens [J].Br. poult Sci., 1999, 40(1):44
- 5 王克华,童海兵.肉用仔鸡Gompertz生长模型简易拟合方法的探讨[J].中国家禽,1995(1):6-7
- 6 杨宁,吴常信,程瑞仪.不同品系鹤鹑的生长曲线分析[J].中国家禽,1990(1):23-26
- 7 Marks H L. Growth curve changes associated with long-term selection for body weight in Japanese quails[J]. Growth,1978,42:129
- 8 Gossman M. Logistic growth curve of chickens: heritability of parameters[J]. Heredity,1985,76:459-462
- 9 陈伟亮,王志跃,白群安,等.Gompertz模型在新扬州鸡及其杂交后代生长发育中的应用[J].中国畜牧杂志,2003,39(3):35-36
- 10 张军,郑云,龚道清,等.樱桃谷鸭部分内脏器官早期生长发育规律研究[J].中国家禽,2005,27(23):16-18
- 11 吕敏芝,陈鹏,叶润全.不同饲养方式下马岗鹅生长曲线分析[J].畜牧与兽医,2004,36(6):13-14
- 12 施寿荣,龚道清,王志跃.骡鸭早期生长曲线的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2005(10):37-38
- 13 吕敏芝.北京鸭、樱桃肉鸭与仙湖鸭的生长曲线分析[J].中国家禽,2000,22(3):13-14
- 14 吕敏芝,叶润全,杨晓武.不同饲养方式下狮头鹅的生长曲线分析[J].中国家禽,2002,24(23):14-15
- 15 祁永红.扬州鹅早期生长发育规律及其肉用性能的研究[D].江苏扬州,扬州大学硕士论文.2001
- 16 葛剑,谷子林,李英,等.河北柴鸡1-16周龄生长曲线分析与拟合的比较研究[J].中国家禽,2005,27(14):9-11
- 17 张录强,杨振才,孙儒泳,等.红腹锦鸡生长曲线分析[J].北京师范大学学报,2002,38(4):549-553
- 18 张红,龚道清,张军,等.溧阳鸡生长曲线分析与拟合的研究[J].畜牧与兽医,2006,38(2):7-9

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

·一句话新闻·

★19日,经黑龙江省司法厅批准,报国家司法部备案,东北农业大学司法鉴定中心正式成立,据了解,该中心是全国第一家综合性的农业司法鉴定机构,鉴定范围包括农业机械、食品安全、土壤化肥等9个方面。

★新华网杭州3月16日专电,近期河豚鱼正处于性成熟期,此时河豚鱼毒性最强,春季最易发生食用河豚鱼中毒事件,浙江省卫生厅、浙江省食品安全办公室日前联合发出食品安全预警通告。

凯氏定氮法测定饲料中粗蛋白含量的不确定度分析

施远国

采用凯氏定氮法测定饲料中粗蛋白的含量,其测量不确定度来源包括样品称量、消化、定容、蒸馏、标准溶液标定及滴定等过程,通过对上述各因素的不确定度分量进行评估,计算合成不确定度,最终给出样品中蛋白质含量的标准不确定度及扩展不确定度。

1 原理与方法

用浓硫酸对饲料进行消化,破坏有机物,使含氮物转化成硫酸铵,加入强碱进行蒸馏使氨逸出,用硼

酸溶液吸收氨,吸收液用盐酸标准溶液滴定,测出氮含量,将结果乘以换算系数 6.25,即是粗蛋白含量。

称取样品 0.5~1 g 进行消化,消化完全后加入蒸馏水转移至 100 ml 容量瓶并定容,取 10 ml 进行蒸馏,吸收液用 0.1 mol/l 盐酸标准溶液进行滴定。

测量数学模型:

$$X(\%) = \frac{(V - V_0) \times C \times 0.014 \times 6.25}{m \times \frac{V_{10}}{V_{100}}} \times 100 \quad (1)$$

$$\frac{u_c(X)}{X} = \sqrt{\left[\frac{u(rep)}{rep}\right]^2 + \left[\frac{u(m)}{m}\right]^2 + \left[\frac{u(V - V_0)}{V - V_0}\right]^2 + \left[\frac{u(C_{HCl})}{C_{HCl}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{10})}{V_{10}}\right]^2 + \left[\frac{u(V_{100})}{V_{100}}\right]^2} \quad (2)$$

式中: m ——试样质量(g);

V ——滴定试样时所需盐酸标准溶液的体积(ml);

V_0 ——滴定空白时所需盐酸标准溶液的体积(ml);

C ——盐酸标准溶液浓度(mol/l);

V_{100} ——试样分解液总体积(ml);

V_{10} ——试样分解液蒸馏用体积(ml);

0.014——氮的毫摩尔质量(g/mol);

6.25——氮换算成蛋白质的平均系数。

2 不确定度分量及计算(见表 1)

表 1 计算粗蛋白含量不确定度的有关数值
(室温 23 °C, 湿度 60%)

参数	X	u(X)	u(X)/X
rep	1	0.013	0.013
m	0.510 2	0.000 1	0.000 2
V-V ₀	1.08	0.005 8	0.005 4
C _{HCl}	0.106 0	0.000 1	0.000 9
V ₁₀	10	0.029	0.002 9
V ₁₀₀	100	0.068	0.000 7

2.1 A 类不确定度

用凯氏定氮法对鸡配合饲料(样品编号 061560)进行 8 次重复测定,有关数据及结果见表 2。

施远国,深圳市饲料监测所,518001,深圳市罗湖区东门南路 3009 号金源大厦。

收稿日期:2006-11-13

表 2 粗蛋白测定结果(n=8)(%)

1	2	3	4	5	6	7	8	\bar{x}
20.0	19.4	20.04	19.42	20.03	19.79	19.60	19.98	19.79

$$u(A) = u(rep) \frac{s}{\bar{x}} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^8 (x_i - \bar{x})^2}}{(8-1) \bar{x}} = 0.013$$

2.2 扣除试剂空白消耗盐酸引起的标准不确定度 $u(V - V_0)$

主要来源:①滴定体积的重复性,已通过重复性实验考虑,包含在 $u(A)$;②5 ml 滴定管的不确定度,经校准证书,5 ml 酸式滴定管其允许误差为 ± 0.010 ml,按均匀分布换算成标准不确定度 u_1 ;③溶液的温度与校正时的温度差异引起的体积不确定度,本实验温度为 23 °C,水的体积膨胀系数为,按照均匀分布换算成标准不确定度 u_2 ;上述②、③两种分量合成得到消耗盐酸体积的标准不确定度 $u(V - V_0)$ 。

$$u_1 = \frac{0.010}{\sqrt{3}} = 0.005 8 \text{ ml}$$

$$u_2 = \frac{1.08 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 3}{\sqrt{3}} = 0.000 4 \text{ ml}$$

$$u(V - V_0) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = \sqrt{0.005 8^2 + 0.000 4^2} = 0.005 8 \text{ ml}$$

2.3 盐酸标准溶液引起的标准不确定度 $u(C_{HCl})$

经查盐酸标准溶液的浓度 $C_{HCl} = 0.106 0$ mol/l,其扩展不确定度 $U = 0.000 2$ mol/l ($k=2$),所以盐酸标准溶

液浓度的标准不确定度 $u(C_{HCl}) = \frac{0.0002}{2} = 0.0001 \text{ mol/l}$ 。

2.4 用 10 ml 移液管移取试样溶液带来的标准不确定度 $u(V_{10})$

主要来源及计算与 2.2 相同。经查 10 ml 分度吸管的校准证书,其允许误差为 $\pm 0.05 \text{ ml}$,所造成的标准不确定度为 $u_1 = \frac{0.05}{\sqrt{3}} = 0.029 \text{ ml}$,温度差异引起的不

确定度 $u_2 = \frac{10 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 3}{\sqrt{3}} = 0.0036 \text{ ml}$ 。

$$u(V_{10}) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = \sqrt{0.029^2 + 0.0036^2} = 0.029 \text{ ml}$$

2.5 用 100 ml 容量瓶定容试样溶液引起的标准不确定度 $u(V_{100})$

主要来源及计算与 2.2 相同。经查 100 ml 容量瓶

$$u_{rel} = \frac{u_c(X)}{X} = \sqrt{0.013^2 + 0.0002^2 + 0.0054^2 + 0.0009^2 + 0.0029^2 + 0.0007^2} = 0.014$$

合成标准不确定度 $u_c(X) = X \cdot u_{rel} = 19.79\% \times 0.014 = 0.28\%$ 。

扩展不确定度:取包含因子 $k=2$ (95%置信概率),则 $U = 2 \times u_c(X) = 2 \times 0.28\% = 0.56\%$ 。

2.8 测量不确定度报告与表示

用凯氏定氮法测定饲料中粗蛋白,当测定结果 $X=19.79\%$ 时,其扩展不确定度 $U=0.56\%$, $k=2$ 。

3 讨论

3.1 用凯氏定氮法测定该样品的粗蛋白含量,其测定结果落在 19.23%~20.35% 区间的置信概率为 95%。

3.2 A 类不确定度是指样品从消化、蒸馏到滴定全过程的重复性实验,它还包含样品称量、滴定、容量瓶定容及移液管移液的重复性。

的校准证书,其允许误差为 $\pm 0.10 \text{ ml}$, $u_1 = \frac{0.10}{\sqrt{3}} = 0.058 \text{ ml}$;

温度差异引起的不确定度: $u_2 = \frac{100 \times 2.1 \times 10^{-4} \times 3}{\sqrt{3}} =$

0.036 ml。

$$u(V_{100}) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = \sqrt{0.058^2 + 0.036^2} = 0.068 \text{ ml}$$

2.6 试样质量 (m) 引起的不确定度

试样质量 (m) 的不确定度主要由天平的线性误差引起,经查天平校准证书,其不确定度为 $U=0.0002 \text{ g}$, $k=3$;因称重为净量称重,必须计算空盘、净重各一次,

所以天平引起的不确定度为 $u(m) = \sqrt{2 \times \left(\frac{0.0002}{3} \right)^2} =$

0.0001 g。

2.7 计算合成不确定度

按式(2)计算相对合成标准不确定度:

3.3 本次实验不确定度主要来源于 A 类不确定度,约占 93%,而 B 类不确定度仅占 7%,它主要由消耗盐酸体积和移液管体积校准引起,其中称量和容量瓶定容体积引起的不确定度可忽略不计。

3.4 从不确定度分析可看出,样品的消化、蒸馏及滴定是影响测定结果的主要因素,因此,在实验过程中应该尽可能降低由这几个方面引起的不确定度,保证测定结果的准确性。

参考文献

- 1 JJF1059-1999,测量不确定度评定与表示[s].
- 2 魏昊主编,化学分析中不确定度的评估指南[M].北京:中国计量出版社,2002

(编辑:崔成德, cuiengde@tom.com)

· 信息采撷 ·



1 池塘条件

池塘为近正方形,四周沟宽 8 m,深 0.6~0.8 m,滩面可提水至 1.2 m,池底为沙质土壤,淤泥较少,水源水质良好,注、排水设施齐全,塘内设 2 t 水泥船一条,用于投饵、施肥和管理。池塘内侧用密眼聚乙烯网布埋入土中作护坡和防鳊、鳅、克氏螯虾、蟹等钻洞,池塘牢固,不漏不渗,用石棉瓦作防逃墙。一个养殖周期开始时池塘要清淤修补,用生石灰、茶籽饼等药物严格消毒,经过滤注水后,施足基肥,培养天然饵料,并栽种蒿草、苦草等水生植物,“清明”前后大量投放活螺蛳,让其自然繁殖。

2 苗种放养

河蟹:5 月份前放养每千克 1 000 只左右早繁大眼幼体培育的“豆蟹”8.6 万只,折合每亩 1 870 只。

青虾:清塘后即可放养幼虾,每亩 3~5 kg,或 4 月份前后放养每千克 80 尾左右的抱卵亲虾 25 kg,平均每亩 0.5 kg。

鱼种:清塘后放养每千克 20 尾左右的异育银鲫鱼种 200 kg,折合每亩 4.3 kg;中后期由于水生植物生长过于茂盛,放养草鱼控制水草,共放 400 kg,平均每亩 8.6 kg。

不确定度评定在饲料卫生学霉菌检验中的应用

卢安根 莫建光 杜寒春

摘要 按 GB/T 13092—1991 规定进行霉菌检验,介绍了不确定度评定在饲料卫生学霉菌检验中的应用。结果表明,将重复性试验结果取对数后,用合并样本标准差计算霉菌检测结果的 A 类不确定度的程序很方便,所得的不确定度适用于多个样本。

关键词 A 类不确定度;霉菌;饲料;合并样本标准差

中图分类号 S816.17

目前,国际上统一使用的 ISO/IEC 17025:2005《检测和校准实验室能力的通用要求》中明确指出,实验室出具的检测报告应包含有关测试结果的不确定度。霉菌是饲料卫生检验中的一项重要指标,但对霉菌检测结果进行不确定度评定的尚未有文献报道。本实验室按 GB/T 13092—1991^[1]规定的方法对 20 个样品进行霉菌检验,并对检验结果的不确定度进行评定。

1 检验方法及数学模型

以无菌操作,将待检样品 25 g 放入含 225 ml 灭菌稀释水中,经振摇做成 1:10 的均匀稀释液,继而作 10 倍递增稀释。根据 GB 13078—1991^[2]和 GB/T 19164—2003^[3]要求估计标本的污染情况,选取 2~3 个稀释度,每个稀释度作 2 个平皿,随后向每个平皿倒入 15~20 ml 高盐察氏培养基,混合均匀,待培养基凝固后,翻转平皿,置于 25~28 ℃培养箱中培养 7 d(第 3 d 开始观察),按 GB/T 13092—1991 规定的计数

规则分别计算各平皿的霉菌菌落数,乘以稀释倍数得到各平行检测结果。设霉菌总数为 Y ,检测结果为 X ,则 $Y=X \text{ cfu/g}$ 。

2 不确定度

2.1 不确定度的来源

微生物检验的特点是结果分散性较大。这类检验,影响因素非常多,其中 B 类不确定度分量对合成不确定度的贡献较小,重复测量带来的不确定度占主要部分^[4];A 类不确定度的主要贡献是重复性,其中包括样品均匀性、取样重复性、检测环境、培养时间、培养温度、数值修约、人员计数,以及培养温、湿度允差,取样温、湿度等(详见图 1)。在重复性条件下所得的检测列的不确定度,通常比用其它评定所得的不确定度更为客观,并具有统计学的严格性^[5]。因此,我们主要考虑重复性试验所得结果不确定度,即 A 类不确定度。

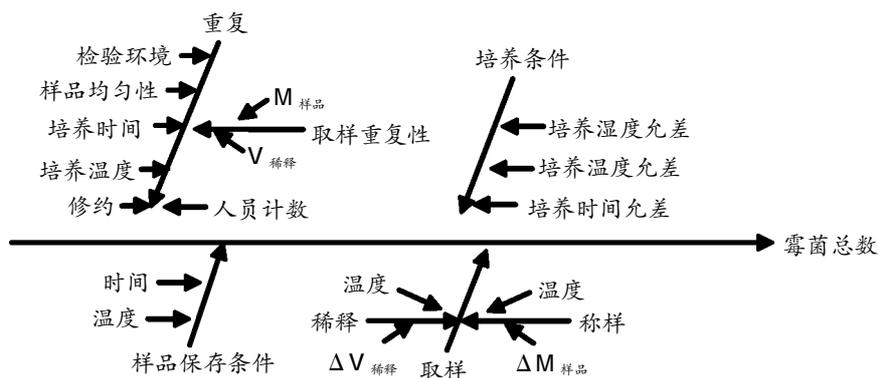


图 1 霉菌检验不确定度来源分析

2.2 不确定度的评定

本实验室准备了不同污染程度的 20 份鱼粉样品,由实验室内不同人员在一段时间内按 GB/T 13092—1991 规定方法作重复性测试,每个样品做两个平行测定,同一样品由同一测试人员进行操作,得

卢安根,广西分析测试研究中心,工程师,530022,广西省南宁市星湖路 32 号。

莫建光、杜寒春,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-12-18

到 20 个样品霉菌数的测试结果, X_1 、 X_2 分别是两次平行检测结果(见表 1)。试验操作严格按 GB/T 13092—1991 规定进行, 显示样品是均匀、稳定的。

表 1 检测结果及中间计算值

项目	测定结果(cfu/g)		取对数结果		平均值 lgX	残差平方和 $\sum(\lg X_i - \lg X)^2$
	X_1	X_2	$\lg X_1$	$\lg X_2$		
1 [#]	1 300	1 100	3.113 9	3.041 4	3.077 6	26.281 3×10 ⁻⁴
2 [#]	980	930	2.991 2	2.968 5	2.979 8	2.576 5×10 ⁻⁴
3 [#]	1 200	1 300	3.079 2	3.113 9	3.096 6	6.020 5×10 ⁻⁴
4 [#]	830	880	2.919 1	2.944 5	2.931 8	3.225 8×10 ⁻⁴
5 [#]	80	90	1.903 1	1.954 2	1.928 6	13.056 1×10 ⁻⁴
6 [#]	2 100	2 000	3.322 2	3.301 0	3.311 6	2.247 2×10 ⁻⁴
7 [#]	870	920	2.939 5	2.963 8	2.951 6	2.952 5×10 ⁻⁴
8 [#]	810	850	2.908 5	2.929 4	2.919 0	2.184 1×10 ⁻⁴
9 [#]	1 700	1 510	3.230 4	3.179 0	3.204 7	13.209 8×10 ⁻⁴
10 [#]	910	980	2.959 0	2.991 2	2.975 1	5.184 2×10 ⁻⁴
11 [#]	1 900	1 700	3.278 8	3.230 4	3.254 6	11.712 8×10 ⁻⁴
12 [#]	890	1 000	2.949 4	3.000 0	2.974 7	12.801 8×10 ⁻⁴
13 [#]	370	320	2.568 2	2.505 1	2.536 6	19.908 1×10 ⁻⁴
14 [#]	1 100	1 210	3.041 4	3.082 8	3.062 1	8.569 8×10 ⁻⁴
15 [#]	1 850	1 680	3.267 2	3.225 3	3.246 2	8.778 1×10 ⁻⁴
16 [#]	160	180	2.204 1	2.255 3	2.229 7	13.107 2×10 ⁻⁴
17 [#]	580	600	2.763 4	2.778 2	2.770 8	1.095 2×10 ⁻⁴
18 [#]	2 100	1 830	3.322 2	3.262 4	3.292 3	17.880 2×10 ⁻⁴
19 [#]	920	960	2.963 8	2.982 3	2.973 0	1.711 3×10 ⁻⁴
20 [#]	1 580	1 410	3.198 7	3.149 2	3.174 0	12.251 3×10 ⁻⁴
Σ						184.754×10 ⁻⁴

