



# 仿生消化法评定猪饲料生物学效价的研究进展

■ 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 / 张宏福 赵峰 张子仪

**摘要** 在畜牧业生产中,客观、准确评定各种饲料原料的生物学效价是建立营养需要量标准、优化饲料配方的基础性科学决策依据,也是提高饲料利用率、降低饲料成本及节能减排的重要手段。

从德国 Weende 试验站的 Henneberg 与 Stohmann 首倡的概略养分测定方法已沿用一个半世纪,传统的生物学效价评定手段也基本保持原体系未变。在此期间,许多动物营养学家、生物化学家和仪器分析专家们在改革这一体系方面进行了大量有益的尝试。特别是在饲料养分的生物学效价的涵义、测试评价手段及分析仪表的开发等方面取得了许多可喜的进展,支撑了现代畜禽养殖业和饲料工业的发展。但是由于饲料养分的生物学效价自身受控于日粮结构、畜禽品种、生理阶段、环境条件、饲养制度乃至健康状况等种种复杂因素。因此,许多学者对文献中报道的有关大量饲料养分生物学效价的测试评定结果的可比性提出了质疑。

文章结合几十年来国内外在用仿生消化法评定猪饲料生物学效价方面的研究进展与存在问题进行讨论,并就作者等在开发以简捷、标准、可重复及可加为前提的单胃动物仿生酶水解系统的设计原理、重演性及可行性进行阶段性总结汇报。

**关键词** 仿生消化法;生物学评价;猪饲料

**中图分类号**: S816

**文献标识码**: A

**文章编号**: 1006-6314(2011)03-0005-05

饲料养分生物学效价评定的宗旨是为了揭示饲料被畜禽采食后消化、吸收,经过动物循环系统进入相应的组织器官,再转化为畜产品的过程。在表达消化、代谢、转化的过程及其涵义方面,前人曾提出种种倡议。Fox 将“生物学效价”定义为“饲料中某种养分支持生物机体结构与机能正常的量化估测”<sup>[1]</sup>; Sibbald(1987)认为“生物学效价”是一种抽象的概念,是养分进入体组织后用于正常代谢机能的效益<sup>[2]</sup>; Ammerman 将“生物学效价”

定义为:动物食入营养素中能被小肠吸收并参与代谢过程或贮存在动物组织中的部分占食入总量的比值<sup>[3]</sup>;许振英将生物学效价剖分为“绝对生物学效价”与“相对生物学效价”两类概念<sup>[4]</sup>;张子仪认为“饲料生物学效价”应包括消化率(digestibility)、吸收率(assorbability)、代谢率(metabolizability)、同化(assimilation)、有效性(utilization)、可利用率(availability)乃至饲料组合效应(associative effect of feeds)等多重涵义<sup>[5]</sup>。

在生物学效价的评定手段上,动物营养学家们在消化能、代谢能和净能的测试手段、立论依据、数学模型等方面进行过大量的研究。最早可溯及法国化学家拉瓦锡(Lavoisier Antoine Laurent, 1743 ~ 1794)创建的小型动物呼吸代谢热量测定装置,他首次否定了“燃素

通讯作者:张宏福。

收稿日期:2011-2-23。

项目基金:国家科技部创新方法专项(20091M033100)、

农业行业科技专项(200903006)项目。

说”，命名氧元素为“oxygen”，阐明了燃烧作用的氧化学说，再一次证实了“质量守恒定律”。经过近两个多世纪的科研实践，迄今消化能和代谢能测值仍然是“净能体系”赖以成立的关键性决策依据。但是经过实践，许多学者从不同角度对饲养标准中的有效能值采用净能体系提出质疑，如 Wiseman 和 Cole 认为净能值太敏感不适宜实际应用<sup>[6]</sup>；美国 NRC 的专家们认为净能的测定太困难、不精确和受影响的因素太多<sup>[7]</sup>；Emmans 总结指出：能量用于维持和脂肪沉积、蛋白沉积的效率是不一样的，因此不能用“净能”来简单描述<sup>[8]</sup>；Whittemore 认为净能指标并不比消化能、代谢能指标为优化饲料配方或预测生产成绩提供更为精确的信息<sup>[9]</sup>。因此，当前对饲料能量生物学效价评定的一个共识仍然是像 Fuller 指出的那样：“一个体系越是追求生产过程中的实际情况，则其测值更易受动物的影响，变异就更大，因此也相应更不精确”<sup>[10]</sup>。

