

让肠道告诉你...

都润肠讯

都润肠道健康研究中心主办

人类微生物菌群基因组的
研究方法 (II)

11

第十一期

猪全价料产品设计定位与技术营销策略



dorun
for the real health

contents



基础理论:

人类微生物菌群基因组的研究方法 (II) -----

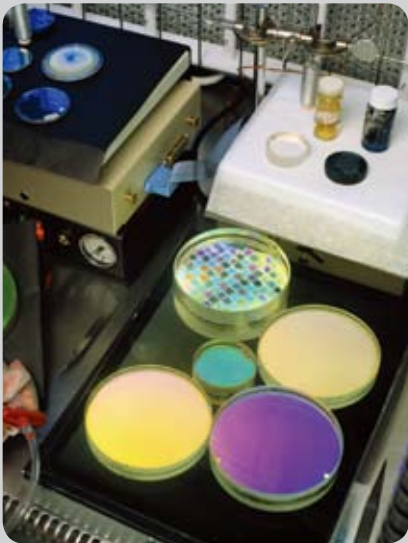
03



专家论坛:

猪全价料产品设计定位与技术营销策略 -----

10



研究进展:

益生菌微生物——鉴定、代谢和对家禽生理的影响 -----

08

基础理论

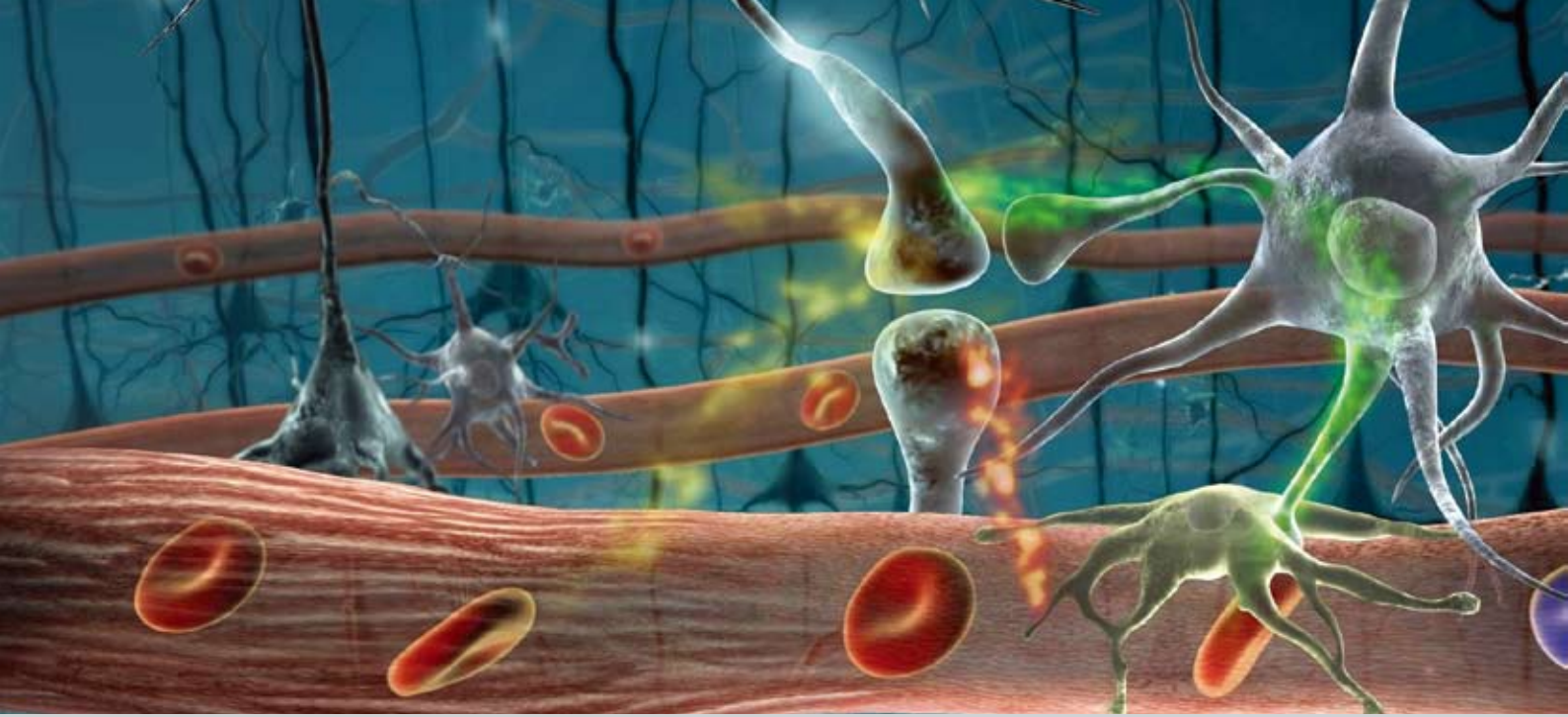
人类微生物菌群基因组的研究方法（II）

鸟枪法测序对微生物进行分类

相比之下,人类病毒和噬菌体的基因组特征的识别鉴定是研究的热点,称为virome。这项工作主要是基于鸟枪测序,尽管在病毒检测也使用寡核苷酸微阵列法。从鸟枪法的片段中检测到病毒序列的数据,病毒基因的无需DNA抽提即可扩增。 Virome的鸟枪测序分析微生物群落(稍后讨论)导致人类病毒的识别,以及检测已知病毒的健康受试者和原因不明的疾病。同样的,细菌噬菌体的发现根据个体差异或疾病状态,表现出高度多样化。

基因测序和功能的推断

宏基因组鸟枪法可以从中抽取到菌群基因内容的样本,这对于菌群功能的确定和特定组成菌的识别有重要意义。对较小基因组成分样本的深度测序,如MetaHIT和HMP项目,可以促进特定



