

中国期刊方阵双效期刊

北方优秀期刊

辽宁省一级期刊

《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊
《中国期刊网》、《中国学术期刊网》(光盘版)
全文收录期刊

2007年第28卷第2期

(总第287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

投稿信箱:tg@feedindustry.com.cn

网站:www.feedindustry.com.cn

总编辑:慕春野

副总编辑:沈桂宇 陈广鹏

责任编辑:王芳

广告总代理:沈阳同兴广告有限责任公司

总经理:林勇

副总经理:荣立南 王峻楠

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:gg@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:辽广字01-42号

开户行:中信银行沈阳分行惠安支行

帐号:72214101826000548-49

每册定价:6.00元

如需转载本刊文章及图片,请注明
摘自《饲料工业》杂志,并寄样刊。

饲料

SILIAO GONGYE

(半月刊)

工业

企业标识展示



通威集团
(028)85118888



江苏中农
(0514)7848811



江苏正昌
(0519)7399988



江苏正昌
(0412)3430018
(024)88080922



布勒(常州)
(0519)7966666



江苏良友
(0519)8309988



杭建机械
(0519)7906658



杭州康建
(0571)86433111



上海福南
(021)57687881



上海福南
(021)57687881



广东中山世宝
(0760)3113061



广东中山世宝
(0760)3113061



广州立达尔
(020)87636309



广州立达尔
(027)83569722



广州海大
(020)84661699



北京爱绿
(010)88597542

■ 40 豆渣固态发酵生产纳豆芽孢杆菌的研究

李晓晖 沈 涛 潘俊杰

■ 42 CpG 寡脱氧核苷酸对中华绒螯蟹

3 种血清酶活性的影响

李红霞 李 义 刘永贵等

饲养试验

■ 46 壳聚糖对 0-3 周龄三黄肉仔鸡生产性能和

免疫力影响的初探

吴秋小 黄冠庆 潘俊福等

■ 49 大豆黄酮对肉仔鸡体内脂肪合成代谢的影响

张桂春 李绍龙

检测技术

■ 51 国产雨生红球藻藻粉质量安全性评价

张晓丽 刘建国 林 伟等

■ 54 气相色谱-串联质谱法检测猪肉组织中的

磺胺二甲嘧啶残留量

赵晓凤 杨 中

兽医兽药

■ 58 硫酸黏杆菌素研究概况

杨高峰 葛竹兴

■ 60 TMP 与氟米尼考酯伍应用对鸡大肠杆菌病的疗效试验

王春华 袁建伟 韩喜彬

专题论述

■ 62 莱籽饼粕中硫代葡萄糖苷的危害与脱毒措施研究

臧海军 张克英

信息采集

■ 10 国外如何改善养殖肉牛的品质

中草药治疗猪流行性感冒

胡炳义等

专家论坛

■ 1 环境营养学研究与水产养殖业的可持续发展

陈立侨 侯俊利 彭士明等

饲料添加剂

■ 4 新型饲料添加剂——木寡糖

虞 洁 余 冰 陈代文

■ 7 饲料抗氧化剂作用机理及其活性评价方法研究进展

魏金涛 齐德生 张妮娜

■ 11 维生素 E 对藏浦鸭超饲养期生长性能和

产肥肝性能的影响

范文娜 刘 辉 何瑞国

酶制剂

■ 16 饲用 β -甘露聚糖酶的研究及应用

李富伟 周响艳 冯定远

■ 20 温度和时间对酶水解豆饼豆粕效果的影响

何经纬 王之盛 曾有均

■ 22 菌源性 β -葡萄糖苷酶特性的研究

李剑梅 修翠娟 李 莉等

水产养殖

■ 25 在饲料中添加 DDGS 对异育银鲫生长的影响

高红建 张邦辉 王燕波等

■ 28 水产动物消化酶的研究

唐 黎 王吉桥 程骏驰等

■ 32 两种饲料对大口黑鲈生长、消化指数和

消化酶活性的影响

吴锐全 谢 骏等

试验研究

■ 37 在体外模拟胃发酵条件下 N-乙酰-DL-蛋氨酸

稳定性研究

武安泉 杨开伦 胡炳义等

环境营养学研究与水产养殖业的可持续发展

陈立侨 侯俊利 彭士明 顾顺樟

1 我国水产养殖业的发展现状

随着国民经济的高速发展和农业结构调整的不断深入,我国水产养殖业得到了持续、迅猛的发展。从 1988 年起,我国水产养殖的产量首次超过捕捞产量,是世界上唯一一个养殖产量超过捕捞产量的国家,且养殖产量已占到世界养殖总产量的 70% 以上。最新统计数据显示,2005 年我国的水产品总产量为 5 107.6 万吨,同比增长 4.2%,其中养殖产量为 3 395 万吨,占总产量的 66.48%。水产养殖业的发展,一方面使水产品的供求关系发生了很大的变化;另一方面改善了产业结构,推动了整个渔业经济的发展。

然而,伴随着中国水产养殖业的迅猛发展,面临的问题也日益突出,如养殖环境污染日趋严重、水域生态环境受到严重破坏等,已成为当今人们不得不认真考虑的问题。在精养和半精养的养殖系统中,野杂鱼和低质饲料的大量投喂加速了养殖水域环境的恶化。水质污染、病害滋生、水产品的卫生和安全问题已成为限制水产业可持续发展的主要因素。

2 高效水产养殖业是我国农业经济发展的重要组成部分

中国是一个资源有限的人口大国,人均占地面积有限,尽管中国人口增长率已得到有效控制,但到 2030 年预计仍可达到 16 亿左右,而资源的缺乏和环境的恶化两大问题将可能进一步发展。很显然,只依靠耕地和陆地资源已不能真正解决中国如此众多人口的“吃饭”问题。面对当前的中国国情和存在的具体问题,有针对性地大力发展高效农业,是我国进行社会主义建设的基础和保障,将关系到我国经济建设的全局。而水产养殖业以它自身的特点,正适合我国的国情,是有利于我国经济发展的一种高效农业。这是因为:①我国海岸线长,其中水深在 15 m 以内的浅海滩涂面积有 1 200 万公顷,潮间带面积 200 万公顷。②大陆海岸线 1.8 万千米,加上 6 500 多个岛屿岸线的 1.4 万千米,共 3.2 万多千米,渔业水域和生物资源丰富。③我国也是世界上内陆淡水总面积最大的国家

之一,全国内陆水域总面积约 1 838 万公顷,发展水产养殖业就是对国土资源的合理利用。④与畜禽业相比,水产动物对饲料的转化率高,可有效地利用我国的有限资源;同时,水产动物的营养丰富,富含蛋白质、不饱和脂肪酸、多糖、维生素、以及矿物质等人体必需的营养素。⑤水产养殖是一种劳动密集型产业,能有效扩大就业机会,缓解就业压力。因此说,高效水产养殖业是我国农业经济发展的重要组成部分,实现水产养殖业的可持续发展是当前国情下所必须的,它不仅关系到整个水产养殖业,而且也关系到整个国家的经济发展和社会稳定。

3 环境恶化对发展水产养殖业的制约和影响

据报道,由于陆地污染物的大量排放,水域生态环境日趋恶化。这不仅使水生生物成体繁殖力和幼体存活力急剧下降,生物资源得不到有效补充,而且威胁到人类自身的生存和发展。目前我国日排污水量在 1.3 亿吨左右,80% 以上未经任何处理直接排放到江河湖海中,直接污染了水域环境,水域环境的恶化严重破坏了渔业资源。调查显示,1982~1983 年渤海鱼类有 85 种,到 1992 年下降到 74 种。水域环境的恶化还表现在水体的生物污染,水体中大量有毒、有害微生物的繁殖导致病害频繁发生。中华绒螯蟹颤抖病、鳊鱼出血症、对虾白斑综合症、牛蛙红腿病、中华鳖病毒病以及河豚、黄鳝、鲇鱼、鳊鱼的烂尾病等,都给养殖业造成重大经济损失。

此外,水域环境的污染还严重威胁了水产品的质量和安全性。通常,水产动物易富集水体中的重金属、石油、农药、有机污染物、细菌、病毒和生物毒素等污染物,严重危及人类的生命和健康。工农业和生活所排放的废水虽然是水域环境的主要污染源,但水产养殖业本身所带来的污染也不能忽视。环境恶化已成为制约水产养殖业发展的重要因素。

4 环境营养学概念的提出

当今,环境问题与可持续发展问题是全球范围内最受关注的问题之一。基于环境、动物营养需求和生产力三者之间的关系,国外有学者针对畜禽养殖,较系统地阐述了研究改善畜禽环境、降低营养物质投入、获取最优生产力和经济效益的关系,从而为环境营养学研究建立了初步的理论基础。环境营养学是将生态学、系统科学和动物营养学结合起来,把环境、动物、产品作为一个

陈立侨,华东师范大学生命科学学院,教授,博士生导师,200062,上海。

侯俊利、彭士明、顾顺樟,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-12-22

整体,研究动物在复杂环境条件下,对营养素的动态需求及其相互关系;在精确量化的基础上,建立物质流、能量流和经济流的动态转化、平衡及其调控模型;在保持生态平衡条件下,获取最优生产力。在水产科学领域,目前还没有一个完整而公认的环境营养学定义。

有学者提出,水产动物环境营养学是一门新生的交叉边缘学科,它是建立在水产动物营养学理论基础之上,运用生态学和系统论的观点,通过现代生物技术、加工工艺、饲喂方案等措施,对水产动物与养殖水域环境进行营养调控的一门科学。目的在于最大限度的发挥饲料效价,降低生产成本,提高水产品质量,并且将水产养殖业对环境所造成的污染降到最低。其最终目标则是降低水环境污染,实现水产养殖业的健康与可持续发展。

与陆生畜禽动物相比,水产动物是相对低等的变温动物,其与养殖水环境之间存在更为复杂的相互作用。水域环境的改变会导致水产动物的生理状况和营养需求发生变化,同样,饲料的营养组成反过来也会影响水域环境。对于水产养殖业来讲,饲料自身污染是养殖水域环境恶化的主要因素。水产养殖水体中的可溶性营养物有3个主要来源:鳃排泄、饲料溶失和粪便中溶出。根据对水生动物生物能量学的研究发现,草食性和肉食性动物用于生长和繁殖的能量仅占20%~29%,而从粪中、尿中排泄的能量占27%~43%。试验表明,投喂的虾蟹饲料会损失20%以上的粗蛋白质、大约50%的碳水化合物和85%~95%的维生素。有时,饲料中会有多达80%的氮和86%的磷会流入水域环境,导致底泥过量沉积、藻类水华和生化需氧量(BOD)提高。在欧洲网箱养殖中,鲑鱼摄入的80%氮中,仅有25%用于鱼体生长,65%内源排泄,10%粪便排泄;而投入的饲料仅有约20%被有效利用,其余部分都以污染物形式排放在环境中。美国池塘养殖的斑点叉尾鲴鱼的饲料中约3.1%的有机物、28.5%的氮、7.0%的磷被溶解释放到水中。鲢鳙鱼类的网箱养殖,饲料中75%的总磷和总氮排入水环境。可见,70%左右的饲料物质直接或间接(被代谢分解后)进入水体之中,对水质造成污染。现代水产养殖业的发展是以破坏水域环境、破坏水产资源为代价而获得的。因此,必须全面开展水产养殖动物的营养需要与环境因素的协调研究,通过营养调控和平衡原理,来开发优质、高效、低污染的饲料,提高饲料的利用率,最大限度的减少资源浪费和环境污染,保证水产养殖业的可持续发展。而水产养殖动物环境营养学的本质就在于探索养殖水域环境、水产养殖动物适宜营养需求、水产品质量

量三者之间的一个可持续的、良性的动态平衡,通过改善水产动物饲料质量与合理调节其营养需求,以此来改善养殖水域生态环境,提高水产品质量。

5 环境营养学的研究范畴与饲料开发情况

5.1 营养需求的研究和营养平衡的研究

迄今世界上已对300余种鱼类和20多种甲壳动物进行了养殖研究,但营养研究较全面的种类仅有太平洋鲑、虹鳟、斑点叉尾鲴和鲤鱼等,尚未有一种甲壳动物获得较完善的营养需要数据。这水产动物生活的环境条件多样、动物本身的生理特性以及营养需要研究的困难有关。我国自20世纪80年代以来,针对水产动物的营养需求已经做了大量的研究,初步探明了如鲤鱼、草鱼、罗非鱼、青鱼、团头鲂、鳊鱼以及甲壳动物中国对虾、中华绒螯蟹等的营养需求。研究工作主要集中在蛋白质、脂肪和碳水化合物等常量营养素指标的研究与配方筛选,而对微量元素的营养作用及其需要量缺少深入系统的研究,特别是没有将养殖动物营养的需要和排放与其生态环境的保护紧密联系起来,系统考虑环境和生态变化对饲料营养利用以及饲料因素对环境和生态的污染的影响,因而不利于饲料配方的进一步优化、完善和饲料利用率的提高。

营养素平衡是指饲料中各营养素的种类、数量及比例关系能最大限度满足养殖动物所需要的营养素的种类、数量及比例关系,使饲料中的营养物质最大限度的用于养殖动物的生长或繁殖,主要包括如下几个方面的营养平衡:①蛋白质和氨基酸平衡。从氨基酸平衡着手,添加适宜氨基酸来平衡日粮中氨基酸的需要,达到既节省天然蛋白质饲料资源,又减少水环境氮污染的问题,即在不影响动物生产性能的前提下,满足低蛋白日粮的氨基酸平衡,可节约蛋白质资源并降低氮排泄。②能量与其它营养素的平衡。在营养物质平衡方面,能量与其它营养素其实都存在一个平衡的问题,日粮能量含量过高,不但影响水产动物对其它营养素的消化吸收,还会减少饲料的摄入量,导致生产性能下降和残饵增加。因此必须建立饲料中能量与其它营养素之间的平衡,才能使饲料达到最佳利用率,减少自身污染。③微量营养素的平衡。维生素、微量元素等微量营养物质在水产动物新陈代谢、酶促反应和生理生化反应中发挥着极其重要的作用。任何一种微量营养素缺乏或不平衡,都会导致机体营养缺乏症和新陈代谢紊乱,使饲料利用率下降,增加营养排泄而形成自身污染。

5.2 营养调控措施和添加剂的合理使用

5.2.1 环境胁迫及其营养调控

动物与其赖以生存的内外环境的协调一致,是动

物正常生长发育的基础。随着集约化生产水平的不断提高,放养密度过大,投饵频率增加,消毒剂和药物的滥用以及不适当的管理方法等,使养殖水体的污染程度不断加剧,养殖环境日益恶化,致使动物不可避免地处于各种环境因子的胁迫之下。探讨水产养殖业和环境胁迫之间的相互关系,研究主要环境胁迫因子对动物生理状态、营养需求的差异以及对其代谢机理的影响,并在此基础上,探明营养素和营养素的交互作用对提高动物抵抗胁迫能量的能力,缓解或消除环境胁迫对动物的不良影响。

