

关于利用微生物提高粗饲料营养价值的 试验和测定方法的若干规定

按：农林部委托浙江省农业科学院于1976年12月在陕西临潼县召开了“利用微生物提高粗饲料营养价值”科研协作会，会上交流总结了三年来利用纤维素酶分解粗饲料纤维素，提高粗饲料营养价值的研究成果和应用经验。为了大力发展养猪事业，需要尽快解决目前在群众性科学实验中存在的某些问题。经过讨论，会议对试验方法和鉴定标准做出了统一规定。下面刊登规定的全文，供大家参考和修正，以进一步改进、完善。

一、纤维素酶活力的测定

(一) 酶液制备

为避免稀释倍数不同对酶活测定结果的影响，样品重量应以绝干计(根据具体情况，亦可以风干计，但应注明，最好报告含水量)。

风干曲，取5克，加20倍蒸馏水；三角瓶曲，按整瓶原料重，加20倍蒸馏水(扣除配曲加水量)；鲜曲，宜先测含水量，取相当于5克干重的鲜曲，加20倍蒸馏水(扣除鲜曲所含水分)。

于40℃恒温浸提一小时(每15分钟振荡或搅拌一次)后，用少量脱脂棉过滤或3,000转/分离心10分钟，取出上清液，用各种方法测定活力时要分别稀释适当倍数。

(二) 测定方法

1. 滤纸糖法：取400倍稀释酶液1毫升(对照用沸水浴20分钟灭活的酶液)，pH4.4，0.05M柠檬酸缓冲液或0.1M醋酸缓冲液1毫升置于试管中，加卷状的50±1毫克滤纸一条(约1×6厘米²，应注明滤纸型号)，50℃保温准确作用1小时，立即加DNS显色剂3毫升，沸水浴显色10分钟，冷后定容至10毫升，500—550毫微米波长比色(用蒸馏水代替酶液，加同量缓冲液和显色剂，作比色空白)。用测定值减对照值计算酶活，活力表示为：

毫克(葡萄糖)/克(曲)·小时

2. CMC法：取800倍稀释酶液0.5毫升，含0.5% CMC-Na的上述缓冲液1.5毫升，置于试管中，50℃保温准确作用30分钟，立即按上法定糖(测CMC活力时，不必作对照，只作比色空白，即用蒸馏水代替酶液，加同量CMC液和显色剂)。活力表示为：

毫克(葡萄糖)/克(曲)·小时

测定时，CMC液应预热至50℃，并摇匀后加入。

3. 滤纸崩溃法：取20倍稀释酶液8毫升，上述缓冲液2毫升，置于试管中，再放入1×6厘米²滤纸一条，

加甲苯数滴，置50℃保温静置反应24小时，定时观察滤纸崩溃情况(观察时稍加摇动)。活力表示：

滤纸边缘膨胀，记录为“+”；

滤纸正体膨胀并下弯，记录为“++”；

滤纸呈碎片状，记录为“+++”；

滤纸不成定形，全部崩溃呈糊状，记录为“++++”；

若滤纸不到24小时就已全部崩溃，则记录达到全部崩溃的小时数。

注1. 还原糖也可用Somogyi法测定。

2. 缓冲液应加0.01%硫柳汞或0.1%苯甲酸钠防腐，可用数月。

3. 酶液稀释倍数及酶活均以绝干计，否则应分别注明。

4. DNS显色剂，每1,000毫升DNS液含：

酒石酸钾钠(分析纯)	182克
3,5-二硝基水杨酸(化学纯)	6.3克
氢氧化钠(分析纯)	20克
无水亚硫酸钠(分析纯)	3克
重蒸邻苯酚	4克

配后过滤放置半个月后使用。

5. 标准曲线的测定，应与酶活测定条件相一致即：显色时的反应液pH，总体积，显色时间，显色后稀释后的体积，比色仪器型号、状态，波长比色杯型号。

二、还原糖的测定

取适量稀释糖液(酶解液)1毫升，加蒸馏水1毫升(对照只加2毫升水)按DNS法或Somogyi法定糖(方法见滤纸糖活性测定方法)。

(一) 酶解液糖浓度

1毫升稀释糖液还原糖毫克数 × 稀释倍数 = 毫克/毫升；

或

$$\frac{1 \text{ 毫升稀释糖液还原糖毫克数} \times \text{稀释倍数}}{10} = \%$$

(二) 糖化率(%)

酶解液糖浓度(毫克/毫升)×酶解样水量(毫升)×100
底物绝干重(克)×100

(三) 底物转糖率(%)

