

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710097702.6

[51] Int. Cl.
A01K 67/02 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 29 日

[11] 公开号 CN 101292639A

[22] 申请日 2007.4.28
[21] 申请号 200710097702.6
[71] 申请人 丁 庆
地址 100086 北京市海淀区北京大学承泽园
108 楼 404 室
[72] 发明人 丁 庆

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 5 页

[54] 发明名称

一种提高牛乳中乳铁蛋白含量的方法

[57] 摘要

本发明的提高牛乳中乳铁蛋白(Lf)含量的方法,通过在奶牛髻内淋巴结处注射抗原释放剂 ARD (Antigen Releasing Device),深入研究了抗原释放剂 ARD (Antigen Releasing Device) 和免疫刺激复合物 (ISCOMs) 的免疫原性与稳定性,重点检验牛乳中乳铁蛋白,ARD 埋植后 Lf 的含量提高了 56%,为含高水平特异性抗体的免疫乳生产提供试验依据。本发明广泛适用于营养食品与保健食品领域。

-
- 1、 本发明的提高牛乳中乳铁蛋白(Lf)含量的方法,通过在奶牛髂内淋巴结处注射抗原释放剂 ARD (Antigen Releasing Device) 的方法,深入的研究抗原释放剂 ARD (Antigen Releasing Device) 和免疫刺激复合物 (ISCOMs) 的免疫原性和稳定性。
 - 2、 根据权利要求1的方法,初乳、常乳及免疫乳清中 IgG、IgA、IgM 和 Lf 绝对含量变化十分明显,ARD 埋植后 Lf 的含量提高了 56%。

一种提高牛乳中乳铁蛋白含量的方法

乳铁蛋白 (Lactoferrin, 简称 Lf) 是一种主要的乳清蛋白, 分子量约为 8 万, 大约由 700 个氨基酸残基构成, 乳铁蛋白因其晶体呈红色, 又称“红蛋白”, 牛初乳中含量约 1 克/升, 牛常乳含量约 0.02-0.35 克/升。具有多种生理功能: 如促进铁的传递和吸收、抗菌活性、抗病毒作用、免疫作用、促进肠细胞的生长和双歧杆菌的繁殖、天然抗氧化剂、调节骨髓细胞生成等。

本发明通过提高抗原释放剂 ARD (Antigen Releasing Device) 和免疫刺激复合物 (ISCOMs) 的免疫原性和稳定性, 扩大试验动物的样本含量, 展开深入的研究, 研究 ISCOMs 疫苗对奶牛细胞免疫的影响规律, 重点检验牛乳中乳铁蛋白, 为含高水平特异性抗体的免疫乳生产提供试验依据。

1、材料与方法

1.1 样品: 抗原释放剂 ARD (Antigen Releasing Device)

选用澳大利亚 Agri-BIOTECH 公司生产的抗原释放剂 ARD (Antigen Releasing Device), 免疫刺激复合物 (ISCOMs) 以不同浓度的聚交酯胶囊包被, 分别在埋植后的 0d、14d 和 28d 释放出免疫刺激复合物引起奶牛的免疫应答产生免疫球蛋白。埋植枪及 ARD 设计示意图见附图 1。

1.2 动物:

在北京市大兴区沧达福奶牛场选择泌乳前期的成年健康荷斯坦奶牛, 以隐性乳房炎诊断液进行乳房炎检测剔除隐性乳房炎病牛, 并根据其产奶量、年龄、胎次、泌乳阶段选择 40 头奶牛并分组, 免疫组 20 头 (编号 No. 1~20), 对照组 20 头 (编号 No. 21~40)。参试奶牛状况见表 1。于 2006 年 11 月 16 日对免疫组的 20 头牛进行埋植 ARD, 埋植位点在奶牛髂内淋巴结处, 每头牛埋植 3 种不同 ARD, 试验期为 4 个月。

表 1 试验奶牛状况

试验 编号	分组	牛号	胎次	分娩日期	泌乳天数 (截至 11 月 10 日)	11 月份产奶量 (kg)
1	试验组	2618	3	2006.07.12	121	22.7
2	试验组	2598	3	2006.06.27	136	21.4
3	试验组	2577	3	2006.08.09	93	26.2
4	试验组	2645	3	2006.09.03	68	26.9
5	试验组	2698	2	2006.08.21	81	24.0
6	试验组	2777	2	2006.08.12	90	28.2
7	试验组	2839	2	2006.07.28	105	28.6
8	试验组	2505	4	2006.06.13	150	24.8
9	试验组	2786	2	2006.08.18	84	19.6
10	试验组	2836	2	2006.06.03	160	22.6
11	试验组	2767	2	2006.08.01	101	24.1
12	试验组	2755	2	2006.08.08	94	24.3
13	试验组	2692	3	2006.07.28	105	27.8
14	试验组	2617	3	2006.08.03	99	26.1
15	试验组	2771	3	2006.08.15	87	28.1
16	试验组	2647	3	2006.05.02	192	25.4
17	试验组	2646	3	2006.06.21	142	24.8
18	试验组	7108	2	2006.07.27	106	33.2
19	试验组	2669	2	2006.07.01	132	19.9
20	试验组	2506	4	2006.06.17	146	27.9
平均		2.65±0.67			114.6±31.64	25.3±3.3
21	对照组	2911	2	2006.06.29	134	29.9
22	对照组	2469	3	2006.05.19	175	20.6
23	对照组	2594	3	2006.07.04	129	21.6
24	对照组	7089	3	2006.05.01	193	23.4
25	对照组	2792	3	2006.06.03	160	31.2
26	对照组	2675	2	2006.07.18	115	25.0
27	对照组	2638	3	2006.08.06	96	24.6
28	对照组	2584	2	2006.08.13	89	24.0
29	对照组	2634	2	2006.07.02	131	34.5
30	对照组	2750	2	2006.08.28	74	25.1
31	对照组	2494	4	2006.08.11	91	23.6
32	对照组	2680	3	2006.06.11	152	29.5
33	对照组	2775	2	2006.08.04	98	30.4
34	对照组	2572	3	2006.08.12	90	23.7
35	对照组	2633	3	2006.08.07	95	24.0
36	对照组	2684	3	2006.07.12	121	25.4
37	对照组	2650	3	2006.08.26	76	28.8
38	对照组	2590	3	2006.08.22	80	31.1
39	对照组	2690	2	2006.08.23	79	28.3
40	对照组	2687	2	2006.08.28	74	26.8
平均		2.65±0.59			112.6±35.6	26.6±3.7