纵观国内外对于饲料能量生物学效价的种种评定方法，可以认为在生物学效价的概念上，评定方法、手段的逻辑性上，理论与实践的结合上都存在许多悬而未决的问题，应该承认当前被长期沿用的种种传统生物学效价评定方法大多是属于约定俗成的权宜之计。基于以上认识，本文对 *in vitro* 消化法方面的研究历史进行了简要回顾，大体上可分为“单一胃酶 *in vitro* 消化”阶段、“胃-肠酶多步法 *in vitro* 消化”阶段及作者等正在探索中的“电脑仿生程控三步消化法”三个历史进程。为了寻求便捷、实用、可信的饲料养分生物学效价评定方法的科学技术路线，作者等曾对 Furuya<sup>[11]</sup> 用“胃蛋白酶-猪小肠液”（PIF）的 *in vitro* 法测定消化能的方法及存在的问题进行了验证，初步认识到“以还原论为指导思想，将任何局部运动之和等同为整体的理念将很难解决传统方法中存在的种种弊端”。基于以上认识，作者等从单胃动物猪、禽的仿生酶谱的建立，酶水解环境的标准化乃至电脑



程控消化系统中必须高度关注的关键性技术的全程仿生优化组合技术路线及实施方案进行了整体规划。复杂问题的简单化必须从零开始，需要通过大量实践检验才有可能达到日趋客观的现实。基于以上认识，本文首先回顾了用 *in vitro* 酶水解法评定猪饲料消化能（DE）及氨基酸利用率（AAA）的简史，作者等基于用仿生消化电脑程控系统评定猪饲料 EHGE 的现状与进程，最后对用仿生酶消化电脑程控系统评定饲料养分生物学效价的现实意义及应用前景进行了展望。希望能集思广益，得到同行们的支持与批评指正。

## 1 国内外用 *in vitro* 消化法评定猪饲料消化能的研究进展概况

由于动物代谢试验法耗资、费力、效率低，重演性、可比性差，同时测值又受到种种测试条件的限制，因此，自 20 世纪 50 年代以来，许多学者在通过 *in vitro* 法或 *in situ* 法，在探索模拟饲料养分在畜禽体内的消化代谢规律的基础上提出了种种简捷、易于执行的饲料养分生物学效价的评定方法，并在研究动物消化酶的变异规律及其对不同养分的水解环境，从不同的角度进行过大量工作。但从文献报道的频率和实际应用方面则显得不够系统。总体来说时起时落，尤其在 *in vitro* 消化法的研究方面，更显得分散。粗略概括，大致是从早期的简单模拟胃酶消化过程到中期的模拟胃、肠道多步消化，最后向近期的全消化道仿生酶谱的建立到电脑仿生程控的方向发展。

### 1.1 简单胃酶消化法

最早 Sheffner 等用胃蛋白酶对饲料进行了 *in vitro* 消化试验，并用以评定饲料或食物中蛋白质的生物学价值<sup>[12]</sup>。该法见于 AOAC 等早期版本<sup>[13]</sup>，作为测定动物性蛋白质饲料消化率的经典方法沿用至今。我国也于 1999 年根据等同采用原则将该法列入饲料行业中的国家级推荐标准（GB/T17811-1999，GB/T17811-2008）<sup>[14]</sup>。此外，有关木瓜蛋白酶<sup>[15]</sup>、胰蛋白酶<sup>[16]</sup>、链霉菌蛋白酶<sup>[17-18]</sup>和凝乳酶<sup>[19]</sup>