5.2.2 控制饲料中氮、磷等营养的水平

饲料中的营养成分,如氮和磷,如果添加过量或添加的物质不利于水产动物吸收,则会使水体富营养化,污染水质环境,影响养殖业的可持续发展。因此,应选择氮、磷生物利用率高而水溶性低的饲料成分,同时在不影响水产动物的生长、饲料利用率的前提下,适当的降低饲料中氮、磷含量,可以减少水产养殖磷对水环境的污染。利用蛋白质的节约作用,增加饲料中可消化非蛋白能。鱼体可以通过降低氮的损失而提高氮的储存率,从而使氮排泄量的减少和蛋白质净利用率的增加。有研究证明,调整饲料中有效磷的水平可降低粪便中磷含量而不影响动物健康和生产性能。

5.2.3 合理使用营养型添加剂

营养型添加剂,如氨基酸、脂肪酸、微量元素、维生素等,其主要作用是补充饲料的营养不足,满足水产动物生长、发育和繁殖的需求,同时通过合理使用营养型添加剂可以改善水产动物的免疫机能,即通过营养调控而非通过药物来提高水产动物的抗病能力,从而减少了水域污染,并保证了食品的安全性。

5.2.4 合理使用非营养型添加剂

5.2.4.1 酶制剂

酶制剂是利用现代生物技术开发的绿色饲料添加剂,如蛋白酶、植酸酶、聚糖酶等。其能降低肠道中食糜的粘度,促进营养物质被机体消化吸收,提高饲料利用率,尤其在幼稚水产动物日粮中添加效果更佳。

5.2.4.2 微生态制剂

添加益生菌、益生源、合生素等,能够在数量或种类上补充肠道内较少或缺乏的正常微生物,调整并维持肠道内正常的微生态平衡,增强集体免疫力,改善饲料利用率,降低营养素的排泄。

5.2.4.3 其它添加剂

如生物活性物质(包括中草药)、诱食剂、甜菜碱等均可促进水产动物食欲,提高饲料利用率。

5.3 实施现代饲料加工技术

生态环保型饲料就是利用生态营养学的理论和方法,考虑降低对环境的污染问题,从饲料原料的选购、配方设计、加工、饲喂等过程进行严格质量控制,并实施动物营养系统调控,使饲料达到低成本、高效益、低污染的效果。在配制水产动物环保饲料过程中,加工工艺的重点应放在最大限度减少饵料在水中溶失和沉底,防止饲料营养和添加物变性和提高饵料利用率上。故要采用现代饲料加工技术和工艺,如普通制粒的革新、挤压膨化、沉性与浮性膨化、最适粉碎粒度、最佳调质参数、后喷涂、微胶囊等工艺都是需要考虑的。

6 总结

我国的水产养殖品种众多、养殖环境多样、养殖模式各异。根据不同养殖模式和系统,应该有针对性地开发出适合不同品种、不同养殖环境和养殖模式的配合饲料,如全价精养饲料、混养饲料和填补型饲料等,以降低养殖的饲料成本和对环境的污染。融合营养学和养殖生态学研究成果,研究水产动物营养与养殖水环境之间的相互关系,优化新型饵料配方和新型饲料添加剂配方,大力开发低蛋白、高能量且蛋白质消化率、磷利用率高的饲料,以减少氮和磷排放。大力开展实用、新型的复合酶制剂和微生态制剂的研究。研究提高营养物质的消化率和利用率,减少饲料溶失的饲料加工工艺。制定一套正确评价饵料质量的指标和投喂管理的措施,同时建立一套评价养殖生态环境的科学方法,推广健康生态养殖,大力推进水产环境营养学的研究,促进水产养殖业的健康、可持续发展。

(参考文献 10 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:沈桂宇,guiyu62@tom.com)

· 作者简介 ·

陈立侨,华东师范大学终身教授、博士生导师,现兼任农业部“水生动物遗传育种与养殖生物学”以及中国水产科学研究院“渔业环境与养殖生态”、“盐碱地渔业工程技术研究中心”等重点开放实验室学术委员。曾先后赴加拿大多伦多大学、美国奥本、夏威夷大学和澳大利亚弗林德斯(Flinders)大学等进行交流合作,主要从事“动物营养学”和“水生生物学”的研究。先后主持、承担了 40 余项国家和省部级课题,其中包括国家自然科学基金重点基金、海外青年学者合作项目(杰出青年 B 类)、国家“863”计划项目、教育部重大培育项目、上海市优秀学科带头人计划、上海市科委重点项目等。在国际著名刊物《Comparative Biochemistry and Physiology》、《Developmental & Comparative Immunology》、《Animal Genetics》、《Aquaculture》、《Aquatic Sciences》、《Fish and fisheries》以及国内的《动物学报》等核心刊物上发表论文 140 多篇,著作 3 部。曾获上海市科技进步一等奖 2 项、省级科技进步三等奖和市级一等奖各 1 项,荣获全国优秀博士后、上海市“十大”杰出青年等荣誉称号,1998 年享受国务院特殊津贴。指导博士研究生 28 名,硕士研究生 29 名,博士后 2 名。

新型饲料添加剂——木寡糖

虞洁 余冰 陈代文

长期以来,饲用抗生素在保障动物健康、促进动物生长、提高饲料利用率等方面效果明显,给畜禽生产带来了巨大的经济效益。但随着人民生活水平的提高和健康意识的加强,饲用抗生素所带来的抗药性和有害残留等问题也日益受到人们的重视,于是各国政府纷纷出台措施,严格控制抗生素作为饲料添加剂使用。因此,开发抗生素替代品成为近年来饲料添加剂研究的热点。

功能性寡糖因其无污染、无有害残留和具有独特的营养生理功能等特点而逐渐成为潜力较大的抗生素替代品之一。木寡糖(Xylo-oligosaccharide, XOS)又称低聚木糖,是一种新型的功能性寡糖,最早作为食品添加剂使用,后来随着研究的深入和生产工艺的改进,木寡糖开始逐渐应用于饲料工业中。目前,在商品生产上木寡糖一般采用球毛壳霉(*Chaetomium globosum*)产生的内切型木聚糖酶对玉米芯、甘蔗渣和麸皮等植物原料中的木聚糖进行水解,然后经脱色、脱盐和精制浓缩等步骤而获得[陈瑞娟,1993]。木寡糖除具有其它功能性寡糖的普遍功能外,还具有稳定性好、发挥作用所需剂量小等独特优点。因此,木寡糖作为饲料添加剂的研究和应用正越来越多受到业界人士的关注。

1 木寡糖的结构与理化性质

1.1 木寡糖的结构

木寡糖是由 2~7 个木糖以 β -1,4 糖苷键连接而成的寡糖,以木二糖和木三糖为主(郑建仙,2004),它们是木寡糖的主要有效成分。木寡糖的化学结构如图 1 所示。

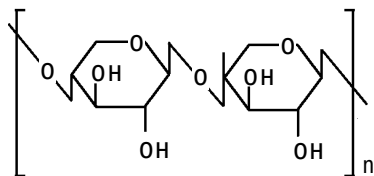


图 1 木寡糖的化学结构($2 \leq n \leq 7$)

1.2 木寡糖的理化性质

固体木寡糖为淡黄色或浅褐色粉末;木寡糖的稳定性好,在 pH 值 2.5~8.0 范围内,100 °C 加热 1 h 无明显变化;甜度低,纯度为 50% 的木寡糖甜度仅为蔗糖的 30%,且甜味纯正,类似蔗糖;粘度低,木寡糖的粘度是所有寡糖中最低的,并随温度升高而迅速下降;热值低,木寡糖的平均热值约为 14.23 kJ;水分活度低,木二糖是木寡糖中水分活度最高的,但与同类二糖相比却是最低的,其水分活度与葡萄糖相近;抗冻性好,木寡糖溶液在 -10 °C 以下也不易冻结,优于葡萄糖、蔗糖和麦芽糖。

2 木寡糖的营养生理功能

2.1 改善动物肠道内环境

木寡糖被动物采食后能降低动物肠道内环境的 pH 值。Campbell 等(1997a)和 Hsu 等(2004)的研究均发现,用含 6% 木寡糖的饲料饲喂小鼠可使其盲肠 pH 值显著降低($P < 0.05$)。党国华(2004)也报道,饲喂木寡糖能显著降低肉仔鸡盲肠和直肠的 pH 值($P < 0.05$)。

动物胃肠道存在着大量的微生物,当其中的双歧杆菌、乳酸菌等有益菌占优势时能够抑制大肠杆菌等有害菌在肠道内的附着和增殖,从而减少消化道疾病的发生(Meng 等,1998)。可见,肠道微生态的平衡对于宿主的健康有着极为重要的意义(Floch 等,2001)。由于木寡糖对动物肠道有益菌尤其是双歧杆菌有选择性的增殖效果,因此被公认为是一种双歧因子和益生素(Gibson 等,1995)。国内外就木寡糖调节肠道菌群这一功能进行了大量研究。体外培养试验表明,木二糖和木三糖分别使青春双歧杆菌浓度从 0.10 g/l 增加到 0.33 g/l 和 0.47 g/l (张军华等,2005)。Campbell 等(1997a)报道,木寡糖可以使小鼠肠内容物和盲肠内的双歧杆菌数显著增加($P < 0.05$),同时使肠道总需氧菌数显著减少($P < 0.05$);而总厌氧菌数显著增加($P < 0.05$)。Hsu 等(2004)在对小鼠的研究中也注意到木寡糖可以在显著促进双歧杆菌增殖的同时,抑制产气荚膜梭菌和大肠杆菌的增殖,且效果优于果寡糖。另外的试验同样表明,木寡糖对于两歧双歧杆菌、青春双歧杆菌等双歧杆菌均有明显的促增殖作用(Okazaki 等,1990;徐勇,2002)。

虞洁,四川农业大学动物营养研究所,625014,四川雅安。

余冰(通讯作者)、陈代文,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-07

2.2 改变动物肠道组织形态

木寡糖的摄入可以使动物肠道组织形态发生改变。Howard 等(1995)通过对鼠的试验发现,木寡糖能显著增加盲肠隐窝深度($P<0.05$)。Hsu 等(2004)也报道,小鼠饲料中添加 6%木寡糖后,小鼠盲肠组织、盲肠壁和盲肠内容物分别比对照组增重了 4.4、1.5、2.7 g,差异均显著($P<0.05$),同时结肠肠壁厚度也有显著增加。Younes 等(1995)和 Campbell 等(1997a)证实,小鼠饲喂含木寡糖饲料后,其结肠和盲肠重以及盲肠壁重均显著增加($P<0.05$),但结肠壁重仅略有增加,与对照组相比差异不显著。此外,还有研究显示,木寡糖有保护动物肠道粘膜,可防止其受损伤的作用(Campbell 等,1997b)。

2.3 促进人体排便

在人体上的试验表明,木寡糖具有增加粪便含水量,促进排便,对于便秘有一定的缓解作用。便秘病人每天服用适量的木寡糖可以使其通便频率增加,使粪便保持正常柔软度,但对健康人没有影响(苏小冰,2003)。徐宏君等(2003)报道,木寡糖口服液对老年便秘有很好的疗效。来自国外的研究也证实,便秘孕妇服用木寡糖后能使其粪便保持正常的柔软度和颜色,而未见副作用(Tateyama 等,2005)。

2.4 影响动物机体对营养物质的代谢

2.4.1 影响蛋白质代谢

木寡糖能够影响动物机体对蛋白质的吸收和利用状况,其具体作用尚不明确。Younes 等(1995)报道,给小鼠饲喂含 7.5%木寡糖的纯合日粮后,血浆尿素氮浓度显著低于对照组($P<0.05$);粪中氮的排泄量显著增加,尿中氮的排泄量显著减少,与对照组相比差异均达到显著水平($P<0.05$)。由于血浆尿素氮、粪氮和尿氮水平反映了饲料蛋白的消化利用情况,因此,该试验说明木寡糖影响了机体蛋白质的代谢状况,导致消化道内饲料蛋白质的分解减弱;而国内有相反的报道。党国华(2004)报道,在蛋鸡饲料中添加 0.02%的木寡糖使其粗蛋白的表观消化率提高了 12.26%,而日增重也比对照组高,表明木寡糖促进了饲料蛋白向动物体蛋白的转化。

2.4.2 调控脂肪代谢

研究表明,木寡糖具有调控动物脂肪代谢的功能,可以减少动物对脂肪的吸收。党国华(2003)报道,在蛋鸡饲料中加入 0.015%和 0.020%木寡糖,持续饲喂 62 d 后,其全蛋胆固醇含量与对照组相比分别降低了 7.13%和 9.14%($P<0.05$)。Hsu 等(2004)则发现,

饲料木寡糖能显著降低小鼠血清甘油三酯含量,但并未发现血清总胆固醇有显著变化。

3 木寡糖的作用机理

已经证明,哺乳动物产生的唾液淀粉酶、胰淀粉酶等内源性碳水化合物消化酶主要作用于 α -1,4 糖苷键,而对寡糖的糖苷键不能发挥作用或分解能力较弱(杨曙明,1999;Gibson 等,2000)。由于肠道内的消化酶不能水解 β -1,4 糖苷键,因此,木寡糖不会在胃肠道上段被消化酶水解,而会在消化道后段被肠道微生物发酵,并且木寡糖能够被肠道微生物很好地利用(Cummings 等,2001)。木寡糖在肠道内经有益微生物发酵后的主要产物为乳酸、乙酸、丙酸等短链脂肪酸(SCFA)和 CO_2 等气体(Okazaki 等,1990;Gibson 等,2000)。Younes 等(1995)和 Campbell 等(1997a)的研究表明,饲喂木寡糖使小鼠盲肠短链脂肪酸(SCFA)浓度显著升高($P<0.05$)。这些木寡糖的代谢产物可能正是使动物肠道内 pH 值降低的原因。

木寡糖被肠道微生物降解后的产物——SCFA 是一种有益于宿主健康的物质(Buddington 等,2001),其中,丁酸盐被结肠上皮细胞作为首选的能量来源和原料,可以促进结肠上皮细胞的增殖(Roediger,1982;Sakata,1987),这可能是肠粘膜隐窝深度增加的原因。同时木寡糖在肠道内的发酵速度较慢(Smiricky-Tjardes 等,2003),并且持续时间较长,使木寡糖通过消化道的时间相对较长,肠道内容物因此在肠道内长时间停留,从而导致动物肠道组织变厚增生,重量增加,肠壁粘膜变薄,有利于营养物质的吸收。

木寡糖进入动物消化道后不能被消化酶水解,而在肠道内被微生物所利用。研究表明,双歧杆菌含有 D-木糖苷酶,可以特异性的将木寡糖水解为木糖,木糖进而转化为有机酸,而有机酸则成为了双歧杆菌增殖、生长的碳源(苏小冰等,2004),因此,木寡糖可以选择性的促进双歧杆菌增殖。Sharon 等(2004)研究认为,微生物在活细胞上的附着受其表面的外源凝集素调节。同时,Stavric(1992)也报道,双歧杆菌等有益菌阻止病原菌附着在肠粘膜上的机理可能是有益菌与肠粘膜粘附受体的结合达到饱和状态后竞争性的抑制病原菌粘附。Meng 等(1998)则发现,双歧杆菌表面可能拥有一种以上外源凝集素类物质,这种结构使双歧杆菌有比其它微生物更多的与肠粘膜细胞结合的位点,从而有比其它微生物更多的机会与肠粘膜结合。因此,木寡糖不仅能促进双歧杆菌的增殖,还能通过间接途径抑制病原菌在动物肠道内的吸附和定植。

