

# 基于人工消化液与密闭消化器的酶法测定豆粕鸭代谢能值的研究

赵 峰, 赵江涛, 张宏福

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193)

**摘 要:** 本试验旨在通过探讨基于人工消化液与密闭消化器的酶法条件下酶法与排空强饲法的测试精度及测定豆粕鸭代谢能值的差异, 为鸭饲料养分生物学效价酶学评定方法的设计提供参考。酶法与排空强饲法测试精度的比较研究采用完全随机设计, 其中酶法每个消化阶段设 5 个重复, 每个重复 1 个样品, 排空强饲法设 4 个重复测定, 每个重复 3 只试验鸭, 比较两方法间重复测定的极差、相对标准差偏差。酶法与排空强饲法测定豆粕鸭代谢能值的比较研究中, 采用配对设计, 对 25 个豆粕样品的酶水解物能值与排空强饲代谢能作系统比较。结果表明, 鸭排空强饲法重复测定的日粮干物质消化率极差为 2.89%, 相对偏差为 1.57%, 代谢能值极差为  $0.36 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 相对标准偏差为 1.13%。酶法重复测定的日粮干物质消化率极差和相对标准偏差分别为 1.57% 和 1.13%, 其测试的精度可以达到鸭排空强饲法类似的测试精度。25 个豆粕样品的鸭排空强饲法真代谢能(TME)平均值、酶水解物能值平均值分别为 13.33 和 13.55  $\text{MJ} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$ , 两平均值间无显著性差异( $P > 0.05$ )。在考虑到允许误差的前提下, 本试验所用酶法准确估测豆粕鸭代谢能值的概率为 68% ( $n=25$ , 差值为  $0.85 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$  以内)。

**关键词:** 豆粕; 代谢能; 酶法; 鸭

中图分类号: S834.81; S816.32

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)07-0946-09

## Study on the Metabolizable Energy of Soybean Meal in Duck Determined Using Enzymatical Method Based on Simulative Digestive Juice and Sealed Digestive Apparatus

ZHAO Feng, ZHAO Jiang-tao, ZHANG Hong-fu

(State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** The comparison of analytical precision between enzymatical and emptying-force feeding methods, and the difference of metabolizable energy of soybean meal in duck determined by using the two methods were investigated to study the feasibility of enzymatical method used for determination of nutrient digestibility in duck feedstuff. In the comparison experiment of analytical precision between enzymatical and emptying-force feeding methods, a completely randomized design was adapted. There were five replicates with one simulative digestion per replicate at each digestion stage of enzymatical method, and four replicates with three ducks per replicate in emptying-force feeding method. The range and relative standard deviation of these two method were calculated. In the comparison experiment of metabolizable energy of soybean meal determined using the two methods, the paired design was adapted to compare the difference of enzymatical hydrolyzed gross energy and metabolizable energy of 25 soybean meal. The results showed that the range and relative standard deviation of dietary dry matter digestibility and metabolizable energy

收稿日期: 2010-05-07

基金项目: 科技部创新方法工作专项(2009IM033100); 基本科研业务费专项(2010jc-3-3)

作者简介: 赵 峰(1977-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事饲料养分生物学效价评定的研究, Tel: 010-62816013, E-mail: zsummit@iascaas.net.cn

determined using emptying-force feeding method were 2.89% and 1.57%, 0.36 MJ · kg<sup>-1</sup> and 1.13%, respectively. The range and relative standard deviation of dietary dry matter digestibility measured using enzymatical method were 1.57% and 1.13%, which meant the precision of enzymatical method was similar to emptying-force feeding method. The mean of true metabolizable energy and enzymatical hydrolyzed gross energy of 25 soybean meal were 13.33 and 13.55 MJ · kg<sup>-1</sup> DM ( $P > 0.05$ ), respectively. Taking the permitted error into account, the probability for accurately predicting the metabolizable energy of soybean meal in duck was about 68% using enzymatical method.

