



2006年第27卷第12期
(总第273期)
(1980年创刊)

主办单位:
辽宁省农业机械研究所
编辑出版:饲料工业杂志社
地址:沈阳市金沙江街16号6门
邮编:110036
电话:总编室(024)86391923
编辑一室(024)86391926(传真)
编辑二室(024)86391925(传真)
网络发行部(024)86391237
投稿邮箱:lg@feedindustry.com.cn
网 站:www.feedindustry.com.cn
总 编:韩惠春青
副总编辑:沈桂宁 陈广鹏
责任编辑:王 芳

广告全权代理:沈阳兴广告有限责任公司
常务副总经理:张立南 林 勇
业务内勤:刘 占
地址:(110036)沈阳市长江街126号甲
B幢4单元16楼

电话:(024)86276137 86276627
传真:(024)86276127

邮箱:gggh@feedindustry.com.cn
印刷:辽宁省印刷技术研究所
国内发行:辽宁省报刊发行局
国外发行:中国国际图书贸易总公司(北京399信箱)
出版日期:每月5日、20日出版

国外代号:M4290
国内统一连续出版物号:CN21-1169/S
国际标准连续出版物号:ISSN1001-091X
邮发代号:8-163
发 行 范 围:国内外发行
广告许可证:辽工商广字01-82号
开户行:中信银行沈阳分行阜南支行
帐 号:72214101826000548-49
刊期定价:6.00元

如蒙赐教本刊文章及图片,请注明
摘自《饲料工业》杂志,并寄样刊。

饲料

SILIAO GONGYE

(半月刊)

目 次

饲料添加剂

- 1 大豆异黄酮在畜牧上的研究与应用 蒋守群 蒋宗勇
- 7 液态蛋氨酸经基类似物(HMB)的酸化剂效应研究
..... 王之盛 崔 芹 刘永刚等
- 10 酪酸菌微生态制剂的生物学功能及在饲料中的应用
..... 宋会议 吴天星

生物技术

- 12 雨生红球藻规模化培养工艺的构建与应用
..... 刘 伟 刘建国 林 伟等
- 18 饲用酶制剂中木聚糖酶酶学性质的研究
..... 伏显华 伍明俊 刘 勇等
- 21 扩展青霉产碱性脂肪酶发酵条件的研究
..... 马敬丽 彭新榜 陈丽超

水产养殖

- 24 不同养殖模式对草鱼生长的影响
..... 林仕梅 谭北平 魏万权
- 26 微生态制剂对中国对虾幼体生长和非特异性免疫的影响
..... 徐 琴 李 健 刘 淇等
- 30 摄食水平对黄颡鱼生长和饲料利用效率的影响
..... 杨严鸥 姚 峰 郑建忠等

试验研究

- 33 复合酶制剂对肉鸡屠宰性能和部分血清生化指标的影响
..... 王 琛 贺建华 苗朝华

■36

- 半胱胺对衰老小鼠胸腺淋巴细胞DNA损伤的影响
..... 王建峰 乐国伟

■39

- 蜂花粉多糖对肉鸡生长性能及肌肉化学成分的影响
..... 潘 珂 孙 汉 高智慧

营养研究

- 42 饲料矿物质微量元素生物化学评价研究
..... 王 群 刘艳芬
- 47 植酸酶磷当量的研究进展
..... 姜清凌 贺建华 邓近平等

饲料生产

- 51 新型饲料添加剂二甲酸钾的合成和应用
..... 钟国清 陈明剑 蒋琪英
- 54 新型水产诱食剂氯化铵中基二甲基磺的合成
..... 陆 豫 李伟杰 邵维龙等

基因工程

- 56 黑曲霉植酸酶基因序列的研究
..... 张荣奎 刘爱花 贺涛才
- 59 肌肉生成抑制素基因的研究
..... 张宇光 许海涛 刘 梅等

问题探讨

- 62 谈高剂量氧化锌降低断奶仔猪腹泻的作用机制
..... 冯自科 马学会 Hanne D. Poulsen

企业标识展示



江苏北方
通威集团
(0412)3343018
(024)88080922



江苏北方
通威集团
(028)85188888



江苏正昌
(0519)7309988



江苏牧丰
(0514)7848811



布勒(常州)
(0519)7966666



江苏良友
(0519)8309988



和成集团 引香炭炭
上海和成
(021)57355544



杭州康源
(0571)86433111



裕达机械
(0519)8305886



挑战集团
(010)62146105



成都大地
(028)85351741



华兴集团
(0510)83791888



北京爱生
(010)88897542



华兴集团
(027)83569722



广州海大
(020)84661699



广东恒威
(020)6136888

大豆异黄酮在畜牧上的研究与应用

蒋守群 蒋宗勇

异黄酮(Isoflavone)广泛存在于豆科植物以及豆类发酵产物丹贝、牧草、谷物和葛根等中,种类繁多,目前已知的有10多种,包括大豆甙(Daidzin)、大豆甙元(Daidzein)、染料木素甙元(Genistein)、谷甾醇(β -sitosterol)、花生酸(Arachidic acid)、6-甲氧大豆素(Glycitein)、鸡豆黄素A(Biochanin A)、香豆雌酚(Coumestrol)、葛根素(Puerarin)和芒柄花黄素(Formononetin)等。大豆异黄酮(Soybean Isoflavone)是一类从大豆中分离提取出的具有多酚结构的混合物,主要分布于大豆种子的子叶和胚轴中,80%~90%异黄酮存在于子叶中,浓度约为0.1%~0.3%;胚轴中所含异黄酮种类较多且浓度较高,约为1%~2%。但由于胚轴只占种子总质量的2%,因此,尽管浓度很高但所占比例却很少,只有10%~20%。

大豆异黄酮类化合物在通常为固体,大部分熔点在100℃以上,常温下性质稳定,呈白色粉末状,无毒、无味,易于贮存。不溶于水,易溶于氯仿、二甲基酰胺等有机溶剂,极易溶于二甲基亚砜。急性毒性试验显示,每千克体重的异黄酮提取物 LD_{50} 大于21.5g(含异黄酮376mg)。目前发现的大豆异黄酮类化合物主要有3类,即大豆甙类(Daidzin groups)、染料木甙类(Genistein groups)、黄豆甙类(Glycitein groups)。每一类以游离型、葡萄糖甙型、乙酰基葡萄糖甙型和丙二酰基葡萄糖甙型4种形式存在(游离型一般称作甙元,后三类则称为结合型的糖甙形式)。

医学上大量的试验证明,大豆异黄酮属于异黄酮类植物雌激素,具有雌激素双向调节作用,还具有抗肿瘤、预防骨质疏松、抗氧化、抗真菌、抗溶血与保护心血管等多种生理功能。近年来,国内外研究者对大豆异黄酮在畜禽上的应用效果进行了研究,发现大豆异黄酮生物利用率高,可调控动物机体养分代谢,改善饲料利用率,并具有抗氧化作用,可改善动物产品品质,提高动物免疫机能和生产性能。因此,大豆异黄

酮在畜禽营养中的作用越来越受到关注。本文对近年来有关大豆异黄酮在畜牧生产中的研究与应用进行综述,主要从大豆异黄酮的吸收与代谢、对动物机体养分代谢的影响、抗氧化作用及其机理、在畜禽上的应用效果4个方面进行了论述。

1 大豆异黄酮的吸收与代谢

目前,大豆异黄酮在体内的吸收与代谢研究主要集中在人和动物试验上(苏成业等,1979;Setchell等,2003;Andlauer等,2000;Adlercreutz等,1991,1993),在畜禽上研究报道较少。

研究表明,大豆异黄酮主要通过两个途径吸收:动物胃肠粘膜可以直接吸收糖苷形式的异黄酮;也可以通过主动转运吸收,这需要借助糖基转运蛋白和乳糖脱氢酶两种活性蛋白。Stephen(1998)提出,异黄酮的甙元在单胃动物胃和小肠的前段就有吸收, β -糖甙在小肠末端被吸收,而丙二酰化和乙酰化的糖甙被大肠的微生物降解后吸收。

被吸收的异黄酮及其分解产物在胃粘膜、肝脏和肾脏中被结合成葡萄糖醛酸酯的形式,少量结合成硫酸酯的形式。异黄酮的葡萄糖醛酸酯可经胆汁排入十二指肠,然后在小肠中被再吸收,形成肝肠循环。动物体内游离型的异黄酮及其代谢产物的比例很低,并且在各组织中分布不均匀,血浆、肝脏、肾脏中含量较高,脑中含量较低。一般情况下,由胃肠吸收的异黄酮在一天内就会经肾脏随尿液排出体外。Andlauer等(2000)在离体细胞腔和血管灌流小鼠小肠试验中发现,金雀异黄素在小肠的吸收率为40.6%,其中大部分(31.3%)以金雀异黄素葡萄糖苷酸形式存在,并作为主要代谢产物被回收(13.3%),仅少量的金雀异黄素(2.6%)和金雀异黄素葡萄糖苷酸(2.9%)存留在小肠组织。由此可见,大豆异黄酮的生物利用率很高,而且其葡萄糖苷是主要的活性形式。

不同动物对大豆异黄酮的吸收和代谢速率不同,一般情况下单胃动物慢于复胃动物(Lundh,1995)。Lundh(1995)报道,猪摄入异黄酮8h后,尿中排出量约为55%,其中22%已转化为雌马酚;而在反刍动物体内,异黄酮要经瘤胃微生物作用,脱甲基转变成大豆黄酮,经进一步代谢,约70%变成雌马酚。

Daidzein在体内的代谢产物有雌马酚、二氢大豆

蒋守群,广东省农业科学院畜牧研究所,510640,广东省广州市天河区五山大丰一街。

蒋宗勇,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-05-08

★ 广东省自然科学基金团队项目,项目编号:05200576

甙元和去甲基安哥拉紫檀素,而金雀异黄酮的代谢产物为对乙基苯酚(Bhathena等,2002)。雌马酚在体内相当稳定,通过尿、粪或奶排出体外(Braden等,1971; Dickinson等,1988)。

2 大豆异黄酮对机体养分代谢的影响

2.1 大豆异黄酮对机体蛋白质代谢的影响

雌激素可通过促进转录活性增加组织蛋白质的合成(Hofbauer等,1999;Villa等,1995)。Hayase等(2001)也报道,雌激素能促进卵巢切除鼠脑中蛋白质的合成。大豆异黄酮具有类似弱雌激素的活性,因此也可能具有促进机体蛋白质合成的作用。

血液中的尿素、尿酸绝大多数是由肝脏经鸟氨酸循环从氨基酸中所脱下的氨生成的,通过血液循环至肾脏排出体外。血浆中尿素、尿酸氮的水平可反映动物蛋白质代谢状况,并可作为蛋白沉积的一个指标。试验显示,添加大豆异黄酮可以降低肥育猪、绵羊血清中尿素氮含量(程忠刚等,2005;郑元林等,2001),也可降低肉鸡、产蛋鸡血清中尿酸水平(王国杰等,1994;孟婷等,2004a、b)。肝脏是体内生成尿素的最主要部位,由于肝脏是体内实质器官中血液供应最丰富、代谢率最高的器官,肝血液流入量约占心脏输出量的1/4,因此,肝脏部位尿素生成的减少可为其它部位如肌肉的蛋白沉积提供充分的氮源。郑元林等(2002)的试验表明,1×10⁻⁵mol/l大豆异黄酮可使大鼠离体肝脏灌流液中尿素氮浓度下降,抑制大鼠离体灌流的肝组织中GPT的活性,提高³H-亮氨酸的掺入量,说明大豆异黄酮可通过增加对大鼠肝脏氮的储留,促进大鼠肝细胞蛋白质的合成。以上试验显示,大豆异黄酮可通过降低肝脏、血浆中尿素氮的生成来促进机体对蛋白质的沉积。另外,王国杰等(1994)认为,大豆异黄酮促进肉鸡肌细胞蛋白质的沉积。Lyou等(2002)报道,在饲料中补充0.01%金雀异黄酮14d,提高了12周龄卵巢切除小鼠的脑皮质和小脑中蛋白质合成率。但也有试验表明,大豆异黄酮不利于机体蛋白质的合成。Ji等(1999)研究表明,金雀异黄酮或Genistein能极显著抑制成肌细胞的增殖和融合,抑制肌管蛋白的合成,而且这种蛋白质合成的降低主要是肌纤维蛋白合成率降低的结果。因此,大豆异黄酮对机体蛋白质代谢还未有定论,其对机体整体与各部分的蛋白质代谢是否存在差异有待进一步研究。

2.2 大豆异黄酮对机体脂肪代谢的影响

在人和动物上的试验研究显示,摄入豆制品能对高胆固醇血症、心血管疾病提供保护,而豆类产品

中大豆异黄酮具有弱雌激素和抗雌激素活性,对降低胆固醇,调节机体脂肪代谢起主要作用。

饲料中添加大豆异黄酮,能降低东北仔鹅、艾维茵商品代肉鸡腹脂、皮下脂肪的沉积率(刘哲洁等,2003a、b;张桂春等,2003)。针对蛋鸡的试验显示,大豆异黄酮可降低蛋黄中甘油三酯含量,降低血浆总胆固醇、甘油三酯水平(尹靖东等,2002;马得莹等,2005)。谢棒祥等(2002)也报道,添加大豆异黄酮显著降低了肉鸡血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇水平,显著提高了高密度脂蛋白胆固醇水平。Yousef等(2004)在新西兰白公兔上的试验也显示,饲料中添加2.5mg/kg或5.0mg/kg大豆异黄酮显著降低血浆总脂、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白水平和低密度脂蛋白与高密度脂蛋白比例,显著提高高密度脂蛋白含量。

关于大豆异黄酮调控机体脂肪代谢的作用机制研究报道较多。一方面,大豆异黄酮可能通过降低肝脏中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)和苹果酸脱氢酶(MDH)的活性来调控机体脂肪沉积(刘哲洁等,2003a、b)。机体的脂肪是通过肝脏中G-6-PDH和MDH在糖代谢过程中提供的乙酰乙酸合成的,此途径作用降低,机体合成脂肪的原料减少,因而导致机体合成脂肪减少。另一方面,大豆异黄酮通过调控脂肪相关基因(脂蛋白基因)的表达影响脂肪代谢。Kim等(2005)报道,饲喂高脂肪饲料显著改变小鼠107个基因的表达,补充大豆异黄酮则使其中84个基因表达正常化,使参与脂肪酸催化的几个基因上调,并激活肉碱-O-八酰转移酶。Claudia等(1998)研究表明,补充大豆异黄酮降低了沙鼠肝脏脂蛋白A-1mRNA水平。Stefania等(2000)研究发现,10μmol/l Daidzein和Genistein分别使介质细胞中Apo A1含量增加约1倍和5倍,Genistein对Apo A1分泌的影响与17-β-雌二醇类似,用Genistein对肝癌细胞系Hep G2处理24h增加了Apo A1基因的转录活性,用含Apo A1基因调节区的质粒转染试验表明,在-256与-41核苷之间的Apo A1 5'端基因表达受Genistein的调控。

异黄酮还可能通过影响低密度脂蛋白受体LDL或过氧化物酶体增殖受体PPAR-α活性调节动物机体脂肪代谢,这方面的研究报道较少。Elizabeth等(1998)报道,饲料异黄酮降低了C57BL/6鼠血浆胆固醇含量,但未降低LDL受体缺乏小鼠的血浆胆固醇含量,说明异黄酮能通过增加LDL受体活性而降低血浆胆固醇水平。Mezei等(2003)研究发现,在含

PPAR α 或 PPAR γ 表达质粒的 RAW264.7 细胞中大豆异黄酮使 PPAR 基因表达加倍 ($P<0.05$), Genistein 和 Daidzein 均使 PPAR α 基因表达加倍 ($P<0.05$), Genistein 和 Daidzein 均使 PPAR γ 基因表达增加 200%~400%。

2.3 大豆异黄酮对机体糖代谢的影响

关于大豆异黄酮对动物机体糖类代谢的影响研究报道较少,且结论不太一致。Keppens 等(1995)用鼠肝细胞研究表明, Genistein 专一性抑制由表皮生长因子(EGF)对糖原磷酸化酶的激活通路,能部分激活磷酸化酶,减弱糖原合成酶活性。林成招等(2005)在体外培养的 SD 大鼠小肠上皮细胞上的试验表明, 0.1、0.5ng/ml 的大豆异黄酮和 0.5、1.0ng/ml 的染料木素对离体小肠葡萄糖的吸收具有促进作用。但 Vedava nam 等(1999)发现, Genistein 和 Daidzein 均抑制兔小肠刷状缘膜囊对葡萄糖的吸收。Huppertz 等(2001)也报道, Genistein 抑制骨骼肌细胞的葡萄糖吸收。有关大豆异黄酮对动物机体糖类代谢的调控作用机制还不十分清楚。其可能的机制是:大豆异黄酮可能通过激活 PPAR 受体调控机体糖代谢(Mezei 等, 2003);大豆异黄酮可竞争性结合细胞核内雌激素受体蛋白调控有关基因表达(Matin, 1978; Markiewicz, 1993);大豆异黄酮可通过抑制蛋白酪氨酸激酶, 调节胰岛 β -细胞的胰岛素分泌(Akiyama, 1987)。

2.4 大豆异黄酮对机体钙、磷代谢的影响

有关大豆异黄酮对动物钙、磷代谢的研究报道较多,并且结论较为一致。绝大多数试验表明,大豆异黄酮对动物钙、磷的吸收利用与骨骼发育具有重要作用。马学会等(2004)研究表明,添加大豆异黄酮可以提高蛋鸡产蛋后期蛋壳品质,增加骨密度,提高血清钙含量,降低血清碱性磷酸酶活性。刘德义等(2005)也报道, 饲料中补充 60 或 75mg/kg 大豆异黄酮均显著或极显著提高奶牛血清钙水平。李大为等(2002)报道,大豆异黄酮具有刺激成骨细胞增殖,提高碱性磷酸酶活性、细胞基质钙含量及矿化结节形成数量的作用。郑高利等(2002)研究表明,异黄酮对雌激素缺乏引起的骨中钙、镁、磷和某些微量元素丢失具有明显防治作用,增加钙、磷在骨骼的沉积,改善骨质的微量元素代谢障碍,促进铁、锌、锰和镁等元素在骨骼的沉积。Ishimi 等(1999)报道,连续给予大鼠 0.5mg/d Genistein 2 周,能明显抑制由于卵巢摘除引起的骨髓 B 淋巴细胞增生。Yamaguchi 等(1998)通过体外骨细胞培养试验证实了 Genistein 可提高碱性磷酸酶活性,提高脱氧

核糖核酸和降钙素含量。Ishida 等(1998)报道,大豆苷和染料木素都能减少骨损失,其中大豆苷能降低骨转化率,抑制尿中骨吸收指标上升。Ishiki 等(2000)发现,低剂量的大豆异黄酮(0.4~0.7mg/d)可抑制小鼠股骨骨小梁的减少。那晓琳等(2002)研究表明,大豆异黄酮可提高正常断乳大鼠的骨钙含量和骨密度。郭慧君等(2001)在断乳雄性大鼠饲料中连续 30d 添加大豆异黄酮 3mg/kg,也得到类似结论。

3 大豆异黄酮的抗氧化作用及其机理

大豆异黄酮的主要生物学作用之一是抗氧化作用。在体外无细胞系统中的试验显示,大豆异黄酮能捕获、清除自由基,发挥抗氧化作用。但不同大豆异黄酮种类及其配体之间的抗氧化性不同,而且大豆异黄酮的抗氧化活性由其化学结构和带电荷状况决定。韩丽华等(2001)在大豆油、棉籽油和葵花籽油中添加大豆异黄酮,观察其对食用油过氧化值的影响,结果表明,大豆异黄酮的抗氧化作用比叔丁基对苯二酚(TBHQ)强。Cotelle 等(1996)和 Cao 等(1997)发现,大豆异黄酮能捕获自由基。陈芳等(2005)报道,大豆异黄酮可有效清除邻苯三酚-鲁米诺反应体系及 Fe^{2+} 和 H_2O_2 -鲁米诺反应体系产生的氧自由基与羟自由基。Wei 等(1995)研究表明,大豆异黄酮在体外能有效抑制 β -胡萝卜素亚油酸盐的氧化,并发现糖苷配基比相应的配糖体有效, Genistein 比 Daidzein 和 Glycitein 更有效。Arora 等(1998)研究了大豆异黄酮及其代谢产物在脂质体中的抗氧化活性,结果表明,母核异黄酮及其代谢产物对抑制金属离子诱导的过氧化比超氧自由基诱导的过氧化更有效,而且其代谢产物的抗氧化活性更强, Equol、4-OH 和 5-OH 代谢产物是最有效的抗氧化剂。总体上,大豆异黄酮母核中 2,3 双键的缺乏和 4-氧基团增加抗氧化性,而且,羟基位置和数量是异黄酮的决定因子,羟基代替位置最佳为 C-4' 位,适宜位置为 C-5 位,最差为 C-7 位。Zielonka 等(2003)报道,在生理 pH 值条件下, Genistein 的单阴离子形式清除自由基能力比中性分子形式更强。

在动物和体外细胞培养试验中发现,大豆异黄酮能提高动物机体抗氧化酶活性,降低过氧化产物的产生。饲料中添加 15mg/kg 大豆异黄酮降低肥育猪血液 MDA 含量,提高血清 SOD、GSH-Px 的活性(程忠刚等, 2005)。陈芳等(2005)在断奶仔猪上也得到类似结论。朱新建等(2004)在 420 日龄伊沙蛋鸡上试验也表明,饲料中连续 30d 添加 6mg/kg 大豆黄酮,蛋鸡血清 SOD 水平提高 6.24%;MDA (丙二醛)水平降低

18.48%；肝脏及下丘脑中 MDA 水平分别降低了 34.48% 和 25.07%。尹靖东(2002) 在 28 周龄海赛克斯褐壳蛋鸡中研究报道,日粮中添加大豆异黄酮显著抑制氧化胆固醇形成,其中 7-keto 氧化胆固醇和总氧化胆固醇量分别下降 27.5% 和 35.5%。尹靖东等(2003)进一步研究表明,在饲料中连续 8 周添加 40mg/kg 大豆异黄酮可提高海赛克斯褐壳鸡蛋黄脂质稳定性,降低蛋鸡肝脏、血浆和蛋黄中脂质过氧化物含量,增强蛋鸡总抗氧化能力。马得莹等(2004)也研究表明,大豆异黄酮具有增强老龄蛋鸡抗氧化水平。Elke 等(2002)用大豆异黄酮处理鼠肝细胞瘤 H4IIE 细胞,使过氧化氢酶 mRNA 表达提高了 2~3 倍,GSH-Px 活性提高。Yousef 等 (2004) 发现,在饲料中添加 2.5mg/kg 或 5.0mg/kg 大豆异黄酮显著降低新西兰白兔血浆、肝脏、脑、肾脏的 TBARS 值。

尽管大多数试验已证实大豆异黄酮具有抗氧化作用,但其作用机理尚未研究清楚。目前的研究提出了几种可能的机制。

3.1 大豆异黄酮提供氢原子,捕捉脂肪超氧自由基,抑制脂肪和脂蛋白的氧化

异黄酮类抑制微粒体和脂质体的脂肪过氧化(Cotelle 等,1996;van Acker 等,1996;Arora 等,1998a,b)。Peng 等(2003)比较了不同结构异黄酮对 Caco-2 小肠细胞由 H_2O_2 和 Fe^{2+} 处理引起的脂肪过氧化的影响,发现具有 O-二羟或邻-三羟基团的异黄酮,均能阻碍 MDA 形成,发挥抗脂肪氧化效应。Patel 等(2001)研究表明,异黄酮在抑制脂肪过氧化过程中未被消耗而保持原始状态,而且与维生素 C 具有协同作用,并认为其最可能的机制是异黄酮提供氢原子,捕捉脂肪超氧自由基。

3.2 大豆异黄酮经调控 PPAR γ 通路,抑制 LDL 的氧化

Tikkanen 等(1998)报道,大豆异黄酮使 LDLs 氧化曲线后段平均延后 20min。Meng 等(1997)研究发现,异黄酮抗氧化的亲脂性产物能进入 LDL 颗粒而发挥抗氧化作用。Meng 等(1999)发现,大豆异黄酮 Genistein 和 Daidzein 与脂肪酸的酯化提高了其进入 LDL 的亲脂性,增加对 LDL 的氧化抑制。Jukka 等(1996)经过混浊度和差异扫描热量测定显示,Daidzein 进入脂质双层,影响其热相特性,导致由酸性磷脂组成的脂质体集聚。Kaamanen 等(1998)研究也发现,Genistein 形成亲脂性产物——Genistein 单酯在 LDL 与 HDL 中的积累可能抑制 LDL 的氧化。Xu 等 (2004) 研究表明,

Genistein 在转录水平通过下调 p22phox 和 AT1 受体表达,而且至少部分经 PPAR γ 通路中发挥抑制效应。

3.3 抑制 DNA 氧化损失

大豆异黄酮能有效降低由 UV 光线和 Fenton 反应引起的 DNA 氧化损失(Wei 等,1996)。Wei 等(2002)报道,在经 UVB 照射前对小鼠用 10 μ mol 的 Genistein 处理 1h,显著降低了皮肤中由 UVB 引起的 H_2O_2 和 MDA、表皮和内脏器官中 8-羟基-2'-脱氧鸟苷含量。Hong 等(2004)报道,异黄酮增加血清总抗氧化值,降低血液淋巴细胞的 DNA 损失。Foti 等(2005)在 Jurkat 细胞和初级淋巴细胞中补充 Genistein 或 Daidzein 发现,浓度为 0.5,5mol/l 异黄酮均显著增加对 DNA 的抗氧化保护,浓度高于 2.5mol/l 的 Daidzein 还降低 MDA 产生,两种异黄酮均能有效抑制淋巴细胞的氧化损失。

4 大豆异黄酮在畜禽上的应用效果

4.1 大豆异黄酮对繁殖母猪和商品猪的影响

大豆异黄酮在猪营养上的研究主要集中在繁殖母猪方面,而在商品肉猪方面的研究相对较少(见表 1)。在母猪饲料中添加大豆异黄酮可提高母猪泌乳力,改善仔猪生长性能。刘根桃等(1997)报道,在经产二花脸母猪分娩第 1d 至 45d,饲料中添加 5mg/kg 大豆异黄酮极显著提高了母猪产后第 5d 的泌乳量,并促进仔猪生长和母猪发情。刘根桃等(1999)在母猪预产期前一个月至产后一周,在饲料中添加 5mg/kg 大豆异黄酮,经产母猪(大约克 $\times$ 二花脸)产后第 10d 和第 20d 的每次泌乳量分别提高 10.57%($P<0.05$)和 14.67%($P<0.01$),所产仔猪初生窝重和 20 日龄窝重也显著提高($P<0.05$)。韦习会等(2004)在大约克夏母猪和二花脸母猪上的试验也得出相似的结论。

大豆异黄酮能提高仔猪生长性能和免疫机能,但也有试验显示,大豆异黄酮对去势仔猪生长的影响表现明显的性别差异。Greiner 等(2001a,b)研究表明,饲料中大豆异黄酮水平为 200~400mg/kg 时,能促进仔猪生长和体内病毒的清除。陈芳等(2005)报道,饲料中添加 40mg/kg 大豆异黄酮,仔猪增重效果较好。饲料中添加 5mg/kg 大豆异黄酮,雄性去势仔猪增重提高 59.15%,但雌性去势仔猪增重降低 26.39%(郭慧君等,2002)。赵志辉等(2003)在 2 周龄仔猪耳后皮下注射大豆异黄酮(每周每千克体重注射 2mg),连续注射 5 周,结果表明,大豆异黄酮对仔公猪生长具有明显的促进作用,对仔母猪则效果不明显。

Cook(1998)报道,大豆异黄酮可提高生长猪日增重和胴体瘦肉率。林映才等(2001)报道,日粮中添加大

表 1 饲粮中添加大豆异黄酮对猪生产性能的影响

猪种与生理阶段	使用阶段与用量	使用效果	资料来源
经产母猪(大约克×二花脸)	产前 1 个月 5mg/kg	泌乳量提高 14.67%	刘根桃等(1999)
大约克夏、二花脸母猪	妊娠 85d 至产后 7d 分别为 8mg/kg 和 5mg/kg	仔猪个体重和窝重提高	韦习会等(2004)
仔猪(杜长大)	断奶后 42d 40mg/kg	平均日增重提高 10.1%	陈芳等(2005)
仔猪(高瘦肉型)	19d 200~400mg/kg	降低血液 PRRS 病毒水平,提高增重与采食量	Greiner 等(2001a,b)
2 周龄仔猪	每千克体重 2mg,皮下注射 5 周	试验仔猪猪体重比对照组增加 26.69%,仔猪增重增加 6.86%	赵志辉等(2003)
生长猪	10mg/kg	日增重、采食量提高,料重比降低	林映才等(2001)
肥育猪	15mg/kg	平均日增重提高 9.5%,料重比降低 12.0%	程忠刚等(2005)
27~119kg 猪	<240mg/kg	未改善生产性能与肉品质	Stahly 等(2002)
肥育公猪	生长期 263mg/kg,肥育早期 171mg/kg,肥育后期 105mg/kg	胴体品质改善,生长性能和肉品质未受影响	Payne 等(2001)
肥育小母猪	生长期 246.2mg/kg,肥育早期 215.7mg/kg,肥育后期 142.9mg/kg	采食量增加,肉色和滴水损失改善	Payne 等(2001)

大豆异黄酮显著提高生长猪平均日增重和采食量,降低料重比,明显改善试猪的肤色和毛况,并认为猪生长阶段大豆异黄酮适宜用量为 10mg/kg。程忠刚等(2005)研究表明,饲粮中添加 15mg/kg 大豆异黄酮使肥育猪的平均日增重提高 9.5%,料重比降低 12.0%。Payne 等(2001)报道,补充大豆异黄酮使公猪肥育后期屠宰率、胴体长度、后腿和胴体无脂瘦肉重和瘦肉率、日瘦肉增重、瘦肉与脂肪比例和后腿重均增加($P<0.10$),后

腿脂肪量、后腿和胴体脂肪率降低($P<0.10$);在小母猪上的试验显示,随大豆异黄酮水平提高,肌肉肉色评分 a^* (红度)和 b^* (黄度)值、滴水损失降低。可见,大豆异黄酮能提高生长肥育猪的生产性能,并具有改善猪胴体品质和肉品质趋势。

4.2 大豆异黄酮对蛋禽和肉禽的影响

大豆异黄酮在家禽上的研究主要集中在蛋禽方面,且效果较好,但是在肉禽上的研究却较少(见表2)。

表 2 饲粮中添加大豆异黄酮对家禽生产性能的影响

家禽品种	用量	使用效果	资料来源
樱桃谷肉种鸭	6mg/kg	产蛋率提高 7.69%,料蛋比降低 6.15%	朱建平等(2002)
岭南黄肉种鸡	3mg/kg	产蛋率提高 30.0%,蛋重提高 5.99 %	黄金明等(2003)
海兰褐蛋鸡	10mg/kg	产蛋率提高	马得莹等(2005)
产蛋种鸭	5mg/kg	产蛋率提高 7.7%,蛋重提高	Zhao 等(2004)
伊莎蛋鸡	6mg/kg	采食量提高,产蛋率提高 31.06%,料蛋比下降	左伟勇等(2003)
蛋鸡	10mg/kg	蛋品质改善	马学会等(2004)
产蛋后期绍兴蛋鸭	5mg/kg	产蛋率提高 13.33%	周玉传等(2002)
海赛克斯褐蛋鸡	10mg/kg	产蛋率提高 7.2%	尹靖东等(2002)
罗曼蛋鸡	3mg/kg	产蛋率提高	刘燕强等(1998)
雄性高邮鸭	3mg/kg	平均日增重提高 7.26%,饲料利用率提高 3.63%	赵茹茜等(2002)
红布罗肉公鸡	3mg/kg	日增重提高 10.1%,胸肌和腿肌重分别提高 6.5 %和 7.2 %	王国杰等(1994)
岭南黄肉鸡	10mg/kg	增重提高,料重比降低	程忠刚(2001)、林映才(2001)
艾维茵肉鸡	10mg/kg	增重、饲料利用率、采食量均显著提高	郭晓红等(2004)
黄羽肉鸡	1~4 周 11.7mg/kg, 5~7 周 7.7 mg/kg	增重、饲料利用率、采食量均显著提高	李莉鸿等(2005)
肉鸡	346.6 mg/kg 或 1 386.7mg/kg	生长性能降低,胸肌重提高,腹脂含量降低	Payne 等(2001)
肉公鸡		提高增重、饲料转化率和免疫器官重	高峰等(2000)
肉用鹌鹑	20mg/kg	鹌鹑增重显著提高,采食量没有变化,料重比有降低的趋势	杨晓静(2004)

4.2.1 大豆异黄酮对蛋禽产蛋性能的影响

刘燕强等(1998)研究表明,在饲粮中补充 3mg/kg 大豆异黄酮,提高了 242 日龄和 330 日龄罗曼蛋鸡产蛋率、蛋重和饲料转化率。尹靖东等(2002)报道,饲粮

中添加 10mg/kg 大豆异黄酮可使海赛克斯褐蛋鸡产蛋率提高 7.2%。左伟勇等(2003)试验也显示,饲粮中补充大豆异黄酮 6mg/kg 能够改善 13 周龄伊莎蛋鸡蛋鸡产蛋性能。孟婷等(2002)报道,在初产迪卡蛋鸡饲

粮中补充大豆异黄酮 3mg/kg,提高了产蛋率、产蛋量,降低破蛋率。在岭南黄肉种母鸡和海兰褐产蛋鸡慢性热应激期饲料中补充大豆异黄酮也提高了产蛋率(黄金明等,2003;马得莹等,2005)。在玉米-豆粕-杂粕型饲料中添加 10mg/kg 大豆异黄酮可提高产蛋后期鸡蛋壳品质(马学会等,2004)。朱新建等(2004)还报道,饲料中补充 6mg/kg 大豆异黄酮可延长蛋鸡产蛋高峰期。

Zhao 等(2004)研究报道,在 415 日龄产蛋种鸭饲料中添加大豆异黄酮,可使产蛋率提高 7.7%,而蛋黄与蛋白比例显著降低。大豆异黄酮对绍兴鸭产蛋初期和产蛋后期生产性能的影响不太一致,试验显示,添加大豆异黄酮降低产蛋初期绍兴鸭的产蛋性能,而提高产蛋后期的产蛋性能(周玉传等,2002)。周玉传等(2002)对其进一步研究显示,大豆异黄酮能显著提高产蛋后期绍兴鸭产蛋性能,并呈现剂量效应,其适宜添加量为 5mg/kg。在樱桃谷肉种鸭上的试验显示,饲料中补充 6mg/kg 大豆异黄酮,使产蛋率提高 7.69%,料蛋比降低 6.15%,并能促进卵泡生长发育(朱建平,2002)。总体上,饲料中添加适量大豆异黄酮,能提高产蛋鸡和蛋鸭的产蛋性能、促进卵泡的发育。

4.2.2 大豆异黄酮对肉禽生长性能和免疫机能的影响

有关大豆异黄酮在肉用禽上的大部分试验呈现正效果。谢棒祥等(2002)研究报道,日粮中添加异黄酮可显著提高商品代 AA 肉鸡饲料转化率,其中以添加 5mg/kg 最为适宜。王国杰等(1994)报道,在 32 日龄红布罗肉鸡饲料中连续 28d 添加 3mg/kg 大豆异黄酮,公鸡提高日增重 10.1%,胸肌重和腿肌重分别提高

6.5%和 7.2%。大豆黄酮也能改善黄羽肉鸡、艾维茵肉鸡生长性能(林映才等,2001;程忠刚等,2001;郭晓红等,2004;郭晓红等,2005;李莉鸿等,2005)。大豆异黄酮能增加雏鸡的免疫器官相对重量,增强 T 淋巴细胞对植物血凝素的反应性(高峰等,2000)。Payne 等(2001)在商品肉鸡的试验表明,饲料中补充大豆异黄酮,降低了肉鸡生长性能,但提高了胸肌重;在低蛋白-补充氨基酸饲料中添加大豆异黄酮还降低了肉鸡腹脂含量。杨晓静(2004)报道,在饲料中添加 20mg/kg 大豆异黄酮,显著提高了鹌鹑增重,并提高法氏囊指数及新城疫抗体滴度。在 5 日龄雄性高邮鸭上试验也显示,日粮中添加 3mg/kg 大豆异黄酮可以促进鸭的生长,提高饲料利用率(赵茹茜等,2002)。总体上,大豆异黄酮能改善肉禽生长性能,提高免疫力,但对胴体品质和肉品质的影响还有待进一步探讨。

5 结语

综上所述,大豆异黄酮能改善动物生产性能,调控机体蛋白质、脂肪、糖类和钙、磷等营养物质的代谢,并具有抗氧化作用。经毒理学试验证实,大豆异黄酮在畜禽生产中使用未发现任何毒副作用。因而,作为一种安全、无毒、无副作用的饲料添加剂,在畜禽生产上具有广阔的应用前景。但关于大豆异黄酮对畜禽肉品质的影响及其机制研究报道较少,大豆异黄酮对机体蛋白质等养分代谢的影响还未有一致的结论,大豆异黄酮抗氧化作用的分子机制还有待进一步研究。

(参考文献 94 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

· 光盘推荐 ·

品 名	定价(元)	品 名	定价(元)	品 名	定价(元)
中国牧业企事业单位名录	100	肉鸡饲养管理与屠宰	25	海狸鼠养殖技术	25
畜牧业经济与规模化养殖场经营管理	125	养鸡生产	125	麝鼠 果子狸养殖技术	25
高致病性禽流感预防与控制	25	鸡的饲养	50	兰狐养殖	25
家畜生理学	325	雏鸡和蛋鸡的饲养与管理	25	养鹿	25
兽医微生物学	250	农村养鸡	25	中国对虾的养殖	25
兽医药理学	200	良种肉鸭大棚饲养技术	25	罗氏沼虾 大口鲈鱼的养殖	25
兽医学	375	鸭鹅养殖技术	25	海参人工养殖秘诀	25
瘦肉型猪的繁殖与饲养	25	鸭病防治	25	珍珠的养殖	25
猪的养殖	75	养鹅 蛋鸭的放牧饲养管理	25	河蟹的养殖	50
猪病防治	50	四季鹅的养殖技术	25	实用养鳖新技术	25
养牛技术	75	獭兔	50	塑料大棚控温快速养鳖	25

邮局汇款地址:110036沈阳市金沙江街 16 号 6 门(本社发行部收)

联系电话:(024)86391237

银行汇款单位:辽宁省农牧业机械研究所有限公司 开户行:中信银行沈阳分行皇姑支行 帐号:72214101826000548-49

液态蛋氨酸羟基类似物(HMB)的酸化剂效应研究

王之盛 崔 芹 刘永刚 周安国

摘 要 采用单因子试验设计,研究了液态蛋氨酸羟基类似物(HMB)作为酸化剂对饲料品质和仔猪生产性能的影响。选用 96 头(28±3)日龄断奶的杜×长×约(DLY)仔猪,随机分为 5 个处理组:3 个 HMB 组(每吨饲料中添加 HMB 为 1.14、2.28、3.42kg)、对照组(基础日粮组)、复合酸化剂组(每吨饲料中添加 3.0kg 复合酸化剂)。结果表明,①HMB 降低了饲料系酸力。②试验 1~6 周,添加 HMB 1.14kg/t 组和 2.28kg/t 组均显著提高了采食量、日增重和饲料利用效率($P<0.05$);添加 HMB 2.28kg/t 组提高仔猪生产性能的效果优于复合酸化剂组($P>0.05$)。③添加 HMB 显著降低了仔猪腹泻率($P<0.05$)。HMB 在断奶仔猪饲料中具有酸化剂作用。

关键词 HMB;仔猪;酸化剂;生产成绩;系酸力

中图分类号 S816.79

Study on the effects of methionine hydroxy analogue (HMB) on acidifier in the diet of piglets

Wang Zhisheng, Cui Qin, Liu Yonggang, Zhou An'guo

Abstract One factor design was conducted to investigate the efficacy of supplementation of methionine hydroxy analogue [2-Hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid, HMB] on acidifier in the diet of piglets. A total of 96 weanling crossbred piglets (Duroc × Landrace × Yorkshire) were randomly allocated into 5 treatments: Control, HMB 1.14, 2.28 and 3.42kg/t, acidifier 3.0kg/t. The results showed that: ① HMB decreased the dietary buffer capacity. ② HMB 1.14 and 2.28kg/t significantly improved ADG, ADFI and feed conversion rate ($P<0.05$), especially in 1~6 weeks post-weaning. The response of HMB 2.28kg/t was better than acidifier group ($P>0.05$). ③ HMB significantly reduced the diarrhea rate of piglets ($P<0.05$). HMB can be used as acidifier to improve performance of the weaned piglets.

