

纤维酶-胃蛋白酶法评定青粗饲料蛋白质降解率的研究

颜品勋* 冯仰廉 莫放 杨雅芳

(中国农业大学动物科技学院,北京 100094)

摘要: 用纤维素酶-胃蛋白酶法测定了苜蓿干草、红三叶草、豆腐渣、啤酒糟、高粱青贮、羊草、雀麦草、羊茅的蛋白质降解率(%)分别为 88.28, 78.83, 79.11, 75.87, 74.26, 59.37, 82.16和 84.90。与瘤胃尼龙袋法测定值(Y)的回归关系为 $Y = -34.27 + 1.29X$ ($r = 0.72$, $P < 0.05$)。纤维素酶-胃蛋白酶法的培养条件为:40℃水浴培养,纤维素酶最适酶量为 75 mg(pH 4.5, 柠檬酸盐缓冲液),胃蛋白酶用量为 160 IU(pH1.4的 KCl-HCl 缓冲液)。

关键词: 纤维酶-胃蛋白酶法; 蛋白质降解率; 青粗饲料

中图分类号: S816

瘤胃尼龙袋法已广泛应用以测定饲料的蛋白质和有机物的降解率,但因该方法需要饲养管动物,费用较高。为了寻求能在一般实验室条件下即可完成的体外评定饲料蛋白质降解率的方法国内外做了大量的研究。酶解法是用酶溶液代替瘤胃液对饲料营养价值进行评定的一种体外法,酶解法比体外发酵法简便、准确、重复性好,用酶解法评定反刍家畜饲料蛋白质降解率的研究起步晚,国外研究多用单一蛋白质酶处理法。但由于饲料种类较多,很难找到一种采用某一种蛋白酶便能反映出其蛋白质降解特征的处理方法,故有些研究者采用纤维素酶-胃蛋白酶法。本研究的目的是研究纤维素酶-胃蛋白酶法评定青粗饲料蛋白质降解率,以寻求一种适宜我国国情的评定青粗饲料瘤胃蛋白质降解率的方法。

1 材料与方 法

1.1 材料 纤维素酶:上海东风生化技术公司生产,标准活性为 1:1 500 滤纸酶活/g。商品酶:胃蛋白酶,北京生化制药厂生产,活性为 1:5 300。缓冲液:0.05 mol·L⁻¹柠檬酸三钠-柠檬酸缓冲液,pH4.5; 0.05 mol·L⁻¹HCl-KCl 缓冲液,pH1.4。

所测的饲料为苜蓿干草、红三叶草、豆腐渣、啤酒糟、高粱青贮、羊草、雀麦草、羊茅。瘤胃尼龙袋法测定蛋白质降解率见表 3(尼龙袋的方法见《奶牛饲养标准及典型日粮配方》^[1],上述样品均经 1.0 mm 筛孔的粉碎机粉碎。

1.2 实验方 法

1.2.1 纤维素酶最适酶量的选择 分别称取 0.3 g 苜蓿干草和羊草于培养管中,各加入含不同纤维素酶量(10,30,50,75,100,140,180 mg)的柠檬酸盐缓冲液 30 mL,在 40℃下培养 24 h 测定有机物降解率,确定最适酶量。

1.2.2 胃蛋白酶最适酶量的选择 分别称取 0.5 g 苜蓿干草和羊草于培养管中,先按 1.2.1 的步骤处理(其中纤维素酶用量为最适酶量),再各加入含不同胃蛋白酶活性单位(80,120,

收稿日期: 1995-06-20

*现工作单位为中国饲料集团公司,100801

160,210 IU)的 KCl-HCl 缓冲液,在 40℃的恒温水浴摇床上培养 24 h,过滤,多次冲洗残留物,凯氏定氮法测定残留物的蛋白质含量,从而计算饲料蛋白质降解率,确定该纤维素酶-胃蛋白酶法中胃蛋白酶的最适用量。

1.2.3 用纤维素酶-胃蛋白酶法测定不同青粗饲料蛋白质降解率 根据所测的最适酶量和纤维素酶-胃蛋白酶法的测定程序,分别测定 8 种饲料用纤维素酶处理后,胃蛋白酶法各时间点(3,7,12,24,36,48)的蛋白质降解率,利用动态模型 $dP=a+b(1-e^{-ct})$ (a 为快速降解部分, b 为慢速降解部分, c 为 b 降解速率, $P=a+(bc) \div (c+K)$, K 为饲料的外流速度)来描述酶法评定的蛋白质降解规律,并与尼龙袋法结果作比较分析,以检验该法的可行性。