**Key words:** soybean meal; metabolizable energy; enzymatical method; duck

目前,国际上通常采用动物平衡试验的方法获得畜禽饲料的有效能值。然而,动物试验法耗时、费资,难以满足现代畜牧业生产对饲料原料有效能值快速获取的实际需求。因此,建立准确、快速测定饲料有效能值的方法一直是动物营养学界研究的关键技术之一。自二十世纪 50 年代以来,人们在通过某些化学成分或某种物理手段获得的信息估测饲料的有效能值上进行了许多有益尝试,特别是通过模拟饲料养分在动物体内的消化程度以实现饲料有效能值的估测已逐渐被丹麦、荷兰、法国等发达国家所认同,并成为其新型畜禽饲养标准的核心技术<sup>[1-2]</sup>。然而,传统的模拟消化技术在小肠消化阶段都是以猪小肠液或猪胰液素为酶源<sup>[3-4]</sup>,模拟消化液的制备仅以满足饲料在短时间内完全水解为人为准则,多脱离动物体内消化液组成的基础参数。该思路使得模拟消化液在组成上难以重复与标准化。在家禽饲料的模拟消化中,试剂级猪源性胰液素在各种消化酶活性的组成模式上与鸡、鸭内源肠液的组成相差较大。以纯化单一试剂级消化酶为基础,根据消化酶活性等效的原则制备禽用模拟消化液可能是科学地解决酶法测定中模拟消化液的重复性与标准化的有效手段。

在动物营养学国家重点实验室前期的研究中,通过禽用肠道套管技术已获得了大量鸭小肠液的组成参数<sup>[5-8]</sup>,为了检验以单一试剂级消化酶为基础制备鸭模拟消化液是否可行,本试验以豆粕为代表性饲料,探讨该模拟消化液制备条件下豆粕的酶水解物总能值与鸭真代谢能值的差异,为创新酶法测定鸭饲料代谢能的方法提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及其管理

采用单因素完全随机设计,选择健康、体质量基

本一致的成年北京公鸭 108 只,随机分成 9 组,每组 4 个重复,每个重复 3 只鸭。共进行 12 期代谢试验,第 1、4、7、10、13 期代谢试验选用 1~3 组试验鸭,第 2、5、8、11 期代谢试验选用 4~6 组试验鸭,第 3、6、9、12 期代谢试验选用 7~9 组试验鸭。每期代谢试验所选用的 3 组试验鸭中,随机选择 2 组用于 2 种试验日粮代谢能的测定,另一组用于内源性粪尿能的测定。代谢试验中,鸭饲养于代谢笼中,适应期试验鸭的饲养管理按动物营养学国家重点实验室常规程序进行。代谢能的测定中,试验鸭的管理按 Sibbald 法<sup>[9]</sup>测定操作规程进行。代谢室的温度维持在 21~27 °C,自然光照。每组试验鸭完成一个代谢试验周期后进入 14 d 的恢复期,实行平养。

### 1.2 豆粕样品及试验日粮

目前,我国大豆榨油过程中生产的豆粕多来自于先去皮后浸提的工艺。实际进入饲料原料市场的豆粕是根据生产者对蛋白质含量的需要将去皮过程中产生的豆皮按 0~8% 的水平添加到去皮豆粕中,形成蛋白质含量在 43%~48% 不等的豆粕产品。为保证本试验所用豆粕样品的代表性,从河北、江苏、山东等 5 家豆粕生产厂家采集不同批次的豆粕样品 12 个及相应品种批次的大豆皮 5 个,根据去皮豆粕与豆皮的 CP、CF、ASH 等参数,在去皮豆粕中加入 0~8% 的豆皮,随机组合出 50 个豆粕样品。并从 50 个豆粕中随机选取 25 个豆粕,最终形成豆粕饲料实体系统中一级豆粕样品 8 个,二级豆粕 9 个,三级豆粕样品 8 个(GB/T 19541-2004)<sup>[10]</sup>。

25 种试验日粮由豆粕和玉米淀粉按 40% : 60% 混合而成。玉米淀粉来源于玉米的加工产物(北京红星淀粉厂提供),粗蛋白质含量为 0.44% DM。每种日粮制备 4.5 kg 用于代谢试验。在制备

过程中,所有原料按各试验日粮质量要求分别称量,并放入小塑料桶中,混合后粉碎过 1 mm 筛。粉碎好的试验日粮经多次手工混合后,加入适量的水,冷

制粒成直径 3 mm,长度 6 mm 的颗粒料,待试验日粮风干至干物质含量在 88% 以上时,置于自封袋中保存备用。

表 1 豆粕组成及概略养分(干物质基础)

Table 1 Composition and proximate nutrients of soybean meal(DM, %)