底物转糖率% = 糖化率 - 酶解前试样底糖率

三、纤维素含量测定

(一) 粗纤维测定

沿用中国农科院畜牧研究所全国饲料分析法暂行操作规程(1956年)。

(二) 纤维素测定

用乙醇的硝酸溶液处理植物秸秆,除去其中的半纤维素、木质素、蛋白质及糖等物质后,剩下的残渣去除灰分即为纤维素。

1. 试剂配制: 硝酸-乙醇溶液: 于1,000毫升干燥量筒中放95%乙醇800毫升,另以干燥量筒取浓硝酸(分析纯,比重1.42)200毫升徐徐加入,加时不断搅拌,冷却后倒入棕色试剂瓶中,现配现用,不宜久置。

甲基橙指示剂: 1%(W/V)的甲基橙水溶液。

2. 测定方法: 准确称取样品2—3克于250毫升三角瓶中,加25毫升硝酸-乙醇溶液,装上回流冷凝器,沸水浴上加热回流1小时(每15分钟摇一次)。

将反应物小心移入垫有1厘米厚玻璃纤维的古氏坩埚抽滤,用10毫升硝酸-乙醇溶液洗涤滤渣,热蒸馏水洗至中性(用甲基橙指示),再以95%乙醇洗数次。用蒸馏水冲净坩埚外部,置105℃烘至恒重(A),入马福炉600℃灼烧2小时称至恒重(B)。

(三) 计算

$$\text{纤维素}\% = \frac{A - B}{\text{样品绝干重}} \times 100$$

注: 配制硝酸-乙醇溶液时,必须将硝酸慢慢加入乙醇中,以免爆炸。

四、木质素测定

(一) 72% 硫酸的配制

将400毫升浓硫酸(98%比重1.84)徐徐加入600毫升蒸馏水中,冷至15℃备用。

(二) 测定方法

风干样品1克包于滤纸中,用索氏抽提器加乙醚抽提10小时,将滤纸包于60℃水浴除去残余乙醚,脱脂样品小心移入250毫升磨口锥塞瓶,加入72%硫酸15毫升,加塞振荡,样品浸透后,24—25℃保温2.5小时(需经常振摇),加蒸馏水200毫升,回流煮沸1小时,用垫1厘米厚玻璃纤维的古氏坩埚抽滤,热蒸馏水150毫升洗涤,105℃烘至恒重(A),入马福炉600℃灼至

恒重(B)。

(三) 计算

$$\text{木质素}\% = \frac{A - B}{\text{样品重} \times \text{绝干率}} \times 100$$

五、蛋白质测定

(一) 粗蛋白测定

按中国农科院畜牧研究所暂行操作规程(1956年)——半微量凯氏定氮法测定。

(二) 真蛋白测定

待测样品于250毫升烧杯内,加50毫升蒸馏水煮沸,加25毫升6%硫酸铜,稍加搅拌,再徐徐加入25毫升1.25%氢氧化钠溶液,边加边搅拌(以防氢氧化钠局部过浓,溶解部分蛋白质),静置2小时,用两层定量滤纸慢速过滤,残渣用热蒸馏水洗至中性(10%氯化钡加入滤液不混浊)。于50—60℃烘至略带潮湿时,将滤纸卷成细卷于凯氏烧瓶定氮。

$$\text{真蛋白含量}\% = \frac{6.25N}{\text{样重(绝干)}} \times 100$$

(三) 不溶性蛋白测定

“人工瘤胃”发酵饲料的不溶性蛋白质可用重量法或比色法测定。

六、粗脂肪及粗灰分测定

同中国农科院畜牧研究所全国饲料分析法暂行操作规程(1956年)。

七、挥发性脂肪酸总量的测定

将“人工瘤胃”发酵饲料的滤纸,用硫酸消化蒸馏,馏液用氢氧化钠滴定。

八、饲养试验

为能比较确切地反映出粗饲料经微生物处理后喂猪的实际效果,进行饲养试验时除具体细节按常规处理外,还应严格控制如下一些条件。

(一) 试验猪只的选择

试验猪只应为健康、生长发育正常、血统来源清楚的当地常见品种,最好是土种或杂交一代,尽可能不用三品种以上的杂交后代。同一批试验猪最好全部为单一品种,必要时也可用两个品种的猪供试,但各组间品种组成比例必须完全一致。最好有计划的选择同胞、半同胞母猪用同一公猪集中在短时间内配种挑选其后代供试。

试验猪的年龄力求近似,初生日期最好不超过25

天。胎次、窝数、特别是体重水平可以不限，但各组间必须近似或一致，组间平均体重差不应超过 $\pm 1\%$ ，每一组内保证体重水平接近，个体差不应超过 $\pm 5\%$ 。