Mortensen(1992)和 Levrat 等(1993)研究发现,血液中的尿素是盲肠微生物蛋白质合成最主要的氮源,血液中的尿素转移到动物肠腔以后被微生物的脲酶水解成为氨而用于其自身蛋白质的合成。而微生物对进入肠腔中的血液尿素的大量利用又形成了肠壁血管与肠腔间尿素的浓度差,在渗透效应的作用下血液中的尿素大量向结肠末端和大肠中转移 (Younes 等, 1995)。由于木寡糖能大量促进动物肠道微生物的增殖,使微生物对尿素需求量大量增加,从而导致动物血浆尿素氮浓度降低,进而使尿中氮排泄量减少;另一方面,由于最终所有的微生物蛋白都要经粪便排出动物体外,因此这就造成了动物粪氮的增加。

木寡糖调控脂肪代谢的机理可能与其增殖肠道有益菌有关。张永福(1999)报道,给 30 周龄的罗曼蛋鸡饲料添加微生态制剂的饲料能使全蛋胆固醇下降 15.91%、脂肪降低 11.7%。关于木寡糖调控动物脂肪代谢的具体机理目前尚不明确,有待于进一步研究。

4 木寡糖在动物生产中的应用

4.1 应用效果

随着木寡糖工业化生产水平的提高和工艺的改进,木寡糖在动物生产上得到了广泛的应用。研究发现,在蛋鸡饲料中添加 0.015%~0.02%的木寡糖能极显著提高产蛋率,降低料蛋比 ($P<0.01$) (党国华等, 2003)。其它试验也发现,仔猪和肥育猪饲料中添加 0.17%的木寡糖添加剂可以极显著提高仔猪和肥育猪的生产性能,提高经济效益(勇强,2004)。

肠道大肠杆菌和沙门氏菌被认为是造成动物腹泻的主要细菌 (Levine,1987;Bhan 等,1989)。由于木寡糖可以大量增殖动物肠道内的有益菌,并且抑制大肠杆菌和沙门氏菌等有害菌在动物肠道内的吸附、定植,因此木寡糖对于降低动物腹泻率和减少动物疾病发生具有一定的效果。蒋正宇等(2005)报道,在肉鸡饲料中添加木寡糖可以降低其死亡率。杨廷桂等(2005)在肉鸭上的研究也得到了相同的结果。

杨廷桂、蒋正宇(2005)研究发现,木寡糖替代部分抗生素应用于畜禽生产时效果比较理想,这可能是抗生素与木寡糖有一定的协同效应。

此外,由于木寡糖具有纯正的甜味,因此其对动物有一定的诱食作用。在饲料中添加木寡糖可以改善饲料的适口性,增强动物的食欲。

4.2 应用注意事项

目前,木寡糖在动物生产上的应用方式主要是在动物饲料中添加木寡糖产品。苏小冰等(2003)研究表明,动物摄入 0.7 g 木寡糖就可以达到摄入 8 g 果寡糖或 15 g 低聚异麦芽糖时才能达到的效果,可见木寡糖具有极高的效率。但对于其添加剂量应视动物种类、年龄、生理状况、饲养环境和饲养管理方式等不同而有所差异。如果添加量不足则无法体现其效果,但如果添加过量则容易适得其反,造成动物拉稀、胀气等。不同的研究中木寡糖的添加剂量差异较大,木寡糖在肉鸡和蛋鸡饲料中的添加剂量为 0.005%~0.02% (党国华,2003;蒋正宇,2005),而在小鼠饲料中的添加剂量为 6%~7.5% (Campbell 等,1997a;Hsu 等,2004);但是对于木寡糖在猪和反刍动物饲料中的适宜添加剂量未见报道。木寡糖在动物饲料中添加剂量的不同可能与木寡糖产品性状、饲料原料中的木寡糖含量、畜禽品种有关,但其适宜添加剂量还有待于研究确定。

日本 Suntory 公司最早开始木寡糖的工业化生产,我国在“九五”期间开始对木寡糖的工业化生产进行研究,并于 2003 年开始生产饲用木寡糖。目前,木寡糖饲料添加剂在动物生产中的应用研究尚不多,实践资料的积累也较少,因此其在动物生产上的应用推广还需要做大量的工作。

5 结语

木寡糖作为一种新型的饲料添加剂因其独特的营养生理特性而日益成为最具潜力的动物保健品和抗生素替代品。然而木寡糖的研究历史还很短,且在畜禽上应用的报道还较少,尚有许多问题没有被认知。因此,木寡糖的研究方向应从以下几个方面考虑:①针对木寡糖在猪和反刍动物上的应用进行系统研究,了解其对动物营养生理、肠道微生态、免疫机能等的影响;②对木寡糖影响动物肠道菌群、营养物质代谢和免疫机能的确切机制作进一步研究,为木寡糖的合理应用提供依据;③进一步进行大规模试验,以确定不同纯度木寡糖产品在不同动物饲料中的适宜添加剂量,为在饲料工业中合理使用木寡糖提供参考。

(参考文献 38 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:王 芳,xfang2005@163.com)

饲料抗氧化剂作用机理及其活性评价方法研究进展

魏金涛 齐德生 张妮娅

饲料内的脂类化合物在储存过程中不断的进行氧化反应,造成饲料的感光性质下降、营养价值降低、储存期缩短和适口性下降,氧化严重的可以导致饲料酸败、蛋白质破坏和色素氧化,而且还具有一定的毒性,对畜禽造成一定程度的危害,常常给饲料行业和畜禽养殖业带来较大的损失。抗氧化剂(Antioxidant)是一类能够有效阻止或者延缓脂类化合物自动氧化的物质,是指在相对可氧化底物(糖类、脂质、DNA 或蛋白质等)浓度更低的情况下,能有效地延缓或阻止底物发生氧化反应的物质(Halliwell, 1990),是饲料工业生产中不可缺少的一种添加剂。但目前对抗氧化剂作用机理及其活性评价方法的研究尚不多见,本文就饲料用抗氧化剂的作用机理及其活性的评价方法做一综述。

1 饲料抗氧化剂的作用机理

1.1 饲料中油脂的氧化过程

在有空气存在的情况下,油脂的氧化反应主要有自动氧化反应、光氧化反应、酶催化反应、金属催化氧化反应 4 种类型,其中自动氧化反应是食用油脂和有机食品品质劣变的最主要原因。脂类的自动氧化反应极为复杂,从理论上讲,它是一个自由基链式反应:①不饱和脂肪酸的自动氧化产物是氢过氧化物;②自由基的清除剂能阻止或延缓脂类的自动氧化,相反,自由基的诱发剂能加速自动氧化反应;③90%以上的亚油酸自动氧化产物共轭化了,且其中一个双键变成了反式。

1.2 自由基清除剂

自由基又称游离基,是外层轨道含有未配对电子的原子、原子团或者特殊状态的分子的总称,是携有单电子的、活性极高的化学质点(Fang, 2002)。自由基以氧自由基为主,主要包括:超氧阴离子自由基、羟自由基、单线态氧、过氧化氢以及由此衍生的氢过氧基、

烷氧自由基、烷基过氧化物自由基、氢过氧化物等。自由基氧化及其中间产物严重损害生物膜、酶、维生素、蛋白质及活细胞功能,其中一些还是公认的致癌物质(Marx, 1987)。饲料中的油脂可以自动氧化产生一定量的自由基,通过与油脂或单质氧作用,或相互作用加剧了油脂氧化链式反应的传递速度,对油脂的氧化起到了推波助澜的作用。

一些抗氧化剂可以作为自由基清除剂,这些抗氧化剂能借助键的均裂,释放出体积小、亲合性很强的氢自由基,被链式反应生成的自由基俘获而生成分子态化合物,将高势能、极活泼的自由基转变为较稳定的分子,从而中断了链式反应的传递,阻止了油脂被进一步氧化。作为自由基清除剂的抗氧化剂必须具备两个条件:一是它本身给出氧自由基的均裂能较低,即极容易给出氢自由基;二是它自身转变成的自由基较油脂氧化链式反应生成的自由基更能稳定存在。

酚类饲料抗氧化剂,如没食子酸丙酯、丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯、叔丁基对苯二酚及生育酚等主要是通过抽氢反应产生较稳定的苯氧自由基来终止链式反应。当活泼氢与自由基结合,酚类抗氧化剂就可以起到清除自由基的作用,脱氢以后,酚变成自由基,而且脱氢后体系比较稳定。酚类母体分子在抽氢后生成苯氧自由基,苯氧自由基的活性越强,苯氧自由基越稳定,抗氧化剂清除自由基的活性越强(Wang 等, 2001; 李新芳等, 2005)。茶多酚也属于酚类化合物,它含有多个游离酚羟基,能提供氢质子与体内自由基结合,达到清除自由基的目的,并在与自由基反应的过程中,分子内形成氢键,生成稳定的自由基中间体,抑制原来的自由基链式反应,从而保护生物体免遭自由基的损伤(林春兰等, 2002)。黄酮类饲料抗氧化剂可以视为酚类饲料抗氧化剂的衍生物,可以通过酚羟基与氧自由基反应(Robak 等, 1988; Lu 等, 2001)形成共振稳定的半醌式自由基而中断链式反应,因此共振半醌式自由基的稳定性与抗氧化剂活性成正相关。茶多酚(PT)可以提供活泼氢,能将氢自由基提供给不饱和脂肪酸,过氧游离基形成氢过氧化物,阻止脂肪酸形成新的自由基(姜绍通等, 1999)。甾醇类

魏金涛,华中农业大学动物科技学院,430070,武汉。

齐德生(通讯作者)、张妮娅,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-07

抗氧化剂也是这类自由基清除剂,它的作用模式是侧链上的烯丙基甲基上给出一个氢原子(传递给过氧化物自由基),而后异构化变成一个相应的较氢过氧化物更稳定的烯丙基自由基。大蒜提取物也是由于其成分分子中有亚甲基亚砷及烯丙基结构,可以提供活泼氢与自由基反应,自身形成自由基共振杂化被稳定(李爱军等,2001)。维生素E是天然生育酚的化合物,是生育酚、三烯生育酚以及能够或多或少地显示d- α -生育酚活性的衍生物的总称(Bramley等,2000),它也是一种自由基清除剂,通过清除氧自由基或干扰氧化物链式反应来阻止氧化反应,保护脂质膜免遭自由基攻击,是最重要的脂溶性断链型抗氧化剂。维生素E是氧自由基的直接清除剂,与GSH-Px协同作用作为脂质过氧化作用的阻断剂。在大多数情况下,维生素E的抗氧化作用是与脂氧自由基或脂过氧自由基反应,向它们提供氢离子,使脂质过氧化链式反应中断(Thomos等,1996;Korotdova等,2004;刘成梅等,2005)。

1.3 还原保护剂

还原保护剂通过自身被氧化,除去弥漫于饲料中的氧气而延缓氧化反应的发生。可以作为还原保护剂的化合物主要有抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、异抗坏血酸、异抗坏血酸钠等(王绍美等,2000;黄绍华等,1999)。这些物质具有极强的还原性,与饲料中的氧气有极强的亲和力,并与其发生化学反应除去饲料中的氧气,自身被氧化为脱氢抗坏血酸和半脱氢抗坏血酸,在氧存在条件下,脱氢抗坏血酸和半脱氢抗坏血酸又不可逆的降解为二酮古罗糖酸,最终分解为草酸和苏糖酸。这类抗氧化剂往往还对其它抗氧化剂具有一定的协同作用。孟杰等(2001)试验表明,维生素C对黄芩提取物有一定的协同抗氧化作用。莫凤奎等(1997)认为,维生素C对维生素E的抗氧化作用具有明显的协同作用。王绍美等(2000)还认为,维生素C对茶多酚的抗氧化作用有显著的协同作用。此外,有研究表明,大量的维生素C可以起到抗氧化的作用,但是少量的维生素C却起到促氧化的作用,主要是因为维生素C在铁离子等过渡金属离子存在的条件下,可以诱发脂质的过氧化反应(Hama等,1989)。

1.4 金属离子清除剂

饲料中的金属离子可以给畜禽提供微量元素营养,在饲料的加工过程中饲料接触金属容器,可以使饲料增加一些金属离子,这些金属离子,特别是重金属,具有二价或更高价态,且在它们之间有合适的氧

化还原电势(例如钴、铜、铁、镁等)可以缩短链式反应引发期的时间,加快饲料中脂类化合物氧化的速度。已经证明,金属和金属盐的卟啉环络合物浓度为 10^{-8} mol/l时产生强氧化效应。含有氧配位原子的络合剂可以作为抗氧化剂,因为它们可以和金属离子络合后降低氧化还原电势,稳定金属离子的氧化态,有效的抑制金属离子的促氧化作用。Aruomo等(1990)和张天秀等(1998)均认为,EDTA是一种较好的防霉促褐变的抗氧化剂。另外,柠檬酸、多磷酸盐、卵磷脂等也是这类抗氧化剂。

1.5 其它抗氧化剂

有些抗氧化剂的作用机制兼具多重特性。磷脂既有络合金属离子清除氧化强化剂的作用,又有通过键的均裂析出氢自由基,消除链式反应自由基的作用。美拉德反应的中间产物——还原铜也具有这种双重特性,不但借助键的均裂给出氢自由基,而且能够清除氧化强化剂金属离子。还有些抗氧化剂,如畜禽体内的超氧化物歧化酶,能将过氧化物自由基催化生成分子态的物质,避免这些自由基参与油脂氧化链式反应的传递,中止了链式反应,从而起到抗氧化作用;但它本身只起催化作用,不同于上述各类抗氧化剂的作用机制。畜禽体内的动脉粥样硬化就是由于这种超氧化物歧化酶(SOD)数量减少,致使脂肪沉积于动脉管壁而导致动脉粥样硬化。有些抗氧化剂却是通过阻挡空气中的氧气进入油脂内部,保护油脂免受氧化;或者抑制油脂表层上的空气对流,减少氧气渗透到油脂内部,而起到抗氧化作用,如甲基硅酮在油脂表面形成一惰性物理屏障层,阻止空气进入油内。

2 抗氧化剂活性评价

评价饲料抗氧化剂抗氧化活性的方法有很多种,具体有:①在指定的时间测定氧化产物或官能团的浓度或者吸光度值;②测定反应的速率;③测量诱导期(延滞期)或氧化达到一定程度所需的时间;④测量速度的积分(即动力学曲线下的面积);⑤测定被测物产生与标准抗氧化剂相对作用的浓度。这些方法都是为了说明饲料抗氧化剂在特定条件下具有抑制底物氧化或者清除自由基的能力。

2.1 抗氧化剂作用的底物

以抗氧化剂抑制脂质氧化为基础的测量抗氧化活性的方法使用最多。常使用纯的甘油三酸酯、植物油(红花油、葵花油、大豆油、橄榄油等)、鱼油或猪油作为氧化反应的底物,也使用磷脂或脂蛋白作为底物。海产品油中富含多不饱和脂肪酸,能降低血清甘油三

酸酯和胆固醇含量,减少血栓症、心脏病、高血压以及其它的炎症和自身免疫性疾病的发生,因此也常使用海产品油作为底物(Nieto等,1993)。Satue等(1995)用不同商业来源的橄榄油作为底物研究天然抗氧化剂的抗氧化活性也得到了很好的结果。