Key words HMB; piglets; acidifier; performance; dietary buffer capacity

酸化剂对猪生产性能影响的研究已经有 40 多年历史,添加酸化剂对断奶仔猪的健康和生长有积极作用(Ravindran, 1993; Liu, 2001)。蛋氨酸羟基类似物 [2-Hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid, HMB] 是蛋氨酸的氨基被羟基取代后的产物,在家禽饲料中广泛作为蛋氨酸源使用,它与等物质的量的 DL-Met 对仔猪具有相同的蛋氨酸活性(NRC, 1998)。HMB 是一种有机酸,酸性较强, pH 值 ≤ 1 ,解离常数为 3.60,它是否可以作为早期断奶仔猪饲料酸化剂应用的研究报道很少。本试验研究 HMB 对仔猪饲料品质和对仔猪生产性能的影响,评价其是否具有酸化剂的促

生长效应。

1 材料和方法

1.1 试验设计和材料

采用单因子试验设计。HMB (RhodimetAT88, 含 HMB 88%)由法国 ADISSEO 公司提供,复合酸化剂为乳酸宝。基础日粮配制参照 NRC(1998)猪营养需要,配制两阶段日粮(见表 1), I 阶段(试验 1~3 周)、II 阶段(试验 4~8 周)。试验分 5 个处理组:3 个 HMB 组(在基础日粮中按每吨饲料中 1kg DL-Met 计算分别添加 HMB 1.14、2.28、3.42kg)、对照组(基础日粮组)、复合酸化剂组(每吨饲料中添加 3.0kg 复合酸化剂)。

1.2 试验动物及饲养管理

试验在四川省成都市金骊种畜场进行,分别选择体重相近,健康的 96 头(28±3)d 断奶的杜×长×约(DLY)仔猪,平均体重(7.0±0.5)kg,随机分为 5 个处理组,每个处理组 6 个重复(圈),每千克饲料中添加 3.42kg HMB 和 3.0kg 复合酸化剂组中的每个重复 2 头猪,其余每个处理组中每个重复 4 头仔猪(公母各半)。预饲

王之盛,四川农业大学动物营养所,副教授,625014,四川省雅安市新康路 36#。

崔芹、周安国,单位及通讯地址同第一作者。

刘永刚,安迪苏亚太私人有限公司。

收稿日期:2006-03-06

★ 项目经费:安迪苏亚太私人有限公司(新加坡)研究经费

期 5d,正式试验期为 8 周。试验猪全部饲养在同一栋半开放双列式猪舍内,按照常规进行仔猪饲养管理,自由采食和饮水,每日准确记录采食量、仔猪精神状况和腹泻情况。

表 1 基础日粮配方

原料	I 阶段(%)	II 阶段(%)	营养水平	I 阶段	II 阶段
玉米	58.47	64.14	CP(%)	19.9	18.00
次粉	6.7	6.5	DE(MJ/kg)	13.81	13.81
大豆粕	11.83	9.47	Ca(%)	0.80	0.70
膨化大豆	3.52	2.8	AP(%)	0.45	0.4
菜籽饼	2.61	2.15	Lys(%)	1.35	1.15
玉米蛋白粉	2.17	1.72	Met(%)	0.35	0.30
啤酒酵母	2.44	1.94			
蔗糖	3	3			
鱼粉	6.7	6.05			
食盐	0.2	0.15			
矿添	0.3	0.3			
碳酸钙	0.51	0.39			
磷酸氢钙	0.76	0.65			
碳酸氢钠	0.24	0.24			
多维	0.1	0.1			
氯化胆碱	0.1	0.1			
盐酸赖氨酸	0.35	0.30			
合计	100	100			

注:1. 矿添为每千克基础日粮提供的微量元素含量分别为 Fe 150mg、Cu 150mg、Mn 40mg、Zn 150mg、I 0.3 mg、Se 0.3mg;
2. 多维中每千克含 VA 54 000 000IU、VD₃ 10 800 000IU、VE 18 000IU、VK₃ 5g、VB₁ 2g、VB₂ 15g、VB₆ 6g、VB₁₂ 30mg、烟酸 35g、泛酸钙 25g、叶酸 500mg。

1.3 测定指标

①日增重:第 2、4、6、8 周末早上 8:00 空腹称重,计算平均日增重;②采食量:按每圈计算每天实际采食量;③料重比:根据采食量和日增重数据计算;④饲料系酸力:测定参照 Bolduan(1988);⑤腹泻率:测定参照 Barnett 等(1989)。

1.4 数据处理

采用 SPSS11.5 软件统计分析,用 LSD 进行多重比较。

2 试验结果

2.1 HMB 对饲料系酸力的影响(见表 2)

表 2 HMB 对饲料系酸力的影响

分组	系酸力(ml)(I 阶段)	系酸力(ml)(II 阶段)
对照组	26.03	27.18
HMB 1.14kg/t 组	23.70	25.37
HMB 2.28kg/t 组	22.80	23.73
HMB 3.42kg/t 组	22.75	24.34
复合酸化剂组	23.71	24.97

注:系酸力(ml)为 100g 风干饲料于 200ml 去离子水中,用 1mol/l 盐酸滴定至 pH 值为 4.0 时所用盐酸的体积。

表 2 结果表明,添加 HMB 和复合酸化剂均降低了饲料系酸力。与对照组相比,在前期料和后期料中添加 HMB 2.28kg/t 组和添加复合酸化剂组饲料系酸力分别下降了 12.40%、8.90%和 12.69%、8.13%。

2.2 HMB 对仔猪生产性能和腹泻率的影响(见表 3)

由试验全期结果表明,与对照组相比,添加 HMB 组和复合酸化剂试验组均提高仔猪末重,减少腹泻率。HMB 2.28kg/t 组末重比对照组提高 6%,腹泻率显著低于对照组($P<0.05$)。

表 3 HMB 对仔猪末重和腹泻率的影响

项目	始重 (kg/头)	末重 (kg/头)	增加 (%)	腹泻率 (%)
对照组	8.02±0.01	36.76±1.26	-	15.12 ^b
HMB 1.14kg/t 组	8.00±0.02	37.84±0.71	2.94	13.58 ^{bc}
HMB 2.28kg/t 组	8.03±0.01	38.97±0.96	6.01	13.27 ^c
HMB 3.42kg/t 组	8.01±0.01	37.00±1.34	0.65	14.81 ^b
复合酸化剂组	8.00±0.02	37.75±1.13	2.69	13.27 ^c

注:同一列数据肩部标有不相同小写字母表示差异显著($P<0.05$),标有相同小写字母或未标注字母表示差异不显著($P>0.05$)。下表同。

仔猪各阶段生产性能见表 4。结果表明,试验 1~2 周, HMB 1.14kg/t 组采食量与对照组相比增加 12.6%,增重提高 16.4%($P<0.05$); 试验 3~4 周时, HMB 2.28/t 组采食量与对照组相比增加 12.2%, 增重提高 17.4% ($P<0.05$); 试验 5~6 周时, HMB 2.28kg/t 组猪采食量高于对照组 6.9%, 增重提高 19.3% ($P<0.05$); 试验 7~8 周, HMB 和复合酸化剂未能显著改善仔猪生产性能。试验 1~6 周添加 HMB 和复合酸化剂提高了仔猪日增重、采食量和饲料转化效率,但改善幅度随时间延长而降低。

表 4 HMB 对仔猪不同试验阶段生产性能的影响

项目	1~2 周			3~4 周			5~6 周			7~8 周		
	ADG	ADFI	F/G	ADG	ADFI	F/G	ADG	ADFI	F/G	ADG	ADFI	F/G
对照组	275 ^a	460	1.67	420 ^a	828	1.98	560 ^a	1 158	2.10 ^{ab}	762	1 536	2.02
HMB 1.14kg/t 组	320 ^b	518	1.62	458 ^{ab}	887	1.93	582 ^{ab}	1 180	2.03 ^{ab}	770	1 620	2.11
HMB 2.28kg/t 组	298 ^{ab}	502	1.69	493 ^b	929	1.89	668 ^b	1 238	1.86 ^b	733	1 622	2.22
HMB 3.42kg/t 组	286 ^{ab}	506	1.76	480 ^{ab}	928	1.94	562 ^a	1 204	2.14 ^a	742	1 594	2.14
复合酸化剂组	295 ^{ab}	514	1.76	479 ^{ab}	863	1.82	618 ^{ab}	1 256	2.04 ^{ab}	734	1 576	2.15

注: ADG 为平均日增重(g); ADFI 为平均日采食量(g); F/G 为料重比。

3 讨论

3.1 HMB对仔猪生产性能的影响

添加复合酸化剂在前期提高了仔猪生产性能,这与国内外许多研究结果基本一致(冷向军,2002)。浣长兴等(1999)认为,在早期断奶仔猪日粮中添加HMB可以提高仔猪生产性能。本试验也表明,添加HMB显著提高采食量、日增重和饲料利用效率,其效果优于复合酸化剂组 and 对照组,这是由于HMB作为有机酸化剂提高了采食量,降低了饲料系酸力,弥补了仔猪胃酸分泌不足,降低仔猪胃肠道pH值,抑制有害病原菌增殖(Wang,2004),提高消化酶活性,提高饲料利用效率(冷向军,2002)。仔猪早期对蛋氨酸需要量相对较高,HMB可作为蛋氨酸源弥补了日粮蛋氨酸不足的缺点,平衡了日粮营养水平,提高氨基酸和能量的消化率,促进氮沉积(Mroz,1998)。随着仔猪生长,其分泌胃酸能力增强,对酸化剂和蛋氨酸的需要量相对降低,并且蛋氨酸对动物是相对毒性最大的氨基酸,继续添加酸化剂和HMB,其促生长效果降低,甚至会影响仔猪的生理健康而产生负面影响(Giesting,1991)。本试验中也发现,试验7~8周HMB3.42kg/t组和复合酸化剂组的采食量低于HMB1.14kg/t和2.28kg/t组,对照组饲料转化效率最高,表明HMB在断奶仔猪饲料中的酸化剂效应,存在典型的时间-剂量效应关系。

3.2 对饲料系酸力和仔猪腹泻率的影响

HMB具有较强的酸性,添加酸化剂和HMB降低了饲料的系酸力和仔猪腹泻率,这与相关研究报道结果一致(Ravindran,1993;Bosi,1999)。断奶仔猪腹泻主要与仔猪分泌胃酸不足,以及病原性大肠杆菌爆发等因素有关。Wang等(2004)研究表明,HMB对大肠杆菌O₈、O₁₅₇、O₁₄₉,沙门氏菌和坏死性肠炎梭菌均具有抑菌和杀菌效果,添加HMB通过降低饲料系酸力和降低仔猪胃肠道pH值,可以改善肠道微生物菌群(冷向军,2002;Bosi,1999),促进乳酸杆菌等有益菌的增殖,抑制大肠杆菌增生,避免了大肠杆菌爆发,降低仔猪腹泻率,促进仔猪生长。

HMB在仔猪饲料中具有酸化剂的作用效果,对仔猪生产性能的提高优于复合酸化剂,HMB作为仔猪饲料酸化剂适宜在仔猪断奶后6周内使用。

参考文献

- 1 冷向军,王康宁,杨凤,等.酸化剂对早期断奶仔猪胃酸分泌、消化酶活性和肠道微生物的影响[J].动物营养学报,2002,14(4):44-48
- 2 浣长兴,戴求仲.日粮中添加“Alimet”饲喂乳猪的效果[J].兽药与

饲料添加剂,1999(4):9~10

- 3 Barnett K L, Kornegay ET, Risley C R. Characterization of creep feed consumption and its subsequent effects on immune response scouring index and performance of weaning pigs [J]. J. Anim. Sci., 1989(67): 2 698~2 708
- 4 Bolduan G, Jung H, Schneider R, et al. Effect of propionic and formic acid in piglets [J]. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 1988(59): 143~149
- 5 Bosi P, Jung J, Han K, et al. Effects of dietary buffering characteristics and protected of unprotected acid on piglet growth, digestibility and characteristics of gut content [J]. Asian-Austr J. Anim. Sci., 1999, 12 (7): 1 104~1 110
- 6 Giesting D W, Easter R A. Effect of protein source and fumaric acid supplementation on apparent ileal digestibility of nutrients by young pigs[J]. J. Anim. Sci., 1991(69):2 497~2 503
- 7 Liu Y G. Recent developments in applying organic acids for health and nutrition [J]. Feed Mix, 2001(9):6
- 8 Mroz Z, Jongbloed A W, Partanen K. Ileal digestibility of amino acids fed diets of different buffering capacity and with supplemented organic acids[J]. J. Anim. Feed Sci., 1998,7(1): 191~197
- 9 NRC. Nutrient Requirement of Swine (9th Ed.)[M]. Washington, DC. National Research Council, National Academy Press, 1998
- 10 Ravindran V, Kornegay ET. Acidification of weaned pig diets: a review[J]. Food Agri. Sci., 1993(62):313~322
- 11 Wang ZS, Liu YG, Ni XQ. Liquid methionine analogues possesses microbial inhibitory activity[J]. Asian Poul., 2004(10):30~32

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

· 广 告 ·

争做稳定性VC系列优秀供应商——

**富阳市优派特
生物技术有限公司**

**L-抗坏血酸-2-磷酸酯 35%(2000吨/年)
包衣VC、VC钙、VC钠**

农业部生产许可证号:饲添(2003)1542

公司地址:杭州富阳市凤浦路86号(311400)

生产基地:富阳市灵桥镇工业小区2号

电话:0571-63349309

传真:0571-63340623

http://www.fyupdate.com

E-mail:sale@fyupdate.com

联系人:陈先生(13806517850)

酪酸菌微生物制剂的生物学功能及在饲料中的应用

宋会仪 吴天星

摘要 酪酸菌作为一种新型微生态饲用添加剂,不仅能够与乳酸菌等有益菌协同共生,而且对链霉素等多种抗生素具有抗性,与抗生素配合使用时其生物作用不受影响,这对其在目前饲料中普遍添加抗生素的情况下仍能发挥其效能有特别意义,是一种很有开发前景的微生态制剂。

关键词 酪酸菌;生物学功能;饲料;应用

中图分类号 S816.7

Biological function of clostridium butyricum and its application in feed industry

Song Huiyi, Wu Tianxing

Abstract Clostridium butyricum is a novel probiotic strain used in feed additive. The properties of its synergistic coexistence with other probiotics and resistance to many kinds of antibiotics contribute to its great potential function in the situation that feed has been added universally with antibiotics. So the biology function and its application in feed industry of clostridium butyricum were discussed in this article.

Key words clostridium butyricum; biological function; feed; application

近年来,我国畜牧业飞速发展的同时,也产生了一些问题,如畜禽粪便中产生的恶臭味对环境的污染、抗生素的残留、养殖成本高等,其中,抗生素残留尤为严重。酪酸菌作为一种新型微生态饲用添加剂,具有的耐热耐酸及对多种抗生素有抗生的特点,被广泛的应用在临床上治疗多种肠疾病,特别是对目前饲料中普遍添加抗生素的情况下仍能发挥其效能有特别意义,是一种很有开发前景的微生态制剂。

1 酪酸菌的来源及特性

酪酸菌 (Clostridium butyricum) 即丁酸梭菌,是 1933 年由日本千叶医科大学宫入近治博士首先发现并报告的,因此又名宫入菌^[1]。该菌存在于土壤、人和动物肠道、干酪及自然酸奶中,细菌学分类属于梭菌属,为革兰氏阳性厌氧芽孢杆菌,培养后期可变为阴性菌。日本最初将其应用于临床作为整肠剂,开发了酪酸菌液剂、粉末剂、胶囊剂等保健食品。后来将其作为兽医药品,用来治疗畜禽肠道菌群紊乱,提高其生产力^[2]。

酪酸菌为梭状芽孢杆菌,菌体为直或微弯,孢子圆形或椭圆形,为内生芽孢,常使菌体中部膨大呈梭形。对外界环境有较强的抵抗力,经 80℃、30min 和 90℃、10min 热处理后全部存活;加热 90℃、20min 后,95% 存活;加热 100℃、5min 后 30% 存活。耐热、耐酸,pH 值为 1.0~5.0 时仍能存活;pH 值为 4.0~9.8 时

能适合其生长。因此,酪酸菌能够抵抗饲料制粒过程中的高温、高热,与目前广泛应用的非芽孢类活菌制剂相比,更具广阔的市场前景。

2 酪酸菌的生物学功能

酪酸菌作为微生态制剂,进入肠道后能促进有益菌生长,抑制有害菌;促进肠道微生态平衡,提高畜禽免疫力和抗病力;促进其健康快速生长,提高饲料转化率,降低粪便臭味。

2.1 调节肠道微生态平衡

酪酸菌能促进肠道内有益菌群增殖和发育。研究发现,酪酸菌最显著的生物特性是能与双歧杆菌、乳酸菌、粪杆菌等肠道有益菌共生,并促进其发育,特别是培养液中含有能促进双歧杆菌发育的因子^[3]。朱晓慧等(2004)在双歧杆菌、嗜酸乳酸杆菌和粪链球菌的培养基中加入 1/3 比例的酪酸菌发酵提取物,进行室温培养 24 h。结果 3 种菌的活菌含量分别比对照组提高了 24.0%、42.57% 和 6.76%^[4],表明酪酸菌对肠道有益菌具有增殖作用。

酪酸菌在促进肠道有益菌群增殖的同时,还能防止病原菌及腐败菌在肠道内的异常增殖,纠正肠道菌群紊乱,减少肠毒素的发生。这是因为它能产生酪酸、乳酸等短链脂肪酸,抑制大肠杆菌、葡萄球菌等多种肠道有害菌。唐宝英等(2005)探讨了酪酸菌对 3 种畜禽肠道致病菌的体外拮抗作用,将酪酸菌分别和猪大肠杆菌、鸡大肠杆菌、鸡的痢沙门氏菌 3 种畜禽肠道致病菌按不同的比例混合接种于 CL(琼脂糖)液体培养基中进行厌氧培养,培养过程中 3 种致病菌的活菌数急剧下降,30h 后菌落数都逐渐降为零。说明酪酸

宋会仪,浙江大学动物科学学院,310029,杭州市凯旋路 164 号。

吴天星,浙江大学理学院。

收稿日期:2006-02-27

菌在体外试验中对上述 3 种畜禽肠道致病菌都有较强的拮抗作用^[5]。

2.2 产生营养物质,具有保健作用

酪酸菌在肠道内可产生 B 族维生素、维生素 K 和淀粉酶等物质,有助于饲料成分的消化,提高饲料转化率,对动物有良好的保健作用。酪酸菌还能促进 VE 的吸收。VE 能强化血管弹性,增强抗病性,激活细胞,对机体非常重要。以酪酸菌为主要成分制成的 VE 吸收促进剂对仔奶牛进行试验,采集血清测 VE 含量变化,发现试验组 VE 含量呈上升趋势,与对照组相比差异显著,仔鸡的试验也得出了相似结果。

2.3 对肠道致病菌具有拮抗作用

将酪酸菌的培养液分离、鉴别,发现它含有葡萄糖、麦芽糖等 6 种糖,含有酪酸、乳酸和醋酸等有机酸以及蛋白质分解酶等,这些小分子的有机酸可抑制常见致病菌的生长、定植,对其它各种不同肠道致病菌均有一定的抗菌作用。国内的许多研究报告已证实,酪酸菌可抑制霍乱弧菌、志贺氏菌、沙门氏菌、致病性大肠杆菌、出血性大肠杆菌以及引起伪膜性肠炎的魏氏梭菌的繁殖^[6],因此,酪酸菌可用于治疗肠道感染和肠功能异常。临床试验证明,酪酸菌剂对腹泻、肠应激综合征的治疗有效率可达 80% 以上;对便秘、便稀、胃肠炎的疗效也有 60%~75%, 是良好的整肠微生态药物。给小鼠灌服酪酸菌制剂后,有益菌中的双歧杆菌和乳酸杆菌的数量明显增加,肠球菌、肠杆菌以及有害的产气荚膜梭菌的数量无明显变化^[7]。有研究者用酪酸菌制剂喂食大鼠,观察其对大鼠右旋葡聚糖硫酸钠结肠炎的治疗作用。试验发现,酪酸菌治疗组大鼠的大肠湿重、溃疡面积和髓过氧化物酶(MPO)活性等炎症指标均低于对照组,证明酪酸菌制剂对结肠炎有良好的治疗作用。

2.4 对抗生素有较强的耐受性

双歧杆菌、乳酸杆菌等非芽孢类微生态制剂在临床上确实能起到调节肠道菌群紊乱的作用,但这些微生态制剂有一个致命的弱点,即在贮存和口服过程中易受外界各种生化和物理因素的影响而失去活性。特别是双歧杆菌对外界环境抵抗力极弱,室温保存时活菌数会大幅度降低,直接口服也易被胃酸灭活而降低疗效,需制成肠溶胶囊加以保护;另外,抗生素也对其有杀灭作用,因而临床上不宜与抗生素同服。而酪酸菌是一种专性厌氧芽孢杆菌,具有耐热、耐酸及对常用抗菌素有抗性等特点,与抗生素并用时不会影响其生物作用,在目前饲料中普遍添加抗生素的情况下仍能发挥效能。

3 酪酸菌在畜禽生产中的应用

酪酸菌能单独作为饲料添加剂使用,也能与乳酸菌、芽孢菌、双歧杆菌等益生菌复配使用,能增强该类产品的功效。黄俊等(2003)根据微生态理论,筛选出 3 株乳酸菌、2 株芽孢菌、2 株酵母菌、1 株光合菌、1 株酪酸菌,经过液体种子培养,再以麸皮为主要原料混合,在厌氧条件下固态发酵生产出新型微生物饲料添加剂,经过育肥猪养殖试验证明:2%添加量组比对照组提高日增重 8%,提高饲料利用率 10%,降低粪便 NH₃ 含量 61%;同时能显著提高猪的免疫力、抗病力^[8]。用蛋白酶、脂肪酶及糖化菌、乳酸菌、酪酸菌为有效成分,制成特效的鱼用饲料添加剂,也能促进鱼对蛋白质、脂肪的消化吸收,成活率上升。当将 0.5%和 2%酪酸菌加入到饲料中作为试验组,饲喂 8 周后,饲料效率比对照组高 8.0% 和 7.0%,增重率高 12.0% 和 11.5%。对肉用仔鸡的试验也证明了酪酸菌的这种功能^[9]。

4 小结

目前,酪酸菌活菌制剂作为新型饲料添加剂在饲料工业中的应用效果已越来越引起人们的关注,但是在应用中还存在如何确保在消化道内最大程度保持活性等问题。随着稳定化和微胶囊等技术在活性微生物制剂中的应用,酪酸菌微生态制剂将会在饲料工业中得到广泛应用,它低毒、无残留、安全性好,更符合消费者的期望,市场潜力巨大,有望成为新型的绿色饲料添加剂。

参考文献

- 1 庄志发,贺连智,冯紫慧.简述微生态活菌(酪酸菌)制剂的研究应用[J].山东食品发酵,1999(1):32-35
- 2 唐宝英,朱晓慧,刘佳.新一代微生态制剂——酪酸菌的研究和开发前景[J].中国微生态学杂志,2000,12(5):297
- 3 Kuroiwa T, Iwanaga M, Kobari K. Preventive effect of *Clostridium butyricum* M588 against the proliferation of *Clostridium difficile* during antimicrobial therapy[J]. J. Pn. A Inf. d, 1990(64):1 425-1 432
- 4 朱晓慧,唐宝英,刘佳.酪酸菌对肠道有益菌的增殖作用和共生关系研究[J].中国微生态学杂志,2004,16(4):193-196
- 5 唐宝英,朱晓慧,刘佳.酪酸菌对动物肠道致病菌体外拮抗作用的研究[J].生物技术,2005,15(1):37-39
- 6 张雪平,陆俭,傅恩武.酪酸梭菌与双歧杆菌对肠道致病菌的体外生物拮抗作用[J].中国微生态学杂志,2001,13(5):260-262
- 7 赵照,冉陆,杨宝兰,等.丁酸梭菌活菌制剂对肠道菌群影响的研究[J].中国微生态杂志,1999,11(6):332-333,338
- 8 黄俊,韩铭海,陈小娥,等.新型微生物饲料添加剂的开发及应用效果研究[J].饲料工业,2003,24(12):40-43
- 9 杨桂革.丁酸梭菌的生物学功能[J].中国微生态学杂志,1998,10(5):306-310

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

雨生红球藻规模化培养工艺的构建与应用

刘 伟 刘建国 林 伟 王增福 李颖逾 史朋家 薛彦斌 崔效杰

摘 要 针对雨生红球藻规模化培养中的工艺流程、生物污染、温度控制、溶氧解析和 pH 值稳定等问题,于 2003 年到 2005 年,在山东省潍坊地区,开展了雨生红球藻中试规模的论证研究。建立了可用于雨生红球藻规模化生产的 3 种不同类型的光生物反应器(柱式、管道、生物幕)和人工调节太阳能的温控车间,并构建了一套二步规模化培养工艺流程。结果表明,研究构建的培养模式降低了培养过程中的潜在风险,并大大提高了雨生红球藻虾青素含量。与传统培养方式相比,年培养天数大约提高了 3 倍。在每个批次培养中,细胞生长培养效率提高了至少 1.75 倍,虾青素累积培养所需时间缩短了 40%,虾青素含量提高了 4 倍。总体来看,研究构建的新工艺比传统开放模式的生产效率有很大提高,全年共计提高了 35 倍。

关键词 雨生红球藻;规模化培养;光生物反应器;工艺

中图分类号 S816.79

Technological assembly and its application in a pilot scale culture of *haematococcus pluvialis*

Liu Wei, Liu Jianguo, Lin Wei, Wang Zengfu, Li Yingyu, Shi Pengjia, Xue Yanbin, Cui Xiaojie

Abstract Some key problems existed in microalgal application such as technological assembly, bio-contamination protection, temperature controlling, dissolved oxygen discharging, pH stabilization, etc were conducted in a pilot scale culture of *haematococcus pluvialis* in Weifang from 2003 to 2005. Three new enlarged photobioreactors (column, tubular and biofilm), an effective and economic temperature controlled plant as well as two-step culture mode was established for microalgal application. Data also showed that the risk of bio-contamination usually blocking the scale-up process of *haematococcus pluvialis* culture was well reduced, meanwhile astaxanthin content was greatly enriched. Compared with the traditional technic, some crucial parameters in the new culture mode were greatly improved as below: 3 folds prolong of the cultivation period in a year, 40% decrease of the astaxanthin accumulation period, 1.75 folds increase in efficiency at least and 4 folds increase in astaxanthin content in the biomass. Therefore, the astaxanthin production efficiency in *haematococcus pluvialis* was about 35 folds higher than that of traditional technique.

Key words *haematococcus pluvialis*; pilot scale culture; photobioreactor; technological assembly

虾青素是类胡萝卜素含氧衍生物,呈鲜红色,目前主要作为水产动物及家禽的饲料添加剂。它具有改

善水生动物及禽类的色泽;促进鱼卵受精,减少胚胎发育的死亡率,促进个体生长,增加成熟速度(Torrisen 等,1995);提高母鸡的产蛋率,增加鸡蛋黄色素含量(Bernhard, 1990)等功能。此外,虾青素还具有促进抗体产生、增强免疫力等作用。

雨生红球藻是一种单细胞绿藻,能在特定条件下积累占干重 1%~5%的虾青素,可直接在饲料中添加使用。雨生红球藻被公认为目前自然界中生产天然虾青素的最好生物资源(董庆霖等,2004),具有非常好的开发前景,近几十年来一直受到国内外学者和产业界人士关注,大量关于红球藻细胞生长、虾青素累积培养和其它相关技术的文章陆续报道(Borowitzka 等,1991;Hagen 等,1994;Harker 等,1996;Lee 等,1995;Chen

刘伟,中国科学院海洋研究所海洋生物技术工程中心,266071,青岛市南海路 7 号。

刘建国(通讯作者)、林伟、王增福、李颖逾、史朋家,单位及通讯地址同第一作者。

薛彦斌、崔效杰,潍坊科技职业学院。

收稿日期:2006-05-15

★ 国家农业成果转化资金(02EFN216601213)、中国科学院方向性创新项目海藻资源高值化及环境治理新途径(L48032409D)和中国科学院海洋研究所创新项目(L86032523)资助

等,1997;Olaizola,2000;刘建国等,2000a,b;庄惠如等,2000)。雨生红球藻的生长对环境因子变化敏感,培养条件相对苛刻,目前国内外关于红球藻研究大多集中在实验室阶段,中试技术较少,而规模化生产只在美国夏威夷等个别地区进行(Olaizola M,2000)。

我国的雨生红球藻培养多处于实验室起步阶段,未见规模化培养技术方面的报道。本研究旨在通过适宜的技术手段,解决限制雨生红球藻规模化培养的关键问题,以促进我国早日实现该藻的规模化培养和虾青素生产。

1 材料与方法

1.1 实验藻种

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)取自于中科院水生生物研究所微藻生物种质库。

1.2 培养基

培养基分为自养和混合营养培养基两种。自养培养基采用MCM的修正配方(张京浦等,1994);混合营养培养基为每升上述自养培养基中添加0.8g的 CH_3COONa 配制而成。

1.3 培养方法

培养包括室内纯种培养、室外放大和规模培养。室内培养采用无菌摇瓶培养,培养温度(24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,光照强度 $100\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光照12h,黑暗12h。室内培养达到合适的生物量后,通过管路将藻液接种到室外光生物反应器中,进行放大培养,最后进行规模化培养。室外培养过程中的光照、温度随季节不同存在一定的变化,在培养过程中,根据细胞密度、接种时间以及光线和温度强弱适当加以调节,当温度和光线过强时适当遮蔽光线,以达到减弱光强和降温的作用;反之,增加采光光照。每日跟踪测定各项生长指标(每日定时在8:30、10:30、12:30、14:30、16:30分5次取样测定)。上述实验于2003年至2005年在山东省潍坊地区进行。开放池培养工作分别于1998年、2001年、2002年在同一地区进行。

1.4 细胞数量计算

在培养期间定时取样,用血球计数板显微计数。实验至少有2组以上重复,每组重复中细胞显微计数16次,以其平均值表示。

1.5 溶氧和pH值测定

溶氧用JPB-607便携式溶氧仪测定;培养液酸碱度采用雷磁pBH-4型pH计测定。

1.6 虾青素提取和含量测定

取10ml藻液于离心管中,4000r/min转速离心

5min。弃去上清液,藻泥中加入3ml丙酮(100%),混匀,转移至研磨器中研磨5min,然后转移至离心管中。按上述方法离心,上清液(色素溶液)转移至10ml容量瓶中。藻渣按上述办法重新进行萃取,至藻体成白色为止,定容色素上清液。

藻粉中虾青素提取也采用上述方法。取1.0g藻粉在丙酮中研磨提取,离心获得色素上清液,藻渣重新进行萃取,至藻体成白色为止,定容色素上清液。

采用722S型分光光度计和1cm光径的比色杯,分别测定480、645、663nm波长下色素提取液的光吸收值(OD值)。按公式计算虾青素含量:

藻液中虾青素量(mg/l)= $[4.6\times(\text{OD}_{480}-0.638\times\text{OD}_{645}+0.114\times\text{OD}_{663})\times\text{提取液体积}]/\text{藻液体积}$;

藻粉中虾青素量($\%$)= $[4.6\times 10^{-4}(\text{OD}_{480}-0.638\times\text{OD}_{645}+0.114\times\text{OD}_{663})\times\text{提取液体积}(\text{ml})]/\text{藻粉重量}$ 。

2 结果与讨论

2.1 工艺和流程

从实验室藻种到光生物反应器放大培养是实现微藻规模化培养的重要环节。在规模化生产中,需要构建规模大小递增的光生物反应器,而目前已有的各种类型的光生物反应器普遍体积较小,不能有效满足规模逐级放大的要求。如何根据不同微藻的生物学特性和光生物反应器的特点,通过建立有机搭配,逐级放大的培养单元,并构建合适的工艺流程成为微藻规模化培养的重要问题(Molina等,2001;Olaizola M,2003)。

雨生红球藻具有特殊的生物学性质,其生活周期分为快速生长繁殖的游动细胞阶段和虾青素累积阶段。这两个阶段所需要的适宜培养条件相差很大,在某些方面甚至相反,因此,二步培养是该藻规模化培养工艺流程的特色(Fabregas,2001)。在中试论证过程中也采用二步生产工艺,第一步控制培养参数,使细胞处于游动阶段以利于细胞快速繁殖,然后改变培养参数,完成细胞转化和虾青素累积;在二步培养过程中,根据不同光生物反应器特点和规模,设计并建立了新型的光生物反应器,其中:柱式光生物反应器每个单元有效体积200L,可由10~20个反应器组成2~4吨级的光生物反应器组,作为更大规模反应器的种子罐,用于放大培养,也可以直接作为终端培养系统使用;建立了适宜于规模培养的新型管道光生物反应器,每个管道光生物反应器体积理论上可以不断增加,在中试论证中采用20~40吨级规模的管道光生物反应器,进行雨生红球藻大量繁殖;另外,还针对红球

藻虾青素累积特点,建立了生物幕光生物反应器。采用将雨生红球藻固定化的方式,同时调节光照、温度、湿度和营养参数,从而实现快速大量生产虾青素。分析结果表明,每个细胞内虾青素含量可以达到 130pg 以上,远远高于传统水培条件下红球藻内虾青素含量。将上述 3 种光生物反应器有机结合,构成了一套完整的雨生红球藻规模培养的工艺流程:

摇瓶培养→柱式光生物反应器组培养(2~4 吨级)→管道光生物反应器培养(20~40 吨级)→生物幕光生物反应器虾青素累积

2.2 生物污染控制

传统上,微藻的规模化培养主要采用开放培养技术,该方式(如循环跑道池)相对简单、投资低,但存在培养参数变化较大,并且极易被各种污染生物(如轮虫、原生动物、藻类)污染的问题,大大限制了其在微藻生物技术领域的应用(Borowitzka 等,1988; Csordas, 2004)。该技术仅适用于几种微藻如螺旋藻、小球藻和盐藻的规模化开发,这是由于螺旋藻和盐藻分别能适应高 pH 值(10~11)和高盐度(接近饱和)的环境,污染生物在这种环境中很难存活;而小球藻生长速度非常快,能够在培养中保持优势种群,污染生物相对较少,不至于导致培养完全失败。近年来,微藻培养方式逐渐转向采用封闭式光生物反应器技术,该技术能够在相当程度上避免生物污染,然而由于材料和其它因素(如溶氧积累)的制约,封闭式光生物反应器的规模受到了很大限制。

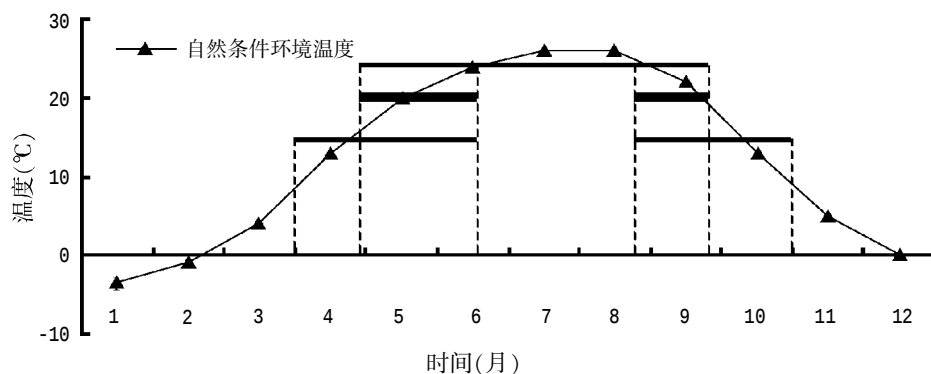
雨生红球藻生长条件相对温和,很多种生物比如轮虫、原生动物和其它微型藻类都能在雨生红球藻培养基中生长繁殖,生物污染防治成为该藻规模化培养时很难克服的问题。早期实验表明,开放池培养过程中,大约 4~5d 左右培养液中就会出现吞食红球藻的轮虫,随后导致整个培养失败(殷明焱,1998)。

本研究构建的柱式和管道光生物反应器能够有效避免生物污染的发生,在批次生长培养周期内(15d 左右)未发现原生动物、轮虫、杂藻等污染生物出现,生长培养过程可以顺利完成,并达到较高的雨生红球藻细胞生物量(最高密度可以达到 4.2×10^8 个/l)。构建的生物幕光生物反应器采用细胞固定化技术,使雨生红球藻脱离水相,这样原来危害红球藻的生物就丧失了赖以生存的水环境而无法存活,从而杜绝了轮虫、原生动物、藻类等生物污染问题。

在运用生物幕光生物反应器进行虾青素累积培养的过程中,还发现雨生红球藻细胞本身具有抗菌活性,能够抑制霉菌等微生物的污染。

2.3 温度调节

尽管雨生红球藻能够生存的温度范围比较广,但是,适宜该藻生长和虾青素累积的温度范围相差较大。对于雨生红球藻生长而言,15~25℃一般是比较适宜的(刘建国等, 2000a、b; 张展等, 2003)。实验过程中,中试地区(山东潍坊)四季分明,一年之中的温度波动较大。冬季很长一段时间处于低温状态,月平均气温在 -4~1℃波动,最低气温有时在 -10℃以下;而夏季温度很高,月平均气温在 24~27℃,最高气温有时超过 40℃。因此,冬、夏季节的自然温度条件都不适宜于雨生红球藻的生长培养。一年中仅有 4 月到 6 月中旬、8 月下旬到 10 月这段时间适合其生长培养。对于红球藻虾青素累积而言,实验表明,25~35℃是虾青素累积的理想温度(刘建国等, 2000a、b),一年中,在实验地区只有春末到秋初(5 月到 9 月)这段时间最适于虾青素累积。因此一年内,既适宜于细胞生长又有利于虾青素累积的重叠时间段是在 5 月到 6 月中旬和 8 月下旬到 9 月,全年大约有 90~100d(见图 1a)。我国北方地区普遍存在季节温度变化很大的现象,因此,规模化培养雨生红球藻在北方受到了限制。



(a) 自养条件

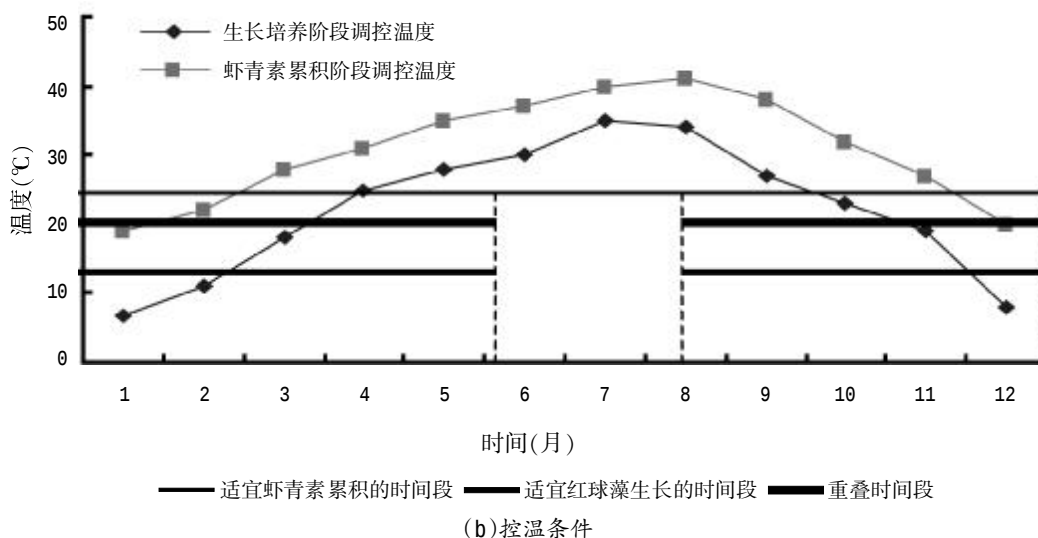


图1 自然条件和反应器控温条件下雨生红球藻年可培养时间对比

国外该产业之所以能够在美国夏威夷等少数地区成功开展,重要原因之一就是能够相对容易地控制培养过程中的温度。夏威夷地区地处热带、光线充足、温度相对较高,对于虾青素累积过程来说,温度是非常适宜的。尽管这种较高的气温不利于雨生红球藻的快速生长繁殖,但是该地区有特殊的地理条件,可以很方便地获得降温用的冷海水,因此控制温度培养红球藻也不是问题。事实上,Cyanotech 和 Aquasearch 等公司就是采用了从深海(600m)抽取冷海水,对红球藻生长培养过程进行经济有效的温度控制(Olaizola, 2000)。受地理条件限制,该方法到目前为止还不适合我国国情。

采用传统办法(比如热交换)进行温度控制耗资比较大、难于推广。将中试车间与温室技术相结合相对容易地实现了温度调控(见图2)。从图2可以看出:在培养雨生红球藻的柱式和管道光生物反应器中,春、夏季节的水温都能维持在细胞生长的温度范围。即使在冬季环境温度非常低时,这两种光生物反应器亦能够有效提升藻液温度(净增高了13℃左右);而在生物幕光生物反应器中,全年温度可提高到19~41℃,比较有利于雨生红球藻虾青素的累积,本结果意味着培养红球藻生产虾青素的适宜季节得到延长。如前所述,在我国北方地区,在自然条件下,适宜该产业发展的时间约有90~100d,而采用本技术后,一年内除7月和8月因环境温度过高,难以低成本的控制温度而不宜于规模培养雨生红球藻外,其余月份规模培养都可以进行,适宜周期可达300d,即

适宜天数提高了2倍,基本上解决了困扰北方地区雨生红球藻规模生产中的温度问题(见图1b)。

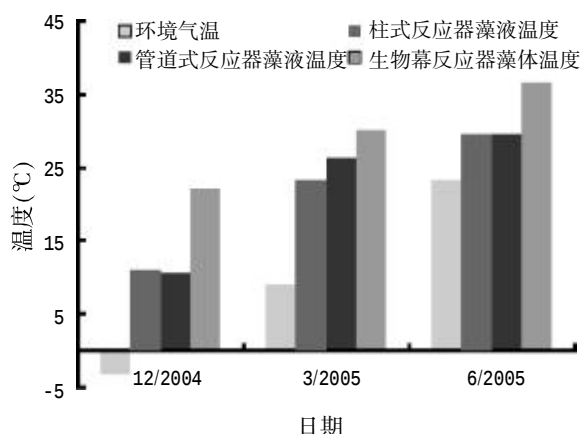


图2 不同月份环境温度和3种反应器中藻液平均温度

2.4 pH值和溶氧控制

反应器性能的重要参考标准就是培养基的混合效率及藻液的pH值和溶氧是否较容易地维持在所需范围内(Masahiko等,2002; Mirón AS等,2003; Berenguel, 2004)。以往的柱式光生物反应器底部通常较大,不可避免地存在不能有效搅拌的死角区域,导致消毒不全、营养分布不均、难以有效解析氧气和补偿二氧化碳,从而降低了微藻培养效率。改变设计,缩小底部面积,通入的空气和二氧化碳的混合气体能有效地搅拌藻液,从而达到解析溶解氧、补偿二氧化碳、控制pH值的目的(见图3)。

