



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109856384 A

(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201811470093.9

G01N 30/06(2006.01)

(22)申请日 2018.11.28

C12Q 1/689(2018.01)

C12Q 1/04(2006.01)

(71)申请人 长春博瑞农牧集团股份有限公司

地址 130000 吉林省长春市经济开发区长
江路57号五层161段

(72)发明人 甄玉国 孙喆 王涛 张学峰

赵巍 陈雪 赵小丽 郑艳秋

张玲玲 张维刚 谭胜男

(74)专利代理机构 北京君泊知识产权代理有限
公司 11496

代理人 王程远

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

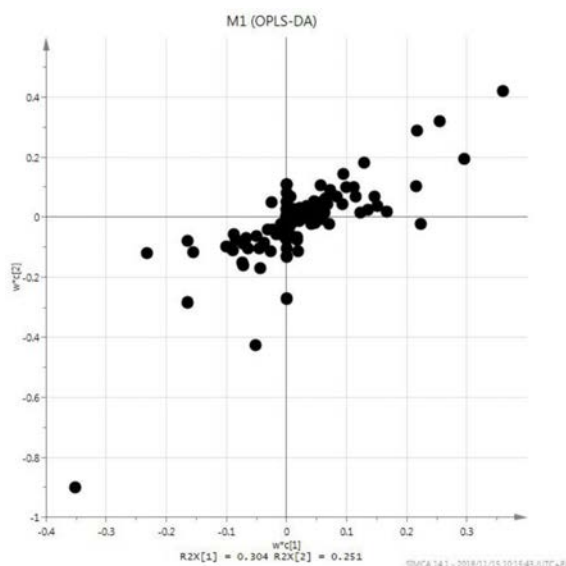
权利要求书4页 说明书24页 附图2页

(54)发明名称

一种应用代谢组学技术评价酵母培养物有
效物组的方法

(57)摘要

本发明涉及微生物有效物组评价领域,具体地涉及一种应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法,利用代谢组学的检测技术对酵母培养物有效物组进行解析,并将多变量降维的数学思路运用到挖掘有效物组的组成中,参照筛选解析的有效物组成分,采用化学单品模拟有效物组的构成关系进行配伍组合,再通过动物饲养试验对有效物组的功效进行验证。得出以下结论:酵母培养物有效物组作为日粮添加剂能显著提高肉仔鸡生长性能、免疫功能、以及抗氧化能力和屠宰性能。



1. 一种应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法,其特征在于,利用代谢组学的检测技术对酵母培养物有效物组进行解析,并将多变量降维的数学思路运用到挖掘有效物组的组成中,参照筛选解析的有效物组成分,采用化学单品模拟有效物组的构成关系进行配伍组合,再通过动物饲养试验对有效物组的功效进行验证。

2. 根据权利要求1所述的应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法,其特征在于,所述的代谢组学的检测技术包括样品采集和处理、代谢物的鉴定和多元统计分析。

3. 根据权利要求1所述的应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法,其特征在于,所述的采用化学单品模拟有效物组的构成关系进行配伍组合具体表现为回归模型的建立与应用,所述的模型建立对生产性能中的日增重指标与筛选到的酵母培养物有效物组之间关系进行研究,利用多元统计分析方法,建立生产性能与酵母培养物有效物组的函数关系,从而进一步揭示有效物组的组合配伍与生产性能的关系。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 筛选酵母培养物有效物组

采用单因素完全随机分组设计,选取336羽1日龄健康体重相近的AA(爱拔益加)肉仔鸡,公母各半随机分为7组,每组6个重复,每个重复8只鸡;试验期为42d;

酵母培养物有效物组筛选分组:对照组饲喂基础日粮,在基础日粮中添加5个时间差异化培养物的酿酒酵母培养物,各处理组添加量为0.192%,以及达农威益康V XP;

DZ为对照组饲喂基础日粮,ABC组为酵母培养物有效物组,即分别饲喂在基础日粮基础上添加有效物组3个配伍组合,D组饲喂发酵24h的酵母培养物(YC24h),E、F组为V XP组,在基础日粮基础上分别添加0.1%、1%“V XP”饲料添加剂;整个试验周期饲料中不添加抗生素与其他促生长剂;

所述的有效物组为甘氨酸、果糖、肌醇、吡喃(型)半乳糖、蔗糖;试验日粮分配表如下表所示:

试验组	DZ 组	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组	F 组
基础日粮	√	√	√	√	√	√	√
试验日粮	0 对照	配伍 1	配伍 2	配伍 3	24hYC	0.1% V XP	1%V XP

ABC组在YC中所占比例配伍情况如下表所示:

配伍	物质在 YC 中所占比例%				
	甘氨酸 X1	果糖 X2	肌醇 X3	半乳糖 X4	蔗糖 X5
1	4.13	0.63	0.53	0.84	0.11
2	3.72	0.56	0.477	0.756	0.099
3	4.54	0.69	0.58	0.92	0.12

各物质配伍说明:取生产性能为发酵24hYC产品的日增重,得到相应的X值,即配伍1(有效物组A);在此基础上调整各物质的比例,所述的比例为各物质 $\pm 10\%$,配置各物质的含量,为配伍2和3(有效物组B、C组);

(2) 血清样品采集:在21日龄和42日龄时,随机选择2只健康和体重相近的鸡从颈静脉采血,采血前12h对试验鸡停料不停水;采血收集完成后,于室温放置待血清析出后将其分装于离心管中,3000r/min离心10min,取其上清分装于Eppendorf试管中,并立即浸入液氮,置 -80°C 低温保存,用于生化分析用;

器官组织样品采集:在21日龄和42日龄时,随机选择2只健康和体重相近的试验鸡,空腹12h后进行屠宰,取胸腺、脾脏、肌胃、腺胃和法氏囊用滤纸吸去血渍,剔除脂肪后称鲜重并记录,样品保存在 -80°C 待用;

肌肉样品的采集:于试验第42日结束时每个重复随机选取与该重复平均体重相近的肉鸡2只,颈静脉放血致死,取胸肌和腿肌样品(去除脂肪和结缔组织),称重并记录;

(3) 生产性能:试验在21和42日龄时,以重复为单位,分别于试验开始的1、7、14、21、28、35、42d早晨,记录鸡初始重和末重,并记录整个试验期供料量、剩余料量和损失料量,计算平均日采食量(ADFI)、平均日增重(ADG)和料重比(F/G);

免疫器官指数:在试验的21d和42d,从每个重复中随机选取2只鸡,空腹称体量,屠宰后,分离胸腺、法氏囊和脾脏等免疫器官并称重、记录,器官指数=器官质量(mg)/活体质量(g);

血清生化指标:使用全自动血液生化分析仪测定血中白蛋白,球蛋白,血清尿素氮与碱性磷酸酶;

血清免疫指标:在第21、42日龄进行屠宰,采血管收集血液,3500r/m, 4°C 离心10min,取血清于1mL离心管,至于 -20°C 保存,用于血清总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、尿素氮(UREA)、葡萄糖(GLU)等测定,检测使用全自动生化分析仪;分泌性免疫球蛋白A(IgA)、分泌性免疫球蛋白G(IgG)用ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定;

血清抗氧化指标:血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性和丙二醛(MDA)含量使用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定;

屠宰性能测定:在试验42d时,每个重复各随机取2只鸡,进行屠宰测定;活体重:禁食12h,宰前称重;屠体重:屠宰后,颈静脉放血并去毛后再次称得的重量;全净膛重为屠体重去除气管、食道、嗦囊、肠、脾脏、胰腺、胆囊和生殖器官心、肝、肾、腺胃、肌胃、腹脂、头、脚的后的重量,分割左侧胸肌、腿肌并称重,分别为胸肉重和腿肉重;腹脂重主要是腹部板油及肌胃周围的脂肪的重量;计算公式:腹脂率=腹脂重/全净膛重 $\times 100\%$;胸肌率=胸肌重/全净膛重 $\times 100\%$;腿肌率=腿肌重/全净膛重 $\times 100\%$;全净膛率=全净膛重/活重 $\times 100\%$;

(4) DNA提取

称取21日龄肉鸡的盲肠内容物0.3g于无菌PBS中,涡轮震荡30S后,10000rpm转速下离心10min后取上清溶于DNA缓冲液中;肠道内容物DNA提取方法参照试剂盒QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit操作步骤(QIAGEN,German),样品16S rRNA基因V3-V4区的PCR扩增及Illumina高通量测序由上海派森诺科技股份有限公司完成;

16S rRNA基因V3~V4区的PCR扩增

将样品DNA稀释至20ng/ μ L作为模板,扩增细菌16S rRNA V3-4区;使用常规引物338F (5'-ACT CCTAC G GGAGGCAGCA-3')和806R (5'-GGA CTAC H VGGGTWTCTAAT-3'),MiSeq测序平台检测;

PCR扩增体系为25 μ L:5 \times reaction buffer 5 μ L,5 \times GC buffer 5 μ L,dNTP (2.5mM) 2 μ L,正向引物 (10uM) 1 μ L,反向引物 (10uM) 1 μ L,模板DNA 2 μ L,ddH₂O 8.75 μ L,Q5 DNA酶0.25 μ L,PCR扩增条件:98 $^{\circ}$ C预变性2min;然后98 $^{\circ}$ C变性15s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,25-30个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5min,10 $^{\circ}$ C保持待测定,PCR扩增产物通过2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,采用AXYGEN公司的凝胶回收试剂盒切胶回收;将PCR扩增回收产物通过荧光试剂为Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit进行定量;

高通量测序

采用MiSeq测序仪进行2 \times 300bp的双端测序,相应试剂为MiSeq Reagent Kit V3 (600cycles);盲肠菌群多样性检测由派森诺生物(上海)完成;

(5) 数据处理与分析:

生产应用试验数据经Excel 2007初步整理后,采用SPSS 23.0统计软件中One-Way ANOVA进行方差分析,多重比较采用Duncan's法;P<0.05为差异显著,P<0.01为差异极显著,数据用“平均数 \pm 标准差 (Mean \pm SD)”表示;

采用Illumina MiSeq平台对群落DNA片段进行双端 (Paired-end) 测序;首先对FASTQ格式的双端序列逐一作质量筛查,要求截断后的序列长度 \geq 150bp,且不允许存在模糊碱基;再利用FLASH软件,对通过质量初筛的双端序列进行配对连接;最后,根据样本所对应的Index信息,将连接后的序列识别分配入对应样本,获得样本的有效序列;

运用QIIME软件识别疑问序列,并剔除:5'端引物错配碱基数>1的序列;含有连续相同碱基数>8的序列;再调用USEARCH检查并剔除嵌合体序列;

Alpha多样性指数:用于比较不同样本的多样性,首先对序列量拉平处理,从而校正测序深度引起的多样性差异;再使用QIIME软件分别对每个样本计算侧重于体现群落丰富度Chao1指数和ACE指数,以及兼顾群落均匀度的Shannon指数和Simpson指数。

5. 根据权利要求4所述的应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法,其特征在于,步骤(1)中所述的基础日粮的组成由下表所示:

日粮组成	1-21d	22-42d	营养成分	1-21d	22-42d
玉米	52.07	55.57	代谢能 (MJ/kg)	12.746	12.719
大豆粕	35.50	34.00	粗蛋白 (%)	20.722	19.609
鱼粉	5.00	3.60	钙 (%)	0.910	0.865
大豆油	4.00	3.5	总磷 (%)	0.676	0.584
磷酸氢钙	1.00	0.70	有效磷 (%)	0.447	0.356

石粉	1.00	1.20	赖氨酸(%)	1.347	0.459
食盐	0.30	0.30	蛋氨酸(%)	1.248	0.432
赖氨酸	0.04	0.04			
蛋氨酸	0.09	0.09			
1%预混料	1.00	1.00			
合计	100	100			

其中,每千克预混料包含:维生素A 5000IU;维生素D3 1500IU;维生素E 15IU;维生素K3 0.8mg;维生素B12 0.01mg;叶酸0.5mg;烟酸50mg;泛酸8mg;生物素0.1mg;吡哆醇2.2mg;核黄素4.4mg;硫胺素1.6mg。

6. 根据权利要求4所述的应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法,其特征在于,步骤(1)中所述的肉仔鸡购自吉林德详公司,酵母培养物由吉林农业大学吉农博瑞研发中心提供,所述的V XP为达农威中国有限公司的益康V XP。