等方面的报道不胜枚举。胃部的主要消化酶是胃蛋白酶，其他酶的含量较低，一般忽略不计。用胃蛋白酶水解法评定饲料或食物的可消化性，虽然只能反映在规范水解条件下对某一饲料或食物中的蛋白质生物学效价的一个片面评价。由于这种方法便捷、重复性好、可比，而且医药用胃蛋白酶产品早已标准化，因此，仍然作为一种相对参比值被相关行业广泛接受。

## 1.2 胃—肠酶多步水解法

鉴于用单一胃酶法评定饲料生物学效价的局限性。从 20 世纪 70 年代以后，许多学者在单一胃酶处理的基础上用胰液、猪小肠液 (porcine intestinal fluids, PIF) 以及商品复合酶 (如 Viscozyme) 乃至 20% 磺基水杨酸 (PSA) 等用于饲料有效能或蛋白质氨基酸的“生物学效价”评定。

Goering 和 Van Soest 最早用胃蛋白酶—猪小肠液 (PIF) 的 *in vitro* 消化方法，估测了饲料淀粉、粗蛋白的消化率和日粮纤维的降解率。这主要是基于日粮干物质和粗蛋白的 *in vitro* 消化率测定与体内消化率测定之间存在着较好的相关性<sup>[20]</sup>。

Furuya 等在系统研究了猪胃蛋白酶及 PIF 的最佳水解环境条件之后，提出了用胃蛋白酶及 PIF 冻干粉水溶液模拟胃肠两步消化的 *in vitro* 法<sup>[21]</sup>。Lowgren 等在该法的基础上，采用十二指肠液处理 12h，再用回肠液和粪提取液处理 48h，粗略评价了猪饲料样品的 *in vitro* 干物质消化率<sup>[22]</sup>。

张子仪等 (1982 ~ 1984) 在前人工作的基础上，系统比较了从不同品种猪、饲喂不同类型日粮、不同瘖术部位采集的 PIF 酶活效价、鲜 PIF 与 PIF 冻干粉水溶液的酶活效价的差异，并在 PIF 冻干粉的保质期、用 PIF 法测值的精度、重演性、可加性以及 PIF 法测值与全收粪法测值间的相关关系开展了必要的性能检验。通过两者之间的相关关系建立了以 *in vitro* 法为变量，以全收粪法为因变量，提出了猪饲料消化能值的回归公式。经

过“七五”国家攻关全国协作及科研教学单位验证后，总结出了以胃蛋白酶和猪小肠液冻干粉水溶液处理为主要手段的 *in vitro* 消化试验方案。该法已被中国饲料工业协会、中国农科院饲料所主编的《饲料生物学效价评定技术规程》所采纳<sup>[23]</sup>。由于该方案是手工操作，因此，受猪小肠液的采集、冻干粉的制备、贮存条件、水解环境的标准化以及试剂盒的贮存条件、保质期、售后服务以及测试者的素质培训等客观社会条件的限制，迄今该方法仍然难在生产上被广大用户接受。

此后，卢福庄等<sup>[24]</sup>、杜荣等<sup>[25]</sup>、李文英等<sup>[26]</sup> 还曾用 PIF 法与全收粪法的鸡日粮代谢能值进行了对比。在此前后，Drake 曾用胃蛋白酶、胰酶连续透析法研究了畜禽对淀粉的消化率<sup>[27]</sup>。Savoie 和 Gauthier<sup>[28]</sup>、Derosiers 等<sup>[29]</sup> 曾用分子量为 1000Da 的透析袋在自制消化装置中模拟了饲料蛋白质的 *in vitro* 消化方法，研究了热处理乳清蛋白中赖氨酸的破坏程度和食物中蛋白质的 *in vitro* 消化率。

在这历史时期，Dierick 曾提出用胃蛋白酶制剂与胰酶制剂水解处理为标志的 *in vitro* 两步法<sup>[30]</sup>。在测定猪的能量消化率及蛋白质、氨基酸利用率方面也取得了令人满意的结果，但都限于所用酶制剂的标准化问题、以及试剂盒开发中的技术规范问题是否能达到肠道全程仿生效果，尚待进一步