图3是雨生红球藻旺盛生长时柱式光生物反应器

内藻液的 pH 值和溶氧的动态变化。可见,尽管受到外界多种因素,如自然光照强度和温度变化等的影响,pH 值和溶氧短时间内会有一定程度的波动,但从整个培养过程来看,白天 pH 值相对恒定地在 7.0~8.5 范围内波动,没有偏离雨生红球藻旺盛生长所需的适宜 pH 值范围,不成为制约该藻生长的因素,在这个范围内,藻液中存在游离二氧化碳,保证了有充足的碳源供给藻细胞,满足光合生长需求。另外,溶氧则维持在 3.0~5.0mg/l 之间,即藻液中的溶氧低于其饱和程度,不存在过多的溶解氧积累而抑制细胞光合的问题。

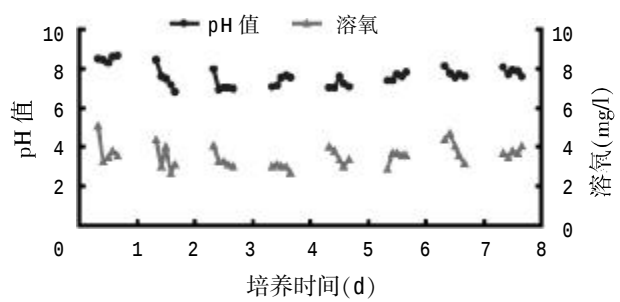


图3 一次典型培养过程中,柱式反应器内溶氧和 pH 值的动态变化

传统的管道光生物反应器在放大过程中存在 pH 值不易调控和溶解氧积累严重的问题。随着管道长度的增加,藻类生长过程中所产生的氧气大量积累,很难从反应器中有效解析出来,相反通入二氧化碳的浓度却越来越小,藻类的生长就受到了抑制。一般而言,管道长度限制在几十米范围之内,最长不超过

100m, 这样也就制约了光生物反应器的规模放大 (Molina, 2001; 向文洲, 2004)。本研究针对传统的管道光生物反应器的上述缺陷,改变管道结构布局 and 气体交换模式,管道总长度可以大幅增加,中试过程中的管道光生物反应器管道总长度可以达到 3 000m,有效培养体积 4.0×10⁴L。图 4 是红球藻细胞旺盛生长时管道光生物反应器内藻液的 pH 值和溶氧的动态变化(见图 4)。

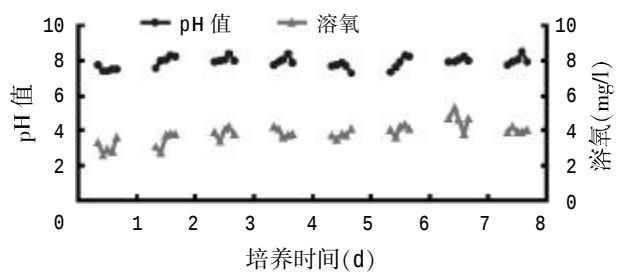


图4 一次典型培养过程中,管道反应器内溶氧和 pH 的动态变化

从图 4 可见,整个培养过程来中 pH 值和溶氧均未偏离雨生红球藻生长所需的适宜范围,没有出现以往管道反应器 pH 不易调控和溶解氧积累严重的问题。

2.5 同传统技术培养效果的比较

在季节和细胞接种密度基本相同(约 1×10⁷ 个/l)的情况下,对中试论证的主要参数和以往在该地区传统开放池技术的培养效果进行了比较(见表 1)。

表 1 各反应器与传统方式培养效果的对比

项目	培养时间	培养模式	营养方式	细胞密度(×10 ⁷ 个/l)	用时(d)	项目	培养时间	培养模式	虾青素含量(%)	用时(d)
细胞生长阶段	冬季	开放循环跑道池	自养	2~4	10~14*	虾青素累积阶段	冬季	传统水培累积模式	<0.1	> 14*
		新型柱式反应器	混养	20~30	7~9			生物幕技术	0.8~2.1	7~9
		新型管道式反应器	混养	18~27	7~9		春季	传统水培累积模式	0.1~0.5	7~14*
	春季	开放循环跑道池	自养	6~15	7~10**			生物幕技术	1.5~3.3	6~8
		新型柱式反应器	混养	20~32	7~9		春末	传统水培累积模式	0.3~1.0	7~14**
		新型管道式反应器	自养	10~17	5~7		夏初	生物幕技术	2~4	5~7
	春末夏初	开放循环跑道池	自养	8~12	5~7**					
		新型柱式反应器	自养	15~25	5~7					
		新型管道式反应器	自养	10~20	4~6					

注:* 表示易受受害生物污染常常影响工作进行;** 极易受受害生物污染导致整个工作失败。

2.5.1 雨生红球藻细胞的生长

在温度较低的冬季,开放池混养培养模式多出现微生物污染,自养培养条件下微生物含量下降,但是藻密度增加不多,细胞增加 2 倍需要 10~14d。相反,可以利用柱式和管道光生物反应器进行混养培养红球藻,培养过程中微生物污染几率较低,藻密度可以达到 2.5× 10⁸ 个/l 左右,用时在 7~9d。因此在冬季的

新技术培养效率可以提高 10 倍左右。

在春季和春末夏初,温度逐渐升高,用开放池培养方式进行培养发生生物污染的几率也逐渐增加,而用两种新型光生物反应器进行培养出现生物污染的几率并没有增加。最终完成一次规模培养管道反应器较循环跑道池培养用时缩短 10%~30%,平均缩短了 20%;而细胞密度则分别提高了 30%~50%,平均提高

40%。因此,在这段时间内,培养效率大约提高到原来的1.75倍。

由此不难计算,在雨生红球藻细胞培养方面,新技术效率至少是传统技术的1.75倍。

2.5.2 虾青素累积阶段

完成一次累积过程,生物幕技术比传统水培模式在冬季、春季、夏初用时分别缩短了43%、35%、44%,平均用时缩短了40%;雨生红球藻虾青素含量却分别提高了13.5、7、3.6倍,平均提高了4倍。

如前所述,应用新技术后1年内的生长期增加到原来的3倍。因此新工艺技术同传统开放池培养的生产效率相比,全年共计至少提高了35倍 $[3 \times 1.75 \times 4 \div (1-40\%) \approx 35]$ 。

3 小结

综上所述,本研究在相当程度上解决了限制雨生红球藻规模化培养的工艺流程、生物污染、温度、溶氧和pH值等关键问题。培养结果表明,本套体系可以在外界气温全年变化在-10~30℃之间的地区进行雨生红球藻的规模化培养,并达到比较理想的藻生物量和虾青素含量。

参考文献

- 董庆霖,赵学明,马红武,等.生物技术生产虾青素研究的最新进展.生物加工过程,2004,2(2):18~24
- 刘建国,殷明焱,张京浦,等.雨生红球藻的细胞周期初探.海洋与湖沼,2000a,31(2):145~150
- 刘建国,张京浦.雨生红球藻光合和呼吸速率研究.海洋与湖沼,2000b,31(5):490~495
- 向文洲.海水螺旋藻的生理抗性及其简易光生物反应器室外培养研究.中科院海洋研究所博士学位论文,2004
- 殷明焱.雨生红球藻细胞周期及调控研究.中科院海洋研究所硕士学位论文,1998
- 张京浦,刘建国.温度对于雨生红球藻光合作用的影响.植物生物学报,1994,4(1):6~10
- 张展,刘建国.微藻高密度培养中的生长指标和适应机制.海洋水产研究,2003,24(4):36~43
- 庄惠如,陈必链,王明兹,等.雨生红球藻混合营养与异养培养研究.生物学通报,2000,27(3):198~201
- Berenguel M, Rodriguez F, Acién FG, et al. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. J Process Control, 2004, 14(4): 377~387
- Bernhard K. Synthetic astaxanthin: The route of a carotenoid from research to commercialization. In Krinsky NL, Mathews-Roth MM, et al., Carotenoids: Chemistry and Biology. New York, Plenum Press, 1990.337~363
- Borowitzka M A, Borowitzka L J. Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press. 1988.18
- Borowitzka M A, Huisman J M, Osborn A. Culture of the astaxanthin-producing green-alga *Haematococcus pluvialis* I. Effects of nutrients on growth and cell type. J. Appl. Phycology, 1991, 3(4):295~304
- Csordas A, Wang JK. An integrated photobioreactor and foam fractionation unit for the growth and harvest of *Chaetoceros* spp. in open systems. Aquacultural Engineering, 2004, 30(1~2):15~30
- Fabregas J, Otero A, Maseda A, et al. Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. J. Biotechnology, 2001(89):65~71
- Feng Chen, Hui Chen, Xiandi Gong. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus pluvialis* and rheological behaviour of the cell suspensions. Biosource Technology, 1997(62):19~24
- Hagen C, Braune W, Bjorn L O. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales). Journal of Phycology, 1994, 30(2):241~248
- Harker M, Tsavalos A J, Young A J. Factor responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology, 1996, 55(3):207~214
- Lee Y K, Ding S Y. Effect of dissolved-oxygen partial-pressure on the accumulation of astaxanthin in chemostat cultures of *Haematococcus pluvialis* (chlorophyta). Journal of phycology, 1995, 31(6):922~924
- Masahiko M, Yoshitomo W, Hiroshi S. Photosynthetic productivity of conical helical tubular photobioreactor incorporating *Chlorella sorokiniana* under field conditions. Biotechnology and Bioengineering, 2002(2):155~162
- Mirón AS, García MGC, Gómez AG, et al. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. Biochemical Engineering Journal, 2003, 16(3):287~297
- Molina E. Tubular photobioreactor design of algal cultures. J Biotechnology, 2001(92):113~131
- Olaizola M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-litter outdoor photobioreactors. J. Appl. Psychology, 2000(12):499~506
- Olaizola M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. Biomolecular Engineering, 2003(20):459~466
- Torrisen O J, Christiansen R. Requirements for carotenoids in fish diets. J. Appl. Ichthyol., 1995(11):225~230

(编辑:孙崎峰, sqf0452@126.com)

饲用酶制剂中木聚糖酶酶学性质的研究

伏显华 伍明俊 刘 勇 汪 蕾 欧成勇 张亚峰 李 钢

摘 要 木聚糖酶是饲用酶制剂中的主要酶种之一,通过对某商品酶制剂中的木聚糖酶所进行的酶学性质的研究表明:该木聚糖酶的最适 pH 值为 4.5,最适反应温度为 50℃,干热稳定性良好, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{3+} 对本木聚糖酶有抑制作用,而 Mg^{2+} 、 Na^{+} 及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 能提高此木聚糖酶的活性。

关键词 饲用木聚糖酶;酶学性质;热稳定性

中图分类号 S816.3

在我国饲料生产中,配合饲料中除一般玉米-豆粕型日粮外,实际上更多的情况是在玉米-豆粕型日粮基础上加入 10%~40%的大麦或小麦、次粉、麦麸、统糠、棉粕等非常规饲用原料,但麦类、谷物和糠麸等副产品中含有许多抗营养因子,如木聚糖^[1],限制了其在饲料中的大量应用。饲料中添加木聚糖酶能降解木聚糖等非淀粉多糖,降低肠道粘度,提高饲料利用率,故开发木聚糖酶市场前景广阔^[2-5]。另外,国外低价格小麦、大麦产品的涌入,将进一步刺激木聚糖酶的市场需求。为了了解常用饲用酶制剂中木聚糖酶的酶学性质,我们对市场上某种木聚糖酶进行了最适 pH 值、最适反应温度、底物针对性、热稳定性、不同金属离子对其酶活的影响等实验,以期对木聚糖酶的保存、应用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

精密 pH 计(± 0.01)、万分之一电子天平、UV200 分光光度计、恒温水浴锅、离心机;木聚糖酶由四川某生物公司提供。

1.2 酶活测定(采用改良的 DNS 法^[6-8])

1.2.1 酶活单位定义

在 50℃、pH 值为 5.0 条件下,每分钟从 1.0%木聚糖酶溶液中释放 $1\mu\text{mol}$ 还原糖所需酶量定义为 1 个酶活单位(U)。

1.2.2 1.0%底物配制

准确称取 1g 燕麦木聚糖(sigma-X0627)加入醋

酸缓冲液中,加热、磁力搅拌溶解,定容至 100ml,保存在 4℃的冰箱内(3d 有效)。

1.2.3 DNS 试剂的配制

取酒石酸钾钠 182.0g 溶于 500ml 水中,加热(不超过 60℃),在热溶液中依次加入 3,5-二硝基水杨酸 6.3g、NaOH 21.0g、苯酚 5.0g、亚硫酸钠 5.0g,搅拌使它们溶解,冷却后定容至 1 000ml,贮于棕色瓶中,2 周后方可使用。

1.2.4 活力测定步骤

在 0.1ml 木聚糖底物中加入 0.1ml 稀释好的待测酶液,50℃水浴中反应 10min,立即加入 0.6ml 的 DNS 试剂,沸水浴中煮 15min,补加 4.2ml 水后,测定其 OD₅₅₀ 值。

2 实验设计与结果

2.1 木聚糖酶最适 pH 值

用 0.1M 柠檬酸和 0.2M 磷酸氢二钠溶液配制 pH 值范围为 3~7 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液,在不同的反应 pH 值条件下测定其酶活,以酶样最大吸光度的酶活为 100%,在其它 pH 值条件下的酶活为最大吸光度酶活的百分数即为该酶在此 pH 值条件下的相对酶活(见图 1)。

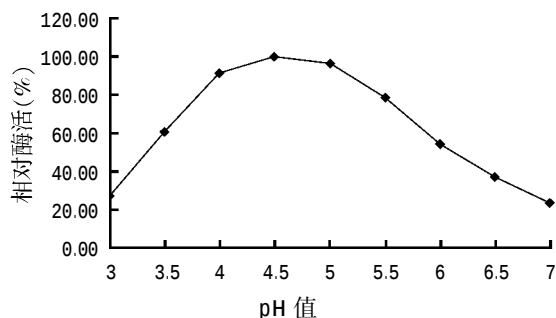


图 1 pH 值对酶活的影响

结果表明,该木聚糖酶在 pH 值为 4.5 的条件下,

伏显华,四川大光耀生物有限责任公司,610065,成都市科华北路四川大学西区 299 信箱科技园创新大楼 558 号。

伍明俊、刘勇、汪蕾、欧成勇、李钢,单位及通讯地址同第一作者。

张亚峰,四川禾本生物有限责任公司。

收稿日期:2006-03-13

酶活力最高,因此,可以确定该木聚糖酶的酶活测定的最适 pH 值为 4.5 左右。由图 1 可知,该酶的 pH 值在 4~5 时相对活力超过 91%,超出这一 pH 值范围后,酶活力下降,付五兵等认为这与 pH 值对酶蛋白活性部位中质子移变基团离子化状态的影响和该酶对 pH 值的稳定性等因素有关^[9]。

2.2 木聚糖酶最适反应温度

在最适 pH 值条件下,分别设置不同的反应温度,并测定该条件下的木聚糖酶活,以酶样最大吸光度的酶活为 100%,在其它温度下的酶活为最大酶活的百分数即为该酶在其温度下的相对酶活(见图 2)。

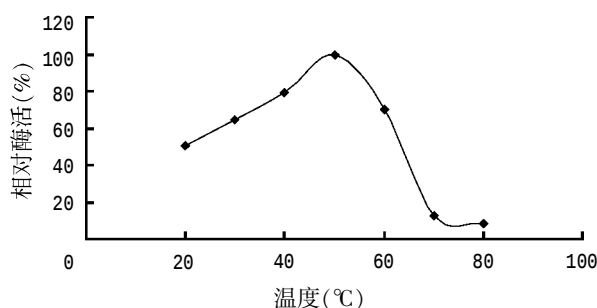


图 2 酶的最适反应温度

从图 2 可见,反应温度对该木聚糖酶酶活的测定影响很大,50℃时酶活最大。所以,我们确定该木聚糖酶的最适反应温度为 50℃。

2.3 木聚糖酶底物针对性实验

在最适 pH 值及最适温度条件下,分别以 1.0%桦木木聚糖和 1.0%燕麦木聚糖作为底物,测定在不同底物下的酶活。并以燕麦木聚糖为底物时的酶活为 100%,桦木木聚糖作为底物时的酶活为燕麦木聚糖作为底物时酶活的百分数即为其相对酶活。

木聚糖酶是一种复合酶,含有多种酶蛋白组分,从已有的研究结果可以发现,能产生木聚糖酶的微生物至少有 20 种,而且不同的微生物产生的木聚糖酶通常也是不同的。另外,底物中作用成分含量及分子结构的不同,也必定会造成酶活测定的不一致,研究表明,选用不同底物时测得木聚糖酶酶活差异较大^[5]。为此,对该木聚糖酶对不同底物进行了酶活针对性实验。实验结果表明,以桦木木聚糖作为底物时的酶活为以燕麦木聚糖作为底物时酶活的 88.62%,而李莲等人研究的木聚糖酶底物针对性实验则显示桦木木聚糖优于燕麦木聚糖^[10]。

2.4 木聚糖酶反应进程曲线的测定

将木聚糖粗酶液用 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀,离心 15min 去沉淀,取上清液;上清液再用 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀,离心后将沉淀溶解于 0.2mol/l 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 值为 5.0)中,上 Sephadex-G100 色谱柱进行分离纯化,用相同的缓冲液洗脱,收集含木聚糖酶的组分,冻干得纯酶。用纯化得到的酶进行如下的反应进程测定。

按照反应时间 20、40、60、70、80、90、100、120min 进行分组,每组分别添加 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1ml 经过适当稀释的木聚糖酶,不足部分用醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 值为 5.0)补足至最终体积为 0.1ml,按体积比为 1:1 加入 1.0%的木聚糖。50℃水浴条件下按相应的反应时间进行反应,以相对应的灭活酶液加 0.6ml DNS 试剂和 1.0%的木聚糖 0.1ml 作对照,完毕后在 OD₅₅₀ 处进行测定。以反应时间(min)为横轴,吸光值为纵轴,可给出不同酶添加量时的反应进程曲线(见图 3)。

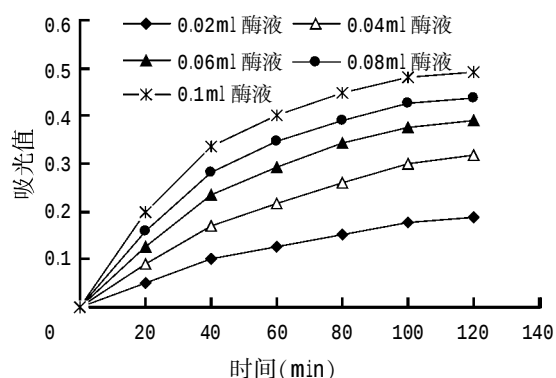


图 3 木聚糖酶的反应进程曲线

从图 3 木聚糖酶的反应进程曲线中可以看出,该木聚糖酶液添加量为 0.02~0.1ml,时间为 40min 之内,反应进程曲线均呈线性,所以在这个范围内进行测定,求出的反应速度为最大反应初速度,有利于酶活的正确测定。

2.5 木聚糖酶热稳定性研究

2.5.1 干热处理对木聚糖酶活的影响

在 55、65、75、85、95℃恒温干燥箱中将样品处理 10min,立即提取,测定酶活,并以未经干热处理的样品中的酶活为 100%,干热处理后的酶活为处理前酶活的百分数即为该酶经干热处理后的剩余酶活,结果见表 1。

从表 1 可以看出,该木聚糖酶对于干热处理温度不敏感,其耐干热处理的能力较强。

表1 干热处理对木聚糖酶酶活的影响

处理温度(℃)	55	65	75	85	95
相对酶活(%)	109.61	102.97	100.57	96.03	91.42

注:处理前酶活为100%。

2.5.2 湿热处理时间对酶活的影响

准确称取1.000 g样品加入10%的水(加水后总含水量约17%~20%),充分搅拌后盖严,于85℃恒温干燥箱中处理2、5、10和30min,立即取出并测定其酶活,以未经湿热处理的酶活为100%,湿热处理后的酶活为处理前酶活的百分数即为该酶经湿热处理后的剩余酶活,结果见表2。

表2 湿热处理时间对酶活的影响

湿热处理时间(min)	2	5	10	30
相对酶活(%)	94.72	89.72	77.74	42.24

注:处理前酶活为100%。

由表2可以看出,湿热处理同干热处理相比对酶活的影响要大得多,这是由于在湿热处理条件下,更易使蛋白质变性^[9]。实验可以看出该酶具有较好的热稳定性,含水分17%左右85℃条件下30min能保留42.24%的活力,在饲料加工时不会因制粒的高温湿热而引起酶活力大幅下降。

2.6 不同金属离子对木聚糖酶酶活的影响

用pH值为5.0的缓冲液配制的10mg/ml燕麦木聚糖溶液中分别加入不同种类的金属离子,并使反应体系中各离子终浓度为5mmol/l。以不加任何离子的木聚糖液作为底物时所测出的酶活值规定为100%,各种金属离子条件下所测出的酶活力为其百分数,即可得到该酶在其条件下的相对酶活,结果见表3。

表3 不同离子或化合物对木聚糖酶活性的影响

化合物	相对酶活(%)	化合物	相对酶活(%)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	106.62	(NH ₄) ₂ SO ₄	104.08
CuSO ₄ ·5H ₂ O	87.44	KCl	100.09
NaCl	101.08	MnSO ₄ ·7H ₂ O	73.47
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	96.27	FeCl ₃ ·6H ₂ O	70.29
CaCl ₂	99.15		

由表3可以看出,此酶对5mmol/l的金属离子不太敏感,Cu²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺、Ca²⁺对于木聚糖酶的活性有一定的抑制作用,其中Mn²⁺、Fe³⁺的抑制作用最强,酶活损失约26.53%~29.71%,其次为Zn²⁺、Cu²⁺,酶活损失约3.73%~12.56%,Ca²⁺、K⁺对木聚糖酶活影响

不大;此外,Na⁺、Mg²⁺及(NH₄)₂SO₄对酶活性有一定的激活作用。说明金属离子对该酶的影响小于其它一些报道,可能是不同来源的木聚糖酶对金属离子的敏感程度有一定的差异^[10,11],因此,饲料中添加的金属离子对该木聚糖酶酶活的影响不大。

3 讨论

本文研究的木聚糖酶最适pH值和最适温度与其它报道的木聚糖酶的特性相似,而耐热性能较好,是已有报道的木聚糖酶中最优的一种性能,在85℃下湿热处理30min剩余酶活42.24%,而现用的饲用酶制剂中木聚糖酶在85℃湿热处理10min剩余酶活为34.62%^[10],由于此酶的热稳定性很好,可以保证在饲料加工的制粒过程中减少酶活损失。另外,Cu²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺和Fe³⁺对本木聚糖酶有抑制作用;而Na⁺、Mg²⁺及(NH₄)₂SO₄对其酶活有一定的激活作用。

从该木聚糖酶的特性看,动物肠道内的温度、pH值对其活性影响不大,而且能耐受制粒过程中的高温,这使其在动物饲料中的运用具有独特优势。

参考文献

- John R. Whitader, Alphons GJ, Voragen DW W. Handbook of Food Enzymeology[M]. New York: 2 Marcel Dkker, Inc., 2003. 879~880
- Inborr J, Ogle R B. Effect of enzyme treatment of piglet feeds on performance and post-weanling diarrhoea. Swed. J. Agri. Ren., 1998 (6): 129~133
- 侯丙炎. 木聚糖酶及其应用 [J]. 动物科学与动物医学, 2002, 19 (4): 52~53
- Owen R. Fennema. 王璋等译. 食品化学, 第三版[M]. 北京: 中国轻工出版社, 2003
- 冯定远. 酶制剂在饲料工业中的应用. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005. 199~251
- 陆文清, 李德发. 还原糖法测饲用非淀粉糖酶的分析[J]. 饲料工业, 2002, 23(2): 27~29
- Khan, A. W. Assay of xylanase and xylosidase activities in bacterial and fungal cultures. Enzyme Microb. Technol., 1986(8): 373~377
- 董国强, 张猛白, 林开江. 半纤维素酶的DNS液显色法测定. 浙江农业科学, 1989(2): 88~89
- 付五兵, 朱涛, 张勤良, 等. Bacillus subtilis T15产木聚糖酶的酶学特性及其在禽饲料中应用的初步. 饲料工业, 2005(16): 34~35
- 李莲, 罗才长. 饲料用酶制剂中木聚糖酶酶学性质的研究. 中国牧业, 2002, 12~26
- 李卫芬, 孙建义. 木聚糖酶的特性研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版) 2001, 27(1): 103~106

(编辑: 刘敏跃, lm-y@tom.com)

扩展青霉产碱性脂肪酶发酵条件的研究

马歌丽 彭新榜 陈丽超

摘要 对扩展青霉 PE51.1 菌产碱性脂肪酶的培养基配方和摇瓶发酵条件进行了初步研究,结果表明,最佳培养基组成为(g/l):黄豆粉 40、玉米淀粉 10、糊精 10、橄榄油 10、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10、 NaNO_3 5、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1、 K_2HPO_4 3、 CaCO_3 5;最佳发酵条件为:装液量 30ml(250ml 三角瓶)、接种量 3%、起始 pH 值 8.5、温度 28℃、摇床转速 150r/min。在此条件下,PE51.1 菌的最高产酶活性可达 20.83U/ml。

关键词 碱性脂肪酶;扩展青霉;发酵条件

中图分类号 S816.79

脂肪酶是一种特殊的酯键水解酶,它可作用于甘油三酯的酯键,使甘油三酯降解为甘油二酯、单甘油酯、甘油和脂肪酸。与化学催化剂相比,生物脂肪酶具有更广泛的作用 pH 值和作用温度,高底物专一性、区域选择性或对映选择性,广泛应用于油脂、食品、香料、化妆品、医药、皮革等领域中。

目前,已发现至少有 65 个属的微生物产生脂肪酶,不同微生物来源的脂肪酶其组成成分、理化特性各有不同。由扩展青霉(*Penicillium expansum*)产生的脂肪酶,其最适作用 pH 值为 9.5~10.5,称为碱性脂肪酶(Alkaline lipase)。把碱性脂肪酶作为助洗剂添加到洗涤剂中,不但能与洗涤剂中的表面活性剂有很好的配伍性,而且能提高洗涤剂的去污能力。碱性脂肪酶本身无毒性,且能被生物完全降解,对环境无污染,是当今消费者追求的绿色添加剂。

本文对从实验室保藏菌种中筛选得到的一株产碱性脂肪酶活性较高的扩展青霉菌株 PE51.1 的发酵培养基组成和培养条件进行了初步研究,以期为进一步研究碱性脂肪酶的发酵生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种

扩展青霉(*Penicillium expansum*) PE51.1 菌株,从生物工程实验室保藏菌种中筛选得到。

1.2 培养基

种子培养基:黄豆粉 10 g/l、葡萄糖 10g/l、玉米淀粉

10g/l、柠檬酸钠 1g/l、 NaNO_3 5g/l、 K_2HPO_4 5g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06g/l, 自然 pH 值;发酵基础培养基:黄豆粉 60 g/l、玉米淀粉 10g/l、葡萄糖 10g/l、 NaNO_3 5g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/l、 K_2HPO_4 3g/l、 CaCO_3 5g/l, 自然 pH 值。

1.3 培养方法

种子培养条件:26℃、150r/min、装料量 30ml (250ml 三角瓶),振荡培养 60h;发酵培养条件:26℃、150r/min、接种量约为 4%,装料量 50ml(250ml 三角瓶),振荡培养 114h。

1.4 分析方法

菌体生物量的测定:发酵液经适当稀释,用 721 分光光度计在 600nm 波长处测定其浊度,以 OD_{610} 表示。

发酵液 pH 值的测定:PHS-3C 精密酸度计测定。

脂肪酶酶活的测定:NaOH 电位滴定法。

2 结果与讨论

2.1 碳源的影响

分别用 1%和 2%的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、玉米淀粉和糊精为单一碳源;1%玉米淀粉+1%糊精及 2%玉米淀粉+2%糊精为复合碳源,代替原始发酵培养基中的碳源;以 1%玉米淀粉+1%葡萄糖的发酵培养基为对照组,培养 PE51.1 菌 114h 后测定发酵液的酶活,其产酶结果如图 1 所示。

由图 1 可以看出,单一碳源的种类和添加量对 PE51.1 菌发酵产酶活性影响不大,以添加 1%糊精时产酶活性最高;复合碳源优于单一碳源,以添加 1%玉米淀粉+1%糊精时产酶活性最高。说明糊精更易于被 PE51.1 菌利用,玉米淀粉中含有多种细胞所需要的生物素,最适合 PE51.1 菌生长和产酶,因此,确定 1%玉米淀粉+1%糊精为 PE51.1 菌发酵产酶的最佳碳源。

马歌丽,郑州轻工业学院食品与生物工程学院,副教授,450002,郑州。

彭新榜、陈丽超,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-03-13

★ 河南省科技厅科技攻关项目(0324230007)资助

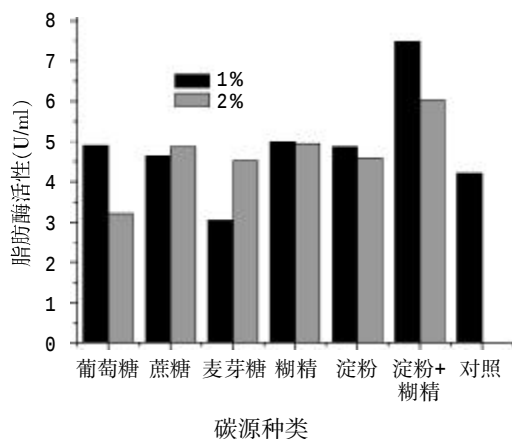


图1 碳源对产酶的影响

2.2 氮源的影响

以 1%玉米淀粉+1%糊精为碳源,用不同的氮源代替黄豆粉,单一氮源在培养基中的添加量均为 6%,复合氮源的添加量分别为 5%黄豆粉+1%硫酸铵,4%黄豆粉+1%硫酸铵+1%橄榄油,以添加 6%黄豆粉时的情况为对照组,PE51.1 菌发酵产酶试验结果如图 2 所示。

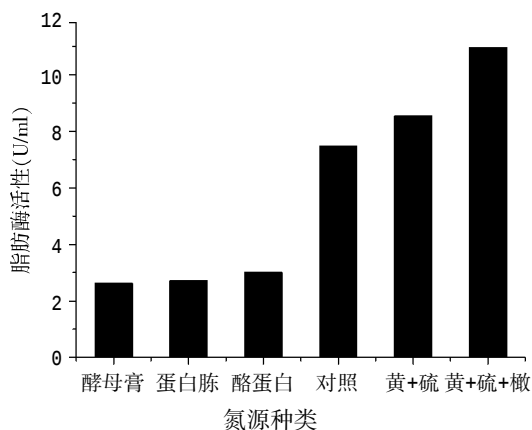


图2 氮源对产酶的影响

从图 2 可以看出,复合氮源明显优于单一氮源,在复合氮源基础上添加橄榄油后,PE51.1 菌产酶活性更高。说明橄榄油的添加对 PE51.1 菌产酶有促进作用。所以确定最佳氮源配比为 4%黄豆粉+1%硫酸铵+1%橄榄油。

2.3 装液量的影响

以 1%玉米淀粉+1%糊精为碳源,4%黄豆粉+1%硫酸铵+1%橄榄油为氮源,改变 250ml 三角瓶中培养基的装液量,进行发酵产酶试验,结果如图 3 所示。

由图 3 可以看出,装液量对产酶有一定影响,说明通气量(通气量与装液量正相关)是 PE51.1 菌发酵

产酶的重要影响因素。装液量为 30ml 时产酶活性最高,因此确定 250ml 三角瓶中最佳装液量为 30ml。

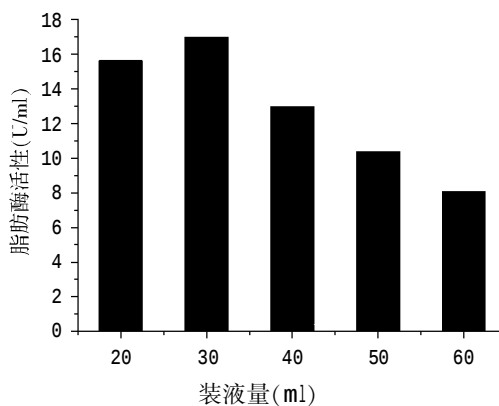


图3 装液量对产酶的影响

2.4 接种量的影响

在上述最佳碳源、氮源和装液量下,改变种子液的接种比例,发酵培养一定时间后测定酶活,结果如图 4 所示。

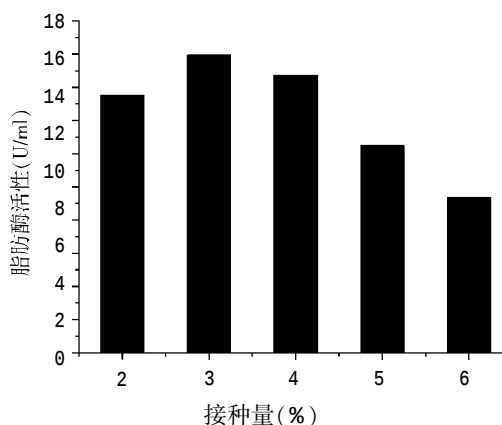


图4 接种量对产酶的影响

由图 4 可知,接种量对 PE51.1 菌产酶活性有显著影响,其中以 3%接种量为最佳。结合试验观察分析原因,可能是接种量过小时,菌体生长缓慢,发酵延迟;接种量过大时,菌体迅速生长并聚集成球,使发酵液通风恶化,从而影响产酶,因此得到最佳接种量为 3%。

2.5 培养基初始 pH 值的影响

在上述试验条件下,改变发酵培养基的初始 pH 值,发酵培养 PE51.1 菌 114h 后测定酶活,结果如图 5 所示。

由图 5 可以看出,发酵培养基的初始 pH 值对 PE51.1 菌发酵产酶影响最为显著,原因可能是初始 pH 值过低不利于菌体产碱性脂肪酶,而过高则对脂肪酶的产生有抑制作用。培养基的初始 pH 值在 8.5

时产酶活性最高,即发酵培养基最佳初始 pH 值为 8.5。

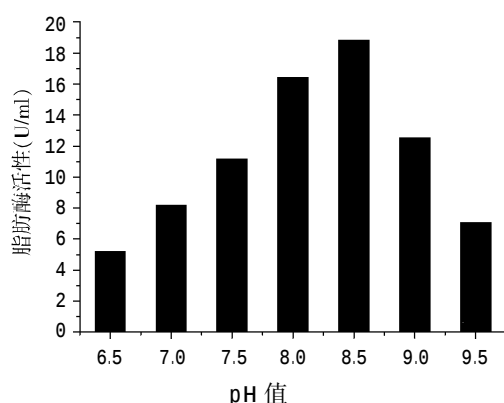


图5 pH 值对产酶的影响

2.6 发酵温度的影响

在上述试验条件下,在不同的摇瓶发酵培养温度下进行发酵产酶试验,结果如图6所示。

从图6可以看出,发酵温度对 PE51.1 菌产酶有较大影响,28℃时产酶活性最高,因此确定最佳摇瓶发酵温度为 28℃。

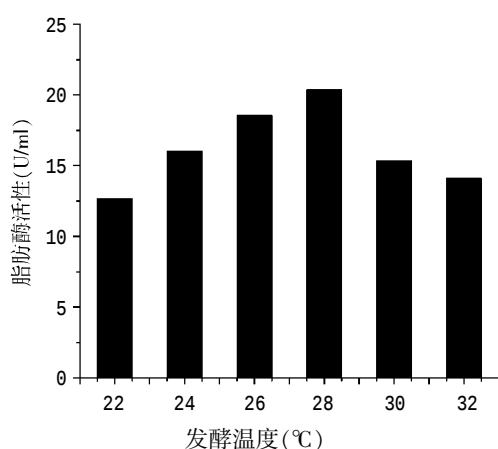


图6 发酵温度对产酶的影响

2.7 摇床转速的影响

采用上述试验条件,改变摇床转速进行发酵产酶试验,结果如图7所示。

由图7可以看出,随着摇床转速的增大,PE51.1 菌发酵产酶的活性逐渐增高,这进一步验证了通风量(通风量与转速相关)对 PE51.1 菌发酵产酶的显著影响。当摇床转速太小时,菌体易聚集成球,通风恶化,使产酶下降;随着摇床转速的增大,培养基通风得到改善,脂肪酶产量增加。虽然在摇床转速为 250r/min 时发酵产酶活性为最佳,但考虑到摇床转速在 150~280r/min 的范围内,其产酶活性相差不是很大,而且

摇床转速过大时,发酵培养液摇动太剧烈,容易溢出摇瓶,造成污染,影响发酵产酶,所以确定最佳的摇床转速为 150r/min。

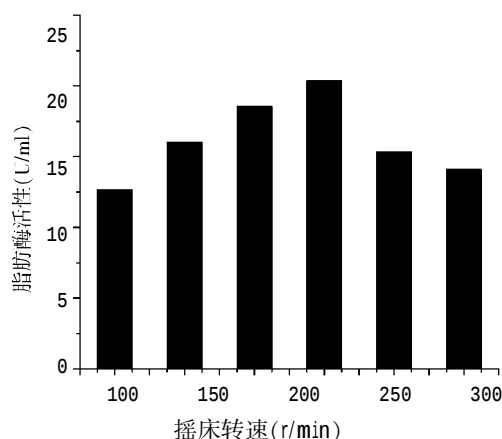


图7 摇床转速对产酶的影响

2.8 验证试验

结合以上实验结果,在最优发酵培养基和发酵条件下对 PE51.1 菌进行发酵培养,并测定发酵液的产酶活性,验证优化效果。共做了三个平行试验,结果 PE51.1 菌平均最高产酶活力可达 20.83U/ml。

3 结论

通过对碱性脂肪酶产生菌 PE51.1 发酵培养基组成及发酵条件的探索,得到了较优培养基组成为(g/l): 黄豆粉 40、玉米淀粉 10、糊精 10、橄榄油 10、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10、 NaNO_3 5、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1、 K_2HPO_4 3、 CaCO_3 5。最佳发酵产酶条件为:装液量 30ml(250ml 三角瓶),接种量 3%,起始 pH 值 8.5,温度 28℃,摇床转速 150r/min。在此条件下,PE51.1 菌的最高产酶活力可达 20.83U/ml。

通过该研究 PE51.1 菌发酵产生碱性脂肪酶的活力得到了较大提高,但与有关报道的高产菌株相比,PE51.1 菌的产酶活力还是比较低的。该研究只是为进一步研究碱性脂肪酶的发酵生产提供了可靠参考。通过在发酵培养基中添加橄榄油可以提高 PE51.1 菌的产酶活力这一现象推测该菌产生的脂肪酶可能为诱导酶,在以后的研究中,可以通过添加不同的诱导物来提高发酵产酶活性,也可以通过基因工程技术选育高产菌株,以期得到接近或达到工业化生产的碱性脂肪酶产生菌。

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

不同养殖模式对草鱼生长的影响

林仕梅 谭北平 魏万权

摘要 试验探讨了池塘小网箱(模式 1)、池塘精养(模式 2)和池塘混养(模式 3)3 种养殖模式对草鱼生长的影响,同时,也探讨了机械投喂(I)和人工投喂(II)两种不同投喂方式对草鱼生长的影响。试验结果表明:①不同养殖模式下,以模式 1 和模式 2 的生长效果最佳,其瞬间生长率达到 1.60%~1.72%,饲料系数达到 2.54 和 2.46,与模式 3 相比,差异显著($P<0.05$);②不同投喂方式下,以机械投喂组饲料系数低,人工投喂组效果较差;③从养殖效益来看,不同养殖模式单斤鱼的饲料成本是不一样的,以模式 1、2 的饲料成本最低。机械投喂比人工投喂可以提高利润 14.2%。

关键词 养殖模式;草鱼;饲料系数;生长率

中图分类号 S962.9

草鱼是我国传统的主养经济鱼类。目前,草鱼在我国淡水鱼类养殖中占有相当大的比例,仅次于鲢、鳙,尤其是广东珠三角地区,草鱼作为池塘养殖的主要对象,其养殖面积和养殖产量都占据着该地区水产养殖业的很大比例。如何充分利用池塘的生态环境,挖掘草鱼的养殖潜力,提高其养殖效益,是水产养殖者和科研工作者关注和探讨的热点问题。为此,本试验进行了 3 种不同养殖模式和 2 种不同投喂方式对草鱼生长的影响的研究,旨在改进和提高现有养殖技术。

1 材料和方法

1.1 试验养殖系统

池塘小网箱养殖(模式 1):试验在广东某池塘小网箱养殖系统中进行,池塘面积为 3 000m²,水深 2.0m,池塘内设置 20 个小网箱,单个小网箱容积为 2.7m³(1.2m×1.5m×1.5m),小网箱用聚乙烯材料编制而成。

池塘精养(模式 2):试验在广东某实验场三口池塘中进行,池塘面积为每口 700m²,平均水深 1.5m。

池塘混养(模式 3):机械投喂试验(模式 3 I)在广东某养殖户的两口池塘中进行,池塘面积分别为 8 000m² 和 6 000m²,平均水深 1.5m;人工投喂试验(模式 3 II)在广东某养殖户的两口池塘中进行,池塘面积分别为 4 000m² 和 5 300m²,平均水深 1.2m。

养殖池塘中定期补充天然水,以保持水质清晰;采用叶轮式增氧机定期增氧,试验期间养殖用水的溶解氧保持在 6mg/l 以上;试验水温 27~30℃。

1.2 试验鱼

试验鱼为草鱼种,鱼体健康、规格一致。模式 1 和模式 2 的鱼体规格为平均 100g 左右;模式 3 鱼体规格分别为平均 200g 和 750g 左右。

1.3 试验饲料

依据我国现有的营养参数,用市售进口肉骨粉、豆粕、菜粕、棉粕、玉米、次粉以及复合预混料配制而成试验饲料。饲料原料均粉碎过 40 目筛,制成 Φ2.5cm 和 Φ4.0cm 的硬颗粒饲料,采用常规包装方法进行保存。采用常规方法测得试验饲料的常规营养成分见表 1。复合预混料由青岛某生物技术公司提供,各试验组添加量相同。

表 1 试验饲料的常规营养成分(%)