2 结果与讨论

2.1 纤维素酶最适酶量的选择

表 1 表明在 40℃温度, pH4.5 条件下,饲料有机物降解率随纤维素酶量的增大而增大,当酶量为 75 mg 时有机物降解率达至最大值,随后又开始下

降,为了让饲料中的纤维成分能充分分解,便于蛋白酶的作用,确定纤维素酶的最适用量为 75 mg。

2.2 胃蛋白酶最适酶量的选择

饲料经纤维素酶处理后,蛋白质降解率在胃蛋白酶为 160 IU 最大值。160 IU 可定为纤维素酶-胃蛋白酶法酶法中胃蛋白酶的最适用量(表 2)。

2.3 纤维素酶-胃蛋白酶法

评定青粗饲料蛋白质降解率 纤维素酶-胃蛋白酶法测定青粗饲料蛋白质降解率结果见表 3。饲料经纤维素酶处理后,再用胃蛋白酶培养,其蛋白质降解率在较短时间便达到较大降解率。从表 3 可以发现, K 值的校正作用已不大(如苜蓿降解率在 $K=0.02$ 时为 89.23%,而 $K=0.10$ 时仅下降至 87.72%)。

以尼龙袋法动态降解率结果作参照,纤维素酶-胃蛋白酶法的蛋白质降解率与尼龙袋法结果相关关系如表 4。表中也列出了纤维素酶-胃蛋白酶法($n=8$)在各时间点及用 K 值校正后的降解率与尼龙袋法结果相关的显著性,对禾本科与豆科牧草结果比较时(即 $n=6$),则在 3,7,12,24 小时点及 $K=0.06, 0.10$ 时两种方法结果均显著相关(r 在 0.84 以上)。Poos-Floyd 等、Roe 等用纤维素酶-胃蛋白酶法处理估测精料蛋白质降解率时,也有相似的结果^[2,3]。用纤维素酶-胃蛋白酶法评定蛋白质降解率时,单用一个时间点($t=24$ h 为宜, r 最高)的结果估测尼龙袋法降解值即可,用动态处理后的 K 值作矫正意义已不大。

表 1 不同纤维素酶量对饲料有机物消化率(%)的影响

Table 1 Effects of different usage of cellulase on organic matter degradability of lucerne hay and Chinese wildrye

| 项 目 Item | 酶 量 (mg) Amount of cellulase | | | | | |
|--------------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 10 | 30 | 50 | 75 | 100 | 140 |
| 苜蓿干草 Lucerne hay | 37.66 | 44.73 | 46.72 | 48.90 | 48.03 | 46.84 |
| 羊草 Chinese wildrye | 22.58 | 26.54 | 29.24 | 32.29 | 26.45 | 27.75 |

表 2 纤维素酶处理后胃蛋白酶量对饲料蛋白质消化率(%)的影响

Table 2 Effects of different usage of pepsin on protein degradability of lucerne hay and Chinese wildrye pre-treated with cellulase

| 项 目 Item | 酶 量 /IU Amount of pepsin | | | |
|--------------------|--------------------------|-------|-------|-------|
| | 80 | 120 | 160 | 210 |
| 苜蓿干草 Lucerne hay | 89.19 | 89.79 | 90.76 | 90.76 |
| 羊草 Chinese wildrye | 65.26 | 67.40 | 67.53 | 64.71 |

表3 纤维素-胃蛋白酶法在不同时间点饲料蛋白质降解率及动态模型处理的结果

Table 3 The protein degradability of forage and degradability model at various by using cellulase-pepsin technique