菌群中基因的识别。通过序列的读取,或先组装成重叠群,可以与数据库中的序列数据进行比对,如美国国立卫生研究院的基因库 GenBank,来确定哪些基因是存在。从宏基因组数据中通过从头测序的方法预测基因也是可能的,为序列功能的推断提供方向,即使序列数据库中没有找到匹配。最后,通过已知生物及其基因序列,通过对齐读取序列或参考基因组重叠群确定其功能。这些方法使得宏基因组序列数据可以转换成基因序列目录,可以进一步分析。

这些基因目录可以与数据库进行比对,如京都基因和基因组的百科全书(KEGG),根据基因的代谢途径和过程进行分类。这种分析提供了途径,列表识别哪些通路基因在社区和量化基因和通路的丰度。此基因目录与代谢数据库相比较,如碳水化合物活性酶数据库也很有用。菌群的碳水化合物降解能力在不同的个体不同的功能,这意味着现有微生物和代谢途径下,菌群的碳水化合物代谢谱可以确定。

除了途径分析,菌群中基因功能和丰富度的确定可以使用类似的方法,例如抗药基因或毒性因子,并能揭示出个体的病原体 and 抗生素治疗的后果。功能分析是研究的重点,菌群功能比菌种分类更重要。

运用的计算工具和策略

宏基因组测序的数据是测序和分析信息的丰富来源。数据分析工作流程有三个阶段:第一阶段,主要取决于应用程序对数据的处理和过滤。16s rRNA基因测序分析的质量非常重要这样才不会出现错误。首先处理阅读质量,由于有嵌合现象(由不同的16s rRNA基因组成的阅读框),并需要消除低质量碱基对和相关基因后读取其长度。鸟枪法序列测序的数据包括重复阅读框,以及通过计算消除被人类的序列所污染的序列。对于病毒组的分析人类和细菌序列的消除是重要的一步(图1)。