营养成分	含量
水分	10.23
粗蛋白	25.23
粗脂肪	2.38
粗灰分	11.36
钙	1.18
磷	0.94

1.4 饲养管理

模式 1 池塘小网箱养殖草鱼,首先预试验 2 周后,随机分成 3 个试验组,每个试验组 30 尾草鱼,尾均重基本一致;模式 2 精养草鱼;模式 3 以养殖草鱼为主,适当搭配鲢鱼、大头鱼和鲫鱼。试验分组情况见表 2。

试验期间,每日定时注入部分新水,并排出部分池水。每天 8:30、12:30、18:30 各投喂一次,采用定点、定量人工或机械投喂,投饲率 2%~4%。每天测定水温、pH 值,每 15d 用生石灰进行池塘消毒,试验期间水温 27~30℃、pH 值 6.8~7.1、溶氧 6.8~8.5mg/l。正式试验期为 110d,试验结束时,饥饿 24h 准确称重,并统计饲料量。

林仕梅,中国海洋大学水产动物营养与饲料研究室,副教授,266005,青岛。

谭北平,单位及通讯地址同第一作者。

魏万权,青岛玛斯特生物技术有限公司。

收稿日期:2006-02-10

表2 试验分组及混养模式

项目	品种规格			
	草鱼	鲢鱼	大头鱼	鲫鱼
模式1(g/尾)	100			
每个网箱(尾)	30			
模式2(g/尾)	100			
每口池塘(尾)	600			
模式3 I(g/尾)	750	17	900	50
每1 000m ² (尾)	625	8 300	55	8 300
模式3 II(g/尾)	200	8	600	60
每1 000m ² (尾)	1 076	38 000	70	230

1.5 样品分析和计算

饲料的粗蛋白质含量采用凯氏定氮法测定;粗脂肪含量采用索氏抽提法测定;粗灰分含量采用高温灰化法测定;采用EDTA快速测定法测钙(Ca)含量;钼钼酸铵比色法测定磷(P)含量。

养殖试验指标:

饲料系数=消耗的饲料量/鱼体增重量;

瞬间增长率(%)=(lnW_t-lnW₀)/d。

式中:W_t——试验结束时鱼体尾均重(g);

W₀——试验开始时鱼体尾均重(g);

d——养殖试验天数。

2 结果与分析

2.1 对草鱼生长速度的影响

经过110d的正式养殖试验,得到草鱼生长试验结果(见表3)。由表3可知,在3种养殖模式中,以模式1和模式2的试验结果最佳,其瞬间生长率达到1.60%~1.72%,与模式3 I试验组相比,差异显著(P<0.05)。各试验组成活率均在90%以上,差异不显著(P>0.05),这说明不同养殖模式对草鱼的成活率是没

有影响的。

另外,模式3 II草鱼的瞬间生长率显著高于模式3 I(P<0.05),这可能是试验鱼体规格不同所致;也说明了鱼体不同生长阶段应该采用不同营养水平的配合饲料。这也正是本试验的不足。

表3 养殖试验结果

项目	试验前	试验后		瞬间生长率(%/d)	饲料系数	成活率(%)
	尾均重(g)	尾均重(g)	饲料用量(g)			
模式1	100	580	1 219.2	1.60	2.54	92.6
模式2	100	660	1 377.6	1.72	2.46	90.5
模式3 II	200	1 120	2 685.2	1.57	2.92	93.2
模式3 I	750	2 750	5 440	1.18	2.72	91.8

2.2 对饲料利用效率的影响

各试验组的饲料利用效率用饲料系数表示,饲料系数也是模式1和模式2最小,达到2.54和2.46,与其它组相比差异显著(P<0.05),表明饲料的利用效率最高;其次为模式3 I,以模式3 II最差,饲料系数达到2.92。本试验于2004年6~9月期间进行,气温、水温均很高,水温保持在27~30℃左右,达到草鱼正常生长的水温(22~28℃),而且试验均是在池塘中进行的。所以,该试验结果具有较强的实践价值,也具有科学的说服力。

另外,模式3 II草鱼的饲料系数显著高于模式3 I(P<0.05),这表明不同的饲料投喂方式对鱼的生长是有影响的;可能是人工投饲造成饲料的浪费增大所致,这充分说明投饲技术在水产养殖中的重要性。

2.3 养殖效益分析(见表4)

由表4可见,不同养殖模式单斤鱼的饲料成本是

表4 养殖效益分析

项目	饲料价格(元/kg)	饲料系数	饲料成本(元/kg)	草鱼价格(元/kg)	毛利润(元/kg)	利润相对比例(%)
模式1	1.8	2.54	4.57	7.8	3.23	127.2
模式2	1.8	2.46	4.43	7.8	3.37	132.6
模式3 II	1.8	2.92	5.26	7.8	2.54	100
模式3 I	1.8	2.72	4.90	7.8	2.90	114.2

注:1.饲料成本为每千克鱼的饲料成本;毛利润为每千克鱼的毛利润;

2.养殖效益分析按2004年市场原料价格和草鱼价格计算的。

不一样的,以模式3 II的饲料成本最高,相应其效益也是最低的。模式1、模式2、模式3 I可以增加利润14.2%~32.6%,这体现了模式1、模式2、模式3 I的优越性。

珠三角地区池塘养殖常规鱼品种,通常采用人工投料的方式进行投喂,饲料浪费很大,并且增加了饲料加工企业的生产成本(耐水性提高),本试验的结果正说明了这一点。从试验结果来看,机械投喂比人工投喂可以提高利润14.2%,从这方面来看,机械投喂

至少可以起到节约饲料的作用。

3 结论

综合上述试验结果表明,采用合理的养殖模式(池塘混养、池塘精养和池塘小网箱)可以提高草鱼的生长效果,能显著提高饲料的利用效率,并且显著提高草鱼的养殖效益。先进的机械投喂也有利于鱼的生长,节约饲料,提高养殖效益。当然,本试验的不足在于鱼体规格不一致,对试验结果可能产生一定影响。

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

微生物制剂对中国对虾幼体生长和非特异性免疫的影响

徐 琴 李 健 刘 淇 王 群

摘 要 将球形红假单胞菌、噬菌蛭弧菌及粘红酵母予以不同搭配,得到 4 种微生物制剂,加入中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)幼体培育水体中,研究其对中国对虾幼体生长和非特异性免疫的影响。结果表明,使用这 4 种微生物制剂均极显著($P<0.01$)提高幼体变态率,存活率提高 16.86%~34.22%,体长增加 0.64~1.29mm; $M_1\sim P_5$ 期的体长平均增长率也高出 17%~40%;酚氧化酶和超氧化物歧化酶活力也显著($P<0.05$)高于对照组。其中添加噬菌蛭弧菌和球形红假单胞菌试验组的效果最好,建议中国对虾育苗中联合添加这种微生物制剂,使用浓度为 2×10^5 个/ml。

关键词 球形红假单胞菌;噬菌蛭弧菌;粘红酵母;生长;非特异性免疫

中图分类号 S963.32+7

近年来对虾的养殖疾病发生频繁、危害严重,截至 1992 年,查明在我国发生的虾病已有 40 多种^[1]。对虾病原体主要包括病毒、细菌、真菌、原虫、藻类等^[2,3],虽然某些疾病可以用抗生素控制,但是大量使用抗生素能使病菌产生抗药性,抑制对虾自身免疫力,而且还会通过食物链对人类健康构成威胁。因此,“以防为主”成为养殖的首选。

球形红假单胞菌菌体含有丰富的蛋白质、多种维生素和生长因子,能在无氧黑暗条件下对水体中的有害物质进行转化,是作为净水剂和饲料添加剂的理想菌体;噬菌蛭弧菌有独特的“寄生”和“噬菌”生物特性^[4],其应用研究侧重于对环境水体的净化和作为水体污染状况评价的指示菌两方面;粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)在水体及动物体内外数量始终次于深红酵母,大概占红酵母属的 30%左右^[5],但是后者有转化为致病菌的可能^[6],粘红酵母具有适口性好(细胞大小多在 4~6 μ m 间),适于工业化大规模生产,能长期保存,在海水中稳定性、分散性好,利用率高等优点。然而单菌种使用有其劣势,且鲜见使用噬菌蛭弧菌和粘红酵母育苗的报道。为了更好发挥优势菌的作用,寻求最佳的菌种配伍,本文将这 3 株微生物制剂联合使用,初

步研究了对中国对虾幼体生长及酶活力的影响,以期在生产实践作一些参考。

1 材料和方法

1.1 材料

试验用的中国对虾无节幼体(N_4 , 平均体长 0.38~0.42mm)购自日照涛雒小海育苗场,基础饲料选用日本株式会社 0 号($Z_1\sim M_3$)和 1 号($P_1\sim P_5$)规格的配合饲料。

噬菌蛭弧菌(以下简称“Z”)由南京恒生科技有限公司提供,球形红假单胞菌(以下简称“Q”)和粘红酵母(以下简称“JM”)均由中国科学院微生物研究所菌种中心提供。

1.2 试验分组及投喂方案

将中国对虾无节幼体暂养 1d 后,随机分到装有 50L 海水的 PVC 桶里,密度为 20 万尾/ m^3 。从蚤状幼体开始投喂配合饲料,每天投喂 8 次。另外,在蚤状幼体中加投单胞藻和轮虫;糠虾期幼体中投单胞藻,后期投卤虫无节幼体;仔虾 $P_1\sim P_5$ 期投卤虫无节幼体。共设 4 个试验组和 1 个对照组,每组 3 个重复。各试验组投喂微生物制剂的方案见表 1。在喂养前 5d 加入菌液,试验组水体内加入总浓度为 2×10^5 个/ml 的复合菌液,以后每隔 5d 加一次,换水之后补足菌量。

表 1 试验各组投喂方案

项目	试验组				对照组
	Z+Q	Z+JM	Q+JM	Z+Q+JM	
添加比例	1:1	1:1	1:1	1:1:1	-

1.3 试验条件及管理

试验用的新鲜海水经沉淀、砂滤,加入 4×10^{-6} EDTA-2Na 和 2×10^{-6} 土霉素,充气并预热。在整个试验过程

徐琴,中国水产科学研究院黄海水产研究所,266071,青岛市南京路 106 号黄海水产研究所生态室。

李健(通讯作者)、刘淇、王群,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-04-10

★ 国家高技术研究发展计划(863 计划)课题(2004AA603320)、科技部社会公益研究专项(2004DIB4J165)、山东省科技发展计划项目(2003-4-1)

中育苗水体充气,充气量大小随幼体大小进行调整。试验期间水温根据变态发育的需要从 19℃逐渐升温到 25℃。自糠是幼体Ⅲ期开始换水,每次换水 1/2。

1.4 中国对虾幼体变态指数、存活率和体长的计量

1.4.1 变态指数

定期在桶里随机取水样,镜检幼体发育阶段并计算变态指数 (development index, DI)。变态指数根据 Malecha 的描述进行鉴定: $DI=(\sum A)/N$ 。

式中:A 为每个时期的数值,设 $Z_1=1$ 、 $Z_2=2$ 、 $Z_3=3$ 、 $M_1=4$ 、 $M_2=5$ 、 $M_3=6$ 、 $PL=7$ (Z_1 、 Z_2 、 Z_3 期分别为蚤状幼体 I、II、III 期; M_1 、 M_2 、 M_3 期为糠虾幼体 I、II、III 期; PL 为仔虾期);N 为每次取样的总个体数目。重复两次取平均值。

1.4.2 存活率和体长

分别在 Z_1 期、 P_5 期计数幼体存活尾数,计算 $Z_1\sim P_5$ 期的存活率。

分别在 M_1 期、 P_5 期从每组里随机取 (15×2) 尾,测量其体长,并计算 $M_1\sim P_5$ 期幼体体长平均增长率。

体长平均增长率(%)=(P_5 期平均体长- M_1 期平均体长)/ M_1 期平均体长。

1.5 免疫指标的测定

酚氧化酶 (Phenoloxidase, PO): 以 L-DOPA 为底物,参照 Ashida^[7] 的方法进行。

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD): 按邓碧玉等^[8]改进的连苯三酚自氧化法进行。

1.6 数理统计方法

用 SPSS11.0 统计软件进行方差分析,当差异显著 ($P<0.05$) 时,用 Tukey's 检验法进行均值间多重比较。

1.7 中国对虾免疫保护率的测定

P_1 期幼体经过 7d 投喂后,每个组随机取 100 尾仔虾,平均分成两组。一组加入鳃弧菌 (Vibrio anguillarum),使总浓度达到 5×10^7 个/ml;另一组不加鳃弧菌作为对照组,两组均正常投饵,攻毒 5d 后试验

结束。考虑到仔虾有一定自然死亡率,因此采用相对存活率(Relative Percent Survival, RPS)计算式:

$$RPS(\%)=(1-\frac{\text{免疫组死亡率}}{\text{对照组死亡率}})。$$

2 结果

2.1 生长指标

2.1.1 变态指数

幼体的变态指数的显著性分析见表 2。从表 2 中可以看出,4 个试验组在 $Z_3\sim M_1$ 和 $M_3\sim P_1$ 时变态指数一直极显著 ($P<0.01$) 高于对照组;而 Z+Q 组的变态指数一直极显著 ($P<0.01$) 高于 Z+JM 组和 Z+Q+JM 组;Z+Q 组与 Q+JM 组差异不显著。

表 2 微生态制剂对中国对虾变态指数的影响 (平均值±标准差, n=2)

发育期	组别	变态指数
$Z_3\sim M_1$	Z+Q	3.813±0.09 ^a
	Z+JM	3.444±0.04 ^b
	Q+JM	3.793±0.07 ^a
	Z+Q+JM	3.547±0.05 ^c
	对照组	3.341±0.12
$M_3\sim P_1$	Z+Q	6.839±0.067 ^a
	Z+JM	6.347±0.09 ^b
	Q+JM	6.422±0.087 ^c
	Z+Q+JM	6.387±0.03 ^{bc}
	对照组	6.253±0.07

注:同一列肩标不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.1.2 存活率和体长

4 种微生态制剂对中国对虾幼体存活率和体长的影响见表 3。结果表明,Z+Q 组的存活率比对照组高出 34.22%, P_5 期的平均体长比对照组长 1.49mm, $M_1\sim P_5$ 期的体长平均增长率比对照组高出 40%;而试验组中最差的 Z+JM 组的存活率也比对照高出 16.86%, P_5 期的平均体长比对照组长 0.64mm, $M_1\sim P_5$ 期的体长平均增长率也高出 17%。

表 3 微生态制剂对中国对虾存活率、体长平均增长率的影响 (平均值±标准差, n=4)

组别	存活率(%)	M_1 期的平均体长 (mm)	P_5 期的平均体长 (mm)	$M_1\sim P_5$ 期的体长平均增长率(%)
Z+Q	56.12±0.01 ^a	2.70±0.10 ^a	6.38±0.15 ^a	136±0.10 ^a
Z+JM	38.76±0.02 ^b	2.60±0.15 ^b	5.53±0.30 ^b	113±0.25 ^b
Q+JM	43.72±0.01 ^c	2.68±0.10 ^a	6.31±0.20 ^a	135±0.15 ^a
Z+Q+JM	44.61±0.01 ^c	2.59±0.15 ^b	5.85±0.20 ^b	126±0.15 ^c
对照组	21.90±0.03	2.56±0.10 ^b	4.89±1.20 ^c	96±0.10 ^c

注:同一列肩标不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.2 免疫指标

2.2.1 酚氧化酶(见图 1)

从图 1 中可以看出,在水体中加入微生态制剂后,随着时间的延长,各试验组酚氧化酶活力较对照

组有不同程度的提高。**Z+Q** 组的酚氧化酶活力一直极显著($P<0.01$)高于其余各组。第 24d 对照组与 **Z+JM** 组和 **Z+Q+JM** 组差异不显著($P>0.05$),第 8d 对照组与 **Z+JM** 组差异不显著,第 16d 试验组酚氧化酶活力均极显著($P<0.01$)高于对照组。

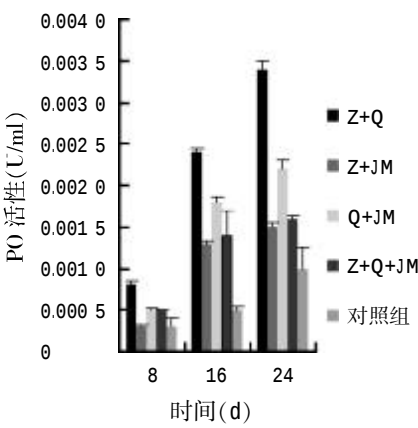


图 1 4 种微生态制剂对中国对虾幼体 PO 活性的影响

2.2.2 超氧化物歧化酶(见图 2)

从图 2 中可以看出,加入微生态制剂后各试验组超氧化物歧化酶活力较对照组均有不同程度的提高。在第 8d 时试验组中除了 **Z+JM** 组外,其它组均极显著($P<0.01$)高于对照组;第 16d 时,各试验组都极显著($P<0.01$)高于对照组,并且 **Z+Q** 组和 **Q+JM** 组也极显著($P<0.01$)高于 **Z+JM** 组和 **Z+Q+JM** 组;到了第 24d,各试验组都极显著($P<0.01$)高于对照组,**Z+Q** 组也极显著($P<0.01$)高于其它试验组,而 **Z+JM** 组和 **Z+Q+JM** 组间差异不显著($P>0.05$)。从图中还可以发现 SOD 的活力在第 16d 时达到了顶峰,在第 24d 时总体开始略有下降,而以对照组下降速度最快。

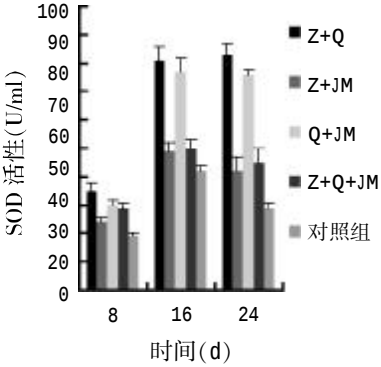


图 2 4 种微生态制剂对中国对虾幼体 SOD 活性的影响

2.3 免疫保护率的测定结果(见表 4)

从表 4 中可以看出,攻毒结束时各试验组的成活率均高于对照组。**Z+Q** 组的成活率最高,表明噬菌蛭弧菌和球形红假单胞菌组的免疫保护能力最好,其次是 **Q+JM** 的试验组,最差的是 **Z+JM** 组。

表 4 感染鳃弧菌的中国仔虾的相对成活率(%)

组别	Z+Q	Z+JM	Q+JM	Z+Q+JM	对照组
相对成活率	58.5±1.05 ^a	29.4±2.53 ^b	38.9±0.54 ^c	34.2±2.36 ^c	12.5±3.42

注:同一行肩标不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

试验结果表明,使用不同配伍的 4 种微生态制剂后,试验组的中国对虾在生长、酶活力等方面与对照组相比均有明显提高,尤其是 **Z+Q** 组。

3.1 在促进生长方面

本试验将 4 种微生态制剂混合添加到中国对虾幼体水中,与对照组相比均能明显提高变态速度,从而起到加速蜕皮促进生长的作用。这可能是因为微生态制剂有效抑制对虾水体中其它杂藻、杂菌的生长和繁殖,改善了养殖水体的生态系统。田维熙等^[9]和马寅斗等^[10]分别用光合细菌、海洋酵母培育中国对虾幼体,成活率比对照组分别高出 20%和 25.7%。而本试验中球形红假单胞菌和噬菌蛭弧菌联合使用则比对照组高出 34.22%,这体现了菌种配伍的优势。在养殖中还发现试验组的虾苗个体大、均匀、健壮,而对照组幼体个体大小不一,存在残食现象。造成试验组与对照组如此差距大的原因可能是对照组到后期幼体出现挂脏现象,导致大量死亡,生长严重滞后。

3.2 在提高酶活力方面

3.2.1 酚氧化酶

对虾的免疫反应属于非特异性免疫。**PO** 系统在对虾的防御系统中起着重要的异物识别和防御功能,酚氧化酶催化生成的黑色素及黑化反应的中间产物都具有细胞毒性或抗微生物功能,所以酚氧化酶激活系统对于维持甲壳动物体液的无菌性十分重要^[11]。在本次试验中,**Z+Q** 组的酚氧化酶活力一直极显著高于其余各组,并且酶活力增加的持续时间长,这样可以增加菌种投喂的间隔时间,节约养殖成本;而 **Z+JM** 组和 **Z+Q+JM** 组到了第 24d 时已与对照组差异不显著,后两者与国内的报道^[12,13]除了时间上的变化有所差异外,表现出的趋势都是在试验初期酶活力增加速度快,到后期增加缓慢,且与对照组相

比差异不显著。

3.2.2 超氧化物歧化酶

超氧化物歧化酶能够催化超氧阴离子的歧化作用,产生过氧化氢和氧,是一种重要的抗氧化酶^[14],与生物的免疫水平密切相关^[15],其活性变化可以作为反映对虾的机能健康状况及衡量对虾免疫状态的指标。本试验加入微生态制剂后,对虾血清的超氧化物歧化酶活力有不同程度的提高,到第 16d 时达到顶峰,在第 24d 时全体开始略有下降,而以对照组下降速度最快。表明微生态制剂能够促进机体的抗氧化能力,SOD 先升后降的规律与孟凡伦等^[16]的报道一致。

在此次试验中,在超氧化物歧化酶活力下降的时候,酚氧化酶却一直在增加。关于酚氧化酶活力一直处于上升状态的现象,可能是由于中国对虾幼体的免疫系统处于健全阶段,而此次试验所测的时间可能正好处于酚氧化酶活力迅速增加阶段,从而使两个试验组到第 24d 时与对照组差异不显著。莫照兰等^[13]发现,气味黄杆菌的胞外糖蛋白对克氏原螯虾成虾的 SOD 没有影响,而能增强 PO 活力。幼体这种现象的具体原因有待进一步研究。

3.3 在菌种配伍方面

这 4 种不同配伍的微生态制剂对中国对虾的作用效果不尽相同,添加噬菌蛭弧菌和粘红酵母的试验组在生长、酶活力及免疫保护率等指标均不及其余试验组,表明二者之间有拮抗作用,如这两种菌体发生了沉淀作用。Z+Q+JM 组效果不及 Z+Q 组的原因也许是因为噬菌蛭弧菌和粘红酵母之间有拮抗作用,菌体只发挥了部分作用。而 Q+JM 组的各项指标均高于 Z+JM 组和 Z+Q+JM 组,只是稍逊于 Z+Q 组。

噬菌蛭弧菌和球形红假单胞菌联合使用在各方面都表现出协同作用,显示出其联合使用的优势。此组中球形红假单胞菌菌体含有 60%以上的蛋白质,富含多种维生素,特别是 VB₁₂、叶酸和生物素,是酵母中含量的几千倍。此外,还有抗病毒的生长因子辅酶 Q,含量是酵母的 13 倍,是幼体适口的饵料。噬菌蛭弧菌则对病原菌有很强地裂解作用,二者联合能有效地吸收氨氮、硫化物等有害物质,这在营养、水质和防治病害上都有力保障了此组在各项指标上处于优势。陈家长等^[17]将噬菌蛭弧菌和球形红假单胞菌结合使用于暗纹东方鲀的养殖后改善了水环境,并提高其成活率和生长速度,本试验中此组的结论与之相一致,同时也表明这两株菌的搭配使用是安全有效的。建议联合

使用噬菌蛭弧菌和球形红假单胞菌,从促进生长、提高免疫力和提高经济效益三方面考虑,混合浓度定为 2×10^5 个/ml。

参考文献

- 1 吴友吕,吕美玲,郑国兴.中国对虾弧菌红腿病的电镜研究[A].中国甲壳动物学会主编,甲壳动物学论文集[C].青岛:青岛海洋大学出版社,1992.171~176
- 2 Hasson K W,Lighte D V,Poulos B T,et al.Taura syndrome in *Penaeus vannamei* demonstration of a viral etiology [J].Dis. Aquat. org.,1995 (23):115~126
- 3 Flegel T W.Special topic review,major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand[J].World J. of Microbiol. Biotechnol., 1997(13):433~442
- 4 Shilo M.Current perspectives in microbial ecology[J].Washington D C American Society for Microbiology,1984,334~339
- 5 周与良,黄铁石,但汉斌,等.中国海红酵母属(*Rhodotorula* Harrison)的种类[J].南开大学学报(自然科学版),1999,32(4):115~116
- 6 刘钢,王玉香,周与良.鱼体上红酵母(*Rhodotorula*)菌的分布[J].南开大学学报(自然科学版),1999,32(1):124~125
- 7 Ashida M.Purification and characterization of pre-prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm,*Bombyx Mori* [J].Arch.Biochem. Biophys.,1971,144(2):749~762
- 8 邓碧玉,袁勤生,李文杰.改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法[J].生物化学与生物物理进展,1991,18(2):163~163
- 9 田维熙,陈俊芹,黄莉莉,等.光合细菌在对虾养殖中应用效果的研究[J].饲料研究,1995(8):4~6
- 10 马寅斗,宋学章.海洋酵母的筛选及应用试验 [J].工业微生物, 1997,27(2):34~36
- 11 孟凡伦,张玉臻.甲壳动物中的酚氧化酶原激活系统研究评价[J].海洋与湖沼,1999,30(1):110~115
- 12 王雷,李光友,毛远兴.口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究[J].海洋与湖沼,1995,26(1):34~41
- 13 莫照兰,李会荣,俞勇,等.细菌糖蛋白对螯虾免疫因子的影响[J].中国水产科学,2000,7(3):28~32
- 14 Tonya L.Nichols,Chris A.Whitehouse,Faye E.Austin.Transcriptional analysis of a superoxide dismutase gene of *Borrelia burgdorferi*[J]. FEMS Microbiology Letters,2000(183):37~42
- 15 丁美丽,林林,李光友,等.有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究[J].海洋与湖沼,1997,28(1):7~12
- 16 孟凡伦,马桂荣,孔健.乳链球菌 SB900 肽聚糖对中国对虾免疫功能的影响[J].山东大学学报(自然科学版),1999,34(1):88~93
- 17 陈家长,胡庚东,吴伟,等.有益微生物在暗纹东方鲀养殖中应用的研究[J].浙江海洋学院学报(自然科学版),2004,23(3):195~198

(编辑:孙崎峰,sqf0452@126.com)

摄食水平对黄颡鱼生长和饲料利用效率的影响

杨严鸥 姚 峰 郑建忠 阮次磊 邹明华

摘 要 测定了饱食 1/3、饱食 2/3 和饱食水平下黄颡鱼的生长和饲料利用情况。结果显示:①随着摄食水平上升,湿重、干重、脂肪、蛋白质和能量特定生长率显著上升,其中湿重特定生长率与摄食水平呈直线相关,干重、脂肪、蛋白质和能量特定生长率与摄食水平呈对数曲线相关;②饲料转化率、蛋白质和能量储积率随摄食水平的上升而显著上升,但蛋白质和能量储积率在饱食 2/3 和饱食水平时差异不显著。

关键词 摄食水平;黄颡鱼;生长;饲料利用效率

中图分类号 S963

Effect of ration level on the growth and feed utilization of *Pseudobagrus fulvidraco*

Yang Yanou, Yao Feng, Zheng Jianzhong, Ruan Cilei, Zou Minghua

Abstract A trials were conducted at 3 ration levels (1/3satiation, 2/3 satiation and satiation) to investigate the effect of ration level on the growth and feed utilization of *Pseudobagrus fulvidraco*. The results showed that: ①with increasing ration level, specific growth rate of wet weight increased significantly in linear style, and specific growth rate of dry weight, lipid, protein and energy increased significantly in curvilinear style; ② with increasing ration level, feed conversion efficiency, recovered protein and energy increased significantly, while recovered protein and energy were similar between group satiation and 2/3 satiation.

Key words ration level; *Pseudobagrus fulvidraco*; growth; feed utilization

摄食水平是影响鱼类生长的重要因素,研究鱼类的生长-摄食关系对渔业管理中最优投饵方案的选择具有指导作用。鱼类的生长-摄食关系主要有直线^[1-4]和减速曲线^[5-7]两种,在生产中,为提高饲料利用效率,对呈直线关系的鱼类应投喂饱食水平,因为在该摄食水平下饲料转化效率和生长率最高;对呈曲线关系的鱼类,投喂水平应在低于饱食水平的某一点上,因为在该点饲料转化效率或(和)生长率最高。

黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)是我国重要的特种养殖鱼类,但到目前为止,尚未见到有关其生长-摄食关系的研究报道。本试验在这方面作一些探讨,以期生产管理提供有意义的参考。

1 材料与方法

1.1 饲养设备

12 只规格为 70cm×55cm×37cm 的水族箱,室内循环水装置,空调控制室温,使水温保持(25±1)℃,自然光照。

1.2 试验步骤

试验饵料为水蚯蚓,每次称量前用滤纸吸干水分。试验期间,每天取 1g 水蚯蚓作为样本冰冻保存,试验结束后将所有样本混合并烘干至恒重,测定干物质含量为 25.01%,干物质中粗蛋白含量为 46.45%(代表试验期间饵料水蚯蚓的干物质和粗蛋白含量)。

试验鱼购于湖北荆州市黄颡鱼良种场,规格基本一致。将水温逐渐调至 25℃,在实验室用试验水族箱暂养,投喂水蚯蚓。暂养的最后 7d 饱食投喂(饱食投喂的含义为:略高于采食量投喂,每过 24h 取出残饵,再投喂新鲜饵料,循环往复),选取 4 只水族箱,每箱放入称重后的 30 尾鱼(重量基本相同),计算 30 尾鱼 7d 中的平均日摄食量。试验开始前,将鱼饥饿 24h,随机取样称重,每箱放入 30 尾,设 3 种投喂水平(饱食 1/3、饱食 2/3 和饱食),每一处理含 4 个平行箱,试验鱼初始体重见表 1。另取样 4 份,每份 30 尾,称重后于 70℃烘干至恒重,用以分析初始躯体生化组成。

生长试验持续 30d,每天于 15:00 投饲料一次,相应的投喂量根据暂养 7d 中 30 尾鱼的平均日饱食量确定,饱食组适当过量投喂,3 种水平的投喂量都随鱼体的生长适量增加。饱食组 24h 后回收残饵,70℃烘干,残饵量用饲料流失率校正。测定饲料流失率时随机在 4 个无鱼的箱中各放入 1 份已称重的饲料,1h 后回收,70℃烘干至恒重并称重。每天 16:45 收集粪

杨严鸥,长江大学动物科学学院,副教授,434025,湖北荆州市长江大学西校区。

姚峰、郑建忠、阮次磊、邹明华,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-04-10

便,70℃烘干。

试验结束时,将鱼饥饿 24h,称量每箱鱼的重量,每箱取样 15 尾处死,70℃烘干至恒重,用以分析最终躯体生化组成。

1.3 生化分析

测定鱼样的干物质(%)、粗蛋白(%)、脂肪和能量(%)含量。测定干物质时在 70℃下干燥样品至恒重;测定蛋白质时用凯氏定氮法测定含氮量;脂肪采用索氏乙醚抽提法测定;能量用弹式能量计测定。

1.4 结果计算

湿重特定增长率(SGR_w)(%)=($\ln W_t - \ln W_0$)/ t ;

干重特定增长率(SGR_d)(%)=($\ln W_{dt} - \ln W_{d0}$)/ t ;

蛋白质特定增长率(SGR_p)(%)=($\ln W_{pt} - \ln W_{p0}$)/ t ;

脂肪特定增长率(SGR_L)(%)=($\ln W_{Lt} - \ln W_{L0}$)/ t ;

能量特定增长率(SGR_e)(%)=($\ln E_t - \ln E_0$)/ t ;

摄食率(RL)(%)= $2I_{td}/t \times (W_t + W_0)$;

饲料转化率(FCE)(%)=($W_t - W_0$)/ I_{td} ;

蛋白质摄食率(Ip)(%)= $2I_{tp}/t \times (W_t + W_0)$;

蛋白质储积率(Rp)(%)=($W_{pt} - W_{p0}$)/ I_{tp} ;

摄食能(E_e)(J/mg)= $2I_{te}/t \times (W_t + W_0)$;

能量储积率(R_e)(J/mg)=($E_t - E_0$)/ I_{te} 。

W_t 为鱼体终末湿重; W_0 为鱼体初始湿重; W_{dt} 为鱼体终末干重; W_{d0} 为鱼体初始干重; W_{pt} 为鱼体终末体蛋白重量; W_{p0} 为鱼体初始体蛋白重量; W_{Lt} 为鱼体终末体脂肪重量; W_{L0} 为鱼体初始体脂肪重量; E_t 为鱼体终末能值; E_0 为初始能值; t 为试验周期(30d); I_{td} 为试验期间的总饲料消耗(干重); I_{tp} 为试验期间的总蛋白质消耗; I_{te} 为试验期间的总能量消耗。

1.5 数字统计

所有试验数据平均数用方差分析后进行组间差异的多重比较。

2 结果与分析

2.1 摄食水平对生长的影响(见表 1)

表 1 摄食水平对黄颡鱼生长的影响(平均值±标准差)

摄食水平	饱食 1/3	饱食 2/3	饱食
平均初始湿重(g)	2.53±0.04	2.45±0.12	2.52±0.04
平均终末湿重(g)	2.84±0.32 ^a	3.43±0.18 ^b	4.48±0.15 ^c
湿重特定增长率(%)	0.39±0.21 ^a	1.12±0.19 ^b	1.92±0.16 ^c
干重特定增长率(%)	0.93±0.30 ^a	2.11±0.29 ^b	2.91±0.22 ^c
蛋白质特定增长率(%)	0.78±0.51 ^a	2.09±0.35 ^b	3.10±0.50 ^c
脂肪特定增长率(%)	2.67±0.87 ^a	4.16±0.58 ^b	4.57±0.36 ^b
能量特定增长率(%)	0.81±0.64 ^a	2.51±0.35 ^b	3.58±0.45 ^c

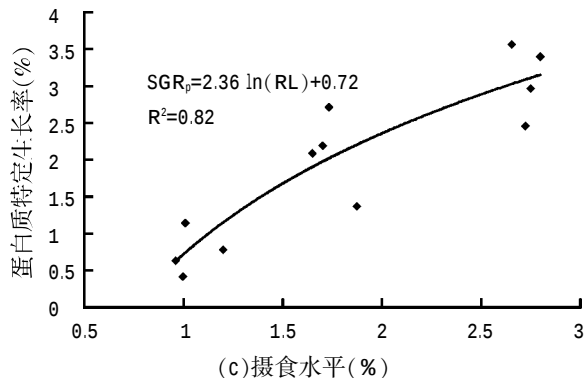
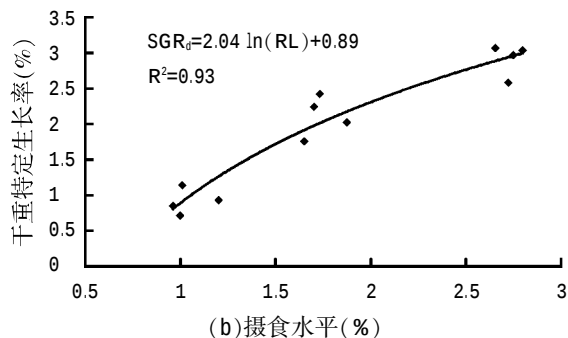
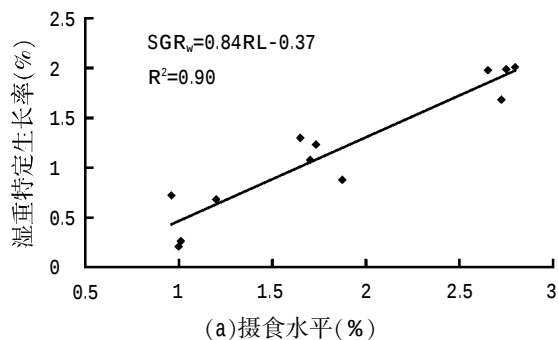
注:1.同行各肩标字母不同表示有显著差异($P<0.05$),下表同;

2.各项特定增长率以每天为单位计。

由表 1 可知,随着摄食水平上升,平均终末湿重以及湿重、干重、蛋白质和能量的特定增长率显著上升($P<0.05$),脂肪特定增长率在饱食 2/3 和饱食水平下的相比差异不显著($P>0.05$),在饱食 1/3 水平时最低。

2.2 摄食水平对特定增长率影响的回归分析

结果表明,湿重、干重、蛋白质、脂肪和能量的特定增长率与摄食水平(以每天体重的百分比计,见表 2 实际摄食率)的关系都具有显著性($P<0.05$)。由图 1 可知,湿重特定增长率随摄食水平的增长呈直线增长,干重、蛋白质、脂肪和能量特定增长率呈曲线增长,即摄食水平增加到一定程度后,增长率的增长趋势变慢。



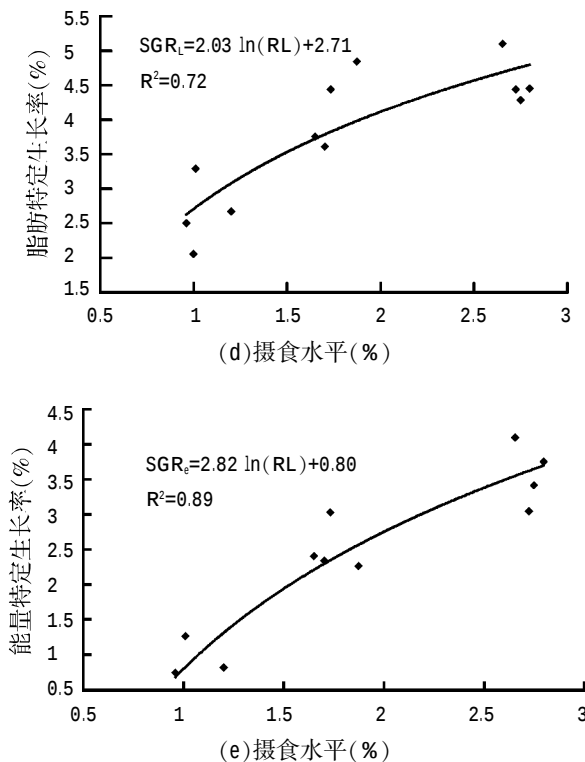


图1 黄颡鱼的湿重、干重、蛋白质和能量特定生长率与摄食水平的关系

2.3 摄食水平对饲料利用的影响(见表2)

表2 摄食水平对黄颡鱼饲料利用的影响(平均值±标准差)

摄食水平	饱食 1/3	饱食 2/3	饱食
实际摄食率(%)	1.06±0.01 ^a	1.73±0.34 ^b	2.69±0.04 ^c
饲料转化效率(%)	31.46±2.45 ^a	64.15±1.32 ^b	69.97±3.33 ^c
蛋白质摄食率(%)	0.49±0.01 ^a	0.80±0.16 ^b	1.25±0.02 ^c
蛋白质储积率(%)	17.69±2.00 ^a	27.39±7.15 ^b	26.88±7.50 ^b
日摄食能(J/g)	24.95±0.57 ^a	40.60±8.03 ^b	63.26±1.87 ^c
能量储积率(%)	12.62±6.85 ^a	24.14±4.83 ^b	22.64±4.08 ^b

由表2可知,随着摄食水平上升,饲料转化效率显著上升,并在3种水平间都存在显著差异;蛋白质和能量储积率在饱食和饱食2/3水平时差异不显著($P>0.05$),在饱食1/3水平时最低($P<0.05$)。

3 小结与讨论

本试验中,黄颡鱼的饲料转化效率随摄食水平的增加而增加,并在最大摄食水平时达到最大值,此时湿重生长速度也最快,这与草鱼^[1]、高首鲟^[2]和异育银鲫^[3,4]的情况相似。因此,在饲养黄颡鱼时应投喂至饱食水平,这样可以获得最大的饲料转化效率和最快的湿重生长速度,取得好的经济效益。但有一些鱼类,如尼罗罗非鱼^[6]和长吻鮠^[7]等,饲料转化效率随摄食水平的增加呈钟形曲线变化,即当摄食率增至某一水平

时,转化效率最高,随着摄食水平的进一步增加,转化效率又降低,对该类鱼,投喂至饱食水平会在一定程度上降低饵料的利用效率。

本试验中,黄颡鱼的湿重生长-摄食关系为直线关系^[8],而Cui等^[2]总结指出,较多的鱼类湿重生长-摄食关系为曲线关系。因此,提出了鱼类湿重生长-摄食关系为直线的最大摄食率限制假设:由于环境条件限制或食物能量密度较低,即使在最大摄食水平条件下,鱼类的摄食率或吸收率(C-F)仍然较低,因此,鱼类仍然维持较高的转化效率。单位重量的天然饵料能量密度一般都较低,刘家寿^[9]总结了多个有关生长-摄食的试验发现,鱼类摄食天然饵料时,湿重生长-摄食关系多为直线,本试验投喂的水蚯蚓为天然饵料,与该假设符合。

除湿重特定生长率与摄食水平的关系为直线外,本试验中的干重、蛋白质、脂肪和能量特定生长率与摄食水平的关系均为曲线。Cui等^[2]指出,当摄食水平较高时,转化效率差异不显著会导致曲线关系。从本试验的蛋白质和能量的储积率(转化效率)来看,摄食水平增加到一定程度后二者的差异都不显著,这与Cui等^[2]的研究结果一致。

参考文献

- 1 Cui Y B, Chen S L, Wang S. Effect of ration size on the growth and energy budget of the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Aquaculture*, 1994(123):95-107
- 2 Cui Y B, Hung S S D, Zhu X M. Effect of ration and body size on the energy budget of juvenile white sturgeon [J]. *J. Fish Bio.*, 1996(49): 863-876
- 3 朱晓鸣, 解授启, 崔奕波. 摄食水平对异育银鲫生长和能量收支的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2000,31(5):471-479
- 4 Qian X Q, Cui Y B, Xiong B X, et al. Spontaneous activity was unaffected by ration size in Nile tilapia and gibel carp [J]. *J. Fish Biol.*, 2001,58(2):594-598
- 5 Smith R C, Paul A J, Paul J M. Effect of food intake and temperature on growth and conversion efficiency of juvenile walleye poolock (*Theragra chalcogramma pallas*): a laboratory study. *J Cons Int Explor. Mer.*, 1986(42):241-253
- 6 Xie S Q, Cui Y B, Yang Y, et al. Energy budget of Nile tilapia in relation to ration size. *Aquaculture*, 1997(54):57-68
- 7 韩冬. 长吻鮠投喂管理和污染评估动态模型的研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2005.41-43
- 8 崔奕波. 鱼类生物能量学的理论与方法 [J]. *水生生物学报*, 1989, 13(4):369-383
- 9 刘家寿. 鳊和乌鳢生长及能量收支的比较研究 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 1998.93-103