一种应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物有效物组评价领域,特别是涉及一种应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法。

背景技术

[0002] 代谢组学是系统生物学的一门新兴科学,属于是系统生物学的重要组成部分,是构成系统生物学的基因组学、蛋白质组及转录组学之后发展起来的一门科学。代谢组学的概念的提出,最早是由1971年Devaux等提出的代谢谱分析。他们通过气相色谱质谱联用技术(GC-MS)对试验者体液的代谢物进行定性、定量测定,此方法主要用来对某些疾病进行筛选和诊断,至今仍在应用。

[0003] 代谢组学是利用现代生物分析手段方法,来研究生物体或细胞在受到外界因素刺激或扰动之后,处于特定生理时期内的,并且与代谢途径相关的小分子代谢物(分子质量<1000)(如氨基酸、脂肪酸、糖类、维生素和脂肪等)随时空的动态变化规律,来探明生物体代谢途径的一种技术。它分析对象主要是血浆或血清、唾液、尿液以及细胞和组织的提取液等。

[0004] 自20世纪90年代中期,代谢组学快速发展起来,被广泛地应用在疾病诊断药物开发等方面。有关植物代谢组学、微生物代谢组学等领域的报道很多。而代谢组学技术在动物营养和饲料领域的应用还处于起步阶段。营养需要量和饲料营养价值评定一直是动物营养研究的两大主题。而代谢组学研究技术日益成熟,扩展了动物营养学研究的范围,使其不仅从宏观扩展还是到微观深入都提供了强大的技术支撑。

[0005] 酵母培养物作为一种极具替代抗生素潜力的产品,具有提高动物生产性能,调节免疫功能、改善胃肠道微生态平衡,保障肠道健康等多种营养保健的功效,在畜牧生产中具有广泛的应用前景。而酵母培养物是特定的培养基经酵母菌发酵技术制得的一种营养丰富、成分复杂微生态发酵产品。多年研究普遍认为,其营养保健作用是通过其发酵代谢产物来实现的,然而酵母培养物所包含的代谢产物种类繁多,除少数已知的营养物质外,多数是以各种化合物形式存在的安全性未知成分,其主要的或特定的有效作用成分未有确切描述和解释,因此酵母培养物成分中发挥功能的主要活性成分有及其之间的协同作用,是需要进一步研究确证的问题。

[0006] 在饲料研发领域,利用代谢组学可以对饲料品质等方面作评价,目前应用最多的是评估饲用微生物在肠道定植和繁殖成优势菌群情况,以便直接研究益生菌的作用机制,有助于益生菌类饲料的开发。另外利用代谢组学快速取样技术并结合其他分析技术,可以实现快速、高频率定量对细胞内代谢物进行测定,用于监测发酵动态过程。但至今并未有应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法报道。

发明内容

[0007] 本发明基于以往有关酵母培养物的代谢组学分析方法的建立、多变量统计分析如

主成分分析等研究成果研究思想方法、在建立的气相色谱质谱联用的 GC-MS检测方法基础上,针对酵母培养物“有效物组”的探究,开展的研发。从而为实现客观、准确、快捷地评价酵母培养物产品品质,科学认识其功能实质提供了重要的研究参考依据。因为酵母培养物的代谢产物很多,本发明专利的目的就是找出起到关键作用的物质,本发明称之为有效物组,这个组可以是一个物质也可以是多个物质的组合。

[0008] 本发明提供了一种应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法,得出以下结论:酵母培养物有效物组作为日粮添加剂能显著提高肉仔鸡生长性能、免疫功能、对抗氧化能力和屠宰性能。

[0009] 解决上述技术问题的技术方案如下:

[0010] 本发明设计了一种应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法,是利用代谢组学的检测技术对酵母培养物有效物组进行解析,并将多变量降维的数学思路运用到挖掘有效物组的组成中,参照筛选解析的有效物组成分,采用化学单品模拟有效物组的构成关系进行配伍组合,再通过动物饲养试验对有效物组的功效进行验证。

[0011] 进一步地说,代谢组学的检测技术包括样品采集和处理、代谢物的鉴定和多元统计分析。

[0012] 样品采集和处理是选用肉鸡为样品,采集和处理方法为肉鸡于21、42日龄进行屠宰实验,每个重复选2只宰杀并解剖,解剖后将一侧盲肠结扎,置于干燥的灭菌试管中,保存于-20℃保存,待用于菌群高通量测序,每组取肉仔鸡盲肠内容物0.5g;

[0013] 更进一步地说,采用化学单品模拟有效物组的构成关系进行配伍组合具体表现为回归模型的建立与应用,所述的模型建立对生产性能中的日增重指标与筛选到的酵母培养物有效物组之间关系进行研究,利用多元统计分析方法,建立生产性能与酵母培养物有效物组的函数关系,从而进一步揭示有效物组的组合配伍与生产性能的关系。

[0014] AA肉仔鸡具有生长快,饲养周期短及饲料转化率高等优点,被广泛应用于肉鸡饲养生产中。AA肉仔鸡的生产性能的高低是直接影响到生产水平和经济效益的一个重要指标。而饲料的配方、鸡舍的温度、光照等因素影响着肉仔鸡的生产性能。

[0015] 通过肉仔鸡饲养试验,筛选出生产性能最佳的发酵产品为发酵24h的酵母培养物,生产性能较差的是发酵60h的酵母培养物,为了找到造成这种差异的物质,因此在这两组中寻找潜在生物标志物即有效物组的组成。OPLS-DA使用 SIMCA-P-13.0 (Umetrics AB, Umeå, Sweden) 软件完成,模型的拟合度及解释率都较高,其中 R^2X (cum) 和 R^2Y (cum) 分别表示模型对X和Y矩阵的解释率, Q^2 (cum) 表示模型的可预测度。 R^2X (cum) 为0.963, R^2Y (cum) 为0.998, Q^2 (cum) 为0.653, R^2 和 Q^2 值通常高于0.4说明模型尚可,越接近越说明模型越稳定可靠。(具体操作见实施例部分详细说明)

[0016] 1) 模型建立定义

[0017] 取各试验组且不同饲养时期的日增重数据,将日增重设定为Y;将酵母培养物有效物组筛选得到的其组成即生物标志物甘氨酸、果糖、肌醇、吡喃(型) 半乳糖、蔗糖相对地分别标注为X1、X2、X3、X4、X5。X表示各组中某物质的采食量, X_n 为 X_n 峰面积/ X_n 所在产品组别总峰面积*采食量。利用SPSS进行回归分析,建立了日增重与有效物组中各物质的回归方程 $Y=f(x)$ 。

[0018] 2) 回归方程建立

[0019] 第一步在SPSS中输入相关数据,通过酵母培养物有效物组筛选得到的其组成成分X1、X2、X3、X4、X5及相对应的日增重y。计算数据的基本统计量,结果如下表所示:

[0020]

描述统计													
	个案数	范围	最小值	最大值	总和	平均值		标准差	方差	偏度		峰度	
	统计	统计	统计	统计	统计	统计	标准误差	统计	统计	统计	标准误差	统计	标准误差
y	72	41.41	30.79	72.20	3683.16	51.1550	1.78244	15.12449	228.750	-.227	.283	-1.457	.559
Glycine	72	7.150708312	.0047251270	7.155433439	242.2842635	3.365059215	.2228352272	1.890819603	3.575	-.007	.283	-.778	.559
fructose	72	2.428995080	.0443039680	2.473299048	48.98026193	.6802814158	.0450210250	.3820160651	.146	1.824	.283	6.526	.559
Inositol	72	2.070177011	.0015772390	2.071754250	31.22459198	.4336748886	.0553047351	.4692762390	.220	1.916	.283	3.276	.559
D-(+)-Galactopyranose	72	2.907897202	.0694721810	2.977369383	35.53275461	.4935104807	.0552359304	.4686924113	.220	3.272	.283	13.042	.559
sucrose	72	9.782533292	.0000000000	9.782533292	35.72790891	.4962209570	.1779022238	1.509550426	2.279	4.926	.283	25.754	.559
有效个案数 (成列)	72												

[0021] 第二步是计算X1、X2、X3、X4、X5与y的偏相关性,结果如下表所示,经 spss计算,从表中结果可以看出X1、X2、X3、X4、X5与y之间均存在较强相关性,存在组建回归方程的可能。

[0022]

相关性					相关性				
控制变量			y	Glycine	控制变量			y	fructose
fructose & Inositol & D-(+)-Galactopyranose & sucrose	y	相关性	1.000	.412	Inositol & D-(+)-Galactopyranose & sucrose & Glycine	y	相关性	1.000	.348
		显著性 (双尾)	.	.000			显著性 (双尾)	.	.004
		自由度	0	66			自由度	0	66
Glycine		相关性	.412	1.000	fructose		相关性	.348	1.000
		显著性 (双尾)	.000	.			显著性 (双尾)	.004	.
		自由度	66	0			自由度	66	0

相关性					相关性				
控制变量			y	Inositol	控制变量			y	D-(+)-Galactopyranose
D-(+)-Galactopyranose & sucrose & Glycine & fructose	y	相关性	1.000	.267	sucrose & Glycine & fructose & Inositol	y	相关性	1.000	.260
		显著性 (双尾)	.	.028			显著性 (双尾)	.	.032
		自由度	0	66			自由度	0	66
Inositol		相关性	.267	1.000	D-(+)-Galactopyranose		相关性	.260	1.000
		显著性 (双尾)	.028	.			显著性 (双尾)	.032	.
		自由度	66	0			自由度	66	0

相关性					相关性				
控制变量			y	sucrose	控制变量			y	sucrose
Glycine & fructose & Inositol & D-(+)-Galactopyranose	y	相关性	1.000	.101	sucrose		相关性	.101	1.000
		显著性 (双尾)	.	.413			显著性 (双尾)	.	.
		自由度	0	66			自由度	66	0

[0023] 第三步,根据数据绘制散点图;在相关性分析的基础之上,根据散点图特点,结合曲线估计可确认各成分与生产性能之间关系大致为立方函数。通过非线性回归分析得出回归方程基本结构:

[0024]
$$Y = m + n \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot x_4 \cdot x_5 + a_1 \cdot x_1 \cdot x_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_1 \cdot x_1 + a_3 \cdot x_1 + b_1 \cdot x_2 \cdot x_2 \cdot x_2 + b_2 \cdot x_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_2 + c_1 \cdot x_3 \cdot x_3 \cdot x_3 + c_2 \cdot x_3 \cdot x_3 + c_3 \cdot x_3 + d_1 \cdot x_4 \cdot x_4 \cdot x_4 + d_2 \cdot x_4 \cdot x_4 + d_3 \cdot x_4 + e_1 \cdot x_5 \cdot x_5 \cdot x_5 +$$

$e2*x5*x5+e3*x5$

[0025] 指定各参数系数的初始数值。经spss计算,得到回归方程中各参数系数(即 X1、X2、X3、X4、X5与y在回归方程中的系数)结果如下:

迭代历史记录^a

[0026]

迭代编号 ^a	残差平方和	参数																
		m	n	a1	a2	a3	b1	b2	b3	c1	c2	c3	d1	d2	d3	e1	e2	e3
1.0	2136452.796	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
1.1	3465.265	32.994	-1.458	-.612	7.506	-22.364	-.819	-2.756	24.360	1.848	-13.526	19.290	7.630	-32.987	38.317	-.134	2.059	-6.071
2.0	3465.265	32.994	-1.458	-.612	7.506	-22.364	-.819	-2.756	24.360	1.848	-13.526	19.290	7.630	-32.987	38.317	-.134	2.059	-6.071
2.1	3465.265	32.994	-1.458	-.612	7.506	-22.364	-.819	-2.756	24.360	1.848	-13.526	19.291	7.630	-32.987	38.317	-.134	2.059	-6.071

将通过数字计算来确定导数。

[0027]