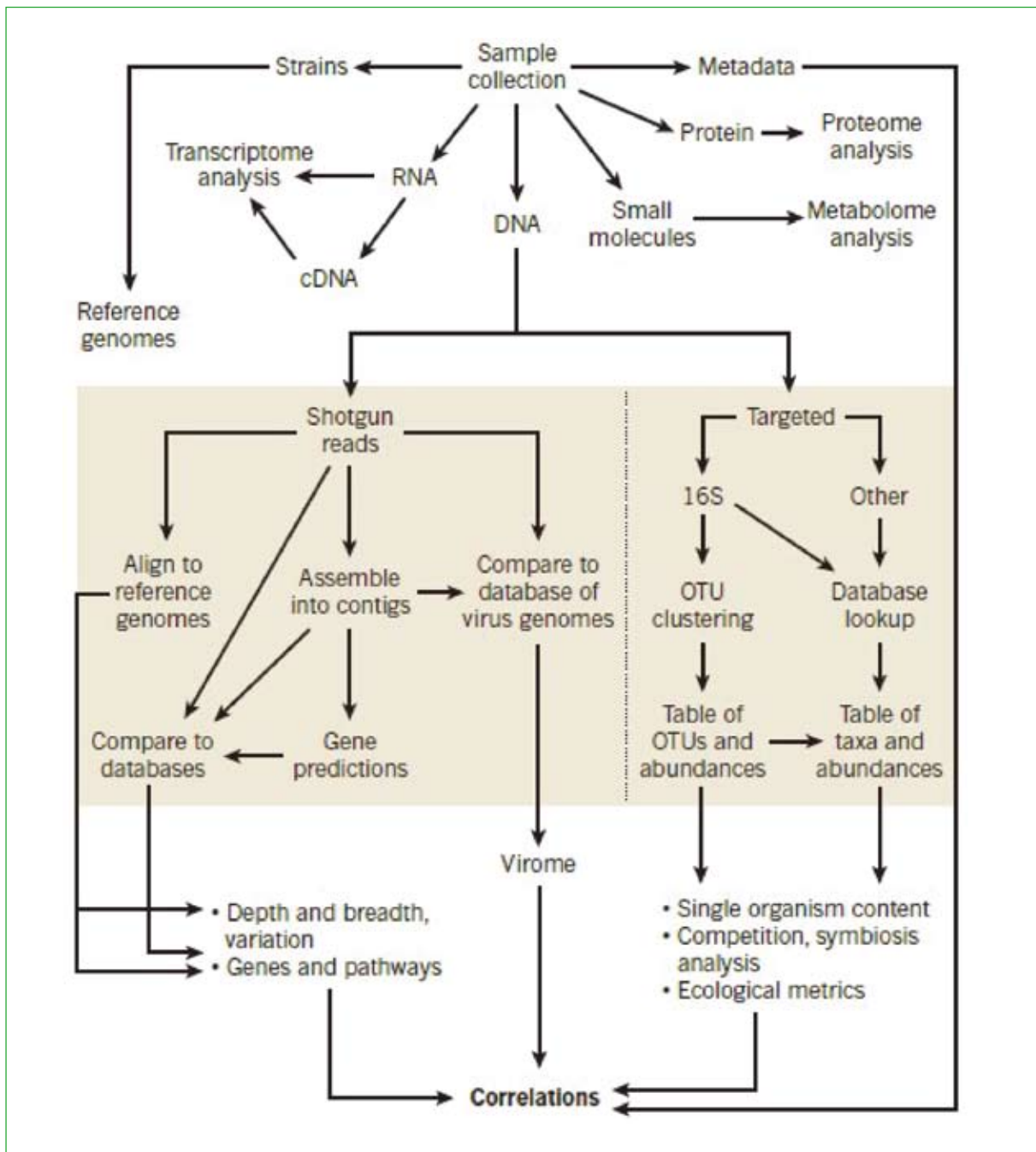


图1 微生物组分析所需数据和工作分析流程。

微生物菌群样本中提取DNA、RNA和蛋白质,获得原数据和菌株。DNA可以对蛋白质组数据进行补充以及转录组分析。在初步分析中,使用鸟枪法获取DNA序列, 比对参考基因组以确定变异和菌群遗传学特性, 通过邻接片段的组装进行基因预测, 或与数据库相比对。另外,有针对性的测序如以16s rRNA基因测序对菌群组成进行分析,在数据库中进行比对后创建不同种属的类群和丰富度,或用软件程序分析菌群创建菌种的丰度。衍生的数据用于接下来分析生态指标或竞争性或共生性分析。此外,鸟枪法克隆基因后与参考基因组或者数据库中的基因进行比对可以用来构建途径和菌群重构。这些分析方法的综合应用将有助于理解不同菌群间和个体内部的差异。