豆粕样品 Soybean meal	原料 Ingredient			概略养分 Proximate nutrient		
	豆皮 Hull	豆粕 Soybean meal	粗蛋白 CP	中性洗涤纤维 NDF	酸性洗涤纤维 ADF	总能/(MJ·kg <sup>-1</sup> ) GE
1	-	100.00	50.20	11.27	7.28	19.58
2	-	100.00	53.34	10.43	6.48	19.59
3	-	100.00	54.14	9.51	5.16	19.65
4	2.01	97.99	52.65	10.37	6.43	19.58
5	4.02	95.98	52.09	11.42	7.59	19.48
6	6.03	93.97	51.04	12.90	8.32	19.56
7	8.04	91.96	49.92	13.73	9.59	19.33
8	-	100.00	51.76	14.10	9.68	19.65
9	-	100.00	53.59	11.73	8.05	19.72
10	2.05	97.95	52.97	13.48	8.95	19.73
11	-	100.00	49.76	12.10	7.40	19.59
12	-	100.00	52.72	9.93	5.88	19.97
13	2.05	97.95	52.21	11.20	6.93	19.89
14	4.10	95.90	51.69	12.57	7.70	19.92
15	6.15	93.85	50.43	14.25	8.70	19.86
16	8.20	91.80	49.93	14.94	9.64	19.73
17	-	100.00	50.79	15.74	10.23	19.55
18	-	100.00	53.54	12.68	8.08	19.57
19	-	100.00	56.70	7.13	5.03	19.81
20	2.05	97.95	55.01	9.20	5.95	19.81
21	4.09	95.91	54.66	10.01	6.79	19.66
22	6.14	93.86	54.15	11.82	7.96	19.61
23	8.18	91.82	53.08	12.90	9.20	19.55
24	-	100.00	50.54	15.22	10.16	19.41
25	-	100.00	54.18	10.66	6.96	19.73

酶水解法各阶段测试精度检验所用试验日粮样品如表 2 所示。

### 1.3 代谢试验过程

鸭饲料代谢试验过程是在 Sibbald<sup>[9]</sup> TME 法的

基础上,根据鸡、鸭的消化生理学差异进行了部分修改<sup>[11]</sup>,其具体过程包括:适应期 72 h,饲喂玉米-豆粕型日粮;预试期 24 h,饲喂待测日粮;禁饲排空 36 h 后强饲待测日粮 60 g,排泄物收集 36 h。排泄物的收

集技术参照 Adeola 等<sup>[12]</sup> 设计方案进行,待每只试验鸭完成了 36 h 的收集期后,将全部粪样转入 65 ℃ 烘箱中鼓风干燥。烘干样在天平室回潮 24 h 后称重,

粉碎过 40 目筛制成风干样品。饲料及粪样的总能用美国 Parr1281 氧弹计测定,常规成分按 AOAC<sup>[13]</sup> 的方法测定,所有养分含量都以干物质为基础表示。

表 2 典型日粮的组成及营养水平(干物质基础)

Table 2 The compositions and nutrient levels of typical diet (DM, %)

组成 Composition	含量 Content	营养水平 Nutrient levels <sup>2)</sup>	含量 Content
玉米 Corn	71.65	粗蛋白质 Crude protein	17.71
豆粕 Soybean meal	23.37	粗脂肪 Ether extract	4.98
豆油 Soybean oil	1.42	粗纤维 Crude fiber	2.13
食盐 NaCl	0.30	钙 Calcium	0.90
石粉 Limestone	1.23	总磷 Total phosphorus	0.60
磷酸氢钙 Dicalcium phosphate	1.70		
蛋氨酸 DL-methionine	0.07		
赖氨酸 L-Lysine	0.04		
复合多维/(mg·kg <sup>-1</sup> ) Vitamines <sup>1)</sup>	1 607		
微量元素/(mg·kg <sup>-1</sup> ) Minerals	652		
合计 Total	100		

<sup>1)</sup> 每千克日粮中含有:VA 2 500 IU;VD<sub>3</sub> 400 IU;VE 10 IU;VK<sub>3</sub> 0.5 mg;VB<sub>1</sub> 1.8 mg;VB<sub>2</sub> 4.0 mg;VB<sub>6</sub> 3.0 mg;VB<sub>12</sub> 7.0 μg;泛酸 11.0 mg;烟酸 55.0 mg;叶酸 0.5 mg;生物素 0.12 mg;氯化胆碱 750 mg;Cu 8.0 mg;Fe 80.0 mg;Zn 40.0 mg;Mn 60.0 mg;Se 0.15 mg;I 0.35 mg。<sup>2)</sup> 表中钙、磷含量为计算值,其他营养指标为实测值