多不饱和脂肪酸对氧化变质高度敏感,也常用作测定天然抗氧化剂活性的底物,如亚油酸。为了避免得到重复性的结果,选择底物时应优先考虑单一的物质,如亚油酸或亚油酸甲酯。不推荐使用植物油或血浆等生物试样作为底物,因为它们是混合物,提供完全相同的底物是不可能的。此外,底物中含有的抗氧化剂(如植物油中常含有VE)也能参与测试过程,干扰测定。但是实际测定中常使用植物油等脂质混合物,因为它们是与真实食品有关的脂质成分,因此,实际操作中应根据具体的测试方法选择合适的底物和测试体系。

2.2 化学方法检测抗氧化剂活性

化学检测主要是测定饲料中油脂被氧化后的产物的量,主要的测定指标有脂肪酸值(酸价)、过氧化值、TBA值。

饲料中的游离脂肪酸用氢氧化钾标准溶液滴定,每克饲料消耗氢氧化钾的毫克数即为饲料的酸价(Acid value, AV)。一般对动物源性饲料使用“酸价”这个名称,而对谷物类饲料原料测定时不用“酸价”这个名称,常用“脂肪酸值”。脂肪酸值(Fatty Acid Value)是指100 g样品消耗的氢氧化钾的毫克数。但是无论是“酸价”还是“脂肪酸值”,实质都是用较低浓度的强碱去中和弱酸(以酚酞为指示剂)。在饲料原料中都含有一定量的脂肪类物质,如果发生变质,其所含脂肪便会分解产生游离脂肪酸,“酸价”和“脂肪酸值”升高。但是酸价的化学本质是脂肪水解产物的多少,指的是游离脂肪酸从甘油三酸酯上脱离的程度,而并不是脂肪氧化产物的数量(张本军等,2004)。

饲料在储藏的过程中,其中的油脂在脂肪酸酶、微生物和空气中氧气的作用下产生过氧化物。过氧化物是油脂变质过程中的中间产物,是油脂酸败的初期标志。过氧化物进一步氧化分解,最后分解成为各种低分子的醛、酮、羧酸及其它氧化物,使饲料中的油脂酸败。挥发性的醛、酮等物质使酸败的脂肪变色、变味,使其完全失去饲用价值。饲料中过氧化物的含量通常以过氧化值来表示,所以,人们也常用过氧化值

(Peroxide value, PV)这个指标来判断饲料的新陈代谢程度和变质情况,过氧化值随着饲料储藏温度和储藏时间的变化而发生不同的变化。过氧化值虽然能够反映脂肪氧化酸败的初级程度,但它只说明脂肪氧化的中间产物——羰基过氧化物的积累程度,这些过氧化物一般不稳定,容易进一步发生其它氧化反应生成低分子化合物,导致脂肪完全酸败,此时过氧化值却不一定高,因此也具有局限性。

TBA值是指利用脂肪的主要氧化终产物——丙二醛与硫代巴比妥发生呈色反应,并在532 nm处有特征吸收,利用吸收强度和丙二醛的浓度在一定范围内呈线性关系,可用来测定脂肪氧化程度的方法,是反映肉类制品在贮藏过程中氧化变质程度的直接指标,也是反映肉类食品安全性的一个重要指标。此方法在西方国家普遍使用,常用于生肉鲜度的测定,在饲料工业中也可以使用。植物器官衰老或在逆境条件下遭受伤害,往往发生膜脂过氧化作用,膜脂氧化的最终产物也是丙二醛。由于TBA值测定的是油脂氧化的最终产物,因此用TBA值去评价抗氧化剂的抗氧化活性是比较合理的。

2.3 清除自由基能力的评价

清除自由基能力评价的方法很多,如ABTS法、DMPD法、DPPH法、Fremy自由基和galvinoxyl法(Peter等,2001;王会等,2006)以及CuSO₄-VC-H₂O₂酵母悬浮液体体系化学发光检测法、次黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶-鲁米诺体系化学发光检测法(杨广花,2004;蔡志强等,2004)。

ABTS法最初用于测定组织样品中血红蛋白的含量,后来这个方法被Miller等(1993)加以改进,用于测定生物样品的抗氧化活性,并且广泛应用于食品和天然水溶性酚类物质抗氧化活性的测定。ABTS法广泛用于评价抗氧化剂清除自由基的能力,此法快速简单,可用于常规测定。Fogliano等(1999)提出的DMPD法与ABTS法类似,即在酸性条件下,DMPD(N,N-dimethyl-p-phenylenediamine)可被ABAP、FeCl₃、CuCl₂、H₂O₂氧化,生成稳定的DMPD^{•+},它在505 nm处有最大吸收峰。根据加入抗氧化剂后吸光度的变化可测得样品清除自由基的能力。DPPH[•]被广泛用于定量测定生物试样、酚类物质和食品的抗氧化能力。DPPH[•](2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-二苯代苦味酰基苯基)是一种稳定的自由基,其乙醇溶液显紫色,在

515 nm 处有最大吸收峰。当有供氢能力的抗氧化剂存在时(如酚类),DPPH·溶液的颜色变浅,吸光度值变小,根据吸光度的变化可测得抗氧化剂的活性。娄红祥等(2004)利用 DPPH 自由基捕获分析了蛇葡萄根中芪类化合物的抗氧化活性。叶辉等(2004)用 DPPH 法对老鹰茶提取物抗氧化作用进行了研究,结果表明,DPPH 法在研究抗氧化剂的活性方面是可行的。Freymy 自由基和 galvinoxyl 法是根据稳定的 Freymy 自由基(potassium nitroso disulphonate,五硫化二钾)溶于水,合成的过氧自由基 galvinoxyl [2,6-di-tert-butyl-a-(3,5-di-tert-butyl-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)-p-tolyloxy]溶于乙醇,它们能与供氢体反应,分别用于测定茶叶中的水溶性和脂溶性抗氧化剂的活性。自由基浓度用电子自旋共振仪(ESR)测定,根据自由基浓度的变化可知抗氧化剂的活性。杨广花(2004)及蔡志强等(2004)使用超微弱发光仪,采用 $\text{CuSO}_4\text{-VC-H}_2\text{O}_2$ 酵母悬浮液体系化学发光检测法测定发光强度,比较几种天然抗氧化剂清除 OH·的能力;采用次黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶-鲁米诺体系化学发光检测法测定发光强度,比较几种天然抗氧化剂清除 $\text{O}_2\cdot$ 的能力,结果发现,几种天然抗氧化剂都具有清除 OH·和 $\text{O}_2\cdot$ 的能力。

2.4 抗氧化剂活性的理论评价

近年来发现,除了传统的试验评价抗氧化剂活性的方法之外,理论计算也是一种可行的方法,可以作为试验研究的辅助手段预先评估各种抗氧化剂的抗氧化活性(Zhang 等,1999;Zhang 等,2003)。用理论评价的方法评价抗氧化剂活性首先要选取合适的理论参数来表征抗氧化剂的活性。目前普遍认为酚类抗氧

化剂通过两种反应机制清除自由基,即在非极性溶剂中,倾向于一步抽氢反应;在极性溶剂中倾向于质子转移伴随的电子转移反应。研究发现,O-H 键解离能(Bond Dissociation Enthalpy,简称 BDE)是适合的表征自由基抽氢反应速率的理论参数(张红雨等,2000),电离电势(ionization potential,IP)表征反应速率取决于母体分子的给电子能力(王兰芬等,2003)。由于 BDE 是基本的物化参数,有许多研究工作者致力于寻找准确、简便的计算 BDE 的方法。Wright 等(1997)又提出了一种组合的密度泛函方法(Density Functional Theory,简称 DFT),具体方法是用半经验量子化学方法优化分子结构,并计算振动频率和零点振动能(ZPVE),校正系数为 0.947,然后用 DFT 方法计算分子的单点电子能量(SPE),最后根据公式计算 BDE。

3 结语

饲料中的脂类物质不断地进行氧化反应,氧化生成的胆固醇氧化物导致酯类酸败、蛋白质破坏和色素氧化,造成饲料的变质。为了保证饲料的储存时间和品质,抗氧化剂已经成为饲料工业生产中不可缺少的一种添加剂,其作用效果和带来的经济效益也越来越多地受到人们的欢迎和重视。但是饲料中添加抗氧化剂的抗氧化机理研究尚不透彻,其活性的检测方法尚不完善,各种抗氧化剂具体的添加量也不确定,而且饲料的成分很多,被氧化的原因和过程都很复杂,添加单一的抗氧化剂未必可以起到预期的目的等,这些都还需要进一步地去系统研究。

(参考文献 38 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

· 信息采撷 ·

国外如何改善养殖肉牛的品质

日本神户的牛肉软嫩可口,香而不腻,堪称美味,据说这种牛是喝着啤酒、听着音乐长大的。最近,一家澳大利亚养殖公司也开始效仿,不过他们用的是红葡萄酒,据说效果比啤酒更好。每天每头牛在饲喂的时候可以享用 1 L 由卡勃耐红葡萄酒和墨尔乐红葡萄酒(都是无甜味的葡萄酒)混合而成的葡萄酒,持续 60 d。每天 1 L 的量不足以把牛灌醉,相反它们在喝酒后不仅食欲大增,而且更加温顺了;另外,牛肉的颜色和保鲜性有了很大的改善,口感上更甜了,这可能得益于红葡萄酒中的抗氧化成分。牛长到一定程度时会出现食欲减退,红葡萄酒不仅具有增进食欲的功效,而且可以改善血液循环,可以帮助牛减轻“精神压力”,使其“安心长肉”。

以色列农学家建议,给肉牛喂大蒜味草料,这样做不仅可以减少牛感染虱子的几率,还能使牛肉更加美味。带大蒜味的草料会使牛散发出大蒜气味,有助于减少虱子对牛的侵扰;没有饲喂大蒜味草料的牛感染虱子的几率比饲喂大蒜味草料的牛高 3 倍。

维生素 E 对溆浦鹅超饲养期 生长性能和产肥肝性能的影响

范文娜 刘 辉 何瑞国

鹅肥肝是一种高级营养食品,质地细嫩、味道鲜美、脂香醇厚、营养丰富,是世界公认的三大美味(鹅肥肝、鱼子酱、松茸蘑)之一。经育肥后的鹅肥肝,其营养成分发生了很大变化,脂肪含量高达 60%~70%,不饱和脂肪酸约占脂肪酸总量的 65%~68%,易水解为能被人体吸收利用的物质,可降低人体血液中的胆固醇水平,减少胆固醇物质在血管壁上的沉积。

维生素 E 是营养性防御系统之一,是体内重要的抗氧化剂,能被动物完整的吸收,且可以在体内贮存。维生素 E 不仅可以消除自由基,还可以去除形成脂过氧化物的潜在来源(Kennedy, 1998),从而促进超饲养过程中的溆浦鹅的生长性能,特别是产肥肝性能。

我国关于超饲养填饲日粮的研究及关于维生素 E 在超饲养生产鹅肥肝中的应用报道很少。何瑞国、刘祥友等^[1]、李翔等^[2]研究了不同类型的日粮对鹅肥肝生产性能的影响。

本试验的研究目的是研究不同的维生素 E 水平在超饲养生产鹅肥肝过程中对溆浦鹅生长性能和产肥肝性能的影响。

1 材料与方法

1.1 试验设计

采用单因子梯度设计方法,将 150 只 1 日龄溆浦鹅(公雏)随机分成 5 组,每组 3 个重复,每个重复 10 只。试验日粮是在基础日粮基础上添加维生素 E 0(试验 1 组,即对照组)、50(试验 2 组)、100(试验 3 组)、200

(试验 4 组)、400 IU/kg(试验 5 组)。生长期(98 d)和预饲期(7 d)、超饲期(18 d)基础日粮组成及营养水平见表 1、表 2。维生素 E 添加水平设计见表 3。

表 1 生长期、预饲期基础日粮组成及其营养水平

项目	组成
原料(%)	
玉米粉	65.50
豆粕	26.50
麸皮	4.00
4%预混料	4.00
营养水平	
代谢能(MJ/kg)	11.79
粗蛋白(%)	19.48
钙(%)	1.00
总磷(%)	0.79
非植酸磷(%)	0.54
蛋氨酸(%)	0.40
赖氨酸(%)	0.99

注:1.营养成分含量计算参照中国饲料成分及营养价值表 2005 年第 16 版;

2.玉米粉为生长期饲喂,玉米粒为预饲期饲喂。

表 2 超饲期基础日粮组成及营养水平

原料	组成
玉米(%)	99
预混料(%)	1
代谢能(MJ/kg)	13.18
粗蛋白(%)	9.3

表 3 维生素 E 添加水平设计

组别	试验 1 组	试验 2 组	试验 3 组	试验 4 组	试验 5 组
添加量(IU/kg)	0	50	100	200	400

注:基础日粮中含有 10 IU/kg 维生素 E,以满足试验动物的基本需要。

1.2 饲养管理

预饲前先对圈舍、饮水器具、料槽、料桶等进行消毒,并用球虫宁进行驱虫。预饲期间,供试鹅自由饮水、采食,同时将砂粒洗净后放入盆中任其采食,并饲喂充足的青饲料,以锻炼其消化道。鹅舍要通气良好,保持清洁、安静和少光,要保证鹅有充足的清洁饮水。超饲过程中用食指伸入鹅的口腔按压鹅舌的基部,将填饲

范文娜,华中农业大学动物科技学院,430070,武汉市狮子山街特 1 号。

刘辉、何瑞国(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-30

★“十一五”湖北省科技攻关计划“良种鹅规模化繁育、饲养及产品加工的关键技术与开发”重大专项项目(2005AA205A08)

机的填饲管插入鹅的口腔,沿咽喉、食道直插至食道膨大部的中端(两锁骨前缘连线的中点位置)。填饲员右脚踩填饲开关,玉米粒从填饲管中向食道膨大部推送,边填料边退出填饲管,自下而上填饲,直至填饲玉米距咽喉约 5 cm 为止。超饲后期,因鹅代谢加强,肥肝逐渐形成,鹅十分脆弱,要轻提轻放,减少对鹅的惊扰。

1.3 超饲时间和次数设计(见表 4)

表 4 超饲时间和次数

试验期(d)	超饲次数	超饲时间
1~2	2	9:00 19:00
3~8	4	9:00 15:00 21:00 2:00
9~12	5	7:00 11:00 19:00 23:00 3:00
13~18	6	7:00 11:30 15:00 19:00 23:00 3:00

1.4 样品采集与分析

1.4.1 生长性能测定

在预饲期和超饲期末将试鹅个体空腹称重,统计各组的饲料消耗量,计算体增重、料重比。

1.4.2 屠宰性能指标测定

活重:指在屠宰前禁食 12 h 后的重量。

屠体重:指肉禽屠宰时放血、拔羽后的重量(湿法拔毛需沥干后再称重)。

腹脂重:腹部和肌胃周围脂肪的重量。

肌间脂肪宽:大腿切离处内侧、胸肌侧突部位肌间的脂肪带宽度,用游标卡尺测量。

皮下脂肪厚:背部靠近尾脂腺的脂肪宽度,用游标卡尺测量。

胸肌重:左右两侧胸大肌、胸小肌和第三胸肌的重量。

腿肌重:左右两侧大、小腿肌的重量。

半净膛重:屠体去气管、食道、食道膨大部、肠、脾、胰和生殖器官,留心、肝(去胆)、肺、肾、腺胃、肌胃(除去内容物及角质膜)和腹脂(包括腹部板油及肌胃周围的脂肪)的重量。