(二) 分组预饲

将经过个体编号、去势、驱虫和防疫注射后的试畜按试验设计，参照上述要求进行分组。试验必须设有对照组。各组头数相同。为保证进入试验期间每组不少于 6 头和组间不再进行调组，分组时应尽量留有余地，每组头数最好不少于 10 头。

预饲期不应少于 20 天，通过预饲要求达到摸清各试畜基础增重率，确定饲料喂量和适应试验期饲料的日粮。

根据每头试畜在预期内的基础增重率，按上述组间平均体重差和个体差的要求，淘汰基础增重率过大和过小的，余 6 头进入试验期。

预饲期内各组均饲喂以对照组的饲料。过渡期 4—6 天，在此期内除对照组外，各试验组逐日增加试验粗料取代对照粗料，以使各试验组试畜进入试验期时，适应于各自的供试粗料。

(三) 试验期处理

试验期不应少于 60 天，如进行交叉试验时，试验期亦不应少于 60 天，而且中间应设过渡期 6—10 天。试验期内各组精、青料均应同质同量（进行替代部分精料试验时，青料不变。精料可以同质不同量）。粗料可限或不限，但必须计量。为使试验获得较确切的结果，对对照组所用的粗料除应根据试验粗料的加曲量增加制曲原料外，其调制方法（如加水量、浸泡时间等）亦应力求与试验饲料一致。

试验期内各组饲料应尽可能让其吃完，偶有剩余，应及时收集拌入下餐料中，并适当减少下餐粗料喂量。

试验饲料的营养成份变化，应于试验期的始、中、末的三阶段各鉴定比较一次。关于具体方法，各单位可自行探索，但以能如实反映出饲料各组份的变化为原则。酶解饲料的还原糖测定，于试验开始起每 5—10 天测定一次。

试验期间日粮的营养水平以保证对照组日增重不低于 100—200 克为宜。日粮组成比例（包括精、青、粗料及添加剂）和实际采食量应予标明。

(四) 称重、记录与统计

称重于预饲期始、预饲期末，试验期始，试验期末各进行清晨空腹个体称重一次，每次连续两天，取平均数表示；如试验期较长，中途可酌情称重若干次。每次各猪称重均应定时、定顺序。

各组每天采食的饲料名称及重量均应作详细记录，摘要记录试畜健康状况。

试验中间发生试畜死亡或必须淘汰时，不另补猪。统计饲养增重时，除各组平均外，应标明最高最低范围，最好指出个体增重情况。饲养增重及饲料报酬一律用公斤或克表示，而进行差异显著性测定。

(五) 屠宰检验

有条件的单位在试验结束时，每组取最接近平均体重的 2—3 头试畜进行屠宰检验，观察其内脏是否正常，特别应注意胃、肠容积、厚度和长度的变化。碱预处理粗料的喂猪试验还应注意考察屠体的灰含量分和骨重等情况，测定方法可自行探索。

九、消化试验

1. 消化试验按常规进行，可采用全量法和指示剂法

2. 为使消化试验结果能较确切的反映饲养试验效果的实际情况，建议

(1) 消化试验的饲养水平最好与饲养试验的饲养水平一致；

(2) 只测定日粮的有机物质（粗纤维、粗蛋白质、粗脂肪）的消化率。

3. 最好测定个体消化率，但为节省人力和物力，也可作群体消化率的测定。

4. 进行消化试验时要求预饲期不少于 7 天，收粪期不少于 5 天。

(附) 在生产条件下测定发酵或酶解饲料

失重率和粗纤维分解率的简易方法

根据饲料在发酵或酶解过程中灰分总量不变的原理，可用灰分作指示剂以间接测定饲料发酵或酶解后有机物的失重率和粗纤维的消化率。

设按常法分别测得饲料发酵或酶解前灰分含量百分数（按绝干计）为 A，粗纤维含量百分数为 B；发酵或酶解后的百分数含量分别为 A' 和 B'。

设若饲料经发酵或酶解后粗纤维百分数含量未变化，则 B' 应等于 $\frac{B \times A'}{A}$

但据实测出现差数 $\frac{B \times A'}{A} - B'$

$$\begin{aligned} \text{故粗纤维分解率} \% &= \frac{B \times A' / A - B'}{B \times A' / A} \times 100 \\ &= \left(1 - \frac{B'}{B \times A' / A} \right) \times 100 \end{aligned}$$

同理，以酶解或发酵前后有机物含量 C 和 C' 代入上式。可测得有机物质的失重率 %。

（利用微生物提高粗饲料营养价值
第二次全国科研协作会议）