试验牛饲养管理按牛场的正常饲养管理程序进行，采用中产奶牛饲料配方，TMR 饲喂，精粗比为 45:55，粮组成及营养水平见表 2。奶牛自由采食，记录采食量，喂 3 次，饲喂时间分别为 7:00、14:00 和 20:00。挤奶 3 次，时间为 7:00、14:00 和 20:00，采用 Delaval 鱼骨式挤奶台进行机械挤奶，挤奶时“二次药浴，一次纸巾擦干”。观察奶牛健康状况，尤其注意是埋植后 7d 内的伤口是否发炎。

1.3 试验牛饲养管理及样品的采集：

试验牛饲养管理按牛场的正常饲养管理程序进行，采用中产奶牛饲料配方，TMR 饲喂，精粗比为 45:55，粮组成及营养水平见表 2。奶牛自由采食，记录采食量，喂 3 次，饲喂时间分别为 7:00、14:00 和 20:00。挤奶 3 次，时间为 7:00、14:00 和 20:00，采用 Delaval 鱼骨式挤奶台进行机械挤奶，挤奶时“二次药浴，一次纸巾擦干”。观察奶牛健康状况，尤其注意是埋植后 7d 内的伤口是否发炎。

表 2 试验粮组成及营养水平

原料	组成	营养水平	
精料组成		干物质 (g/kg)	391
玉米 (%)	47.4	产奶净能 (MJ/kg)	6.69
麦麸 (%)	10.5	粗蛋白 (%)	13.8
豆粕 (%)	26.3	可消化粗蛋白 (g/kg)	104
棉粕 (%)	10.5	粗纤维 (%)	20.3
玉米胚芽饼 (%)	3.2	Ca (%)	0.59
石粉 (%)	1.0	P (%)	0.41
磷酸氢钙 (%)	1.0		
合计	99.9		
粗料组成			
羊草 (%)	10.5		
苜蓿 (%)	1.8		
青贮 (%)	87.7		
合计	100		

0d~10d 每两天记录每头牛的产奶量，于每天的固定时间测量每头牛直肠体温，采集每头牛的乳样；21d~60d 时每 3 天采集每头牛的乳样，每周记录采食量、产奶量和体温。采乳样时每天采集乳样 3 次，按早中晚比例 4:3:3 混合，共取样 100mL，4℃ 保存；50mL 于北京奶牛中心检测牛奶体细胞总数和乳脂、乳蛋白等常规成分；50mL 奶样用于分离乳清。每组固定 10 头牛用于采血 (No. 11~20; No. 31~40)。采血时以采血针尾根动/静脉采血，分别以真空抗凝采集管和真空促凝采血管收集血液。凝固的血液用于分离血清，分装于 4 个离心管中-80℃ 保存待用。抗凝血分别用于 MTT、流式细胞仪等检测。

同时采集沧达福牛场其他奶牛的初乳样品，每头分娩奶牛每 24h 采集 1 次奶样，每次采集 200mL 以上，连续采集 7d，用以分析比较免疫乳清和初乳乳清。收集乳样的同时采集抗凝

和促凝血。

1.4 实验方法

1.4.1 乳房炎和体细胞数检测

取 50mL 乳样以乳成分分析仪（型号：Fossomatic 5000、Milkoscan 4000）测定体细胞数和乳脂率（Fat）、乳蛋白（Pro）、乳糖（Lac）、总固形物（TS）、非脂固形物（SNF）5 项常规成分。

1.4.2 间接 ELISA 方法测定特异性抗 Lipase 的 Ig

参照 Guan Tay 博士的方法，以 Lipase Antigen 包被酶标板捕获待检样品中的特异性抗体，样品稀释倍数为 1: 200，采用 AP 酶标驴抗山羊 IgG 作为二抗，p-NPP 显色，测定特异性抗 Lipase 的总 Ig。FCS（胎牛血清）为阴性对照，以澳大利亚 Agri-BIOTECH 公司提供的 2 个阳性乳清（牛号分别为 168Q 和 460X）为阳性对照。

1.4.3 夹心 ELISA 方法测定 Ig 和乳铁蛋白绝对含量

选用 Bethyl 的 IgG/IgA/IgM/Lf 定量试剂盒测定其绝对含量，采用捕获抗体、标准参照蛋白、HRP 标记抗体等建立标准曲线，建立回归方程检测其含量。

1.4.4 SDS-PAGE 电泳及定量分析方法

制作 5%浓缩胶和 12%分离胶，进行初乳、常乳和免疫乳乳清的 SDS-PAGE，电压为 80V（浓缩胶）及 120V（分离胶），电泳时间约为 1.5h，考马斯亮蓝染色。用 Bio-Rad 凝胶成像系统 Quantity One 软件的 Volumes Quick Guide（定量分析）对 Ig 条带进行相对定量分析，得到不同 Ig 的相对浓度。

1.5 数据处理

以 Excel 初步整理数据，以 SAS V8 进行统计分析。

2、结果

2.1 ARD 对牛奶体细胞数的影响

牛奶中体细胞数不仅是衡量奶牛乳房健康的一个重要指标，同时也是原料奶质量评价的重要指标，它对乳品营养价值、加工贮藏特性及乳品风味等方面均有影响。体细胞包括多种类型的细胞如嗜中性白细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性细胞及各种乳腺上皮细胞等。在健康奶牛乳腺中，大部分体细胞是巨噬细胞和淋巴细胞，这些细胞来自血液，当乳腺受到感染或损伤后，这些细胞将浸透到此部位，从而达到抵御外界微生物感染的作用。健康奶牛的乳中体细胞数一般在 20 万/mL 左右，初产奶牛以及饲养管理比较理想的奶牛乳中体细胞数可能低于 10 万/mL，如果乳中体细胞数高于 50 万/mL，则奶牛乳房很可能被感染或有创伤。受损的乳腺组织一方面表现为合成功能的降低，导致乳产量降低；另一方面表现为血乳屏障被一定程度的破坏，不仅影响乳合成前体物进入乳腺，而且增加血液中其它物质进入乳汁，从而导致乳成分发生变化，进一步对乳营养价值和其他特性产生比较广泛的影响。