(编辑:孙崎峰, sqf0452@126.com)

复合酶制剂对肉鸭屠宰性能和部分血清生化指标的影响

王琛 贺建华 苗朝华

摘 要 用 960 羽 1 日龄双鬼头肉鸭研究了一种固体发酵复合酶(Allzyme SSF)在玉米-豆粕及玉米-小麦-豆粕型日粮中的应用效果,考察了添加该复合酶对肉鸭屠宰性能、血清生化指标的影响。试验结果表明,不同处理对 49 日龄肉鸭的半净膛率、全净膛率、腿肌率、胸肌率没有显著影响($P>0.05$)。玉米-小麦-豆粕型日粮的屠宰率略高于玉米-豆粕型日粮;玉米-豆粕及玉米-小麦-豆粕型日粮中添加 200PU/kg Allzyme SSF 降低了腹脂率($P<0.05$);玉米-豆粕型日粮中添加 300PU/kg Allzyme SSF 及玉米-小麦-豆粕型日粮中添加 200PU/kg Allzyme SSF 提高了血清磷的含量($P<0.05$);玉米-小麦-豆粕型日粮中添加 200PU/kg Allzyme SSF 提高了血清球蛋白的含量($P<0.05$)。

关键词 复合酶;肉鸭;屠宰性能;血清生化指标

中图分类号 S834

1 材料与方法

1.1 试验设计

选取 1 日龄肉鸭 960 羽,随机分成 8 个组,每组 120 羽,分别饲喂于 6 个重复栏,每个重复 20 羽鸭子,公母各半,8 个处理组分别饲喂 8 种不同的日粮:1 组玉米-豆粕型日粮;2 组低营养水平的玉米-豆粕型日粮;3 组低营养水平的玉米-豆粕型日粮+200PU/kg

Allzyme SSF;4 组低营养水平的玉米-豆粕型日粮+300PU/kg Allzyme SSF;5 组玉米-小麦-豆粕型日粮(用小麦代替 50%玉米);6 组低营养水平的玉米-小麦-豆粕型日粮;7 组低营养水平的玉米-小麦-豆粕型日粮+200PU/kg Allzyme SSF;8 组低营养水平的玉米-小麦-豆粕型日粮+300PU/kg Allzyme SSF。各日粮组成详见表 1。

表 1 试验日粮组成及营养成分

项目	0~21d				21~49d			
	日粮 1	日粮 2	日粮 5	日粮 6	日粮 1	日粮 2	日粮 5	日粮 6
玉米(%)	60.90	63.99	35.00	38.17	65.80	68.97	37.60	40.74
小麦(%)	0	0	32.80	32.80	0	0	37.15	37.15
豆粕(%)	22.40	21.960	17.91	17.45	12.35	12.04	8.66	8.34
米糠粕(%)	3.50	3.43	2.80	2.73	5.03	4.90	3.52	3.40
优质棉粕(%)	3.50	3.43	2.80	2.73	5.03	4.90	3.52	3.40
菜粕(%)	3.50	3.43	2.80	2.73	5.03	4.90	3.52	3.40
磷酸氢钙(%)	1.80	1.20	1.69	1.05	1.29	0.69	1.16	0.56
石粉(%)	0.11	0.20	0.10	0.20	0.21	0.30	0.21	0.30
蛋氨酸(%)	0.11	0.110	0.110	0.11	0.04	0.04	0.04	0.04
赖氨酸(%)	0.12	0.130	0.240	0.25	0.03	0.03	0.15	0.15
氯化胆碱(%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
食盐(%)	0.35	0.35	0.35	0.35	0.36	0.36	0.32	0.32
混合油(%)	2.61	0.67	2.30	0.33	3.73	1.77	3.05	1.10
预混料(%)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
营养水平								
代谢能(MJ/kg)	12.12	11.81	12.12	11.81	12.54	12.23	12.54	12.23
粗蛋白(%)	18.01	18.01	18.01	18.01	15.40	15.40	15.40	15.40
赖氨酸(%)	0.90	0.90	0.90	0.90	0.65	0.65	0.65	0.65
蛋氨酸(%)	0.40	0.40	0.40	0.40	0.30	0.30	0.30	0.30
蛋+胱(%)	0.71	0.71	0.71	0.71	0.58	0.58	0.58	0.58
钙(%)	0.88	0.78	0.88	0.78	0.78	0.68	0.78	0.68
总磷(%)	0.73	0.64	0.72	0.62	0.66	0.56	0.63	0.54

王琛,湖南农业大学,410128,长沙。

贺建华,单位及通讯地址同第一作者。

苗朝华,奥特奇亚太生物科学研究中心。

收稿日期:2006-05-15

1.2 试验材料

复合酶制剂 Allzyme SSF 由奥特奇公司提供。Allzyme SSF 是运用固体发酵技术生产而得,植酸酶活性最小为 1 000PU/g(复合酶制剂中以植酸酶为主,

其单位采用植酸酶单位 PU),还含有木聚糖酶、蛋白酶、 β -葡聚糖酶、纤维素酶、果胶酶和淀粉酶。

1.3 试验时间和地点

本研究的饲养试验在湖南唐人神集团科研中心进行,从 2004 年 11 月 22 日开始,到 2005 年 1 月 11 日结束。

1.4 饲养管理

试验期间,试验动物自由采食和饮水,饲养管理按常规进行。

2 试验指标的测定与分析

2.1 屠宰性能

49 日龄时,每栏挑选 2 只鸭(趋于平均体重),禁食 12h 后称重,颈动脉放血致死。根据贺建华(1996)的方法对肉鸭进行屠宰测定,测定肉鸭的屠宰率、全

净膛率、半净膛率、胸肌率、腿肌率、腹脂率。

2.2 血清生化指标

49 日龄时,每栏选取 2 只鸭进行翅静脉采血,血液静置 20min 后 3 000r/min 离心,采集血清于-20℃低温保存,测定其中碱性磷酸酶、钙、磷、总蛋白、球蛋白、白蛋白的含量。

2.3 统计分析

所有数据均表示成平均值 $\pm$ 标准差,用 SAS(SAS 研究所,1990)软件中的 GLM(一般线形模型)进行方差分析,用 Duncan's 检验进行多重比较和显著性分析。

3 试验结果

3.1 屠体性能

不同处理组对 49 日龄肉鸭屠体性能的影响见表 2。

表 2 不同处理组对 49 日龄肉鸭屠体性能的影响(%)

项目	屠宰率	半净膛率	全净膛率	腿肌率	胸肌率	腹脂率
1 组	87.21 $\pm$ 1.54 ^{ab}	80.38 $\pm$ 2.28	73.07 $\pm$ 2.63	5.28 $\pm$ 1.11	4.56 $\pm$ 0.86	1.91 $\pm$ 0.66 ^{ab}
2 组	87.22 $\pm$ 1.41 ^{ab}	82.63 $\pm$ 6.44	74.87 $\pm$ 6.70	4.82 $\pm$ 0.661	4.51 $\pm$ 0.82	2.29 $\pm$ 0.89 ^{Aa}
3 组	86.44 $\pm$ 1.72 ^b	79.86 $\pm$ 1.71	71.55 $\pm$ 3.50	5.27 $\pm$ 0.801	4.48 $\pm$ 0.50	1.18 $\pm$ 0.59 ^{Bc}
4 组	87.19 $\pm$ 0.90 ^{ab}	81.54 $\pm$ 1.14	74.39 $\pm$ 1.88	5.49 $\pm$ 0.781	4.44 $\pm$ 0.64	1.77 $\pm$ 0.58 ^{abc}
5 组	87.21 $\pm$ 1.00 ^{ab}	81.17 $\pm$ 1.08	73.27 $\pm$ 1.45	5.53 $\pm$ 0.771	5.10 $\pm$ 0.65	1.77 $\pm$ 0.65 ^{abc}
6 组	88.28 $\pm$ 1.43 ^a	81.89 $\pm$ 1.21	74.45 $\pm$ 1.52	5.08 $\pm$ 0.731	4.67 $\pm$ 0.71	2.08 $\pm$ 0.56 ^{Ab}
7 组	88.41 $\pm$ 1.62 ^a	82.13 $\pm$ 1.48	74.91 $\pm$ 1.77	4.91 $\pm$ 0.451	4.91 $\pm$ 0.71	1.50 $\pm$ 0.55 ^{Bc}
8 组	87.54 $\pm$ 1.69 ^{ab}	80.23 $\pm$ 2.05	72.57 $\pm$ 2.12	5.56 $\pm$ 0.41	4.45 $\pm$ 0.44	2.12 $\pm$ 0.54 ^{Ab}

注:同列肩标数字有不同字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。

不同处理组对 49 日龄肉鸭的半净膛率、全净膛率、腿肌率、胸肌率没有显著影响,但对屠宰率有显著影响,处理 6 和 7 组的屠宰率显著高于处理 3 组,其余各组的屠宰率没有显著差异。表明在相同的日粮类型内,屠宰率没有显著差异,但低营养水平及添加 200PU/kg Allzyme SSF 的玉米-小麦-豆粕型日粮的屠宰率高于低营养水平添加了 200PU/kg Allzyme SSF

的玉米-豆粕日粮。处理 3 组的腹脂率极显著的低于处理 2、6、8 组(P<0.01),显著的低于处理 7 组(P<0.05)。处理 7 组的腹脂率显著的低于处理 2 组(P<0.05)。表明低营养水平的玉米-豆粕及玉米-小麦-豆粕型日粮中分别添加 200PU/kg Allzyme SSF 均降低了腹脂率。

3.2 血清指标(见表 3)

表 3 不同处理组对 49 日龄肉鸭血清指标的影响

项目	总蛋白(g/l)	球蛋白(g/l)	白蛋白(g/l)	碱性磷酸酶(U/l)	钙(mmol/l)	磷(mmol/l)
1 组	33.09 $\pm$ 4.10 ^b	15.26 $\pm$ 9.00 ^{ab}	17.83 $\pm$ 7.80	345.42 $\pm$ 118.60 ^{ab}	2.14 $\pm$ 0.36 ^B	4.64 $\pm$ 0.87 ^{abc}
2 组	34.39 $\pm$ 4.06 ^{ab}	14.07 $\pm$ 4.28 ^{ab}	20.32 $\pm$ 1.44	422.98 $\pm$ 98.34 ^{ab}	2.46 $\pm$ 0.06 ^A	5.63 $\pm$ 0.46 ^{ab}
3 组	30.63 $\pm$ 3.22 ^{abc}	13.37 $\pm$ 4.08 ^{ab}	20.27 $\pm$ 4.82	324.64 $\pm$ 32.33 ^{ab}	2.66 $\pm$ 0.17 ^A	3.58 $\pm$ 0.98 ^c
4 组	28.46 $\pm$ 2.27 ^{bc}	8.88 $\pm$ 3.92 ^b	19.58 $\pm$ 2.49	406.89 $\pm$ 65.57 ^{ab}	2.65 $\pm$ 0.16 ^A	6.00 $\pm$ 1.61 ^a
5 组	31.48 $\pm$ 4.70 ^{bc}	11.55 $\pm$ 4.10 ^{ab}	19.92 $\pm$ 2.21	444.70 $\pm$ 73.77 ^{ab}	2.55 $\pm$ 0.07 ^A	3.69 $\pm$ 1.05 ^{bc}
6 组	25.96 $\pm$ 2.05 ^{bc}	8.86 $\pm$ 2.37 ^b	15.57 $\pm$ 3.76	306.46 $\pm$ 81.43 ^b	2.56 $\pm$ 0.19 ^A	3.99 $\pm$ 0.81 ^{abc}
7 组	39.25 $\pm$ 7.98 ^{Ac}	20.31 $\pm$ 11.39 ^a	18.94 $\pm$ 5.79	458.51 $\pm$ 146.83 ^a	2.58 $\pm$ 0.29 ^A	5.72 $\pm$ 2.03 ^a
8 组	31.33 $\pm$ 2.57 ^{bc}	12.86 $\pm$ 3.75 ^{ab}	22.04 $\pm$ 6.24	402.04 $\pm$ 97.07 ^{ab}	2.74 $\pm$ 0.28 ^A	4.50 $\pm$ 2.24 ^{abc}

不同处理组对肉鸭血清中白蛋白含量没有显著影响。处理 7 组的血清总蛋白含量极显著高于处理

3、4、6 组(P<0.01),显著高于处理 1、5、8 组(P<0.05);处理 7 组的血清球蛋白含量显著高于处理 4、6 组。因

此,低营养水平的玉米-小麦-豆粕型日粮中添加 200PU/kg Allzyme SSF 提高了血清球蛋白的含量,从而提高了血清总蛋白的含量。

处理 7 组的碱性磷酸酶含量显著高于处理 6 组,说明低营养水平的玉米-小麦-豆粕型日粮中添加 200PU/kg Allzyme SSF 提高了血清碱性磷酸酶的含量。处理 1 组的血钙含量极显著低于其它各组 ($P<0.01$)。处理 4 组和处理 7 组的血清磷含量显著高于处理 5 和 3 组 ($P<0.05$),处理 2 组的血清磷含量显著高于处理 3 组 ($P<0.05$)。说明在低营养水平的玉米-豆粕型日粮中添加 300PU/kg Allzyme SSF 及低营养水平的玉米-小麦-豆粕型日粮中添加 200PU/kg Allzyme SSF 提高了血清磷的含量。

4 讨论与分析

4.1 对屠宰性能的影响

本试验中,不同处理组对 49 日龄肉鸭的半净膛率、全净膛率、腿肌率、胸肌率没有显著影响。在同种日粮内,屠宰率没有显著差异,但在两种日粮之间,低营养水平及添加 200PU/kg Allzyme SSF 低营养水平的玉米-小麦-豆粕型日粮的屠宰率高于添加 200PU/kg Allzyme SSF 的低营养水平的玉米-豆粕型日粮的屠宰率。因此,影响屠宰率的主要因素是日粮类型。玉米-小麦-豆粕型日粮的屠宰率有高于玉米-豆粕型日粮的趋势。

本试验结果表明,在低营养水平的玉米-豆粕及玉米-小麦-豆粕型日粮中分别添加 200PU/kg Allzyme SSF 均降低了腹脂率。李伟忠等(2000)指出,饲料中的能蛋比对动物的能量代谢、生长性能及胴体组成有影响,日粮能蛋比与胴体水分呈负相关,与胴体蛋白质呈一定的负相关,与胴体脂肪呈正相关。采用较低的能蛋比可显著提高肉仔鸡 57 日龄屠宰率,肉仔鸡的胸肌肉的产量不受能量水平的影响,但与日粮的能蛋比呈显著负相关;日粮能蛋比对调节脂肪沉积很重要,提高能量蛋白比,体脂沉积量会增加,相反体脂沉积减少。因此,本试验中,在低营养水平的玉米-豆粕型及玉米-小麦-豆粕型日粮中添加 200PU/kg Allzyme SSF 提高了低营养水平日粮的蛋白质利用率,改善了能蛋比,降低了肉鸭的腹脂率。

4.2 对血清指标的影响

血磷受 VD_3 和 PTH(甲状旁腺激素)的影响, VD_3 促进磷在小肠后段由高浓度的内容物向低浓度的肠粘膜扩散而吸收,PTH 则抑制磷的重吸收。因此,在日

粮磷供应不足的情况下,磷的吸收减少,从而导致钙的吸收也减少,PTH 浓度升高,抑制磷在肾小管的重吸收,从而使磷由尿液排出,最终导致血磷浓度降低。在低营养水平的玉米-豆粕型日粮中添加 300PU/kg Allzyme SSF 及玉米-小麦-豆粕型日粮中添加 200PU/kg Allzyme SSF 提高了血清磷的含量,表明 Allzyme SSF 的添加促进了日粮磷的吸收,这与席峰(2000)的研究结果一致。

饲料中磷不足以提供造骨细胞所需时,造骨细胞的活性增强,使血液中的碱性磷酸酶的活性提高(Kaneko,1989)。Lei 等(1993)在磷不足的仔猪饲料中添加植酸酶数周后,血中碱性磷酸酶的活性逐渐降低。本试验中,低营养水平的玉米-小麦-豆粕型日粮中添加 200PU/kg Allzyme SSF 提高了肉鸭血清碱性磷酸酶的活性,与他们的结果不一致,且本试验所测得的肉鸭的碱性磷酸酶的活性为 $(306.46 \pm 81.43) \sim (458.51 \pm 146.83) U/L$,与席峰(2000)报道的樱桃谷肉鸭的碱性磷酸酶的 $(308.62 \pm 46.21) U/L$ 的结果不尽一致。玉米-豆粕型日粮高营养水平的血钙含量极显著低于其它组 ($P<0.01$),处于异常范围,其它所有处理的血钙含量均在正常范围。碱性磷酸酶的活性直接受血钙、血磷浓度的影响,血钙浓度升高抑制其活性,血磷浓度降低使其激活。但本试验的血钙、血磷、碱性磷酸酶的活性并没有呈现明显的规律,可能是因为采血期间的应激或饲养期间的寒冷气候造成的。

本试验中,低营养水平的玉米-小麦-豆粕型日粮中添加 200 PU/kg Allzyme SSF 提高了血清球蛋白的含量,从而提高了血清总蛋白的含量。血清球蛋白是参与机体免疫的蛋白,它的含量上升表明机体的免疫能力增强。

参考文献

- 1 李伟忠,单安山.能蛋比及其在畜禽中的应用[J].中国饲料,2002(20):20~21
- 2 席峰,吴治礼.植酸酶在樱桃谷肉鸭饲料中的应用.集美大学学报(自然科学版),2000(9):40~45
- 3 Kaneko J J. Clinical Biochemistry of Domestic Animal, Academic Press, Inc., San Diego, California USA, P.1989.700~714
- 4 Lei X,P.K Ku,E.R Miller, D.E.Ullrey and M.T.Yokoyama. Supplemental microbial phytase improves bioavailability of dietary zinc to weaning pigs.J.Nutr., 1993(123):1 117~1 123

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

半胱胺对衰老小鼠胸腺淋巴细胞 DNA 损伤的影响

王建峰 乐国伟

通过在日粮中添加外源半胱胺(CS)能清除机体内过量的氧自由基^[1],维护机体的氧化平衡,保护细胞和机体免受氧化损伤^[2],从而提高动物机体的免疫功能^[3],这种机制是否与机体免疫细胞 DNA 受到保护有关,目前还未见报道。

DNA 存储着生物体赖以生存和繁衍的遗传信息,因此,维护 DNA 分子的完整性对细胞至关重要。外界环境(如射线辐射、化学诱变剂、加热等)和生物体内部因素(疾病、应激、衰老等)都常常会引起 DNA 分子的损伤和改变^[4]。美国麻省理工学院 Guarente 等(1999)已将 DNA 损伤列为引起生物氧化衰老的首要因素,这一领域已成为研究的热点。据统计,每个细胞的 DNA 在 24h 内大约会受到 1 万次的损伤^[5]。如果 DNA 的损伤或遗传信息的改变不能更正,就会影响生物遗传的稳定性。研究表明,在细胞中能进行自我修复的生物大分子只有 DNA,这就反映出 DNA 分子的完整性对生命机体的重要性,但生物进化时突变与遗传是相对统一的,DNA 分子损伤也不会完全被修复。许多疾病的发生和发展都与细胞 DNA 损伤有关,因此,改善机体细胞 DNA 修复功能已成为预防和治疗多种疾病的一种重要手段。

1 材料与方法

1.1 试验材料

半胱胺以微胶囊包被,半胱胺含量为 34.21%;正常熔点琼脂糖、低熔点琼脂糖(Promegar);十二烷基肌氨酸钠(上海华美);Triton X-100 (Amersco);溴化乙锭、台盼蓝(Sigma);D-半乳糖(江苏恒瑞制药)。

1.2 试验方法

1.2.1 动物试验

选用 5~6 周龄昆明种雄性健康小鼠 50 只,按体重随机分成 1 个对照组和 4 个衰老组。对照组鼠每天每千克体重腹腔注射 100mg 的生理盐水。4 个衰老组鼠每天每千克体重腹腔注射 100mg 的 D-半乳糖,连续注射 4 周,建立小鼠氧化衰老模型^[6]。试验开始时,

对照组饲喂基础日粮,4 个衰老组分别饲喂添加了 0、15、30、45mg/kg 半胱胺的基础日粮。4 周后屠宰,取胸腺,分离胸腺淋巴细胞,采用单细胞凝胶电泳法观察小鼠胸腺细胞 DNA 损伤情况。所有小鼠同室分笼饲养,定期更换垫料和饮水,光照时间 12h,自由饮水和采食,室温控制在 20~25℃。

1.2.2 小鼠胸腺淋巴细胞的分离

小鼠眼球放血后,放入 75% 的酒精中消毒 3~5min,在超净工作台内无菌取胸腺放在培养皿内,用镊子撕碎,于 200 目筛网上加少量预冷 PBS,用注射器芯轻轻挤压出细胞至培养皿内,用吸管移入离心管,1 500r/min 离心 10min,去上清液,加入 5ml 红细胞裂解液,裂解红细胞 5min,1 500r/min 离心 10min,去上清液,再用 PBS 洗涤细胞两次,最后将细胞浓度调成 1×10^6 个/ml。

1.2.3 细胞活力的检测

将细胞悬液和 0.5% 台盼蓝溶液按照 1:1 体积比混合,在显微镜下观察。活细胞圆形透明,而死细胞被染成蓝色,计数 200 个细胞,用活细胞占计数细胞的百分比表示细胞活力。

1.2.4 单细胞凝胶电泳(SCGE)

参照 Sigh 法^[7],具体方法如下:取 100 μ l 浓度为 0.7% 的正常熔点的琼脂糖凝胶铺在磨砂的载玻片上,加盖盖玻片,在室温下待琼脂糖凝固,然后去掉盖玻片,此胶作为地层胶。取 10 μ l 浓度为 1×10^6 个/ml 的淋巴细胞悬液与 70 μ l 浓度为 0.7% 低熔点琼脂凝胶在 37℃ 下混匀后铺在低层胶上,迅速盖上盖玻片,4℃ 冰箱中凝固 10min 后,轻轻移去盖玻片,取 85 μ l 浓度为 0.7% 低熔点琼脂糖凝胶铺第三层胶,4℃ 冰箱中凝固 10min。

将制好的载玻片放在新鲜制备的 4℃ 细胞裂解液 (2.5mmol/l NaCl、100mmol/l Na₂EDTA、10mmol/l Tris-HCl、pH 为 10、1% 肌氨酸钠,用前加入 1% Triton-X100、10% DMSO) 中裂解 1h,将载玻片转移到 4℃ 电泳液中 (1mmol/l Na₂EDTA、300mmol/l NaOH) 解旋 20min,使 DNA 充分展开,然后在 25V 电压下,通过调节电泳液液面的高度调节电流为 300mA,电泳 30min。

电泳结束后,取出载玻片,用蒸馏水轻轻将电泳

王建峰,上海邦成生物科技有限公司,201615,上海市松江区九里亭工业园区沪松公路 1620 弄 21 号。

乐国伟,江南大学食品学院。

收稿日期:2006-02-10

液冲洗掉,在暗处将水控干,最后用 $2\mu\text{g/ml}$ 的 EB 水溶液 $25\mu\text{l}$ 染色,盖上盖玻片,放在潮湿的盒中, 4°C 避光保存,24h 内进行测定。

以上所有步骤均在 4°C 避光条件下进行,以避免产生额外的 DNA 损伤。最后在 Olympus 落射式荧光显微镜下观察 DNA 电泳结果,并采用自动成像系统($\times 400$)拍照,在荧光显微镜($\times 400$)下每张图片子观察 100 个细胞计算其中拖尾细胞的百分率,以其作为 DNA 受损细胞所占的百分率;测定 30 个拖尾细胞的尾长(即 DNA 的迁移距离),取平均值作为该样品细胞 DNA 尾长。图片采用 Komet5.5 单细胞凝胶电泳专业分析软件进行分析处理。

1.3 数据处理与统计分析

采用 SAS 统计软件进行方差分析,若方差分析有显著性差异,再进行多重比较。

2 结果与分析

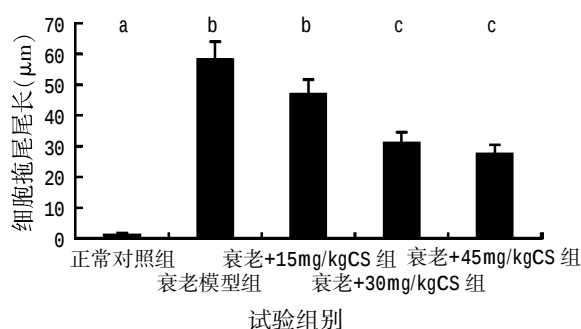
2.1 细胞活力

经检测,细胞活力均在 95% 以上,表明细胞大部分存活。

2.2 单细胞凝胶电泳

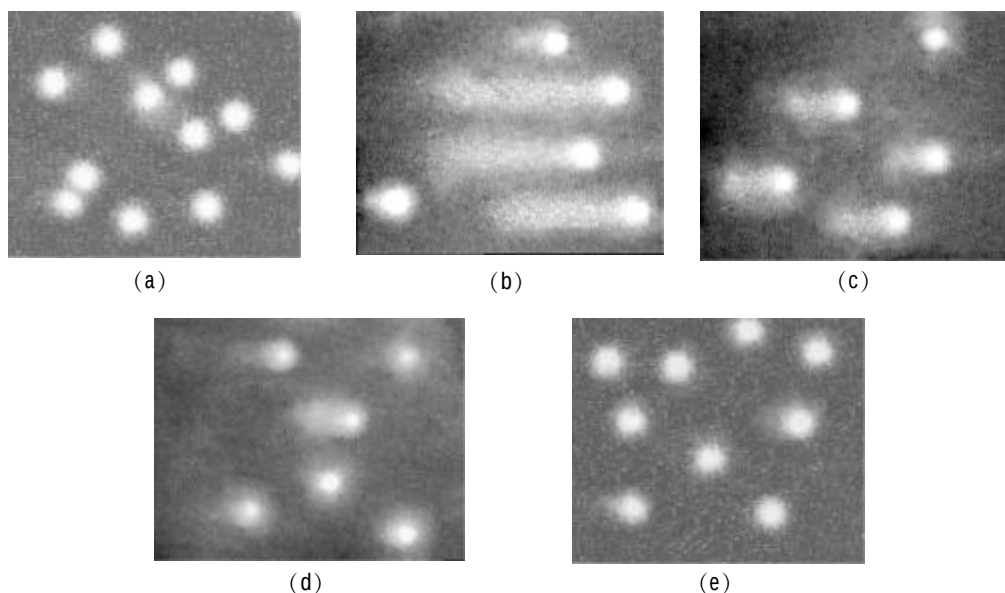
2.2.1 拖尾细胞尾长

在荧光显微镜下,正常的对照组小鼠胸腺淋巴细胞 DNA 呈现较明亮圆形点, DNA 没有或很少出现拖尾现象,尾长也较短,仅为 $2.31\mu\text{m}$ (见图 1、图 2a);衰老模型组(见图 1、图 2b)小鼠胸腺淋巴细胞 DNA 出现明显拖尾,呈现明显的彗星状,拖尾细长,彗星头部变小,此时细胞 DNA 断裂程度剧烈,断裂成小分子 DNA 片段,说明小鼠在衰老过程中胸腺淋巴细胞 DNA 不断受到损伤,衰老引起的胸腺淋巴细胞 DNA 损伤模型建立成功。



注:图上标注不含相同字母表示差异显著($P < 0.05$),下同。

图 1 半胱胺对胸腺细胞拖尾长度的影响



注:a~e 依次为正常对照组 SCGE、衰老模型组 SCGE、衰老+15mg/kg CS 组 SCGE、衰老+30mg/kg CS 组 SCGE、衰老+45mg/kg CS 组 SCGE。

图 2 单细胞凝胶电泳

试验观察到:在日粮中添加 15、30、45mg/kg 半胱胺后胸腺淋巴细胞 DNA 拖尾有不同程度的变短变粗(见图 1、图 2c、d、e),说明在日粮中添加半胱胺对胸腺淋巴细胞 DNA 的损伤具有一定的保护作用。其中 45mg/kg 半胱胺组细胞拖尾变的很粗短,且主要集中

在细胞附近,彗星头部也变大,说明此时胸腺淋巴细胞 DNA 只有小部分断裂成分子量较大的片段,与衰老模型组相比差异显著($P < 0.05$)。试验结果表明,在日粮中添加 45mg/kg 半胱胺可有效地保护胸腺淋巴细胞 DNA 免受损伤,或是对胸腺淋巴细胞 DNA 的损

伤有很好的修复作用。

2.2.2 拖尾细胞百分率

正常对照组细胞很少出现拖尾,仅有 19.2%的细胞出现拖尾,表明在正常情况下胸腺淋巴细胞 DNA 受到的损伤很小(见图 3)。与正常对照组相比,衰老模型组 DNA 拖尾细胞百分率显著增加 ($P<0.05$),有 78%的细胞拖尾,表明在小鼠的衰老过程中,它的胸腺淋巴细胞 DNA 受到了极大的损伤,由衰老引起的胸腺淋巴细胞 DNA 损伤模型建立成功(见图 2b、图 3)。试验观察到:与衰老模型组相比,在日粮中添加了 15、30、45mg/kg 半胱胺后细胞拖尾百分率都有所下降,其中 30、45mg/kg 半胱胺组均差异显著 ($P<0.05$)。试验结果表明,在日粮中添加半胱胺能保护由衰老引起的胸腺淋巴细胞 DNA 的损伤,减轻细胞 DNA 受损程度。

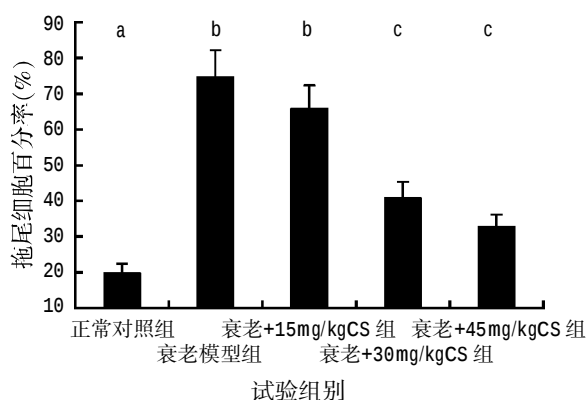


图3 半胱胺对胸腺细胞拖尾率的影响

3 讨论

D-半乳糖致衰老的小鼠胸腺拖尾细胞的百分率和拖尾细胞尾长均显著高于正常对照组 ($P<0.05$),表明衰老小鼠的胸腺细胞 DNA 的损伤严重。衰老的自由基学说认为,自由基和脂质过氧化物引起细胞等一系列氧化损伤是导致衰老的重要原因。连续注射 D-半乳糖可引起小鼠体内自由基持续地升高,自由基的产生和清除失去平衡^[9],过多的自由基对机体的蛋白质、各种酶类、DNA、糖类、细胞膜等都有破坏作用,导致机体代谢混乱,造成有害物质的大量堆积,加速机体衰老。疾病、衰老、应激等因素均可引起细胞 DNA 损伤。DNA 损伤的形式包括碱基丢失或修饰、化学键断裂和 DNA 双链断裂。机体自身存在着 DNA 损伤修复体系,当 DNA 损伤时,在一定条件下该修复系统能使之恢复正常或将缺陷加以弥补,以保证正常生命活动及种族繁衍的稳定性。DNA 损伤修复学说认为,生

物衰老时,修复损伤 DNA 能力下降,致使损伤积累,引起基因及其表达异常,最终引起生物衰老。DNA 损伤与衰老的关系正日益受到重视,有试验表明,衰老动物的细胞 DNA 断裂较多,且损伤后修复能力也明显较年轻动物低^[9]。

本试验结果表明,在日粮中添加不同剂量的半胱胺均能不同程度地降低胸腺淋巴细胞 DNA 的损伤。和衰老模型组相比,15 mg/kg 半胱胺组能降低胸腺淋巴细胞 DNA 的损伤程度,但差异不显著 ($P>0.05$)。30、45mg/kg 半胱胺能显著降低 DNA 受损细胞的拖尾尾长 ($P<0.05$) 和受损细胞百分率 ($P<0.05$),表明半胱胺能显著降低老龄小鼠胸腺淋巴细胞 DNA 的受损程度。在日粮中添加半胱胺能不同程度地保护细胞 DNA 免受损伤或能加速损伤细胞的修复过程,这可能与外源半胱胺的加入能及时有效地清除机体衰老时产生的大量氧自由基有关。在日粮中添加外源半胱胺能减轻胸腺淋巴细胞 DNA 损伤的作用很可能与其调节 DNA 损伤修复相关基因的表达有关,这还有待于从分子水平作更深入的研究。

参考文献

- 1 Yoshiaki, A. Weihong Gu. Oxidation of cysteamine induced by gas-phase radicals from combustion smoke of poly[J]. Chemosphere,1998 (37):876-881
- 2 B Bryant H U, John W, Holabay, et al. Cysteamine produces dose-related bidirectional immunomodulatory effects in mice[J]. Pharmacol J. Exp. Ther., 1989(249):424-429
- 3 王恩秀,陈伟华.半胱胺和几种激素对大鼠免疫功能的影响[J].中国兽医杂志,2003,39(5):10-11
- 4 Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA [J]. Nature, 1993(362):709-715
- 5 Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Experimental Cell Research, 1988(175):184-191
- 6 Pieri C, Recchioni R, Marcheselli F, et al. The impairment of mitochondrial membrane potential and mass in proliferating lymphocytes from vitamin E deficient animals is recovered by glutathione[J]. Cell Mol Biol.,1995(41):755-762
- 7 朱茂详,张劲松.纳米硒对 D-半乳糖所致小鼠免疫和氧化损伤的保护作用[J].微量元素与健康研究,1999(18):4-7
- 8 Errol C, Friedberg. Nucleotide excision repair and cancer predisposition [J]. American Journal of Pathology, 2000(157):693-701
- 9 Moriwaki S, Ray S, Tarone RE, et al. The effect of donor age on the processing of UV-damaged DNA by cultured human cells: reduced DNA repair capacity and increased DNA mutability [J]. Mutat Res, 1996(364):117-122

(编辑:孙崎峰, sqf0452@126.com)

蜂花粉多糖对肉鸡生长性能及肌肉化学成分的影响

潘珂 孙汉 高智慧

摘要 试验用蜂花粉多糖作为一种饲料添加剂饲喂肉鸡,探讨蜂花粉多糖对肉鸡生产性能及肌肉化学成分的影响。试验分A、B两组,A组饲料中添加0.2%蜂花粉多糖,B组为空白对照组,在相同环境下饲养。通过测定周龄重、饲料效率和屠宰性能,发现蜂花粉多糖能提高8周龄肉鸡的体重和饲料效率,但屠宰性能提高不明显。通过对8周龄肉鸡肌肉化学成分分析测定,发现A组水分含量极显著低于B组($P<0.01$);粗蛋白、粗脂肪、粗灰分从数据上显示,A组均高于B组,但差异均不显著($P>0.05$)。结果表明,饲喂蜂花粉多糖对肉鸡生长性能有一定的提高。

关键词 蜂花粉多糖;生长性能;肌肉化学成分

中图分类号 S831.5

蜂花粉是工蜂从显花植物花药内采集的花粉粒,含有十分复杂的化学成分,且含有丰富和全面的营养成分,富含多种生物活性物质,有“完全营养素”之美誉。在食品、化工、医药方面的研究及开发利用取得了一定进展,然而在作为饲料添加剂方面开发利用还只是刚刚起步。前苏联学者用10%的颗粒花粉料对禽增重做了研究,试验结果表明,饲料中添加蜂花粉添加剂使雏禽加速增重接近50%,并且能够全部健壮成长,因此,在家禽的饲料添加剂中可以不破壁就利用蜂花粉,减少蜂花粉加工工序,降低蜂花粉饲料添加剂的成本^[1]。张玉兰等(1998)用1%的复方蜂花粉(蜂花粉+中草药)饲料添加剂饲喂肉鸡和蛋鸡,结果使蛋鸡产蛋率提高7.6%~12.4%,饲料转化率提高13.2%~15.8%,死胎率和破蛋率均有所降低;使肉鸡增重5.8%~17.0%,提高饲料转化率5.80%~10.25%,鸡只疾病减少,死淘率降低6.5%~9.0%,扣除添加剂的成本,每只肉鸡可增加0.56~2.88元的收入^[2]。方守兰(1998)认为,添加蜂花粉在家禽饲养上主要有以下几点好处:①可不用或少用赖氨酸、多维、酶制剂、着色剂,降低饲料成本;②适口性好,家禽爱吃,推广容易;③使家禽毛色光亮,肉鸡的皮、脚着色好,蛋黄胆固醇含量低,颜色好;④生长速度快,料肉比较小,饲料利用率高;⑤抗病力强,育成率高^[3]。

随着生活水平的不断提高,人们的膳食结构也发生了重大变化,鸡肉正成为餐桌上的主要肉品来源,鸡肉的品质也越来越受到人们的关注。据目前的估

算,我国每年生产蜂花粉1 000多吨,仅为蜂产花粉一般资源量的1/24,大量的花粉资源有待大力开发利用^[4]。开发利用蜂花粉,将资源优势转化为商品优势,已成为许多家禽工作者研究的课题。本研究通过添加蜂花粉多糖饲喂肉鸡试验,探讨饲喂蜂花粉多糖对肉鸡生产性能及胸肌中水分、粗蛋白、粗脂肪等营养成分的影响,以期为提高肉鸡的生产性能提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验方案设计

本试验分为3个阶段,0~4周龄为第一阶段;4~6周龄为第二阶段;6~8周龄为第三阶段。试验A组添加0.2%蜂花粉多糖,B为空白对照组,试验设计见表1。

表1 试验设计

组别	试验处理
A	基础日粮+0.2%蜂花粉多糖
B	基础日粮

1.2 试验动物及管理

选用1日龄的健康商品代肉用仔鸡70只,随机分为2组,每组35只,经检验组间差异不显著。A组为试验组,喂基础日粮(正大集团生产的全价肉用仔鸡饲料),并在饮水中添加0.2%蜂花粉多糖;B组为对照组,喂基础日粮,饮水中不添加任何物质。采取地面铺厚垫料平养,人工控温;整个试验期环境湿度采用自然湿度,采用自然光照和人工光照相结合,全期采用24h光照。自由采食(干粉料)和饮水,饲槽和水槽均为塑料制品。第2周末和第3周末注射新城疫疫苗。

1.3 生长性能指标测定

1.3.1 称重

4周末和8周末称全群仔鸡个体重(晨饲前空腹

潘珂,江西农业大学动物科学技术学院,高级实验师,330045,南昌。

孙汉、高智慧,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-04-17

进行)。

1.3.2 耗料量及料重比

每天按组定量投料称重,统计耗料量,计算 0~4 周龄和 0~8 周龄的料重比。

1.3.3 屠宰率测定

称活重:试验结束(6 周龄末和 8 周龄末),每组每次随机抽取 4 只试验鸡,进行屠宰测定,宰前禁食 12h,屠宰前称活重。

半净膛重:刺杀放血,干拔毛,然后称屠体重,屠体去除食道、嗦囊、气管、肠道、脾脏、胰脏、胆囊及生殖器官,留下心脏、肝脏(去胆)、肺脏、肾脏、腺胃、肌胃(去除内容物及角质膜)和腹脂的重量。

全净膛重:半净膛鸡去除心脏、肝脏、肌胃、腺胃、腹脂、头、颈、脚,留肺脏、肾脏的重量。

剥离左侧胸肌、腿肌,测定胸肌重和腿肌重。

屠宰率(%)=屠体重/活体重;

半净膛率(%)=半净膛重/屠体重;

全净膛率(%)=全净膛重/屠体重;

胸肌率(%)=胸肌重/全净膛重;

腿肌率(%)=腿肌重/全净膛重。

1.4 肌肉化学成分测定

1.4.1 试验材料

从 1 日龄饲养到试验结束(8 周龄末),从体重相差不显著的仔鸡当中,随机选取两组各 6 只,进行屠宰,采样在屠宰后立即进行,取其同部位胸肌进行肌肉化学成分测定。

1.4.2 测定内容及方法

根据国标 GB1.4—88 测定:蛋白质(半微量凯氏定氮法)、水分[干燥箱恒温干燥法(105±2)℃约 5~6h]、脂肪(索氏脂肪提取法,约 48h)、灰分(采用高温炉灰化法)。

1.5 统计分析

试验数据用 SAS 数据处理系统进行方差分析,差异显著的进行 Duncan's 多重比较。

2 结果与分析

2.1 蜂花粉多糖对肉鸡生长性能的影响

分别对添加有蜂花粉多糖的试验组与对照组鸡的周龄重、饲料效率、屠宰性能进行测定,测定结果见表 2 和表 3。

从表 2 可以看出,4 周龄时,添加蜂花粉多糖组肉鸡体重与对照组差异不显著($P>0.05$),但到 8 周龄,A 组体重显著高于对照组(B 组)($P<0.05$)。0~4 周的饲料效率两组间差别不大;0~8 周龄的饲料效率 A 组高于 B 组。可见蜂花粉多糖对肉鸡的生长速度与饲料效率有显著的促进作用,但这个作用要到 8 周龄才能表现出来。

表 2 蜂花粉多糖对肉鸡生长性能的影响

组别	体重(g)		料重比	
	4 周龄	8 周龄	0~4 周	0~8 周
A 组	421.33±19.69 ^a	988.83±12.23 ^b	1.954	2.234
B 组	429.08±25.43 ^a	950.33±19.26 ^a	1.948	2.478

注:同列肩标字母相同者表示差异不显著;同列字母不同者表示差异显著。下表同。

表 3 蜂花粉多糖对肉鸡屠宰性能的影响(%)