从表 1 可以看出, 检测结果的分散性是比较大的, 如果直接用贝塞尔公式计算出的标准偏差会很高, 这样由合并样本标准差所得到的不确定度就不适合于每一个样本^[6]。我们将检测结果取对数进行计算, 标准偏差的中间计算结果见表 1。

根据贝塞尔公式, 计算出检测结果对数值标准偏差的合并样本标准差:

$$S_p(Y) = \sqrt{\frac{\sum(\lg X_i - \lg X)^2}{n(m-1)}} = \sqrt{\frac{184.754 \times 10^{-4}}{20 \times (2-1)}} = 0.030 4$$

总体合成标准差:

$$u_c(Y) = \frac{S_p(Y)}{\sqrt{m}} = \frac{0.030 4}{\sqrt{2}} = 0.021 5$$

2.3 扩展不确定度

计算公式: $U = k_p \times u_c(Y)$

取 $p=95\%$ 的置信水平, 自由度 $\nu=19$, 查 t 分布表得 $t_{95}(19) = 2.09 = k_{95}$, 故 $U_{95} = k_{95} \times u_c(Y) = 2.09 \times 0.021 5 = 0.045$ 。

3 检测报告

当检验结果以 2 次测定值取对数值的平均值表示时, 其取值正向分布于 ± 0.045 之间; 当检验结果以 2 次平行测定的平均值表示时, 相对于其对数值的取

值再取反对数得其取值区间, 这个取值区间适合于任何一次检测^[6]。

例: 1[#] 样品, 对数值的平均值为 3.078, 取值区间为 3.033~3.123, 取反对数得平行样平均值的取值范围为 1 079~1 327 cfu/g, 则霉菌总数应完整报告为:

$Y = (1.2 \times 10^3 \pm 1.2 \times 10^2) \text{ cfu/g}; k_{95} = 2.09$; 括号内第二项为 U_{95} 反对数之值。

例: 5[#] 样品, 对数值的平均值为 1.929, 取值区间为 1.884~1.974, 取反对数得平行样平均值的取值范围为 77~94 cfu/g, 则霉菌总数应完整报告为:

$Y = (86 \pm 9) \text{ cfu/g}; k_{95} = 2.09$; 括号内第二项为 U_{95} 反对数之值。

例: 10[#] 样品, 对数值的平均值为 2.975, 取值区间为 2.930~3.020, 取反对数得平行样平均值的取值范围为 851~1 047 cfu/g, 则霉菌总数应完整报告为:

$Y = (9.5 \times 10^2 \pm 98) \text{ cfu/g}; k_{95} = 2.09$; 括号内第二项为 U_{95} 反对数之值。

4 小结

霉菌菌体自身的结构、繁殖方式等生物学特性和霉菌检验方法本身的特点, 容易造成平行(重复)检测结果之间较高的离散性。从以上计算结果可以看出, 由于检验结果分散性较大, 不宜直接用贝塞尔公式计算合并样本标准偏差, 而将检验结果取对数后, 用合并样本标准差求对数值的标准偏差, 也就是检验结果的不确定度, 这样使用很方便, 并且所得的不确定度适合于多个样本。在本实验室以后的检测工作中, 随着检测数据的不断增多, 随时或定期将新检测结果加入到合并样本中, 重新计算合并样本的标准偏差, 逐步更新霉菌检验不确定度的取值范围, 进一步提高检测数据的科学性和有效性。

参考文献

- 1 GB/T 13092—1991 饲料中霉菌检验方法[S]. 国家质量监督检验检疫总局, 1991
- 2 GB 13078—1991 饲料卫生标准[S]. 国家质量监督检验检疫总局, 1991
- 3 GB/T 19164—2003 鱼粉[S]. 国家质量监督检验检疫总局, 2003
- 4 张霞. 微生物检验中不确定度的评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(2): 141~142
- 5 JJF. 1059—1999 测量不确定度评定与表示[S]. 国家质量监督检验检疫总局, 1999
- 6 徐灼均. 微生物检验中菌落总数的不确定度评定[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2006, 5(1): 68

(编辑: 崔成德, cuiengde@tom.com)

不同生产阶段奶牛群体营养代谢状况的评价

李大刚 王加启

摘要 目前对奶牛代谢失调的研究和诊断主要针对个体,而当个体表现出临床症状时,只能采取治疗手段,也就造成了饲养成本的增加。如果对易于采集到的奶样、尿样、血样以及奶牛呼出的气体进行检测分析,通过测得的结果对牛群营养代谢状况进行早期分析与评价,减少营养代谢失调对奶牛业造成的经济损失,对指导奶牛生产具有重要的意义。文中通过对牛奶中尿素氮(MUN)浓度、尿液 pH 值、瘤胃液 pH 值、奶牛呼出的气体、血浆游离脂肪酸(NEFA)、血浆 β -羟丁酸(BHBA)以及 DHI 数据值所处的不同范围与奶牛的营养状况和代谢失调之间的关系进行分析,以期为牛群营养方案的制定提供参考。

关键词 奶牛;群体;营养代谢;评价

中图分类号 S823

随着集约化奶牛业的发展,人们对奶牛饲养的规模、效益日益重视,但在养牛生产中针对奶牛营养与健康状况进行监测与评价的方法并不多。奶牛营养学家们一直探索如何对易发生代谢疾病的牛群进行适时监控,通过制定合理的取样程序和方法,在不对奶牛造成伤害和强烈应激的条件下,采集奶样、血样、尿样等易于收集的样本进行分析检测,在对结果进行合理评价的基础上进而对牛群(既可以应用于大规模的牛场,又可应用于中小牛场)的整体营养代谢状况和存在的健康问题进行诊断,为采取预防措施提供依据。通过奶牛群体营养代谢状况评价体系的建立可及时发现牛群存在的营养问题,减少集约化饲养条件下高产奶牛代谢疾病的发生,提高牛群的整体健康水

平,增加奶牛场的经济效益。

1 乳尿素氮(MUN)含量对蛋白和能量营养状况的预测

通过对牛乳中尿素氮含量的测定可对奶牛蛋白质与能量营养状况进行预测。血清中正常的尿素氮浓度为 5~7 mmol/l,由于血液中的尿素氮可自由扩散到奶中,因此,奶中的尿素氮浓度与血中的尿素氮浓度高度相关,这种相关性可以使我们通过奶中尿素氮浓度的变化对血中尿素氮含量进行评价。生产实践中按牛群乳蛋白含量的高低将 MUN 分为三个水平,即 <12 mg/dl、12~16 mg/dl、>16 mg/dl。有关不同乳蛋白含量条件下 MUN 变化情况的解释见表 1。

当乳蛋白含量在 3.0%~3.2%,MUN 浓度的变化

表 1 不同产奶阶段和不同乳蛋白含量条件下对 MUN 值的解释

产奶阶段(天数)	乳蛋白含量(%)	MUN<12 mg/dl	MUN>16 mg/dl
开始产奶的前 45 d	<3.0	低 RDP 或 UDP 和低能量(NSC)	高 RDP,低可发酵碳水化合物
	3.0~3.2	低 RDP 和(或)UDP	高 RDP,低 NE _L
	>3.2	低 RDP 和(或)高 NE _L	高 RDP,低 NE _L
产奶 46 ~150 d	<3.0	低 RDP、UDP、NE _L	高 UDP,RDP 相对低于可发酵碳水化合物
	3.0~3.2	低 RDP 和(或)UDP	RDP 过量
	>3.2	低 RDP,UDP,高 NSC	RDP 过量,UDP 相对低于可发酵碳水化合物
产奶的中后期(>150 d)	<3.0	低 RDP、UDP、NE _L	高 SIP,RDP 低于可发酵碳水化合物,低 NE _L
	3.0~3.2	低 RDP、UDP	高 RDP
	>3.2	低 NE _L	高 RDP

注:①资料来源于 Dr.Barney Harris。

②RDP 为降解食入蛋白;SIP 为可溶解的食入蛋白;UDP 为非降解食入蛋白;NSC 为非结构性碳水化合物;NE_L 为产奶净能。

范围在 12~16 mg/dl,表明蛋白质降解和能量供应状况达到平衡状态。乳中尿素氮浓度过高与日粮较高的粗蛋白水平(或可溶解蛋白含量较高)或较低的非结

构性碳水化合物(NSC)直接相关。而低水平的尿素氮浓度表明在瘤胃中没有适于微生物生长所需的 NH₃-N,即 RDP 较少,能氮出现正平衡,最终可导致乳产量下降。而瘤胃产生过量的 NH₃-N,则需要在肝脏以尿素的形式解毒,这一过程需要消耗大量的能量,同时血浆中较高的尿素氮浓度也是影响奶牛繁殖的重要因素。对集奶箱内牛奶 MUN 的测试是建立在群体平均值基础上,因而这种方法对于评价奶牛群体营养状

李大刚,广东省农业科学院畜牧研究所,博士,510640,广州市天河区五山。

王加启(通讯作者),中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。

收稿日期:2006-12-25

况具有一定的合理性。

2 通过尿液 pH 值对奶牛酸碱平衡状况的评价

围产前期给奶牛饲喂阴离子含量较高的酸性日粮是预防临床和亚临床低血钙的有效方法(Oetzel, 1993)。日粮的酸化效果与尿液 pH 值有关,奶牛尿液 pH 值一般偏碱性,当尿液 pH 值在 6.5 以上时,表明日粮的阴阳离子差(DCAD)为正值,此时肠道 pH 值不利于 Ca^{2+} 的吸收;当 pH 值在 6.2~6.5 之间时表明 DCAD 适宜;当 $\text{pH} < 6.5$ 且 DMI 降低,表明日粮阴离子浓度过高,将会出现酸中毒症状。通过对尿液 pH 值的监测,可对日粮 DCAD 情况进行判断,不同 DCAD 值条件下尿液 pH 值情况见表 2。

表 2 不同 DCAD 值条件下尿液的 pH 值

DCAD(meq/kg)	尿液 pH 值		资料来源
	+DCAD	-DCAD	
-4, -169~-175	8.10	7.39~7.96	Oetzel 等, 1991
+69, -428	7.88	5.93	Wang, 1992a
+90, -30	7.86	6.55	Tucker 等, 1992
+276, -170	8.68	7.97	Schonewille, 1994c
+150, 0, -150	7.95, 7.32	6.01	Moore, 2000
+200, 0	8.09	6.80	Jackson, 2001
+690, +510, -120	7.90, 8.02	7.02	Roche, 2003

在奶牛自由采食条件下,饲喂后的时间对尿液 pH 值影响很小(Goff 和 Horst, 1998)。当饲料钾离子含量高时,应加入更多的阴离子盐。饲喂氯离子含量高的牧草也能降低尿液 pH 值,在这种情况下给经产奶牛饲喂阴离子盐的剂量应减少,否则牛群的 DMI 将降低,影响对蛋白和能量摄入,使奶牛在产后出现能量缺乏和营养不良症状。小牧场倾向于对所有适宜检测的牛进行 pH 值测试,或者将 8 头或更多样本的测定结果累积起来再计算平均值,根据测得的结果来调整日粮阴阳离子平衡。

3 对瘤胃发酵状况的评价

3.1 通过瘤胃液 pH 值对瘤胃酸中毒状况的评价

瘤胃微生物的生长繁殖与瘤胃内环境密切相关,瘤胃液 pH 值一般在 5.5~7.5 之间,奶牛最理想的 pH 值在 6.2~6.8 之间,瘤胃液 pH 值可作为奶牛健康状况和代谢状态的间接评价指标。人们常根据瘤胃液 pH 值的变化来判断瘤胃酸中毒情况,瘤胃液 pH 值在同一牛群内的不同时间都在变化,用一群牛的单一样本极易发生错误,因此选取的样本要有一定的代表性。另外可能发生错误的原因是测定瘤胃 pH 值的设备不精确或者不能对 pH 计进行很好的校正。应用精密的 pH 试纸测瘤胃 pH 值时,由于受瘤胃液绿色的干扰,常影响结果的准确性。现在已有专门用于测瘤胃 pH 值的仪器,在进行测试时仅需要少量的瘤胃液,并且

具有常规的自动校正功能,而且能够对样品进行自动温度补偿作用。

3.2 通过奶牛呼出的气体对瘤胃发酵情况的评价

应用离子选择流量计可对奶牛呼出气体的有机物组成进行分析,通过判断呼出气体中存在或缺少某种气体进而对相关疾病进行诊断。当给奶牛饲以新鲜饲料后,间隔一段时间对气体进行取样分析发现,气体的组成发生明显的改变,奶牛呼出的基本气体主要是甲烷、乙醇和硫化氢。通过警用酒精测定仪可对瘤胃产生的酒精进行测定,尽管目前还不确定不同酒精浓度所代表的确切信息,但是通过多元统计分析有可能确定气体组成与饲料特征和动物健康的关系。通过这种方法还可对瘤胃亚急性酸中毒、气体中是否存在氨进行判断。硫化氢在牛呼出的气体中含量也非常高,主要来自蛋白质和含硫氨基酸的降解产物,因此通过硫化氢的浓度可对蛋白质在瘤胃的降解情况进行判断。通过奶牛呼出的气体可对瘤胃发酵情况进行评价的可行性和应用前景还需要进一步研究和探讨。

4 通过血样对牛群营养代谢状况的评价

4.1 通过血浆代谢产物的变化对围产期奶牛营养状况的评价

围产期奶牛体内的代谢发生巨大的变化,其中血浆葡萄糖、胆固醇、尿素、胰岛素、胰岛素样生长因子、甘油三酯和 T_3 、 T_4 等指标均与能量平衡正相关;而血浆游离脂肪酸(NEFA)、肌氨酸、清蛋白、 β -羟丁酸、生长激素、血浆中酶的活性、血浆脂肪、蛋白、脂肪/乳糖的比值、乳中丙酮的浓度与能量平衡呈负相关。在围产阶段奶牛血浆中葡萄糖浓度应该大于 2.5 mmol/l,与蛋白质代谢有关的指标理想范围为:尿素氮 3.3~5.0 mmol/l、白蛋白 30~40 g/l、总蛋白 60~80 g/l、球蛋白 30~40 g/l。矿物质元素的最佳范围为: Mg^{2+} 高于 0.74 mmol/l、无机磷高于 1.8 mmol/l、谷胱甘肽过氧化物酶(Se 检测)高于 39 U/33%PCV、血清 Cu^{2+} 高于 7.4 mmol/l。在众多的评价指标当中,NEFA 浓度的变化直接反映脂肪组织的动员情况,能量负平衡越严重,血液中的 NEFA 浓度越高,NEFA 浓度的变化与脂肪肝、酮病、产后皱胃移位和胎衣不下等代谢疾病密切相关(见表 3)(Kaneene, 1997; Cameron, 1998; Dyk 和 Emery, 1996)。据报道,血浆 NEFA 和乳脂百分含量的相关系数为 0.76(Pullen, 1998)。血浆 NEFA 浓度值分别高于 574、619、585 mmol/l 时,奶牛患酸中毒、真胃移位、胎衣不下的概率将显著增加。美国密歇根州奶业工作者将距分娩 14 d 以上奶牛血液 NEFA 浓度值为 0.325 meq/l 作为临界点,距分娩 2~14 d 时 NEFA 浓度为 0.4 meq/l 定义为警戒点。NEFA 浓度通常在产前 48 h 升

高,因此对分娩后不久的奶牛采取血样进行测试,则很难对结果作出解释,应该同时对 BHBA 进行测试才合理。一般认为有 3/7 参加测试的牛 NEFA 浓度升高是正常的,Oetzel (1993) 建议有 10% 参加测试的牛 NEFA 浓度升高是正常的。

表 3 因 NEFA 浓度变化引起相关疾病的发生情况(%)

代谢紊乱	血浆 NEFA 浓度		
	过低值	适宜值	过高值
酮病	>9	>11	>8.2
难产	4	8	>10
胎衣滞留	>10	>11	>15
皱胃移位	>3	>5	>10
产犊前后乳房炎	>3	>7	>10
一般乳房炎	>5	>9	>10

在小牛场所有适宜测试的奶牛都应该进行 NEFA 测试。一般将样品进行冷冻保存,直到将全部分娩牛样品收集齐,或至少将 12 头或累积的更多样本以一个组的形式提交给实验室进行分析。对于较大的牛场可将产前的牛分成几个小组进行 NEFA 的测试,一般认为采集进入产房奶牛的血浆样品进行检测具有更重要的参考价值。NEFA 浓度在饲喂后的 4~5 h 时达到最低点,而最高点出现在下次饲喂前(Eicher, 1998)。因此,为了捕捉到 NEFA 的峰值,最佳的取样时间是在饲喂前。