参数估算值相关性

	m	n	a1	a2	a3	b1	b2	b3	c1	c2	c3	d1	d2	d3	e1	e2	e3
m	1.000	.262	-.231	.244	-.230	-.594	.615	-.583	-.495	.548	-.613	-.140	.139	-.121	-.285	.338	-.415
n	.262	1.000	.044	-.058	.037	-.303	.217	-.120	-.342	.342	-.365	.172	-.149	.075	-.401	.450	-.500
a1	-.231	.044	1.000	-.979	.863	-.038	.055	-.087	.016	-.036	.076	-.036	.016	.126	-.106	.072	
a2	.244	-.058	-.979	1.000	-.941	.113	-.131	.160	-.027	.044	-.081	.028	-.005	-.028	-.103	.082	-.046
a3	-.230	.037	.863	-.941	1.000	-.218	.250	-.302	.060	-.076	.105	-.038	.018	.024	.064	-.045	.012
b1	-.594	-.303	-.038	.113	-.218	1.000	-.983	.894	.293	-.297	.312	-.159	.196	-.235	.254	-.291	.338
b2	.615	.217	.055	-.131	.250	-.983	1.000	-.956	-.273	.278	-.293	.171	-.214	.271	-.234	.273	-.323
b3	-.583	-.120	-.087	.160	-.302	.894	-.956	1.000	.181	-.184	.194	-.213	.256	-.333	.148	-.181	.230
c1	-.495	-.342	.016	-.027	.060	.293	-.273	.181	1.000	-.985	.911	-.063	.088	-.122	.349	-.403	.493
c2	.548	.342	-.036	.044	-.076	-.297	.278	-.184	-.985	1.000	-.965	.057	-.081	.115	-.370	.428	-.527
c3	-.613	-.365	.076	-.081	.105	.312	-.293	.194	.911	-.965	1.000	-.069	.089	-.119	.422	-.488	.596
d1	-.140	.172	-.036	.028	-.038	-.159	.171	-.213	-.063	.057	-.069	1.000	-.983	.897	-.103	.118	-.154
d2	.139	-.149	.016	-.005	.018	.196	-.214	.256	.088	-.081	.089	-.983	1.000	-.958	.121	-.138	.177
d3	-.121	.075	.011	-.028	.024	-.235	.271	-.333	-.122	.115	-.119	.897	-.958	1.000	-.129	.146	-.188
e1	-.285	-.401	.126	-.103	.064	.254	-.234	.148	.349	-.370	.422	-.103	.121	-.129	1.000	-.982	.875
e2	.338	.450	-.106	.082	-.045	-.291	.273	-.181	-.403	.428	-.488	.118	-.138	.146	-.982	1.000	-.948
e3	-.415	-.500	.072	-.046	.012	.338	-.323	.230	.493	-.527	.596	-.154	.177	-.188	.875	-.948	1.000

参数估算值

参数	估算	标准误差	95% 置信区间	
			下限	上限
m	32.994	6.638	19.692	46.297
n	-1.458	3.650	-8.774	5.857
a1	-.612	.129	-.872	-.353
a2	7.506	1.352	4.797	10.215
a3	-22.364	4.079	-30.537	-14.190
b1	-.819	6.443	-13.730	12.093
b2	-2.756	23.289	-49.427	43.916
b3	24.360	23.112	-21.957	70.678
c1	1.848	8.158	-14.501	18.197
c2	-13.526	23.867	-61.357	34.304
c3	19.291	19.369	-19.525	58.106
d1	7.630	3.413	.789	14.470
d2	-32.987	14.683	-62.413	-3.561
d3	38.317	16.611	5.028	71.606
e1	-.134	.117	-.369	.101
e2	2.059	1.672	-1.293	5.410
e3	-6.071	6.111	-18.318	6.177

ANOVA^a

源	平方和	自由度	均方
回归	201188.056	17	11834.592
残差	3465.265	55	63.005
修正前总计	204653.321	72	
修正后总计	16241.271	71	

因变量: y

a. R 方 = 1 - (残差平方和) / (修正平方和) = .787。

[0028] 由结果可知, $R^2=0.79$ 即回归方程拟合度约为80%,拟合度较为理想,此回归函数可以信任。代入各参数系数,得到回归方程如下:

[0029] $Y=32.994-1.458*x1*x2*x3*x4*x5-0.612*x1*x1*x1+7.506*x1*x1-22.364*x1-$

$0.819 \times x_2^2 \times x_2^2 - 2.756 \times x_2 \times x_2 + 24.360 \times x_2 + 1.848 \times x_3 \times x_3 \times x_3 - 13.526 \times x_3 \times x_3 + 19.291 \times x_3 + 7.630 \times x_4 \times x_4 \times x_4 - 32.987 \times x_4 \times x_4 + 38.317 \times x_4 - 0.134 \times x_5 \times x_5 \times x_5 + 2.059 \times x_5 \times x_5 - 6.071 \times x_5$ 。

[0030] 为从数学统计的角度验证选取的五种成分是否为决定生产性能的主要因素,根据已获得的X1、X2、X3、X4、X5与y之间的回归方程,进行如下计算:

[0031] (1) 选取y值。根据实验数据,选取在现有条件下,添加全部成分时所能获取的最佳生产性能值。把该值作为下一步计算的y值。

[0032] (2) 把上一步得到的y值带入已知的X1、X2、X3、X4、X5与y之间回归方程,同时根据现有试验条件指定X1、X2、X3、X4、X5的取值范围。编写vb 计算程序,计算在指定范围内是否存在能通过回归方程得到指定y值的X1、X2、X3、X4、X5。经计算得到符合要求的X1、X2、X3、X4、X5。

[0033] (3) 计算上一步得到的X1、X2、X3、X4、X5间的比值。在实践中按得到的比值调配X1、X2、X3、X4、X5五种成分的比例,经验证得到的生产性能值和指定的y值不存在显著性差异,继而证明,只选取五种成分同样可以达到选取全部成分所能达到的生产性能值。

[0034] (4) 本数学模型仅适用于在正常肉仔鸡实践生产范围内,有一定的局限性。

[0035] 该方法具体包括以下步骤:

[0036] (1) 采用单因素完全随机分组设计,选取336羽1日龄健康体重相近的 AA (爱拔益加) 肉仔鸡,公母各半随机分为7组,每组6个重复,每个重复8 只鸡;试验期为42d;

[0037] 酵母培养物有效物组筛选分组:对照组饲喂基础日粮,在基础日粮中添加5 个时间差异化培养物的酿酒酵母培养物,各处理组添加量为0.192% (比例为发酵液干物质质量/饲料质量), (即发酵时间分别为YC-12h、YC-24h、YC-36h、YC-48h、YC-60h), 以及达农威益康VXP产品。

[0038] DZ为对照组饲喂基础日粮,ABC组为酵母培养物有效物组,即分别饲喂在基础日粮基础上添加有效物组3个配伍组合,D组饲喂发酵24h的酵母培养物 (YC24h), E、F组为XP组,在基础日粮基础上分别添加0.1%、1% “XP” 饲料添加剂;整个试验周期饲料中不添加抗生素与其他促生长剂;

[0039] 所述的有效物组为甘氨酸、果糖、肌醇、吡喃 (型) 半乳糖、蔗糖;试验日粮分配表如下表所示:

[0040]

试验组	DZ 组	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组	F 组
基础日粮	√	√	√	√	√	√	√
试验日粮	0 对照	配伍 1	配伍 2	配伍 3	24hYC	0.1%XP	1%XP

[0041] ABC组在YC中所占比例配伍情况如下表所示:

配伍	物质在 YC 中所占比例%				
	甘氨酸 X1	果糖 X2	肌醇 X3	半乳糖 X4	蔗糖 X5
[0042]	1	4.13	0.63	0.53	0.84
	2	3.72	0.56	0.477	0.756
	3	4.54	0.69	0.58	0.92

[0043] 各物质配伍说明:取生产性能为发酵24hYC产品的日增重,得到相应的X 值,即配伍1(有效物组A);在此基础上调整各物质的比例,所述的比例为各物质±10%,配置各物质的含量,为配伍2和3(有效物组B、C组);

[0044] (2) 血清样品采集:在21日龄和42日龄时,随机选择2只健康和体重相近的鸡从颈静脉采血,采血前12h对试验鸡停料不停水;采血收集完成后,于室温放置待血清析出后将其分装于离心管中,3000r/min离心10min,取其上清分装于Eppendorf试管中,并立即浸入液氮,置-80℃低温保存,用于生化分析用;

[0045] 器官组织样品采集:在21日龄和42日龄时,随机选择2只健康和体重相近的试验鸡,空腹12h后进行屠宰。取胸腺、脾脏、肌胃、腺胃和法氏囊用滤纸吸去血渍,剔除脂肪后称鲜重并记录,样品保存在-80℃待用;

[0046] 肌肉样品的采集:于试验第42日结束时每个重复随机选取与该重复平均体重相近的肉鸡2只,颈静脉放血致死,取胸肌和腿肌样品(去除脂肪和结缔组织),称重并记录;

[0047] (3) 生产性能:试验在21和42日龄时,以重复为单位,分别于试验开始的1、7、14、21、28、35、42d早晨,记录鸡初始重和末重,并记录整个试验期供料量、剩余料量和损失料量,计算平均日采食量(ADFI)、平均日增重(ADG) 和料重比(F/G);

[0048] 免疫器官指数:在试验的21d和42d,从每个重复中随机选取2只鸡,空腹称体量,屠宰后,分离胸腺、法氏囊和脾脏等免疫器官并称重、记录,器官指数=器官质量(mg)/活体质量(g);

[0049] 血清生化指标:使用全自动血液生化分析仪测定血中白蛋白,球蛋白,血清尿素氮与碱性磷酸酶;

[0050] 血清免疫指标:在第21、42日龄进行屠宰,采血管收集血液,3500r/m, 4℃离心10min,取血清于1mL离心管,至于-20℃保存,用于血清总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、尿素氮(UREA)、葡萄糖(GLU)等测定,检测使用全自动生化分析仪;分泌性免疫球蛋白A(IgA)、分泌性免疫球蛋白G(IgG)用ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定;

[0051] 血清抗氧化指标:血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性和丙二醛(MDA)含量使用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定;

[0052] 屠宰性能测定:在试验42d时,每个重复各随机取2只鸡,进行屠宰测定;活体重:禁食12h,宰前称重;屠体重:屠宰后,颈静脉放血并去毛后再次称得的重量;全净膛重为屠体重去除气管、食道、嗦囊、肠、脾脏、胰腺、胆囊和生殖器官心、肝、肾、腺胃、肌胃、腹脂、头、脚的后的重量。分割左侧胸肌、腿肌并称重,分别为胸肉重和腿肉重;腹脂重主要是腹部板油及肌胃周围的脂肪的重量。计算公式:腹脂率=腹脂重/全净膛重×100%;胸肌率=胸肌重/全净膛重×100%;腿肌率=腿肌重/全净膛重×100%;全净膛率=全净膛重/活重×100%;

[0053] (4) DNA提取

[0054] 称取21日龄肉鸡的盲肠内容物0.3g于无菌PBS中,涡轮震荡30S后,10000 rpm转速下离心10min后取上清溶于DNA缓冲液中;肠道内容物DNA提取方法参照试剂盒QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit操作步骤(QIAGEN,German);

[0055] 16S r RNA基因V3~V4区的PCR扩增

[0056] 将样品DNA稀释至20ng/μL作为模板,扩增细菌16S rRNA V3-4区。使用常规引物338F(5'-ACT CCTAC G GGAGGCAGCA-3')和806R(5'-GGA CTAC H VGGGTWTCTAAT-3')。

[0057] PCR扩增体系为25μL:5×reaction buffer 5μL,5×GC buffer 5μL, dNTP (2.5mM) 2μL,正向引物(10uM) 1μL,反向引物(10uM) 1μL,模板DNA 2μL,ddH₂O 8.75μL,Q5DNA酶0.25μL.PCR扩增条件:98℃预变性2min;然后98℃变性15s,55℃退火30s,72℃延伸30s,25-30个循环;最后72℃延伸5min,10℃保持待测定.PCR扩增产物通过2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,采用AXYGEN公司的凝胶回收试剂盒切胶回收.将PCR扩增回收产物通过荧光试剂为Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit进行定量;

[0058] (5) 数据处理与分析:

[0059] 生产应用试验数据经Excel 2007初步整理后,采用SPSS 23.0统计软件中One-Way ANOVA进行方差分析,多重比较采用Duncan's法;P<0.05为差异显著,P<0.01为差异极显著,数据用“平均数±标准差(Mean±SD)”表示;

[0060] 运用QIIME软件识别疑问序列,并剔除:5'端引物错配碱基数>1的序列;含有连续相同碱基数>8的序列;再调用USEARCH检查并剔除嵌合体序列;