由于患乳房炎的奶牛个体牛奶中体细胞数会高达几百万甚至几千万，而其它正常奶牛体细胞数为 20 万以下，乳房炎个体的体细胞数值会对统计结果造成巨大影响，因此研究 ARD 对牛奶中体细胞数影响时除去了乳房炎发病牛的数据。

埋植 ARD 会对奶牛乳房造成一定损伤，埋植是否会增加体细胞数是我们比较担心的问题。试验期内牛奶体细胞数测定结果见表 3，试验组与对照组结果差异不显著 ($p>0.05$)，但试验组奶牛 No.8 和 No.12 体细胞数在埋植手术后明显上升（见附图 2 牛奶中体细胞数变化情况，附图 3 No. 8 和 No. 12 奶牛体细胞数变化情况），但很快恢复原来水平。

表 3 牛奶体细胞数测定结果

试验天数	试验组	对照组
0	8.52±4.93	8.64±4.12
5	8.39±4.08	8.08±7.63
11	21.12±11.42	12.65±8.41
15	10.49±5.75	12.13±7.84
20	11.02±7.00	16.08±13.04
32	17.75±3.57	16.42±4.57
39	16.50±6.96	11.52±5.12
50	10.41±5.74	11.86±9.98
55	13.47±12.40	18.44±15.35
60	15.01±5.76	17.33±8.46
75	18.42±10.97	16.14±8.39
90	17.38±13.59	19.85±10.80
120	14.51±9.97	14.10±6.37

2. 2 ARD 埋植手术对奶牛乳房炎发病率的影响

试验期内（4 个月）共有 8 头牛发病，其中试验组 2 头，对照组 6 头；共有 6 头牛发生乳房炎，其中试验组 2 头，对照组 4 头，详细情况见表 4。

表 4 试验期内奶牛发病情况

组别	牛号	是否埋植	是否采血	发病日期及病情	牛奶中体细胞数（104/mL）
试验组	5 号	是		06-11-29 脖子左侧刮伤，肿胀化脓，发热，伴发乳房炎。07-01-10 转入低产牛群。	60~130
	18 号	是	是	06-12-21 乳房炎转入病牛舍；07-01-13 转回试验牛群；07-01-20 乳房炎复发。	470~2050
对照组	26 号			06-11-28 乳房炎转入病牛舍；07-01-13 恢复，07-01-20 乳房炎复发转回病牛舍。	200~1900
	27 号			07-01-13 临床乳房炎转入病牛舍，产奶极少。	80~470
	28 号			07-01-13 乳房炎转入病牛舍；07-03-10 恢复转入低产牛群。	10~50
	30 号			07-01-20 乳房炎转入病牛舍。	80~380
	33 号		是	07-01-10 体形过瘦，估计有慢性疾病；07-01-20 屠宰。	6~40
	35 号		是	06-12-02 不进食，初步诊断为瓣胃堵塞；后逐渐停奶，07-02-02 转入干奶牛群。	2~30

乳房炎最显著的特点是牛奶中的体细胞增多，乳的性状品质发生异常。从表 4 可以看出乳房炎病牛体细胞数明显增高，高达几百万甚至几千万。

乳房炎是乳腺组织受到物理、化学、微生物刺激所发生的一种炎性变化，当奶牛受到不良饲养管理或抵抗力下降时，病原微生物通过乳汁，血液和淋巴液侵入乳腺组织而造成。引起乳房炎的病原主要是由多种非特定的病原微生物引起，有细菌、霉形体、真菌、病毒等，受气候、饲养管理、挤奶方式、泌乳量、泌乳阶段以及乳头形态、不同乳区、遗传等多种因素的影响。从乳房炎的发病率来看埋植手术不会引发奶牛发生乳房炎。

2. 3 特异性抗体含量变化规律

2. 3. 1 血清中特异性抗体含量变化规律

ARD 埋植后于特定时间释放出 ISCOMs，经淋巴循环进入淋巴结或经血液进入脾脏，从而发生体液免疫应答和细胞免疫应答。进入淋巴结的 ISCOMs 被抗原递呈细胞 APC 捕获，经加工处理形成抗原肽-MHC II 分子复合物，递呈给 CD4+TH 细胞。TH 细胞通过对抗原的识别、活化、增殖，分化为 CD4+TH2 细胞，产生细胞因子作用于 B 细胞，促使 B 细胞活化。活化的 B 细胞可表达多种细胞因子受体，在不同细胞因子作用下发生类别转换，增殖分化为能合成分泌不

同类别 Ig 的浆细胞，合成并分泌抗体，发挥特异性免疫效应。在此过程中，部分 B 细胞分化为记忆 B 细胞，保留对特异性抗原有长期记忆，当再次应答时，能迅速增殖分化为浆细胞，合成更多抗体扩大免疫效应。ARD 诱导奶牛产生的抗体经淋巴液和血液输送到全身，在乳腺组织由腺泡上皮选择性地将 IgG 转运进牛奶中。因此，牛乳和血液中抗体变化规律应该一致，且乳中抗体浓度受血液抗体浓度影响。

血清中特异性抗 Lipase 抗体测定结果见附图 4，埋植 ARD 后，免疫组 20 头牛血清中特异性抗体水平均明显升高，与比一期试验（5 头牛中 2 头牛免疫失败）相比，说明此次试验 ARD 生产效果较好，免疫原性较好。埋植后 10d 可检测到高水平的抗体，一直持续到 40d 才开始缓慢下降。

2.3.2 乳清中特异性抗体含量变化规律

埋植后 9d 便可检测到乳清中特异性抗 Lipase 的抗体，其抗体含量变化见附图 5，其应答规律与 3 种 ARD 的释放一致，17~40d 水平较高，此后特异性抗体水平一直下降。可见，抗体高水平可以维持 20 多天，持续时间不是很理想。此后抗体含量下降很快，75d 后对照组和便差异不显著。