4.2 通过血浆 β -羟丁酸(BHBA)对亚临床酮病进行评价

由于亚临床酮病的发病症状不明显,主要表现在干物质摄入减少、产奶量降低、皱胃移位和临床酮病发病率增加等,因此实践中预测亚临床酮病的发生状况相对困难。由于很难对散放牛群进行 DMI 监测,很多奶牛的 BHBA 浓度可能超过 30 mg/dl,这种情况下牛群不仅存在亚临床酮病,而且也存在泌乳早期的其它代谢疾病。目前对亚临床酮病的权威预测方法是对血浆 BHBA 含量进行监测,因为 BHBA 含量在血液比丙酮和丁酸含量要稳定,研究表明,血液中 14.4 mg/dl 的 BHBA 是亚临床酮病发生的临界水平,高于这一临界点会增加奶牛患皱胃移位、临床酮病的风险以及降低产奶量,患临床酮病的奶牛血浆 BHBA 的浓度一般为 26 mg/dl 或者更高(Duffied, 2000)。一般认为泌乳早期 15% 的奶牛发生亚临床症状为警戒水平。中小型牛场对泌乳早期奶牛进行亚临床酮病评价时,需要对大多数或全部适宜参加评价的奶牛进行测定。对大型牛场可通过对某一牛群的测定来进行。血浆出现 BHBA 浓度的高峰值是由于饲喂后瘤胃产生了大量丁酸,过量的丁酸通过瘤胃壁时更容易转化为 BHBA。BHBA 在饲喂后的 4~5 h 内显著增加,因此在饲喂后的 4~5 h 内连续取样,一般认为能捕捉到 BHBA 的高峰浓度(Eicher, 1998)。

表 4 列出了几种代谢疾病的检测临界点和警戒水平。

表 4 发生不同代谢疾病的临界点和警戒水平

测试项目	临界点	警戒水平(%)	发生相关的代谢疾病
瘤胃 pH 值	≤ 5.5	>25%	亚临床酸中毒
BHBA	> 14.4 mg/dl	>10%	亚临床酮病
NEFA	产前 14 d 以前 NEFA>0.325 meq/l;或者产前 2~14 d NEFA>0.400 meq/l	>10%	产前能量负平衡,脂肪肝

5 借助 DHI 数据对产奶牛营养与健康状况的评价

DHI 的分析结果可以用于奶牛日粮结构的调整,乳脂和乳蛋白的比值可以提示营养状况,乳脂肪和蛋白比值应为 1.12~1.36,如果乳脂率太低,可能是瘤胃功能不佳、存在代谢疾病、精粗饲料组成比例或精粗饲料的物理加工存在问题。DHI 的分析结果可以对健康指标进行评定,个体牛的体细胞数直接反映了乳房的健康状况,通过监测体细胞数的变化也能反映防治措施是否有效。对于体细胞数较高的牛群,说明乳房保健存在问题。通过对奶牛不同时间和生产性能的比较,可以分析出该牛生产性能和健康状况与正常牛的差别,并找出原因。若某头奶牛泌乳早期前后两次产奶量相差太大,提示该牛异常,应查找原因并采取补救措施。

6 如何对检测的结果进行合理的解释

对牛群整体营养状况进行测试,所得的结果不同于实验室对个体进行测试所获得的结果。对个体营养

状况的检测是直接的。对群体营养状况进行监控时,各种代谢指标的正常值范围需要考虑样本的大小(样本足够大且能充分反映出整体状况)。对检测结果进行解释前应明确是对测得的平均值进行解释还是对高于或低于某一临界点的动物所占的比例进行解释。进行疾病诊断时,只有那些高于或低于某生物临界值的动物才受到影响。进行群体营养监控时,由于任何牛群都有少数动物高于或低于临界值或警戒水平,因此对高于或低于某生物临界值的奶牛所占的比例进行分析的同时,还必须对高于或低于警戒水平的奶牛进行分析。因此,制定合理的分析与取样方法与科学的检测技术相配合,才可以对群体的营养状况进行合理的评价。定期对便于快速检测的指标进行分析,对确定最佳的饲养方案、减少牛群代谢疾病的发生具有重要意义。

(参考文献 23 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:张学智, mengzai007@163.com)

改善牛乳脂中共轭亚油酸含量的研究

于安乐 高巍

摘要 自从发现共轭亚油酸特殊的生理作用以来,共轭亚油酸就一直是动物营养、药物及食品等研究领域的一个热点,目前对于含有共轭亚油酸的功能性食品的研究越来越受到关注和重视。文中阐述了现阶段改善牛乳脂中共轭亚油酸含量的各种方法和手段,为以后共轭亚油酸的深入研究提供一些参考。

关键词 牛乳脂;日粮;共轭亚油酸;生物氢化

中图分类号 S547

Study of improving the content of conjugated linoleic acid in milk fat

Yu Anle, Gao Wei

Abstract The conjugated linoleic acid has already become a focus in some research fields such as animal nutrition, drugs and food, since discovering the conjugated linoleic acid's special physiological role. currently, research including the conjugated linoleic acid's functional food causes more and more attention. This text has illustrated various kinds of methods and means of improving the content of conjugated linoleic acid in cow milk at the present stage, in order to making a reference for the further investigation in the future.

Key words milk fat; diet; conjugated linoleic acid; biohydrogenation

随着人们生活水平的提高,越来越多的人意识到食品很可能是引发某些疾病的重要因素,因此,对人类健康有益的功能性食品的开发越来越引起人们的关注和重视。共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)是一种非常令人感兴趣的功能因子,它的作用是在20多年前发现的,当时 Pariza 等发现,牛肉中含有某种抗癌成分,经研究分析是由一系列亚油酸的共轭双烯酸异构体组成。后来人们又发现日粮中的 CLA 对抑制动物模型的乳腺癌、前胃癌、结肠癌、皮肤癌方面有积极作用。最近的一些研究得出,CLA 具有降低体脂沉积、改变营养物质分配、抗氧化、抗动脉粥样硬化、调节免疫系统的保健功能。

目前,大多数 CLA 产品是通过人工合成,价格较高,易氧化,也不宜直接食用,而通过反刍动物瘤胃微生物合成 CLA 可以避免上述缺点,因此,它是一种有效合成 CLA 的途径。但在常规饲养条件下,通过瘤胃微生物合成的 CLA,在乳中沉积的数量较少。因此,通过调节日粮组成及其成分等调控瘤胃的不完全加氢,从而提高反刍动物乳脂中共轭亚油酸的含量是现实

可行的办法。

1 共轭亚油酸的来源

共轭亚油酸是具有共轭双键的十八碳烯酸的位置、几何异构体的总称,其具有抗癌活性的主要是 c9, t11-CLA 和 t10, c12-CLA 异构体。天然优质的共轭亚油酸主要来源于反刍家畜乳和肉的脂肪中,而牛乳是 c9, t11-CLA 最丰富的天然来源,每克乳脂中含 CLA 2~25 mg 不等。一些未加工的食物中 CLA 相对浓度见表 1。

表 1 新鲜食品中的 CLA 的含量

食品	总 CLA[mg/(g 脂肪)]	c9,t11-CLA(%)
鲜牛肉末	4.3	85
小牛肉	2.7	84
小羊肉	5.6	92
猪肉	0.6	82
小鸡肉	0.9	84
鲤鱼	0.3	未检出
小虾	0.6	未检出
均质乳	5.5	92
普通酸乳	4.8	84
冰淇淋	3.6	86
向日葵	0.4	38
油菜籽	0.5	44

注:引自 Chin 等,1992。

从表 1 中我们可以看出,反刍动物乳及肉中 CLA 的含量明显高于非反刍动物和蔬菜中 CLA 的含量。

于安乐,石河子大学动物科技学院,832003,新疆石河子。

高巍,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-30

2 反刍动物体内合成共轭亚油酸的途径

根据它们作用的潜在机理分成:①向瘤胃提供生成 CLA 或 t-11C18:1 脂质底物;②通过改变瘤胃环境,进而影响与瘤胃生物加氢有关的细菌;③既能提供脂质底物,又能改变瘤胃菌群。

反刍动物乳脂和体脂中的 c9,t11-CLA 的来源主要有两种:一是日粮中的亚油酸等多不饱和脂肪酸(PUFA)在瘤胃氢化过程中的中间产物 c9,t11-CLA,避免了瘤胃微生物的进一步氢化作用。这一过程在 Gulati 的试验中已得到证明。二是内源合成,亚油酸等 PUFA 在瘤胃微生物氢化过程中的另一中间产物——t-11C18:1,在反刍动物体组织内或乳腺组织内的 Δ^9 去饱和酶作用下进一步去饱和形成的去饱和产物。此过程已在 Griinari 等(2000)所做的试验中得到证实。因此,反刍动物源性食品中的 CLA 与日粮中的不饱和脂肪酸在瘤胃中不完全生物加氢作用息息相关。瘤胃中亚油酸的生物氢化途径见图 1。

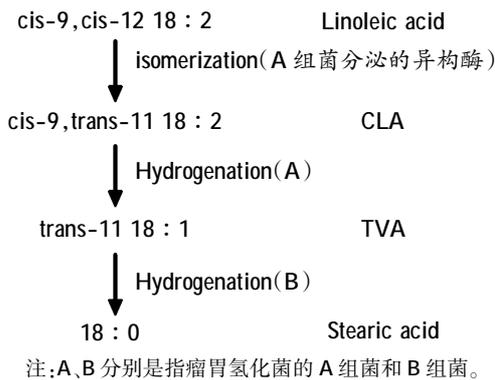


图 1 瘤胃中亚油酸的代谢

3 改善牛乳脂中共轭亚油酸含量的方法

3.1 向瘤胃提供生成 CLA 或 t-11C18:1 脂质底物

3.1.1 放牧对牛乳脂中 CLA 含量的影响

草场放牧的奶牛所产的牛乳中 CLA 含量较高,因为青草中含有较高的不饱和脂肪酸。Dhiman 等报道,随着奶牛日粮中青草含量的增加(1/3、2/3 到 3/3),乳脂中的 CLA 含量呈线性增加。而且 Kelly 等报道,放牧高产奶牛的乳脂 CLA 含量也有所增加,但是增加量仅是低产奶牛的 1/2(高产放牧奶牛 10.9 mg/g,低产奶牛 22.1 mg/g)。另外, Kelly 等人选用 16 头奶牛,在试验开始前 2 周内统一饲喂由 24%玉米青贮料、18.5%苜蓿草青贮料、4%苜蓿干草和精饲料混合组成的全混合日粮(TMR)。试验开始之日起,8 头作对照组,继续饲喂 TMR;另外 8 头作试验组,从第 3 周起饲喂 50%TMR+放牧,第 4 周起饲喂 25%TMR+放牧。草地

牧草由约 53%稗麦牧草、19%白三叶草和 21%其它牧草等组成。微量矿物质砖自由摄取。试验结果是放牧奶牛乳脂中 CLA 含量比饲喂由青贮料、干草和精饲料组成的 TMR 的奶牛提高了一倍。

其它一些研究也报道,吃鲜草的奶牛乳脂中 CLA 有较高浓度。一直在草地上放牧的牛比以 50:50 标准精粗比的饲料饲喂的牛乳脂中的 CLA 的含量要高 500%。在多年生黑麦草为主的草地上放牧的牛比在围栏中饲喂干草的牛乳脂中 CLA 的含量有显著提高(每 1 g 脂肪中的含量为 23.0、14.2 mg)。

3.1.2 日粮对牛乳脂中 CLA 含量的影响

目前普遍认为日粮中添加含高亚油酸的植物油是较有效的提高牛乳中 c9,t11-CLA 的营养调控途径。郑会超等通过试验比较了在高产奶牛的日粮中添加亚油酸含量近似而来源不同的植物油(棉籽油、豆油、玉米油)对牛乳中的 CLA 含量的影响,结果表明,添加植物油能显著增加牛乳中的 CLA 含量,从高到低的顺序依次为豆油、玉米油、棉籽油。其中棉籽油的亚油酸含量最高,但添加棉籽油组的 c9,t11-CLA 含量低于豆油组和玉米油组,这可能与豆油较高的亚麻酸含量和玉米油的高油酸含量有关。但是,当给奶牛喂含有大豆油的高浓度日粮时,牛乳脂中 c9,t11-CLA 不会被增加,而 t10,c12-CLA 则被增加。

Stanton 等发现,给山羊或奶牛补饲油或富含脂类的油菜籽,能明显地提高乳汁中的 CLA 含量,当补饲油菜籽油时,乳汁中的 CLA 含量可达到每克脂肪 32.05 mg(对照组为 10.35 mg)。Yves 等研究发现,用深海鱼油补饲,牛乳脂中的 CLA 含量比对照组增加 300%。这主要与这些不饱和脂肪酸在瘤胃内的生物氢化产物(t11-CLA)有关,它们能在体内脱氢生成 CLA。另外,日粮中铜的含量也影响瘤胃中的生物加氢过程和牛乳脂中 CLA 的含量。低铜日粮有助于提高牛乳脂中 CLA 的含量,日粮中添加铜(40 mg/kg)则降低了乳脂中 CLA 的含量。

然而,一些研究者也报道,在日粮因素的影响下,多数情况下容易发生乳脂率下降的现象。这主要是由于日粮因素改变了瘤胃微生物的发酵参数,尤其是瘤胃 pH 值,它们使瘤胃微生物对日粮中的多不饱和脂肪酸的生物氢化作用不完全,造成微生物生物氢化作用的中间产物共轭亚油酸和反式十八碳烯酸(TFA)在瘤胃中蓄积。而它们能够抑制动物体内脂肪酸的从头合成途径,使乳脂中短链脂肪酸的比例减少,而 CLA 和 TFA 的比例相对升高,导致奶牛的

乳脂率降低。但是,有研究显示,如果日粮中含有足够的粗饲料,即使日粮中 PUFA 的含量较高时乳脂中 TFA 增高,乳脂率却不会降低。因此,我们在考虑日粮对牛乳中 CLA 含量的影响时,一定要同时考虑粗饲料的添加量。

3.1.3 日粮中添加或灌注 CLA 产品对牛乳脂中 CLA 含量的影响

通过对瘤胃以后的消化道注射 CLA 或饲喂瘤胃保护性 CLA 的试验表明,连续 5 d 注射合成的 CLA 0、50、100、150 g/d·头,结果表明:随注射量的增加,乳量和乳脂率显著降低;而牛乳中的 CLA 含量(每克脂肪中)从 5.4 mg 增加到 19.1 mg。薛秀恒通过对 4 头荷斯坦牛十二指肠灌注 CLA 混合物 200 g/(d·头),连续灌注 5 d,结果表明,乳脂中的 CLA 含量在灌注期间提高了 7 倍。

3.2 瘤胃 pH 值对 CLA 合成的影响

瘤胃 pH 值的高低也影响 CLA 的合成。Martin 等用 0.5 g/l 的瘤胃细菌体外培养 48 h,发现当 pH 值为 5.5~6.5 时,CLA 浓度在前 8 h 无变化,在 24~30 h 间 CLA 浓度最高,以后逐渐减小;而当 pH 值为 5.0 时,CLA 的浓度不发生变化。这主要是因为当瘤胃具有最佳的 pH 值和发酵能力时才能保证乳脂中 CLA 的最佳浓度。瘤胃 pH 值降低,改变了瘤胃微生物的生态系统,合成更多的顺 10 单烯酸或共轭二烯酸。所以,维持正常的瘤胃 pH 值对 CLA 的合成是非常重要的。也有研究报道,通过改变日粮中阴阳离子平衡(dietary cation-anion difference)的方法,测得牛乳中 t-11C18:1 的浓度随阴阳离子的值升高而增大。

3.3 瘤胃菌群对 CLA 合成的影响

瘤胃中含有大量微生物,瘤胃微生物对 CLA 的合成起主要作用,反刍动物体内 CLA 来源于瘤胃厌氧的溶纤维丁酸弧菌对亚油酸的生物转化作用。一些研究表明,CLA 可由反刍动物瘤胃内厌氧的溶纤维丁酸弧菌等无毒性的微生物中的亚油酸异构酶转化而合成。Panza 等(1999)研究结果表明,乳酸菌微生物可在发酵过程中产生 CLA。乳酸菌微生物中含有亚油酸异构酶,其作用位点是在脂肪酸的 C12 双键上而不是 C9 双键上,能把亚油酸转化为 c9,t11 异构体而不是 t10,c12 或 c10,c12 异构体。现阶段,于国萍等已开始利用乳酸菌等生产共轭亚油酸。另外,张中义等利用植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)LT2-6 发酵添加亚油酸(LA)的脱脂牛乳,转化 LA 生成共轭亚油酸,以期提高发酵牛乳中的 CLA 含量。结果

表明:LA 诱导可提高发酵牛乳中的 CLA 产量,发酵温度 37 °C,CLA 生成量和 LA 转化率为最高。

4 改变牛乳脂中共轭亚油酸含量的其它方法

有研究报道,随着年龄以及体重的增长,反刍动物体内 CLA 的含量有所增长。奶牛品种对牛乳中 CLA 的含量也有显著影响,不同品种的反刍动物体内 CLA 的含量也会有所不同。例如奶牛中泽西种乳牛的乳脂中 CLA 含量较低,这可能是 Δ^9 去饱和酶活性较差的原因;法国的 Montbeliardes 奶牛的乳脂中 CLA 含量较高。同一头奶牛所产的乳脂中 CLA 含量的变异系数为 25%~35%,在一个种群中其变异系数为 15%。另外,饲养管理对其也有影响,不良的饲养管理可能会改变瘤胃中内环境(微生物类型以及 pH 值),从而导致瘤胃内生物氢化产物有所改变,进而使牛乳脂中 CLA 的含量发生改变。

5 结论

牛乳脂中 CLA 的含量受到多种因素的影响:奶牛的品种、年龄、体重、饲养方式及季节等环境因素,同时也应考虑日粮因素对乳脂率的影响。所以,在实际生产中要考虑各种因素,因地制宜地采取不同方法和手段来改善牛乳脂中 CLA 的含量,以提高牛奶的健康保健作用,同时使养殖户达到增加收入的目的。

(参考文献 40 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:张学智, mengzai007@163.com)

征订启事

欢迎订阅 2007 年《饲料工业》

本刊为半月刊,大 16 开本,每期正文 64 页,公开发行,各地邮局均可订阅,也可直接向本刊发行部订购。国际标准连续出版物号 ISSN 1001-991X,国内统一连续出版物号 CN21-1169/S,邮发代号:8-163。每期定价 6 元,全年 24 期共 144 元。

地址:沈阳市金沙江街 16 号 6 门

邮编:110036

发行部电话:024-86391237

传真:024-86391925

奶牛隐性乳房炎病原菌的 分离鉴定及药敏试验

刘萍 侯西成 郝满良 叶宝娜 谢菲

摘要 试验对河北省某奶牛场采集的70份奶样进行了病原菌的分离培养及生化鉴定,并对主要病原菌进行药敏试验,结果表明:共分离到10种91株细菌,其中葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌为主要病原菌,占91.21%(83/91);主要致病菌对头孢氨苄、新霉素、红霉素、盐酸克林霉素、林可霉素、氨苄青霉素等6种药物敏感。

关键词 奶牛;隐性乳房炎;病原菌;分离鉴定;药敏试验

中图分类号 S854.4+3

Isolation and identification of the pathogenic bacteria of cow
recessive mastitis and it's drug sensitivity test

Liu Ping, Hou Xicheng, Hao Manliang, Ye Baona, Xie Fei

Abstract The pathogens of seventy milk samples from dairy cows with mastitis was isolated ,biochemical indentified and pharmacosensitive test.It showed that there were ninety-one strains,ten species which the incidence of staphylococcus aureus, streptococcus uberis and Escherichia coli was 91.21%(83 divided by 91);the drugs of the most sensitive effect to pathogenic bacteria were cefalexin, neomycin, erythromycin, clindymycin hydrochloride, lincomycin, ampicillin.