全净膛重:半净膛重去心、肝、腺胃、肌胃、腹脂的重量。

屠体性能指标的计算公式:

半净膛率(%)=半净膛重/屠体重;

全净膛率(%)=全净膛重/屠体重;

屠宰率(%)=屠体重/活重;

腹脂率(%)=腹脂重/全净膛重;

胸肌率(%)=胸肌重/全净膛重;

腿肌率(%)=腿肌重/全净膛重。

以上各计算指标均参照中华人民共和国专业标准(ZBB43001-85)、全国家禽育种委员会 1982 年公布的《家禽生产性能指标名称和计算方法试行标准》中与鸭、鹅有关的部分内容。

1.4.3 产肥肝性能指标测定

取肝:屠宰前 1 d 下午开始停食 18 h,供应充足的饮水,第 2 d 先称重,屠宰后挂起把血沥干。

烫毛脱毛:屠体浸入 60~70 °C 水温中,手工脱毛。屠体放在 4 °C 冰箱中预冷,使屠体稍稍变坚实,剖腹取肝,采用横向剖腹法。

肥肝重:试验鹅屠宰后称取的肥肝鲜重。

料肝比:某一阶段的平均耗料量与平均肥肝重的比值。

肥肝活重比:肥肝鲜重与活体重的比值。

1.5 数据处理

全部试验数据采用 SAS8.0 进行单因素方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 维生素 E 水平对溆浦鹅生长性能的影响(见图 1、2、3、表 5)

由图 1、2、3 和表 5 可以看出,随着维生素 E 添加水平的提高,填饲后的体重和体增重出现先升后降的趋势,料重比出现先降后升的趋势。填饲前体重差异不显著,试验 2、3、4 组填饲后体重分别比对照组增加了 5.78%、7.90%、9.63%,差异不显著($P>0.05$)。体增重最大的是第 4 组,比对照组高 54.02%,差异显著($P<0.05$);试验 2、3 组体增重比对照组分别提高了 36.78%、37.93%,差异不显著($P>0.05$)。试验 2、3、4 组料重比分别比对照组降低了 32.18%、32.35%、32.54%,差异不显著($P>0.05$)。第 5 组填饲后溆浦鹅体重和体增重比对照组降低,料重比反而上升。

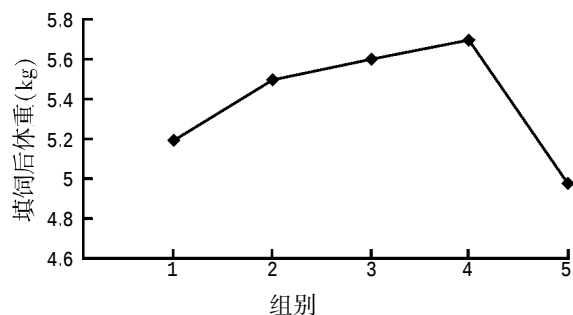


图 1 各组鹅填饲后体重

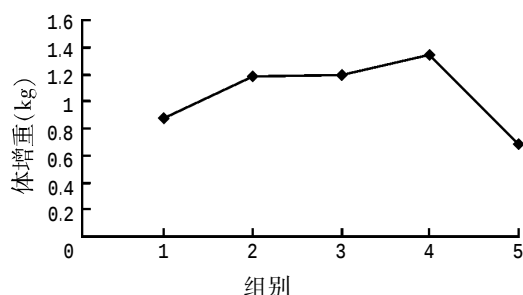


图2 各组鹅填饲后的体增重

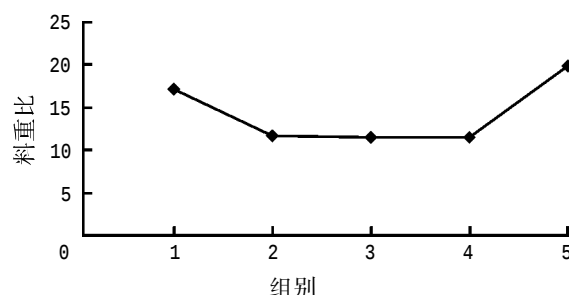


图3 各组鹅填饲后的料重比

表5 试验各组生长性能

项目	试验1组	试验2组	试验3组	试验4组	试验5组
填饲前体重(kg)	4.30±0.25 ^a	4.30±0.21 ^a	4.33±0.29 ^a	4.32±0.31 ^a	4.33±0.32 ^a
填饲后体重(kg)	5.19±0.55 ^{ab}	5.49±0.45 ^a	5.60±0.28 ^a	5.69±0.33 ^a	4.97±0.59 ^b
体增重(kg)	0.87±0.30 ^{bc}	1.19±0.20 ^{ab}	1.20±0.16 ^{ab}	1.34±0.03 ^a	0.69±0.28 ^b
料重比	17.12±8.73 ^a	11.61±2.17 ^a	11.58±2.25 ^a	11.55±1.37 ^a	19.91±9.94 ^a

注:表中数据为平均值±标准差;同行肩标字母相同者表示差异不显著,不同者表示差异显著($p<0.05$)。下表同。

2.2 不同维生素 E 水平对溆浦鹅屠宰性能的影响 (见表 6、7、8)

由表 6 可以看出,试验各组与对照组之间溆浦鹅的屠体重、屠宰率、半净膛重、半净膛率、全净膛重、全净膛率相比差异不显著($P>0.05$),且无规律性变化。添加不同水平的维生素 E 对溆浦鹅屠宰性能影响不大。由表 7 可以看出,各组溆浦鹅的胸肌重、胸肌率、腿肌重、腿肌率的差异不显著($P>0.05$)。试验 4、5 组的胸肌

率、腿肌率高于其它各组,但差异不显著($P>0.05$),说明维生素 E 可以一定程度的提高溆浦鹅肌肉率,改善肉鹅胴体品质。由表 8 可以看出,各组溆浦鹅的腹脂重、腹脂率、皮脂厚、肌间脂肪宽差异不显著($P>0.05$)。但试验各组的腹脂重、腹脂率高于对照组,说明维生素 E 的添加可以一定程度上促进腹脂沉积;试验各组皮脂厚、肌间脂肪宽低于对照组,但差异不显著($P>0.05$),维生素 E 的添加可以降低皮脂厚和肌间脂肪宽。

表6 试验各组屠宰性能

项目	试验1组	试验2组	试验3组	试验4组	试验5组
屠体重(g)	4 810.50±337.64 ^a	4 849.00±477.65 ^a	4 460.40±770.89 ^a	4 647.67±891.11 ^a	4 451.50±881.60 ^a
屠宰率(%)	0.93±0.05 ^a	0.90±0.02 ^a	0.91±0.03 ^a	0.88±0.01 ^a	0.89±0.09 ^a
半净膛重(g)	4 317.72±324.04 ^a	4 438.71±403.71 ^a	4 028.53±739.40 ^a	4 244.93±858.75 ^a	3 930.15±675.87 ^a
半净膛率(%)	0.90±0.03 ^a	0.92±0.03 ^a	0.90±0.04 ^a	0.91±0.04 ^a	0.88±0.02 ^a
全净膛重(g)	3 880.50±305.22 ^a	3 867.75±405.19 ^a	3 612.40±622.85 ^a	3 778.67±622.85 ^a	3 560.50±590.84 ^a
全净膛率(%)	0.81±0.01 ^a	0.80±0.02 ^a	0.81±0.03 ^a	0.82±0.03 ^a	0.80±0.04 ^a

表7 胸肌、腿肌指标

项目	试验1组	试验2组	试验3组	试验4组	试验5组
胸肌重(g)	268.50±57.04 ^a	252.25±36.48 ^a	245.20±41.48 ^a	263.33±47.06 ^a	251.50±29.96 ^a
胸肌率(%)	0.069±0.010 ^a	0.065±0.005 ^a	0.068±0.007 ^a	0.070±0.003 ^a	0.071±0.004 ^a
腿肌重(g)	239.25±38.57 ^a	234.25±21.82 ^a	201.80±11.03 ^a	250.67±37.74 ^a	226.25±40.18 ^a
腿肌率(%)	0.061±0.005 ^a	0.061±0.010 ^a	0.057±0.008 ^a	0.067±0.011 ^a	0.064±0.008 ^a

表8 腹脂重、腹脂率、皮脂厚、肌间脂肪宽指标

项目	试验1组	试验2组	试验3组	试验4组	试验5组
腹脂重(g)	213.75±26.18 ^a	264.00±88.46 ^a	232.75±76.98 ^a	266.00±70.41 ^a	251.50±55.15 ^a
腹脂率(%)	0.055±0.007 ^a	0.068±0.022 ^a	0.057±0.017 ^a	0.068±0.023 ^a	0.064±0.009 ^a
皮脂厚(cm)	0.92±0.18 ^a	0.83±0.15 ^a	0.76±0.11 ^a	0.83±0.03 ^a	0.75±0.26 ^a
肌间脂肪宽(cm)	3.40±0.49 ^a	3.31±0.85 ^a	2.67±0.67 ^a	2.94±1.02 ^a	2.74±0.34 ^a

2.3 不同维生素 E 水平对溆浦鹅产肥肝性能的影响 (见表 9, 图 4、5、6)

由表 9 和图 4、5、6 可以看出, 随着维生素 E 添加水平的提高, 平均肥肝重、肥肝活重比有先升高后下降的趋势; 料肝比有先下降后升高的趋势。试验 3、4 组平均肥肝重较大、料肝比最小, 平均肥肝重比对照组分别提高了 23.32%、28.80%, 差异显著 ($P<0.05$); 料肝比分别

比对照组下降了 13.95%、14.14%, 差异显著 ($P<0.05$)。试验 2 组平均肥肝重、料肝比与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$)。试验 4 组的肥肝活重比最大, 比对照组升高 11.52%, 差异显著 ($P<0.05$); 试验 2、3 组肥肝活重比比对照组升高了 4.83%、10.53%, 与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$)。试验 5 组料肝比比对照组上升, 平均肥肝重、肥肝活重比对照组下降, 差异不显著 ($P>0.05$)。

表 9 不同维生素 E 水平对溆浦鹅产肥肝性能影响

项目	试验 1 组	试验 2 组	试验 3 组	试验 4 组	试验 5 组
最大肝重(g)	403	425	515	540	350
最小肝重(g)	315	345	372	381	300
平均肥肝重(g)	349.00±39.93 ^c	385.00±33.30 ^{bc}	430.50±60.31 ^{ab}	449.50±48.68 ^a	323.50±22.71 ^c
料肝比	36.07±3.29 ^a	33.64±1.81 ^{ab}	31.04±2.54 ^b	30.97±1.85 ^b	37.01±2.58 ^a
肥肝活重比	0.070 3±0.003 6 ^{bc}	0.073 7±0.006 1 ^{ab}	0.077 7±0.004 4 ^{ab}	0.078 4±0.003 0 ^a	0.065 5±0.006 7 ^c

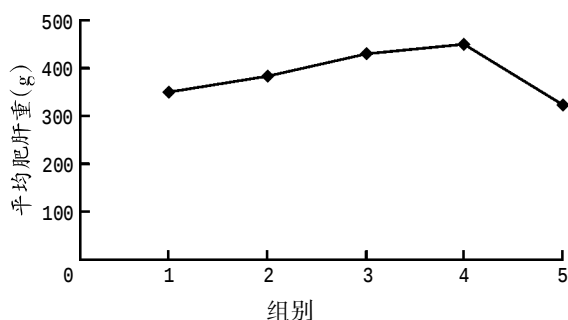


图 4 平均肥肝重

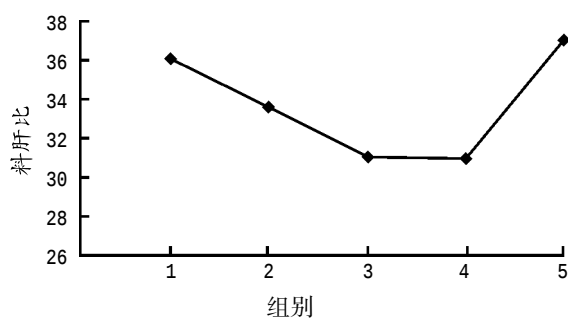


图5 料肝比

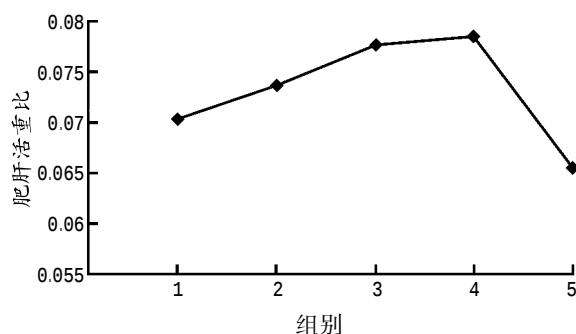


图 6 肥肝活重比

3 讨论

3.1 日粮中添加不同水平维生素 E 对溆浦鹅生长性能的影响

在家禽饲料中添加 VE 可以显著提高其日增重和饲料转化率等生产性能指标 (Bond 和 Boren 等, 1996)。本试验研究表明, 添加维生素 E 可以一定程度的提高体增重, 降低料重比。饲料中添加 200 IU/kg VE 时, 溆浦鹅体增重与对照组相比差异显著 ($P<0.05$); 日粮中添加 50~200 IU/kg VE 时可以一定程度的降低溆浦鹅的料重比。这与吴于明等 (1999)^[3]、刘凤民^[4]在鸡上的试验报道一致。这可能是 VE 可以清除机体内过多的自由基, 从而减少自由基对 DNA 结构的损伤而造成蛋白质合成时基因表达的错误, 从而影响动物机体正常的生长发育速度^[5]; 也可能是自由基引发细胞膜和亚细胞器上的脂质过氧化, 导致蛋白质、酶、激素以及核酸等变性失活及一系列的细胞变性, 必然导致动物生长发育的减缓^[6,7]; 也可能是饲料中添加 VE 可调节 T_3 和 T_4 的浓度在一定的范围内波动, 使甲状腺活动不至于亢进和减弱, 体内营养物质代谢趋于相对稳定, 从而有利于动物的生长^[8]; 也可能是 VE 降低皮质酮的分泌而阻止免疫功能下降, 提高机体的免疫力, 从而减少因免疫力降低而造成的生长发育受阻^[9]。本试验研究表明, 当添加 400 IU/kg VE 时, 得到相反结果, 日增重降低、料重比上升, 这说明生长性能指标与 VE 的添加量有关, 添加量过多对生产性能的提高影响不大, 甚至有副作用。