<sup>1)</sup> Per kg diet supplies: VA 2 500 IU;VD<sub>3</sub> 400 IU;VE 10 IU;VK<sub>3</sub> 0.5 mg;VB<sub>1</sub> 1.8 mg;VB<sub>2</sub> 4.0 mg;VB<sub>6</sub> 3.0 mg;VB<sub>12</sub> 7.0 μg;Pantothenic acid 11.0 mg;Nicotinic acid 55.0 mg;Folic acid 0.5 mg;Biotin 0.12 mg;Choline chloride 750 mg;Cu 8.0 mg;Fe 80.0 mg;Zn 40.0 mg;Mn 60.0 mg;Se 0.15 mg;I 0.35 mg。<sup>2)</sup> The contents of calcium and total phosphorus are calculated values, while the other nutrient contents are determined values

#### 1.4 基于人工消化液和密闭消化器的酶水解操作规程

酶法测定鸭饲料代谢能值的操作规程按照赵江涛<sup>[14]</sup>方法进行,具体步骤为:

胃消化期水解操作规程:称取 0.500 0 g 待测饲料样品 2 份,分别置于 2 个 100 mL 三角瓶中。每个样中加入 10 mL 1 418.26 U·mL<sup>-1</sup> 的胃蛋白酶-盐酸溶液(盐酸浓度为 0.075 mol·L<sup>-1</sup>,无水碳酸钠标定;氯霉素含量为 0.25 g·L<sup>-1</sup>)。将三角瓶置于恒温水浴摇床中,震荡频率为 80 r·min<sup>-1</sup>,待温度达到 38 ℃ 时开始计时 3 h。

人工鸭十二指肠液水解操作规程:胃蛋白酶消化完成后,每个三角瓶中加入 0.75 mL 的 NaOH 溶液中和,再加入 5 mL 人工鸭十二指肠液(淀粉酶活性为 1 278.58 U·mL<sup>-1</sup>,0.7 mol·L<sup>-1</sup> pH 6.85 Tris-HCl 缓冲液)。继续在 38 ℃、80 r·min<sup>-1</sup> 条件下振荡 10 h。

人工鸭空肠液水解操作规程:待人工鸭十二指肠液消化完成后,每个三角瓶中加入 5 mL 人工鸭

空肠液(脂肪酶 4.4 U·mL<sup>-1</sup>、胰蛋白酶 348.88 U·mL<sup>-1</sup>、糜蛋白酶 167.68 U·mL<sup>-1</sup>,pH 8.6 0.8 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液)。继续在 38 ℃、80 r·min<sup>-1</sup> 条件下振荡 10 h。

离体消化结束后,将三角瓶中的已消化和未消化的产物无损失地转入 50 mL 的玻璃离心管中,1 250 g 的重力下离心 5 min,弃去大部分上清液;再向离心管中加入 30 mL 去离子水冲洗残渣,再次离心弃去上清液,重复上述操作 3 次后将离心管放入冷冻干燥器中干燥,最后将样品转入烘箱中,105 ℃ 烘至恒重。

#### 1.5 数据处理与统计分析

差量法计算豆粕鸭代谢能值(干物质基础)的公式:

$$ME_{Soy} = (ME_{Diet} - ME_{BD} \times C_1) / C_2$$

式中, $ME_{Soy}$  为差量法计算出的待测豆粕的代谢能值, $ME_{Diet}$  为试验日粮的代谢能值, $ME_{BD}$  为基础日粮的代谢能值, $C_1$  为试验日粮中基础日粮的含量, $C_2$  为试验日粮中待测豆粕的含量。

酶法干物质消化率和酶法消化能值计算公式:

酶法干物质消化率

$$(EMDMD) = \frac{F \times DM_F \% - R}{F \times DM_F \%} \times 100\%$$

酶水解物总能值

$$(EHGE) = \frac{F \times DM_F \% \times GE_F - R \times GE_R}{F \times DM_F \%}$$

式中： $F$ 为饲料样品质量(g)， $DM_F\%$ 为饲料干物质含量(%)， $R$ 为消化后残渣的绝干质量(g)， $GE_F$ 为饲料能值(kJ·g<sup>-1</sup>DM)， $GE_R$ 为水解残渣能值(kJ·g<sup>-1</sup>DM)。