Key words dairy cow;recessive mastitis;pathogenic bacteria;isolation and identification;pharmacosensitivetest

乳房炎是奶牛最普遍的疾病,依其表现形式可分为临床型乳房炎和亚临床型乳房炎^[1]。亚临床型乳房炎又称隐性乳房炎,是指乳房和乳汁均无肉眼可见的变化,但乳汁导电率、体细胞、pH值等理化性质发生变化,必须用特殊的理化方法才能检出的乳房炎^[2]。有资料表明,全世界约有2.2亿头奶牛,33%患有各种类型的乳房炎^[3],其中隐性奶牛乳房炎的发病率高达50%左右^[4,5],我国奶牛乳房炎的发生率更高^[6]。本试验通过对采集奶样进行细菌的分离鉴定及药敏试验,为奶牛隐性乳房炎的防治、用药提供参考。

1 材料与方

1.1 标准菌株

金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、无乳链球菌、乳链球菌等,由本实验室提供。

1.2 培养基、试剂及仪器

刘萍,河北农业大学动物科技学院,071000,河北保定。

侯西成,河北农业大学林学院。

郝满良(通讯作者)、叶宝娜、谢菲,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-12-18

绵羊鲜血琼脂培养基、麦康凯琼脂、营养琼脂、营养肉汤、血清肉汤、却甫曼琼脂培养基、改良爱德华琼脂,生化培养基及试剂按常规方法配制^[7]。生化鉴定所用的微量发酵管及药敏纸片购于杭州天和微生物试剂有限公司。

1.3 方法

1.3.1 CMT试剂(阴性乳房炎诊断液)检测方法

从河北省某奶牛场随机选取无临床症状的奶牛,采取乳样2 ml加入检验盘中,每个检验盘加入CMT试剂2 ml,水平旋转检验盘,根据混合物性状判断奶牛是否患有隐性乳房炎(见表1)。

表1 奶牛隐性乳房炎判断

凝集现象	结果
不见凝集片,乳汁在盘中自由流动,为阴性	-
虽见到少量的凝集片,但乳汁仍自由流动,为弱阳性	+
盘底出现少量的稀薄粘性沉淀,但不呈胶状,摇动时沉淀物散布于盘底,并有一定的粘附性	++
盘底沉淀物较多,比较粘稠,微呈胶状,倾斜检验盘时沉淀物有明显粘附于盘底而难以流动的现象,检验盘做旋转时,沉淀物有聚集于中心的倾向	+++
盘内混合物的大部分或全部参与形成明显胶状沉淀物,几乎完全粘附于盘底,旋转检验盘时,凝胶聚集中心呈团块,难以散开	++++

1.3.2 奶样的采集

确定乳房炎病例,采集乳样 70 份,先用温水洗涤乳房,然后用 0.2%新洁尔灭,最后用 75%的酒精清洁乳头。待干后,每个乳头先挤去头 2~3 把奶,以排除一些污染的杂菌,然后以无菌操作的方法在每个乳室取奶样 10 ml(各个乳区分开),标明牛号、乳区、日期。

1.3.3 细菌分离培养与鉴定

每个离心管 5 ml 奶样,2 000~3 000 r/min,离心 10 min,弃去管中的上层液体,留取底部沉淀物,无菌操作吸取沉淀物 0.1 ml,分别接种于绵羊鲜血琼脂培养基、麦康凯琼脂、营养琼脂、改良爱德华琼脂、却甫曼琼脂平皿,并接种营养肉汤两管(一管只有营养肉汤,另一管在营养肉汤中加 10%血清),37 °C 培养 24 h。挑取菌落进行涂片,革兰氏染色,镜检。根据菌体形态、溶血情况及染色特性初步判定细菌类属⁹。各类细菌按相应生化特性做进一步的鉴定^{9,10}。

1.3.4 药敏试验

采用纸片扩散法¹¹,即用吸管滴加纯培养菌液 1 滴(约 0.02 ml)于鲜血琼脂平板上,用 L 棒将菌液均匀涂布,加盖后放置 10 min 左右,待平板面稍干,用镊子将药敏纸片平放在琼脂平板上,并轻压使其紧贴平板

表面,药敏纸片一旦接触平板即不再移动。采用直径为 90 mm 的平皿,可贴纸片 7 张,两纸片中心距离不少于 24 mm,纸片与平皿边缘不少于 15 mm。贴好纸片的平板置 37 °C 培养 24 h。结果判定参考世界临床实验室标准委员会(National Committee for Clinical Laboratory Standards,NCCLS)推荐的纸片扩散标准¹²。

14 种药物:青霉素 G、恩诺沙星、庆大霉素、盐酸克林霉素、头孢氨苄、利福平、四环素、新霉素、链霉素、红霉素、氨苄青霉素、林可霉素、诺氟沙星、复方新诺明。

2 结果

2.1 培养及染色特性

在 70 份奶样中共分离到 10 种 91 株细菌,从菌落形态、染色特性上分为三类:革兰氏阳性链球菌(标记为 A 类细菌)、革兰氏阳性葡萄球菌(标记为 B 类细菌)、革兰氏阴性杆菌(标记为 C 类细菌)。各类细菌在固体和液体培养基上的生长特性、菌落形态特征、染色特性见表 2。

2.2 生化试验

将分离到的菌株进行纯培养并做生化试验进行鉴定,结果见表 3、4、5。

表 2 各类细菌在不同培养基上的生长性状

菌株培养基	A 类细菌	B 类细菌	C 类细菌
普通营养琼脂平板	生长不良	生长良好,菌落初白色后变黄,圆形、光滑、微隆起	生长良好
绵羊鲜血营养琼脂平板	菌落圆形、光滑、半透明,无色或灰白色,呈 α、β 或 γ 溶血,直径约 1.0 mm	生长旺盛,圆形,光滑、边缘整齐,多数为 β 溶血,少数为 α 溶血或 γ 溶血,菌落直径 1.5~2 mm,为不透明的米黄色或乳白色	生长旺盛,菌落直径 2~3 mm,光滑,湿润,有的呈 β 溶血
麦康凯培养基	不生长	不生长	生长旺盛,菌落直径 2~3 mm,不透明,颜色各异
改良爱德华培养基	菌落直径 1~1.5 mm,灰白或浅结晶紫色	不生长	不生长
却甫曼培养基	不生长	生长良好,不透明,直径 1.5~2 mm,菌落乳白、灰白或米黄,放置 3 d 后,有的菌落底层的培养基因 pH 值下降而染成黄色	不生长
普通营养肉汤	肉汤清亮或稍混浊,有絮状沉淀,易摇散,有的一直混浊,时久下沉变清	生长迅速,上清液呈高度均匀的混浊,管底有多量沉淀	肉汤混浊,管底有沉淀,有的有菌膜,有的无菌膜
革兰氏染色	G ⁺ ,圆形或椭圆形,链状排列,长短不一,较小	G ⁺ ,圆形或椭圆形,较大,单个或成对,个别有四联球菌	G ⁻ ,端圆,多形,短粗,单个或成对

表 3 A 类细菌的生化鉴定结果

项目	溶血性	cAMP	七叶甘	0.1%美兰牛奶	甘露醇	山梨醇	菊糖	6.5%NaCl	40%胆汁	60 °C 水浴 30 min	0.3%淀粉	VP 试验
A ₁	α/β/γ	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
A ₂	α	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-
A ₃	β	-	+/-	+	+/-	-	-	-	+	+/-	-	ND
A ₄	β/γ	-	ND	+	+	+	-	+	+	+	-	ND

注:“+”表示 95%以上菌株为阳性,“-”表示 95%以上菌株为阴性,ND 表示未测定。表 4、表 5 同。

表4 B类细菌的生化鉴定结果

项目	B ₁	B ₂	B ₃
兔血浆凝固酶	+	-	-
3%双氧水酶试验	+	-	-
有氧甘露醇	+	+/-	+/-
厌氧甘露醇	+	-	-
溶血试验	β	γ	γ
三糖铁试验	+	+	-

表5 C类细菌的生化鉴定结果

项目	C ₁	C ₂	C ₃
硫化氢	-	-	-
尿素酶	-	+	+
靛基质	+/-	+	-
M.R	+	-	-
枸橼酸盐	-	-	+
乳糖	+	-	+
蔗糖	+/-	-	+
阿拉伯糖	+	-	+
甘露醇	+	-	+
明胶	-	-	-

由生化结果可知,共分离到10种91株细菌,A₁~A₄依次为无乳链球菌(*S.agalactiae*)、停乳链球菌(*S.dysgalactiae*)、乳链球菌(*S.lacticus*)、粪链球菌(*E.faecalis*),分别为10、5、3、1株,分别占10.99%(10/91)、5.49%(5/91)、3.30%(3/91)、1.10%(1/91);B₁~B₃依次为金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)、表皮葡萄球菌(*S.epidermidis*)、腐生葡萄球菌(*S.saprophyticus*),分别为20、14、12株,分别占21.98%(20/91)、15.38%(14/91)、13.19%(12/91);C₁~C₃依次为大肠杆菌(*E.coli*)、变形杆菌(*Bacillus proteus*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*),分别为18、6、2株,分别占19.78%(18/91)、6.59%(6/91)、2.20%(2/91)。

2.3 药敏试验

选用青霉素、庆大霉素、恩诺沙星等14种常用药物对分离菌株作药敏试验,结果见表6。

表6 分离细菌药敏试验抑菌圈直径结果(mm)

药物	无乳链球菌	停乳链球菌	乳链球菌	粪链球菌	金黄色葡萄球菌	表皮葡萄球菌	腐生葡萄球菌	大肠杆菌	变形杆菌	克雷伯氏菌
青霉素G	21	18	23	15	8	24	20	24	16	28
氨苄青霉素	26	24	27	20	27	24	31	29	27	19
头孢氨苄	24	25	22	26	23	29	24	24	30	26
链霉素	17	14	9	11	5	0	20	12	25	23
庆大霉素	14	9	16	19	22	24	20	11	24	20
新霉素	22	25	29	24	26	27	24	29	25	20
恩诺沙星	16	14	20	15	25	29	24	24	23	19
诺氟沙星	17	7	14	9	7	18	14	19	21	24
红霉素	21	23	24	23	26	25	16	18	24	20
复方新诺明	0	0	0	0	0	31	30	11	9	14
盐酸克林霉素	27	24	23	28	28	23	25	22	24	26
林可霉素	22	20	20	27	26	29	24	18	20	28
利福平	27	14	0	13	27	30	24	19	23	24
四环素	21	0	5	18	28	10	32	14	10	16

由表6可知,在14种抗菌药物中头孢氨苄、新霉素、红霉素、盐酸克林霉素、林可霉素、氨苄青霉素等6种抗菌素的抑菌效果较好,而诺氟沙星、链霉素、复方新诺明等药物的抑菌效果较差。

3 讨论

据报道,奶牛乳腺炎主要是由多种特定的病原微生物引起,目前已发现约有150多种,常见的有23种^[3]。依据其来源和传播方式可分为接触传染性病原体和环境性病原体两类。前者主要包括无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、支原体(*Mycoplasma sp.*)等,通过挤奶工或挤奶机在乳区和牛群中传播。环境性病原体主要包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)、乳房链球菌(*Streptococcus u-*

beris)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、变形杆菌(*Proteus sp.*)、凝固酶阴性葡萄球菌(*Coagulase-negative staphylococci*)、环境链球菌(*Environmental streptococci*)、真菌或酵母菌(*Fungi* 或 *Yeast*)、化脓性放线菌(*Actinomyces pyogenes*)及牛棒状菌(*Corynebacterium bovis*)等^[4]。上述病原体中,以金黄色葡萄球菌、链球菌和大肠杆菌为主,约占整个奶牛乳腺炎病例90%以上^[5]。本试验经细菌培养特性、形态染色特性、生化特性等鉴定表明,所检测的70份奶样中共分离到10种91株细菌,以葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌为主,与马保臣^[6]报道的基本一致。乳房炎的发生是多因素所致,除加强饲养管理、搞好挤奶卫生外,还要定期进行隐性乳腺炎的监测,及时淘汰慢性或顽固性病牛,在干奶期乳房内注入抗生

素以预防乳腺炎的发生。Natzke R P 等^[7]提出,干奶母牛治疗是目前乳腺炎控制方案中消除感染最有效的方法。Kehrli 等^[8]指出,挤奶后乳头药浴和泌乳期结束时乳腺的抗生素治疗是控制乳腺炎两种公认的方法。

用 14 种常见抗菌素对 10 种分离菌进行药敏试验,结果表明头孢氨苄、新霉素、红霉素、盐酸克林霉素、林可霉素、氨苄青霉素等 6 种抗菌素的抑菌效果较好,而诺氟沙星、链霉素、复方新诺明等药物的抑菌效果较差。故在治疗时应尽量交叉用药,以防产生耐药性;另外,传染性致病菌和环境性致病菌对同一类药物的敏感性也存在一定的差异。

因此,对乳房炎应采取以防为主、防治结合的综合防治措施。根据本场实际建立一整套的预防程序,加强技术人员的培训,减少乳房炎的感染机率;对牛群要进行定期检查,详细记录检查结果,根据牛群的实际情况进行及时的防治。

参考文献

- 1 陈德,魏太亮,石清来.奶牛隐性乳房炎病原菌的分离与耐药性分析[J].中国动物检疫,2006,23(2):36
- 2 陈家璞.奶牛疾病学[M].北京:农业出版社,1992.283-321
- 3 张中文,吴国娟,刘凤华,等.北京地区奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及药敏试验[J].北京农学院学报,2002,17(4):42-47
- 4 吴国娟.北京地区奶牛乳房炎阳性率及发生规律的研究[J].北京农学院学报,2001,16(3):43-46
- 5 李勇,葛秀国,窦忠英.奶牛隐性乳房炎研究进展[J].黄牛杂志,2003,29(3):38-41
- 6 双金,嘎尔迪,包鹏云,等.奶牛隐性乳房炎的发生规律及其致病菌

- 的分离鉴别与药物敏感性试验[J].内蒙古农业大学学报,2001,22(1):18-23
- 7 姚火春.兽医微生物学实验指导[M].北京:中国农业出版社,2002.19-66
- 8 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001
- 9 袁永隆,张永欣,侯奕昭,等.奶牛乳房炎细菌的分离和鉴定程序[J].中国兽医科技,1991,21(2):7-10
- 10 陆承平.兽医微生物学[M].中国农业出版社,2002.2 002-2 012
- 11 陈坤永,翁良树,吴慕贞,等.深圳地区奶牛临床型乳房炎病原菌分离鉴定与药敏试验[J].中国兽医科技,1999,29(9):36-38
- 12 NCCLS consensus.Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing [S].Approved Standard-Seven Edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In Twelfth Informational Supplement. NCCLS document M100 -S12.Volume 22. NCCLS, Wayne, PA; 2002:42-45
- 13 林锋强,潘抗君,胡松华.奶牛乳房炎疫苗研究进展[J].中国奶牛,2002(1):40-42
- 14 储明星,石万海,卞霞,等.浅谈奶牛乳房炎[J].中国奶牛,2001(3):39-40
- 15 火焱,刘佳森,刘曾力.奶牛乳房炎病因分析及防治[J].内蒙古科技与经济,2004(7):61-62
- 16 马保臣,李建基,王春.奶牛乳腺炎病原分离鉴定[J].中国兽医杂志,2004,40(11):23-24.
- 17 Natzke R P. Elements of mastitis control[J]. J.Dairy Sci.,1981,64(6):1 431-1 442
- 18 Kehrli M E Jr.,Shuster DE. Factors infecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland [J]. J. Dairy Sci.,1994,77:619-627

(编辑:张学智, mengzai007@163.com)