3.2 日粮中添加不同水平维生素 E 对溆浦鹅屠宰性能的影响

本试验结果表明,维生素 E 对溆浦鹅屠宰性能影响不大。日粮中添加 200~400 IU/kg VE 可以一定程度的提高超饲养期溆浦鹅肌肉率,试验组腹脂重、腹脂率高于对照组,皮脂厚、肌间脂肪宽均低于对照组,以添加 100 IU/kg 效果最好,说明维生素 E 的添加可以促进超饲养期溆浦鹅腹脂沉积,降低皮脂厚和肌间脂肪宽。周林(2000)的试验表明,在肉仔鸡后期日粮中随着维生素 E 添加量的增加,肉仔鸡屠宰率、半净膛率、全净膛率均有降低的趋势。本研究结果与此有些差异,可能与试验动物、日龄、水平设计和试验期的不同有关。刘凤民^[4]研究表明,日粮中不同水平的维生素 E 对寿隐杂交鸡的各项屠宰性能指标均无显著影响($P>0.05$),但随维生素 E 的添加,可以降低肌间脂肪宽和皮脂厚,与本试验结果一致。郑桂红^[10]研究表明,在饲料中添加 200 mg/kg VE 对固始鸡腿肌率的作用效果显著高于添加 100 mg/kg VE 的($P<0.05$)。

3.3 日粮中添加不同水平维生素 E 对溆浦鹅产肥肝性能的影响

本试验研究表明,在超饲养过程中,日粮中添加 100、200 IU/kg 维生素 E,可以显著提高肥肝重、肥肝活重比,降低料肝比,与对照组相比差异显著 ($P<0.05$),这说明添加 100、200 IU/kg 维生素 E,可以显著提高溆浦鹅平均肥肝重。维生素 E 在肥肝形成中起抗氧化作用,保护 PUFA 尤其是亚油酸的氧化。自由基易使细胞膜结构组分中的多不饱和脂肪酸氧化,产生过氧化脂质,这个过程主要发生在含脂质丰富的细胞膜和亚细胞膜上^[11,12]。VE 有和细胞脂质膜上活性氧结合的倾向,减少了它和不饱和脂肪酸的结合而引起脂质过氧化物在肝脏中蓄积,从而使 β 氧化途径降解的脂肪酸远少于生成的脂肪酸,造成脂肪在肝细胞中大量堆积。同时,维生素 E 在吸收与代谢的过程中,使血浆中 VLDL 升高时,也影响肝中脂肪的运出,使脂肪在肝中积存^[13,14]。周敏^[15]的研究表明,在樱桃谷鸭超饲养饲料中添加 90 IU/kg 维生素 E,可以显著降低樱桃谷鸭的料肝比,提高肥肝重的结论与本研究结果一致。维生素 E 的抗氧化作用与其浓度有较大关系,低浓度时有抗氧化作用,但当超过其抗氧化作用的浓度时,反而会起到助氧化的作用。在超饲养饲料中添加 400 IU/kg 维生素 E 时,肥肝重、肥肝活重比下降,料肝比反而上升,说明高剂量 VE 对产肥肝性能有抑制作用。向德栋^[16]观察 4 种不同浓度的维生素 E 对体外培养大鼠肝细胞抗脂质过氧化作用影响的结果表明,VE 浓度过大或过小,维生素 E 的抗脂质过氧化作用

均会降低,而合适浓度的维生素 E 对大鼠肝细胞有一定的保护作用。

参考文献

- 1 刘祥友,何瑞国,周庆安,等.糙米对朗德鹅产肝性能影响的研究[J].中国粮油学报,2005,20(6):107~110
- 2 李翔,杨正梅,何瑞国,等.超饲养期糙米型饲料对骡鸭肥肝肥育及脂肪沉积影响的研究[C].中国畜牧兽医学学会学术年会论文集,2004
- 3 芮于明,陈继兰,乔岩瑞,等.0~3 周龄肉仔鸡日粮中维生素 E 的适宜供给量的研究[J].畜牧兽医学报,1999,30(4):17~25
- 4 刘凤民.有机硒和维生素 E 对地方杂交鸡抗氧化和抗热应激性能的影响[D].山东农业大学硕士论文,2004
- 5 谢浩,曾凡坤.维生素 E 和维生素 C 在营养免疫中的作用[J].中国饲料,2002(12):3~7
- 6 高兴兰.维生素 E 防治烧伤后脏器损伤的适宜剂量[J].营养学报,1992,14(4):339~343
- 7 高兴兰.烧伤、创伤后维生素 A、E、C 代谢变化及补给适宜剂量的研究[J].营养学报,1999,21(4):405~408
- 8 傅伟龙,蒋宗勇,徐映才,等.维生素 E 和 C 对高温环境中蛋鸡及血液甲状腺素浓度的影响[J].华南农业大学学报,2000,21(4):61~64
- 9 宋志刚,朱立贤.维生素 E 的研究现状与未来[J].饲料研究,2001(4):16~19
- 10 郑桂红.维生素 E 和维生素 C 对固始鸡 4C 生产性能的影响[D].安徽农业大学硕士论文,2003
- 11 刘晓东,何玲,鲁志博,等.维生素 E 及其联合维生素 C 对老龄小鼠肝细胞凋亡的影响[J].营养学报,1999,21(4):405~408
- 12 薛长勇,张荣欣,郑子新,等.烧伤后维生素 E 的变化及其与脂质过氧化作用的关系[J].营养学报,1991,13(2):97~101
- 13 沈同,王镜岩.生物化学(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1998
- 14 齐顺章.动物生物化学(第二版)[M].北京:中国农业出版社,1996
- 15 周敏.维生素 E 对樱桃谷鸭产肝性能及血液理化指标的影响[D].广西大学硕士论文,2005
- 16 向德栋.维生素 E 对培养肝细胞抗脂质过氧化作用的影响[J].重庆医学,2001,30(6):502~503

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

·信息采撷·

中草药治疗猪流行性感胃

流行性感胃是猪的一种急性呼吸器官传染病。临床特征为突然发病,传播迅速;病猪体温升高到 40~41.5℃,精神不振,食欲减退或不食;肌肉疼痛,喜伏卧;呼吸困难、急速,咳嗽,眼鼻流出分泌物;大便干结呈粒状。如果在发病期治疗或管理不当,则可并发支气管肺炎、胸膜炎等,导致猪死亡率增加。

对此病的治疗,建议采用中草药制剂,其治愈率 100%。其方法是:金银花、连翘、黄芩、柴胡、牛蒡子、陈皮、甘草各 15 g,水煎汤 3 次,拌入饲料喂服。一般 1 剂即可治愈。

本栏目由北京挑战生物技术有限公司协办



饲用 β -甘露聚糖酶的研究及应用

李富伟 周响艳 冯定远

近年来,饲料酶制剂作为一种绿色饲料添加剂,在饲料工业和养殖行业中得到了普遍重视并广泛应用。例如,在以小麦为基础的日粮中添加木聚糖酶,在以大麦为基础的日粮中添加 β -葡聚糖酶,可消除由可溶性的非淀粉多糖(SNSP),如木聚糖和 β -葡聚糖等导致的抗营养作用,提高日粮的消化率,进而提高动物的生产性能;应用植酸酶来消除饲料中植酸的抗营养作用,节约磷酸氢钙,并减轻磷的排放所带来的环境污染等。但是,目前酶制剂在以玉米、豆粕为基础的单胃动物日粮中的应用还非常有限。尽管单胃动物对玉米的消化率较高,但对豆粕的能量利用率仅为50%~60%,单胃动物对豆粕能量的利用率如此低的原因可能是豆粕中含有22.7%左右的半纤维素是不能被单胃动物消化的非淀粉多糖(Stephen,1983)。如能降解或去除这些不可消化的成分就能提高豆粕的饲喂价值(汪傲,1996)。 β -甘露聚糖是非淀粉多糖中的一种,具有较强的抗营养作用。甘露聚糖酶能有效地分解饼粕类饲料中的甘露聚糖,生成甘露寡糖等物质。多数试验研究表明,在玉米—豆粕型日粮中添加 β -甘露聚糖酶可以提高动物的生产性能和健康水平。

1 β -甘露聚糖的抗营养作用

β -甘露聚糖是非淀粉多糖中的一种,它是以1,4- β -D-吡喃甘露糖苷键连结的线状多糖,如果主链某些残基被葡萄糖取代,或半乳糖通过1,6- α -糖苷键与甘露糖残基相连形成分支,则称之为异甘露聚糖,主要有半乳甘露聚糖(galactomannan)、葡聚甘露聚糖(glucomannan)、半乳葡萄甘露聚糖(galactoglucomannan)(Elisabetta等,2000;Puls等,1993)。这些物质构成了植物半纤维素的第二大组分。大多数陆生植物细胞壁的半纤维素主要由木聚糖和甘露聚糖组成,需要很

多酶系协同作用才能完全水解为可溶性糖(Biely等,1992;Hazlewood等,1998a)。

β -甘露聚糖及其衍生物是豆科植物细胞壁固有的组分之一,在豆科植物中的含量约为1.3%~1.6%(Jackson等,1999)。单胃动物肠道中不能分泌相关酶,因而 β -甘露聚糖及其衍生物不能被消化酶分解,从而对动物生产性能造成负面影响。 β -甘露聚糖对单胃动物的抗营养作用表现在以下几个方面:

① β -甘露聚糖及其衍生物在单胃动物的消化道内溶于水后形成凝胶状,使消化道内容物具有较强的粘性。食糜黏性的提高,一方面减少了动物消化酶与饲料中各种营养物质的接触机会,同时使已经消化了的养分向小肠壁的扩散速度减慢,降低了已经消化养分的吸收;此外,食糜黏性的增加还可以造成畜禽粪便含水量和黏稠度增加,影响了畜禽舍和周围的环境。

② β -甘露聚糖具有高的持水活性,可通过其网状结构吸收超过自身重量数倍的水分,改变其物理特性,抵制肠道的蠕动,影响消化。

③ 高亲水性的 β -甘露聚糖与肠黏膜表面的脂类微团和多糖蛋白复合物相互作用,导致黏膜表面水层厚度增加,降低了养分的吸收(Johnson等,1981),表面水层厚度是养分吸收的限制因素。

④ β -甘露聚糖是表层带负电荷的活性物质,在溶液中极易与带相反电荷的养分物质结合,从而影响养分的吸收; β -甘露聚糖还能吸附 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Na^{+} 等金属离子以及有机质,造成这些物质的代谢受阻(李剑芳等,2004); β -甘露聚糖与消化酶、胆盐结合,可降低消化酶的活性,并使胆酸呈束缚状态,导致胆固醇等脂类和类酯吸收减少,同时也影响脂类吸收微团的形成,影响了脂肪的消化吸收。

⑤ 未消化的 β -甘露聚糖等非淀粉多糖可以与消化道后段微生物区系相互作用,造成厌氧发酵,产生大量的毒素(生孢梭菌等分泌的),抑制动物的生长;还可造成胃肠功能紊乱。

李富伟,北京挑战生物技术有限公司,博士,100081,北京海淀区中关村南大街12号。

周响艳、冯定远,华南农业大学动物科学学院。

收稿日期:2006-12-22

总之, β -甘露聚糖不仅阻碍了营养物质的消化吸收,还可以导致动物不同程度的腹泻,最终影响畜禽生长和饲料利用率(Cherbut 等,1995)。

2 β -甘露聚糖酶的作用机理

β -1,4-甘露聚糖酶简称 β -甘露聚糖酶,是一类能够水解含 β -1,4-甘露糖苷键的甘露寡糖和甘露多糖(包括甘露聚糖、半乳甘露聚糖、葡萄甘露聚糖等)的内切水解酶,属于半纤维素酶类。 β -甘露聚糖酶能将广泛存在于豆类籽实中的甘露聚糖等多糖降解为甘露寡糖等低聚糖,不仅消除了甘露聚糖对单胃动物各种营养素的抗营养作用,同时生成的甘露低聚糖在动物肠道中起着重要的调节作用。近年来随着对自然界半纤维素资源的开发应用,微生物 β -甘露聚糖酶的开发和研究进入了一个新阶段。研究表明,在富含 β -甘露聚糖的动物饲料中添加外源 β -甘露聚糖酶可以有效消除 β -甘露聚糖的抗营养作用,从而提高动物的生长性能(Jackson,2001)。针对 β -甘露聚糖的抗营养作用, β -甘露聚糖酶的作用机理主要表现在以下几个方面:

① 降低消化道内容物黏度。甘露聚糖在 β -甘露聚糖酶的作用下降解为甘露寡糖等低聚糖,大大减少了 β -甘露聚糖与水分子的相互作用,从而降低肠道内容物的黏度,有利于营养物质的进一步消化吸收。

② 破坏植物性饲料细胞壁结构,使营养物质与消化酶充分接触。植物细胞中淀粉和蛋白质等营养物质被细胞壁包裹,细胞壁是由纤维素、半纤维素、果胶等组成的一种复杂化合物,单胃动物不能很好地消化这一类物质。饲料中适当地添加能够分解这类物质的酶,可以破坏饲料中存在的植物细胞壁,使营养物质释放出来,提高饲料的营养价值。 β -甘露聚糖是半纤维素的主要组成成分之一,添加 β -甘露聚糖酶可起到降解细胞壁的作用。

③ 改善肠道微生物菌群和保护肠黏膜的完整性。甘露聚糖的降解产物为甘露低聚糖(MOS),它能减少病原菌在肠道的定植,调节动物的免疫反应,保护肠黏膜的完整性,显著地促进动物肠道内以双歧杆菌(*Bifidobacterium*)为代表的有益菌的增殖,最终提高动物的生产性能(毛胜勇,2000)。甘露寡糖作为一种绿色饲料添加剂已经在饲料工业中得到较广泛的应用,甘露寡糖可选择性地抑制有害微生物在肠道中的增殖。微生物病原菌致病时,第一步是结合在消化道肠黏膜表面,这种结合是特异性的,其机理为细菌细胞壁表面蛋白,如植物凝血素(lectin)与动物肠道黏膜上皮细

胞表面糖脂或糖蛋白的糖残基结合。但当肠道内存在一定量的 MOS 等寡糖时可结合细菌的植物凝血素,而减少了细菌与肠黏膜上皮细胞结合的机会,这样外源病菌就会被排出体外,根据竞争性排阻作用,促进有益菌在肠道中增殖。MOS 等类寡糖能促进细胞分泌含甘露糖基的糖蛋白,这些糖蛋白可结合侵入机体的细菌,从而调节机体的多级免疫反应,提高动物对抗疾病的能力。长期使用甘露低聚糖还可防止沙门氏菌、肉梭状芽孢杆菌等致病菌的感染及其在肠道的繁殖和定植,减少抗生素的添加量(Jackson,2001)。

3 β -甘露聚糖酶的来源及生物学特性

β -甘露聚糖酶广泛存在于自然界中,在一些低等动物(如海洋软体动物 *Littorina brevicula*)的肠道分泌液中、某些豆类植物(如长角豆、瓜儿豆等)发芽的种子中以及天南星科植物魔芋萌发的球茎中都发现了 β -甘露聚糖酶活性的存在。而微生物(包括真菌、细菌和放线菌等)则是饲用 β -甘露聚糖酶的主要来源,各种微生物产生 β -甘露聚糖酶的条件和所产酶活性的高低、酶的性质和作用方式以及蛋白质一级结构等均有所不同。微生物来源的 β -甘露聚糖酶具有活性高、成本低、提取方便以及比动植物来源的有更广的作用 pH 值、温度范围和底物专一性等显著特点,已在工业化生产和理论研究中得到了广泛的应用。