读取处理后的阅读框后,第二阶段包括生成各种衍生数据集。16s rRNA基因分析,其类群和丰度是通过与16s rRNA序列数据库进行比对或通过使用软件包来读取操作分类单位(OUTs)。比较鸟枪读取基因数据库可以通过基因库或者KEGG库,使用局部比对搜索工具(BLAST),来生成一系列相似基因和基因的匹配度。与每个参考基因组对齐,读取其覆盖的广度和深度。每一个数据集都可以收集到更多的生物信息并通过进一步分析补充。不是所有阅读框都可以匹配到数据库,因为不是所有的基因都有测序的参考基因组。此外,可能匹配的基因功能可能尚未阐明。这些来历不明的序列可以是相当大的部分,并且这部分数据的分析和结论的影响还不清楚。

第三阶段的分析使用这些数据形成系统发育树或者其他相似的结构图来标识丰富曲线,生物多样性和其他生态和群落结构的统计描述符(图1)。从BLAST中构建代谢途径来确定菌群的功能。通过与参考基因组比对确定变异和种群遗传学来进一步分析菌群组成和功能。计算分析也可以用来确定哪些菌种属于共生或竞争关系,还是遵循纵向时间序列的群落结构动态。

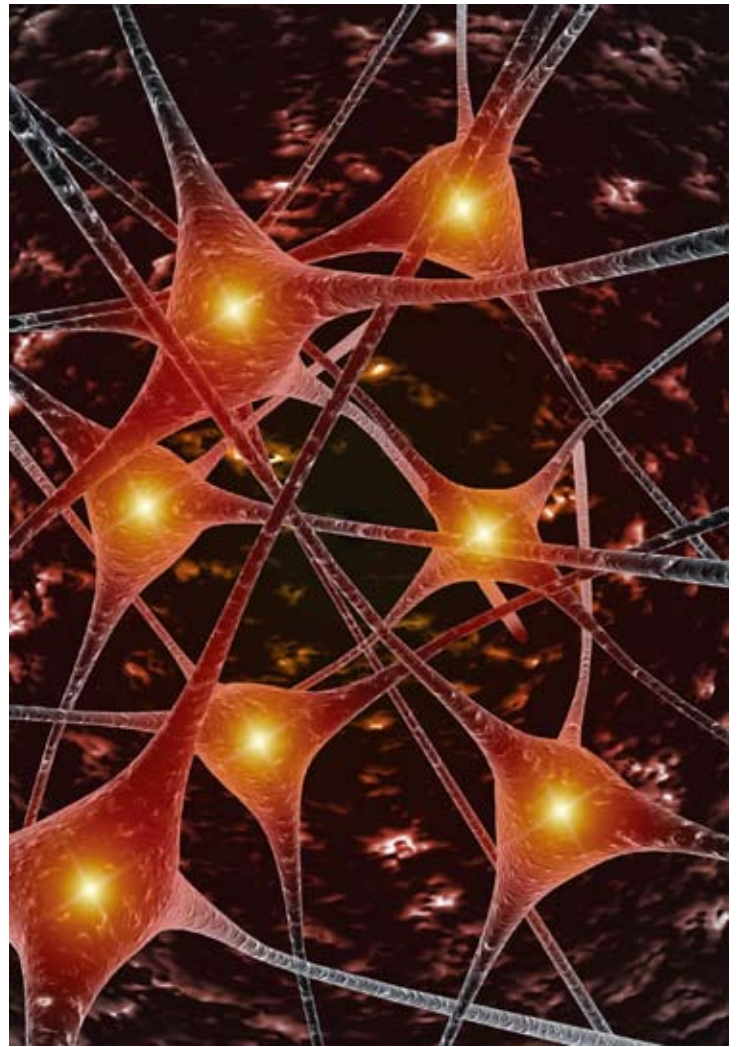
这些分析带来巨大的计算挑战。在蛋白质水平比较基因数据库要求很特别,因为要求鸟枪序列必须被翻译成多肽所翻译出的所有六个阅读框架,并在蛋白质水平与基因数据库进行比对。使用这种传统的BLAST在大型