· 书 讯 ·

书 名	作 者	定价(元)	书 名	作 者	定价(元)
畜禽十大高效饲料添加剂	李尚波等	22	蛋鸡饲养技术	白修明等	8
饲料非营养调控物质的研究与应用	单安山	41	肥牛饲养技术	雷云国	16
饲料安全与动物营养调控技术研究	单安山	41	肉牛饲养技术大全	韩荣生	15
饲料添加剂	王安	29	实用犬病诊疗图册	赵玉军	29
毛皮动物饲养技术	杨福合等	14	实用猪病防治图册	陈国庆	13
猪鸡常用饲料配方	张洪翔等	11	饲料添加剂安全使用规范	杨振海等	100
养猪技术大全	王彪等	19	全国规模化养猪场大全		120
养猪问答	李树德等	14	默克兽医手册		123
经济动物疾病诊疗新技术	程世鹏等	11	实用养鸭技术	杨桂芹	13
珍禽饲养技术	王峰等	16	肉鸡生产新技术精选		14
新编畜禽用药手册	葛宝伟等	17	实用鸡病防治图册	张爱民等	13

邮局汇款地址:(110036)沈阳市金沙江街 16 号 6 门(本社发行部收)

联系电话:(024)86391237

银行汇款单位:辽宁省农牧业机械研究所有限公司

开户行:中信银行沈阳分行皇姑支行

帐号:72214101826000548-49

奶牛乳房炎病原菌的分离及药敏试验

齐永华 董永军 陈桂香 王秀娟

摘要 试验从新乡市某奶牛场患乳房炎奶牛的乳汁中共分离到68个菌株,其中葡萄球菌30株,链球菌14株,大肠杆菌8株,其它杂菌16株。经药敏试验结果表明:头孢氨苄和头孢三嗪对大肠杆菌和无乳链球菌最敏感;葡萄球菌对环丙沙星、庆大霉素、丁胺卡那霉素高度敏感;金银花、连翘、蒲公英等对3种主要病原菌均有较强的体外抗菌活性,从而为奶牛乳房炎的有效防治提供了一定的帮助。

关键词 病原菌;分离鉴定;药敏实验;奶牛乳房炎

中图分类号 S858.23

奶牛乳房炎是由各种病因引起的乳房炎症,是危害奶牛养殖业的三大疾病之一。据报道,全球约有2.2亿头奶牛,其中1/3的奶牛患有各类型乳房炎,国内关于乳房炎发病率的报道均在46%~70%之间^[1]。为了进行感染病原的鉴定,美国和澳大利亚均根据本国具体情况制定了“牛乳房炎微生物学和细菌学诊断程序”。我国至今尚未制定类似的统一程序,以致在一定程度上阻碍了奶牛乳房炎检菌工作的开展。

在浙江金华地区,乳房炎是影响奶牛产奶量的主要因素。其主要原因是感染病原微生物,其中以金黄色葡萄球菌、链球菌和大肠杆菌为主,约占奶牛乳房炎病例的90%以上^[2]。但各地病原感染情况不尽相同,据袁永隆等^[3]报道,天津、兰州、广州、昆明、重庆、柳州等地奶牛场,均以无乳链球菌为主;而长沙、郑州等地奶牛场以停乳链球菌为主;北京、青岛等地又以金黄色葡萄球菌占首位;个别奶牛场则以克雷伯氏菌占第一位。为了解新乡地区奶牛乳房炎的病原情况,同时也为控制乳房炎寻找更好的防治途径,笔者对所在地区患有乳房炎的某奶牛场的奶牛进行了病原菌分离鉴定及药敏试验。

1 材料与方法

1.1 乳样采集

乳样主要采自某乳制品有限公司所属的4个奶牛场,选取4只有明显症状的奶牛,其它基本无临床

可见症状或症状不明显(其中有一批乳样曾用过青霉素、链霉素或中药涂膜剂)。奶牛按常规挤奶消毒后,再用酒精棉球消毒乳头和采样者手指。每个乳头挤去头2~3把乳后无菌取乳样20 ml,共40个乳样(分次进行),贴好标签,4 h内送检。

1.2 培养基、试剂及仪器

绵羊鲜血琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基、普通琼脂培养基、营养肉汤、血清肉汤及生化培养基, MH琼脂平板及试剂均按常规方法配制。药敏纸片由河南科技学院动物科学学院实验室提供。还要准备接种L棒、酒精灯、恒温培养箱、高压灭菌锅、生物显微镜、平皿试管和锥形瓶等。

1.3 乳房炎检测

在每个测试盘中倒2 ml乳样,加入等量指示剂混合后,据其有无絮状物及沉淀程度来判定结果:混合液均匀,流动性好,无絮状物(阴性,-);有少许絮状物或沉淀产生(弱阳性,+);有明显絮状物或沉淀产生(阳性,++);絮状物或沉淀黏集呈凝胶状或呈凝胶状团块(强阳性,+++或++++)。

1.4 细菌分离与培养

将采集的乳样各10 ml,分别加入灭菌离心管中,以2 500 r/min离心15 min,弃去管中上层液体,留取底部沉淀物,分别接种于绵羊鲜血琼脂平板培养基,置37℃恒温箱培养24 h,取出后观察菌落形态并对可疑菌落进行革兰氏染色,镜检。

1.5 培养及形态染色特性观察

对可疑菌落再分别接种于麦康凯琼脂、营养琼脂、鲜血琼脂平板培养基,进一步观察其生长特性及做纯化培养,并进行革兰氏染色,镜检观察形态染色特性。对能在麦康凯琼脂上生长呈红色的菌落,且镜

齐永华,河南科技学院动物科学学院,453003,河南新乡。

董永军、陈桂香、王秀娟,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-01-04

★ 基金项目:河南科技学院重点科研项目(中药复方制剂对奶牛乳房炎防治效果的研究)资助基金(项目编号:040118)

检为革兰氏阴性中等大小杆菌,接种营养肉汤;对不能在麦康凯琼脂上生长而只能在绵羊鲜血琼脂上生长良好的菌落,且镜检为革兰氏阳性链球菌,接种于血清肉汤,进行cAMP试验。

1.6 生化试验

参考有关细菌生化特性^[4],根据初步鉴定结果,将分离纯化的细菌基本分类增菌后分别进行不同的生化试验,并按有关资料判定细菌种类。

1.7 药敏试验

1.7.1 西药圆纸片扩散试验

选择典型的分离菌株葡萄球菌、链球菌和大肠杆菌,用纸片扩散法^[5]观察结果,测抑菌圈直径(包括药敏纸片直径),计算同一类菌不同菌株的平均抑菌直径。直径小于10 mm为耐药,10~15 mm之间为中度敏感,大于15 mm为高度敏感。

1.7.2 中草药体外抗菌活性试验

采用试管二倍稀释法测定中草药提取物的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。所用细菌悬液的CFU为1×10⁵,取10支灭菌试管并编号,第1~9管中各加入无菌肉汤培养基2 ml,于第1管中加入1 g/ml的受试中草药提取液2 ml,混合后取出2 ml加入第2管中,以此类推,直到第8管,取出2 ml弃去,使其含中药浓度分别为0.500、0.250、0.125、0.063、0.031、0.016、0.008、0.004 g/ml;第9管不加药液作为对照;第10管加入受试药液2 ml,不加菌液作为对照。然后每管加入供试菌液0.1 ml,摇匀,置恒温箱中培养18 h。以不发生浑浊变化的最高药物稀释倍数为该药物的MIC,将所有清晰、细菌生长的试管培养液接种于MH琼脂平板,培养18~24 h,以菌落数不超过5个的最低药物浓度为该药物的MBC。

2 结果

2.1 乳房炎检测结果

40个乳样中有6个有明显可见的絮状沉淀物,乳色发黄。检测结果5个为阴性,35个为阳性,其中强阳性及强阳性以上的为15个,因为其中有20个乳样曾用过青霉素、链霉素或中药涂膜剂,且用药不太规范,因此这个比例并不能完全反映乳房炎的感染情况。

2.2 细菌分离鉴定结果

对35个阳性乳样进行细菌分离培养和鉴定,有34个乳样检出15种共68个菌株,其中葡萄球菌30株,占44.12%;链球菌14株,占20.59%;大肠杆菌8

株,占11.76%。而另一个强阳性乳样则未检出细菌,可能为非特异性乳房炎或者是由其它病原微生物引起。结果见表1。

表1 奶牛乳房炎病原菌检出率

病原菌名称	混合感染株	单独感染株	总株数	出现率(%)
金黄色葡萄球菌	24	6	30	44.12(30/68)
无乳链球菌	10	0	10	14.71(10/68)
停乳链球菌	2	0	2	2.94(2/68)
化脓链球菌	2	0	2	2.94(2/68)
大肠杆菌	7	1	8	11.76(8/68)
克雷伯氏菌	3	0	3	4.41(3/68)
G-芽孢杆菌	3	0	3	4.41(3/68)
其它G-杆菌	8	2	10	14.71(10/68)
总计	59	9	68	100

从表1可以看出,单纯由某一种病原菌引起的乳房炎较少,而多数是由2~3种的病原菌引起,混合感染的情况比较严重。

2.3 药敏试验结果

2.3.1 圆纸片扩散试验

选用青霉素、庆大霉素、丁胺卡那霉素等10种常用药物对分离菌株做药敏试验,结果见表2。

表2 药敏试验结果

药名	葡萄球菌		链球菌		大肠杆菌	
	1	2	1	2	1	2
青霉素	1	1	1	11	1	5
庆大霉素	16	18	14	15	15	16
丁胺卡那霉素	17	20	16	18	13	14
环丙沙星	18	15	8	11	12	15
头孢氨苄	12	11	23	24	19	16
头孢三嗪	13	11	22	20	17	18
氟哌酸	14	18	12	13	9	14
红霉素	8	10	13	11	7	9
强力霉素	10	12	11	10	6	8
新霉素	13	15	12	12	12	15

由表2可知,在10种抗菌药物中以头孢氨苄、头孢三嗪对大肠杆菌和链球菌最敏感;庆大霉素、丁胺卡那霉素、环丙沙星对葡萄球菌敏感性较高。

2.3.2 中草药单方对分离菌株的抗菌效果

选择的连翘、金银花和蒲公英等6味中草药单方对4种主要病原菌的抗菌效果见表3。

表3 中草药单方对4种分离菌株的MIC和MBC(g/ml)

药物	大肠杆菌		金黄色葡萄球菌		无乳链球菌		停乳链球菌	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
连翘	0.125	0.125	0.062	0.062	0.125	0.125	0.030	0.030
金银花	0.062	0.125	0.030	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062
蒲公英	0.030	0.062	0.062	0.125	0.062	0.125	0.062	0.062
鱼腥草	0.062	0.125	0.125	0.125	0.250	0.250	0.250	0.250
当归	0.125	0.125	0.250	0.250	0.250	0.250	0.125	0.125
没药	0.250	0.500	0.125	0.125	0.500	0.500	0.500	0.500

3 分析与讨论

通过 35 个阳性乳样进行细菌分离培养和鉴定,共得到 15 种 68 个菌株。其中葡萄球菌的分离率最高,占 44.16%,链球菌占 20.59%,说明本地区奶牛乳房炎以葡萄球菌为主要病原菌,且混合感染相当严重,这与胡松华等^[6]报道有所不同,但与叶秀娟等^[2,7]报道基本一致。这可能与牛场的消毒管理不严有一定的关系,因此切实强化卫生意识,加强挤奶过程的各项卫生管理,改善牛舍的环境卫生,是防治奶牛乳房炎工作的重中之重。

药敏试验结果表明,奶牛乳房炎的主要病原菌中绝大部分对青霉素耐药,用传统的青霉素疗法效果已几乎无效。但对头孢氨苄、头孢三嗪、庆大霉素、丁胺卡那霉素、环丙沙星等敏感性较高,这与在治疗奶牛乳房炎方面较少使用这些药物有关。此结果与王冬梅等^[1,2]报道的基本一致。随着抗菌药物的广泛应用和耐药菌株的增多,细菌对常用抗生素的耐药性愈来愈强,给奶牛乳房炎的治疗及选择用药带来很大困难。随着人们对绿色消费要求的提高,建议有关部门加强卫生安全教育,加强奶制品检测,尽量少用各类抗菌药物,开辟其它的用药途径。根据六味中草药单方对

几种主要病原菌的抗菌活性效果的试验,可以看出蒲公英、连翘和金银花可作为防治奶牛乳房炎的主药。这与王新等^[8]报道相同。由此可见,在以后的研究中,采用中药制剂防治奶牛乳房炎也是一个研究方向。

参考文献

- 1 王冬梅,刘磊,王胜利.奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及药敏实验[J].动物医学进展,2005,26(6):81-83
- 2 叶秀娟,杜爱芳,胡松华.金华地区奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及药敏实验[J].兽医临床,2004(8):41-42
- 3 袁永隆,张礼华,刘纯传,等.我国奶牛乳房炎常见病原菌的区系调查[J].中国农业科学,1992,25(4):70-76
- 4 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.77-78
- 5 姚火春.兽医微生物学实验指导第二版[M].北京:中国农业出版社,2003.3-43
- 6 胡松华,杜爱芳,蔡渭明.奶牛临床型和隐性乳房炎的细菌分析[J].中国畜禽传染病,1998,20(4):199-201
- 7 袁永隆,张永欣,侯奕昭,等.奶牛乳房炎乳汁细菌的分离和鉴定程序[J].中国兽医科技,1991,21(2):7-10
- 8 王新,张秀英.中草药对奶牛乳腺炎主要病原菌的体外抗菌活性试验[J].中国兽医科技,2004(4):49-51

(编辑:张学智, mengzai007@163.com)

· 简 讯 ·

2007 年长三角地区水产动物营养与饲料科技论坛成功举办

3月22~24日,由上海水产大学、上海市饲料工作办公室和上海市水产办公室联合主办,上海水产大学生命科学与技术学院、上海高校水产养殖学E-研究院、农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室联合承办的“2007年长三角地区水产动物营养与饲料科技论坛”在上海水产大学隆重召开,来自上海、浙江、江苏、福建、广东、山东等省市的官、产、学、研各界代表 250 余人参加了此次盛会。上海水产大学潘迎捷校长、上海市饲料工作办公室张苏华主任、上海市水产办公室周建敏主任助理出席了开幕式并发表了热情洋溢的讲话;中国水产学会水产动物营养与饲料专业委员会主任麦康森教授到会祝贺并作题为“海水鱼类的营养需要与饲料配制”的专题学术报告。

长三角地区是我国重要的水产养殖基地,也是我国重要的水产饲料生产地区,在此区域内集中了众多从事水产养殖业,水产饲料生产企业和大专院校、科研单位。在水产养殖业和水产饲料业蓬勃发展的今天,对于公众对水产食品安全的关注和原料紧缺的危机,加强区域内行业的交流合作,显得尤为重要。在此背景条件下,由上海水产大学、华东师范大学、苏州大学、浙江省淡水水产研究所、浙江万里学院、《饲料工业》杂志社、上海市渔业经济研究会、上海市畜牧兽医学会等多家单位发起并举办的“长三角地区水产动物营养与饲料科技论坛”,旨在加强区域内高校、研究所和饲料企业的交流合作,推进区域内的行业经济发展。

本次大会邀请了国内知名水产营养专家:中国海洋大学麦康森教授,上海水产大学周洪琪教授、冷向军教授、陈乃松教授,华东师范大学陈立侨教授、苏州大学叶元土教授、江南大学过世东教授、浙江万里学院钱国英教授、浙江省淡水水产研究所叶金云研究员以及美国达农威公司首席水产专家 Dr.Brian Hunter 先生就海水鱼类、虾类、河蟹的营养与饲料配制技术、饲料原料质量与配方原料的选择、水产饲料加工工艺及设备、水产饲料中氨基酸的使用技术、水产动物营养与免疫等水产动物营养与饲料的关键问题、热点问题作了精彩的学术报告。在“质量、安全、效益”的主题下,专家学者与企业代表们展开了广泛的学术交流和热烈的技术讨论,对于提高行业的科技水平,构建水产饲料质量安全体系,推动长三角地区乃至全国水产饲料行业和现代养殖业的发展将产生积极的影响。

野山菜蒲公英在动物生产中的应用

刘进 刘敏跃 于德强 张玉东

蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.)别名婆婆丁、黄花苗、黄花地丁、奶汁草等,为菊科蒲公英属多年生草本植物。蒲公英生长于山坡草地、路旁、河岸沙地及田野间,广泛分布于我国大部分地区。

1 蒲公英的化学成分

蒲公英全草含蒲公英甾醇(Taraxasterol)、天冬酰胺、苦味素、皂甙、树脂、胆碱(Choline)、菊糖(Inulin)和果胶(Pectin)等。同属植物药用蒲公英(*Taraxacum officinale*)的根中含蒲公英醇(Taraxol)、蒲公英赛醇(Taraxerol)、 α -蒲公英甾醇、蒲公英甾醇、 β -香树脂醇(β Amirin)、豆甾醇(Stigmasterol)、 β -谷甾醇(β -Sitosterol)、胆碱、有机酸、果糖、蔗糖、葡萄糖、葡萄糖甙以及树脂、橡胶等;叶含叶黄素(Lutein)、蝴蝶梅黄素(Violaxanthin)、叶绿醌(Plastoquinone)、维生素C 50~70 mg/100 g和维生素D 5~9 mg/100 g;花中含山金车二醇(Arnidiol)、叶黄素和毛茛黄素(Flavoxanthin)。花粉中含 β -谷甾醇、5 α -豆甾醇-7-烯-3 β -醇(5 α -Stigmast-7-en-3 β -ol)、叶酸(Folic acid)和维生素C;绿色花萼中含叶绿醌;花茎中含 β -谷甾醇和 β -香树脂醇。蒲公英是一种营养丰富的野菜,主要食用部分为叶、花、茎、根。每百克鲜叶含蛋白质4.8 g、脂肪1.2 g、碳水化合物11 g、粗纤维2.1 g、灰分3.1 g、钙216 mg、磷93 mg、铁10.2 mg、维生素B₁ 0.03 mg、维生素B₂ 0.39 mg、尼克酸1.9 mg、维生素C 47 mg、胡萝卜素7.35 mg。