周龄	组别	屠宰率	半净膛率	全净膛率	胸肌率	腿肌率
6 周	A 组	90.6±0.48 ^a	82.2±1.13 ^a	62.6±0.28 ^a	16.2±3.50 ^a	30.1±0.48 ^a
	B 组	91.16±0.58 ^a	84.19±0.11 ^a	61.61±1.37 ^a	15.68±4.80 ^a	29.20±0.62 ^a
8 周	A 组	92.06±0.65 ^a	84.00±0.68 ^a	69.59±1.07 ^a	18.27±0.42 ^a	33.33±0.78 ^a
	B 组	91.99±2.27 ^a	84.82±2.27 ^a	70.04±1.88 ^a	18.08±0.57 ^a	31.28±0.95 ^a

从表 3 可以看出,两组肉鸡的屠宰率、半净膛率、全净膛率、胸肌率、腿肌率差异均不显著($P>0.05$)。

2.2 蜂花粉多糖对肉鸡肌肉化学成分的影响

通过对添加蜂花粉多糖的试验组与对照组两组肉鸡进行肌肉品质测定,其化学成分结果见表 4。

通过对两组数据比较发现,试验组和对照组间水分含量差异达到极显著水平($P<0.01$),添加蜂花粉多糖的试验组极显著低于对照组。粗蛋白、粗脂肪、粗灰分试验组和对照组间差异不显著,但从数据上表现为添加蜂花粉多糖的试验组均约高于对照组。

表 4 8 周龄肉鸡肌肉化学成分(%)

组别	水分	粗蛋白	粗脂肪	粗灰分
A 组	72.07±0.30 ^a	25.26±0.28 ^a	0.84±0.08 ^a	1.30±0.02 ^a
B 组	73.04±0.30 ^b	24.39±0.28 ^a	0.77±0.08 ^a	1.29±0.02 ^a

注:同一列中小写字母相同表示差异不显著($P>0.05$);同一列中小写字母不同表示差异显著($P<0.05$);同一列中大写字母不同表示差异极显著($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 由于选取的仔鸡初始体重两组间差异不显著,可以排除因个体体重差异导致的生长速度的差异。饲

喂过程中,采用相同的基础日粮,在相同的环境下饲养,尽可能减少蜂花粉多糖之外的其它影响因素。在4周龄时,A、B两组肉鸡体重和饲料效率差异都不显著,但到8周龄时,添加蜂花粉多糖的试验组体重显著高于对照组,饲料效率也高于对照组。可见,蜂花粉多糖对肉鸡生长性能有促进作用,但要到8周龄时效果才能明显地表现出来。蜂花粉在我国利用率很低,在成本允许范围之内,蜂花粉多糖作为一种饲料添加剂是可行的。因此,利用蜂花粉多糖作为肉鸡饲料添加剂有着明显的经济效益。

屠宰性能包括半净膛率、全净膛率、胸肌率、腿肌率。试验表明,添加蜂花粉多糖对肉鸡的屠宰性能没有明显的改变,这是因为这些性状体现的是体态结构性状,而蜂花粉多糖只对生长性能有影响,而对体态结构方面没有什么影响。

3.2 水分虽然不是肉的营养物质,但肉品中的水分含量及其持水性能直接关系到肉及肉制品的组织状态,一般来说,含水量低则肌肉中的干物质含量高,蛋白质含量也高,则营养价值较高^[6],本次检测结果比较符合这一规律。测定结果发现,添加蜂花粉多糖的试验组肉鸡含水量极显著低于对照组,粗蛋白含量虽然比对照组高但差异不显著。显示添加蜂花粉多糖对提高肉鸡的营养价值有一定的作用。

肌肉中脂肪含量与肌肉品质的关系也较密切,肉品中脂肪的多少直接影响到肉的多汁性和嫩度^[6]。从试验测定结果来看,添加了蜂花粉多糖的试验组粗脂

肪含量比对照组略高,但差异不显著。显示添加蜂花粉多糖饲喂肉鸡可以在一定程度上提高鸡肉的风味。

灰分中主要有钾、钠、钙、镁、硫、磷、铁,也含微量的锌、铜、锰等无机物。肌肉中这些常量或微量矿物质的存在与肌肉宰前功能和宰后品质的变化有关系,从本次试验结果可见,添加了蜂花粉多糖的试验组灰分略高于对照组,但差异不显著。

肌肉化学成分是肉质的主要影响因素。肉质是肉鸡的主要生产性能之一,随着人民生活水平的不断提高,人们越来越重视肌肉品质^[7]。本次试验探讨蜂花粉多糖对肉鸡生产性能和肌肉化学成分的影响,旨在为提高鸡肉品质和蜂花粉多糖的利用提供一定的参考依据。结果发现,添加蜂花粉多糖饲喂确实一定程度上可以提高肉鸡的生产性能。

参考文献

1 王贻节.蜜蜂产品学[M]北京:农业出版社,1991.204
2 张玉兰,王开发,姜立征,等.花粉饲料添加剂在肉鸡饲喂中的使用效果[J].蜜蜂杂志,1998(8):3~4
3 方守兰.蜂花粉在家禽饲料中的应用[J].饲料研究,1998(6):22~23
4 毛礼米.花粉资源利用前景广阔[J].植物杂志,1999(1):17
5 潘珂.江西地方鸡种肉品质的比较研究[J].动物科学与动物医学,2000,17(1):24~25
6 潘珂,孙汉,欧阳建华.几种江西地方品种鹅肌肉品质测定分析[J].江西农业大学学报,2005,27(3):443~445
7 李建军,文杰.禽肉风味影响因素研究进展[J].中国家禽,2002,24(5):32~34

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

· 书 讯 ·

书 名	作 者	定价(元)	书 名	作 者	定价(元)
畜禽十大高效饲料添加剂	李尚波等	22	蛋鸡饲养技术	白修明等	8
饲料非营养调控物质的研究与应用	单安山	41	肥牛饲养技术	雷云国	16
饲料安全与动物营养调控技术研究	单安山	41	肉牛饲养技术大全	韩荣生	15
饲料添加剂	王安	29	实用犬病诊疗图册	赵玉军	29
毛皮动物饲养技术	杨福合等	14	实用猪病防治图册	陈国庆	13
猪鸡常用饲料配方	张洪翔等	11	饲料添加剂安全使用规范	杨振海等	100
养猪技术大全	王彪等	19	全国规模化养猪场大全		120
养猪问答	李树德等	14	默克兽医手册		123
经济动物疾病诊疗新技术	程世鹏等	11	实用养鸭技术	杨桂芹	13
珍禽饲养技术	王峰等	16	肉鸡生产新技术精选		14

邮局汇款地址:(110036)沈阳市金沙江街16号6门(本社发行部收) 联系电话:(024)86391237
银行汇款单位:辽宁省农牧业机械研究所有限公司 开户行:中信银行沈阳分行皇姑支行
帐号:72214101826000548-49

饲料矿物质微量元素生物学效价评定的研究

王 群 刘艳芬

随着生物学、生物化学、环境卫生学、动物营养学等学科的迅速发展,微量元素与动物生产、健康、疾病的关系越来越密切。例如,微量元素参与人和动物体内 50%~70% 的酶的构成,组成体内重要的载体和电子传递系统,参与体内激素和维生素的合成^[1]等。畜牧业上,矿物质微量元素添加剂的作用日益受到人们的重视,并广泛地应用于动物生产上,取得了很好的效果。但是,随着这种添加剂的广泛应用,畜禽粪便中的矿物质含量过高,给环境带来了污染,已引起人们的高度重视。要准确地配制畜禽的全价日粮,就必须弄清各种饲料原料中可以为畜禽利用的营养素的含量,这样就不可避免地涉及到生物学效价问题,如何评定饲料中矿物质微量元素生物学效价,成为畜牧工作者的重要任务。本文介绍并综合了现有评定饲料矿物质微量元素生物学效价的方法,以及影响微量元素吸收利用的因素,旨在为以后客观地评定饲料矿物质微量元素生物学效价提供依据。

1 生物学效价的概念

生物学效价也称“生物学利用率(Bioavailability)”。Sibbald(1987)指出,生物学效价本身是一个抽象的概念,可以给出定义而无法直接测定。这一概念具有多重涵义。张子仪(1994)指出,生物学效价包括消化率、代谢率、同化、有效性和可利用率等多重涵义。一种营养素的生物学效价是指该营养素被动物食入后,被小肠吸收并能参与代谢过程,贮存在动物体内的部分占食入总量的比值^[2],可概括为相对利用率和绝对利用率^[3]。

2 饲料矿物质微量元素生物学效价的评定方法

评定饲料矿物质微量元素生物学效价不仅涉及到不同动物、不同生理条件、各种形态的矿物质微量元素的代谢过程,还受控于不同元素之间的互补、拮抗的规律,所以,评定其生物学效价较评定能量、蛋白质生物学效价要困难得多。目前评定矿物质微量元素生物学效价方法有 4 种,即平衡试验法、参比法、同位素法和细胞生物学的应用法。各种评价方法都有优点

和缺点,应根据不同的情况和试验目的选择合适的评定方法。

2.1 平衡试验法

平衡试验法即通过在一定时间内测定动物对元素的食入量和排出量,从而得到被动物吸收或利用的量。Ammerman(1995)将这种评定方法命名为“表观吸收率(apparent absorption)评定法”,即表观吸收率(%) = (某元素摄入量 - 粪中某元素排出量) / 某元素摄入量。

该方法原理简单,所需试验设备也不复杂,因此,在一段时间内该法应用比较广泛。但是,随着研究的深入,该法的缺点也逐渐暴露出来。一方面,此法获得的矿物质元素的吸收率不一定能反映深层次生物学效价。Sealand Heston(1983)报道,2-吡啶羧酸能显著提高大鼠对锌的吸收率(约 60%),但同时尿中的锌排出量也随之增加,尽管锌的“表观吸收量”增加了,但锌的净沉积率却没有改变。另一方面,粪是内源性 Mn、Fe、Zn 和 Cu 等元素的主要排出渠道。综合以上两方面,用“表观吸收率”来表示某元素的生物学效价具有很大的片面性。虽然可以通过延长试验期、增加动物数量来提高试验的精确性,但需消耗大量的人力、物力和财力。尽管平衡试验评定方法存在很多缺点,但它毕竟是经典的测定表观吸收的方法。使用该方法时,动物处于自然生长状态,其试验结果最接近动物自身状态,对生产实际具有指导意义,是与其它研究方法相比较的参照基准^[4]。

2.2 参比法^[5]

参比法是一类评定相对生物学利用率的方法,包括斜率比法、三点法、标准曲线法、平均值比法等。参比法原理是基于考察的效应与待评定物和标准物的添加量具有线性关系。通常选用利用率高的物质作为标准物,然后考察标准物和待评定物的添加效应,根据两种物质的效应进行比较,从而求出待评定物相对于标准物的生物学利用率。标准物一般选择利用率高的物质,如评定锌的生物学效价通常采用硫酸锌和氧化锌等^[6-8];评定锰时采用水合硫酸锰^[9];评定铁时采用硫酸亚铁^[10-11];评定铜时采用五水硫酸铜^[12]。

2.2.1 斜率比法

斜率比法以其灵敏、准确、客观而成为评定微量

王群,广东海洋大学农学院,524088,广东湛江主校区 29#。

刘艳芬(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-03-13

元素生物利用率最常用的方法。它简单易行,适用于各种元素生物学利用率的测定,且采用多元线性回归法比简单线性回归法更精确^[13-15],但所测定的结果是相对利用率,需要设定一定的浓度梯度,要求试验动物较多。该法基本原理是假设反映指标(Y)与被测元素在饲料中的含量(X)呈线性关系($Y=i+bx$),当被测物质(at)与标准物质(as)在 $x=0$ 相交时,即 $at=as$,则 bt 与 bs 的比值即为被测物质相对于标准物的生物利用率。多种来源同时进行比较时,多元线性即回归方程中相应化合物的斜率与参比标准物的斜率比,即为该元素源相对于参比标准物的生物学利用率。赵剑(2002)采用斜率比法,以肝脏锌浓度为判定指标,以硫酸锌为参比标准物的研究表明,氨基酸螯合锌的生物学效价为 100%^[16]。Cao(2000)以羔羊肝脏锌浓度与日粮中锌添加量线性回归的斜率来评定,结果表明,赖氨酸螯合锌的生物学效价为硫酸锌的 110%^[17]。Hahn(1993)采用斜率比法研究了高水平添加(含锌 $> 1\ 000\text{mg/kg}$)下,氧化锌、赖氨酸螯合锌和硫酸锌的生物学效价。以硫酸锌为标准物,以血浆锌为判断指标,氧化锌、赖氨酸螯合锌的相对生物学效价分别为 56%、110%^[18]。Lewis(1995)用猪研究并测得蛋氨酸螯合铁的相对生物学效价为 68%(血红蛋白为判断指标,硫酸亚铁的相对生物学效价为 100%)。Cao(1996)以肝脏铁浓度为判断指标,在肉仔鸡的试验研究中表明,蛋氨酸螯合铁的相对生物学效价为 88%(硫酸亚铁为 100%)^[19]。前人对有机锰源生物学利用率的研究,也多采用添加大剂量锰(以骨灰锰含量为指标)来评价有机锰源的生物学利用率。Fly 等(1989)以饲料级氧化锰为标准参照物,在不含植酸和纤维的酪蛋白-葡萄糖饲料中或在上述饲料中加入 10% 的玉米-豆粕混合物后的饲料中添加蛋氨酸锰,结果添加蛋氨酸锰组胫骨灰锰含量均比添加饲料级氧化锰的对照组高 30%~74%^[20]。但是,不同的研究者因试验背景不尽相同,得到的微量元素的生物学效价差别也很大。可能主要有以下几个原因^[21-26]:①试验所用日粮类型不同;②试验研究持续的时间不同;③试验动物的种属和生长阶段不同;④试验动物体内微量元素贮量背景不同;⑤所选的微量元素产品的种类和质量不同;⑥研究者所选统计处理方法不同;⑦研究中所用评价指标不同;⑧试验设计时所设定的微量元素的添加水平的高低不同。

2.2.2 三点法

三点法是当已知某指标在一定的范围内与被测元素在饲料中的含量呈线性关系时,取 $x=0$ 和在此范

围内的任意点分别测定参比标准物和待测物的反映量 Y ,由此作出的两条直线的斜率比来计算被测物质的相对生物学利用率。这种方法设定含量梯度仅为两个,试验简单,但必须有足够的前提条件做保证。

2.2.3 标准曲线法

标准曲线法是用不同梯度的标准源作标准曲线,选线性回归范围内的一点做为被测样品的试验点,制作被测样品的线性方程,同样根据两条直线的斜率比来计算被测源的生物学利用率。

2.2.4 平均值比法

平均值比法适用于两种或多种微量元素作比较,但缺乏共同的对照点($x=0$)时,可选用反映指标平均值相比的方法。当添加元素占饲料中该元素的主要比例时,该法精确度高;如果占的比例很少时,则意义不大(Littell 等,1995)。

2.3 同位素法

1896 年人类就发现了天然放射性核素,1924 年 Gorge De Hevesy 第一次将放射性同位素应用于动物研究,但直至 20 世纪 50 年代,放射性同位素法才广泛应用于动物代谢和临床研究^[27,28]。放射性同位素法是通过测定标记矿物元素在体内组织中的贮存含量来测定矿物元素生物学利用率。这种方法可以反映微量元素在体内的分布情况,主要优点表现为:①灵敏度高,放射性的检测水平可达 10^{-18} ~ 10^{-19}g ,而普通化学分析法的灵敏度只有 10^{-12}g ;②可以在整体正常生理条件下进行研究;③操作简单,样品可直接测定,不需要繁琐的前处理;④放射性核素的引入量低,比较接近动物体正常的生理状态;⑤试验期大大缩短。放射性同位素法大大提高了试验的准确性,平衡试验中若引入放射性同位素,可以测定锌的真吸收率。Judith^[29](1986)采用 ^{65}Zn 平衡试验测定了老年人锌的真吸收率为 17%;而年轻人为 31%。Weigand^[30](1980)给大鼠每千克体重饲喂 56~141mg 范围的 6 个水平锌,发现锌的真吸收率随锌水平的升高而增加。从理论上讲该法最理想,但要求一定的设备,饲料成本也高,虽然在测定饲料原料中矿物元素生物学利用率方面应用广泛(O'Dell, 1984,1985),但在有机微量元素生物学利用率测定方面应用不多,只有 Hill 等(1987)利用肠灌注法测定了蛋氨酸锌对鸡和猪的生物学利用率,这可能与有机微量元素添加剂在普通饲料中测吸收率的准确性不高有关。将同位素法与其它试验方法结合起来,可更准确的研究微量元素的吸收、利用和影响因素,总结前人的研究方法,可将同位素法分为体外法和体内法两类。

2.3.1 体外法

体外法主要有两种:外翻肠囊法和小肠刷状缘膜微粒(Brush Border Membrane Vesicles, BBMV)法。

2.3.1.1 外翻肠囊法

外翻肠囊技术是在体外培养肠环技术上发展而来的,即从活体取出将要研究的肠段,分割成不同的片段,将各片段外翻做成囊状物,放入培养液中培养一段时间后,取出放进装有被测物的烧瓶中,观测肠道粘膜、浆膜及肠体中被测物的变化^[31]。由于同位素法的应用,才使应用外翻肠囊技术研究成为可能。Manis 和 Schachter (1962)首次用外翻肠囊技术研究了小肠对铁的吸收。Hopping^[32](1963)用此技术研究整合剂对⁵⁹Fe被大鼠吸收和在体内分布的影响后指出,外翻肠囊技术是研究铁吸收的一种有效方法。Emes (1975)采用外翻肠囊技术研究了大鼠小肠锌最大吸收部位。Seal^[33](1983)则用该方法研究了锌吸收的影响因素。该方法操作简单、快速且耗费低,能详细地观察到元素进出肠粘膜的变化规律,从而使人们能够深入地了解微量元素在小肠内被吸收的特点。但该方法是在没有血液供应的非正常生理条件下进行的,肠粘膜没有营养供应,试验结果只能表示摄入而非吸收。我们不可能完全模拟体内的生理条件进行培养,因此,此时小肠的功能不能正常发挥。

2.3.1.2 小肠刷状缘膜微粒 (Brush Border Membrane Vesicles, BBMV)法^[34]

该法是将所研究的肠段取出后,轻轻刮下粘膜,经离心等一系列的处理得到刷状缘膜微粒,刷状缘制品的纯化程度可通过蛋白和特殊酶活的测定来判定。刷状缘制品在培养液中培养一段时间后,快速过滤,通过测定滤纸上的放射性元素来估测刷状缘对微量元素的摄入。Menard (1983)应用该技术研究不同锌浓度下,锌的摄入及体内锌贮对刷状缘膜锌吸收的影响,发现锌的吸收在 0.2mmol/l 时是饱和的,在 1mmol/l 时是不饱和的。刷状缘锌转运系统受动物体内锌贮的影响。

2.3.2 体内法

根据被测元素的引入方法,可以将体内法分为两类:一类是直接采食或通过胃管引入;另一类是小肠灌注,前者主要用于人的研究。Wastney (1986)应用该方法,通过测定粪尿、血液、肝器官等中同位素的放射性,研究了人对锌的代谢动力学模型及血液锌池的大小。据报道,通过精确计量的采食或胃管给研究对象投入含Fe的食物,然后测定同位素的全身计数(whole-body counting)、血液及某些器官中同位素的放射性,

同时监测一些血液学指标和肝脏、脾脏等器官总铁浓度,以评价人对铁的吸收利用情况^[35]。

原位结扎灌注技术是指将动物麻醉后,打开腹腔,将试验肠段两端结扎,肠段中引入被测元素灌注液,一段时间后,通过测定被测元素的消失率,结扎肠段粘膜上被测元素的放射性,血液组织器官中元素的放射性来估计被测元素的吸收、转运和利用。Darrell (1965)在其研究中详细描述了该技术。由于其具有试验期短(几分钟至几小时)、操作简单、在动物体内进行等特点,该技术得到研究者的广泛应用^[36]。

2.4 细胞培养技术

细胞培养是指人为地从体内取出细胞,模拟体内生理环境,在无菌、适当温度和一定营养条件下,使细胞能够继续生存、生长、繁殖并维持结构和功能的实验技术。运用细胞培养进行研究有其独特的优点^[4,34]:①离体培养细胞脱离了有机体复杂的环境因素的影响,可以很方便地控制试验条件,进行单因子测试;②细胞均质,类型单一,对外界影响的反应一致;③可供比较不同因素或同一因素不同剂量对同一种细胞的作用;④细胞可直接暴露在预测试剂中,细胞发生的变化可以直接被观测,及时反映出来。

尽管细胞培养技术有很多优点,但在人工培养环境下的细胞反应和体内细胞环境相比毕竟有很大差异,所以不应视为与体内细胞完全一样。国外研究者将细胞培养与同位素示踪技术有机结合用于研究,已经获得成功。有研究者利用CACO-2细胞(A human colonadenocarcinoma cell line)在有牛胎儿血清存在的条件下,研究了锌的摄入和跨细胞运动,结果表明,锌在细胞两侧跨细胞速度不一样,顶膜(Capical)锌摄入是非饱和的,而基底侧(basolateral)对锌的摄入是饱和的^[37]。近年来,由于我国细胞生物学技术发展迅速,同时借助于同位素示踪技术,使得将细胞培养技术用于动物营养研究中成为可能。但是,关于这方面的报道甚少,分析其原因可能是技术含量要求高,要求的试验仪器昂贵、费用大等,所以,到目前为止还很难推广应用。

综上所述,研究矿物质微量元素生物学效价技术具有多样性,因此,所需条件也各不相同。鉴于此,研究者应根据自身的研究目的和所具备的试验条件来选择试验方法。近年来,结合放射性同位素示踪技术是研究微量元素在动物体内吸收利用、分布特点及影响因素行之有效的方法。但是,同位素示踪技术要求测试设备昂贵,标记物来源有限,还有安全问题等,使其利用受到限制。但随着科学技术的发展,综合性学

科的出现以及各国研究者坚持不懈的努力,在不久的将来,必将克服这些缺点,使之得到更广泛的应用。必将研究出具有操作更简单、结果更准确、费用更低廉等优点的测定微量元素生物学效价的方法。

3 影响微量元素吸收利用的因素

近年来,人们对影响微量元素吸收利用的因素进行了大量的研究和探讨。借助于一些新技术(如同位素示踪技术、组织培养技术、细胞培养技术)和手段(放免分析),人们对影响微量元素吸收利用因素的研究进展迅速,归纳起来主要有饲料方面、动物自身方面、评定指标的选择和微量元素的化合物形式方面。

3.1 饲料方面

饲料中矿物质微量元素的含量,还有日粮中的某些成分都会影响微量元素的吸收利用。总结多年来的研究成果,可以把影响因素分为两类——抑制剂和促进剂。抑制剂如纤维素、植酸、某些矿物元素、某些抗营养因子(单宁、棉酚等)。有研究报道,粗纤维与锰的利用率呈明显的负相关。一般来说,随着植酸水平的提高,肉仔鸡对锰吸收水平显著下降。李杰(1992)试验指出,饲料中植酸水平为 0.8% 时,足以使全鸡及胫骨中锰含量极显著下降。饲料中某些矿物元素,如铜、锌、锰和钴由于与铁具有相似的生理生化特性,通过吸收结合位点的竞争,影响铁的吸收(Underwood, 1977)。在动物机体内,微量元素铜在铁的代谢过程中起着非常重要的作用^[38]。饲料中有些成分对铁的吸收利用起促进作用,如抗坏血酸(VC)、维生素 A、蛋白质及其降解产物、某些氨基酸、某些有机酸和糖类等。研究者早在六、七十年代就已经发现氨基酸和小肽具有促进锌吸收的作用。较为一致的看法是:氨基酸或小肽可与锌在小肠中形成可溶的锌-氨基酸螯合物或锌-小肽络合物,该物质在肠段中不受植酸等因素的影响,并能以氨基酸和小肽的吸收模式转运,提高了锌的利用率。

3.2 动物自身方面

不同种类动物对矿物质微量元素的吸收利用差异很大。Schricker (1981) 在研究中发现,向日粮中加入 VC 显著提高人对铁的吸收利用,而大鼠表现的没有那么明显。Elliott(1977)研究报道了大鼠和仔猪之间铁吸收利用的差别很大。同种动物不同品种间、同品种不同性别间对铁吸收利用无明显差异^[39]。有资料证实,动物体内铁的营养状况不同,铁的吸收利用情况也不同;另外,动物的胃肠道环境也影响铁的吸收。动物的不同生长阶段对微量元素利用也有影响,据报道,蛋氨酸锌对肉鸡的生长具有一定的促进作用,主要表现在试验的前期^[40]。

3.3 评定指标的选择

大量的试验对微量元素的生物学效价的敏感指标进行了研究,不同研究者采用的指标各异,主要有生产性能指标(日增重、采食量和饲料转化率)、骨骼发育(胫骨)指标、血清指标(血清中无机锌的浓度、碱性磷酸酶活性、ALP、血清锌结合不饱和率)、外观指标等^[41]。

生长速度是早期评定微量元素利用率的最基本指标,但为非特异性指标。在测定时通常需要使用纯合或半纯合饲料,不仅成本高,而且测定结果不一定适合含有天然原料的实用饲料^[42]。近年来出现的大剂量添加微量元素法使添加量远远超过了动物的生理需要量,使生长速度作为微量元素利用率评定指标的准确性更低。特定敏感组织中的矿物元素积累是用斜率比法评定微量元素化合物生物学利用率时最常用的评定指标。许多学者在纯合、半纯合饲料中添加低含量微量元素,以组织或血液中该元素的含量评定了有机锌^[43]、有机铜相对于无机硫酸盐的相对利用率。微量元素在体内的代谢途径和功能不同,特异性敏感指标也不同^[44]。以往的研究表明,采用不同的指标,所得的结果也不同。因此,评定指标的选择对于评价微量元素的生物学效价特别重要。

3.4 微量元素的化合物形式

微量元素在饲料中的添加形式一般有 3 种:无机态、有机酸、氨基酸和蛋白质络合物形式。以锌元素为例,锌在体内主要以有机结合态进行吸收、转运、储存和利用。无机锌只有转化为有机态,才能被机体利用。因此,无机锌的生物学效价取决于其转化成有生物活性的有机锌的能力。目前研究最多的是氨基酸螯合锌。Lowe(1996)报道,螯合锌由于其独特的结构,与无机锌的吸收机制可能不同。Wedekind^[45]的试验表明,与硫酸锌(100%)相比,根据日粮的复杂程度,蛋氨酸螯合锌的生物学效价在 117%~206% 之间。其它元素关于这方面的报道也很多。但就目前而言研究最多的还是氨基酸螯合物,今后随着技术的成熟,这种方法必将得到广泛的应用。

4 小结

随着科学技术的快速发展,饲料中矿物质微量元素生物学效价的评定方法趋于一致,研究的结果也呈现出一致性,但由于某些因素的存在往往还有一定的差异性。今后的研究应着重分析哪些因素是重要的以及找到最合适的评定体系。也许人们可以从细胞水平和分子水平的研究中为饲料中矿物质微量元素生物学效价的评定找到理想的答案。

参考文献

- 1 陈代文. 饲料添加剂手册[M]. 四川:四川科学技术出版社,1997.2

- 6~28
- 2 董晓慧,韩友文,周桂莲,等.不同锌源生物学效价的研究[J].动物营养学报,2004,16(3):21~23
 - 3 许振英.单胃动物对不同来源锌利用的研究[J].东北农学院学报,1993,2:122~136
 - 4 董晓慧.氨基酸螯合锌吸收、转运特点和影响因素的研究[D].东北农业大学学位论文,2001
 - 5 苏振刚.氨基酸螯合锌对肉鸡生物学效价及对生产性能和免疫功能的影响[D].四川:四川农业大学学位论文,2004
 - 6 闫立新,李华周,刘军,等.不同锌源对雏鸡的生物学效价[J].山西农业大学学报,1999(3):250~251
 - 7 张显东,单安山.不同锌源生物学效价的研究进展[J].饲料博览,2004(10):30~32
 - 8 Wedekind K J, Hortin A E, Baker D H. Methodology for assessing zinc bioavailability: Efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate, and zinc oxide[J]. Anim. Sci., 1992(70):178~185
 - 9 汤莉.不同形态锰源和铁源对肉仔鸡相对生物学利用率的研究[D].武汉:华中农业大学学位论文,2004
 - 10 周桂莲,韩友文,徐子伟,等.不同铁源生物学效价的研究[J].动物营养学报,2002,14(2):47~56
 - 11 Littell R.C., P.R. Henry, A.J. Lewis, C.B. Ammerman. Estimation of Relative Bioavailability of Nutrients Using SAS Procedures [J]. Anim.Sci., 1997(75):2 672~2 683
 - 12 冯兴军,单安山,张晶.不同铜源生物学效价及其影响因素[J].饲料博览,2004(12):24~26
 - 13 罗绪刚,苏琪,黄俊纯,等.肉仔鸡实用饲料中锰的适宜水平的研究[J].畜牧兽医学报,1991,22:313~317
 - 14 罗绪刚,苏琪,黄俊纯,等.锰对肉仔鸡血红蛋白浓度等的影响[J].中国家禽,1991(4):6~7
 - 15 张瑞强.微量元素与动物免疫的研究进展[J].动物科学与动物医学,2002,19(12):10~11
 - 16 赵剑.氨基酸螯合微量元素对南江黄羊生产性能、身体性状和肉品质影响的研究[D].四川:四川农业大学学位论文,2002
 - 17 Cao J, P.R. Henry, R. Guo et al. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants[J]. Anim. Sci., 2000(78):2 040~2 052
 - 18 Hahn J. D. Growth and plasma zinc responses of young pigs fed pharmacologic levels of Zinc [J]. Anim. Sci., 1993(71):3 020~3 024
 - 19 Cao J. Luo X.G. Effect of dietary iron concentration, age, and length of iron feeding on feed intake and tissue iron concentration of broiler chicks for use as a bioassay of supplemental iron sources [J]. Poultry Science, 1996(75):496~502
 - 20 Fly, A. D, O. A. Izquierdo, K. L. Lowry et al. Manganese bioavailability in a manganese-methionine chelate[J]. Nutr. Res., 1989(9):901~910
 - 21 李建平,单安山.硫的生物学效价[J].饲料研究,2004(3):19~22
 - 22 尹兆正,洪建伟,李肖梁,等.日粮不同无机磷源在肉雏鸡体内生物学效价的比较研究[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2002,28(5):565~568
 - 23 尹兆正,王忠良,潘根长,等.不同化学形式的无机磷源在肉雏鸡体内生物学效价的研究[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2002,28(1):74~77
 - 24 Nelson T S, Walker A C. The biological evaluation of phosphorus compounds [J]. Poultry Sci., 1994(64):43~47
 - 25 Potter L M. Bioavailability of phosphorus from various phosphates based on body weight and toe ash measurement [J]. Poultry Sci., 1988(67):96~102
 - 26 Cheng J, Kornegay E T, Schell T. Influence of dietary lysine on the utilization of zinc from zinc sulfate and zinc-lysine complex by young pigs[J]. Anim. Sci., 1998,76(6):1 064~1 074
 - 27 商照荣.同位素示踪技术在畜牧研究中的一些新进展 [J]. 农学报,1992(4):194~197
 - 28 李丽立.同位素示踪法在动物营养添加剂中的应用 [J]. 中国饲料,1997(20):21~22
 - 29 Judith R Turrnlund. Stable isotope studies of zinc absorption and retention in young and elderly men [J]. Nutr., 1986,116:1 239~1 247
 - 30 Weigand E. Total true efficiency of zinc utilization: determination and homeostatic dependence upon the zinc supply status in young rats [J]. Nutr., 1980(110):469~480
 - 31 Willson T.H, Wiseman G. Intestinal absorption. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface [J]. Physiol., 1954(6):123~116
 - 32 Hopping J.M., Ruliffson W.S. Effects of chelating agents on radio-iron absorption and distribution in rats in vivo. Am [J]. Physiol., 1963,205(5):885~889
 - 33 Seal C J, Heaton F W. Chemical factors affecting the intestinal absorption of zinc in vitro and in vivo Br[J]. Nutr., 1983(50):317~323
 - 34 周桂莲.氨基酸螯合铁的营养作用机理和相对生物学效价[D].东北农业大学学位论文,2000
 - 35 Maxton D.G., Thompson R.P. Absorption of iron from ferric hydroxypyranone complexes[J]. Nutr., 1994(71):203~207
 - 36 Simpson R.J. Dietary iron levels and hypoxia independently affect iron absorption in mice.[J]. Nutr., 1996(126):1 858~1 864
 - 37 Finley W John. Zinc uptake and transcellular movement by CACO-2 Cell: studies with media containing fetal bovine serum [J]. Nutr. Biochem., 1995(6):137~144
 - 38 Evans J L, P.A. Abraham. Iron Storage and Ceruloplasmin in Copper Nutrition in the Growing Rat[J]. Nutr., 1973(103):196~201
 - 39 Elliott J.G, Gorman L.A. Iron bioavailability methodology: comparison of rat and pig models[J]. Federation Proc., 1977(37):1 180~1 182
 - 40 闫素梅,郝永清.日粮锌水平对肉鸡组织锌浓度及其生产性能与免疫功能的影响[J].饲料工业,2002,23(12):24~27
 - 41 王代刚.酵母菌富集微量元素锌酵母锌生物学效价的研究[D].四川:四川农业大学学位论文,2004
 - 42 李素芬.有机锰源的化学特性及其对肉仔鸡的相对生物学利用率研究[D].北京:中国农业科学院学位论文,2002
 - 43 Pimentel J L, M. E. Cook, J. L. Greger. Research note: bioavailability of zinc supplementation for chicks[J]. Poult. Sci., 1991,70:1 637~1 639
 - 44 李素芬,罗绪刚,刘彬.动物有机微量元素利用率研究进展[J].中国畜牧杂志,2000(36):51~53
 - 45 Wedekind K.J. Methodology for assessing zinc bioavailability: efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate and zinc oxide[J]. Anim.Sci., 1992(70):178~187

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

植酸酶磷当量的研究进展

姜洁凌 贺建华 邓近平 钟宁

植酸酶作为一种新型饲料添加剂在饲料工业中的应用已经有多年的历史,随着绿色环保型饲料产品的不断开发和矿物磷资源锐减,人们对如何高效合理地利用饲料原料中的磷提出了更高的要求。到目前为止,植酸酶能够提高饲料磷利用率、改善动物生产性能已经得到了公认。但是植酸酶受环境中各种理化因素影响较大,而市场上各种此类产品加工工艺不同,质量控制有异,更何况人们对植酸酶酶活效价评定过程中的各种标准还存有争议,因此,植酸酶的实际使用效果尚难尽如人意,生产过程中有关植酸酶应用失败的报道也屡见不鲜。本文通过综合资料分析,对饲养过程中出现的有关问题作一探讨。

1968年,Nelson首次将植酸酶应用于动物饲料中,发现它对动物的生产性能和磷利用率有促进作用。此后,人们对植酸酶的理化性质及在饲料中的应用效果进行了大量研究,并取得一系列成果。然而,在植酸酶的实际应用方面,由于植酸酶的活性受到多种因素(如日粮中钙、磷含量及两者比值和日粮结构等)的影响,再加上所采用的评价指标不一样,因此,植酸酶的应用效果在不同研究结果间缺乏可比性,这就给一定条件下植酸酶最适添加量的确定带来了困难,从而大大限制了它的应用。为了解决这一问题,近年来有研究者提出了植酸酶磷当量的概念,即特定条件下,针对某一评价指标一定量植酸酶所能取代的外源无机磷添加量(Yi,1996)。这一概念的核心是在植酸酶与无机磷之间针对某一指标建立的数学关系式,根据这一关系式人们可以确定特定条件下所需添加的植酸酶量或可以取代的无机磷量。从植酸酶磷当量的定义可以看出,它实际上是间接反映植酸酶活性的一个参数。因此,所有影响植酸酶活性的因素都会对植酸酶磷当量值的大小产生影响。由于不同组成日粮中钙、有效磷含量及它们的比值,内源性植酸酶活性及植酸磷含量等存在差异,而这些因素对外源植酸酶的活性又会产生很大影响(Qian,1996;Yi,1996;Harper,

1997)。因此,在相同条件下不同结构日粮中植酸酶的磷当量值是不一样的。

1 关于植酸酶磷当量值确定的方法

分别设计系列浓度梯度的无机磷酸和植酸酶日粮,然后分别针对不同指标建立各自的回归方程,经统计学检验后选取相关性强的指标作为建立回归方程的标准,最后从以无机磷为基础建立的标准曲线和以植酸酶为基础建立的曲线中读出某一指标值所对应的无机磷量和植酸酶量,此无机磷量即该实验条件下针对某一指标的植酸酶磷当量值。一般情况下取针对不同指标磷当量值的平均值作为该条件下植酸酶的磷当量值。

易治雄等(1995)统计了不同学者在仔猪、雏鸡和火鸡上的一系列试验数据,通过以下方法研究植酸酶的磷当量:即饲予不同水平的磷与植酸酶,然后将各个测定指标,诸如生产性能、磷的表观吸收率或沉积值以及骨组织特性等数据建立线性或非线性回归方程,其数学模型为: $Y=a+bx$ (线性)、 $Y=a(1-be^{-kx})$ (非线性)[其中: Y 为测定指标,如增重; X 为无机磷(g/kg)或植酸酶(U/kg)的添加量]。因为动物饲喂无机磷的反应方程与饲喂植酸酶的反应方程左边的 Y 为同一测定指标,因此,可将两个方程合并为同一个方程再计算其替代值,比如饲喂4水平的磷,其增重反应为:

$$Y_g = 705.9 \times (1 - 0.150e^{-0.991X_1}) \quad (1)$$

饲喂4水平的植酸酶,其增重反应为:

$$Y_g = 775.8 \times (1 - 0.232e^{-0.0005X_2}) \quad (2)$$

将方程(1)与(2)合并,即为 $705.9 \times (1 - 0.150e^{-0.991X_1}) = 775.8 \times (1 - 0.232e^{-0.0005X_2})$ 。设 $X_2=500$ U/kg,那么, $X_1=0.45$ g/kg。即以增重为测定指标,每千克饲料中添加500U的植酸酶可替代0.45g的无机磷,然后将同一试验的不同指标的计算值归纳为一个平均值。随着饲料中添加的植酸酶水平增加,其替代值呈非线性递增。但每100U的植酸酶的相对效率则下降,其下降幅度在700~800U后趋于平缓。基于现有资料,在饲喂仔猪、雏鸡和火鸡的玉米-豆饼型饲料中,要替代1g无机磷约需要500、800、600U的植酸酶。其中,以雏鸡的资料最为丰富,且数据均匀一致,因此也最可靠。其替代函数为 $Y=1.554 \times (1 - 0.996e^{-0.002X})$,其中, Y 为无机磷的替代值(g/kg); X 为植酸酶的添加量(U/kg)。

姜洁凌,湖南农业大学动物营养研究所,410128,湖南长沙。

贺建华(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

邓近平、钟宁,湖南农业大学。

收稿日期:2006-03-06

2 植酸酶的磷当量研究进展

2.1 植酸酶活性与磷当量之间的关系

植酸酶可在一定程度上将植酸磷降解为单胃动物能够吸收的有效磷形式,所以植酸酶可认为是一种“磷资源”。酶活性就是指酶催化其底物能力的大小,通常用活力单位来表示。人们对植酸酶活力的定义有多种,目前国际上通用的植酸酶活力定义为:37℃及pH值5.5的条件下,1min内从5.1mmol/l的植酸钠溶液中水解1 μ mol无机磷所需要的酶量为一个活力单位。所谓当量关系就是不同物质之间针对某一共同性质在数量上的一种等效关系。就植酸酶的磷当量而言,其实质就是日粮中一定量外源植酸酶所能替代的无机磷添加量(Jongbloed,1992;Yi,1996)。由于植酸酶的功能是水解植酸,释放其中的磷酸基团,因此,植酸酶磷当量值的大小实质上就是它活性高低的间接体现。植酸酶活性越高,它可从植酸中释放出的无机磷量越多,磷当量值就越大;而活性越低则磷当量值越小,它们之间呈一种正相关性。由此可知,一切影响植酸酶活性的因素都会对它的磷当量值产生影响。

2.2 不同研究结果之间的差异性

近年来,人们对植酸酶的磷当量进行了一些研究,但不同研究结果间存在一定差异。如Cromwell等(1993b)的研究显示,日粮中添加1 000U/kg的植酸酶能够将饲料中1/3的植酸磷降解为可利用的形式,此外,玉米-豆粕型日粮中总磷的生物效价也因植酸酶的添加而增加了45%。Simons等(1990)以肉鸡为研究对象,考查了玉米-豆粕型日粮中植酸酶的“磷当量”,即用植酸酶代替单钙磷酸盐中的磷,0~2周的试验结果显示,在饲料中添加250FTU/kg植酸酶相当于添加0.5g/kg单磷酸钙盐中的磷或0.4g/kg有效磷。Kemmer等(1997)报道,在饲料中使用500FTU/kg商业植酸酶,能够分别代替生长和育肥期猪日粮中的0.066%和0.083%的磷。也有学者同时研究植酸酶对猪和鸡的日粮中磷的当量效果(Augspurger等,2003)发现,在青年猪饲料中添加400FTU/kg的植酸酶相当于添加0.081%的磷;在鸡的试验中,添加500FTU/kg的植酸酶相当于添加0.033%的磷。Simons等(1990)的研究结果显示,生长猪日粮中,添加1 000FTU/kg的植酸酶相当于添加0.086%的磷,而添加1 000FTU/kg的植酸酶在鸡日粮中相当于添加0.057%的磷。产生差异的主要原因是影响植酸酶活性的因素很多,而且这些因素之间还存在复杂的相互作用关系,因此,导致不同研究间植酸酶的活性高低不一样。研究表明,与植酸

酶磷当量密切相关的因素包括日粮结构,日粮中钙、磷水平和它们的比值以及消化道pH值等(Qian,1996;Harper,1997;Han,1997;Knowlton,2004)。目前,国外针对植酸酶磷当量的研究大多以玉米-豆粕型日粮为基础,探索不同钙、磷水平及比值对它的影响(Lei,1993a,b;Qian,1996;Yi,1996;Happer,1997;Gentile,2003),相对而言,对其它因素与磷当量之间关系的研究就要少得多。因此,探索适合我国特定条件下的植酸酶磷当量值就显得尤为必要。