数据集的对比,比如HMP,可能需要几十年,所以使用超级计算机,或者加速BLAST程序或二者共同使用。宏基因组分析中测序和数据产生并不是限制因素,瓶颈是缺乏有效的软件和足够大的计算机集群。大型数据集和计算资源的管理与云计算服务是一个可行的选择,得到了更多的关注。

未来的发展方向和面临的挑战

宏基因组研究已经解决了许多问题,但随着技术的发展,又出现了新的问题。现有的方法越来越复杂而且测序技术也长足发展。Illumina公司平台的仪器更适合测序短的基因组序列,拥有更快的运行速度和长的阅读框,为宏基因组的应用提供更大的灵活性。长阅读PacBio平台有助于区分读取来自不同生物的序列。Oxford Nanopore的技术可以长时间读取序列并缩短可变系统的运行时间,因此适合微生物的应用程序。减少鸟枪测序所需的DNA使得在较小的解剖区域的菌群检测成为可能,如胃肠道内。短运行时工具和样本量的减少加速微生物分析引入临床中,更加快速分析患者样本,并处理数量有限的材料,从而达到研究人与微生物关系的目的,应用于临床中治疗和预防的工具。

使用鸟枪法的主要限制是没有大量的可培养生物,更不用说是测序。这些生物数据库的数据不具备代表性。菌群的鸟枪法数据拼接为新的基因组时,由于生物丰度较低,基因序列



重叠群一般较小，并且拼接一个复杂的混合物是很有难度的。PacBio的阅读长度和Oxford Nanopore工具对宏基因组的拼接等有所帮助。对不可培养组织相关参考基因组目录的扩展是现在研究的热点。在高通量模式下,使用细胞归类的方法分离生物,使用单细胞DNA测序和拼接技术,产生新的基因序列,使得鸟枪法宏基因组分析菌群的方法更完整。

与基因组数据相关的一个问题是,它并没有解决机体是否活着或者死于宿主防御或抗生素治疗。然而,数据可以与转录组分析,或蛋白质组和代谢组数据来完善,分析基因表达

和代谢的数据,特别是来自活细胞的。

人类遗传学和基因组学的同步发展为宿主与微生物表型基因型的研究提供机会。微生物组特征和相关的宿主基因型正在研究中。宿主与微生物研究进展也来自免疫学和人类与微生物的研究的结合。此外,统计方法在微生物研究的应用也为试验设计和分析提供了支持。

注：上述内容参考自：“[Genomic approaches to studying the human microbiota](#)”



研究进展

益生菌微生物——鉴定、代谢
和对家禽生理的影响

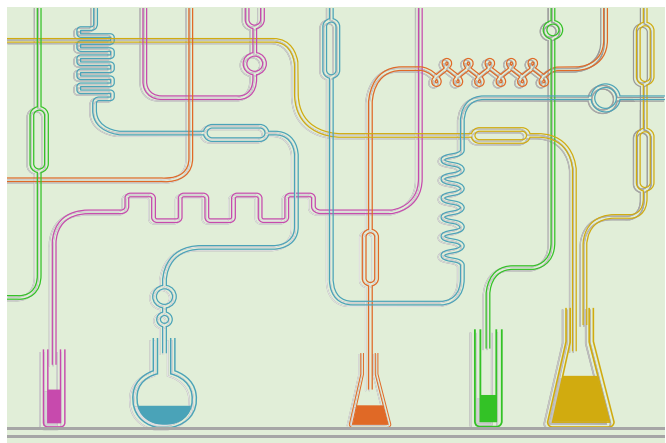


益生菌的分离和筛选是根据特定的菌种生理特性、在消化道中的耐受性、肠道内增殖能力、对免疫系统的作用、抗菌因子和定殖能力、对于加工的抵抗性以及其功效和安全性做为标准来进行筛选决定的，尤其是乳杆菌和双歧杆菌。