2 蒲公英功效及应用

中医认为蒲公英性寒、味甘苦、无毒,入肝、胃二经,具有清热解毒,泻肝胃实火,利湿散结,健胃消炎,明目的功能,疗诸疮肿毒,治各种急慢性炎症发热,痈肿疮疡等症,在中草药里属清热解毒类药物。现代药理研究表明,它有良好的抗菌作用,特别能有效抑制金黄色葡萄球菌和皮肤真菌,并有轻泻和健胃的功效;蒲公英浸剂则有利胆作用。

2.1 抗菌作用

现代药理研究证明,蒲公英水煎剂对金黄色葡萄球菌,溶血性链球菌有较强的杀菌作用,对致病性皮

肤真菌有抑制作用。体外实验证明蒲公英的抗菌作用与TMP合用有抑菌增效作用。扫描电镜对细菌超微结构改变的观察表明,在蒲公英的作用下,金黄色葡萄球菌菌体呈膨大、胞壁增厚,胞核、核糖体均聚集成块,干扰了RNA和DNA的合成,阻断细菌生长等改变。此外,蒲公英还能抑制变形链球菌的生长。

对于病毒,曾有报道在细胞培养上蒲公英能延缓ECHO病毒及疱疹病毒所致人胚肾或人胚肺原代单层细胞的病变,但对流感病毒、副流感病毒、腺病毒、鼻病毒等无明显作用。1:80的水煎剂能延缓ECHO病毒细胞病变,对某些真菌也有抑制作用,其提取液对内毒素有中等的直接拮抗作用。此外,对肺炎双球菌、脑膜炎球菌、白喉杆菌、绿脓杆菌、变形杆菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌及其它球菌也有一定的杀菌作用。蒲公英提取液1:400在试管内能抑制结核菌;醇提取物31 mg/kg,能杀死钩端螺旋体。所以蒲公英制剂在一定程度上可以代替抗菌素使用,对某些疾病还表现出广谱抗菌素的作用。可治疗上呼吸道感染、急性扁桃腺炎、咽喉炎、结膜炎、流行性腮腺炎、急性乳腺炎、胃炎、肠炎、痢疾、肝炎、胆囊炎、急性阑尾炎、泌尿系统感染、盆腔炎、疖痈、疔、疮等疾病。尽管如此,由于蒲公英抗菌、抗病毒作用的浓度都要求较高,体内难以达到抑菌浓度,故蒲公英对全身感染的疗效尚难于用其抗菌作用解释。

2.2 利胆保肝

蒲公英根部含有的胆素(Choline),有助于清除血液中的胆固醇,净化血液,还有助肝脏排毒、预防及改善肝硬化、胆结石、肝炎等功效。蒲公英根部亦含有丰富的微量元素,其钙的含量为番石榴的2.2倍、刺梨的3.2倍,铁的含量为刺梨的4倍,钾的含量为一般绿色植物的3倍,更重要的是其中富含具有很强生理活性的硒元素,是保肝健脾的良药。另外,其叶子还有改善湿疹、舒缓皮肤炎、关节不适的净血功效。蒲公英提取物经十二指肠给药,能增加麻醉大鼠胆汁分泌,这是蒲公英对肝脏的直接作用引起的,其利胆的有效部分主要为树脂部分。蒲公英肌注或灌服对四氯化碳所致大鼠肝损伤有显著保护作用,能显著减轻肝细胞的脂肪变性及降低ALT(谷丙转氨酶)活性。拮抗毒素致使肝细胞溶酶体和粒线体损伤,对乙肝表面抗原也有抑制作用。

另据国外医学临床介绍,蒲公英的提取物对慢性胆囊痉挛及结石症,有提高胆汁流量、缓解疼痛的作

刘进,辽宁省农牧业机械研究所有限公司,110036。

刘敏跃,单位及通讯地址同第一作者。

于德强,辽宁农业职业技术学院。

张玉东,大连老虎滩海洋公园有限公司。

收稿日期:2007-02-11

用。煎汤内服,能使胆囊收缩,有利于胆汁排入肠中,同时对慢性胆囊炎痉挛及结石症有疗效。胆囊炎急性发作,以上腹胀痛为主症者,可以蒲公英为主,配茵陈、郁金等加以治疗。

2.3 抗肿瘤

试验表明,蒲公英水抽提液在体外能显著提高人外周血淋巴细胞母细胞转化率,有增强机体免疫力的作用。从蒲公英植株中提取一种由葡萄糖、甘露聚糖等构成的含微量蛋白质的多糖物质能显著增强艾氏癌及 MM46 肿瘤细胞抗原所致的小鼠脚垫迟发型过敏反应强度,其作用机制为活化巨噬细胞,使 T-DHR (迟发型过敏反应) 上升,后期呈现对增殖的抑制效果,此作用于接种癌细胞 10~20 d 的后期给药有效,故蒲公英多糖的抑瘤活性与其免疫激活效果有关。蒲公英多糖腹腔注射还能显著增强小鼠抗体依赖性巨噬细胞的细胞毒作用。

2.4 抗胃溃疡

蒲公英中含有的山莴苣苦素(Lactupicrine)能刺激天然的消化液的分泌,促进消化,缓解胃部压力,同时对组胺、五肽胃泌素、氨甲酰胆碱引起的大鼠胃液分泌均有显著的抑制作用,对大鼠应激性胃溃疡、幽门结扎性溃疡、乙醇性胃黏膜损伤均有良好保护作用,并能提高大鼠胃组织中 PGE2 的含量。表明其抗溃疡和抗胃粘膜损伤的机理可能与影响胃组织内源性 PGE2 含量有关。蒲公英制剂 3.0、10.0 g/kg 有抑制胃液作用,采用幽门结扎法,给药组胃酸抑制率分别为 41.9%和 72.2%,胃液量抑制率为 87.7%和 97.6%。还可把蒲公英加入健脾理气止痛的方剂中,治疗胃溃疡等症。

2.5 利尿作用

蒲公英又称尿床草,它具有丰富的维生素 A、C 及矿物质,对消化不良、便秘都有改善的作用。蒲公英是天然的利尿剂和消化良药,它能促进肾中盐和水的排泄从而增加尿液的产生,能帮助降低血压,而且不像合成利尿剂那样会造成人体中钾、钠的流失。蒲公英有一个比其他的利尿剂优越的地方,其含有钾——一种通常在利尿治疗中失去的营养物。蒲公英适用于需要轻微的利尿治疗的大多数情况,像消化不良、肝和胆囊的疾病、高血压和充血的心脏麻痹等。美国著名的营养保健专家 Earl Mindell 博士对蒲公英的最新研究表明:蒲公英是天然的利尿剂和助消化圣品;含有丰富的矿物质,不仅能帮助预防缺铁引起的贫血症,而且它的大量钾成分还可以和钠一起共同调节体内酸碱平衡。在加拿大蒲公英的根正式被注册为利尿、消水肿的草药。

2.6 用于皮肤颜色的改良剂

蒲公英也是早春优质野菜资源,是一种不可多得

的含维生素丰富的蔬菜,所含维生素 A 超过等量胡萝卜的 1/5 以上,维生素 B 的含量也超过大多数绿叶菜。如蒲公英、野菊花、桅子、红辣椒等,其中的色素能很好地在畜禽的皮肤、脚趾、蛋黄中残留,改变皮肤及蛋黄的颜色,给人带来视觉享受。

2.7 其他作用

蒲公英制剂低浓度时直接兴奋离体蛙心,而高浓度时则呈抑制作用。蒲公英水煎剂能提高兔离体十二指肠肠的紧张性并加强其收缩力,临床也认为其有健胃和轻泻作用。来自蒲公英咖啡的 β -胡萝卜素在体内被转化为 11-顺式-视黄醇(11-cis retinol),是视紫质(rhodopsin)的最重要成分,能改善眼睛的健康,因此在德国蒲公英根被称作“眼睛根”。怀孕期间的孕妇,饮用蒲公英咖啡对期间的高血压和体内液体滞留治疗作用。同时蒲公英含铁量高,孕妇在孕期饮用蒲公英咖啡能够帮助预防新生儿的贫血症和黄疸病;蒲公英对肝脏的作用也能帮助胎儿自己长成强壮的肝脏;同时也有助于产妇胎盘的排出。

此外,蒲公英具有一定的美容作用。蒲公英含有一种可使毒素从体内排出的物质,干草中含的纯天然纤维素物能促进微生物消化,具有抗炎症的功能,能抵抗炎症和肌肉痉挛,所含抗微生物成分,对面部感染粉刺及黑头粉刺有很好疗效。所含多种氨基酸等营养物质,能滋养皮肤,促进皮肤细胞新陈代谢,防止色素沉积。

3 蒲公英在动物生产中的应用

蒲公英不仅是人类的食疗佳蔬和疗疾良药,而且也能在畜牧兽医上得到较为广泛的应用,既可作为珍贵的饲料添加剂,又可治疗多种家畜的多种疾病。如蒲公英全草加水煮汁灌服,可治疗家畜上呼吸道感染;蒲公英煎水热洗患处,可治疗家畜乳房炎;蒲公英、紫花地丁、冬瓜子配伍,可治疗家畜肺气肿、发烧气喘;蒲公英与茵陈蒿配伍,可治疗羊尿涩疼、发烧腹胀;蒲公英、王不留行共研细末,以黄酒、红糖为引,可治疗母畜缺乳;蒲公英煎汁加白糖调服,可治疗牛、马鼻出血;蒲公英、杏仁、明矾煎汁温服,可治疗牛、马喉炎;蒲公英、黄菊花共捣烂敷患处,可治疗家畜痈肿疔疮等。

蒲公英柔嫩多汁,饲用价值很高,对猪来说是一种多用途优质保健饲料,既可鲜喂也可干喂。实践证明,夏季常给猪喂蒲公英,不仅节约饲料、降低成本,而且猪食欲旺盛、增重快、发病少。在猪饲料中添加 2%~3% 的蒲公英干粉,具有清热、凉血、消肿解毒、助消化、健脾胃的功能。饲喂蒲公英能增进食欲,促进生长,可预防消化道及呼吸道的各种疾病,特别是对猪链球菌病的治疗效果尤佳。对局部热毒症、癩、疔、疖、疮或外伤性肿痛,用蒲公英鲜品捣泥调匀外敷,也有

较好的疗效。孙志良等将白毛藤、蒲公英、板蓝根等 5 味中药以一定比例配伍,用水醇法按注射剂制备要求研制成复方白毛藤注射液,1 ml 注射剂相当于原药总提取物 1 g,并研究了复方白毛藤注射液对大肠杆菌的体外抑菌作用和对猪大肠杆菌病的治疗效果,结果表明,该制剂对大肠杆菌的抑菌效果明显,其抑菌圈直径为(16.7±1.12) mm;该制剂对仔猪黄白痢的治疗效果显著,总治愈率为 94.3%,明显高于药物对照组($P<0.01$)。宋朝真等(1999)用中药复方注射液(黄连、黄芩、白头翁、地榆、银花、板蓝根、穿山连、秦皮、青木香、蒲公英、山鸡椒等)治疗自然发病的猪副伤寒患猪 155 例,治愈 138 例,有效率达 88.4%。万廷英(2002)采用中西医相结合的方法,其中药组成为银花藤、蒲公英、车前草,水煎,然后喂服患畜,对 85 例猪丹毒患病猪进行疗效观察,取得了较好治疗效果。

孟志敏研究了炎热夏季在饲料中添加蒲公英粉对鸡产蛋性能的影响及效益分析。结果表明,饲料中添加 2%蒲公英粉可极显著提高产蛋率($P<0.01$),蛋重有增加趋势,但差异不显著($P>0.05$);添加蒲公英粉后,蛋壳及卵黄的色泽得到了改善,提高了蛋的商品价值。蒲公英粉具有清热解毒、凉血的功效,故在炎热夏季,饲料中添加蒲公英粉,可在一定程度上缓解热应激对蛋鸡的危害,提高产蛋性能。

现代医学研究表明,蒲公英能诱导产生 γ -干扰素,具有较强的抗病毒作用。蒲公英对免疫细胞有激活作用。用蒲银汤(配方为蒲公英 30 g、金银花 20 g、连翘 15 g,薄荷少许为引)治疗火鸡痘病,无论是口服或洗涤,痘疹都能较快消失。在治疗中,未见蒲银汤对鸡的不良影响,试验鸡均渐有明显的降温、增食、精神好转等表现。

研究发现蒲公英在提高血清 T-球蛋白含量、E-花环百分率、EAC-花环百分率、DAHI 效价及增加白细胞数等方面均优于胸腺肽。祝建新等用黄芪、黄芩、板蓝根、蒲公英、生地、赤芍等 12 味药物组成的方剂防治鸡传染性法氏囊病,以卵黄抗体为对照,发现中药能减轻病鸡法氏囊和脾脏等免疫器官的病变,腿肌出血、肾脏出血和肿大等病症较轻于对照组,死亡率与对照组相当。杨志强等将当归、股梢、蒲公英等中草药按一定比例混合组成归蒲方,按 2%比例添加在基础日粮中,结果表明,中草药饲料添加剂对肉鸡肠道疾病和腿部疾病具有明显的防治效果,从而提高了肉鸡的成活率。

胡松华等研究表明,雏鸡饮用由黄芪、绞股蓝、蒲公英、苦参和秦皮组成的“禽速康”后,脾脏、法氏囊指数显著高于对照组,并可拮抗地塞米松对鸡免疫机能的抑制作用。金银花、蒲公英、紫花地丁口服液能显著

增强小白鼠白细胞的吞噬功能。石膏液、蒲公英液能使因损伤而降低的腹腔巨噬细胞的吞噬功能显著上升至正常,甚至超过正常值。

赵晓明研究表明,利用药用蒲公英的生物特性,可以预防并治疗奶牛乳腺炎,以解决目前困扰乳品市场的“有抗奶”问题,杜绝“奶牛吃药,人喝药奶”的现象,让群众喝上放心奶。赵晓明认为,通过调整奶牛饮食结构,可以增强奶牛体魄,而研究证明,蒲公英是一种理想的抗乳腺炎强化饲料,具有食药双重价值,这就提供了一个以极低成本、高效率、无抗生素、长期预防同时治疗奶牛乳腺炎的新途径。

窦俊伟研究发现,蒲公英对羊有促生长作用,使用该饲料喂养的羊无任何化学和其它有害物质残留,属纯天然的绿色畜产品,并且肉质较一般羊肉更加鲜嫩,口感更佳。陈慧云以王不留行、黄芪、蒲公英、神曲、大茴香、碳酸钠等配成“增乳散”饲喂奶山羊,每头增乳 4.1 kg。

蒲公英可防治兔的肠炎、肺炎、乳房炎和腹泻等症,对健胃和促进食欲也有一定作用,用其防治兔病时,蒲公英可以直接鲜喂,也可以每只兔每次取干粉 5 g,煎水内服,每日 2 次,连服 3~5 d。向幼兔的饲料中添加黄柏 10%、仓术 12%、昆布 12%、蒲公英 12%、绿豆 30%、麦芽 12%、党参 12%(中草药占载体的 2%),研究表明,中药添加剂对幼兔生产发育有促进作用,效果显著,在整个试验期内无毒副作用,也没有抗药性,安全可靠。蒲公英在猪、鸡、牛上应用的较多,其它动物上的应用报道的较少,还有待于进一步研究。

4 蒲公英的开发前景

蒲公英的食用价值、医药价值、营养价值在《本草纲目》、《辞海》及历代医药大典中都有极高的评价和肯定。现代医学研究表明,蒲公英具有“抗病毒、抗感染、抗肿瘤”的三抗作用,引起了国际关注。各国专家认为,蒲公英的营养价值之高在自然界十分罕见,是一种高维营养菜,并是药膳食品,吃蒲公英能治疗人体的很多疾病,被专家称为“健康天使”。美国科研人员对蒲公英的食用价值也作了深入研究,证实其维生素 C 含量比西红柿高 50%,蛋白质含量是茄子的 2 倍,铁的含量几乎与菠萝相当。

由于在用蒲公英研发人类保健品和药品过程中,已进行了大量的动物实验,因此可以认为蒲公英是一种纯天然、安全的饲料添加剂。在动物生产中,蒲公英可作为一种具有强化营养、增强免疫、促进生长、改善动物产品品质的新型饲料添加剂推广应用,相信在不久的将来会开发出更多的产品应用于动物生产,为人类提供更多的安全食品。(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

泌乳母猪采食量降低的原因和改善措施

刘涛 孙强

1 母猪育种的目标和问题

随着现代遗传育种科学的不断发展,人们趋向性地根据自身的需要对猪遗传特性进行改良。现代遗传育种的方向是追求生长速度快、瘦肉率高,在母猪的选育中就更明显,包括:①脂肪组织减少;②成熟体重增大;③性成熟提前;④更高的饲料转化率。

在以上这些遗传性状改善的同时也带来一些不利的因素,限制了母猪繁殖性能的最大表现,包括:①消化道结构和功能的变化导致采食量的减少;②母猪采食的能量不足以喂养更多的仔猪,母猪的泌乳量显得非常不够。

2 泌乳母猪采食量下降带来的问题

由于母猪在泌乳期间采食量不够,而仔猪数目较多,母猪为了满足泌乳的需要,往往会通过自身调节,分解体内的脂肪组织来满足乳腺对能量的需要,在21 d或者更长的泌乳期后就会发生母猪掉膘的情况。在不同季节和不同区域,母猪掉膘的情况也有很大差别,掉膘严重的可以达到20 kg或者更高。母猪掉膘会产生以下几方面影响。

2.1 延长下次发情间隔(见图1)

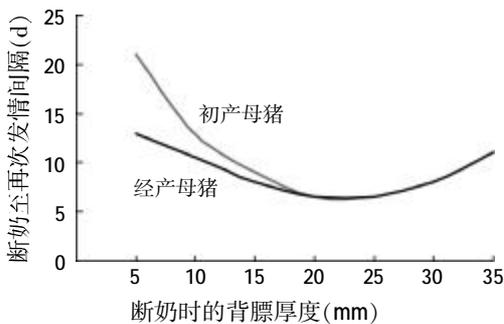


图1 断奶至再次发情间隔与背膘厚度的关系

随着母猪掉膘程度的加大,到下次发情时的间隔时间就更长。如果母猪背膘从25 mm减少到5 mm,那么母猪在两次发情的间隔时间就会从6 d延长到14 d或者20 d,对下次配种和母猪的利用率非常

不利,尤其对初产母猪影响更大。

2.2 降低排卵数(见图2)

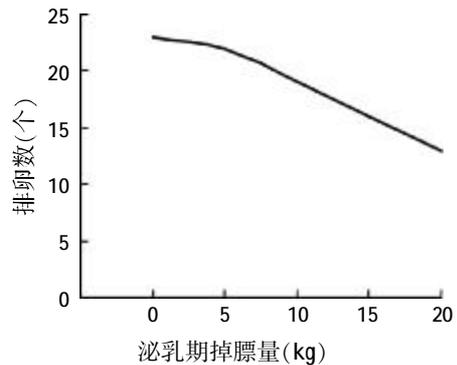


图2 泌乳期掉膘量与排卵数的关系

如果泌乳期掉膘从5 kg上升到20 kg,那么排卵数就会从23个下降到13个,降低43.48%,直接影响配种的效率和出生仔猪数,这对猪场的经济效益是非常严重的影响。

2.3 降低母猪使用年限

对于经产母猪来说,其使用年限越长,则费用就会越低。但是由于各种因素的影响,特别是泌乳期间体重下降太大对繁殖性能的负面作用,往往导致母猪的使用年限大大缩短。国内母猪的使用年限平均是在4~5胎次,更低的是在头胎被淘汰,达到50%以上。

综上所述,在母猪泌乳期间,保持好母猪的膘情是非常重要的,特别是对规模化较高的种猪场。那么如何提高母猪泌乳期的采食量或者保证母猪良好的营养水平呢?