研究。

进入 20 世纪 90 年代，Bosien 等<sup>[31]</sup>、Boisen 和 Fernandez 等<sup>[32]</sup>、Bosien 等<sup>[33]</sup> 前后报道了用胃蛋白酶—猪胰酶及 Viscozyme 评定了饲料干物质、有机物、粗蛋白质和能量 *in vitro* 消化率，并与体内法对比测定后，获得令人满意的结果。

加拿大学者 Regmi 等<sup>[34-35]</sup> 以三角瓶为反应器，用胃蛋白酶—胰酶—“Viscozyme”<sup>®</sup> “PSA”<sup>®</sup> 处理为主线的模拟胃肠水解环境及水解产物分离为目标的 *in vitro* 法，提出了预测生长猪对大麦样本全消化道能量表



观消化率(apparent total tract digestibility, ATTD)的回归模型( $y=1.23x-25.33$ ;  $R^2=0.97$ )。

综上所述,从仿生消化法研究的历程分析,其初衷都是以便捷为前提,为获取趋近于可信的生物学法信息为目标,以精度、重演性好为约束条件。从上述单一胃消化法与胃肠酶消化多步法的设计原则分析,基本上如出一辙。从各家在选定的消化酶或商品消化酶产品的功能分析方面也都难免有以点代面,以面代全之嫌,在实际操作中又存在着酶谱设计、酶活力乃至酶与酶、外源酶与内源酶之间互补颞颥,以及手工操作中不可回避的种种未知因素的干扰。因此,作者等认为:沿用了近一个世纪的各种方案,都有必要互通有无,取长补短,在模拟全消化道酶水解体系的仿生学方面作进一步努力。

### 1.3 仿生酶消化法

进入 21 世纪前后,许多学者又沿着胃蛋白酶-胰酶-Viscozyme 法的技术路线,在重演性方面进行了类似研究<sup>[36]</sup>。在 Boisen 等<sup>[33]</sup>研究基础上, Noblet 等<sup>[37]</sup>又用胃蛋白酶-胰酶-Viscozyme 系统分析了 115 种复合饲料和 68 种饲料成分。肯定了该体系对生长猪的饲料中有机物以及代谢能和净能的生物学效价评定方面具有可重复性。但是同时也指出该系统实验操作过程相对复杂。Kim<sup>[38]</sup>也指出在水解产物中油脂分离的重复性较差。Boisen<sup>[31]</sup>本人也指出该系统中在模拟消化液的制备、缓冲液的组成及水解时长等方面存在着操作者之间的随意性等遗留问题。

总体回顾,在诸多的国内外研究者公开报道的酶消化体系的 *in vitro* 测试手段方面,基本上停留在以三角瓶、透析管、摇床等为组件的手工操作阶段,人为设定酶谱条件下获得的信息。无论从仿生的角度及从所获参数的可比性与可重复性等方面都具有很大的局限性。为此,本研究组从 20 世纪后期开始,就仿生酶谱的设计定型依据,消化过程中水解环境、消化液的加入、乃至水解产物的分离,饲料样品的制备、仿生酶消化系统、透析膜的筛选、饲料样本量与消化酶的配套用量、缓冲液的配制(离子浓度、缓冲体系、pH 等)、反应温度、消化时长等因素的标准化与规范等方面的立论依据开展了研究,在此基础上开发了第一代到第三代“单胃动物仿生消化系统”<sup>[39,40]</sup>。

## 2 仿生酶消化法的发展目标

回顾早期工作,基本是属于探索到追踪的过程。进入 21 世纪,虽然在影响单胃动物消化酶谱的因素及其发育变异规律方面进行了必要研究,但仍属初学阶段,更复杂的问题乃至在传统饲料养分的生物学效价评定方面的难题还有待努力探索与深入研究。