利用 SAS9.0 REG<sup>[15]</sup>模块进行线性回归分析，数学模型：

$$y_i = a + bx_i + \epsilon_i$$

式中， $y$  排空强饲法真代谢能值(TME)， $x$  为酶水解物总能值(EHGE)。

利用 SAS9.0 TTEST<sup>[15]</sup>模块，对酶水解物总能值与排空强饲法真代谢能值进行配对  $t$  检验，统计模型为：

$$t = \frac{\frac{1}{n} \sum d_i}{\sqrt{\frac{\frac{1}{n-1} \sum (d_i - \bar{d})^2}{n}}}$$

式中， $d$ 为酶水解物总能值与排空强饲法真代谢能值之差， $n$ 为样本量。

## 2 结果

### 2.1 排空强饲法测定淀粉-豆粕试验日粮干物质真消化率及真代谢能值的变异

从试验日粮4个重复测定(每个重复为3只试验鸭)的变异分析(表3)，鸭排空强饲法的测试精度：3种试验日粮的干物质真消化率分别为78.40%、78.29%和80.04%，重复观测值内的极差分别为2.05%、2.80%和3.82%，相对标准偏差分别为1.15%、1.57%和2.00%。3种试验日粮真代谢能值分别为14.96、14.98和15.35 MJ·kg<sup>-1</sup>，重复观测值内的极差分别为0.31、0.33和0.45 MJ·kg<sup>-1</sup>，相对标准偏差分别为0.95%、1.05%和1.40%。综合上述数据分析，本试验条件下，鸭排空强饲法测定日粮干物质消化率及代谢能值时，重复测定的干物质消化率极差为2.89%，相对标准偏差为1.57%，代谢能值的极差为0.36 MJ·kg<sup>-1</sup>，相对标准偏差为1.13%。

表3 排空强饲法测定淀粉-豆粕型试验日粮干物质真消化率及真代谢能值的精度

Table 3 The precision of true digestibility of dry matter and true metabolizable energy in emptying-force feeding method using starch-soybean meal diet

淀粉-豆粕日粮 Starch-soybean meal diet	重复号 Repetition	干物质真消化率/% True digestibility of dry matter				真代谢能值/(MJ·kg <sup>-1</sup> ) True metabolizable energy			
		实测值 Determined value	平均值 Mean	极差 Range	相对标准 偏差 RSD	实测值 Determined value	平均值 Mean	极差/% Range	相对标准 偏差/% RSD
日粮1 Diet1	1	78.13				15.06			
	2	77.67				14.78			
	3	79.72	78.40	2.05	1.15	15.09	14.96	0.31	0.95
	4	78.10				14.93			
日粮2 Diet2	1	79.89				15.14			
	2	78.57				15.08			
	3	77.09	78.29	2.80	1.57	14.88	14.98	0.33	1.05
	4	77.63				14.81			
日粮3 Diet3	1	78.22				15.21			
	2	82.04				15.58			
	3	79.52	80.04	3.82	2.00	15.13	15.35	0.45	1.40
	4	80.40				15.48			

## 2.2 酶水解法各消化阶段的测试精度

从玉米-豆粕型日粮酶水解法各消化阶段干物质消化率的测试变异看(表 4),5 个重复观测内胃、十二指肠、空肠各消化期日粮干物质的平均消化率分别为 27.58%、71.63% 和 73.03%,极差分别为 0.64%、2.23% 和 1.83%;相对标准偏差分别为

1.06%、1.43% 和 0.91%。综合上述结果,本试验条件下,酶法测定鸭日粮干物质消化率时,重复内的干物质消化率极差和相对标准偏差分别为 1.57% 和 1.13%,其测试的精度可以达到鸭排空强饲法类似的测试精度。

表 4 玉米-豆粕型日粮酶法各消化阶段的测试精度

Table 4 The precision of three-step digestion in enzymatical method using corn-soybean meal diet

消化阶段 Simulative digestion stage	重复号 Repetition	干物质消化率/% Dry matter digestibility			
		实测值 Determined value	平均值 Mean	极差 Range	相对标准偏差 RSD
胃消化期 Stomach	1	27.31			
	2	27.26			
	3	27.83	27.58	0.64	1.06
	4	27.62			
	5	27.90			
十二指肠消化期 Duodenum	1	72.32			
	2	70.29			
	3	缺失	71.63	2.23	1.43
	4	72.53			
	5	71.39			
空肠消化期 Jejunum	1	74.04			
	2	72.87			
	3	72.84	73.03	1.83	0.91
	4	72.21			
	5	73.19%			