3 改善泌乳母猪采食量的措施

3.1 加强管理

比如在夏天采食量下降更严重的时候采取通风、降温等措施。

3.2 从营养角度

通过提高母猪饲料的营养浓度,使单位采食量内的营养元素浓度更高,改善母猪可利用营养的水平。

3.3 通过使用合适的添加剂来提高母猪的采食量

从添加剂角度来讲,酸化剂、有益的益生菌、新鲜的原料等等都是可使用的措施;另外合适的有针对性的诱食剂有着更大的优势,它添加方便、针对性更强、不受季节等因素的影响。AP9100是这一类产品的典

刘涛,上海彼福艾饲料科技有限公司,博士,201615,上海市松江区新格路1125号。

孙强,山东省即墨市普东动物防疫监督站。

收稿日期:2007-02-05

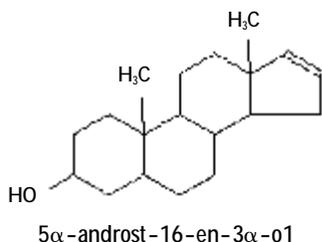
型代表。该公司通过其在动物调味剂 40 多年的经验,对动物的采食性和采食规律进行研究,对自然界存在的上万种原料进行筛选,成功地开发了针对泌乳期母猪采食量下降的诱食剂产品,其主要的原料为自然界存在的对母猪有特定诱食功能的黑松菌——松露。

4 松露简介

松露是一种主要生长在橡树根部底下,一年生的天然蕈菇,种类约有 30 多种,其中以白松露、黑松露最为珍贵。通常外观均是不规则球状,切开来看,切面则是犹如迷宫般的大理石纹路。松露对于生长环境非常挑剔,只要阳光、水量或土壤的酸碱值稍有变化就无法生长,这也是为何松露如此稀有并且价格不菲的缘故。松露的味道很特别,它经常发出麝香、精液的味道,而这股气味自古就被认为有催情作用,所以,西方人嗜吃松露,不只是因为其贵比黄金。黑松露的口感也很特别,不过香味没有特别。好的松露生食不仅会有一种难以比拟的脆爽口感,而且有一点甜味,但一遇热就消失。

人们对 $5\alpha\text{-androst-16-en-3}\alpha\text{-ol}$ 进行了测试,这是一种在黑松菌中发现的类固醇,同时也出现在公猪的唾液里,这是母猪对费洛蒙(信息素)做出的反应。

黑松菌内类固醇 $5\alpha\text{-androst-16-en-3}\alpha\text{-ol}$ 的化学结构为:



科学家还发现,黑松菌包括很多小型有机分子,特别是酒精、乙醛和酮,例如 2-甲基丙醛、丁酮、2-methylpropan-1-ol、2-甲基正丁醛、3-甲基正丁醛、2-methylbutan-1-ol 和 3-methylbutan-1-ol。不过黑松菌香味应该归因于含硫磺分子,最显著的是 CH_3SCH_3 (二甲基硫化物),就像 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 与 $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHSCH}_3$ 一样,并且它的香味持续时间非常长。

5 母猪的偏好性试验

5.1 母猪是否对 AP9100 有偏好性而喜食含有它的饲料呢,通过偏好性试验就能说明这个问题。在英国爱丁堡大学进行的试验选用了 6 头经产母猪,分别饲喂含有诱食剂或者不含诱食剂的饲料,在特殊的猪栏设计下来完成偏好性试验。猪栏设计成两个部分,一

半是可以自由采食区,另一半是主动采食区,饲料放在面板为开关的料槽内,如果母猪想采食这个料槽内的饲料就必须主动的去拱推面板 5 次才会有饲料出来。设计见图 3。

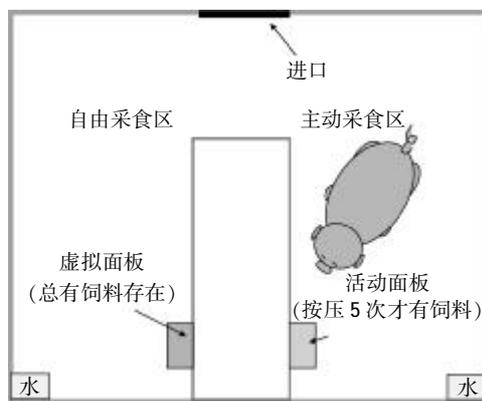


图 3 偏好性试验的猪栏设计

通过 10 d 的试验后,统计的采食量结果显示母猪对含有 AP9100 的饲料有非常明显的偏好性(见图 4)。

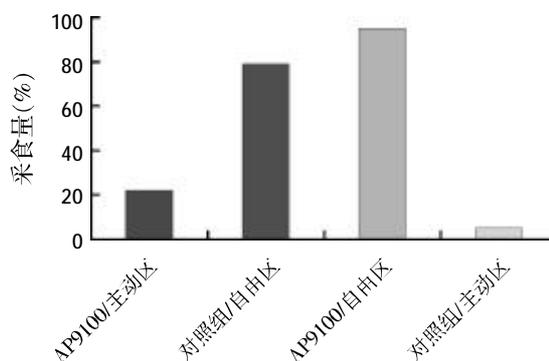


图 4 以饲料/区域计算的饲料采食量

5.2 研究 AP9100 对初产、经产母猪泌乳期采食量、窝重及下一产仔周期的影响。英国利兹大学动物生理与营养研究所的研究者们用 300 头纯种大白猪进行了为期 12 周的试验,每个重复 3 周,从产仔到断奶结束。试验选用了从初产到 4 胎以上的母猪,所有母猪按照日粮的差异分为两组,一组饲喂正常日粮,另一组饲喂含有诱食剂的日粮。自由采食后记录泌乳期内每头猪的平均采食量、试验开始及结束时母猪的体重、活仔数以及窝重、断奶后到排卵的间隔时间以及下一个胎次的产仔数。结果显示:饲喂含有 AP9100 (Addarome Truffe) 日粮的母猪在泌乳期的第二、三周内比对照组母猪的采食量都高,在第三周达到 15% 的显著性差异(见图 5)。

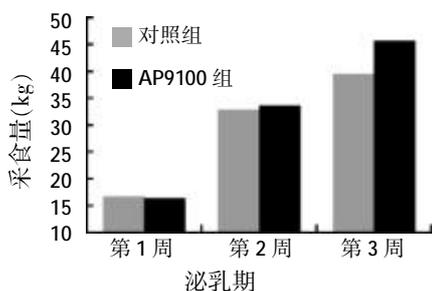


图5 所有母猪每周平均采食量

对经产母猪在泌乳期内体重损失没有差异,但是对于初产母猪有 18%的显著性差异(见图 6)。

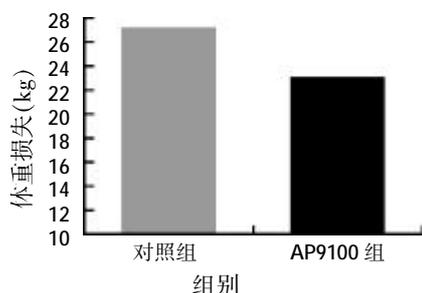


图6 初产母猪的体重损失

母猪体况维持对乳猪的影响也很大,图 7 显示对于初产母猪,合适的体况能提高窝重 7.8%,表明母猪有足够的能满足仔猪对奶水的需要。

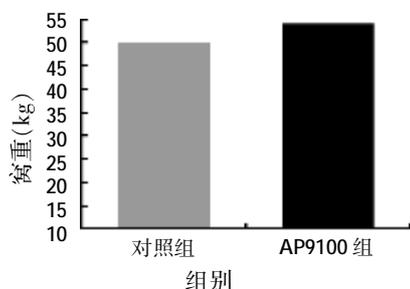


图7 初产母猪窝重的比较

对下一个胎次的产仔数继续统计的结果表明,采食含有 AP9100 日粮的母猪的产仔数比对照组母猪要高(见图 8),进一步的分析表明每头母猪能够多生产 0.75 头(见图 9)。

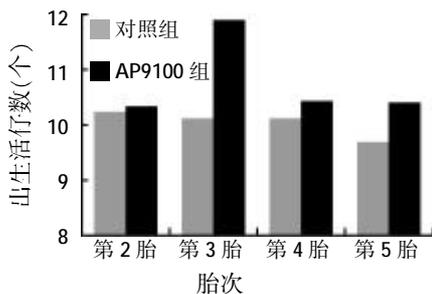


图8 对下一胎次窝仔数的影响

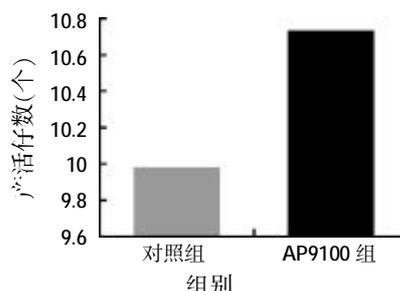


图9 对下一胎次平均产活仔数的影响

整个试验的结果表明,含有松露的母猪诱食剂 AP9100(Addarome Truffe)对泌乳期的母猪有积极的作用。泌乳期内是母猪生产中食欲很容易受到抑制的阶段,要达到合适的采食量非常困难。母猪营养的缺乏势必影响母猪的体重以及乳猪的生长。母猪较差的体况也会影响其下一个胎次的产仔数和窝重,而这些指标又是决定母猪使用年限和效率以及猪场效益的关键因素。

通过提高采食量,AP9100(Addarome Truffe)提供了一种解决营养不足的方法,填补母猪的潜在需要和实际采食量之间的空隙。维持母猪合适体况的好处在上面的试验中很明显的显现出来,主要是提高窝重,特别是对初产母猪而言。尽管对所有母猪,断奶到下次排卵的间隔上没有统计上的差异(5.05 d),但是调味剂在提高下胎次产仔数上还是有明显的促进作用。

5.3 在农场所做的试验也表明,母猪诱食剂 AP9100对母猪的繁殖性能以及仔猪的性能有非常大的改善(见表 1、表 2)。

表 1 某猪场试验结果

项目	对照组	AP9100组	差异	差异
母猪平均采食量(kg/d)	9.38	9.91	0.53	+5.65%
产仔数(个)	11	11.25	0.25	2.27%
断奶活仔数(个)	8.75	9.25	0.5	5.71%
平均断奶重(kg)	6.33	6.75	0.32	5.06%

表 2 某猪场试验结果

项目	对照组	AP9100组	差异	差异
母猪平均采食量(kg/d)	4.76	5.53	0.77	+16.1%
产仔数(个)	11.5	11.5	0	0
断奶活仔数(个)	9	10	1	11.1%
平均断奶重(kg)	6.84	7.70	0.86	12.57%

6 结语

人们对于母猪在泌乳期采食量的研究还在进行,但是无论如何,我们都应该从各个方面来提高母猪,特别是泌乳期母猪的采食量,进而提高断奶仔猪的体重和整个猪场的经济效益。其中母猪诱食剂是个很好的、简单的措施饲喂,特别是在炎热的夏季就更明显。

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

瘤胃微生物来源的纤维降解酶及其应用

陈振明 张朝晖 刘建新

摘要 瘤胃微生物含有种类丰富的纤维降解酶系统。通过研究纤维降解酶活性在瘤胃内的分布和各种瘤胃微生物降解酶系统等有助于这些酶的开发利用。系统生物学研究的快速发展为大规模克隆更多的纤维降解酶基因提供了可能。文中还综述了纤维降解酶在畜牧生产中的一些应用途径。

关键词 微生物;瘤胃;纤维降解酶;基因

中图分类号 Q556+.2

全球酶市场目前正以每年 6.6% 的速度增长,到 2009 年,需要量将达到 5 亿美元^[1]。作为新兴的世界制造中心之一,中国将在这一进程中起更大的作用。有关酶制剂应用的产业如食品、纺织、皮革和洗涤剂工业中,饲料工业需求的增长将是最快的。发展更有效的酶表达系统将有效地降低酶生产成本,促进畜牧生产。其中,酶基因库的建立并从中选择最有效的酶是一个关键^[2]。

反刍动物的瘤胃是一个复杂的微生态系统,其微生物区系主要由细菌、原虫和真菌组成。这些微生物的存在使反刍动物能够以植物纤维原料为主的低质粗饲料作为主要日粮。粗饲料的主要成分是纤维素、半纤维素、木聚糖、果胶和木质素等纤维多糖。与此相对应,瘤胃微生物能产生纤维素酶、半纤维素酶、木聚糖酶、葡萄糖苷酶等纤维多糖的降解酶系^[3]。近年来,很多研究者以 16S rDNA 和 18S rDNA 序列分析、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)及抑制性消减杂交(SSH)等技术为基础,报道了牛和羊等反刍动物瘤胃微生物区系的多样性^[4,5],但是瘤胃来源酶的多样性研究报道不多。本文对纤维降解酶活性在瘤胃中的分布,各类瘤胃微生物的酶活性,酶基因克隆及其应用等方面的研究进展作一综述。

1 纤维降解酶在瘤胃内部的分布

由于微生物种群的多样性和同种瘤胃微生物可能产生多种纤维降解酶的特性^[6],瘤胃微生物产生的酶种类极为丰富,包括各种纤维降解酶系(如纤维素

酶、木聚糖酶、 β -葡聚糖酶和果胶酶等)、淀粉酶、蛋白酶、植酸酶和植物毒素的降解酶(如单宁酶)等。

瘤胃微生物产生的酶可分布于瘤胃液(RFE)、瘤胃饲料颗粒(FAE)或吸附于自身细胞表面(CAE)。通过瘤胃微生物酶分布的研究可促进人们对瘤胃饲料消化机制的了解,来调控瘤胃发酵,以最大程度地促进粗饲料在瘤胃内的降解;同时,也可促进从酶基因库中选择合适的酶制剂作为饲料添加剂的研究。Lee 等(1999)^[7]系统研究了赫里福公牛以全苜蓿作为日粮时,各种纤维降解酶系在瘤胃内不同部位的分布情况。结果表明,内切葡聚糖酶、木聚糖酶、淀粉酶、葡聚糖酶和阿拉伯酶等多糖降解酶的活性主要位于微生物细胞表面;而葡萄糖苷酶、岩藻糖苷酶、木糖苷酶、阿拉伯呋喃糖苷酶等糖苷酶的活性则主要位于瘤胃液中。结合其它研究结果, Lee 等^[2]认为,即使考虑到日粮的性质和组成及宿主动物和采样方式等因素的变化, CAE 的多糖降解酶活性都会超过总活性的 65%。如果仅从 FAE 和 RFE 的角度来考虑酶活性分布,内切葡聚糖酶活性在 FAE 和 RFE 中分别为 65%和35%;木聚糖酶活性则是 FAE 要比 RFE 高 2 倍以上。这一结论是和 Martin 等^[8]人(1995)的研究结果相一致的。

2 瘤胃微生物对纤维多糖的降解作用

总的来看,瘤胃细菌、真菌和原虫对植物纤维降解的作用人们了解仍很少^[9]。反刍动物种类、日粮组成和消化阶段等因素都可能影响瘤胃微生物对结构多糖的降解能力。细菌、原虫和真菌等主要瘤胃微生物间的各种复杂的协同和拮抗作用也对降解作用有着重要的影响。

2.1 细菌的作用

细菌是瘤胃内最主要的微生物。每毫升瘤胃液中有 200 种细菌^[10],总数可达到 10^{11} 个活细胞,而原虫只有 10^4 ~ 10^6 个,真菌则为 10^3 ~ 10^5 个。基于数量上的优势和代谢能力的多样性,一般认为细菌在瘤胃日粮消化中起主要作用,其中 *Fibrobacter succinogenes*、*Ru-*