[0061] Alpha多样性指数:用于比较不同样本的多样性,首先对序列量拉平处理,从而校正测序深度引起的多样性差异;再使用QIIME软件分别对每个样本计算侧重于体现群落丰富度Chao1指数和ACE指数,以及兼顾群落均匀度的Shannon 指数和Simpson指数;

[0062] 进一步地说,步骤(1)中所述的基础日粮的组成由下表所示:

[0063]

日粮组成	1-21d	22-42d	营养成分	1-21d	22-42d
玉米	52.07	55.57	代谢能 (MJ/kg)	12.746	12.719

[0064]

大豆粕	35.50	34.00	粗蛋白 (%)	20.722	19.609
鱼粉	5.00	3.60	钙 (%)	0.910	0.865
大豆油	4.00	3.5	总磷 (%)	0.676	0.584
磷酸氢钙	1.00	0.70	有效磷 (%)	0.447	0.356
石粉	1.00	1.20	赖氨酸 (%)	1.347	0.459
食盐	0.30	0.30	蛋氨酸 (%)	1.248	0.432
赖氨酸	0.04	0.04			
蛋氨酸	0.09	0.09			
1%预混料	1.00	1.00			
合计	100	100			

[0065] 其中,每千克预混料包含:维生素A 5000IU;维生素D3 1500IU;维生素E 15IU;维生素K3 0.8mg;维生素B12 0.01mg;叶酸0.5mg;烟酸50 mg;泛酸8mg;生物素0.1mg;吡哆醇2.2mg;核黄素4.4mg;硫胺素1.6 mg。

[0066] 本发明的有益效果是:

[0067] 本发明设计思路清晰,得出以下结论:酵母培养物有效物组作为日粮添加剂能显著提高肉仔鸡生长性能、免疫功能、对抗氧化能力和屠宰性能。日粮中添加不同处理组对肉仔鸡21日龄及42日龄时脾脏指数、胸腺指数和法氏囊指数的影响差异不显著。在42日龄时,各添加处理组胸腺指数较对照组呈增加趋势,但并不显著;添加酵母培养物有效物组显著提高了21日龄与42日龄肉鸡的体液免疫指标;酵母培养物有效物组血清中各抗氧化指标较对照组有增加趋势,但差异不显著。而在21日龄时有效物组B与YC组D血清中MDA的含量低于对照组与XP组,其中有效物组B血清中的MDA含量最低,比对照组降低了62.27%。各处理组对42d肉仔鸡屠宰率、全净膛屠宰率、胸肌率、腿肌率无显著影响,但有一定的升高趋势。以97%作为相似性阈值统计得到8000多个OTU,且不同组别OUT数量不相同,酵母培养物及其配伍处理组较对照组数量有所减少,说明酵母培养物的添加降低了盲肠菌群的多样性,但添加处理组间并没有显著性变化。

[0068] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细的说明。

附图说明:

[0069] 图1为酵母培养物对肉仔鸡生长性能的影响;

[0070] 图2是2个发酵时间点样品的OPLS-DA得分图结果;

[0071] 图3是基于OPLS-DA得分图模式下的S-Plot载荷图;

[0072] 图4为散点图;

具体实施方式

[0073] 实施例1:

[0074] 准备原料:AA肉仔鸡购自吉林德详公司;酿酒酵母培养物由吉林农业大学吉农博瑞研发中心提供;达农威益康VXP是购于达农威中国有限公司;

[0075] N,0-双(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(BSTFA含1%TMCS)、三甲基氯硅烷是美国Sigma-Aldrich公司的TMCS;上海阿拉丁生化科技股份有限公司的色谱纯吡啶;

[0076] 美国TEDIA公司的正己烷、美国Sigma-Aldrich公司的甲氧胺盐酸盐。

[0077] 美国Agilent公司的Agilent7890A/5975C气相色谱-质谱联用仪,配有Agilent化学工作站:MSD Chem station(E.02.01.1177,Agilent),自动进样器(Agilent7683),Agilent HP-5MS(30m×0.25mm×0.25μm)石英毛细管柱。德国Hettich公司的MIKRO-22R台式低温冷冻离心机,北京博医康有限公司的FD-1冷冻干燥机。

[0078] (1)采用单因素完全随机分组设计,选取336羽1日龄健康体重相近的AA(爱拔益加)肉仔鸡,公母各半随机分为7组,每组6个重复,每个重复8只鸡;试验期为42d;

[0079] 酵母培养物有效物组筛选分组:对照组饲喂基础日粮,在基础日粮中添加5个时间差异化培养物的酿酒酵母培养物,各处理组添加量为0.192%(比例为发酵液干物质质量/饲料质量), (即发酵时间分别为YC-12h、YC-24h、YC-36h、YC-48h、YC-60h),以及达农威益康VXP产品,上述材料均由吉林农业大学吉农博瑞奶牛饲料研发中心提供。

[0080] 酵母培养物有效物组验证分组:DZ为对照组饲喂基础日粮,ABC组为酵母培养物有效物组,即分别饲喂在基础日粮基础上添加有效物组3个配伍组合,D组饲喂发酵24h的酵母培养物(YC24h),E、F组为XP组,在基础日粮基础上分别添加0.1%、1%“XP”饲料添加剂;整个试验周期饲料中不添加抗生素与其他促生长剂;

[0081] 所述的有效物组为甘氨酸、果糖、肌醇、吡喃(型)半乳糖、蔗糖;试验日粮分配表如下表所示:

[0082]

试验组	DZ组	A组	B组	C组	D组	E组	F组
基础日粮	√	√	√	√	√	√	√
试验日粮	0对照	配伍1	配伍2	配伍3	24hYC	0.1%XP	1%XP

[0083] ABC组在YC中所占比例配伍情况如下表所示:

[0084]

配伍	物质在 YC 中所占比例%
----	---------------

[0085]

	甘氨酸 X1	果糖 X2	肌醇 X3	半乳糖 X4	蔗糖 X5
1	4.13	0.63	0.53	0.84	0.11
2	3.72	0.56	0.477	0.756	0.099
3	4.54	0.69	0.58	0.92	0.12

[0086] 各物质配伍说明:取生产性能为发酵24hYC产品的日增重,得到相应的X值,即配伍1(有效物组A);在此基础上调整各物质的比例,所述的比例为各物质 $\pm 10\%$,配置各物质的含量,为配伍2和3(有效物组B、C组);

[0087] (2) 血清样品采集:在21日龄和42日龄时,随机选择2只健康和体重相近的鸡从颈静脉采血,采血前12h对试验鸡停料不停水;采血收集完成后,于室温放置待血清析出后将其分装于离心管中,3000r/min离心10min,取其上清分装于Eppendorf试管中,并立即浸入液氮,置 -80°C 低温保存,用于生化分析用;

[0088] 器官组织样品采集:在21日龄和42日龄时,随机选择2只健康和体重相近的试验鸡,空腹12h后进行屠宰。取胸腺、脾脏、肌胃、腺胃和法氏囊用滤纸吸去血渍,剔除脂肪后称鲜重并记录,样品保存在 -80°C 待用;

[0089] 肌肉样品的采集:于试验第42日结束时每个重复随机选取与该重复平均体重相近的肉鸡2只,颈静脉放血致死,取胸肌和腿肌样品(去除脂肪和结缔组织),称重并记录;

[0090] (3) 生产性能:试验在21和42日龄时,以重复为单位,分别于试验开始的1、7、14、21、28、35、42d早晨,记录鸡初始重和末重,并记录整个试验期供料量、剩余料量和损失料量,计算平均日采食量(ADFI)、平均日增重(ADG)和料重比(F/G);

[0091] 免疫器官指数:在试验的21d和42d,从每个重复中随机选取2只鸡,空腹称体量,屠宰后,分离胸腺、法氏囊和脾脏等免疫器官并称重、记录,器官指数=器官质量(mg)/活体质量(g);

[0092] 血清生化指标:使用全自动血液生化分析仪测定血中白蛋白,球蛋白,血清尿素氮与碱性磷酸酶;

[0093] 血清免疫指标:在第21、42日龄进行屠宰,采血管收集血液,3500r/m, 4°C 离心

10min,取血清于1mL离心管,至于-20℃保存,用于血清总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、尿素氮(UREA)、葡萄糖(GLU)等测定,检测使用全自动生化分析仪;分泌性免疫球蛋白A(IgA)、分泌性免疫球蛋白G(IgG)用ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定;

[0094] 血清抗氧化指标:血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性和丙二醛(MDA)含量使用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定;

[0095] 屠宰性能测定:在试验42d时,每个重复各随机取2只鸡,进行屠宰测定;活体重:禁食12h,宰前称重;屠体重:屠宰后,颈静脉放血并去毛后再次称得的重量;全净膛重为屠体重去除气管、食道、嗦囊、肠、脾脏、胰腺、胆囊和生殖器官心、肝、肾、腺胃、肌胃、腹脂、头、脚的后的重量。分割左侧胸肌、腿肌并称重,分别为胸肉重和腿肉重;腹脂重主要是腹部板油及肌胃周围的脂肪的重量。计算公式:腹脂率=腹脂重/全净膛重 \times 100%;胸肌率=胸肌重/全净膛重 \times 100%;腿肌率=腿肌重/全净膛重 \times 100%;全净膛率=全净膛重/活重 \times 100%;

[0096] (4) DNA提取

[0097] 称取21日龄肉鸡的盲肠内容物0.3gg于无菌PBS中,涡轮震荡30S后,10000 rpm转速下离心10min后取上清溶于DNA缓冲液中;肠道内容物DNA提取方法参照试剂盒QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit操作步骤(QIAGEN,German),样品16S rRNA基因V3-V4区的PCR扩增由上海派森诺科技股份有限公司完成;

[0098] 16S rRNA基因V3~V4区的PCR扩增

[0099] 将样品DNA稀释至20ng/ μ L作为模板,扩增细菌16S rRNA V3-4区。使用常规引物338F(5'-ACT CCTAC G GGAGGCAGCA-3')和806R(5'-GGA CTAC H VGGGTWTCTAAT-3'),MiSeq测序平台检测。

[0100] PCR扩增体系为25 μ L:5 \times reaction buffer 5 μ L,5 \times GC buffer 5 μ L, dNTP (2.5mM) 2 μ L,正向引物(10uM) 1 μ L,反向引物(10uM) 1 μ L,模板DNA 2 μ L,ddH₂O 8.75 μ L,Q5DNA酶0.25 μ L.PCR扩增条件:98℃预变性2min;然后98℃变性15s,55℃退火30s,72℃延伸30s,25-30个循环;最后72℃延伸5min,10℃保持待测定。PCR扩增产物通过2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,采用AXYGEN公司的凝胶回收试剂盒切胶回收。将PCR扩增回收产物通过荧光试剂为Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit进行定量;

[0101] (5) 数据处理与分析:

[0102] 生产应用试验数据经Excel 2007初步整理后,采用SPSS 23.0统计软件中One-Way ANOVA进行方差分析,多重比较采用Duncan's法;P<0.05为差异显著,P<0.01为差异极显著,数据用“平均数 \pm 标准差(Mean \pm SD)”表示;

[0103] 采用Illumina MiSeq平台对群落DNA片段进行双端(Paired-end)测序;首先对FASTQ格式的双端序列逐一作质量筛查,要求截断后的序列长度 \geq 150 bp,且不允许存在模糊碱基;再利用FLASH软件,对通过质量初筛的双端序列进行配对连接;最后,根据样本所对应的Index信息,将连接后的序列识别分配入对应样本,获得样本的有效序列;

[0104] 运用QIIME软件识别疑问序列,并剔除:5'端引物错配碱基数>1的序列;含有连续相同碱基数>8的序列;再调用USEARCH检查并剔除嵌合体序列;

[0105] Alpha多样性指数:用于比较不同样本的多样性,首先对序列量拉平处理,从而校正测序深度引起的多样性差异;再使用QIIME软件分别对每个样本计算侧重于体现群落丰

富度Chao1指数和ACE指数,以及兼顾群落均匀度的Shannon 指数和Simpson指数;

[0106] 进一步地说,步骤(1)中所述的基础日粮的组成由下表所示:

[0107]