目前,已有许多不同来源的 β -甘露聚糖酶获得了纯化,如田新玉(1993)首先报道了嗜碱性芽孢杆菌 *Bacillus* sp.N16-5 产生的 3 种胞外碱性 β -甘露聚糖酶。杨文博(1995)、余红英(2003)、吴襟(2000)分别对地衣芽孢杆菌 *Bacillus lichieniformis* NK-27 产生的碱性 β -甘露聚糖酶、枯草芽孢杆菌 SA-22 产生的中性 β -甘露聚糖酶、诺卡氏菌形放线菌 *Nocardioform actinomycetes* NA3-540C 产生碱性 β -甘露聚糖酶的纯化及性质作了报道。在真菌方面,田亚平(1998)、王和平(2003)分别就黑曲霉 WX-96 所产的 β -甘露聚糖酶、里氏木酶 RutC-30 所产的酸性 β -甘露聚糖酶进行了酶纯化和性质研究。国外 Ademark (1998)和 Yosida(1997)分别报道了黑曲霉、环状芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶的纯化和性质。微生物产生的 β -甘露聚糖酶为多组分型,这些酶组分可能在分子量或等电点上有着微小的差别,但在水解甘露聚糖时活性却明显不同,存在一定的互补关系,这说明微生物 β -甘露聚糖酶的诱导和分泌是一个复杂的代谢调节过程。

不同来源的 β -甘露聚糖酶对不同来源的底物作用深度及其水解产物是不相同的。 β -甘露聚糖酶水解

底物的方式和深度主要与 α -半乳糖残基和葡萄糖残基在主链中的位置、含量、酯酰化的程度有关。底物本身的物理状态也会影响酶对底物的作用,如结晶状态的甘露聚糖不易被降解。甘露聚糖经 β -甘露聚糖酶作用后,通过 HPLC 或纸层析方法分析,主要产物是低聚糖(一般含 2~10 个残基),产物聚合度的大小与酶和底物的来源有关 (McCleary,1988; 田新玉等,1993;杨文博等,1995;Arison-Atac 等,1993),但相对来说很少或根本不产生单糖(甘露糖)。国内外对来源于不同菌种的 β -甘露聚糖酶的生产有所报道,但多集中在碱性和中性 β -甘露聚糖酶方面,而关于酸性 β -甘露聚糖酶的微生物发酵生产国内很少有报道;而单胃动物饲料中使用的 β -甘露聚糖酶要求是酸性的,因此,对酸性 β -甘露聚糖酶的研究及进行工业化推广将在饲料工业中具有较大的应用潜力。

利用分子生物学手段,可以开发产酶活性高、适应性强的微生物菌种。 β -甘露聚糖酶分子生物学的研究进展较快,到目前为止有 *Rhodothermus marinus* (Politz 等,2000)、*Dictyoglomus thermophilum* Rt46B1 (Gibbs 等,1999)、*Aspergillus aculeatus* (Christgau 等,1994)、*Bacillus stearothermophilus* (Ethier 等,1998)、西红柿种子 (Bewley 等,1997)等多种微生物和动植物的 β -甘露聚糖酶基因先后被克隆和表达,这些为开发新的、能满足饲料工业需要的产酶菌提供了条件。

4 β -甘露聚糖酶在饲料工业中的应用

4.1 提高日粮能量的利用

最近,在国外进行的一些试验研究了 β -甘露聚糖酶对典型玉米—豆粕型肉鸡、火鸡和猪日粮中能量的利用率的影响情况。其结果表明,饲喂加酶的低能日粮的肉鸡,其生长率和饲料利用率与饲喂不加酶的高能日粮的肉鸡相同;在火鸡试验中,低能日粮代谢能比高能日粮降低 171.38~392.92 kJ/kg,而加酶低能日粮组的饲料利用率显著优于不加酶的高能日粮组,这表明加酶使饲料能量利用率得以改善 (Jackson,2001);在猪的试验中,日粮能量和酶对于饲料利用率的有利影响与肉鸡试验相同。这些试验结果表明, β -甘露聚糖酶可提高能量的利用率,具体表现为饲料利用率得到了改善,生长率得到了提高。加酶对低能日粮能量的补偿,肉鸡日粮代谢能为 597.74 kJ/kg、猪日粮代谢能为 418 kJ/kg (Jackson,2001)。Jackson 等(1999)在玉米—豆粕型蛋鸡日粮中添加 β -甘露聚糖酶,结果显著增加了蛋的重量,产蛋时间和总产蛋量也有所提高。在降低了蛋鸡日粮的能量水平后,添加酶制剂

可以维持蛋鸡的生产性能。

4.2 提高畜禽体重整齐度

动物体重的整齐度是衡量生产性能的重要指标,在家禽生产中更是如此。有研究者用肉鸡和火鸡做的多次试验表明,添加 β -甘露聚糖酶显著降低不同日龄时体重的变异系数 (Jackson,2001)。这些研究结果表明,酶对饲料利用率和生产率提高的程度,不是仅仅用日粮能量利用率改善就能解释的。

4.3 促进动物健康

有研究者用肉鸡进行了两项试验来研究在可诱变疾病条件下日粮加酶的效果,其结果表明,加酶处理显著改善了感染鸡的生产性能,尽管差异不显著,但加酶和加药都使死亡率降低到了未感染鸡的水平 (Jackson,2001)。这些试验表明, β -甘露聚糖酶能通过非去除 β -甘露聚糖的途径来改善鸡的健康状况,这可能是 β -甘露聚糖酶降解 β -甘露聚糖的产物(甘露低聚糖)在发挥作用。因为甘露低聚糖能有效阻止肠道内病原菌的繁殖,使有益菌大量增殖,从而提高肠黏膜的免疫力,增强动物抵御疾病的能力 (杨文博等,1995)。因此,酶在实际使用中的作用是一个综合效果的体现。

4.4 改善豆粕等谷物饲料的营养价值

豆粕在许多国家都是畜禽的主要蛋白源。豆粕中因含有大量非淀粉多糖,其能量利用率很低(<60%)。 β -甘露聚糖作为 NSP 的一种成分,在豆粕中含量较高,这一成分对猪和家禽具有若干不良作用,包括减少葡萄糖、脂肪、水和氨基酸等在肠道的吸收。许多研究结果都表明, β -甘露聚糖酶能减少 β -甘露聚糖对畜禽的抗营养作用,如降解 β -甘露聚糖为低聚糖,提高豆粕的能量利用率等。 β -甘露聚糖酶已被证实能提高玉米—豆粕型日粮的饲料转化率,并促进肉鸡及火鸡的日增重和饲料利用率,提高蛋鸡的生产性能 (Jackson,2001)。

5 结语

外源酶对植物性蛋白饲料的作用效果,许多试验得出的结果并不一致。对这些观察结果有许多不同的解释。因为影响酶制剂作用效果的因素太多,特别是要准确地评定酶制剂在全价日粮中对特定底物的作用效果是很困难的。很多试验结果都表明,复合酶制剂的效果要优于单一酶制剂的效果,因此,进一步了解不同酶制剂之间的互作,尤其是碳水化合物酶,如纤维素酶、NSP 酶(木聚糖酶、葡聚糖酶、甘露聚糖酶等)、植酸酶和蛋白酶之间的关系,使得人们能在不同

的日粮底物和饲养环境下均能获得最大的投入产出比是以后研究复合酶制剂的方向之一。

另外,一些酶的降解产物,如甘露聚糖酶水解甘露聚糖的产物——低聚甘露糖,其本身并不能被动物利用,但它能抑制病原菌的定植,从而促进后肠道有益菌的大量增殖。因此,我们有必要更好地了解酶制剂在调控肠道微生物平衡中的潜在作用。今后的动物生产体系肯定是不能完全依赖预防和治疗药物的,这将为酶制剂与其它添加剂的协同作用提供参考依据。

参考文献

- 毛胜勇. 甘露聚糖在动物生产中的应用研究[J]. 粮食与饲料工业, 2000(9):31~33
- 王和平, 范文斌, 张七斤, 等. 里氏木酶 RutC-30 β -甘露聚糖酶的制备与纯化方法的研究[J]. 内蒙古农业大学学报, 2003, 24(3):44~48
- 田新玉, 徐毅, 马延和, 等. 嗜碱芽孢杆菌 N16-5 β -甘露聚糖酶的纯化与性质[J]. 微生物学通报, 1993, 33(2):115~121
- 余红英, 孙远明, 王炜军, 等. 枯草芽孢杆菌 SA-22 β -甘露聚糖酶的纯化及其特性[J]. 生物工程学报, 2003, 19(3):327~331
- 吴襟, 何秉旺. 诺卡氏菌放线菌 β -甘露聚糖酶的纯化和性质[J]. 微生物学报, 2000, 40(1):69~74
- 李剑芳, 郭敏辰, 夏文水. 微生物 β -甘露聚糖酶的研究进展[J]. 江苏食品与发酵, 2004, 118(3):4~9
- 杨文博, 佟树敏, 沈庆. 地衣芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶的纯化及酶学性质[J]. 微生物学通报, 1995, 22(6):338~342
- 杨文博, 佟树敏, 沈庆, 等. β -甘露聚糖酶酶解植物胶及其产物对双歧杆菌的促生长作用[J]. 微生物学通报, 1995, 22(4):204~207
- 杨曙明. 寡聚糖在动物营养研究中的进展. 动物营养学报, 1999(1):1~9
- 汪徽. 动物营养研究进展[M]. 北京:中国农业大学出版社, 1996
- 陈勇, 张慧玲. 饲用酶制剂的应用研究[J]. 粮食与饲料工业, 1999(8):35~37
- Ademark P, Varga A, Medve J, et al. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a beta-mannanase[J]. J. Biotechnology, 1998, 63(3):199~210
- Aeison-Atac I, Hodits R, Kristufek D, et al. Purification, and characterization of a β -mannanase of *Trichoderma reesei* C-30. Appl. Microbial. Biotechnol., 1993, 39:58~62
- Bewley J D, Burton R A, Morohashi Y, et al. Molecular cloning of a encoding beta-mannanendohydrolase from the seeds of germinated tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant, 1997, 203(4):454~459
- Biely P, Vrsanska M, Kucar S. Identification and mode of action of endo-(1-4)- β -xylanases // Vssee J, Beldman G, Kusters-van Someren M A xylans and xylanases. Progress in Biotechnological, Elsevier, Amsterdam. The Netherlands, 1992, 7:81~95
- Cherbut C, Barry J L, Lairon D, et al. Dietary Fibre. Mechanisms of Action in Human Physiology and Metabolism. John Libbey EUROTEXT, Paris, 1995
- Christgau S, Kauppinen S, Vind J, et al. Expression cloning, purification and characterization of a beta-1, 4-mannanase from *Aspergillus aculeatus*[J]. Biochem. Mol. Bio. Int., 1994, 33(5):917~925
- Edwards C A, Johnson I T, Read N W. Do viscous polysaccharides slow absorption by inhibiting diffusion or convection?[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 1988, 42:306~312
- Elisabetta Sabini, Keith S. Wilson, Matti Slika-aho, et al. Digestion of Single Crystals of Mannan by an endo-mannanase from *Trichoderma reesei*[J]. Eur. J. Biochem., 2000, 267:2 340~2 344
- Ethier N, Tablot G, Sygusch J. Gene Cloning, DNA Sequencing and Expression of Thermo stable-Mannanase from *Bacillus stearothermophilus*[J]. Appl. Envir. Microbiol., 1998, 64(11):4 428~4 432
- Gibbs M D, Reeves R A, Sunna A, et al. Sequencing and expression of the recombinant enzyme [J]. Curr. Microbiol., 1999, 39(6):351~357
- Hazlewood G P, Gilbert H J. Structure and function analysis of pe-sudomonas plant cell wall hydrolases [J]. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 1998a, 61:211~241
- Ikegami S, Tsuchihashi F, Harada H, et al. Effect of viscous indigestible polysaccharides on pancreatic-biliary secretion and digestibility organs in rats[J]. J.Nutr., 1990, 120:353~360
- Jackson M E, Fodge D W, Hsiao H Y. Effect of β -mannanase in corn-soybean meal diets on laying hen performance [J]. Poult. Sci., 1999, 78:1 737~1 741
- Jackson M E. Improve soya utilization in monogastrics: maize-soya diets with β -mannanase[J]. Feed International, 2001, 11:22~26
- Johnson I T, Gee M. Effect of gel-forming gums on the intestinal unstirred layer and sugar transport in vitro[J]. Gut, 1981, 22:398~403
- McCleary B V. β -mannanase [J]. Methods in Enzymeology, 1988, 160:596~610
- Meier H, Reid J S G. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants[J]. In Encyclopaedia of Plant Physiology (Loewus, F. A. & Tanner, W., eds.), 1982, 13: 418~471
- Portland Press, London Stephen A M. Other plant polysaccharides. In the Polysaccharides, (Aspinall, G. O., ed), Academic Press, New York and London, 1983, 2:97~193
- Puls J, Schuseil J. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In Hemicellulose and Hemicellulases (Coughlan, M.P. & Hazlewood, G.P., eds.), 1993. 1~28
- Springer Verlag, Berlin, Germany Politz O, et al. A highly thermo stable endo-(1,4)-beta-mannanase from the marine bacterium *Rhodothermus marinus* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000, 53(6):715~721
- Viikari L, Tenkanen M, Buchert J, et al. Hemicellulases for industrial applications. In: Saddler, J.N. (ed.) Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Reviews. CAB International, Wallingford, UK, 1993. 131~182
- Yosida S, Sako Y, Uchida A. Purification, properties, and N-terminal amino acid sequences of guar gum-degrading enzyme from *Bacillus circulans* K-1[J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1997, 61(2):251~255

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

温度和时间对酶水解豆粕效果的影响

何经纬 王之盛 曾有均

目前动物性蛋白原料价格上涨,导致了对高品质植物性蛋白质需求量的增加。在世界范围内,饲料中的绝大部分蛋白质来自油料种籽和豆科作物等植物性蛋白,豆粕又是应用最广泛的植物饲料蛋白质资源,其蛋白质含量高,除富含蛋氨酸外,其它氨基酸也较平衡,但是由于大豆中存在一些抗营养因子,如胰蛋白酶因子、抗原蛋白,严重影响饲料蛋白源的生物学效价,从而限制了其在早期断奶仔猪和犊牛日粮中的应用。许多国家用热乙醇处理、膨化加工处理等方法去除大豆抗原,但这些处理方法成本高,安全性差,污染大,不宜推广。采用生物酶制剂对豆粕进行处理,条件温和,绿色安全。它通过破坏大豆抗原蛋白质的高级结构,从而达到破坏其抗营养因子的作用,提高仔猪对饲料的利用率。

1 材料与方法

1.1 材料

豆粕(CP 48.165%)、中性蛋白酶(无锡市某公司提供)。

1.2 测定指标

氨基氮含量(mg/g)的测定参照黄伟坤(1989)的方法进行;蛋白质水解度(DH%)的测定参照赵新淮等(1995)的方法进行。

1.3 中性蛋白酶水解条件的确定

1.3.1 最适温度的确定

中性蛋白酶使用的稳定 pH 值范围为 6.5~7.5,取初始 pH 值为 7.5,故安排试验如下:豆粕碎过 120 目筛,取 1 g 豆粕加水 10 ml 按照固液比(1:9,其中 8 ml 缓冲溶液,1 ml 酶液),加酶量 E/S=1%(质量百分比),分别在 320、370、420、470 °C 水解 30 min 后,沸水浴加热 10 min,离心 10 min,取上清液过滤,定容至 100 ml,取样测氨基氮含量。