| 项 目 Item | 苜蓿干草 Lucerne hay | 红三叶草 Red clover | 豆腐渣 SCR ^① | 啤酒糟 Brewer's grain | 高粱青贮 SS ^② | 羊草 CW ^③ | 雀麦草 SB ^④ | 羊茅 Reed fescue |
|-----------------------|---------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------|------------------------|-------------------|
| <i>t</i> /h | | | | | | | | |
| 3 | 86.48 | 76.48 | 76.05 | 70.10 | 71.29 | 52.19 | 80.05 | 82.79 |
| 7 | 88.13 | 77.96 | 79.50 | 74.28 | 73.39 | 59.75 | 80.77 | 84.82 |
| 12 | 88.75 | 79.30 | 79.83 | 75.94 | 75.57 | 59.81 | 82.49 | 85.04 |
| 24 | 89.42 | 80.28 | 79.97 | 80.36 | 75.65 | 60.43 | 82.69 | 85.24 |
| 36 | 89.61 | 82.21 | 80.89 | 84.19 | 77.03 | 68.82 | 83.47 | 88.59 |
| 48 | 89.98 | 80.85 | 81.89 | 84.19 | 77.99 | 68.23 | 83.84 | 85.91 |
| 参数 Parameter | | | | | | | | |
| <i>a</i> | 85.52 | 75.92 | 75.94 | 67.74 | 70.19 | 51.44 | 79.04 | 83.15 |
| <i>b</i> | 4.49 | 7.01 | 6.22 | 18.13 | 8.20 | 19.49 | 20.96 | 16.76 |
| <i>c</i> | 0.0966 | 0.0426 | 0.0623 | 0.0484 | 0.0591 | 0.0411 | 0.0106 | 0.0070 |
| RSD | 0.36 | 0.46 | 1.01 | 0.28 | 0.74 | 2.20 | 1.52 | 0.89 |
| <i>P</i> ^⑤ | | | | | | | | |
| <i>K</i> =0.02 | 89.23 | 80.69 | 80.65 | 80.57 | 76.32 | 64.55 | 86.29 | 87.49 |
| <i>K</i> =0.06 | 88.28 | 78.83 | 79.11 | 75.87 | 74.26 | 59.37 | 82.18 | 84.90 |
| <i>K</i> =0.10 | 87.72 | 78.02 | 78.33 | 73.65 | 73.23 | 57.12 | 81.04 | 84.24 |
| NY ^⑥ | | | | | | | | |
| <i>a</i> 值 | 47.03 | 31.03 | 47.36 | 5.53 | 37.74 | 17.44 | 25.31 | 35.98 |
| <i>P</i> ^⑦ | 77.47 | 80.08 | 84.40 | 46.02 | 66.28 | 40.24 | 65.07 | 69.84 |

① Soybean crude residue; ② Sorghum silage; ③ Chinese wildrye; ④ Smooth brome; ⑤ 酶解法的降解率(Degradability by cellulase-pepsin technique); ⑥ 尼龙袋法(Nylon bag technique); ⑦ 尼龙袋的降解率(Degradability by cellulase-pepsin technique)。

同时纤维素酶-胃蛋白酶法则高估了饲料蛋白质的尼龙袋法降解率值(表3),因此,对于粗饲料包括纤维含量较高的牧草,用纤维素酶-胃蛋白酶法评定其蛋白质降解率时,进行前处理(纤维素水解)的效果不佳。

纤维素酶-胃蛋白酶法所测定的饲料蛋白质快速降解部分 *a* 值明显高于尼龙袋法 *a* 值(表3),这可能是在体外酶处理中,酶与基质(饲料样品)的比值较瘤胃内偏高的缘故。在纤维素酶-胃蛋白酶法中,使用纤维素酶处理,使得与饲料 NDF 结合氮游离出来,再用胃蛋白酶水解蛋白质,因此所测的快速降解 *a* 值也包括了游离出来的 NDF 结合氮部分。而 Pichard 等表明,NDF 结合氮是与饲料的慢降解氮存在正相关的,这样使得纤维素酶-胃蛋白酶法所估测的 *a* 值更高^[4]。

3 结论

以尼龙袋法结果作参照,如果对粗饲料进行分类估测,则可明显提高纤维素酶-胃蛋白酶法测定值与尼龙袋法的相关。同时估测牧草与糟渣类饲料则效果不好,但只估测牧草类降解率值时,可取培养时间为 24 h 的值。培养条件为:40 C 水浴培养,纤维素酶最适酶量为 75 mg (pH4.5, 柠檬酸盐缓冲液),胃蛋白酶用量为 160 IU (pH1.4 的 KCl-HCl 缓冲液)。

表4 纤维素酶-胃蛋白酶法测定蛋白质降解率(X)与瘤胃尼龙袋法(Y)测定值的相关

Table 4 The regression of protein degradability between cellulase-pepsin technique(X) and rumen nylon bag technique(Y)