尽管将通过体外方法获得的结果应用在体内存在困难，菌株的初步筛选仍为益生菌筛选的第一步。

不同的菌株显示不同的菌种特征，其中一些表现出强烈的拮抗活性，其他具备优势的技术特点（如便于生产或热加工），还有一些安全性较高（如抗菌药物敏感性）。

复杂的肠道环境可能需要引入混合菌株才能达到益生效果。体外实验表明，益生菌具有病原体排除能力。例如，在欧盟的C-EX项目中，各种肠道细菌（特别侧重于乳酸菌和双歧杆菌）从不同的鸡的胃肠道来源分离并检测其抗菌活性、粘附性、发酵特性以及抗生素敏感性模式。如Giemsa染色和琼脂板试验所表明的，粘附于Caco-2细胞的能力在被测试菌株中有很大的不同，并发现是高度菌株特异性。有效的菌株具备家禽病原体抗性方面特性后，再就进一步的选择标准，包括生长和发酵性能、PH降低、生物安全（如缺乏致病因素、药物敏感性、以及缺乏临床相关的抗生素的质粒联抗性）来进行评估(Klose et al., 2006)。



注：以上内容参考自“World's Poultry Science Journal, 2013



专家论坛

猪全价料产品设计定位与技术营销策略

孟德连 博士

广东旺大集团研发中心副总监。动物营养学博士。毕业后在西北农林科技大学任教，先后供职于湖南正虹集团，江西正邦集团，陕西石羊集团等企业。从业十多年来，一直工作于猪营养与生产的第一线，对猪产业发展有独到的见解。现在主要从事猪的前期营养研究与技术推广工作。本次论坛中孟博士与技术人员就养猪生产的效益分析、猪全价料产品设计定位整体思路、猪全价料产品阶段设计技术方案等问题展开深入的探讨。

在西北有句俗话说“家有万贯，带毛的不算”，真实反映养猪盈利的不确定性，实际在养猪生产效益存在一个金三角，效益围绕3块开展，分别是生殖道、呼吸道和消化道，其中生殖道的健康与成活率、产子率相关；呼吸道与仔猪的成活率相关；消化道的健康关系到猪能否长的好，只有这三块健康好了猪场才能最终赚到钱。种猪的种质资源是重要的元素。在营养成本上比普通种猪料在种猪经营成绩中占四成，管理人员占六成。前期料首先解决适应性问题，第二块是抵抗力问题，从而为后期体重的增长打下坚实的基础。

2006年在猪高热病高发时期，湖南某猪场由于在全期猪料中添加植物提取物，没有发生疾病的爆发，由此可见长期保健，非抗生素的使用提高动物免疫力。再例如，猪的拉稀这一常见问题需要综合性处理方式，猪的腹泻有营养性、环境性、病毒性等类型，这是营养师要针对实际情

况来判断。所以如何做系统化营养，接下来进行分析：

1、健康猪群

最好的抗病力来自猪群的健康。饲料配方中要求无违规、违禁、超标成分的使用，抗应激效果明显并且无二次污染。

2、系统化连续设计

所谓系统的连续性就是将健康动物交给下一环节。产品组合更显实力，每个产品盈利点不同。在产品设计时按照猪的生理规律，阶段饲养，精确饲喂。分析客户的产品结构看是否符合规律，当其前期料量大时这种企业可能在后期料中可以通过技术手段使其所需产品量有所突破，让客户赚到钱从而保证客户的稳定性。

3、典型的瘦肉型猪特征是有坚实的脊背、明显双肌臀；胴体品质

以预混料和浓缩料为主的企业都存在肉质品质的问题，例如之前出现的黄膘肉问题。现在主要解决滴水损失的问题，特别是南方预混料企业，这需要一个综合性的解决方案。

4、关注客户利益，尽可能客户利益最大化，适用的市场需要

分析强势企业的强势产品，掌握其弱点

进行产品设计企业盈利模式与产品体系的有效结合，找到适合于本企业的盈利模式。未来猪全价料的方向以直销为主，而非经过经销商，当猪出现问题一般投诉首先是料的问题，而从技术上讲，是饲养管理，80%与料无关。以种猪料为例，实际存在两张皮的现象，即，大料基本上使用的是规模化猪场的水平，核心料则是商品料的水平，最终造成种猪的淘汰问题。所以做产品应是系统连续性。一般产品模式主要有以下几种：

1、高档育肥猪系列主要目标市场是规模化猪场，大中型育肥猪场，将投入产出比作为核心利益，而非价格。

2、高档种猪系列主要目标是品种猪、规模化猪场系列，高效益需要高投入，高投入需要明确效益。产品的基本内涵包括多，快，好，省（即仔猪多，速度快，稳定性好，全程耗料省）