陈振明,浙江工业大学生物与环境工程学院,博士,310032,浙江省杭州市潮王路 18 号。

张朝晖,单位及通讯地址同第一作者。

刘建新,浙江大学奶业科学研究所。

收稿日期:2006-11-27

★ 浙江省自然科学基金项目“瘤胃木聚糖酶基因的克隆和进化分析”(编号:Y306448)

minococcus flavifaciens 和 *R. albus* 等三种细菌是瘤胃中降解植物细胞壁的主要微生物^[9]。

这三种细菌有着其它瘤胃细菌和其它肠道纤维降解菌所没有的共同特点,其中最明显的一点是营养专化性^[2]。多数瘤胃细菌能利用多种单糖、寡糖或多糖作为生长底物。但是,这三种细菌几乎只能利用纤维素、木聚糖和它们的水解产物^[11]。这种营养专化性迫使这三种瘤胃细菌对自身的纤维分解能力不断进行优化,为在瘤胃中获得生长优势。而且,针对植物细胞壁很难降解和瘤胃内容物不断流动的特性,这三种细菌能快速水解纤维素。事实上,在已知的所有能降解纤维素的微生物中,只有 *Clostridium thermocellum* 这种嗜热细菌的纤维素降解速度比这三种瘤胃细菌快^[2]。

Koike 等^[12]利用 16S rDNA 序列分析表明,吸附于干草茎部的瘤胃细菌种类随所用干草的种类不同而变化。并且,一般人们认为纤维吸附细菌与纤维降解有关,因此,很有可能通常认为的三种主要纤维降解细菌 *F. succinogenes*、*R. flavifaciens* 和 *R. albus* 只是所有纤维降解微生物很少的一部分。

2.2 真菌的作用

真菌仅占瘤胃微生物生物量的 8%^[13],这可能与它们的生长速度(6~9 h)比细菌的(0.3~3.5 h)缓慢有关。与细菌相比,真菌在瘤胃中的作用还不很明确。如果把真菌从瘤胃中除去,只会对饲喂非常差的牧草日粮的动物有显著影响。

目前,从瘤胃中已分离培养了 5 个属的真菌,分别是 *Anaeromyces*、*Caecomyces*、*Neocallimastix*、*Orpinomyces* 和 *Piromyces*^[9]。从已有研究来看,真菌具有穿透植物细胞表皮和木质化细胞壁的能力,而细菌并不具备这种能力。通过这种方式,瘤胃真菌把饲料颗粒化或软化,从而使最难降解的纤维多糖能被利用。瘤胃真菌的纤维降解酶系很有特色,它们能产生多种纤维水解酶,其中的纤维素酶和木聚糖酶活性是目前已知的纤维降解酶中最强的^[2],远远高于其它瘤胃细菌、原虫或其它用来生产商品酶的各种真菌和细菌所产生的酶活性。而且,瘤胃真菌所产生的酶一般都是胞外的,比较稳定,能利用的底物比细菌更多。因此,这些酶应用潜力很大。

在 Lee 等^[2]进行的体外培养试验中,瘤胃细菌对果园草的纤维降解作用在培养早期较高,但真菌在培养晚期降解作用较强,而原虫不能独立降解细胞壁纤维(也可能是由于没有发现培养原虫的合适条件)。由此他们认为,从细胞壁消化的整个过程来看,瘤胃各种微生物对纤维的消化作用由大到小依此为:真菌、细菌和原

虫。他们认为,尽管细菌因有数量和代谢多样性上的优势,这一试验结果却提示在瘤胃中真菌对细胞壁的降解作用可能远远超过细菌的贡献。Akin 等^[14]人的研究显示,70%以上的纤维素在瘤胃纤维中的消化都是由真菌实现的。因此,真菌可能在瘤胃纤维特别是高度纤维化的低质粗饲料的消化中起着很重要的作用。

2.3 原虫的作用

瘤胃中至少已发现 30 属 200 种原虫^[10]。Williams 等^[14]报道瘤胃中 62%的纤维素降解活性由原虫产生。如果把原虫从瘤胃中除去,纤维的消化程度会有所降低,但瘤胃发酵的总效率会提高。瘤胃原虫具备所有降解纤维多糖所需要的活性,但由于培养的困难,对于原虫酶系统的研究还不够深入。

3 瘤胃微生物纤维降解酶新基因的克隆

越来越多的瘤胃来源的纤维降解酶基因已被克隆,对酶系统的了解也在逐步深入^[3,16,17]。随着基因组学和蛋白组学等各种系统生物学研究的快速发展,越来越多的基因克隆方法不断出现。以下介绍这一领域正出现的一些方法。

3.1 基因组注释

目前在公共数据库中有 343 种已完成的基因组,1 609 种正在进行中^[18],其中瘤胃微生物有 6 种,包括 3 种主要的纤维降解细菌 *F. succinogenes* S85、*R. flavifaciens* 和 *R. albus*。基因组测序为我们提供了大量的数据,根本性地改变了生物学研究的途径。在新基因的克隆上,至少有三方面的工作可以开展:①利用和已知蛋白序列的相似性对基因组进行注释(Annotation)。这是目前最有效的方法,但 40%~60%的新序列不能通过序列比较的方法发现其功能,而且大量的注释只是推测基因具有某种功能,而不是确定的功能^[19]。②利用各种功能基因组学方法来推测基因功能。如基因组背景分析(Genome context analysis)^[20],蛋白质和蛋白质以及蛋白质和核酸相互作用分析^[21-23],特定基因破坏后的表型分析^[24,25],蛋白质在细胞内的定位分析和结构蛋白组学研究^[26]。尽管这些方法还不能很直接地确定基因的具体功能,但至少可以判定其大致功能。③基因表达并进行生物化学分析,对上述两种方法所推测的基因功能进行验证^[27]。

3.2 总基因组学途径

据估计,很多自然环境中超过 99%的微生物仍很难用传统方法培养^[28],瘤胃微生物也只有极少数可以单独培养^[5,8,29]。这些难培养微生物代表着一个极大的潜在资源。利用不依赖于培养的方法即总基因组学(Metagenomics)方法进行难培养微生物的研究是一

条有效途径^[30]。这些方法首先从目标环境中直接提取所有微生物的总 DNA, 或者提取总 RNA 并制备 cDNA, 然后通过以下三条途径之一获得目标基因: ①设计兼并引物进行 PCR 扩增^[31]; ②制备基因组文库, 根据基因序列的相似性或基因产物的活性来筛选^[30]; ③制备 cDNA 文库, 根据基因产物的活性进行筛选^[32]。三种方法各有优缺点, 互相补充。

Ferrer 等^[33]为从奶牛瘤胃提取的总 DNA 构建了一个表达文库, 利用以酶活性为基础的方法筛选水解酶基因。他们总共筛选了整个基因组文库的 7%, 得到了 22 个分别具有酯酶或 β -1,4-葡聚糖酶等水解酶活性的克隆编码, 其中 8 个克隆编码和已知基因几乎完全不同的新基因。Liu 等^[34]从富集的瘤胃真菌培养物中直接提取总 DNA 并进行木聚糖酶基因扩增, 得到的基因 xyn R8 和已知基因 xynA、xynw1-4 和 xyn-sk1-15 的氨基酸序列分别具有 95.9%、89.1% 和 88.8% 的同源性。

3.3 抑制性消减杂交(SSH)

如前所述, 微生物基因组的测定数目在快速增长当中。但是, 不可能对所有的微生物进行全基因组测序。在已知的模式微生物的基因组基础之上, 结合 SSH 技术有可能快速了解相似的微生物与模式微生物基因组的差异, 从而较快地发现一些有用的信息^[35]。鉴于瘤胃微生物细胞壁水解酶的多样性, SSH 技术将是发现瘤胃微生物细胞壁水解酶的多样性甚至新基因的一项极有用的技术。

Fibrobacter 是一类具有很强植物细胞壁降解能力的细菌, 其中 *F. succinogenes* S85 的基因组正在完成中^[18]。Qi 等(2005)^[36]报道了应用 SSH 技术来比较 *F. intestinalis* species DR7 和 *F. succinogenes* S85 的基因组差异, 并试图从中寻找一些新的细胞壁水解酶基因。差异克隆所得到的序列进行 BLASTN 搜索表明, 61% 的基因不能在 *F. succinogenes* 的基因组中找到相似基因; 但是在进行蛋白质序列比较时, 约 80% 的基因在 *F. succinogenes* 能找到相似蛋白, 其中 30 个基因编码以糖作为底物的酶。这表明 SSH 是富集两种相似瘤胃微生物的差异片段, 寻找蛋白质多样性的一个相当有效的途径。类似的, SSH 也可以用于两种相似瘤胃环境的总基因组比较研究^[6]。

4 瘤胃微生物纤维降解酶基因技术的应用途径

4.1 瘤胃微生物的遗传改造

很多实验室都在试图通过把纤维降解酶基因导入瘤胃细菌以改善瘤胃发酵^[37], 目的是使外源基因能在瘤胃微生物中稳定表达, 使其表达原来不存在的基因或提高原来就存在的基因的表达式。为达到改善瘤

胃发酵的目的, 这种遗传改造过的细菌还必须能在瘤胃中稳定存在。目前, 好几种优势瘤胃细菌已经建立并优化了基因接合或电穿孔转移方法, 如 *Butyrivibrio fibrisolvens*、*Eubacterium cellulosolvens*、*P. ruminicola*、*R. albus*、*Streptococcus bovis*、*S. ruminantium*; 多糖降解酶基因被导入瘤胃微生物中, 并稳定的表达, 如来自 *Streptococcus bovis* 的淀粉酶基因被导入到 *Butyrivibrio fibrisolvens* 中, 后者的淀粉酶活性在菌株以葡萄糖为唯一碳源时提高了 2.5 倍^[37]。

4.2 青贮接种物的遗传改造

在青贮前往低质牧草中添加酶以释放可溶性的糖类可以提高青贮饲料的质量, 促进动物生长。但是酶比较昂贵, 用起来也不方便, 如果青贮接种物能产生所需要的酶, 这些问题就可以较好的得到解决。乳酸菌(LAB)是青贮饲料中常见的有益微生物, 经常被用作青贮接种物, 因此可以对 LAB 进行遗传改造使其产生纤维降解酶^[37]。16S rRNA 基因序列分析表明^[38], 青贮饲料中主要的 LAB 依次是 *Lactobacillus plantarum*(24%)、*Lactococcus lactis*(22%)、*Leuconostoc pseudomesenteroides*(20%)、*Pediococcus acidilactici*(11%)、*Lactobacillus brevis*(11%)、*Enterococcus faecalis*(7%)、*Weissella kimchii*(3%)和 *Pediococcus pentosaceus*(2%), 对 LAB 的遗传改造主要针对这些微生物。目前, LAB 外源基因的组成表达、诱导表达和定位表达等系统已经比较成熟, 并已成功应用 LAB 来生产有用蛋白或作为产生蛋白质的载体^[39,40]。这些技术有望很快应用于青贮饲料的生产。

4.3 转基因植物

考虑到植物生物技术的进展, 把牧草等饲料作物进行转基因, 使之能产生纤维降解酶是一条经济有效的途径。得到的转基因植物可直接用于饲喂, 不仅可简化饲料加工, 包装和饲喂过程中的很多步骤, 而且更加稳定, 易于贮藏和运输。目前已有很多研究报道了纤维降解酶基因在饲用作物中的表达^[37], 但没能看到其饲养效果方面的报道。

4.4 转基因动物

本途径是把纤维降解酶基因转入动物, 并使外源基因能在特定组织中表达并分泌到胃肠道中。所产生的酶必须能不被蛋白酶降解, 并能在胃肠道表现活性^[37]。目前已有数个成功表达的例子, 需要进一步解决的问题是在动物中的足够高的表达量, 以实现在肠道中对多糖的降解作用。

5 展望

瘤胃微生物是一个很好的纤维降解酶来源。传统上, 由于瘤胃生态系统和厌氧微生物培养的复杂性,

对这一资源的开发进展缓慢。近年来,随着基因组学和蛋白组学等生物系统学研究的快速发展,应用总基因组学方法来研究不易培养的微生物正成为热门。作为一种比较容易实现一定程度调控的微生态系统,瘤胃微生物有望成为一个模式系统,在开发利用瘤胃中丰富的纤维降解酶资源的同时,为环境中不易培养的微生物研究提供经验。

参考文献

- Enzymes to 2009. Published by The Freedonia Group, 2005
- Lee S S, Shin K J, Kim W Y, et al. The Rumen Ecosystem : As a Fountain Source of Nobel Enzymes -Review. Asian -Australasian Journal of Animal Sciences, 1999,12(6):988-1 001
- Selinger L B, Forsberg C W. The rumen:A unique source of enzymes for enhancing livestock production. Anaerobe, 1996,2(5):263-284
- Kocherginskaya S A, Aminov R I, White B A. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. Anaerobe, 2001(7):119-134
- Edwards E, McEwan R, et al. 16s DNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. Antonie Van Leeuwenhoek, 2004,86:263-281
- Galbraith E A, Antonopoulos D A, White B A. Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: The rumen as a model. Environ Microbiol, 2004(6):928-937
- Regensbogenova M, Pristas P, Javorsky P, et al. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. Lett Appl Microbiol, 2004,39:144-147
- Shin E C, Cho K M, Lim W J, et al. Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. J Appl Microbiol, 2004,97:378-383
- Martin C, Michalet-Doreau B. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: Effect of barley and buffer supplements. J. Sci. Food Agric., 1995,67:407-413
- White B A, Cann I K O, et al. Molecular Analysis of Archaea, Bacteria and Eucarya Communities in the Rumen. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 1999,12(1):129-138
- Hungate R E. The Rumen and Its Microbes. New York: Academic Press, 1966
- Koike S, Yoshitani S, Kobayashi Y, et al. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. FEMS Microbiol Lett, 2003, 229:23-30
- Orpin C G, Joblin K N. The rumen anaerobic fungi. In: Hobson P N. The rumen microbial Ecosystem. New York: Chapman and Hall, 1988,129-150
- Williams A G, Withers S E. Effect of ciliate protozoa on the activity of polysaccharide-degrading enzymes and fibre breakdown in the rumen ecosystem. J Appl Microbiol. 1991,70:144-155
- Akin D E, Ames-Gottfred N, Hartley R D, et al. Microspectrophotometry of phenolic compounds in bermudagrass cell walls in relation to rumen microbial digestion. Crop Sci, 1990,30:396-401
- Kobayashi Y, Onodera R. Application of Molecular Biology to Rumen Microbes. Asian -Australasian Journal of Animal Sciences, 1999,12(1):77-83
- Krause D O, Denman S E, Mackie R I, et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology, and genomics. FEMS Microbiology Reviews, 2003,27(5): 663-693
- Liolios K, Tavernarakis N, Hugenholtz P, et al. The Genomes On Line Database (GOLD). v. 2: a monitor of genome projects worldwide. NAR, 2006,34:332-334
- Green M L, Karp P D. A Bayesian method for identifying missing enzymes in predicted metabolic pathway databases. BMC Bioinformatics, 2004(5):76
- Galperin M Y. Who's your neighbor? New computational approaches for functional genomics. Nat Biotechnol, 2000,18: 609-613
- Phizicky E M, Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. Microbiol Rev, 1995,59:94-123
- Puig O, Caspary F, Rigaut G B, et al. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. Methods, 2001,24:218-229
- Predki P F. Functional protein microarrays: ripe for discovery. Curr Opin Chem Biol, 2004(8):8-13
- Winzeler E A, Shoemaker D D, Astromoff A. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. Science, 285,1999:901-906
- Ross-Macdonald P, Coelho P S, et al. Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. Nature, 1999, 402:413-418
- Yakunin A F, Yee A A, Savchenko A, et al. Structural proteomics: a tool for genome annotation. Curr Opin Chem Biol, 2004(8):42-48
- Kuznetsova E, Proudfoot M, Sanders S A., et al. Enzyme genomics: Application of general enzymatic screens to discover new enzymes. FEMS Microbiology Reviews , 2005,29:263-279
- Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev, 1995,59:143-169
- Wright A D, Williams A J, Winder B, et al. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. Appl Environ Microbiol, 2004,70:1 263-1 270
- Lorenz P. Metagenome-a challenging source of enzyme discovery. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002,19(20):13-19
- Jacobsen J, Lydolph M, Lange L. Culture independent PCR: an alternative enzyme discovery strategy. Journal of Microbiological Methods, 2005,60:63-71
- Dalbøge, H. Expression cloning of fungal enzyme genes: a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. FEMS Microbiol Rev, 1997,21:29-42
- Ferrer M, Golyshina O V, Chernikova T N, et al. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. Environmental Microbiology 2005,7(12):1 996-2 010
- Ennahar S, Cai Y, Fujita Y. Phylogenetic Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Paddy Rice Silage as Determined by 16S Ribosomal DNA Analysis. Applied and Environmental Microbiology, 2003,69(1):444-451
- Akopyants N S, Fradkov A, et al. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:13 108-13 113
- Qi M, Nelson K E, et al. Novel Molecular Features of the Fibrolytic Intestinal Bacterium *Fibrobacter intestinalis* Not Shared with *Fibrobacter succinogenes* as Determined by Suppressive Subtractive Hybridization. Journal of Bacteriology, 2005, 187: 3 739-3 751
- Cheng K J, Lee S S, et al. Industrial applications of rumen microbes. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 1999,12(1):84-89
- Loir Y L, Azevedo V, Sergio O C, et al. Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. Microbial Cell Factories, 2005(4):2
- De Vos W M. Gene expression systems for lactic acid bacteria. Current Opinion in Microbiology, 1999,2(3):289-295
- Liu J, Yu B, Lin S, et al. Direct cloning of a xylanase gene from the mixed genomic DNA of rumen fungi and its expression in intestinal *Lactobacillus reuteri*. FEMS Microbiology Letters, 2005, 251:233-241 (编辑:张学智, mengzai007@163.com)