2.3 影响植酸酶磷当量的因素

2.3.1 日粮结构与植酸酶活性之间的关系

在玉米-豆粕型日粮中以生长性能和磷表观消化率为评价标准时,250、500、750、1 000U/kg植酸酶使猪对植酸磷的利用率分别为40%、64%、83%、93%(Yi,1996);但在半纯合日粮中,250、500、1 000U/kg植酸酶针对骨强度的磷利用率分别为14%、22%、43%(Cromwell,1993a);针对骨灰分含量以及钙、磷沉积量的磷利用率分别为15%、42%和57%(Hoppe,1993)。此外,Cromwell(1993a)还发现,1 000U/kg植酸酶在单一来源型日粮(日粮中所有磷来源于同一种原料)与多来源型日粮中磷的利用率分别是32%和25%;他的另一个研究结果表明,低磷玉米-豆粕型日粮中添加250、500、1 000U/kg植酸酶分别使磷的表观消化率提高30%、80%、90%(Cromwell,1995)。然而在高粱型日粮中添加400、800、1 200、1 600U/kg植酸酶分别使磷的利用率提高100%、140%、270%、280%(Veum,1996),这说明不同日粮结构对植酸酶的磷释放能力产生一定影响。产生这种差异的原因可能是因为不同日粮结构中磷的利用率存在差异。研究发现,在高粱型日粮中,生长育肥猪对磷的利用率为8.4%(Veum,1996),而在豆粕型日粮中磷的利用率为28.7%(Harper,1997)。Kornegay(1998)通过比较后发现不同基础日粮中磷的吸收率在8.4%~63%之间变动,不同结构日粮中磷吸收率的差异可能与日粮中内源植酸酶活性、植酸磷含量以及钙磷比等因素有关(NRC,1998)。此外,不同地区饲料原料中植酸磷以及植酸酶含量上的差异也可能是导致植酸酶磷当量值不一样的一个原因,因为日粮中植酸磷的量相对不足,外源植酸酶对它的降解速度就会出现不同程度的下降(Knowlton,2004)。

2.3.2 钙、磷水平以及钙磷比与植酸酶磷当量之间的关系

日粮中钙、磷水平是影响植酸酶活性的重要因素

之一。由于高钙和磷形成不溶性盐,且高钙能够和植酸形成螯合物,不利于植酸酶的作用,因此,日粮钙过量会降低植酸酶的活性和效率(Wise,1983;Fisher,1992)。Lei(1994)就仔猪日粮中钙水平与植酸酶磷当量之间的关系进行了研究,结果表明,高钙日粮(0.8%)中植酸酶的活性显著低于低钙日粮(0.4%)组,具体表现在猪的平均日采食量、平均日增重、血浆磷和钙浓度以及碱性磷酸酶活性等指标上。Mohammed(1991)的研究也得到了类似的结果,他们发现,当加酶日粮中钙水平从1.0%下降到0.5%时,畜禽对植酸磷的利用率提高15%。上述研究结果表明,日粮中植酸酶的活性与钙水平成负相关。钙水平影响植酸酶磷当量值可能与下列3个原因有关:①它和植酸形成植酸钙或钙-植酸-蛋白质复合物,从而抑制植酸酶对植酸的水解作用(Wise,1983;Nelson和Kirby,1987;Fisher,1992;Zyla K,2001);②钙可以和磷形成不溶性复合物,日粮中高水平钙易于降低磷的吸收,尤其是当日粮中磷含量低于需要量时更是如此(NRC,1998);③高 Ca^{2+} 浓度还可通过引起消化道中pH值升高,多余 Ca^{2+} 竞争植酸酶活性中心位点等方式来抑制植酸酶的活性(Wise,1983;Lei,1984;Pointillart,1985)。

同时有报道指出,在高磷日粮中额外添加植酸酶会有改善动物生长性能的趋势。但Singh等(2003)通过研究证明,高浓度的非植酸磷日粮中添加植酸酶效果不明显,主要原因可能是反馈机制抑制了植酸酶的活性。Campbell(1992)研究表明,相同量的植酸酶在不同磷水平下对猪的作用不同,低磷(0.18%)可提高增重17%,而当日粮中可利用磷达0.54%时,仅提高日增重7.8%。Qian等(1997)发现,日粮中钙与总磷比值是影响植酸降解和提高日粮中磷和钙利用率的重要因素,如果钙总磷比值从2.0:1下降到1.2:1时,可使植酸酶的作用增加16%,提高钙、磷的消化率和血浆钙水平,增加骨骼强度,改善生长性能。此外,Lei(1993a)和Simons(1990)等对育肥猪的研究结果也表明,低磷日粮(0.40%)中添加750U/kg或1000U/kg植酸酶分别使饲料中磷的消化率提高23%和24%,相当于释放出0.1%的无机磷。Lei(1994)等证明日粮中钙磷比值从1.5:1提高到3.0:1时,断奶仔猪的平均日增重明显下降。Liu(1997)研究了日粮中不同钙磷比与含植酸酶日粮中磷的表观消化率之间的关系发现,钙磷比在1.5:1~1:1时,日粮中磷在小肠中的表观消化率随比值的减小而上升,呈明显线性

关系,当比值减小到1:1时达到最佳;与对照组(含钙0.6%、磷0.5%)相比,低磷日粮(总磷为0.39%)中添加500U/kg植酸酶在改善生长猪的生产性能和血清磷水平方面与添加1.1g无机磷具有相同的效果,而在育肥猪中大约相当于0.8g无机磷。同样,Qian(1996)对断奶仔猪的研究也得到了相似的结果,在比较了日粮中不同钙磷比及磷水平对植酸酶活性的影响后发现,钙磷比在1.2:1~2.0:1之间时,植酸酶的活性随钙磷比的增加而下降,呈线性关系,当钙磷比从2.0:1下降到1.2:1时,酶活性大约增加16%;而且钙磷比对植酸酶活性的影响随日粮中磷含量的下降不断增强,这主要表现在仔猪的生产性能,磷的表观消化率以及血清和骨中钙、磷的含量等显著下降等方面。此外,Liu(1996)进一步研究了育肥猪中钙磷比与植酸酶磷当量之间的关系发现,低磷日粮(总磷0.39%,含有效磷0.07%)中钙磷比从1.5:1下降到1:1时,植酸酶使育肥猪的平均日增重和肉料比、血清钙和磷水平、肋骨灰分含量显著提高,对磷的表观消化率提高20%以上。因此,不同研究间的植酸酶磷当量值差异可能与日粮中钙磷比值的不同有关(Veum,1996;Helander,1994)。钙与总磷比值对日粮中植酸磷利用率的影响主要与它可以直接影响植酸酶的活性(Wise,1983)和与植酸形成不溶性复合物有关(Beers,1992)。

综上所述,日粮中钙、磷含量及比值能对猪的不同生长阶段植酸酶的无机磷置换能力产生显著影响,这可能与钙可以和日粮中的植酸形成复合物,从而影响后者的降解或钙可以直接抑制植酸酶的活性有关(Wise,1983;Lei,1984;Pointillart,1985;Zyla K,2001)。

2.3.3 有机酸与植酸酶磷当量之间的关系

在乳猪饲料中添加一定比例有机酸是当前的一种普遍做法。有机酸可以稳定消化道中的pH值,从而促进有益菌群生长(特别是乳酸杆菌等),同时抑制有害菌的繁殖。此外,部分研究者认为饲料中添加有机酸还可改善植酸酶的活性。玉米-豆粕型日粮的pH值一般在6左右,而微生物植酸酶2个酶活性峰的pH值分别为2.5和5.5左右,因此,有机酸的添加还可以提高日粮中植酸酶的无机磷释放能力。除此之外,有机酸还使食糜pH值下降,从而引起它在胃内的停留时间延长,这样便增加了植酸酶的作用时间。Han(1998)研究发现,日粮中添加300U/kg植酸酶可使断奶仔猪的平均日增重达到和添加0.2%无机磷酸相同的效果,但血磷浓度和肉料比却明显低于无机磷

酸组,当在饲料中进一步添加有机酸(1.5%柠檬酸)时,猪对磷的利用率可达到和添加0.2%无机磷酸一样的效果。Jongbloed(1996)等发现,1%乳酸可以使含植酸酶日粮中可消化磷的量增加0.24g/kg。然而,也有部分研究发现,有机酸与植酸酶之间不存在协同作用。Radcliffe(1998)和Yi(1996)等在试验中发现,饲料中添加1.5%和3%柠檬酸不仅不能增加植酸酶的活性,反而使它的活性从370U/kg分别下降为269U/kg和250U/kg。这有可能是由于有机酸的添加使胃内的pH值降低到植酸酶的最适pH值以下,或者胃内pH值的下降提高了其中某些酶的活性以及食糜的滞留时间,从而增加了植酸酶的降解量(Radcliffe,1998;Yi,1996)。由此可见,饲料中有机酸对植酸酶活性的影响因添加的种类和比例不同而不同。添加的比例适当可以提高植酸酶的活性,如果添加的比例过大或它的酸化能力过强,反而会降低植酸酶的活性。从目前已有的研究结果看,柠檬酸的添加量以不超过1.5%为宜。

2.3.4 VD_3 与植酸酶活性之间的关系

VD_3 可以不依赖于钙的运输而单独促进磷的吸收,饲料中添加 VD_3 可以促进机体对磷的吸收。Fontaine(1985)和Pointillart(1985)等发现,在高植酸磷(80%)日粮(含总磷0.6%)中添加1 000U/kg VD_3 可使猪对日粮中植酸磷的利用率提高将近一倍。还有报道称,在低有效磷(0.07%)日粮中添加6 600U/kg VD_3 可以消除高植酸磷含量对鸡生长造成的影响(Mohammed,1991)。进一步的研究表明, VD_3 和植酸酶联合使用可进一步提高日粮中植酸磷的利用率(Lei,1994;Edwards,1993;Biehl,1995)。Lei(1994)研究发现,正常钙水平(0.8%)日粮中 VD_3 的含量从660U/kg增加到6 660U/kg时,可以部分消除高钙水平对植酸酶的影响,其活性恢复到低钙日粮(0.4%)的水平,但将 VD_3 添加到低钙日粮(0.4%)中不能进一步提高植酸酶的活性。上述研究结果表明, VD_3 与植酸酶之间的这种协同作用并不是因为 VD_3 可以提高植酸酶的活性,而是因为它能够促进钙的吸收,钙浓度过高会与植酸形成复合物,从而影响植酸酶对后者的水解或直接抑制植酸酶的活性(Pointillart,1989)。

2.3.5 动物的品种、年龄及生理状态因素

不同动物品种利用植酸磷的效率不同的确切原因还不清楚,但这应该和品种间消化道环境的差异有关。有研究表明,鸡的消化道内源植酸酶分泌量比猪要多(Biehl和Baker,1997),这也许可以作为解释鸡

对玉米中磷的利用率比猪至少高2倍的原因(Crowell,1992;Spencer等,2000)。幼龄动物消化道酶系尚未健全,对外源酶的添加似乎比成年动物更加敏感。但是猪和鸡随着年龄的增加,消化道酶活性也增加。Maenz等(1998)研究了鸡小肠刷状缘膜小泡的植酸磷水解动力学发现,酶的适宜pH值为5~6.5,pH值为6时活性最高,十二指肠酶活性最高,结肠稍低,盲肠仍具酶活性,研究认为,肠道酶活性的表达受到调节机制控制,且对维持磷的营养状态十分重要。除此以外,饲料中植酸酶的添加水平还受到动物的生理状态(断乳、育肥、妊娠或泌乳)的影响。

综上所述,影响植酸酶磷当量值的因素包括日粮中钙、磷含量及其比值,日粮结构、食糜的酸碱度、动物年龄及生理状态等。因此,在比较或参考不同研究中植酸酶的磷当量时,应该注意上述这些指标是否一致。

2.4 针对不同指标时的植酸酶磷当量

植酸酶磷当量的大小与所选用的评价指标有关(Harper,1997)。Harper(1997)等报道,低磷玉米-豆粕型日粮(含总磷0.35%)中添加500U/kg植酸酶,针对生长育肥猪的平均日增重、磷的表观消化率及第10肋骨强度的磷当量值分别为0.64、1.10和1.13g无机磷,取平均值后大约521U植酸酶相当于1g无机磷。其它研究还表明,针对平均日增重、胫骨强度和磷消化率关系(Shih和Hsu,1996),平均日增重、掌骨和趾骨与磷消化率的关系及平均日增重、趾骨强度和磷消化率的关系(Veum,1996),取代1g无机磷的植酸酶量分别为475U/kg、434U/kg和558U/kg。而Jongbloed(1992)和Cromwell(1992)等发现,日粮中添加1 500U/kg植酸酶针对不同指标的植酸磷利用率在9%~59%之间变动。因此,不同研究间植酸酶磷当量值之间的差异可能与所选用的评价指标不同有关。多项研究结果表明,平均日增重、磷的表观消化率及趾骨和第10肋骨强度和灰分含量是评价日粮中磷利用率的敏感指标(Yi,1996;Nasi,1990;Mroz,1994;Beers和Jongbloed,1993),尤其是平均日增重(Cromwell,1993a、b;Lei,1993b、c)和磷表观消化率(Dellaert,1990;Qian,1996)。因此,现在有关植酸酶磷当量的研究大多以这些指标为基础。

近十多年来有关植酸酶磷当量的研究已取得一系列进展,不同研究结果间存在差异,植酸酶的磷当量值大致在0.27~2.47g无机磷之间变动,研究表明,半纯合蛋白日粮中,当可利用磷为0.05%时,500U植

新型饲料添加剂二甲酸钾的合成和应用

钟国清 陈明剑 蒋琪英

摘要 二甲酸钾是一种能替代抗生素的促生长剂,绿色、安全。以甲酸与碳酸钾或甲酸与氢氧化钾为原料,合成了白色晶体二甲酸钾,讨论了物质的量比、反应温度、反应时间对产品收率的影响,产品收率少达83%,纯度98%以上。合成工艺简单,易进行工业生产。

关键词 二甲酸钾;饲料添加剂;合成;应用

中图分类号 S816.7

二甲酸钾的商品名为弗米(Formil),是一种能替代抗生素的促生长剂,2001年被欧盟批准使用,是欧盟批准的第一种用于替代抗生素促生长剂的非抗生素饲料添加剂。使用添加二甲酸钾的饲料可节省养

猪成本,改善猪的健康状况和农场的卫生情况。饲料中添加抗生素能促进动物的生长发育并减少感染细菌的机会,但是残留在畜禽体内的抗生素会对人的身体健康产生不利影响。欧盟已于2006年1月1日起全面禁止在饲料中添加抗生素,因此,二甲酸钾作为能够取代抗生素的新型添加剂将拥有巨大的潜在市场。它在我国已于2005年被农业部批准生产、经营和使用。

二甲酸钾是由2个甲酸根离子和1个钾离子组

钟国清,西南科技大学材料科学与工程学院,教授,621010,四川绵阳市。

陈明剑、蒋琪英,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-04-10

酸酶针对总磷消化率的磷当量为0.83g/kg,而当可利用磷为0.16%时,这一数值为1.10 g/kg。但当以平均日增重和第10肋骨灰分含量为评价指标时,上述植酸酶磷当量值分别为0.80、0.70g/kg和0.56、0.52g(Yi, 1996)。这表明当以生长性能和磷消化率为评价指标时,植酸酶磷当量值要明显高于以骨灰分含量为评价指标,尤其是当有效磷为0.16%时,针对磷消化率的磷当量值(1.10g/kg)达到针对骨灰分含量时的2倍。Radcliffe和Kornegay(1998)也得到了相似的结果,他们发现,以平均日增重为标准时的磷当量值是针对第10肋骨灰分重时对应值的1.4倍。对玉米-豆粕型日粮的研究表明,在低有效磷(0.07%)和高有效磷(0.16%)情况下针对总磷消化率的500U植酸酶,其磷当量值分别为1.19、1.14g/kg;以平均日增重和第10肋骨灰分含量为评价指标时这一值分别为1.66、2.47g/kg和1.65、1.33g(Kornegay和Qian, 1996);以趾骨灰分含量及趾骨强度为指标时的磷当量值分别为0.85、0.27g(Skaggs, 1999)。但在玉米-燕麦-豆粕型日粮中以磷消化率为标准时,500U植酸酶相当于1.32g单钙磷酸盐;以胫骨粗灰分为标准时这一值为1.25g(Harper, 1993)。上述研究结果表明,不同日粮结构中针对不同指标的植酸酶磷当量值是不一样的,如以磷消化率为标准,玉米-燕麦-豆粕型日粮中的当量值是半纯合日粮值的1.2倍。这就提示人们,当日粮结构发生变化时,取代等量无机磷的植酸酶量也是不一样的。

3 植酸酶磷当量研究中存在的问题

尽管植酸酶对改善动物日粮中植酸磷的利用率已经得到人们的广泛认同,但在植酸酶的磷当量值测定方面,目前不同研究间还存在很大差异,这主要是因为影响植酸酶活性的因素很多,包括钙、磷含量及其比值,日粮结构,食糜的酸碱度,动物年龄及生理状态等。虽然近十多年来人们在确定影响植酸酶活性的因子以及定量它们与植酸酶活性之间的关系方面已取得一系列进展,但大多集中在日粮中钙、磷含量及它们的比值与植酸酶磷当量之间的关系方面,而对其它与植酸酶活性有关因素的研究却相对很少,如基础日粮结构是否对植酸酶的活性产生影响,具体影响程度如何;外界的环境条件以及动物的年龄、性别等因素可影响到动物消化道中的生理环境,它们与处于消化道中的植酸酶磷当量之间的关系如何等。值得注意的一点是,由于不同条件下各种指标(如生长性能、磷的表观消化率、血清磷浓度以及骨灰分含量等)反映体内磷吸收状况的灵敏度是不一样的。因此,针对不同检测指标所得到的植酸酶磷当量值也是不一样的。在特定条件下应该选择最敏感指标来建立回归方程,获得植酸酶的磷当量值。基于目前研究的不足,全面系统地确定与植酸酶磷当量有关的因素和定量植酸酶磷当量问题是今后一段时期的主要任务之一。

(参考文献63篇,刊略,需者可函索)

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

成的白色结晶体,化学式为 $\text{KH}(\text{HCOO})_2$,相对分子质量为 130.12,熔点 109°C ,是甲酸和甲酸钾靠分子间力和氢键形成的化合物,具有吸湿性,易溶于水。梁平、石波等曾合成过二甲酸钾。本文在参考了国内外文献基础上,以甲酸和无水碳酸钾以及甲酸和氢氧化钾为原料,通过工艺改进,能在更方便的条件下制得更高产品收率的二甲酸钾,从而降低生产成本。

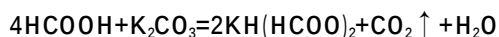
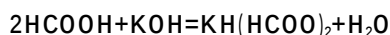
1 材料与方法

1.1 原料与仪器

甲酸(化学纯,88%)、无水碳酸钾(化学纯,98%)、氢氧化钾(分析纯,82%);三颈烧瓶、冷凝管、磁力搅拌器、电炉、真空干燥箱、分析天平。

1.2 原理

甲酸与氢氧化钾按 2:1 的物质的量比或甲酸与碳酸钾按 4:1 的物质的量比在一定温度、时间条件下反应后,通过蒸发结晶,分离、干燥,得到的白色晶体二甲酸钾,母液循环使用,无环境污染。其化学反应方程式为:



二甲酸钾的生产工艺流程见图 1:

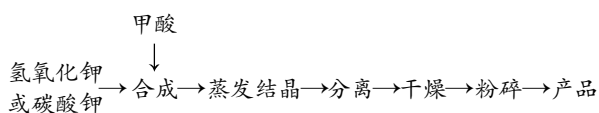


图 1 二甲酸钾合成工艺流程

1.3 合成方法

以无水碳酸钾为原料:在反应器中加入 26.2g 甲酸,搅拌状态下缓慢加入 17.3g 无水碳酸钾,在 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 下使其在磁力搅拌器上搅拌反应 2h,然后蒸发结晶,降至室温,抽滤, 40°C 真空干燥 24h,母液循环使用,得到白色晶体二甲酸钾 26.7g,产品收率 82.58%。

以氢氧化钾为原料:在反应器中加入 26.2g 甲酸,搅拌下缓慢加入 16.8g 氢氧化钾,在 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 下使其在磁力搅拌器上搅拌反应 2h,然后蒸发结晶,降至室温,抽滤, 40°C 真空干燥 24h,母液循环使用,得到白色晶体二甲酸钾 27.3g,产品收率可达 85.3%。

2 结果与讨论

2.1 产品分析

产品中甲酸含量用酸碱滴定法测定:用分析天平准确称取本法制得的二甲酸钾晶体 0.2~0.3g,溶解在 30ml 蒸馏水中,然后用 0.1mol/l 氢氧化钠标液滴定,

酚酞作指示剂,测得甲酸含量为 34.92%,通过理论计算得到的甲酸含量为 35.37%,相当于纯度为 98.7%的二甲酸钾。

2.2 影响产品收率的因素

2.2.1 反应温度对产品收率的影响

在固定甲酸与无水碳酸钾的物质的量比为 4:1,反应时间为 2h 的条件下,改变反应温度,考察不同反应温度对产品收率的影响,结果见表 1。

表 1 不同温度对产品收率的影响

反应温度($^\circ\text{C}$)	20	30	40	50	60
产品收率(%)	75.58	78.43	80.58	82.63	83.12

由表 1 可以看出,随着反应温度的升高,产品收率有所提高。因甲酸沸点为 100.8°C ,当温度高于 70°C 时,甲酸易挥发,产品收率反而会降低。因此,反应温度以 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 为宜,过低的温度不利搅拌混匀。

用甲酸与氢氧化钾做原料,按 2:1 的物质的量比进行反应合成二甲酸钾,其合成条件同甲酸与碳酸钾反应条件类似,但反应中无 CO_2 气体产生,可以减少甲酸的损失,反应更平稳,回收率略高于甲酸与无水碳酸钾做原料的生产。

2.2.2 反应时间对产品收率的影响

甲酸与无水碳酸钾物质的量比为 4:1,反应温度为 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 的条件下,改变反应时间,考察不同反应时间对产品的收率的影响,结果见表 2。

表 2 不同反应时间对产品收率的影响

反应时间(h)	1	2	3	4	5
产品收率(%)	81.40	82.58	82.84	83.03	83.24

由表 2 可以看出,反应时间对产品收率影响较小,主要是由于本反应属于简单的酸碱中和反应,反应较为迅速而剧烈,瞬间即可完成。随着反应时间的增加,产品收率提高减少。反应时间以 2h 为宜。

2.2.3 反应原料物质的量比对产品收率的影响

在 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 下,反应时间为 2h,甲酸与无水碳酸钾不同物质的量比对产品收率的影响见表 3。

表 3 反应原料不同物质的量比对产品收率的影响

物质的量比	2:1	3:1	4:1	5:1	6:1
产品收率(%)	0	38.41	82.58	83.63	84.46

由表 3 可以看出,随着甲酸与无水碳酸钾物质的

量比的增大,产品收率有较大的提高,物质的量比达到 4:1 时对收率的影响不大。因反应中有较易挥发的甲酸,为达到较好收率,甲酸量可适当过量,但不应过多。从生产成本考虑,反应原料物质的量比以 4.1:1 为宜。

2.3 生产设备与投资强度结算

生产设备包括反应釜、离心机、真空浓缩釜、结晶罐、干燥机、粉碎机。

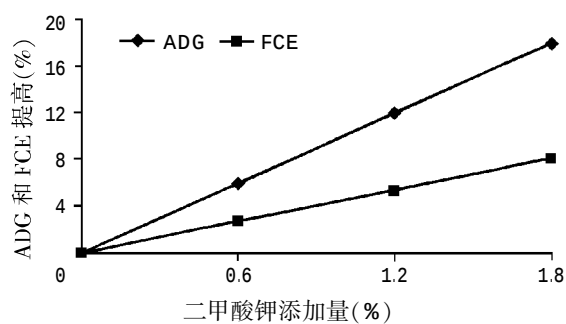
投资强度估算:按年产 300t 产品计算,约需设备投资 120 万元。

3 二甲酸钾的应用

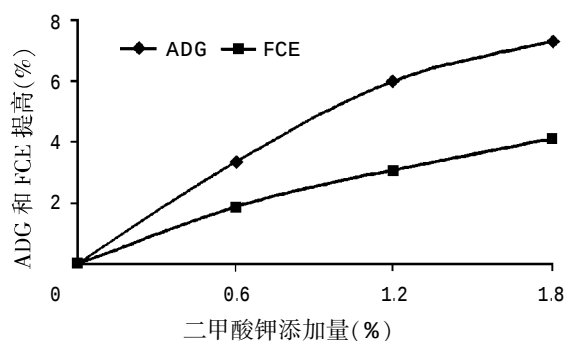
国外对二甲酸钾作为猪饲料添加剂的研究较多。Knarreborg 等 (2002) 用体外法研究了二甲酸钾在 pH 值为 3 的胃液和 pH 值为 4.5 的小肠液环境中对大肠杆菌和乳酸菌数量的影响,发现二甲酸钾的添加抑制了大肠杆菌和乳酸菌的生长。Qverland 等(2000)研究结果表明,二甲酸钾显著地减少了生长育肥猪十二指肠($P<0.03$)、空肠($P<0.02$)和直肠($P<0.01$)中大肠杆菌的数量。Windisch(2001)研究二甲酸钾和不同剂量、不同来源的过量铜对断奶仔猪生长性能的影响,结果显示,二甲酸钾和铜的添加提高了仔猪的日增重、饲料采食量和饲料转化率。Paulicks(2000)研究不同谷物和不同能量浓度饲料中添加二甲酸钾对断奶仔猪生长性能的影响,添加二甲酸钾可使日增重和采食量分别达到 14%和 9%,在小麦、大麦或大麦-小麦-玉米的混合日粮中添加二甲酸钾可使饲料转化效率分别提高 4%、6%和 7%。Roth(1998)研究在不同赖氨酸水平日粮中添加二甲酸钾对仔猪氮代谢及营养物质消化率的影响,结果表明,添加二甲酸钾可提高干物质的消化率 84.0%~85.0%;粗蛋白质 80.7%~82.6%;能量 83.5%~84.7%。

二甲酸钾是通过帮助猪加强自身抵抗感染的能力、改善饲料消化率来提高生产性能的。试验结果表明,在猪饲料中添加 0.6%~1.2%的二甲酸钾^[2],即可显著促进猪的生长,减少感染细菌造成的死亡数量。欧洲对断奶仔猪的研究结果证明,二甲酸钾对生长率有明显的剂效,即往饲料里添得越多,生长性能就越好。Overjeld 与 Roth 等 (1996) 分别在饲料中添加二甲酸钾,考察了对断奶猪生长率 (ADG) 和饲料转化效率 (FCE) 的影响,分别见图 2a、2b。从图中可以看出,添加相同量的二甲酸钾对断奶猪 ADG 和 FCE 的影响差异较大。这种促生长剂用在生长、肥育猪当中的剂效

更明显。BASF 推荐了最佳日粮添加量,开食料为 1.8%;断奶料为 1.2%;生长、肥育猪为 0.6%。英国一个 2 000 头规模的猪场在生长、肥育猪饲料中连续 2 个月添加 6kg/t 二甲酸钾,猪的生长率提高了 7.7%,猪群死亡率也从 4.25%降到了 2.53%(Dennis, 2004)。



(a)Overjeld 的试验结果



(b)Roth 的试验结果

图 2 二甲酸钾对断奶猪生长率和饲料转化效率的影响

但堂胜报道,断奶仔猪日粮中添加 1.6%二甲酸钾后,日增重和饲料转化率分别提高 15.7%和 3.8%;添加 2.0%时,日增重达最大(589g),提高了 22.9%;添加 2.4%,饲料转化率提高 7.5%。北京挑战集团与中国农业科学院饲料研究所合作,对产品进行了饲喂效果试验,试验结果表明,二甲酸钾在降低仔猪腹泻和死亡率方面有一定作用,同时可以改善仔猪的日增重和饲料转化率。

4 结论

用甲酸与无水碳酸钾或甲酸与氢氧化钾为原料,按反应物质的量比 4.1:1 投料,50~60℃下反应 2h,可制得白色晶体二甲酸钾,产品收率可达 83%,纯度 98%以上,生产操作简便,无三废产生,反应过程安全,易进行工业生产。

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

新型水产诱食剂氯化羧甲基二甲基铈的合成

陆 豫 李伟杰 邱维龙 吴世林

摘 要 运用无溶剂合成方法,利用较低成本的氯乙酸为原料与二甲硫醚反应,合成新型水产动物诱食剂——氯化羧甲基二甲基铈。该化合物通过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、MS 和元素分析证实了其结构。通过正交实验法,获得较佳反应条件:反应温度为 75°C ,反应时间 12h, $n_{\text{氯乙酸}} : n_{\text{二甲硫醚}} = 1 : 1.18$,收率达到了 72.2%。

关键词 诱食剂;氯化羧甲基二甲基铈;合成

中图分类号 S816.7

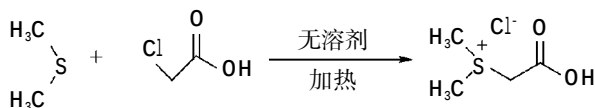
Synthesis of carboxymethyl dimethyl sulfonium chloride as a novel aquatic feed attractant

Lu Yu, Li Weijie, Di Weilong, Wu Shiling

Abstract Carboxymethyl dimethyl sulfonium chloride as a novel aquatic feed attractant was synthesized with chloroacetic acid, methyl sulfide and in solvent free system. Its chemical structure was determined by ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS spectra and elemental analysis. Optimum reaction condition was obtained by orthogonal test, which reaction temperature was 75°C , reaction time 12h and $n(\text{chloroacetic acid}) : n(\text{methyl sulfide}) = 1 : 1.18$, Yield of the product was 72.2%.

Key words feed attractant; carboxymethyl dimethyl sulfonium chloride; synthesis

水产动物喜食水中活饵,但在集约化养殖中水产动物的饲料主要是以植物原料为主的配合饲料,这种饲料尽管营养成分丰富,但却失去了水中活饵的风味和诱惑力,致使水产动物觅食兴趣淡化,摄食量下降,又造成饲料浪费,加大了养殖成本。水产动物诱食剂是近几年来开发的人工高效养殖的新产品^[1,2],它能改变饲料风味,提高摄食速度和摄食量,促进动物生长,提高饲料利用率;又可改善水产动物的健康,提高其生产性能。氯化羧甲基二甲基铈(CMDMS)是一种含硫诱食剂,有文献报道^[3,4],其合成方法是采用溴乙酸与二甲硫醚为原料,合成工艺成本高,而且收率低。本实验改用较低成本的氯乙酸为原料,通过正交实验,获得较佳的反应条件,产品质量好,收率也比文献报道的高。其反应式为:



陆豫,南昌大学中德联合研究院,330047,江西南昌。

李伟杰,汕头大学多学科研究中心。

邱维龙、吴世林,广州市智特奇饲料科技有限公司。

收稿日期:2006-03-21

1 实验步骤

氯化羧乙基二甲基铈的合成采用正交实验。在 100ml 圆底烧瓶中加入氯乙酸和二甲硫醚,在水浴中加热 9~15h,然后加入 34ml 甲醇溶解,冷却结晶,过滤,再用甲醇重结晶,得无色晶体,收率为 62.4%~72.2%。详细实验数据见表 1。

表 1 反应条件对产物收率的影响

实验号	加热温度 ($^\circ\text{C}$)	反应时间 (h)	$n_{\text{氯乙酸}} :$ $n_{\text{二甲硫醚}}$	产率 (%)
1	45	9	1 : 1.18	62.4
2	45	12	1 : 1.25	66.4
3	45	15	1 : 1.3	69.5
4	60	9	1 : 1.25	64.6
5	60	12	1 : 1.3	66.8
6	60	15	1 : 1.18	71.5
7	75	9	1 : 1.3	63.1
8	75	12	1 : 1.18	72.2
9	75	15	1 : 1.25	68.6
K_a	198.3	190.1	205.5	
K_b	202.9	204.9	199.6	
K_c	203.3	209.6	199.4	
k_a	66.1	63.4	68.5	
k_b	69.6	68.3	66.5	
k_c	67.8	69.9	66.4	
R	1.7	6.5	2.0	

2 结果与讨论

以氯乙酸和二甲硫醚为原料,合成氯化羧甲基二甲甲基硫的反应是一个吸热反应,研究发现,反应瓶内的反应温度低于加热温度。本文采用三因素三水平的正交实验方法研究了加热温度、反应时间和投料比对该反应产物收率的影响(见图1~3)。从图中可知,加热温度升高,k值增大,但随着温度的升高,有下降的趋势;反应时间增加,k值增大;物质的量比越小,k值越大。根据正交实验,在温度(75℃)、时间(15h)最佳条件下物质的量比与收率的关系见图4。

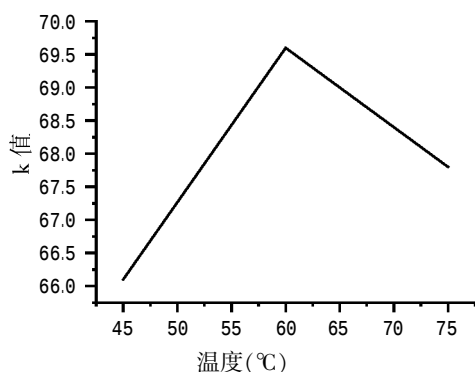


图1 加热温度与k值的关系

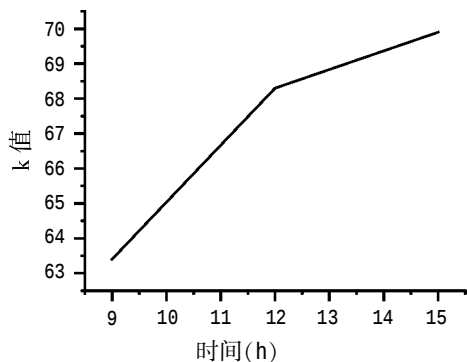


图2 反应时间与k值的关系

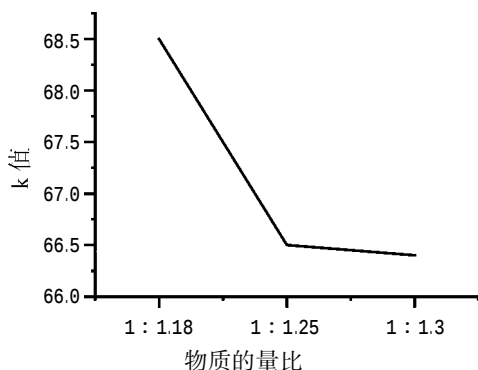


图3 反应物物质的量比与k值的关系

而从图4可见, $n_{\text{氯乙酸}}:n_{\text{二甲甲基硫醚}}=1:1.18$ 时,产物收率出现最大峰值。工业生产需考虑成本、市场价格等诸多因素,反应时间不能无限延长,由于原料中的二甲硫醚的沸点低,故加热温度不能无限提高,所以选择加热温度75℃、反应时间15h、 $n_{\text{氯乙酸}}:n_{\text{二甲甲基硫醚}}=1:1.18$ 为较佳的反应条件。通过实验证实该反应条件下产物收率达72.1%,同实验8号相比较相差无几。因此,将实验8确定为最佳反应条件:加热温度为75℃、反应时间为12h,物质的量比为1:1.18,产物收率为72.2%。

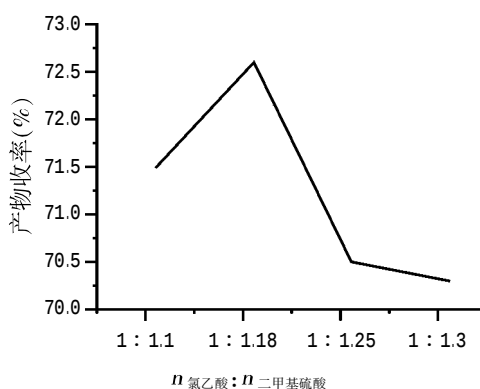


图4 一定温度(75℃)和时间(15h)条件下原料物质的量比与收率的关系

从 ^1H NMR谱数据可知,化学位移 δ 为3.03的6个氢的单峰是硫的两个甲基上的氢,而通过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、MS和元素分析证明了氯化羧甲基硫的化学结构。化学位移 δ 为4.78的2个氢的单峰是亚甲基上的两个氢,羧基上的氢容易与氘试剂发生交换,所以难以看到其核磁共振峰。 ^{13}C NMR谱反映出该化合物的3种碳原子,碳氢分析结果也证实了该化合物。

3 结论

综合以上数据得出最佳反应条件:加热温度为75℃,反应时间为12h, $n_{\text{氯乙酸}}:n_{\text{二甲甲基硫醚}}$ 为1:1.18。生产实际情况也证明该反应条件可用于规模生产。

参考文献

- 熊谱成. 水产动物高效诱食剂的使用技术 [J]. 广东饲料, 2000, 9 (3):38~39
- 梁雪霞, 冯国华, 肖渲雄. 饲料诱食剂在饲料工业中的应用与发展 [J]. 中国禽业导报, 2000, 17(18):14~15
- 曾仁权. 新型水产诱食剂CMDMS的化学合成与应用 [J]. 广东饲料, 2001, 10(2):38~39
- 曾仁权. 一类新型水产诱食剂的化学合成与应用研究 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2001(2):1~2

(编辑:孙崎峰, sqf0452@126.com)

黑曲霉植酸酶基因序列的研究

张荣奎 刘爱花 贺淹才

植酸酶(Phytase)是催化植酸及植酸盐水解成肌醇与磷酸(或磷酸盐)的一类酶的总称^[1]。目前主要用于饲料工业和食品工业,用来消除植物性饲料或食品中植酸的抗营养作用,提高机体对蛋白质及多种微量元素的利用率,促进生长发育,提高动物生产性能,减少粪便中磷的排放量,降低磷对环境的污染^[2]。大量研究表明,在猪、禽日粮中添加植酸酶,可使饲料中磷的利用率提高 40%~60%,粪便中磷的排出量减少 30%~50%^[3]。

植酸酶主要存在于植物和微生物中,其中以微生物产生的植酸酶具有良好的开发前景,但微生物天然菌株产酶水平较低,难以在生产中推广应用。利用分子生物学技术构建基因工程菌,提高植酸酶产量,从而降低生产成本,已成为世界性的研究热点之一^[4,5]。本文通过生物信息学方法拟对黑曲霉植酸酶基因进行序列分析,为该酶的改造研究提供参考。

1 植酸酶基因序列的研究

1.1 黑曲霉植酸酶基因 PhyA 序列分析

黑曲霉植酸酶基因 PhyA 序列全长 1 506bp。其中+45bp~+146bp 的 102 个核苷酸序列是一段典型的真菌内含子序列,基因含有真菌内含子的特征保守序列^[6]包括:供体序列(Donor)-GTATGC、套索结构(Lariat)-GCTGAC 及受体序列(Acceptor)-CAG。黑曲霉 phyA 基因中的(G+C)%含量较高,达到 52%,密码子第三位碱基的(G+C)%含量更高达 62.7%。在密码子第三位碱基上高频使用 G 和 C 碱基是曲霉中高效表达蛋白编码序列所具有的特征之一^[6]。

PhyA 基因相应的氨基酸序列共有 467 个氨基酸残基,其中,根据 VonHeijne 的信号肽切割位点的预测原则,并结合已知的植酸酶氨基酸序列分析,信号肽切割位点位于第 19 个氨基酸残基之后,余下的 448 个氨基酸残基为成熟植酸酶的氨基酸序列。从氨基酸序列上还找到了植酸酶的活性位点序列 (Active site

sequence)——CRVTFAQVLSRHGARYPTDSKGG^[6],它位于氨基酸序列的+71~+93bp,其中 RHGARYPT 是微生物来源的植酸酶活性位点中最保守的序列。PhyA 的晶体结构与鼠的低分子量酸性磷酸酶的晶体结构有很高的结构相似性,说明 PhyA 属于组氨酸酸性磷酸酶家族。

1.2 黑曲霉植酸酶基因 PhyB 序列分析

PhyB 基因序列全长 1 861bp,由 4 段外显子构成,基因有一个 PolyA 尾信号。黑曲霉 PhyB 基因中的(G+C)%含量为 56%左右,黑曲霉 PhyB 基因相应的氨基酸序列共有 479 个氨基酸残基,但起作用的为翻译产物的 460 个氨基酸。PhyB 虽然也属于组氨酸酸性磷酸酶家族,有活性位点保守序列 RHGERYP,但核苷酸序列及编码的氨基酸序列与 PhyA 同源性较低,实际上它的最适底物不是植酸盐,它仅是具有植酸酶活性的酸性磷酸酶。

2 植酸酶基因进化树分析

以丝状真菌植酸酶基因建立进化树(见图 1)。从基因库中查找到黑曲霉植酸酶基因 PhyA、PhyB、烟曲霉 (*A.fumigatus*)、米曲霉 (*A.Oryzae*)、构巢曲霉 (*A.nidulans*)等丝状真菌植酸酶的基因,应用 BioEdit 软件对这些植酸酶基因作进化树。由图 1 可知,黑曲霉植酸酶基因 PhyA 为肌醇六磷酸水解酶基因,而 PhyB 为具有植酸酶活性的最适 pH 值为 2.5 的酸性磷酸酶基因。它们之间的进化关系较远。黑曲霉的 PhyA 基因与米曲霉、土曲霉(*A. aerrus*)、构巢曲霉、烟曲霉、无花果曲霉(*A.ficuun*)等丝状真菌的植酸酶基因比较接近。而 PhyB 与 *O.proteus* 的 PhyA2 和绒毛栓菌(*T. pubescens*)的 PhyA 比较接近。