日粮组成	1-21d	22-42d	营养成分	1-21d	22-42d
玉米	52.07	55.57	代谢能 (MJ/kg)	12.746	12.719
大豆粕	35.50	34.00	粗蛋白 (%)	20.722	19.609
鱼粉	5.00	3.60	钙 (%)	0.910	0.865
大豆油	4.00	3.5	总磷 (%)	0.676	0.584
磷酸氢钙	1.00	0.70	有效磷 (%)	0.447	0.356
石粉	1.00	1.20	赖氨酸 (%)	1.347	0.459
食盐	0.30	0.30	蛋氨酸 (%)	1.248	0.432
赖氨酸	0.04	0.04			
蛋氨酸	0.09	0.09			
1%预混料	1.00	1.00			
合计	100	100			

[0108] 其中,每千克预混料包含:维生素A 5000IU;维生素D3 1500IU;维生素E 15IU;维生素K3 0.8mg;维生素B12 0.01mg;叶酸0.5mg;烟酸50 mg;泛酸8mg;生物素0.1mg;吡哆醇2.2mg;核黄素4.4mg;硫胺素1.6 mg。

[0109] 由图1可知,在整个试验期7-42d,试验组料重比(F/G)均优于对照组,其中添加酿酒酵母培养物组对肉仔鸡的料重比(F/G)都有不同程度的降低趋势,其中YC24组显著低于对照组。

[0110] 酵母培养物有效物组的筛选

[0111] 根据肉仔鸡饲养试验,筛选出生产性能最佳的发酵产品为发酵24h的酵母培养物(YC24组),生产性能较差的是发酵60h的酵母培养物(YC60组),为了找到造成这种差异的物质,因此在这2组中寻找潜在生物标志物即有效物组的组成。OPLS-DA使用SIMCA-P-13.0(Umetrics AB, Umeå, Sweden)软件完成,模型的拟合度及解释率都较高,其中 R^2X (cum)和 R^2Y (cum)分别表示模型对X和Y矩阵的解释率, Q^2 (cum)表示模型的可预测度。 R^2X (cum)为0.963, R^2Y (cum)为0.998, Q^2 (cum)为0.653, R^2 和 Q^2 值通常高于0.4说明模型尚可,越接近与1说明模型越稳定可靠。2个发酵时间点样品的OPLS-DA得分图结果如图2,可以直观看出发酵24h组与发酵60h组有着较好的分离。图3是基于OPLS-DA得分图模式下的S-Plot载荷图。在载荷图中可变量,数据点距离原点越远据点的贡献是正性的,反之则为负性的关性,数据点距离原点越远则为负相关。所以,在S型曲线两端的数据对分别代表了每个样本组中可信度最高的化合物,即特征代谢物。首先与NIST质谱数据库的比对,这2组的差异代谢物质整理见下表。

[0112]

序号	组分名称		保留时间 min	可能性%
1	Propanoic acid	丙酸	9.702	91
2	Acetic acid	乙酸	10.252	91
3	l-Alanine	L-丙氨酸	11.345	96
4	Propanedioic acid	丙二酸	16.067	74
5	L-Leucine	L-亮氨酸	19.74	78
6	l-Threonine	L-苏氨酸	20.489	74
7	Glycine	甘氨酸	20.824	90
8	Butanedioic acid	琥珀酸	21.065	98
9	Pyrimidine	间二氮苯	21.779	91
10	L-Proline	脯氨酸	27.009	98
11	Carbamoylglycine	海因酸	31.301	86
12	Glutamic acid	谷氨酸	31.646	85
13	Phosphoric acid	磷酸	38.742	94
14	DL-Ornithine	DL-鸟氨酸	40.101	99
15	fructose	果糖	42.269	83
16	d-Mannose	甘露糖	42.725	91
17	L-Tyrosine	左旋酪氨酸	43.49	95
18	Inositol	肌醇	44.359	95
19	D-(+)-Galactopyranose	吡喃（型）半乳糖	45.108	94
20	D-Talopyranose	D-塔罗糖	48.471	80
21	Octadecanoic acid	十八酸	49.813	91
22	Sucrose	蔗糖	61.391	96

[0113] 注：上述物质都被包含在2组中。

[0114] 筛选标志物的标准是VIP值 >1 且P值 <0.05 。在差异物质中筛选符合VIP 值 >1 且P值 <0.05 的物质。筛选到VIP值大于1的代谢产物后,对B、E组分别行独立样本t检验,在这些代谢产物中以 $p<0.05$ 为筛选标准,最终得出酵母培养物的生物标志物即有效物组的组成。特征代谢物见下表。由下表可知,筛选到10种生物标志物,酵母培养物的生物标志物即有效物组的组成主要为氨基酸和糖类。其中甘氨酸、果糖、肌醇与酵母培养物产品达农威V XP报道的主要成一致。

[0115]

序号	保留时间	物质	中文名称	VIP	P 值
1	20.824	Glycine	甘氨酸	3.9	0.05
2	31.301	Carbamoylglycine	海因酸	1.3	0.12
3	40.101	DL-Ornithine	鸟氨酸	0.9	0.13
4	41.245	9H-Purin-6-amine	嘌呤	1.1	0.12
5	42.269	fructose	果糖	4.7	0.039
6	44.161	2,6-Diaminopimelic acid	2,6-二氨基庚二酸	2.8	0.06
7	44.359	Inositol	肌醇	1.7	0.05
8	45.108	D-(+)-Galactopyranose	吡喃(型)半乳糖	2.1	0.046
9	48.471	D-Talose	D-塔罗糖	1.2	0.059
10	61.391	sucrose	蔗糖	3.4	0.002

[0116] 生物标志物的确定:为了确证这些物质的存在,我们进一步定量定性表中物质,最终筛选并确定以下5种物质为酵母培养物的生物标志物即有效物组成分见下表。

[0117]

序号	保留时间	物质	中文名称	VIP	P 值	相对含量%	
						B	E
1	20.824	Glycine	甘氨酸	3.9	0.05	2.979	2.555
2	42.269	fructose	果糖	4.7	0.039	0.221	0.169
3	44.359	Inositol	肌醇	1.7	0.05	0.204	0.214
4	45.108	D-(+)-Galactopyranose	吡喃(型)半乳糖	2.1	0.046	0.233	0.348
5	61.391	sucrose	蔗糖	3.4	0.002	0.159	0.107

[0118] 回归模型的建立与应用

[0119] AA肉仔鸡具有生长快,饲养周期短及饲料转化率高等优点,被广泛应用在肉鸡饲养生产中。AA肉仔鸡的生产性能的高低是直接影响到生产水平和经济效益的一个重要指标。而饲料的配方、鸡舍的温度、光照等因素影响着肉仔鸡的生产性能。本模型建立对生产性能中的日增重指标与筛选到的酵母培养物有效物组之间关系进行研究,利用多元统计分析方法,建立生产性能与酵母培养物有效物组的函数关系,从而进一步揭示有效物组的组合配伍与生产性能的关系,为酵母培养物有效物组的确定提供依据。

[0120] 模型建立定义

[0121] 在试验中,取本发明各试验组且不同饲养时期的日增重数据,将日增重设定为Y;

将酵母培养物有效物组筛选得到的其组成即生物标志物甘氨酸、果糖、肌醇、吡喃(型)半乳糖、蔗糖相对应地分别标注为X1、X2、X3、X4、X5。X 表示各组中某物质的采食量, X_n 为 X_n 峰面积/ X_n 所在产品组别总峰面积*采食量。利用SPSS进行回归分析,建立了日增重与有效物组中各物质的回归方程 $Y=f(x)$ 。

[0122] 回归方程建立

[0123] 第一步在SPSS中输入相关数据,通过酵母培养物有效物组筛选得到的其组成成分X1、X2、X3、X4、X5及相对应的日增重 y 。(注:根据统计学原理,样本数据越充分,即得到的X1、X2、X3、X4、X5和 y 的数据量越大,结论越具有说服力。)计算数据的基本统计量,结果如下表所示:

[0124]

[illegible]

[0125] 第二步计算X1、X2、X3、X4、X5与y的偏相关性,结果如下表,经spss 计算,从表中结果可以看出X1、X2、X3、X4、X5与y之间均存在较强相关性,存在组建回归方程的可能。

[0126]

控制变量			y	Inositol
D-(+)-Galactopyranose & sucrose & Glycine & fructose	y	相关性	1.000	.267
		显著性 (双尾)	.	.028
		自由度	0	66
Inositol		相关性	.267	1.000
		显著性 (双尾)	.028	.
		自由度	66	0

相关性				
控制变量			y	D-(+)-Galactopyranose
sucrose & Glycine & fructose & Inositol	y	相关性	1.000	.260
		显著性 (双尾)	.	.032
	D-(+)-Galactopyranose	自由度	0	66
		相关性	.260	1.000
		显著性 (双尾)	.032	
		自由度	66	

相关性			y	Glycine
控制变量				
fructose & Inositol & D-(+)	y	相关性	1.000	.412
-Galactopyranose & sucrose		显著性 (双尾)	.	.000
		自由度	0	66
	Glycine	相关性	.412	1.000
		显著性 (双尾)	.000	.
		自由度	66	0

相关性				
控制变量			y	fructose
Inositol & D-(+)-Galactopyranose & sucrose & Glycine	y	相关性	1.000	.348
		显著性 (双尾)	.	.004
		自由度	0	66
	fructose	相关性	.348	1.000
		显著性 (双尾)	.004	.
		自由度	66	0

控制变量			y	sucrose
Glycine & fructose & Inositol & D-(+)-Galactopyranose	y	相关性	1.000	.101
		显著性 (双尾)	.	.413
		自由度	0	66
sucrose		相关性	.101	1.000
		显著性 (双尾)	.413	.
		自由度	66	0

[0127]

[0128] 第三步,根据数据绘制散点图,如图4所示:

[0129] 在相关性分析的基础之上,根据散点图特点(主要看第一行的散点趋势),结合曲线估计可确认各成分与生产性能之间关系大致为立方函数。通过非线性回归分析得出回归方程基本结构:

$$[0130] \quad Y = m + n \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot x_4 \cdot x_5 + a_1 \cdot x_1 \cdot x_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_1 \cdot x_1 + a_3 \cdot x_1 + b_1 \cdot x_2 \cdot x_2 \cdot x_2 + b_2 \cdot x_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_2 + c_1 \cdot x_3 \cdot x_3 \cdot x_3 + c_2 \cdot x_3 \cdot x_3 + c_3 \cdot x_3 + d_1 \cdot x_4 \cdot x_4 \cdot x_4 + d_2 \cdot x_4 \cdot x_4 + d_3 \cdot x_4 + e_1 \cdot x_5 \cdot x_5 \cdot x_5 + e_2 \cdot x_5 \cdot x_5 + e_3 \cdot x_5$$

[0131] 指定各参数系数的初始数值。经spss计算,得到回归方程中各参数系数(即 X1、X2、X3、X4、X5与y在回归方程中的系数)结果如下:

[0132]

迭代历史记录^b

迭代编号 ^a	残差平方和	参数																
		m	n	a1	a2	a3	b1	b2	b3	c1	c2	c3	d1	d2	d3	e1	e2	e3
1.0	2136452.796	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
1.1	3465.265	32.994	-1.458	-.612	7.506	-22.364	-.819	-2.756	24.360	1.848	-13.526	19.290	7.630	-32.987	38.317	-.134	2.059	-6.071
2.0	3465.265	32.994	-1.458	-.612	7.506	-22.364	-.819	-2.756	24.360	1.848	-13.526	19.290	7.630	-32.987	38.317	-.134	2.059	-6.071
2.1	3465.265	32.994	-1.458	-.612	7.506	-22.364	-.819	-2.756	24.360	1.848	-13.526	19.291	7.630	-32.987	38.317	-.134	2.059	-6.071