| 项目 Item | 回归方程 Regression equation | 相关及显著性 Relationship | RSD |
|---|-----------------------------|------------------------|-------|
| n=8 即全部饲料(牧草+糟渣类) All of forages | | | |
| t/h | | | |
| 3 | $Y = -18.37 + 1.14X$ | 0.76 ($P < 0.01$) | 11.14 |
| 7 | $Y = -38.28 + 1.36X$ | 0.74 ($P < 0.05$) | 11.48 |
| 12 | $Y = -38.20 + 1.33X$ | 0.73 ($P < 0.05$) | 11.58 |
| 24 | $Y = -29.00 + 1.20X$ | 0.66 ($P < 0.05$) | 12.88 |
| 36 | $Y = -37.09 + 1.26X$ | 0.53 ($P > 0.05$) | 11.47 |
| 48 | $Y = -44.32 + 1.35X$ | 0.56 ($P > 0.05$) | 14.19 |
| P ^① | | | |
| K=0.02 | $Y = -34.23 + 1.24X$ | 0.62 ($P > 0.05$) | 13.42 |
| K=0.06 | $Y = -34.27 + 1.29X$ | 0.72 ($P < 0.05$) | 11.91 |
| K=0.10 | $Y = -30.48 + 1.26X$ | 0.74 ($P < 0.05$) | 11.42 |
| P-a & NY-P ^② | $Y = -18.36 + 1.15X$ | 0.78 ($P < 0.01$) | 10.63 |
| P-a & NY-a ^③ | $Y = -30.16 + 0.83X$ | 0.62 ($P > 0.05$) | 12.26 |
| n=6 即牧草类(禾本科+豆科) Grass family+legme family | | | |
| t/h | | | |
| 3 | $Y = -9.43 + 1.01X$ | 0.87 ($P < 0.01$) | 7.62 |
| 7 | $Y = -25.64 + 1.19X$ | 0.84 ($P < 0.01$) | 8.46 |
| 12 | $Y = -28.32 + 1.21X$ | 0.87 ($P < 0.01$) | 7.83 |
| 24 | $Y = -30.23 + 1.23X$ | 0.88 ($P < 0.01$) | 7.56 |
| 36 | $Y = -56.42 + 1.51X$ | 0.82 ($P < 0.05$) | 9.01 |
| 48 | $Y = -60.07 + 1.56X$ | 0.83 ($P < 0.05$) | 8.84 |
| P ^① | | | |
| K=0.02 | $Y = -33.62 + 1.24X$ | 0.81 ($P < 0.05$) | 9.30 |
| K=0.06 | $Y = -25.92 + 1.19X$ | 0.86 ($P < 0.01$) | 8.05 |
| K=0.10 | $Y = -20.58 + 1.13X$ | 0.87 ($P < 0.01$) | 7.84 |
| P-a & NY-P ^② | $Y = -7.75 + 1.00X$ | 0.87 ($P < 0.01$) | 7.72 |
| P-a & NY-a ^③ | $Y = -13.92 + 0.62X$ | 0.75 ($P < 0.05$) | 7.61 |

①酶解法的降解率(Degradability by cellulase-pepsin technique);

②酶解法的a值与尼龙袋法的降解率的相关(The relationship of the "a" by cellulase-pepsin technique and the degradability by nylon bag technique).

③酶解法的a值与尼龙袋法a值的相关(The relationship of the "a" by cellulase-pepsin technique and by nylon bag technique);

参 考 文 献

- 1 奶牛饲养标准科研协作组等. 奶牛饲养标准及典型日粮配方, 北京: 农业出版社, 1989
- 2 Poos-Floyd M, Klopfenstein T, Britton R A. Evaluation of laboratory techniques for prediction ruminal protein degradation. J Dairy Sci, 1985, 68: 829~838
- 3 Roe M B, Hudson R J. Digestive kinetics of moose (*Alces alces*), wapiti (*Serrus elaphus*) and cattle. Anim Prod, 1991, 50: 51~65
- 4 Pichard G, Van Soest P J. Protein solubility of ruminant feeds. Proc Cornell Nutr Conf, 1977, 91~98

Estimating of the Protein Degradability of Forage by the Cellulase-Pepsin Technique

Yan Pinxun Feng Yanglian Mo Fang Yang Yafang

(College of Animal Science and Technology, CAU, Beijing 100094)

Abstract: The protein degradabilities of lucerne hay, red clover, soybean crude residue, brewer's grain, sorghum silage, Chinese wildrye, smooth brome, reed fescue were 88.28, 78.83, 79.11, 75.87, 74.26, 59.37, 82.16, 84.90 per cent, respectively, estimated by cellulase-pepsin technique. The regression equation of protein degradability between nylon bag (Y) and cellulase-pepsin (X) techniques was $Y = -34.27 + 1.29X$ ($r = 0.72$, $P < 0.05$). The incubating condition of cellulase-pepsin technique is pepsin (160 IU/0.3 g sample) dissolved in KCl-HCl buffer, incubated at 40°C, pretreated by cellulase (75 mg) in citrate buffer at 40°C.

Key words: cellulase-pepsin; protein degradability; forage

www.cnki.net