2.3.3 初乳中特异性抗体变化规律及与免疫乳之间的比较

检测初乳乳清中特异性抗体 Ig 含量并与澳大利亚免疫乳阳性对照 168Q、460X、此次试验免疫乳混合样（17d~35d）进行比较（见附图 6 不同乳清特异性抗体含量比较），可见，澳大利亚的 2 个免疫乳样品特异性抗体含量可以达到早期初乳的水平，本试验的免疫乳可以达到 2d~3d 初乳的水平。

2.3.4 乳清特异性抗体消长规律分析

虽然第二期试验效果明显优于第一期试验，得到了含更高特异性抗体的免疫乳，但详细分析免疫组每一头奶牛的应答规律，会发现 3 种 ARD 的效果、释放时间和奶牛个体间存在一定差异。

2.3.5 乳清中特异性抗体消长规律的理想模型

体液免疫应答的一般规律是：初次应答潜伏期长，抗原刺激后约 1w~2w 血清中才能出

现抗体，主要为 IgM，抗体含量低，IgG 在体内维持时间短；再次应答潜伏期短，一般为 1d~2d，主要产生 IgG，抗体浓度高，维持时间长。附图 7 表示的是乳清中特异性抗体消长规律的理想模型。3 种 ARD 先后刺激，其应答规律变化明显，埋植后 10d 左右可以检测到特异性抗体，维持时间短，迅速下降；14d 时 ARD2 释放，引起二次免疫应答，抗体迅速上升，再缓慢下降；30d 时 ARD3 释放，引起第 3 次免疫应答，抗体含量应该上升到更高水平，持续时间长，下降速度缓慢。

2.4 初乳、常乳及免疫乳清中 IgG/IgA/IgM/Lf 含量的比较

初乳、常乳及免疫乳清中 IgG、IgA、IgM 和 Lf 绝对含量测定结果见表 5，奶牛初乳中活性蛋白含量变化十分明显，随着分娩日龄的增加而迅速下降，奶牛个体间差异很大。ARD 埋植后 Lf 提高了 56%。

表5 初乳、常乳及免疫乳清中IgG、IgA、IgM和Lf

(单位: mg/mL)

乳清种类	IgG	IgA	IgM	Lf
初乳 (n=13)				
0d	100.7±39.55	7.223±3.506	10.25±3.463	0.724±0.462
1d	27.75±23.61	2.261±2.499	2.799±1.601	0.238±0.168
2d	10.93±11.68	0.697±0.578	1.168±0.772	0.254±0.227
3d	4.407±4.94	0.509±0.627	0.576±0.296	0.210±0.248
4d	2.229±2.104	0.276±0.179	0.372±0.106	0.190±0.125
5d	1.324±0.86	0.23±0.142	0.327±0.083	0.166±0.143
6d	1.083±0.496	0.211±0.109	0.319±0.093	0.146±0.069
7d	1.071±0.705	0.224±0.117	0.333±0.096	0.106±0.060
常乳 (n=15)	0.731±0.162	0.272±0.013	0.229±0.104	0.080±0.021
免疫乳 (免疫后 17d~40d 混合样, n=6)	0.914±0.703	0.279±0.038	0.231±0.101	0.125±0.014

2.5 初乳、常乳及免疫乳清蛋白 SDS-PAGE 分析

进行初乳、常乳及免疫乳清蛋白 SDS-PAGE 电泳，结果见附图 8。

蛋白条带的着色程度存一定差异，说明这些蛋白成分的含量存在差异，以 Volumes Quick Guide 将 Ig 条带进行相对定量分析，设本试验的常乳 Ig、Lf 含量为 1，可以得到其他乳清 IgG 和 Lf 的相对浓度，夹心 ELISA 方法和 SDS-PAGE 相对定量分析的 IgG、IgA、IgM 和 Lf 变化规律类似，如附图 9 SDS-PAGE 相对定量分析 Lf 变化和附图 10 夹心 ELISA 方法分析 Lf 变化规律所示 Lf 变化规律。

3.5.3 免疫刺激对 Lf 含量的影响

分析 No. 8、No. 11、No. 12 等奶牛免疫后 Lf 含量变化（见附图 11），免疫后 Lf 会升高，并且与 ARD 的释放、乳清特异性抗体变化规律有一定的相关性。Lf 含量受胎次、产奶阶段、健康状况等多种因素的影响。

3. 讨论

3.1 埋植手术对奶牛健康状况没有不良影响，没有引发奶牛乳房炎，奶牛采食量、产奶量、乳成分未有大幅度变化。这初步说明了奶牛髂内淋巴结埋植 ARD 的安全性。

3.2 本试验的免疫乳特异性抗体可以达到后期初乳的水平。初乳、常乳及免疫乳清中 IgG、IgA、IgM 和 Lf 绝对含量变化十分明显，随着分娩日龄的增加而迅速下降，奶牛个体间差异较大；ARD 埋植后 Lf 提高了 56%。

3.3 免疫乳是新型的功能性食品，具有广阔的市场前景，通过提高 ARD 和 ISCOMs 的免疫原性和稳定性，扩大试验动物的样本含量，展开更深入的研究工作，有望生产出含高水平特异性抗体的免疫乳。