^a 将通过数字计算来确定导数。

参数估算值相关性

	m	n	a1	a2	a3	b1	b2	b3	c1	c2	c3	d1	d2	d3	e1	e2	e3
m	1.000	.262	-.231	.244	-.230	-.594	.615	-.583	-.495	.548	-.613	-.140	.139	-.121	-.285	.338	-.415
n	.262	1.000	.044	-.058	.037	-.303	.217	-.120	-.342	.342	-.365	.172	-.149	.075	-.401	.450	-.500
a1	-.231	.044	1.000	-.979	.863	-.038	.055	-.087	.016	-.036	.076	-.036	.016	.011	.126	-.106	.072
a2	.244	-.058	-.979	1.000	-.941	.113	-.131	.160	-.027	.044	-.081	.028	-.005	-.028	-.103	.082	-.046
a3	-.230	.037	.863	-.941	1.000	-.218	.250	-.302	.060	-.076	.105	-.038	.018	.024	.064	-.045	.012
b1	-.594	-.303	-.038	.113	-.218	1.000	-.983	.894	.293	-.297	.312	-.159	.196	-.235	.254	-.291	.338
b2	.615	.217	.055	-.131	.250	-.983	1.000	-.956	-.273	.278	-.293	.171	-.214	.271	-.234	.273	-.323
b3	-.583	-.120	-.087	.160	-.302	.894	-.956	1.000	.181	-.184	.194	-.213	.256	-.333	.148	-.181	.230
c1	-.495	-.342	.016	-.027	.060	.293	-.273	.181	1.000	-.985	.911	-.063	.088	-.122	.349	-.403	.493
c2	.548	.342	-.036	.044	-.076	-.297	.278	-.184	-.985	1.000	-.965	.057	-.081	.115	-.370	.428	-.527
c3	-.613	-.365	.076	-.081	.105	.312	-.293	.194	.911	-.965	1.000	-.069	.089	-.119	.422	-.488	.596
d1	-.140	.172	-.036	.028	-.038	-.159	.171	-.213	-.063	.057	-.069	1.000	-.983	.897	-.103	.118	-.154
d2	.139	-.149	.016	-.005	.018	.196	-.214	.256	.088	-.081	.089	-.983	1.000	-.958	.121	-.138	.177
d3	-.121	.075	.011	-.028	.024	-.235	.271	-.333	-.122	.115	-.119	.897	-.958	1.000	-.129	.146	-.188
e1	-.285	-.401	.126	-.103	.064	.254	-.234	.148	.349	-.370	.422	-.103	.121	-.129	1.000	-.982	.875
e2	.338	.450	-.106	.082	-.045	-.291	.273	-.181	-.403	.428	-.488	.118	-.138	.146	-.982	1.000	-.948
e3	-.415	-.500	.072	-.046	.012	.338	-.323	.230	.493	-.527	.596	-.154	.177	-.188	.875	-.948	1.000

[0133]

参数估算值

参数	估算	标准误差	95% 置信区间	
			下限	上限
m	32.994	6.638	19.692	46.297
n	-1.458	3.650	-8.774	5.857
a1	-.612	.129	-.872	-.353
a2	7.506	1.352	4.797	10.215
a3	-22.364	4.079	-30.537	-14.190
b1	-.819	6.443	-13.730	12.093
b2	-2.756	23.289	-49.427	43.916
b3	24.360	23.112	-21.957	70.678
c1	1.848	8.158	-14.501	18.197
c2	-13.526	23.867	-61.357	34.304
c3	19.291	19.369	-19.525	58.106
d1	7.630	3.413	.789	14.470
d2	-32.987	14.683	-62.413	-3.561
d3	38.317	16.611	5.028	71.606
e1	-.134	.117	-.369	.101
e2	2.059	1.672	-1.293	5.410
e3	-6.071	6.111	-18.318	6.177

ANOVA^a

源	平方和	自由度	均方
回归	201188.056	17	11834.592
残差	3465.265	55	63.005
修正前总计	204653.321	72	
修正后总计	16241.271	71	

因变量：y

a. R 方 = 1 - (残差平方和) / (修正平方和) = .787。

[0134] 由结果可知, $R^2=0.79$ 即回归方程拟合度约为80%, 拟合度较为理想, 此回归函数可以信任。带入各参数系数, 得到回归方程如下:

[0135]
$$Y=32.994-1.458*x_1*x_2*x_3*x_4*x_5-0.612*x_1*x_1*x_1+7.506*x_1*x_1-22.364*x_1-0.819*x_2*x_2*x_2-2.756*x_2*x_2+24.360*x_2+1.848*x_3*x_3*x_3-13.526*x_3*x_3+19.291*x_3+7.630*x_4*x_4*x_4-32.987*x_4*x_4+38.317*x_4-0.134*x_5*x_5*x_5+2.059*x_5*x_5-6.071*x_5$$

[0136] 回归方程应用

[0137] 为从数学统计的角度验证选取的五种成分是否为决定生产性能的主要因素, 根据已获得的X1、X2、X3、X4、X5与y之间的回归方程, 进行如下计算:

[0138] (1) 选取y值。根据实验数据, 选取在现有条件下, 添加全部成分时所能获取的最佳生产性能值。把该值作为下一步计算的y值。

[0139] (2) 把上一步得到的y值带入已知的X1、X2、X3、X4、X5与y之间回归方程, 同时根据现有试验条件指定X1、X2、X3、X4、X5的取值范围。编写vb 计算程序, 计算在指定范围内是否存在能通过回归方程得到指定y值的X1、X2、X3、X4、X5。经计算得到符合要求的X1、X2、X3、X4、X5。

[0140] (3) 计算上一步得到的X1、X2、X3、X4、X5间的比值。在实践中按得到的比值调配X1、X2、X3、X4、X5五种成分的比例, 经验证得到的生产性能值和指定的y值不存在显著性差异, 继而证明, 只选取五种成分同样可以达到选取全部成分所能达到的生产性能值。

[0141] (4) 本数学模型仅适用于在正常肉仔鸡实践生产范围内, 有一定的局限性。

[0142] 日粮中添加不同配伍的酵母培养物有效物组对肉仔鸡生产性能的影响结果由下表所示:

[0143]

项目	对照组	YC 有效物组配伍组合			YC (24h)	XP 组	
	DZ	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组 (0.1%)	F 组(1%)
7~21d (g/bird per d)							
平均日增重 ADG	33.91±0.003 ^a	38.15±0.002 ^b	39.37±0.001 ^b	38.52±0.002 ^b	37.51±0.001 ^b	40.24±0.003 ^b	37.83±0.002 ^b
平均日采食量 ADFI	58.65±0.001 ^{cd}	57.46±0.001 ^c	51.53±0.003 ^b	49.32±0.001 ^a	50.01±0.001 ^{ab}	61.21±0.001 ^e	59.92±0.001 ^{de}
料重比 (F/G)	1.74±0.11 ^c	1.55±0.07 ^b	1.35±0.09 ^a	1.32±0.06 ^a	1.37±0.04 ^a	1.57±0.11 ^b	1.63±0.08 ^{bc}
22~42d (g/bird per d)							
平均日增重 ADG	60.64±0.004	61.05±0.005	62.72±0.005	63.47±0.004	65.75±0.004	64.92±0.012	59.91±0.002
平均日采食量 ADFI	138.04±0.001 ^g	111.56±0.001 ^c	118.53±0.001 ^c	122.81±0.001 ^d	132.02±0.001 ^f	108.41±0.001 ^a	109.42±0.001 ^b
料重比 (F/G)	2.26±0.12 ^c	1.83±0.12 ^{ab}	1.93±0.12 ^b	1.88±0.12 ^{ab}	1.86±0.12 ^a	1.71±0.12 ^a	1.82±0.12 ^{ab}
7~42d (g/bird per d)							
平均日增重 ADG	49.9±0.003 ^b	51.8±0.002 ^a	53.2±0.003 ^a	55.6±0.004 ^{ab}	54.4±0.002 ^{ab}	55±0.007 ^{ab}	51.1±0.002 ^a
平均日采食量 ADFI	87.53±0.001 ^b	85.42±0.001 ^a	85.16±0.002 ^a	86.32±0.007 ^a	85.21±0.001 ^a	86.92±0.002 ^a	86.01±0.001 ^a
料重比 (F/G)	1.76±0.11 ^b	1.65±0.09 ^{ab}	1.60±0.13 ^a	1.55±0.1 ^a	1.56±0.07 ^a	1.60±0.16 ^a	1.69±0.1 ^{ab}

[0144] 注:同行数据肩表字母全部不相同为差异显著 ($P<0.05$), 无肩表或肩标有一个字母相同者即为差异不显著 ($P>0.05$)。

[0145] 由上表可知,在7~21日龄,与对照组相比,各添加处理组可显著提高肉仔鸡日增重、显著降低料重比 ($P<0.05$),对日采食量也有显著影响 ($P<0.05$)。其中有效物组 (ABC) 日增重均大于D组 (YC24h) ($P>0.05$),较D组 (YC24h) 分别提高1.71%、4.96%和2.69%,XP (0.1%) 组日增重略高于有效物组。而各处理组体均显著低于对照组 ($P<0.05$),其中以有效物组C的料重比最低。除有效物组A,对照组的采食量显著高于其他各处理组 ($P<0.05$)。

[0146] 在22~42日龄,各添加处理组对肉仔鸡采食量、料重比有显著影响 ($P<0.05$),对日增重影响不显著 ($P>0.05$)。其中对照组的采食量显著高于其他各添加处理组 ($P<0.05$)。与对照组相比,各添加处理组的日增重呈增加趋势,但差异不显著 ($P>0.05$)。而各处理组的料重比较对照组显著降低 ($P<0.05$),但各处理组间的料重比差异不显著 ($P>0.05$)。

[0147] 在7~42日龄,各添加处理组对肉仔鸡日增重、采食量、料重比均有显著影响 ($P<0.05$),与对照组相比,各添加组的日增重都显著高于对照组 ($P<0.05$),采食量、料重比均显著低于对照组 ($P<0.05$),但各添加组间差异不显著 ($P>0.05$)。各个处理组间,有效物组C料重比最低,与D组 (YC24h) 组基本相同。

[0148] 从多方面生产指标比较酵母培养物有效物组与发酵24h产品的饲养效果比较,有效物组的配伍组合的效果能达到甚至超过发酵产品的应用效果,说明在本试验条件下,筛选得到的生物标志物可认为是酵母培养物有效物组的主要成分组合。

[0149] 日粮中添加不同处理的酵母培养物对肉仔鸡血清生化指标的影响

[0150] 饲料中添加不同处理的酵母培养物对肉仔鸡血清生化指标的影响见下表。结果表明,饲料中添加不同添加处理组对21日龄和42日龄肉鸡血清总蛋白质、白蛋白、谷草转氨酶、碱性磷酸酶、血清尿素氮及血清球蛋白均有不同程度的影响。

[0151] 21日龄时,对于血清总蛋白、白蛋白,血清球蛋白各试验处理组含量较对照组均有所提高,但差异并不显著 ($P < 0.05$)。对于谷草转氨酶,配伍组AB含量显著小于对照组 ($P < 0.05$),与对照组相比,有效物物组A、B组含量分别降低13.71% ($P < 0.05$)、13.39% ($P < 0.05$)。而各试验处理组间无显著差异 ($P > 0.05$)。对于碱性磷酸酶,各试验处理组含量均高于对照组,其中有效物组C 含量显著高于对照组与XP组 ($P < 0.05$)。对于血清尿素氮,各试验处理组含量均显著低于对照组 ($P < 0.05$),其中以E、F组 (XP组) 含量最低,分别较对照组降低42.33% ($P < 0.05$)、48.17% ($P < 0.05$)。

[0152] 42日龄时,对于血清总蛋白、谷草转氨酶、碱性磷酸酶及血清球蛋白,各试验处理组含量分别较对照组有所提高,但与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。对于白蛋白,D组 (YC组) 含量显著高于有效物组A ($P < 0.05$),但与其他各组差异不显著 ($P > 0.05$)。对于血清尿素氮,有效物组C与E、F组 (XP) 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$),其中以E组最低,C组次之。有效物组ABC与 D组 (YC24h) 比较无显著差异 ($P > 0.05$)。

[0153]

组别	总蛋白 TP g/L	白蛋白 ALB g/L	谷草转氨酶 AST U/L	碱性磷酸酶 ALP U/L	血清尿素氮 BUN mmol/L	血清球蛋白 GLB U/L
21 日龄 21d						
DZ 组	25.16±2.4	8.27±0.86	221.86±46.46 ^b	10165.86±5407.33 ^a	1.37±0.3 ^d	16.85±1.71

[0154]