## 2.3 酶水解物总能值与排空强饲法代谢能值的比较

对排空强饲法 TME 值与酶水解物总能值进行配对 *t* 检验(表 5),结果表明,25 个样品的 TME 平均值、EHGE 平均值分别为 13.33 和 13.55 MJ · kg<sup>-1</sup> DM,两平均值间无显著性差异( $P > 0.05$ )。进一步对 25 个豆粕样品的 EHGE 值相对于排空强饲法 TME 值的偏差进行分析表明,17 个样品的偏差在 0~7.5% (占总样品数的 68%, 差值在 0.85

MJ · kg<sup>-1</sup> DM 以内),7 个样品的偏差在 7.5% 以上(占总样品数的 32%, 差值在 1.05~1.65 MJ · kg<sup>-1</sup> DM)。鉴于排空强饲法测定家禽日粮代谢能值的允许误差可以达到 3% 以内,通过差量法测定蛋白质饲料原料的代谢能值因待测饲料的含量约占试验日粮的 40%,而使差量法的允许误差在 7.5% 以内,故可认为本研究中酶法准确估测豆粕代谢能值的概率约为 68%。

表 5 豆粕酶水解物总能值 (EHGH) 与排空强饲法真代谢能值 (TME) 的比较

Table 5 Comparison of the true metabolizable energy by emptying-force feeding method and enzymatical hydrolyzed gross energy

豆粕 Soybean meal	TME/(MJ · kg <sup>-1</sup> )	EHGE/ (MJ · kg <sup>-1</sup> )	差值 Difference	估计偏差/% Estimation bias
1	13.74	14.13	-0.39	2.84
2	13.77	13.39	-0.38	2.76
3	14.38	14.16	0.22	1.53
4	13.71	13.92	-0.21	1.53
5	14.52	13.15	1.37	9.44
6	14.28	12.94	1.34	9.38
7	15.13	13.48	1.65	10.91
8	13.23	13.39	-0.16	1.21
9	13.68	13.93	-0.25	1.83
10	11.97	13.48	-1.51	12.61
11	13.69	13.36	0.33	2.41
12	14.07	14.02	0.05	0.36
13	13.70	13.62	0.08	0.58
14	12.69	12.90	-0.21	1.65
15	12.21	13.26	-1.05	8.60
16	11.95	12.50	-0.55	4.60
17	13.03	12.53	0.50	3.84
18	13.37	13.21	0.16	1.20
19	13.32	14.51	-1.19	8.93
20	12.83	14.47	-1.64	12.78
21	13.32	14.17	-0.85	6.38
22	12.35	13.77	-1.42	11.50
23	12.90	13.41	-0.51	3.95
24	12.44	13.15	-0.71	5.71
25	13.08	13.93	-0.85	6.50
统计量 Statistics				
平均值 Mean	13.33	13.55		
标准误 SEM	0.16	0.11		
极差 Range	3.18	2.01		
变异系数/% CV	6.10	4.02		
<i>t</i> 值	$t = -1.11, P = 0.2738$			
线性回归 Linear regression	$TME = 8.72 + 0.34 \times EHGE (R^2 = 0.0521, RSD = 0.81, P = 0.27)$			