3、通用产品系列的主要目标市场为通用市场竞争，老市场的维护。满足主流产品的



市场特征，使之更具稳定性，上量产品。

我在产品设计的时候关注适口性和采食量问题，即产品设计重点，因为一般只要正常顺利地吃下去，猪就能长。一般猪料3140—3150就够了（以采食量计），料的成本大约是2950—3000，一吨料省的纯利润为40—50元，从中拿10元解决采食量和适口性的问题并不难，当然是在抗拉稀的条件下。下面我就以猪料适口性为例，总结提升质量的关键控制点：

1. 降低饲料原料和成品中的粗灰分含量（越低越好，小猪大猪料灰分约5.5，种猪料的在6.0—6.5之间）；

2. 合理控制饲料中的粗纤维，提供适量的膳食纤维；

3. 控制杂粕质量，减少抗营养因子和霉菌毒素，尽可能做些前处理；

4. 注意粗脂肪含量，合理的理想脂肪酸模型（不饱和：饱和脂肪酸 > 2.5：1；Omega 6：Omega3 < 5：1）；

5. 减少饲料原料中的抗性淀粉含量；

6. 不同阶段理想氨基酸模型应用；

7. 净能体系应用和可利用能量与氨基酸之间的平衡；

8. 降低日粮钙的水平（0.5—0.7%），使用有机钙（甲酸钙或乳酸钙），降低饲料系酸力；

9. 选用优质磷源（使用磷酸二氢钙或二氢钾等）；

10. 合理的食盐水平增加对味道的敏感性（水平不能太低）；

11. 注意微量元素的氧化，尤其是亚铁盐的氧化；

12. 提高维生素尤其是功能性维生素的添加量；

13. 胆碱、维生素A、E、C和类胡萝卜素及HYD等的合理水平；

14. 合理的复合酶制剂选用和耐温性与存留率提高；

15. 筛选优异的酸化剂和抗生素替代产品；

16. 减少抗生素的使用量；

17. 控制鱼粉和血浆蛋白等动物副产品质量（如IGG和VBN、酸价等）；

18. 控制容易氧化变质的原料（鱼油、全脂米糠、DDGS、全脂大豆等）；

19. 减少陈化粮的使用；

20. 减少原料的变异，提高稳定性，核准营养成分；

21. 提高粉碎细度（平均颗粒度和颗粒度分布）；

22. 延长调制时间和质量；

23. 使用好的颗粒饲料（注意大小）；

24. 采用膨化原料和成品膨化技术（注意温度和熟化度）；

25. 控制饲料的水分（14%以上水分会降低适口性）的控制主要与蒸汽的饱和度，冷凝水的排放和喂料速度相关联；

26. 颗粒饲料的硬度会降低适口性，原料选择和环膜的压力比相关5.5—6.0，加入小麦后4.5—5，教槽保育料中由于加入乳清粉大概4.5左右；

27. 注意颗粒的含粉率，提高颗粒耐久度；



28. 添加好的油脂和乳化剂；

29. 减少混合机中油脂添加,采用后喷涂技术；

30. 不要添加劣质诱食剂；

19. 不要过量使用甜味剂；

32. 谷物粉碎细度提高,玉米每降低100微米,增重提高1.3%；

33. 使用短链脂肪酸(如包膜丁酸钠)可以改善肠道健康,增加诱食效果,提供肠道动能；

34. 添加谷氨酰胺等改善肠道绒毛和吸收；

35. 添加好的益生菌或益生源(MOS,糖蜜等)；

36. 注意抗生素的剂型和拮抗；

以上四点是在动物肠道中综合发挥作用的,他们需要提高营养的消化利用率,提高肠道营养,还要维护肠道的健康。关于芽孢杆菌,市场上产品很乱,如何评估,我的观点是首先要搞清楚产品中芽孢的状态,包装上标识的含量可能没有意义。第二,芽孢在肠道中的作用位点是否清楚。猪料尤其是颗