A 组	24.98±2.31	8.48±1.0	191.45±20.98 ^a	15834.32±6064.12 ^{ab}	0.95±0.19 ^{bc}	16.50±1.64
B 组	26.53±2.79	8.91±0.58	192.14±18.58 ^a	13425.71±7339.43 ^{ab}	0.98±0.19 ^c	17.63±2.36
C 组	27.18±2.06	8.93±0.65	195.52±31.3 ^{ab}	21010.41±13064.77 ^b	1.03±0.18 ^c	18.25±1.54
D 组	26.56±2.68	8.91±0.85	213.45±37.91 ^{ab}	17806.69±11957.9 ^{ab}	1.08±0.25 ^{bc}	17.65±2.06
E 组	26.58±1.35	8.77±0.66	197.65±21.96 ^{ab}	10924.61±9958.47 ^a	0.79±0.16 ^a	17.81±0.86
F 组	26.47±2.73	8.33±0.79	198.48±14.72 ^{ab}	11405.58±5035.35 ^a	0.71±0.16 ^a	18.14±2.09
42 日龄 42d						
DZ 组	31.68±2.77	11.06±1.03 ^{ab}	285.17±45.54	3751.62±1315.43	0.70±0.18 ^c	20.69±2.17
A 组	30.24±3.47	10.18±1.23 ^a	302.93±42.82	2732.07±1752.76	0.60±0.24 ^{bc}	20.08±2.36
B 组	32.05±1.97	11.19±0.72 ^b	318.83±107.71	3781.79±1651.65	0.72±0.10 ^c	20.79±1.59
C 组	32.16±3.77	10.68±1.13 ^{ab}	276.76±30.70	4193.26±1822.64	0.52±0.07 ^{ab}	21.48±3.04
D 组	31.41±2.65	11.56±1.62 ^b	303.3±39.32	2436.82±806.62	0.59±0.19 ^{bc}	19.83±1.41
E 组	31.71±2.89	10.60±0.66 ^{ab}	280.57±27.91	3563.16±1480.75	0.44±0.10 ^a	21.28±2.33
F 组	31.47±1.54	11.16±0.55 ^b	273.42±37.75	3034.933±1140.76	0.55±0.06 ^{ab}	20.31±1.14

[0155] 注：同行数据肩表字母全部不相同为差异显著 ($P < 0.05$)，无肩表或肩标有一个字母相同者即为差异不显著 ($P > 0.05$)。

[0156] 日粮中不同添加处理酵母培养物对肉仔鸡免疫器官指数的影响见下表。

[0157] 由表可知日粮中添加不同处理组对肉仔鸡21日龄及42日龄时脾脏指数、胸腺指数和法氏囊指数的影响差异不显著 ($P > 0.05$)。在42日龄时，各添加处理组胸腺指数较对照组呈增加趋势，但并不显著 ($P > 0.05$)。

[0158]

组别	脾脏指数	胸腺指数	法氏囊指数
21 日龄 21d			
DZ 组	1.21±0.3	2.56±0.82	2.57±0.55
A 组	1.12±0.23	2.29±0.88	2.62±0.96
B 组	1.01±0.19	2.52±1.0	2.84±0.82
C 组	1.19±0.17	1.86±0.58	2.31±0.39
D 组	1.11±0.61	1.94±0.62	2.63±1.17
E 组	1.12±0.19	1.93±0.75	2.51±0.65
F 组	1.05±0.24	2.11±0.54	2.63±0.69
42 日龄 42d			
DZ 组	1.79±0.68	1.55±1.01	2.04±0.84
A 组	1.55±0.47	1.78±0.95	2.09±0.41

[0159]

B 组	1.72±0.7	1.83±0.96	1.81±0.83
C 组	2.06±0.48	1.83±0.41	2.00±0.46
D 组	1.97±0.48	1.88±0.52	1.91±0.23
E 组	1.81±0.66	1.92±0.63	2.07±0.32
F 组	1.82±0.51	1.61±0.45	1.75±0.43

[0160] 注:同列数据肩标相同字母者表示差异不显 ($P>0.05$), 字母不同者表示差异显著 ($P<0.05$)。

[0161] 日粮中添加不同配伍的酵母培养物有效物组对肉仔鸡IgA、IgG的影响如下表所示。

[0162] 由表可知,21与42日龄,与对照组相比,各试验处理组IgA、IgG含量均有所升高。其中21日龄时,F组IgA的含量显著高于对照组 ($P<0.05$),而其余各组间无显著差异 ($P>0.05$)。有效物组C的IgG含量显著高于对照组 ($P<0.05$)。42日龄时,有效物组B中IgA、IgG的含量均显著高于对照组 ($P<0.05$)。

[0163]

组别	IgA($\mu\text{g/ml}$)	IgG($\mu\text{g/ml}$)
21 日龄 21d		
DZ 组	40.46 \pm 6.011 ^a	289.143 \pm 18.918 ^a
A 组	52.119 \pm 18.325 ^a	406.571 \pm 129.059 ^{ab}
B 组	46.325 \pm 2.75 ^a	340.857 \pm 16.036 ^a
C 组	31.857 \pm 16.951 ^a	1040.571 \pm 978.822 ^b
D 组	40.333 \pm 4.3A、IgG 的含量均显	738.857 \pm 587.118 ^{ab}
E 组	49.286 \pm 9.607 ^a	604.857 \pm 195.487 ^{ab}
F 组	92.365 \pm 30.284 ^b	721.143 \pm 145.134 ^{ab}
42 日龄 42d		
DZ 组	52.263 \pm 7.68 ^a	518.25 \pm 92.238 ^a
A 组	70.789 \pm 30.229 ^a	614.25 \pm 247.119 ^a
B 组	241.667 \pm 168.104 ^b	1769.75 \pm 1327.848 ^b
C 组	113.281 \pm 59.176 ^{ab}	846.5 \pm 370.803 ^a
D 组	110.895 \pm 68.744 ^{ab}	825.5 \pm 401 ^a
E 组	100.93 \pm 81.338 ^a	651.25 \pm 366.537 ^a
F 组	126.579 \pm 74.647 ^{ab}	804.75 \pm 349.08 ^a

[0164] 注：同列数据肩标相同字母者表示差异不显 ($P>0.05$)，字母不同者表示差异显著 ($P<0.05$)。

[0165] 日粮中添加不同配伍的酵母培养物有效物组对肉仔鸡血清抗氧化指标的影响如下表所示：

[0166] 从表可以看出，对于21日龄肉仔鸡，与对照组相比，日粮中添加XP产品的E、F组能显著性的提高血清中GPX，SOD和CAT的活性 ($P<0.05$)。其他添加处理组血清中各抗氧化指标较对照组有增加趋势，但差异不显著 ($P>0.05$)。有效物组B与D组血清中MDA的含量低于对照组与XP组，其中有效物组B血清中的MDA含量最低，比对照组降低了62.27% ($P>0.05$)。对于42日龄肉仔鸡，与对照组相比，各添加处理组血清中GPX，SOD和CAT活性均有不同程度的提高，而血清中MDA的含量较对照组略有升高，但影响作用不明显 ($P>0.05$)。

[0167]

组别	谷胱甘肽还原酶 GPX(U/L)	丙二醛 MDA(nmol/ml)	超氧化物歧化酶 SOD(U/mL)	过氧化氢酶 CAT(U/mL)
21 日龄 21d				
DZ 组	33.56±2.156 ^a	1.41±0.17 ^{ab}	69.57±11.76 ^a	12.47±2.74 ^a
A 组	39.11±8.346 ^{ab}	1.48±0.516 ^{ab}	60.07±27.35 ^a	15.18±6.56 ^a
B 组	36.88±2.81 ^{ab}	1.11±0.563 ^a	90.21±15.06 ^{ab}	13.33±1.72 ^a
C 组	34.56±1.653 ^a	1.43±0.273 ^{ab}	57.64±9.054 ^a	10.54±0.84 ^a
D 组	39.98±2.92 ^{ab}	1.26±0.32 ^{ab}	81.786±14.74 ^{ab}	13.39±1.56 ^a
E 组	48.59±14.707 ^{bc}	2.57±1.712 ^{bc}	122.86±51.99 ^{bc}	15.52±3.06 ^a
F 组	58.98±13.77 ^c	3.38±1.125 ^c	158.28±56.03 ^c	30.48±7.67 ^b
42 日龄 42d				
DZ 组	26.97±4.59	2.42±0.23	59.74±6.96	15.37±2.69
A 组	40.00±17.37	3.40±1.14	92.31±46.43	22.09±8.36
B 组	65.04±18.35	4.72±6.49	78.7±27.59	35.19±5.46
C 组	60.27±28.60	4.63±2.18	73.58±5.61	34.08±16.68
D 组	62.51±41.10	4.30±2.17	83.97±27.11	35.35±24.32
E 组	58.14±53.52	3.76±2.23	80.70±34.91	27.54±18.01
F 组	62.55±31.66	5.09±2.92	108.03±78.7	44.99±20.27

[0168] 注：同列数据肩标相同字母者表示差异不显 ($P>0.05$)，字母不同者表示差异显著 ($P<0.05$)。

[0169] 日粮中添加不同配伍的酵母培养物有效物组对肉仔鸡屠宰性能的影响如下表所示：

[0170] 从表中可知，与对照组相比，各处理组对42d肉仔鸡屠宰率、全净膛屠宰率、胸肌率、腿肌率无显著影响 ($P>0.05$)，但有一定的升高趋势。其中，添加处理组与对照组比全净膛率分别提高了5.92%、0.71%、5.41%、8.06%、6.26%、7.42%。各处理组与对照组比胸肌率分别提高了6.79%、9.81%、16.07%、15.68%、15.36%、13.98%。而腹脂率DEF组较对照组有所下降 ($P>0.05$)，有效物组B的腹脂率显著高于E组(XP组)，而各处理组间差异不显著 ($P>0.05$)。

[0171]

组别	屠宰率%	全净膛屠宰率%	胸肌率%	腿肌率%	腹脂率%
42 日龄 42d					
DZ 组	93.52±0.01	70.20±0.22	76.14±24.18	69.21±0.02	0.99±0.004 ^{ab}
A 组	93.47±0.01	74.36±0.02	81.31±25.5	76.09±0.01	1.08±0.004 ^{ab}
B 组	94.35±0.02	70.70±0.21	83.61±26.94	68.06±0.02	1.18±0.006 ^b
C 组	93.47±0.01	74.00±0.03	88.38±5.74	71.04±0.01	1.02±0.002 ^{ab}
D 组	93.51±0.02	75.86±0.02	88.08±12.44	73.59±0.01	0.92±0.002 ^{ab}
E 组	92.53±0.04	74.6±0.03	87.84±8.42	70.25±0.01	0.78±0.003 ^a
F 组	93.77±0.01	75.41±0.02	86.79±9.48	74.43±0.01	0.89±0.003 ^{ab}

[0172] 注:同列数据肩标相同字母者表示差异不显 ($P>0.05$), 字母不同者表示差异显著 ($P<0.05$)。

[0173] 样品reads数及OTUs统计

[0174] 对每个样品的reads数进行统计, 总共得到1246374个序列(如下表)。用Uclstvl.2.22软件根据序列相似性进行聚类得到OTU时选择97%作为相似性阈值(Edgar等,2010)。

[0175]

样本名	测序量	样本名	测序量	样本名	测序量
DZ1	45607	B3	41346	D5	31672
DZ2	40265	B4	37465	E1	31820
DZ3	40905	B5	35196	E2	29938
DZ4	35100	C1	41573	E3	39164
DZ5	38105	C2	28576	E4	30862
A1	32950	C3	30257	E5	31336
A2	37940	C4	27457	F1	38134
A3	43141	C5	27829	F2	35609
A4	42012	D1	30212	F3	31609

[0176]

A5	40132	D2	33234	F4	29976
B1	38418	D3	37509	F5	39914
B2	39280	D4	31831		

[0177] 注:DZ1、2、3、4、5分别为21日龄对照组肉鸡盲肠内容物;ABC Z1、2、3、4、5分别为21日龄配伍组肉鸡盲肠内容物;D-12345分别为21日龄YC(24h) 肉鸡盲肠内容物;E、F-12345分别为21日龄XP组肉鸡盲肠内容物(下同)

[0178] 由结果可知每个样本的Reads数在30,000以上,最高可达40,000多,可满足后续试

验需要。各组肉鸡盲肠微生物的OTUs的数量范围在4000~8000之间,从不同日粮处理组来看,有效物组(ABC)盲肠内容物中菌群的多样性高于XP组,与D组(YC24h)多样性水平相当。