差值 = TME-EHGE; 估测偏差 = | TME-EHGE | / TME

### 3 讨 论

#### 3.1 基于人工消化液和密闭消化器条件下酶水解法测值的影响因素

在以三角瓶作为密闭消化器的条件下,酶促反应的温度、混合频率与时长、饲料样品的粒度与酶样比、模拟消化液的组成都是影响酶水解法测值与变异的关键因素<sup>[16]</sup>,且在现有的酶水解法中这部分参数的设置具有较大的人为随意性。本试验条件下,这些因素都已设置成固定值,模拟消化液的活性也相对可重复,因此,本酶水解法的测值主要与酶促反应中三角瓶内饲料样品完全浸泡于酶液中的实际质量及酶水解物与未水解物的分离方法有关。在以三角瓶作为密闭消化器的情况下,通常是将 20~50 mL 消化液置于 100 mL 三角瓶中,在水浴摇床回旋混合时总有部分饲料样品粘贴于三角瓶瓶壁而难以与消化液充分接触,特别是麸皮、高粱等含种皮较多的饲料更为明显。尽管因缓冲液蒸发冷却可沿三角瓶壁冲洗部分贴壁的饲料样品,但不同三角瓶间贴壁残留的样品仍有一定差异。然而,该因素对测试结果的影响程度需要设计专门的试验进一步研究。在酶水解物与未水解物的分离上,通常采用过滤分离的方法<sup>[3,5,17]</sup>。在本实验室前期研究中发现无论是国产定量分析滤纸(浙江新华)还是进口滤纸(Whatman 531)经过布氏漏斗抽滤后滤纸自身有质量损失,且不同滤纸间重量的变化也相差较大。在称量过程中,滤纸很易吸收空气中的水分,只有将滤纸包置于密封性好的瓶称量才可尽量降低因滤纸吸潮引起的称量误差。从 Clunies 等<sup>[18]</sup>胃蛋白酶-猪小肠液酶水解法的精度看,过滤法引起胃消化期、小肠消化期的相对标准差分别高达 4.86%和 6.63%,且其相对标准差具有较大的变异性。本试验方法采用离心-清洗-离心(循环 3 次)-冻干-绝干的方法分离酶水解物与未水解物,将重复测定的相对标准差控制在 1.5%以内,测试精度可以达到生物学试验的精度要求。从各阶段干物质消化率的变异看,胃消化期、十二指肠消化期、空肠消化期的相对标准差分别为 1.06%、1.43%和 0.91%,这也表明本试验方法中,酶水解物与未水解物分离方法引起的误差是比较稳定的。

#### 3.2 酶水解物总能值与排空强饲法代谢能值间的关系

酶法测值与生物学法实测值存在一定的差异是

用酶法评定畜禽饲料生物学效价的一种常见现象。由于当前的家禽饲养标准都是基于生物学法代谢能参数,根据饲料的酶水解物(干物质消化率或酶水解物能值)与生物学法有效能值间的回归关系估测待测饲料的代谢能是大多数酶法研究工作的目标。在酶法估测饲料代谢能值的建模中,首先在初步确定统计学原理上成立的回归方程,然后根据畜禽营养学原理,淘汰那些显然违反常识的回归方程。经过这两次原则性的筛选之后将剩下的回归方程再与实际经验数字或实测的生物学效价进一步比较后得出的与一定的规范化操作条件相匹配的数学模型<sup>[19]</sup>。根据上述建模原则可以推断定标饲料实体系统的设计将直接关系到酶法测值与生物学法测值间的数学模型,并对估测的有效范围及精度起决定性作用。根据 Cone 等<sup>[20]</sup>的试验结果发现,定标小麦实体系统( $n=5$ )的蛋白质消化率跨度较大(44%~89.5%)可获得酶法与生物学法间较好的直线模型( $R^2=0.93$ ),而定标豌豆实体系统( $n=14$ )的蛋白质消化率跨度小(65%~77%)则酶法与生物学法的相关性很低( $R^2=0.04$ )。从 Boisen 等<sup>[5]</sup>,Regmi 等<sup>[17]</sup>的研究结果也证实了定标饲料实体系统有效能值的变异范围对建模的影响。由此可见,由于生物学法或酶法本身的测试精度相对固定,若定标饲料实体系统的代谢能值变异较少,则会出现模型中生物学法与酶法自身的测试精度引起的误差平方和占变异总平方和的比例增大,从而直接影响酶法与生物学法的相关关系。本研究中,豆粕的酶水解物总能值与真代谢能值间无显著的相关关系(表 5),这可能是由于以下三个方面的原因:(1)本试验条件下,25 个豆粕样品的能量真消化率在 61.07%~79.51%,其中 68%的样品能量真消化率在 63.45%~73.89%,定标饲料实体系统较窄的代谢能值变异范围导致了酶法与排空强饲法间的相关性较低。(2)在豆粕鸭代谢能值的测定中,排空强饲法套算测定真代谢能值时重复间的最大偏差在 7.5%以上,而本试验条件下酶水解物重复测定的最大偏差在 2%以内,2 个分析精度相差较大的指标间可能难以从统计上求出其相关性。(3)本试验中也不排除该酶水解法可能将豆粕中某些可消化成分视为不可消化成分,如不溶性非淀粉多糖等。然而,通过配对  $t$  检验发现,25 个豆粕样品的酶法平均值与排空强饲法间无统计显著性差异( $P>0.05$ ),这表明酶水解物总能值与鸭真代谢能值的差值符合随机正态分布。从酶