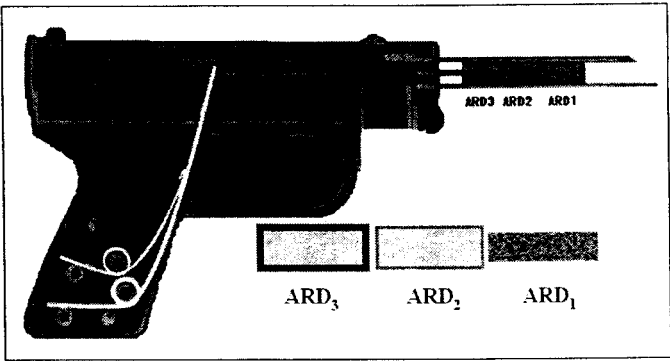


图 1

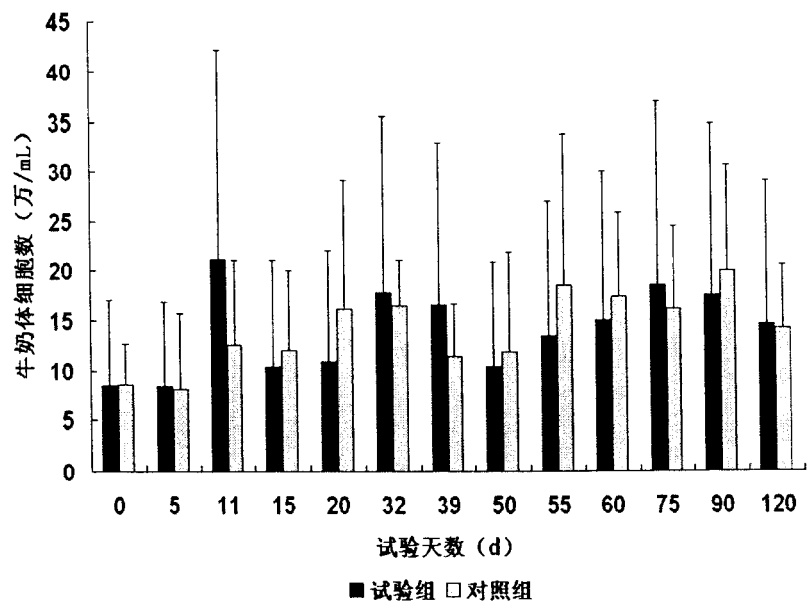


图 2

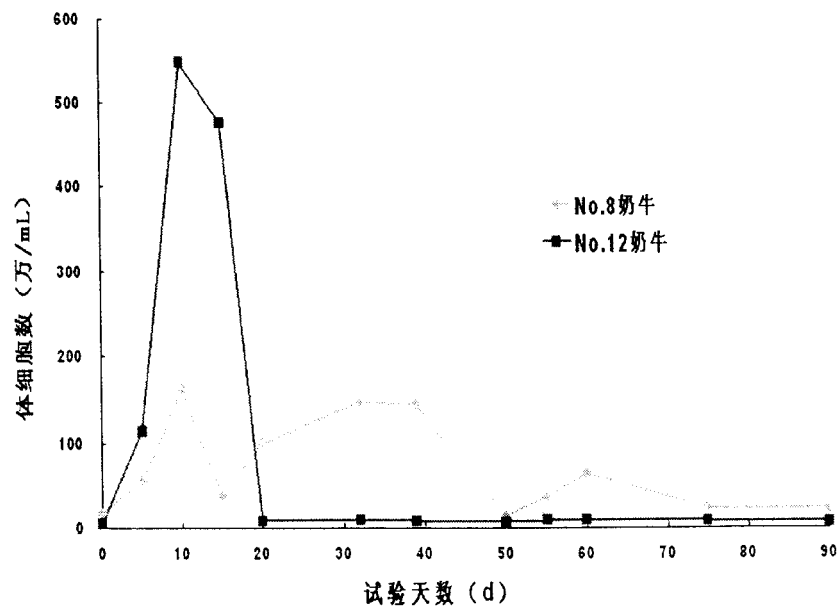


图 3

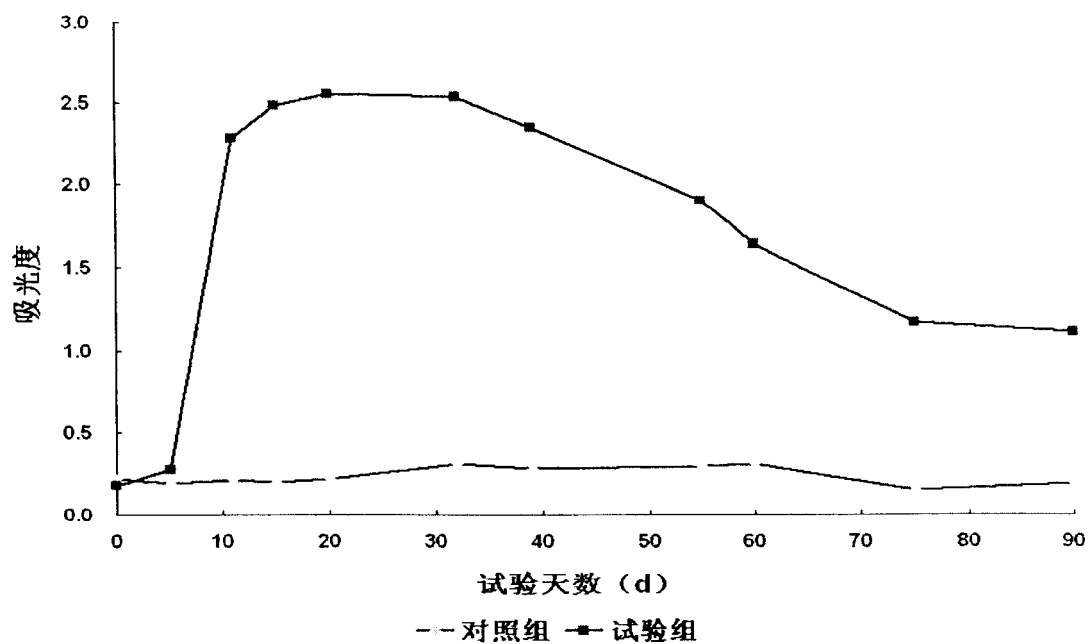


图 4

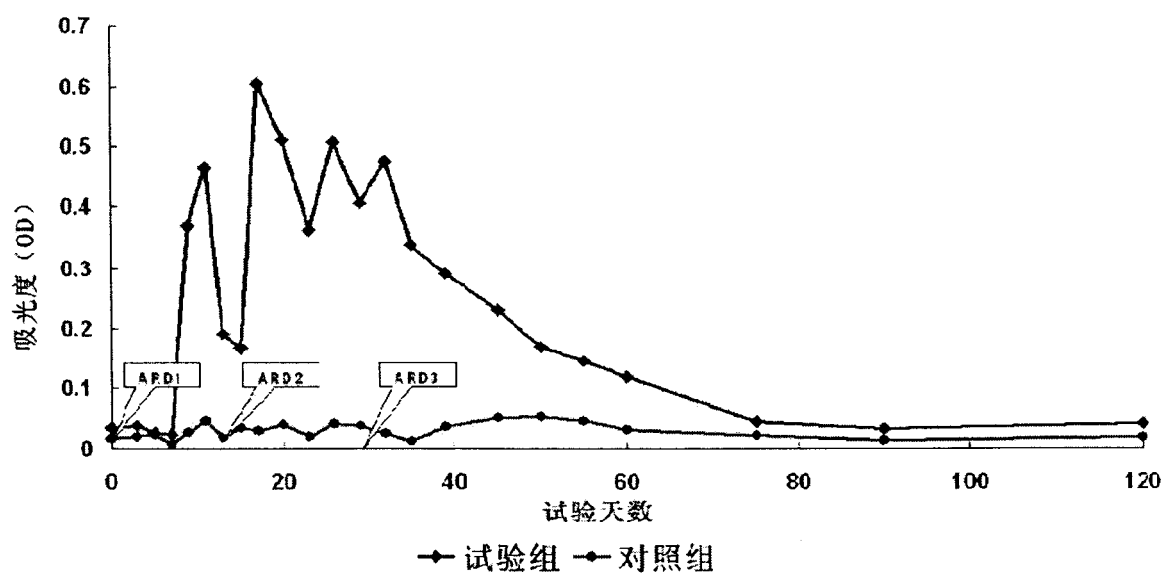


图 5

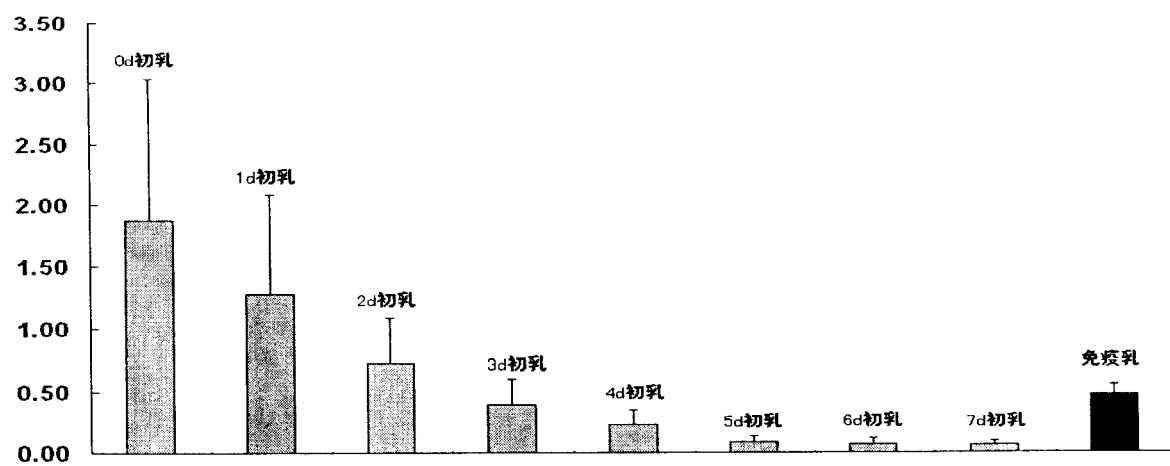


图 6

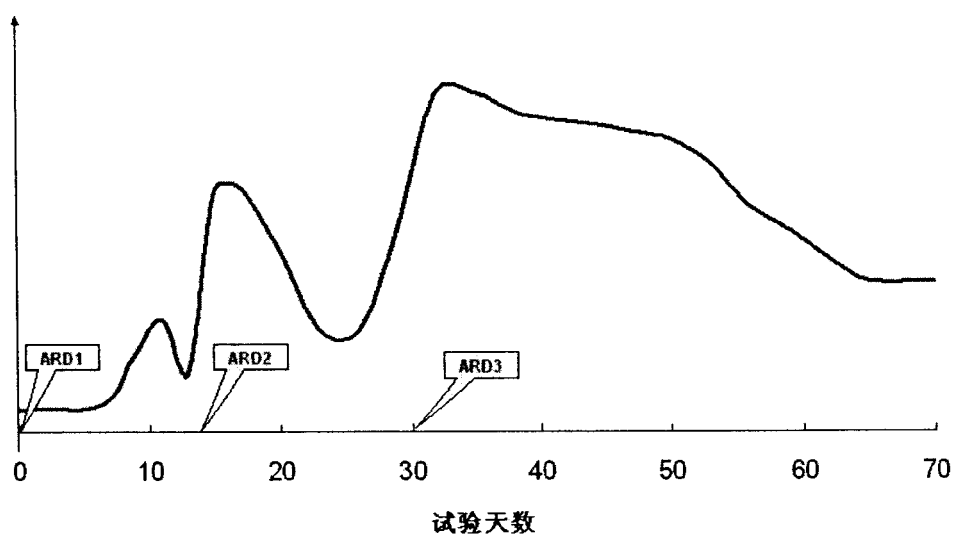


图 7

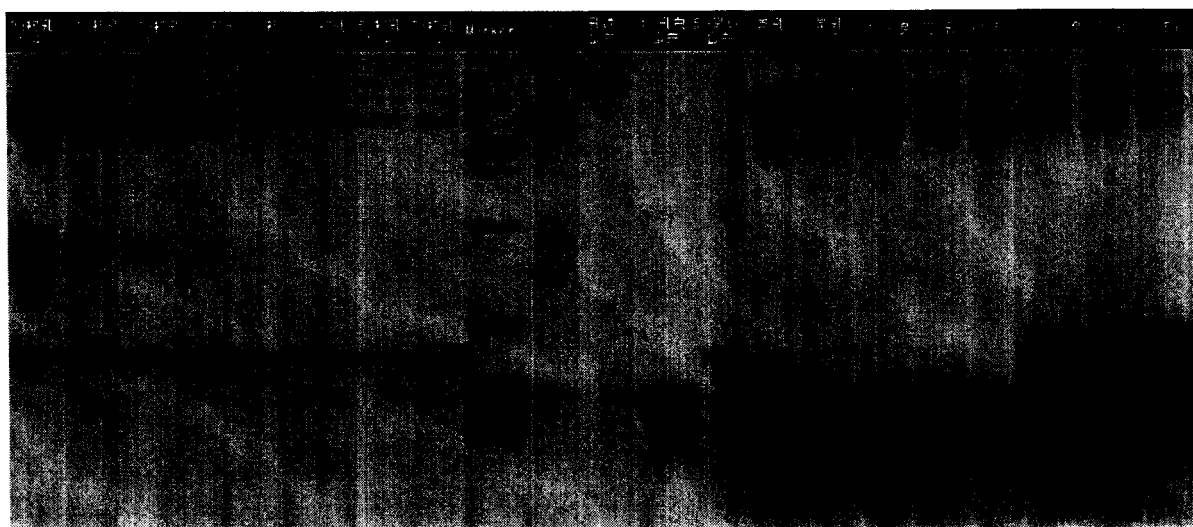


图 8

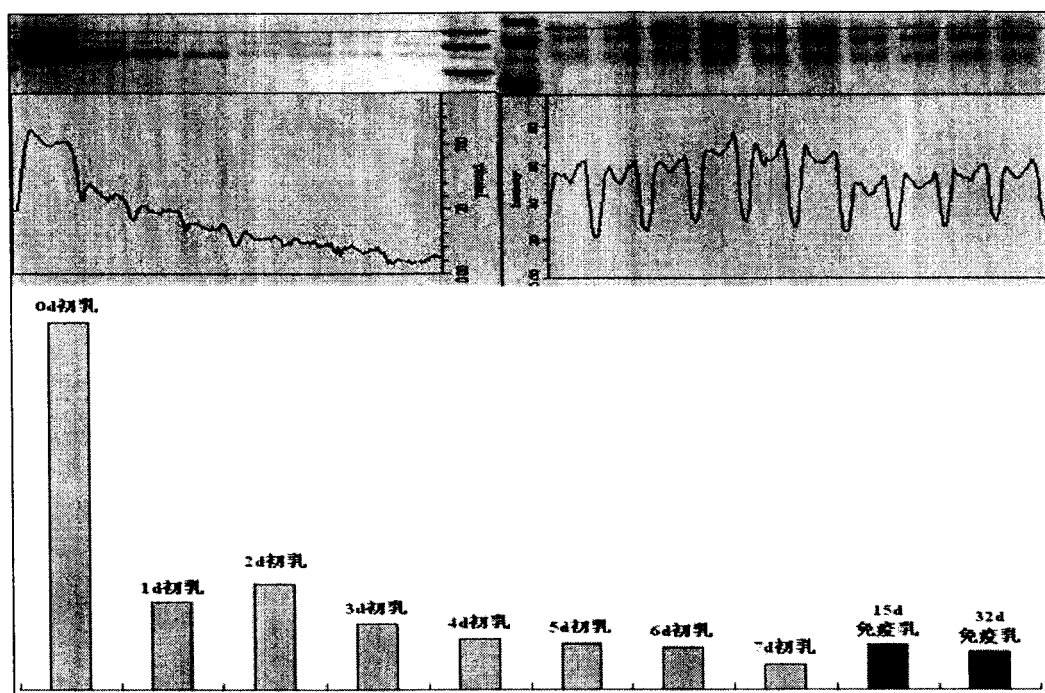


图 9

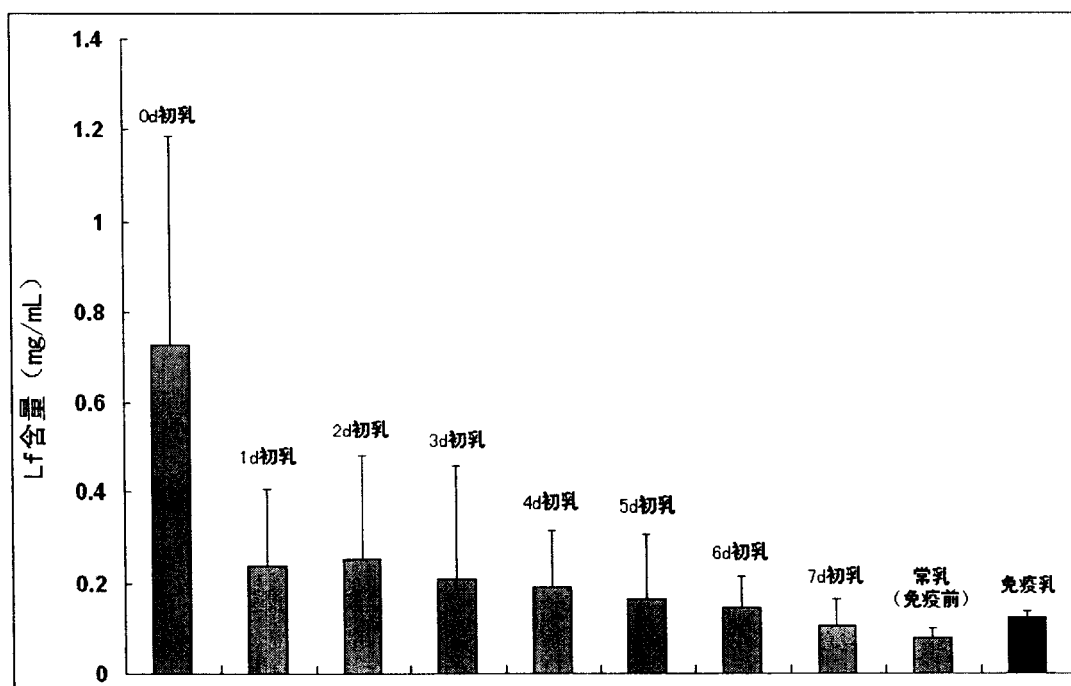


图 10

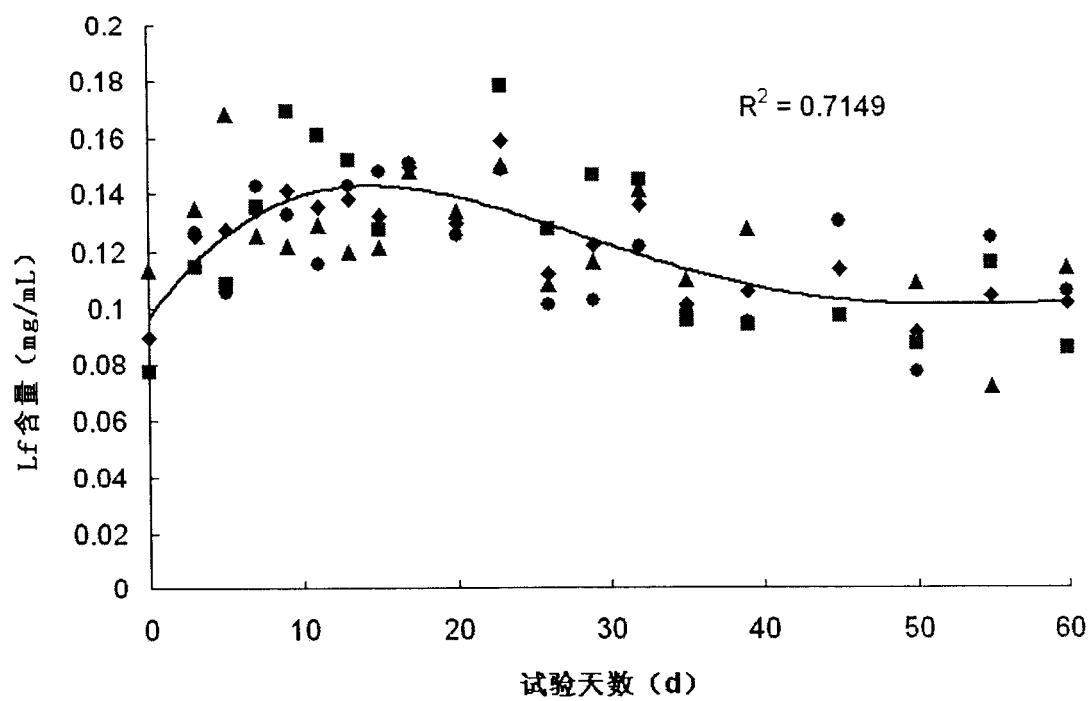


图 11

专利名称(译)	一种提高牛乳中乳铁蛋白含量的方法		
公开(公告)号	CN101292639A	公开(公告)日	2008-10-29