基于“仿生”这主题本身就是一个永恒的课题,因此,因此作者等认为:攻坚的程序也只能以“已知”求“未知”。一蹴而就、一次到位是困难的,也是不可能的。基于以上认为:(1)为了更能趋近于动态宿主主体在特定时间、空间条件下获取饲料营养价值的客观信息,首先应该在传统饲料营养评定工作的理论、涵义、评定手段等方面作整体反思,并能在被现代养殖业与饲料工业所急需的便捷手段上寻求可行性技术路线。(2)在尚未能一次性获得公允方案之前,所有创新方案应具备以下条件:①在规定试验研究条件下所获得的信息或参数必须具有可信的精度和重演性,有利于对过去及未来的科研信息在同一条件下可比、可重演,以有利于用传统法或种种倡议生成数据的吐故纳新、淘而不汰;②饲料生物学效价评定项目名词术语应在相关信息管理系统的约束规定条件下标准化。繁简的度也应从生产实际出发,作出适度的选择(如 DE-ME-NE-NEM);③对试验动物特别是“荷术动物”(hostal animal)应在动物福利(animal welfare)理念下更新观念,提出试验动物必须是在健康、舒适、无应激的饲养环境下所获得的信息;④不同种类、不同生长阶段的畜禽饲料养分生物学效价仿生评定系统也应择重、渐进、组织全国分期分批有计划地协作完成。

## 3 结语

对传统的以“套算法”为立论依据的猪单个饲料营养价值评定体系,许多学者从组合效应及逻辑学等角度提出质疑。作者等认为:鉴于猪是杂食动物,从仿生学角度分析,其难度应是介于反刍动物与禽类之间的复杂问题。从国情考虑,还面对着以配合饲料为主的规模化养殖业体系与有啥喂啥的千家万户养殖业体系。因此,在建立仿生酶消化法体系时,应从我国养猪业的整体考虑,应注意“粗饲料类型日粮”与“精饲料类型日粮”两大饲料饲养体系的背景,审时度势,择重优化技术路线。