法与排空强饲法一一对应的绝对差值看,如果考虑到允许误差,则本试验所用酶法准确估测豆粕鸭代谢能值的概率为 68% ( $n=25$ , 差值为  $0.85 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$  以内),其估测的准确性比 Valdes 和 Lesson<sup>[21]</sup> 报道用胃蛋白酶-胰液素法准确测定鸡日粮代谢能值的概率为 60.6% ( $n=71$ , 差值为  $0.74 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$  以内)有明显的改善。

## 4 结 论

**4.1** 本试验条件下,酶法重复测定的干物质消化率极差和相对标准偏差分别为 1.57% 和 1.13%,其测试的精度可以达到鸭排空强饲法类似的测试精度。

**4.2** 25 个豆粕样品的 TME 平均值、酶水解物能值平均值分别为 13.33 和  $13.55 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DM}$ ,两平均值间无显著性差异 ( $P>0.05$ )。在考虑到允许误差的前提下,本试验所用酶法准确估测豆粕鸭代谢能值的概率为 68% ( $n=25$ , 差值为  $0.85 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$  以内)。

### 参考文献:

[1] BOISEN S. A new concept for practical feed evaluation systems [A]. DJF animal science report No. 79. 2007.

[2] SAUVANT D, PEREZ J M, TRAN G. Table of composition and nutritional value of feed materials [M]. Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2004.

[3] FURUYA S, SAKAMOTO K, TAKAHASHI S. A new *in vitro* method for the estimation of digestibility using the instinal fluid of the pig [J]. *Br J Nutr*, 1979, 41: 511-520.

[4] 卢福庄, 张子仪, 何 廷. 鸡饲料代谢能离体测定方法的研究[J]. 中国畜牧杂志, 1986, 6: 8-11.

[5] BOISEN S, FERNANDEZ J A. Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by *in vitro* analyses [J]. *Anim Feed Sci Tech*, 1997, 68: 277-286.

[6] 赵 峰, 张子仪, 侯水生. 鸭空肠食糜连续采集方法及其空肠套管的设计[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37 (7): 672-675.

[7] 赵 峰, 张宏福, 张子仪 等. 日粮营养水平对鸭空肠液组成的影响 [C]//中国畜牧兽医学学会 2008 年学术年会论文集, 2008: 89-93.

[8] 郑卫宽, 赵 峰, 张宏福. 日粮类型及肠液储存条件对鸭空肠液组成与特性的影响 [J]. 动物营养学报, 2009, 21(5): 652-658.

[9] SIBBALD I R. A bioassay for true metabolizable energy in feedingstuffs [J]. *Poult Sci*, 1976, 55: 303-308.

[10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会发布. 饲料用大豆粕 [GB]. 中华人民共和国国家标准 GB/T 19541-2004. 2004.

[11] 樊红平. 鸡鸭对饲料养分消化作用的比较研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2003: 55-61.

[12] ADEOLA O, RAGLAND D, KING D. Feeding and excreta collection techniques in metabolizable energy assays for ducks [J]. *Poult Sci*, 1997, 76: 728-732.

[13] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis [M]. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 1990.

[14] 赵江涛. 豆粕鸭代谢能值的酶学评定方法研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2008: 16-25.

[15] SAS INSTITUTE. SAS/STAT User's guide; Statistics [M]. SAS Institute Inc., Cary, NC, 2004.

[16] BOISEN S, EGGUM B O. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals [J]. *Nutr Res Rev*, 1991, 4: 141-162.

[17] REGMI P R, FERGUSON N S, ZIJLSTRA R T. *In vitro* digestibility techniques to predict apparent total tract energy digestibility [J]. *J Anim Sci*, 2009, 87: 3620-3629.

[18] CLUNIES M, LEESON S, SUMMERS J D. *In vitro* estimation of apparent metabolizable energy [J]. *Poult Sci*, 1984, 63: 1033-1039.

[19] 张子仪, 吴克谦, 吴同礼, 等. 应用回归分析评定鸡饲料表现代谢能值的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 1981, 12: 223-229.

[20] CONE J W, VAN DER POEL A F B. Prediction of apparent ileal protein digestibility in pigs with a two-step *in vitro* method [J]. *J Sci Food and Agric*, 1993, 62: 393-400.

[21] VALDES E V, LEESON S. Measurement of metabolizable energy in poultry feeds by an *in vitro* system [J]. *Poult Sci*, 1992, 71: 1493-1503.