研究发现,大部分丝状真菌的植酸酶基因 PhyA 之间进化关系较近,只有无花果曲霉的 PhyA 与其它丝状真菌 phyA 进化关系较远。而黑曲霉的 PhyB 与细菌植酸酶进化关系较近,与丝状真菌进化关系较远。植物植酸酶基因如玉米(*Z.mays*)的植酸酶基因和一些细菌,如新月柄杆菌 (*C. crescentus*)、沙雷氏菌(*S.oneidensis*)的植酸酶和枯草芽孢杆菌 (*B.subtilis*)的 phyC 等的植酸酶基因进化关系较近,而和丝状真菌

张荣奎,华侨大学材料学院,362021,泉州。

刘爱花、贺淹才(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-02-20

★ 福建省自然科学基金资助项目(C04010011)

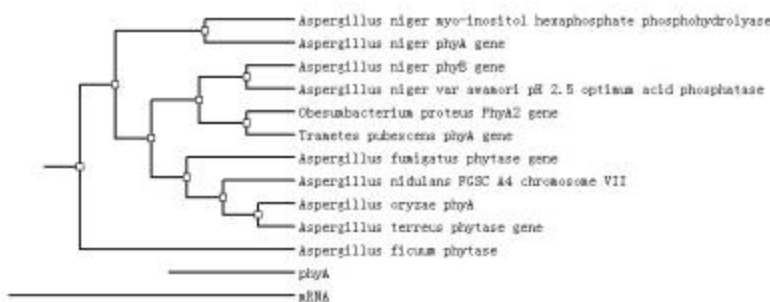


图1 丝状真菌植酸酶基因进化树

来源的植酸酶基因相差较多,可见植物植酸酶基因主要由细菌植酸酶基因进化而来。新月柄杆菌、沙雷氏菌的植酸酶基因和枯草芽孢杆菌的 *PhyC* 比较接近,为中性植酸酶。大肠杆菌(*E.coli*)的 *appA*、*O. proteus* 的 *PhyA2*、胡萝卜软腐欧文氏菌马铃薯黑胫病亚种(*E. carotovora* subsp. *atroseptica*) 植酸酶和 *R. terrigena* 的 *PhyK* 等细菌植酸酶基因之间进化关系较近,和丝状真菌植酸酶基因进化关系较远。

3 黑曲霉植酸酶蛋白质的高级结构研究

3.1 植酸酶蛋白 *PhyA* 的高级结构研究

黑曲霉植酸酶 *PhyA* 是一种糖基化蛋白,糖基化含量为 27.3%,糖链中富含甘露糖,表观分子量约为 85 000。因此,翻译出的蛋白质必须经过一系列的加工过程才能成为活性的成熟酶。糖基化能改变蛋白的一级结构,从而能增强酶的疏水性和钢韧性,提高耐热性,因此,糖基化对 *PhyA* 的生物合成和热稳定性至关重要。但是不同程度的糖基化也可能对蛋白质结构的稳定性及其功能产生一定的影响,糖基化也可能是提高植酸酶耐热性的原因。在 *PhyA* 中已发现了 10 个潜在的 N 糖基化位点 (*Asn-Xaa-Ser/Thr*, X 为任意氨基酸)。研究发现^[7],植酸酶 *PhyA* 的第 297 个氨基酸残基 *Arg* 对该酶的催化性质至关重要,分子模拟表明,该氨基酸残基直接作用于底物植酸的磷基团,推测是由于离子相互作用导致底物和产物紧密结合,从而降低酶的活力,成为反应产物释放限制步骤。

3.2 黑曲霉植酸酶蛋白 *PhyB* 的高级结构研究

黑曲霉植酸酶基因 *PhyB* 翻译产物为含 460 个氨基酸残基的蛋白质,糖基化程度不如 *PhyA* 高,分子量只有 68 000。*PhyB* 必须形成四聚体才具有植酸酶活性^[8],四聚体结构保证了 *PhyB* 的耐热性,但分开的单体不能再聚合成具有活性的酶,解释了 *PhyB* 在受热变性后很难复性的原因。

3.3 黑曲霉植酸酶的最适 pH 值等有关特性

黑曲霉植酸酶 *PhyA* 有两个最适 pH 值,分别为 2.5 和 5.5,最适温度为 58℃,在 37℃、pH 值为 2.5 的条件下,以植酸钠为底物的 *K_m* 值为 50mmol/l。*Ca²⁺*对酶活性无影响,*Mn²⁺*、*Co²⁺*对酶有激活作用,能使酶活力分别提高 30%和 13%,*Cu²⁺*、*Zn²⁺*、*Fe²⁺*和 *Cu⁺*对酶活性有抑制作用,其中前两种为非竞争性抑制,后两种为竞争性抑制。另外,一些对来源于动物、植物的酸性磷酸酶有抑制作用的抑制剂如 L (+) - 酒石酸、磷霉素 (Phosphomycin)对它却没有抑制作用。*PhyA* 对植酸钠有很高的底物特异性,每毫克蛋白的比活力为 105U,是目前发现的比活最高的植酸酶之一, *PhyA* 降解植酸磷生成的终产物分别是磷酸肌醇和无机磷酸。

PhyB 只有一个最适 pH 值为 2.5,并且在 pH 值为 5.0 时没有或者只有很少的活性,最适反应温度为 63℃。*PhyB* 对 1,2 - 环己胺和苯甲酰甲醛有抗性,而 *PhyA* 对它们很敏感。*PhyB* 的 *K_m* 值为 103mmol/l,因此对植酸的专一性较差。

PhyA 和 *PhyB* 结构和酶学性质具体差别数据见表1^[9]。

表1 植酸酶 *PhyA* 和 *PhyB* 的动力学及结构

参数	<i>PhyA</i>	<i>PhyB</i>
对植酸的 <i>K_m</i> (mmol/l)	50	103
<i>K_{cat}</i>	348s ⁻¹	628s ⁻¹
<i>K_{cat}/K_m</i>	1.3×10 ⁷ M ⁻¹ s ⁻¹	6.1×10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹
最适 pH 值	2.5 和 5.0	2.5
最适温度(℃)	58	63
分子量大小	85 000	68 000
氨基酸残基数量	448	460
二硫键数量	5	3
活性位点序列	RHGARYP	RHGERYP

4 应用与展望

黑曲霉植酸酶 *PhyA* 具有较高的酶活性,最适 pH 值为 2.5、5.0,与其它丝状真菌来源的植酸酶相差较多,酶活性比其它丝状真菌来源植酸酶高,热稳定性也比较好。目前很多科研单位已经对该酶做了大量研

究,对该酶基因结构和酶的性质已经很了解,主要通过改变其基因的(G+C)%含量,提高在毕赤酵母等基因工程菌中的表达水平,通过增加其糖基化位点来提高热稳定性以更适合生产,并对酶的活性位点进行定点诱变,提高酶活性和特异性。黑曲霉植酸酶 PhyB 为含有 4 个亚基的蛋白质,最适 pH 值为 2.5 左右。由于 PhyB 高温下变性后很难复活,因此研究较少,但是,国外一些科研机构对 PhyB 在某些基因工程菌中的表达进行了研究,目前主要研究方向是改变酶分子中四聚体中亚基间的结合位点,使其更稳定,适合生产要求。

综上所述,以植酸酶黑曲霉作为出发菌株,采用基因工程技术研究开发饲用植酸酶产品所获得的基因工程菌,所产酶活可达出发菌株的几十倍到上千倍。美国、芬兰、荷兰和德国的多家公司已推出了多种植酸酶制剂,我国已开展微生物植酸酶的有关研究工作,主要研究工作集中在产酶微生物菌种筛选、诱变和酶活力测定等方面,植酸酶的基因工程应用研究较少,还没有利用基因工程菌生产植酸酶产品面市。因此,利用基因工程技术对微生物植酸酶基因进行研究与开发,使我国自行生产成本低廉的植酸酶,对缓解我国磷资源的缺乏,降低饲料成本,减少磷对环境的污染,产生巨大的经济效益和社会生态环境效益。

参考文献

- 1 倪宏波,曲进,石星明,等.植酸酶的分子生物学特性及应用前景研究进展[J].黑龙江八一农垦大学学报,2005,17(3):62~65
- 2 Hurrell RF,Reddy MB, Juillerat MA, et al. Degradation of phytic acid in cereal Porridges improves iron absorption by human subjects [J]. Am. J. Clin. Nutr., 2003,77(5):1 213~1 219
- 3 王红宁,吴琦,刘世贵,等.黑曲霉 N25 植酸酶 PhyA 基因的克隆及序列分析[J].微生物学报,2001,41(3):310~314
- 4 彭远义,刘山峰,李春明,等.黑曲霉 N14 植酸酶基因在巴斯德毕赤酵母中的高效表达[J].生物工程学报,2004,20(6):967~971
- 5 Nickolay V. Zinin, Anna V. Serkina, Mikhail S. Gelfand, et al. Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from *Obesumbacterium proteus* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004 (236): 283~290
- 6 吴静,闫艳春.植酸酶基因工程的研究进展 [J].中国畜牧兽医,2004,31(1):12~15
- 7 Andrea Tomschy, Markus Wyss, Dirk Kostrewa, et al. Active site residue 297 of *Aspergillus niger* phytase critically affects the catalytic properties [J]. FEBS Letters, 2000(472): 169~172
- 8 朱海东,周晓云,王蓓,等.植酸酶的研究进展[J].饲料研究,2005 (1): 13~15
- 9 Abul H.J. Ullah, Kandan Sethumadhavan. Differences in the Active Site Environment of *Aspergillus ficuum* Phytase [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998(243): 458~462

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

· 广 告 ·



中国农业网址大全

中国农业网址大全 (www.ny3721.com) 是企业采购、销售人员,企业管理者,农业技术人员,网站站长,农业院校求职者寻找信息、寻找商机、寻找合作伙伴的得力助手。

目前,中国农业网址大全收录了超过6000家的农业网站、20万的农业企业,日访问量超过30万,全球排名约7000名(全球有400多亿个网站),是全国访问量大、极具影响力的农业类网站。

火爆推出

关键词广告:500元/年

地址:北京市海淀区西直门北大街41号天兆5B#302 电话:010-62273253 传真:010-62250804-602
邮编:100044 网站: <http://www.ny3721.com> 电子邮箱: support@ny3721.com

肌肉生成抑制素基因的研究

张宇光 许海涛 刘梅 胡兰

动物肌肉生成抑制素 (Myostatin, MSTN) 是 Mcpherron 等研究小鼠转化生长因子- β (TGF- β) 超家族时发现的一种新的生长因子。当时命名为生长分化因子- β (GDF- β), 后经研究发现, 其对骨骼肌的生长具有负调控作用, 因此改名为肌肉生成抑制素^[1-3]。该基因编码的蛋白质对骨骼肌有负调控作用, 动物缺乏 MSTN 时出现肌肉增大, 骨骼肌肌群分布广, 而且不增生脂肪等现象。MSTN 主要在胚胎期的骨骼肌中表达, 它的缺失使一些动物表现双肌性状^[4-7]。

1 MSTN 基因的发现及组织分布

Mcpherron 等 (1997) 根据 TGF- β 超家族的保守区设计一对简并引物, 通过 PCR 扩增而发现的骨骼肌特异性因子, 属于转化生长因子 (TGF- β) 超家族成员之一, 又名生长分化因子- β (GDF- β)^[1]。2001 年, 由 Michel Georges 领导的研究组, 历经十余年的研究, 发现比利时蓝牛 (Belgim Blue) 的双肌现象是由于 MSTN 基因突变造成的^[8]; 同年, 由美国农业部的 Tim Smith 领导的研究组和霍普金斯大学的 Sejin Lee 领导的研究小组发现, 比利时蓝牛及皮尔蒙特牛 (Piedmontese) 的双肌性状也是 MSTN 基因突变造成的^[9, 10]。

最初的研究结果表明, MSTN 只存在骨骼肌中, 具有组织特异性, 而在其它组织 (肺、胸腺、脑、肾、胰腺、肠、脾、睾丸、肝、卵巢等) 中均不存在。Ji 等 (1998) 发现 MSTN mRNA 主要分布在猪骨骼肌中, 在乳腺组织、脂肪组织、脑、舌、心、肺、小肠、肾、肝和骨髓也有 MSTN mRNA 存在, 但含量较少。鸡的 MSTN 在胚胎发育第 7d 就开始出现, 在腿肌、胸肌和心肌中均存在, 在脑、肝、肠、肺、脾、肾、皮肤等组织中则没有发现。在绵羊、牛体内, MSTN mRNA 不仅存在于骨骼肌中, 也存在于心肌中 (Sharma 等, 1999)。MSTN 基因在鱼类中的表达更广泛, 该基因不但在罗非鱼和大马哈鱼的骨骼肌中表达, 而且在眼、腮、肠、大脑、舌和性腺等组织中均有表达, 并且表达的时序性与肌肉形成一致。这说明 MSTN 在鱼类体内的生物学功能不仅限于肌肉, 对其它组织也有类似的作用。Radaelli 等 (2003)

发现, 在鱼类的咽、鳃、肝脏、食管顶部、胃上皮、小肠上皮、肾小管等均有 MSTN, 在刚孵化的幼鱼的视网膜、大脑中均存在 MSTN, 最集中的部位是大脑皮层上皮; 在成年鱼的肝、胃肠道、卵巢和跖足底均含有 MSTN。

2 MSTN 基因特点及结构

Lee SJ. (1997) 采用小鼠 MSTN 的保守 C-末端编码序列为探针, 对小鼠、大鼠、人、牛、猪、羊、鸡、火鸡、斑马鱼的 MSTN 的 cDNA 进行了克隆、测序。结果表明, 各种动物的 MSTN 基因序列高度保守, 其 N-末端都有分泌必需的信号肽序列、都有类胰蛋白酶 (RSRR) 水解加工位点以及都含有 TGF-B 家族的富含半胱氨酸的保守区, 并且小鼠、大鼠、人、猪、鸡、火鸡的水解加工位点后的 C-末端序列完全相同, 而牛和绵羊的成熟蛋白中也仅有 1~3 个氨基酸不同, 斑马鱼的 MSTN 基因序列保守性稍差, 与其它动物的 C-末端同源性为 88%。在人、鼠、猪、火鸡和鸡的 MSTN 蛋白的 C-末端活性区有编码 110-aa 的蛋白质, 该 C-末端蛋白是 MSTN 蛋白的成熟形式, 在小鼠和人的骨骼肌中广泛存在, 但是由于种属间的不同, 蛋白的氨基酸序列还是存在一定的差异。

3 MSTN 的生物学功能及作用机理

Rios R 等^[11]将编码鼠 MSTN cDNA 重组体瞬时转染 C2C12 成肌细胞, 有效地抑制了细胞的增殖, 并发现 MSTN 蛋白可能具有正向调控细胞周期依赖性磷酸转移酶抑制因子的作用。Joulia D^[12]通过稳定转染 MSTN 基因在骨骼肌细胞中表达, 发现减少了分化过程中 G0 和 G1 期细胞的数目, 另外还检测到 P21 和 P53 蛋白的表达有所提高。Western 的杂交实验结果表明, MSTN 可以影响与细胞增殖相关的蛋白质的表达, 如可以促进 P21 的表达、降低细胞周期依赖性蛋白激酶 (Cdk2) 的表达。

Wayne E. 研究表明, MSTN 基因抑制 C2C12 细胞增生, 可能是通过该基因作用于 TGF 家族的其它成员 (如丝氨酸-苏氨酸激酶家族的特异受体), 并且可以通过清除 MSTN 而解除对细胞增生的抑制作用, MSTN 对 C2C12 抑制作用比对中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 的抑制作用更加强烈, 初步说明 MSTN 基因优先作用于骨骼肌。

Lee SJ. 发现, 纯化的 C-末端二聚体复合物能够

张宇光, 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 110161, 辽宁沈阳。

许海涛、刘梅、胡兰 (通讯作者), 单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期: 2006-03-13

作用于激活素(ACT II)受体, MSTN 可与 ACT RIIB 连接(ACT 是多功能的生长因子,有促进细胞系分化,诱导胚胎中胚层发育及维持神经存活、诱导肝细胞发生凋亡等作用,其生物学活性与 TGF- β 有相似之处),然后再通过二聚体与细胞膜上的受体结合。MSTN 与受体结合后通过 3 种 Smad 蛋白的介导,信号传入细胞核,作用于靶基因的调控区,调节肌肉生长。其作用机理是:当向 C2C12 成肌细胞中添加 MSTN 蛋白,成肌细胞的增殖随 MSTN 水平的升高而降低。MSTN 可抑制成肌细胞从细胞周期的 G1 到 S 阶段的过渡(Thomas 等, 2000),此时 Rb 主要以低磷酸化的形式存在,磷酸化的 Rb 与转译因子如 E2F-DP1 的结合,使细胞在 G1 期阻止。这些结果表明,与 MSTN 相对应, MSTN 特异地正向调控 p21 (一种依赖于细胞周期蛋白的激酶抑制因子),降低成肌细胞中 cdk2 蛋白的浓度和活性^[13],导致低磷酸化 Rb 蛋白的集中,这样,将细胞周期捕获在 G1 阶段。另外,过度表达 MSTN 还减少 G0 向 G1 转化的频率,所以抑制 MSTN 的活性能加快细胞循环,促进成肌细胞的分裂(Khurana 等, 2003)。由此可见,抑制 MSTN 基因的表达,可引发动物肌肉增生。另外有实验表明,利用脂质体成功地将反译核酸(ASODN)转染到体外培养的原代成肌细胞内,通过 ASODN 抑制 MSTN 基因的表达,可促进成肌细胞的增殖与分化,形成大量肌纤维。

4 研究 MSTN 的意义

MSTN 基因是继生长激素(GH)胰岛素样生长因子(IGF)之后新发现的功能基因, MSTN 对维持动物机体的生理平衡起着重要的作用^[14], MSTN 活性的降低或丧失会出现“双肌”动物。通常高产肉率、高瘦肉率是家畜生产的重要指标,所以双肌动物的出现为人们利用 MSTN 基因的特性来调节肌肉的生长,为畜禽的育种工作提出了新的思路,开辟了新的途径,在畜牧业中有重要意义。

在医学上研究 MSTN 基因的结构和功能对于改善人的肌营养不良,为治疗肌营养不良或因其它疾病引起的肌消瘦提供新的手段。MSTN 已被人们确立为治疗肌肉萎缩类疾病的一个新的靶标分子,通过抑制体内 MSTN 可以改善萎缩肌肉的功能。MSTN 还可以调节脂肪代谢(Rebbapragada 等, 2003; McPherron 等, 2002),它的突变能够部分地抑制高血糖症 Ay(McPherron 等, 2002), MSTN 基因的缺失不仅减弱了肥胖症状,也减弱了二型糖尿病(非胰岛素依赖性糖尿病)症状,说明 MSTN 蛋白抑制素有望能成为治疗肥胖病和二型糖尿病的有效药剂,在临床医学上有重要

应用价值。

5 MSTN 基因研究现状

欧阳红生领导的研究小组扩增了大约克夏猪 MSTN 基因的全部序列 6 015bp,包括两个内含子和三个外显子,克隆了 MSTN 基因的 cDNA,测出了 MSTN 基因的编码序列,并采用了 RT-PCR 扩增法研究了 MSTN 基因在猪脑、肝、肾、肺、骨骼肌、心肌脂肪组织中的表达情况。结果发现, MSTN 基因仅在骨骼肌、心肌组织中表达^[15]。

李宁、姜运良等研究小组主要对不同品种猪的 MSTN 基因 5'和 3'端的单核苷酸多态性位点(SNPs)及 5'端调控区 T $\rightarrow$ A 突变与生长性状的关系进行分析,试图估计突变产生的效应,以实现早期标记辅助选择,加快育种工作的研究进展。杨兴元等研究小组克隆和表达了皮尔蒙特牛的 MSTN 基因活性区突变基因,并通过离体培养的肌肉细胞检测其生理活性证实, MSTN 的突变体具有促进肌肉细胞增生和增殖的功能^[16]。

吕文发成功的构建了牛、猪的肌肉生成抑制素基因的真核表达载体并转染到 COS-7 细胞,最终 COS-7 细胞表达了 MSTN 基因而产生了肌肉生成抑制素^[17]。

比利时蓝牛和皮尔蒙特牛的双肌表型使人们自然想到能否在其它家畜中通过 MSTN 基因修饰,控制其表达和功能的发挥,达到改变肌肉质量和重量的目的,生产具有商业化意义的优良品种家畜。可以结合体细胞基因敲除、RNAi 干扰、反译核酸和转基因技术,探索提高现有畜禽的肌肉重量和质量的可能性,也适于对一些地方品种进行改良。

目前国内有些实验室对畜禽的肌肉生成抑制素进行了克隆、序列分析、原核表达以及将畜禽的 MSTN 成熟蛋白编码序列在真核细胞中进行了表达,并且产生了有生物活性的蛋白质^[17-19]。为进一步探讨该基因的作用机理、生物活性,和开发新型安全饲料添加剂,提供了新的材料。

参考文献

- 1 McPherron A C, Lawler A M, Lee S J, et al. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member [J]. Nature, 1997, 387(6 628):83~90
- 2 Sharma M, Langley B, Bass J, et al. Myostatin in muscle growth and repair [J]. Exerc. Sport Sci. Rev., 2001, 29(4):155~158
- 3 Lee S J, McPherron A C. Regulation of myostatin activity and muscle growth [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001(98):9 306~9 311
- 4 McPherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997(94):12 457~12 461
- 5 Grobet L, Martin L J R, Poncelet D, et al. A deletion in the

- bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle [J]. Nature Genet, 1997(17):71-74
- 6 Grobet L, Poncelet D, Royo L J, et al. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle [J]. Mamm Genome, 1998(9):210-213
 - 7 Kambadur R, Sharma M, Smith T P L, et al. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle [J]. Genome Res, 1997(7):910-915
 - 8 Hughes S M. Running without regulators. Nature, 1992(360):536-537
 - 9 Jeanplong F, Sharma M, Somers W, et al. Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. Molecular and Cellular Biochemistry, 2001(200):31-37
 - 10 Massague J. The transforming growth factor- β family. Annu. Rev. Cell Biol., 1990(6):597-641
 - 11 Rios R, Carneim I, Arce VM. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002(282):993-999
 - 12 Joulia D, Bemardi H, Garandel V. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin [J]. Exp Cell Res, 2003,286(2):263-275
 - 13 Thomas M, Langley B, Berry C. Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation [J]. J. Biol. Chem., 2000(275):40 235-40 243
 - 14 Kim H S. Inhibition of Preipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2001(281):902-906
 - 15 欧阳红生. 猪肌生成抑制素基因的克隆和序列测定. 中国兽医学报, 2001, 5(21):479-481
 - 16 姜运良, 李宁. 不同品种猪 MSTN 基因的单核苷酸多态性. 遗传学报, 2001, 28(9):804-805
 - 17 吕文发. 牛肌肉生成抑制素基因真核表达载体的构建及其在 COS-7 细胞中的表达. 中国兽医科技, 2005, 35(12):997-999
 - 18 王全喜. 不同品种马肌肉抑制素基因的克隆与 PCR-RFLP 多态性分析. 中国草食动物, 2005, 25(4):11-13
 - 19 吕文发. 西门塔尔牛肌肉生成抑制素基因编码序列的克隆与序列分析. 中国牛业科学, 2006, 32(1):19-23

(编辑:孙崎峰, sqf0452@126.com)

2006 通威水产动物饲料及营养科技论坛 邀 请 函

近年,我国水产饲料行业迎来了历史性的机遇,产量大幅提高,各企业获得了良好的发展。今年,由于原材料特别是鱼粉价格的大幅度上涨,终端产品价格的回落,各饲料企业都面临着严峻的挑战。为此,我公司将举办“2006 通威水产动物饲料及营养科技论坛”,特聘请我国水产动物营养及饲料方面的著名学者到会作专题报告,同时盛情邀请水产饲料界的同行就共同关心的问题共同研讨,并欢迎提出专题报告在会上交流。会议主题为“渔用饲料原料、加工、机械、添加剂及质量监测和主要养殖对象的营养需求”。

一、会议组织单位:通威股份有限公司

二、会议地点及日程安排:①6月25日报到:成都·通威大厦(成都市二环路南四段11号)

②6月26日:9:00-9:30 通威集团刘汉元总裁致词

9:30-17:30 会议专题报告

18:00-19:20 晚宴

19:30-21:30 座谈交流(为方便会议安排,请需要书面或口头交流的参会单位在参会回执中提供发言题目)

三、会议费用:参会人员食宿自理,不交注册费。会议费用由通威承担(包括6月26日中午的工作餐及晚宴)

四、会议专题报告内容:

麦康森	中国海洋大学 教授 博导 “长江学者奖励计划”水产养殖学科特聘教授	题目待定
陈立侨	华东师范大学生命科学院 教授 博导	《大豆浓缩蛋白作为河蟹饵料蛋白源的综合评价》
叶元土	苏州大学生命科学院 教授	《淡水鱼类饲料原料选择及质量控制》
谭北平	中国海洋大学 教授 博导	《鱼粉资源短缺压力下高档水产饲料配方的思路与对策》
任泽林	北京英惠尔生物科技有限公司 总经理	《应对鱼粉暴涨的原料调整思路》
冷向军	上海水产大学生命科学院 副院长、教授	《改善养殖草鱼肉质的研究》
陈乃松	上海水产大学生命科学院 教授	《酶制剂在水产饲料中应用的研究与展望》
冷永智	通威水产研究所 所长	《我国养殖鱼类的营养类型与饲料问题》
高启平	通威水产研究所 副所长	《饲料品位与养殖利润》

薛敏 中国农科院饲料研究所水产动物营养与饲料研究室主任 《水产动物促摄食物质研究进展》

五、会务组联系方式:金世英 jinsy@tongwei.com、028-86168598、13219052056

“2006 通威水产动物饲料及营养科技论坛”报名回执

单位名称	参会人员	职 务	电 话	E-mail
是否联系住宿	标准房()间		套房()间	
6月26日晚座谈交流发言题目				

※注:为方便会务安排,请参会代表务必于6月15日前将回执传真至会务组 028-85199999 转 8598 或发送邮件到 jinsy@tongwei.com。

谈高剂量氧化锌降低断奶后仔猪腹泻的作用机制

冯自科 马学会 Hanne D. Poulsen

在现代养猪生产中,为发挥母猪最佳生产性能、减少仔猪疾病感染几率并提高仔猪生产性能,常采用早期隔离断奶(segregated early weaning, SEW)技术。早期断奶仔猪的消化系统尚未发育完善,难以承受由液体母乳向谷物性固体饲料变换带来的营养应激;仔猪与母畜骤然分离引起的心理应激;以及重新建群和等级地位确定过程中仔猪个体之间的争斗引起的环境应激(Spencer 等,1989)。营养、心理和环境三重应激不可避免地增加断奶后仔猪对环境中潜在病原微生物的敏感性,导致断奶后仔猪腹泻(post weaning diarrhea, PWD)。断奶后仔猪腹泻往往伴随仔猪生长的停滞,情况严重时产生僵猪,甚至造成仔猪死亡,对养猪生产造成重大经济损失。

断奶后仔猪腹泻是仔猪生产中亟待解决的重大课题。国内外的科研人员通过各种途径尝试解决此问题,但迄今为止,无论是在理论上还是在实践方面都没有取得突破性进展。丹麦 Poulsen(1989)首次报道,在断奶仔猪的饲料中添加 3 000 mg/kg 氧化锌可以降低断奶后仔猪腹泻发生率,改善仔猪的生产性能。因此,人们开始就高剂量氧化锌对治疗早期断奶仔猪腹泻开展了研究。

1 断奶后仔猪腹泻

1.1 生理性腹泻

仔猪在幼龄断奶期间,面临来自营养、心理和环境 3 个方面的应激,其中营养应激最为严重,不仅造成了断奶后短期内仔猪严重的营养不良,而且还会影响到仔猪的内分泌系统、免疫系统和行为状态等,同时也会造成仔猪肠道酶系活性和吸收功能的降低。在应激状态下,断奶仔猪分泌过量的糖皮质激素,导致正常生理代谢紊乱,胃肠道粘膜功能降低,微生物区

系发生变化,引起腹泻。

1.2 病理性腹泻

仔猪因肠道尚未建立稳定的微生态系统和免疫系统,自身抵抗力较低,对外界刺激敏感,易受各种病原微生物的侵袭而导致病理性腹泻。其中,大肠杆菌和轮状病毒是最常见的病原微生物,次者为沙门氏菌、志贺氏菌等。

1.3 过敏理论

仔猪断奶后腹泻的发生机制复杂,由 Miller 等(1984)提出的断奶仔猪腹泻“过敏理论”经过补充完善后已得到国内外共识。其作用模式为:过敏-肠道损伤-养分消化下降-腹泻,最终导致病原菌的过量定植。抗原物质进入断奶仔猪肠道引起免疫反应,仔猪肠道受损,绒毛缩短,隐窝增生,消化酶活性下降,肠道吸收功能降低,导致消化不良和腹泻,肠道正常菌群发生很大变化,从而为某些致病性大肠杆菌的增殖、固着和毒素产生创造了条件。未被消化的蛋白质或未被吸收的氨基酸进入大肠后,会改变肠道内微生物菌群。肠道微生物以大肠杆菌等蛋白质水解菌为主,这些细菌能分解蛋白质,释放尸胺、腐胺、酪胺和组胺等毒素,这些毒素会刺激肠壁,引起肠损伤和消化功能紊乱。组胺进入血液后,会诱使肠道组织水肿,也会引起消化吸收功能紊乱,组胺过高会引起“组胺休克”,导致仔猪突然死亡(李德发,2003)。

2 高剂量氧化锌作用机制

高剂量氧化锌日粮对断奶仔猪降低腹泻的效果已经得到学者的公认,但对其作用机制目前尚无统一结论,总结起来,对高剂量氧化锌大体有 3 种认识:①对肠道微生物的杀灭作用;②对断奶仔猪阶段性锌缺乏的改善;③不甚明晰的药理学作用。

2.1 对断奶仔猪肠道微生物的杀灭作用

由于日粮中的高锌可以表现出与抗生素相类似的促生长和抗腹泻效果(Jensen,1998),所以有关断奶仔猪日粮中 2 500~3 000mg/kg 氧化锌的作用效果往往被归结于高锌对肠道微生物菌群的影响。然而到目前为止,尚无充分的数据和依据可以证明锌在仔猪肠道中的抗菌效果。

冯自科,农业部饲料工业中心,博士,100094,北京市海淀区圆明园西路 2 号。

马学会,河北农业大学中兽医学院。

Hanne D. Poulsen, Danish Institute of Agricultural Science, Senior Professor, Foulum, Denmark。

收稿日期:2006-03-13

Jensen-Waern 等(1998)和 Katouli 等(1999)研究了在日粮中添加 2 400~2 500mg/kg 氧化锌对 35 日龄断奶仔猪肠道微生态的影响。研究发现,尽管高锌日粮改善了断奶仔猪的生产性能,但在 4 周的试验期内没有发现高锌组与对照组断奶仔猪粪便中产肠毒素大肠杆菌(*E. coli*)和肠道球菌(*Enterococci*)有何差异。同样, Li 等(2001)也未发现日粮中添加 3 000mg/kg 氧化锌对 3 周龄仔猪断奶后 2~11d 回肠和粪便中产肠毒素大肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)、梭菌(*Closteridia*)和乳酸菌(*Lactobacilli*)的数量造成影响。然而, Katouli 等(1999)研究表明, 2 500mg/kg 剂量的氧化锌对维持肠道菌群平衡和保持大肠中菌落的密殖有一定益处。此外,一些研究发现,无论日粮中添加抗生素与否,高锌均表现出相同的促生长效果(Mavromichalis 等, 2001; Hill 等, 2001)。

Zhang 等(1995)用接种猪痢疾螺旋体(*S. hyodysenteriae*)的小鼠作为研究模型,发现日粮中添加 6 000mg/kg 锌可以显著降低猪痢疾螺旋体的排出率;同时,组织学检查发现,与对照组相比,饲喂高锌日粮显著改善了小鼠的回肠损伤。尽管高锌可以降低猪痢疾螺旋体的数量,但也发现如此高剂量的锌(6 000mg/kg)对小鼠的生长造成了不良影响,这表明 6 000mg/kg 水平的锌对小鼠是有害的(Zhang 等, 1995)。因此, Zhang 等(1995)指出,问题的关键在于是否降低锌的添加水平后仍然可以降低猪痢疾螺旋体的数量。Mores 等(1998)进行了一个相似的试验,给断奶仔猪接种大肠杆菌,结果发现,饲喂 2 400mg/kg 锌的断奶仔猪并未表现腹泻征兆;相反,未饲喂高锌的仔猪却发生严重的腹泻。尽管如此,研究人员并没有发现上述两组断奶仔猪粪便中的大肠杆菌(*E. coli*)在数量上存在差异。这一结果表明,高剂量的锌可能增强仔猪肠道对病原微生物的抗性。Huang 等(1999)研究了 3 000mg/kg 水平的日粮氧化锌对肠系膜淋巴结(mesenteric lymph nodes, MLN)和循环系统(systemic circulation)中活菌数量的影响,结果发现,与对照组相比,饲喂高锌的断奶仔猪肠系膜淋巴结中的活菌数量显著降低,但不同菌种之间的存活率没有差异。由此可见,高剂量氧化锌的抗腹泻效果有可能是通过改善肠道粘膜的结构,或者改善肠道免疫系统的完整性实现的。

Roselli 等(2003)的试验在一定程度上验证了上述假设,在这一试验中,研究人员发现氧化锌可以保护肠道细胞(Caco-2 作为模型)因产内毒素型大肠杆菌(*enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC)感染而产生的损伤。研究人员分析认为,该作用并非源于氧化锌

的杀菌效果,因为在含有高剂量氧化锌的细胞培养液中大肠杆菌的生长未受影响。鉴于高剂量的氧化锌增加了培养细胞系的细胞紧密连接渗透性(tight junction permeability),研究人员认为氧化锌对细胞的保护效果是通过抑制大肠杆菌的粘附、侵入等过程实现的。

综上所述,高剂量氧化锌改善了肠道生物学结构,抑制了病原微生物的粘附和侵入,从而表现出局部抑菌效果,提高断奶仔猪对病原微生物的抗性。但值得注意的是,高锌并不改变仔猪肠道和粪便中的病原菌数量,也并未证实锌的抑菌效果或者对病原菌的这种抗性对仔猪断奶后腹泻构成显著影响。

2.2 断奶仔猪临界锌缺乏的改善

断奶应激往往造成仔猪采食量降低,生长性能下降以及腹泻发生率提高(Pluske 等, 1997),而在日粮中添加高剂量氧化锌可以增加仔猪断奶后的采食量和日增重以及降低腹泻等(Poulsen, 1989; Poulsen, 1995)。联想到锌缺乏的临床症状:食欲降低、生长低下、腹泻(McClain 等, 1985),一些科研人员提出一种假说,即断奶仔猪日粮中的高锌所表现的效果是改善机体锌状况的结果。显然,断奶阶段仔猪的采食量降低(Pluske 等, 1997),谷物日粮和无机锌中锌的利用率降低(Poulsen 和 Larsen, 1995),再加上仔猪体内的锌储备较低,这些因素综合在一起极易导致仔猪断奶后锌的缺乏。

有研究表明,断奶后饲喂非高锌日粮的仔猪可能会出现锌缺乏。这是因为仔猪哺乳后期,每头仔猪对乳汁的摄入量是 1 100g/d(Theil, 2002; Auldist 等, 2000),母猪乳汁中锌的含量为 6mg/kg(Poulsen, 1993);断奶后仔猪采食量为 50g/d(McCracken 等, 1999),非高锌日粮含有 50mg/kg 植物源的锌以及 100mg/kg 外源添加的锌(氧化锌)。锌(氧化锌形式)的生物学利用率大约为 20%(Poulsen 和 Larsen, 1995),植物源锌的生物学利用率也约为 20%(Poulsen 和 Larsen, 1995),母乳中锌的生物学利用率估计为 73%(就目前资料而言,母乳锌的利用率尚未明确)。对采食牛奶产品的仔猪进行的研究结果表明,断奶仔猪对牛奶锌的生物学利用率是 73%(Atkinson 等, 1993; Bobilya 等, 1991)。所以,断奶前仔猪锌的日摄入量为: 1.1 kg(母乳)/d $\times$ 6mg/kg=6.6mg/d;断奶后仔猪锌的日摄入量为: 0.05kg(日粮)/d $\times$ 150mg/kg=7.5mg/d。这表明,仔猪断奶前与断奶后摄入大体相同的锌。然而,考虑到断奶前与断奶后摄入锌来源的不同,锌利用的情况差异很大(断奶前仔猪锌的利用情况: 6.6mg/d $\times$ 0.73=4.8mg/d;断奶后仔猪锌的利用情况: 7.5mg/d $\times$

0.20=1.5mg/d)。

通过计算,我们可以清楚看到,仔猪断奶后可利用锌远远低于断奶前。断奶后摄入的可利用锌约为断奶前的 30%,可以推算出断奶后仔猪日粮中需要添加 450mg/kg 的氧化锌才能满足其需要。事实上,由于谷物中的锌利用率被高估,以及猪乳中的锌利用率被低估,这一差异或许更大。鉴于物种之间的差异,猪乳中的锌源较牛奶中的锌源更易于被仔猪消化吸收,因此,猪乳中锌的利用率要高于 73%。此外,测定氧化锌形式锌利用率的试验所用的猪的体重多为 35~45kg (Poulsen 和 Larsen,1995),由于断奶仔猪的消化系统尚未发育完善,同时又要采食与母乳完全迥异的日粮,其对氧化锌源锌的利用率估计低于 20%。如果将猪母乳中锌的利用率设定为 80%,日粮中氧化锌的利用率设定为 10%,那么断奶前仔猪摄入的可利用锌为断奶后的 7 倍。为保持与断奶前仔猪相同的可利用锌的摄入量,需要在断奶仔猪日粮中提供 1 000mg/kg 的锌源。

鉴于仔猪断奶后较断奶前摄入较少的可利用锌,因此,可以推断出仔猪断奶后会出现锌缺乏或者临界缺乏。然而,需要指出的一点是断奶前和断奶后锌营养的需要并未准确界定。NRC(1998)认为仔猪对锌的需要量为 100mg/kg 或 50mg/d。但是,当仔猪每天只是采食 50g 左右的日粮时,100mg/kg 的锌浓度每天只能提供 5mg 的锌。这样,如果根据 NRC(1998)推荐,即提供断奶仔猪每天 50mg 的可利用锌,则需要提供 1 000mg/kg 日粮锌,这一点与上面公式推算出来的一致。但实际上,断奶仔猪准确的锌需要量尚未确定。此外,确定锌的需要量必须考虑饲料原料中以及不同有机锌源和无机锌源中锌的利用率情况。对于断奶初期的仔猪,这一利用率可能很低。

小鼠空肠进行的体外试验表明,在断奶后一定阶段锌离子从粘膜端向浆膜端的转运降低。Wapnir 等(1985)的研究也表明,蛋白和能量缺乏可以削弱锌在小鼠肠道粘膜的转运和吸收。如果这样的情况发生在刚刚断奶的仔猪,此阶段仔猪的采食量会非常低,发生锌缺乏的可能性是存在的,而且,仔猪对锌的需要量有可能在断奶后增加。诸多研究证实,断奶可以降低粘膜高度,增加隐窝深度(Hampson,1986),改变粘膜和胰腺的酶系活性(Owsley 等,1986;Hedemann 等,2003)。锌是体内诸多酶的催化活性所必需的元素(Prasad 等,1969;Bettger 和 O'Dell,1993),这些酶大多关系到细胞分化和增殖过程,故锌对于具有较高周转速度的小肠组织的生长是极为重要的(Park 等,1985;

Tamada 等,1992)。因此,仔猪在刚断奶后的一定阶段需要高的锌摄入量,以满足肠道粘膜生长和功能维持的需要。

2.3 锌的药理学作用

锌有可能影响或调节肠道的吸收和(或)分泌过程。Hoque 等(2005)的研究结果表明,锌可以抑制大鼠回肠 cAMP 依赖的、而非钙离子依赖的氯离子的分泌,这一抑制作用是通过回肠基底膜上的钾离子通道的阻断实现的。同样,Klein 等(2002)发现,锌离子可以抑制 N18TG2 成神经细胞瘤细胞系中激素和弗司可林(forskolin,FSK)诱导的 cAMP 的产生,后者与肠道氯离子的分泌直接相关。

Roselli 等(2003)以产肠毒素型埃希氏大肠杆菌(ETEC,K88 株)所导致的受损 Caco-2 细胞系作为模型,研究了氧化锌对受损细胞的保护作用。产肠毒素型埃希氏大肠杆菌可以粘附 Caco-2 细胞系细胞,继而引发感染,破坏粘膜的完整性,导致炎性细胞因子——白细胞介素-8(interleukin-8,IL-8)、 α -生化相关肿瘤基因(growth-related oncogene- α , α -GRO)、 α -肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , α -TNF)的表达量提高,而抗炎性因子—— β -生长转化因子(transforming growth factor- β , β -TGF)表达量降低。研究结果表明,0.2mmol/l 氧化锌可以阻止粘膜完整性遭到破坏,而 0.2mmol/l 或 1mmol/l 氧化锌可以抵消细菌感染所导致的细胞因子的过量表达。研究人员认为,氧化锌对细胞的保护作用并不能归结于抗菌活性,因为在培养液中加入氧化锌后,产肠毒素型埃希氏大肠杆菌的生长并没有抑制。氧化锌对产肠毒素型埃希氏大肠杆菌感染的细胞的保护作用是通过抑制细菌在肠道粘膜的粘附,阻止上皮细胞渗透性的增加和调节细胞因子基因的表达而实现的。

综上所述,通过对 3 种有关高剂量氧化锌作用机制的假设,可以认为,高剂量氧化锌对断奶后仔猪的抗腹泻作用可能归功于锌对肠道氯离子分泌活动的抑制以及氧化锌对肠道结构和功能的改善,增加了对病原微生物的抗性。上述作用可能是基于锌的药理学作用,但也有一些理由认为,肠道抗性的增加是由于锌临界缺乏状态改善了其生理效果。没有试验证实,当仔猪接受高剂量氧化锌时,锌的抗菌作用和断奶仔猪生产性能改善之间存在明确关联。总之,高剂量氧化锌在断奶后仔猪生产中的应用有待进一步研究。

(参考文献 43 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)