粒料,休眠的能被激活的才是有用的。

37. 控制饲料原料和成品的霉菌毒素(如黄曲霉毒素/T2/呕吐毒素/麦角毒素等)；

38. 注意调制温度(70-75度乳仔猪料)；

39. 降低制粒温度(60-65度乳仔猪料)和提高中大猪的制粒温度(80-85度以上)；

40. 专业的生产设备和喷涂技术的应用。

接下来,简要介绍下各种料的技术要点,以规模化种猪场为销售对象的教槽保育料的可以用几个数据来量化目标来进行分析：

1、从教槽开始,到断奶,能吃多少教槽料? 600g-1000g。

2、断奶后前三天的总体采食量? 500g。

3、断奶后前10天的采食量与生长性能评估,中档产品总体平均采食量350g。

实现目标的技术措施通过适口性与采食量、抗拉稀、生长速度和皮毛来解决。料中使用的抗生素不要太多,我们使用的一般是吉他霉素等,其他辅助型的产品有微生态、酶制剂和中草药。

以专业猪场、育肥猪场、散养户的保育料下痢是断奶后仔猪的主要问题，皮红毛亮是健康和营养状况良好的表现。实现保持体质健康，抵御病毒侵袭是第一要求；防止细菌侵袭，控制营养及细菌性下痢为第二要求；最大采食量设计，防止应激为第三要求。所以要清楚猪拉稀的原因。

小猪料基本不拉稀就好，但保育料对生长是有要求，一般要求60天45斤，70天要55斤以上，所以我认为是比较难做的，因为技术要点主要是适口性及采食量、生产性能，抗痢能力，抗逆能力，皮红毛亮和价格。11-12Kg的小猪，养20天后，规模化3-5%的淘汰率，主要是缺硒。

腹泻主要有以下三种：营养性腹泻、病理性腹泻和环境性腹泻。营养性腹泻主要是配方设计与原料选用问题，主要包括：抗原性物质，蛋白质过敏，内源消化酶不足等。病理性腹泻是细菌，病毒，寄生虫等引起。环境性腹泻与冷、热、应激等因素相关。仔猪营养型腹泻可以通过加螯合剂，加蛋白酶

来解决；对于引起肠壁炎症的用谷氨酰胺，教槽保育配方中加入1Kg谷氨酰胺在加入小麦水解蛋白配合使用效果很好。

以规模猪场型直销用户、网络型经销商用户的育肥期猪料产品设计以适口性、生长速度、体形和肉品质为目标。

规模猪场型直销用户、网络型经销商用户的母猪饲料产品设计的目标有发情与产健康仔数问题、便秘问题、奶水问题、裂蹄问题。

饲料尤其是全价料企业不仅需要对经销商了解，还需要对经销商下面的基础客户进行掌握：客户在哪里，猪场多大规模，用多少料。深挖井。

综上所述，饲料企业中技术、营销和质量控制应该是一个整体，而不是技术的妥协。高效型猪料的主导市场策略是全面营养解决方案和全面健康管理方案。首先要有高效保健型种猪料，高价值和功能性的教槽料和断奶料和生长前期料，安全高效后期配合料套餐模式的综合体现。



肠精灵[®]

守护肠道健康

肠精灵[®] 家族



肠优[®]

猪专用枯草芽孢杆菌



肠佳[®]

蛋禽专用枯草芽孢杆菌



肠悦[®]

肉禽专用枯草芽孢杆菌



肠爽[®]

水产专用枯草芽孢杆菌



同源筛分

Homologous
screening



合生发酵

Synbiotic
fermentation

dorun[®]
for the real health

更多信息请致电 400-652-6899 或登录 www.dorunbio.com

都润 只为真健康

更多资讯请拨打“真健康”专线：400-652-6899
或登录 www.dorunbio.com



北京都润科技有限公司

地址：北京市海淀区中关村南大街12号农科院饲料所科研辅助楼505(100081)
电话：010-62159219 62159129 传真：010-62158831

Beijing Dorun Science & Technology Co., Ltd

Add.:No. 505 Feed affiliated building in Chinese Academy of Agricultural Sciences,
12 ZhongGuanCun South Avenue, Haidian District, Beijing(100081)
Tel: 010-62159219 62159129 Fax:010-62158831