## 参考文献

- [1] Fox S.M.R.,Jacobs R.M.,Jones A.O.,*etal.*Animal models for assessing bioavailability of essential and toxic elements[J]. Cereal Chemistry,1981,58(1):6 ~ 11.
- [2] Sibbald I.R.Estimation of bioavailable amino acid in feedingstuffs for poultry and pigs:A review with emphasis on balance experiments[J].Canadian journal of Animal Science,1987,67:221 ~ 300.
- [3] Ammerman C.B.,Luo X.G.Iron-met hionine complex and feed grade ferroussulfate as sources of dietary ironfor chicks[J]. J Anim.Sci.,1996,74(suppl.1):8.
- [4] 许振英. 养分对猪的生物效价 [J]. 中国动物营养学报,1990,12(2):1 ~ 24.
- [5] 张子仪. 蛋白质及氨基酸生物学效价评定中值得注意的若干问题 [J]. 饲料研究,1994,1:2 ~ 4.
- [6] Wiseman J.,Cole D.J.A.Energy evaluation of cereals for pigdiets.In:Cole,D J A and Haresign W(eds),Recent Development in Pig Nutrition.Butterworths,London,1985:246 ~ 262.
- [7] National research Council.Nutrition requirements of dairy cattle,6th Revised ed.,National Academy press, Washington,D.C.1988
- [8] Emmans G.C.Energy flows.In:I.Kyriazakis(Ed.):A quantitative biology of the pig[M].CAB International,1999:363 ~ 379.
- [9] Wittemore C.T.The science and practice of pig production.Longman Scientific and Technical, Essex,UK,1993:661.
- [10] Fuller M.F.Principles in energy evaluation.In:Horgensen H and Femandez J A.Energy and Protein Evaluation for Pigs in the Nordic Countries[C](edited by Jorgensen H and Femandez J A).Proceedings of NJF-seminar No.274. Foulum,Denmark.1997:4 ~ 8.
- [11] Furuya S.,Sakamoto S.,Takahashi S.A new *in vitro* method for the estimation of digestibility using the intestinal fluid of the pigs[J].British Journal of Nutrition,1979,41:511 ~ 520.
- [12] Sheffner A.L.,Eckfeldt G.A.,Spector H.The pepsin digest residue(PDR) amino acid index of net protein utilization[J]. Journal of Nutrition,1956,60:105 ~ 120.
- [13] AOAC.Officials methods of analysis[M].Assoication of official Analytical chemists.Wshington D C,USA.1984.
- [14] 中国饲料工业协会, 中国农业科学院饲料研究所, 饲料生物学效价评定技术 [M]. 北京: 中国农业科技出版社,1996.
- [15] Buchanan R.A.*In vivo* and *in vitro* methods measuring nutritive value of leaf-protein preparations[J].British Journal of Nutrition,1969,23:533 ~ 545.
- [16] Maga J.A,Lorenz K,Onayemi O.Digestive acceptability of proteins as measured by the initial rate of *in vitro* proteolysis[J].Journal of Food Science,1973,38:173 ~ 174.
- [17] Taverner M.R,Farrell D J.Availability to pigs of amino acids in cereal grains.3.A coparision of ileal availability values with faecal,chemical and enzymic estimates[J].British Journal of Nutrition,1981,46:173 ~ 180.
- [18] Hewitt D,Ford J.E.Nutritional availability of methionine,lysine and tryptophan in fish meals,as assessed with biological,microbiological and dye-binding assay procedures [J].British Journal of:Nutrition,1985,53(3):575 ~ 586.
- [19] Bhatti R.S.Albumin proteins of eight edible grain legume species:electrophoretic patters and amino acid composition[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,1982,30:620 ~ 622.
- [20] Goering H.K, Van Soest P.J.Forage fiber analyses(Apparatus reagents,procedures,and some applications)[M]. In:Agric.Handbook No.379,ARS USDA,Washington D C.1970:20.
- [21] Furuya S,Sakamoto S,Takahashi S.A new *in vitro* method for the estimation of digestibility using the intestinal fluid of the pigs[J].British Journal of Nutrition,1979,41:511 ~ 520.
- [22] Lowgren W,Graham H,Aman P.An *in vitro* method for studying digestion in the pig.Simulating digestion in the different compartments of the intestine[J].British Journal of Nutrition,1989,61:673 ~ 687.
- [23] 张子仪等. 动物营养代谢研究 [A]. 动物营养代谢农业部重点开放实验室,1990-1994 论文集 [C]. 北京: 北京农业大学出版社,1995.
- [24] 卢福庄等. 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.
- [25] 杜荣等. 利用离体法估测单一饲料表观代谢能(鸡)值的研究 [A]. 动物营养代谢农业部重点开放实验室 1990-1994 论文集 [C]. 北京: 北京农业大学出版社,1995: 114 ~ 121.
- [26] 李文英等. 利用离体法测定蛋鸡日粮表观代谢能值的研究 [A]. 动物营养代谢农业部重点开放实验室 1990-1994 论文集 [C]. 北京: 北京农业大学出版社,1995.
- [27] Drake A P,Fuller M F,Chesson A.Simultaneous extimations of precaecal protein and carbohydrate digestion in the pigs[A].*In vitro* digestion for pigs and poultry[C].(edited by Fuller M.),1991.
- [28] Savoie L,Gauthier S.Dilysis cell for the *in vitro* measurment of protein digestibility[J].Journal of Food Science,1986,51:494 ~ 498.
- [29] Derosiers T,Savoie L,Bergeron G,*et al.*Estimation of lysine damage in heated proteins by furosine determinations in conjunction with the digestion cell technque[J].J Agric Food Chem,1989,37:1387 ~ 1391
- [30] Dierick N.,Vervaeke I.,Decuyper J.,*et al.*Protein digestion in pigs measured *in vivo* and *in vitro*[M].In:Just A., Jorgensen H.,Fernandez J.A.(Eds.).Digestive physiology in the pig.Copenhagen National Institute of Animal Sci., 1985:329 ~ 332.

(参考文献 31 ~ 40 略)

注: ① Viscozyme 是一种复合酶, 含有多种碳水化合物水解酶, 包括纤维素酶、半纤维素酶、阿拉伯聚糖酶、木聚糖酶、 $\beta$ -葡聚糖酶和果胶酶等; ② PSA: Sulfosalicylic acid, 磺基水杨酸。