[0179] 物种多样性指数分析

[0180] Alpha多样性常用的度量指数主要包括Chao1指数、ACE指数,Shannon指数和Simpson指数。一般而言,Chao1或ACE指数越大,表明群落的丰富度越高。Shannon多样性指数综合考虑了群落的丰富度和均匀度。Shannon指数值越高,表明群落的多样性越高。Simpson指数值越高,表明群落多样性越高。

[0181]

样品名	Simpson	Chao1	ACE	Shannon
DZ	0.977655	1955.33	2079.972	7.956
A	0.956427	1587.318	1658.108	7.578
B	0.956427	1587.318	1658.108	7.578
C	0.983093	1552.804	1595.392	8.214
D	0.971534	1571.862	1579.36	7.735
E	0.980181	1565.542	1588.652	8.046
F	0.978281	1669.62	1770.232	8.004

[0182] 由表可知,Chao1、ACE指数,对照组均高于试验处理组,但差异不显著。说明对照组微生物的数目要多于其他实验组,有效物组(ABC)与D组(YC24h)丰度基本相同。对于Simpson、Shannon指数,有效物组C高于其他各组,但各组间差异不显著,说明配伍组C微生物多样性要丰富一些,并且该组中各物种之间个体分配越均匀。同时说明有效物组C各物质比例调配能够增加盲肠的菌群多样性。而添加XP组,也同样较对照组丰富了菌群的丰度及多样性。

[0183] 本发明思路清晰,通过试验后得出结论:酵母培养物有效物组对肉仔鸡生长性能明显提高;日粮中添加不同处理组对肉仔鸡21日龄及42日龄时脾脏指数、胸腺指数和法氏囊指数的影响差异不显著($P>0.05$)。在42日龄时,各添加处理组胸腺指数较对照组呈增加趋势,但并不显著($P>0.05$);添加酵母培养物有效物组显著提高了21日龄与42日龄肉鸡的体液免疫指标($P<0.05$);酵母培养物有效物组血清中各抗氧化指标较对照组有增加趋势,但差异不显著($P>0.05$)。而在21日龄时有效物组B与YC组D血清中MDA的含量低于对照组与XP组,其中有效物组B血清中的MDA含量最低,比对照组降低了62.27%($P>0.05$)。各处理组对42d肉仔鸡屠宰率、全净膛屠宰率、胸肌率、腿肌率无显著影响($P>0.05$),但有一定的升高趋势。以97%作为相似性阈值统计得到8000多个OTU,且不同组别OUT数量不相同,酵母培养物及其配伍处理组较对照组数量有所减少,说明酵母培养物的添加降低了盲肠菌群的多样性,但添加处理组间并没有显著性变化。

[0184] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明做任何形式上的限制,凡是依据本发明的技术实质上对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化,均落入本发明的保护范围之内。

料重比

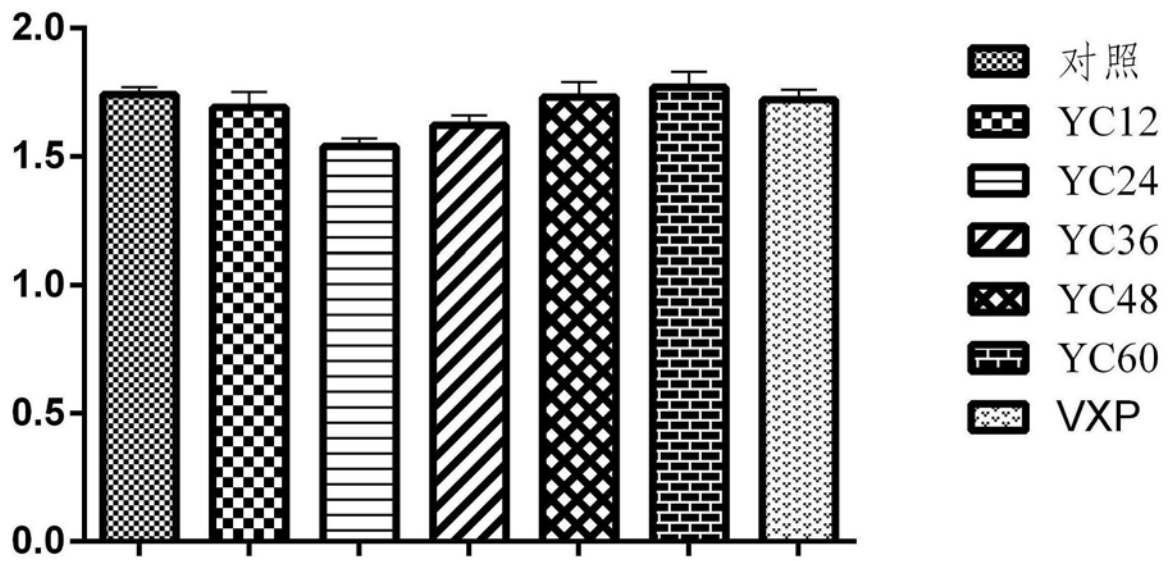


图1

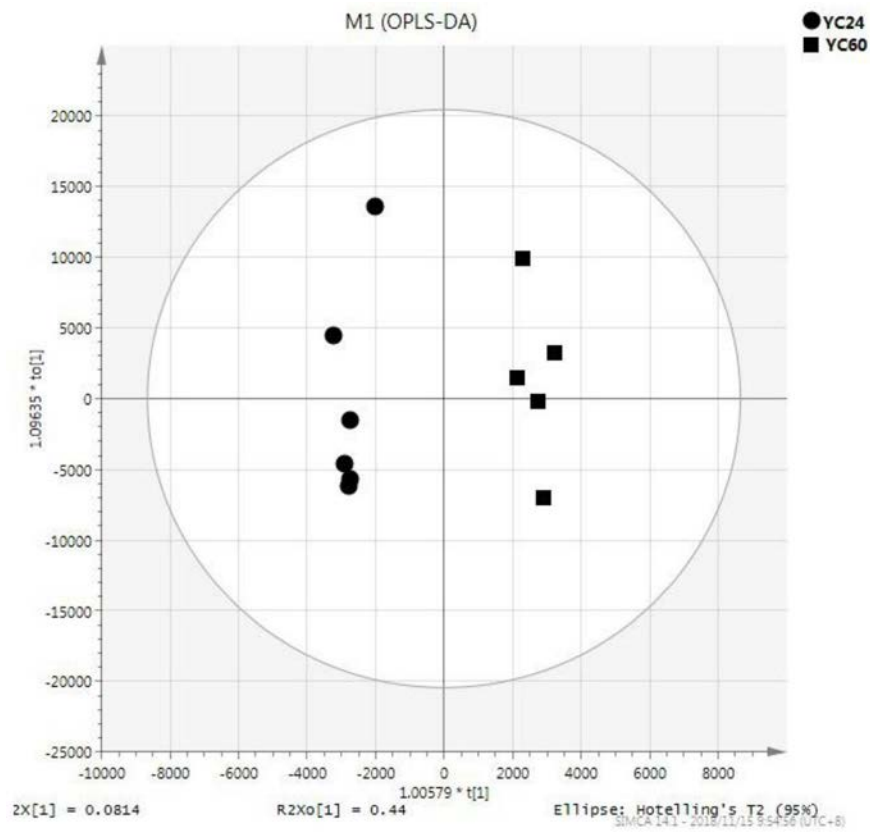


图2

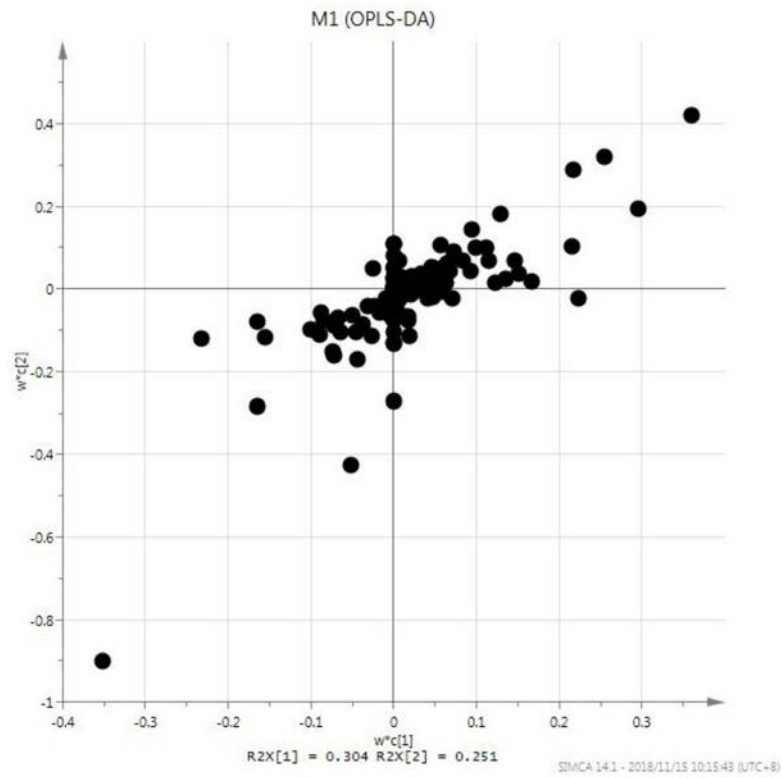


图3

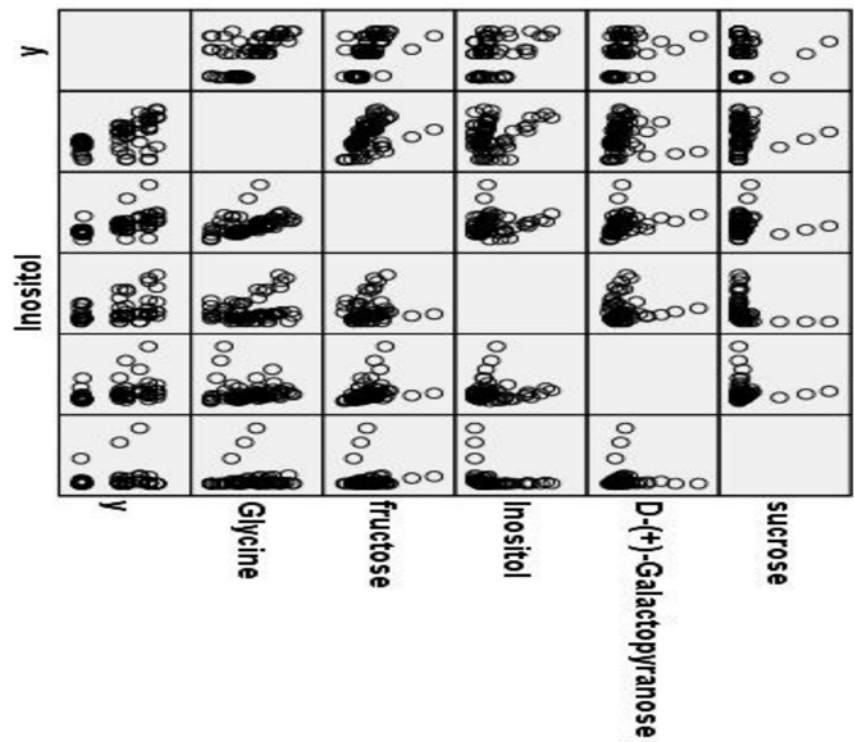


图4

专利名称(译)	一种应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法		
公开(公告)号	CN109856384A	公开(公告)日	2019-06-07
申请号	CN201811470093.9	申请日	2018-11-28
[标]发明人	甄玉国 孙喆 王涛 张学峰 赵巍 陈雪 赵小丽 郑艳秋 张玲玲 张维刚 谭胜男		
发明人	甄玉国 孙喆 王涛 张学峰 赵巍 陈雪 赵小丽 郑艳秋 张玲玲 张维刚 谭胜男		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N30/02 G01N30/06 C12Q1/689 C12Q1/04		
代理人(译)	王程远		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及微生物有效物组评价领域，具体地涉及一种应用代谢组学技术评价酵母培养物有效物组的方法，利用代谢组学的检测技术对酵母培养物有效物组进行解析，并将多变量降维的数学思路运用到挖掘有效物组的组成中，参照筛选解析的有效物组成分，采用化学单品模拟有效物组的构成关系进行配伍组合，再通过动物饲养试验对有效物组的功效进行验证。得出以下结论：酵母培养物有效物组作为日粮添加剂能显著提高肉仔鸡生长性能、免疫功能、以及抗氧化能力和屠宰性能。