申请号	CN200710097702.6	申请日	2007-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	丁庆		
申请(专利权)人(译)	丁庆		
当前申请(专利权)人(译)	丁庆		
[标]发明人	丁庆		
发明人	丁庆		
IPC分类号	A01K67/02 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的提高牛乳中乳铁蛋白(Lf)含量的方法，通过在奶牛髻内淋巴结处注射抗原释放剂ARD(Antigen Releasing Device)，深入研究了抗原释放剂ARD(Antigen ReleasingDevice)和免疫刺激复合物(ISCOMs)的免疫原性与稳定性，重点检验牛乳中乳铁蛋白，ARD埋植后Lf的含量提高了56%，为含高水平特异性抗体的免疫乳生产提供试验依据。本发明广泛适用于营养食品与保健食品领域。

试验 编号	分组	牛号	胎次	分娩日期	泌乳天数 (截至 11 月 10 日)	11 月份产奶量 (kg)
1	试验组	2618	3	2006.07.12	121	22.7
2	试验组	2598	3	2006.06.27	136	21.4
3	试验组	2577	3	2006.08.09	93	26.2
4	试验组	2645	3	2006.09.03	68	26.9
5	试验组	2698	2	2006.08.21	81	24.0
6	试验组	2777	2	2006.08.12	90	28.2
7	试验组	2839	2	2006.07.28	105	28.6
8	试验组	2505	4	2006.06.13	150	24.8
9	试验组	2786	2	2006.08.18	84	19.6
10	试验组	2836	2	2006.06.03	160	22.6
11	试验组	2767	2	2006.08.01	101	24.1
12	试验组	2755	2	2006.08.08	94	24.3
13	试验组	2692	3	2006.07.28	105	27.8
14	试验组	2617	3	2006.08.03	99	26.1
15	试验组	2771	3	2006.08.15	87	28.1
16	试验组	2647	3	2006.05.02	192	25.4
17	试验组	2646	3	2006.06.21	142	24.8
18	试验组	7108	2	2006.07.27	106	33.2
19	试验组	2669	2	2006.07.01	132	19.9
20	试验组	2505	4	2006.06.17	146	27.9
平均		2.65±0.67			114.6±31.64	25.3±3.3
21	对照组	2511	2	2006.06.29	134	29.9
22	对照组	2469	3	2006.05.19	175	20.6
23	对照组	2594	3	2006.07.04	129	21.6
24	对照组	7089	3	2006.05.01	193	23.4
25	对照组	2792	3	2006.06.03	160	31.2
26	对照组	2675	2	2006.07.18	115	25.0
27	对照组	2638	3	2006.08.06	96	24.6
28	对照组	2584	2	2006.08.13	89	24.0
29	对照组	2634	2	2006.07.02	131	34.5
30	对照组	2750	2	2006.08.28	74	25.1
31	对照组	2494	4	2006.06.11	91	23.6
32	对照组	2680	3	2006.06.11	152	29.5
33	对照组	2775	2	2006.08.04	98	30.4
34	对照组	2572	3	2006.08.12	90	23.7
35	对照组	2633	3	2006.08.07	95	24.0
36	对照组	2684	3	2006.07.12	121	25.4
37	对照组	2650	3	2006.08.26	76	28.8
38	对照组	2590	3	2006.08.22	80	31.1
39	对照组	2690	2	2006.08.23	79	28.3
40	对照组	2687	2	2006.08.28	74	26.8
平均		2.65±0.59			112.6±35.6	26.6±3.7