1.3.2 最适水解时间的确定

样品处理同上,在确定的最适温度下,pH 值为 7.5,加酶量(E/S)为 1%,取水解时间分别为 3、4、5、6 h,沸水浴加热 10 min,离心 10 min,取上清液过滤,定容

至 100 ml,取样测氨基氮含量。

表 1 温度 and 时间的单因素实验设计

温度(°C)	时间(h)
32	0.5
37	0.5
42	0.5
47	0.5
42	3
42	4
42	5
42	6

1.4 统计分析

用 Excel 对数据进行初步处理,以 SPSS13.0 统计软件对数据进行回归分析,LSD 法进行多重比较。

2 实验结果

2.1 酶水解温度的确定(见表 2、图 1)

表 2 不同温度对氨基氮产生量的影响

温度(°C)	氨基氮产生量(mg/g)			氨基氮平均产生量(mg/g)	蛋白质水解度(%)
	1	2	3		
32	16.401 91	16.401 91	16.555 94	16.45 ^c	1.61
37	18.404 21	18.465 82	18.773 86	18.55 ^b	1.81
42	29.154 98	29.185 78	28.908 54	29.08 ^a	2.84
47	11.257 56	11.288 37	11.534 8	11.36 ^d	1.11

注:1.同列肩标不同大写字母表示差异极显著($p<0.01$);

2.水解 pH 值为 7.5,时间是 0.5 h,酶用量(E/S)为 1%、固液比是 1:9;

3.1、2、3 为 3 个重复,下同。

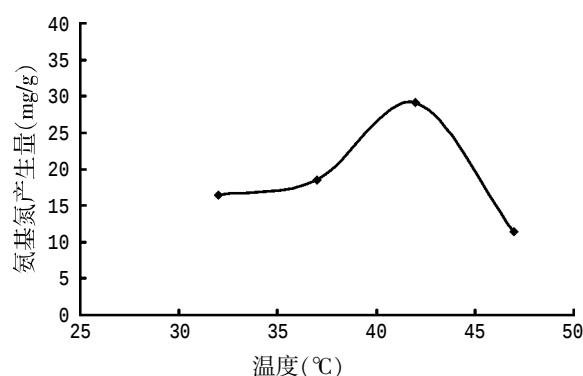


图 1 温度对酶水解效果的影响

由表 2、图 1 的实验数据表明,中性蛋白酶随温度的提高,水解活性逐渐增强,达到 42 °C 时,相同时间内产生氨基氮的量和蛋白质被酶水解程度最大,以后随温度的提高,中性蛋白酶的水解活性明显降低。在 42 °C 条件下水解产生氨基氮的量比 32、37 °C 条件下水解

何经纬,四川农业大学动物营养研究所,625014,四川省雅安市雨城区新康路 36 号。

王之盛、曾有均,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-27

产生氨基氮的量分别提高了 76.78% ($P<0.01$) 和 56.77% ($P<0.01$); 而在 47 °C 条件下比 42 °C 时减少了 60.94% ($P<0.01$)。实验还表明,在 42 °C 条件下蛋白质被酶催化水解的程度比在 32、37、47 °C 时分别高出 1.23、1.03、1.73 个百分点。用二次回归曲线求出最适水解温度为 41.36 °C ($R^2=0.999\ 7$)。

2.2 酶水解时间的确定(见表 3、图 2)

表 3 不同水解时间对氨基氮产生量的影响

水解时间 (h)	氨基氮产生量(mg/g)			氨基氮平均 产生量(mg/g)	蛋白质水 解度(%)
	1	2	3		
3	82.943 2	75.966 4	71.041 6	76.65 ^{Ba}	7.49
4	93.408 4	86.226 4	101.000 8	93.55 ^{AB}	9.14
5	87.868	106.746 4	111.671 2	102.10 ^{ABb}	9.98
6	114.133 6	92.382 4	103.673 6	103.46 ^A	10.11

注:1.同列肩标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);

2.水解 pH 值为 7.5、温度 42 °C、酶用量(E/S)为 1%、固液比是 1:9。

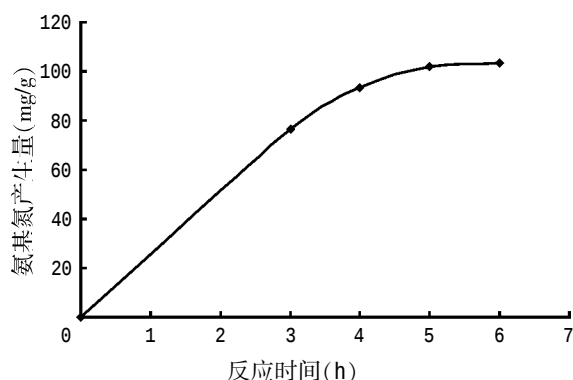


图 2 时间对酶水解效果的影响

由表 3、图 2 结果表明,随酶水解时间的延长,氨基氮的产生量逐渐增加,蛋白质被酶水解程度逐渐提高,4 h 比 3 h 提高了 22.03% ($P>0.05$),5 h 比 4 h 提高了 9.19% ($P>0.05$),6 h 比 5 h 提高了 1.30% ($P>0.05$),它们的变化幅度逐渐减小,但水解 6 h 时氨基氮的平均产生量比 3、4 h 时分别提高了 34.97% ($P<0.01$) 和 10.59% ($P>0.05$)。蛋白质被酶催化水解的程度 5 h 比 3、4 h 时分别高出 2.49 和 0.85 个百分点,比水解 6 h 下降 0.13 个百分点。由此表明,水解效果随时间的延长并不是呈线性上升的关系,达到一定程度氨基氮的产生将停止。结合水解效率和实际生产运用,水解时间 5 h 左右为宜。

3 讨论

3.1 温度对酶解效果的影响

大多数化学反应的速率都和温度有关,酶的催化

反应也不例外。每种酶在一定条件下都有其最适温度。实验结果表明,中性蛋白酶在反应的最初阶段,酶蛋白的变性尚未表现出来,因此产生氨基氮的量随温度升高而增加,但高于 42 °C 时,酶蛋白变性逐渐突出,反应速率迅速随温度升高的效应逐渐被酶蛋白变性效应所抵消,氨基氮产生量下降。中性蛋白酶在 42 °C 水解豆粕产生氨基氮的量极显著高于其余温度下的产生量 ($P<0.01$),即产生的氨基氮最多,酶的水解活性最高,说明温度的高低对酶活性的影响相当大。根据二次回归曲线求出在此实验条件下中性蛋白酶适合反应温度是 41.36 °C ($R^2=0.999\ 7$)。李磊等(2002)对大豆饼粕进行中性蛋白酶水解处理的最适温度为 40 °C。李树品等(1997)做了应用中性蛋白酶对豆粕进行水解的实验,确定 pH 值为 7.0、温度为 45 °C 为最适水解条件。产生温度差异的原因可能是:①豆粕所过目筛不同,酶与底物结合后造成酶活性中心结构的改变影响其催化活性;②水解反应过程中 pH 值的变化造成的。从仔猪实际生产角度考虑,初生仔猪的体温在 39.5 °C,所以,在仔猪体内中性蛋白酶接近它的最适反应温度,能够一定程度上发挥酶的最大水解活性,在此温度条件下,中性蛋白酶的活性较高,能够一定程度的水解蛋白质、破坏大豆抗原蛋白的高级结构,从而破坏抗营养因子,提高饲料蛋白质的利用率,降低仔猪腹泻。对于消化酶分泌不足的幼龄动物通过添加生物酶制剂可以增加消化酶的种类和数量,提高其对各种物质的消化和吸收。

3.2 时间对酶解效果的影响

中性蛋白酶水解豆粕产生氨基氮的量随水解时间延长而逐渐增大,但水解到 5 h 后,氨基氮产生速度减缓,水解 6 h 产生氨基氮的量极显著高于水解 3 h 产生氨基氮的量 ($P<0.01$),该结果与龙定彪(2004)、吕刚等(2005)的实验结果相同;水解度与吕刚等(2005)的实验结果相同。考虑到随水解时间延长,底物不断消耗,其浓度逐渐降低,酶也逐渐失活;另外生成的产物在释放出来之前与酶以复合体形式存在,可以占领酶分子上的特殊位点,使酶不能结合底物,产生竞争性抑制;或者占据催化部位,对结合了的底物不能发挥催化作用。所以达到一定程度后水解速度必然随之减慢。由于饲料在仔猪小肠中停留的时间为 4~5 h,在这段时间内,中性蛋白酶能够和底物充分结合,使肽键断裂,降解大豆抗原蛋白成为氨基酸或者多肽,这样有利于小肠的吸收和利用,减少氮的排泄,降低养猪业的环境污染,同时生产出无药物残留,有利于人类

菌源性 β -葡萄糖苷酶特性的研究

李剑梅 修翠娟 李 莉 王振丽

大豆异黄酮可调控动物机体养分代谢,改善饲料利用率,可改善动物产品的品质,并有抗氧化作用,提高动物免疫功能和生产机能。因此,大豆异黄酮在畜禽营养中的作用越来越受到关注。但是大豆异黄酮主要以结合型的糖苷(glucosides)形式存在,从大豆中提取的大豆异黄酮中游离型的苷元占总量的 2%~3%,结合型的糖苷占总量的 97%~98%。研究发现,结合型的糖苷不具有最佳的生理活性状态,只有大豆异黄酮糖苷被水解脱去糖基转化成游离型的苷元形式才能被动物体吸收,发挥生理调节作用。 β -葡萄糖苷酶能使生物活性因子大豆异黄酮苷等生物苷类物质脱去糖基,变成分子量较小的高生物活性苷元,进而提高生物利用率。 β -葡萄糖苷酶(β -Glucosidase)系统名称为 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶(β -D-glucoside glucohydrolase; EC.3.2.1.21),它是纤维素酶系中的一个组分,主要作用于 β -1,4 糖苷键,还能作用于 β -1,1,1,2,1,3,1,6 糖苷键。目前市售商品 β -葡萄糖苷酶主要是从酵母、苦杏仁等植物种子中分离纯化而获得的,主要应用于食品、饲料工业中,如青梅脱苦、降解纤维素等。微生物生长速度快,能分泌多种胞外酶,并且成本低廉,是 β -葡萄糖苷酶的重要来源。杨树林等(2006)用微生物发酵法和 DEAE-SephadexG100 离子交换法从绿色木霉发酵物中分离纯化出一种分子量为 64.7 kD 的 β -葡萄糖苷酶,并对酶学性质进行了初步的研究。本文利用从大豆发酵物中筛选出的一株 β -葡萄糖苷酶高产菌株进行液体发酵,得到 β -葡萄糖苷酶粗酶液,进行相关的酶学性质研究,以便于该酶的进一步开发利用,同时为大豆异黄酮微生物酶转

化工艺的研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基

发酵培养基组成为蛋白胨 0.2%、水杨苷 0.05%、麸皮 2%、磷酸氢二钾 0.1%、硫酸镁 0.1%、VC 0.1%。

1.1.2 主要试剂

DEAE-SephadexA50(Sigma 公司生产)、标准 β -葡萄糖苷酶(Sigma 公司生产,100 U)、标准分子量蛋白(上海生物化学研究所提供)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂为国产电泳纯,其它试剂为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器

层析柱、TH-梯度混合器、BSZ-100 自动收集器、HL-2 恒流泵(上海沪西分析仪器厂生产)、电泳仪(北京六一仪器厂生产)、723 分光光度计(上海精密仪器厂生产)、台式低温高速离心机(Sigma 公司生产),其它仪器为实验室常规设备。

1.2 方法

1.2.1 菌种的培养

将发酵培养基组分用蒸馏水溶解并定容至 1 000 ml,分装到 500 ml 三角瓶中,装量为 80 ml;121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min,无菌操作接入 42 h 的种子培养液;在温度为 30 $^{\circ}$ C,摇床转数 160 r/min 条件下培养 72 h,合并发酵液,离心(1 000 r/min)除菌,收集上清液即为 β -葡萄糖苷酶粗酶液。

1.2.2 β -葡萄糖苷酶活性测定

1.2.2.1 葡萄糖标准曲线的制作

采用分光光度法。取 8 只带有刻度的比色管,精密吸取葡萄糖标准液(1 mg/ml)各 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 ml 于比色管中,再用蒸馏水补足至 2 ml,分别加入 1.5 ml DNS 试液,置于沸水浴 5 min,用蒸馏水定容至 10 ml,于 540 nm 处比色,绘制标准曲线,见图 1。曲线方程为 $Y=2.281\ 19X-0.001\ 83$, $r=0.997\ 9$ 。

中性蛋白酶水解豆粕在 pH 值 7.5、酶用量(E/S)为 1%、固液比为 1:9 时的最适水解温度为 41.36 $^{\circ}$ C,水解时间为 5 h 左右。

(参考文献 11 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

李剑梅,辽宁省微生物科学研究院,副研究员,122000,辽宁省朝阳市文化路二段 22 号。

修翠娟、李莉、王振丽,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-13

健康的安全肉产品。但水解时间太长,酶水解效率达到一个平台期,氨基氮产生量和水解度没有显著变化($P>0.05$),而且食糜在 5 h 后将进入大肠,不利于仔猪的消化吸收。

4 结论

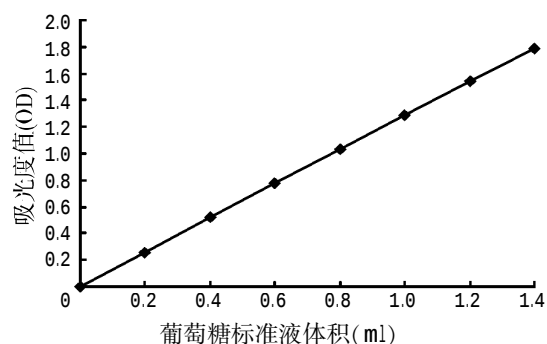


图1 葡萄糖溶液标准曲线

1.2.2.2 样品中 β -葡萄糖苷酶酶活的测定

取4只10 ml的比色管,其中1只为对照管,3只为样品管于每只比色管中分别加入0.5%的水杨苷0.5 ml后,在对照管中再加入DNS试液1 ml;然后将4只比色管在50℃水浴中放置5 min;再向每只比色管中分别加入酶液0.5 ml;将4只比色管放在50℃环境中水浴30 min后,向样品管加入DNS试液1 ml;将4只比色管沸水浴5 min后,分别用蒸馏水定容至10 ml,于540 nm波长测定吸光度值。酶活单位规定为每小时生成1 $\mu\text{mol/ml}$ 的葡萄糖为一个酶活单位(U)。

1.2.3 β -葡萄糖苷酶分子量的测定

经过摇床发酵培养,得到发酵液,离心收集上清液,缓慢加入硫酸铵进行分步盐析,相对饱和度为浓度为35%~75%;离心收集沉淀物,用pH值4.50柠檬酸缓冲液(0.1 mol/l)溶解,经透析后,依次用DEAE-SephadexA50离子交换柱吸附,再用0.1~0.8 mol/l氯化钠溶液梯度洗脱步骤进行分离纯化后,用SDS-PAGE电泳以确定分子量。

1.2.4 粗酶最适作用温度

酶与底物反应30 min,在30、40、45、50、55、60、65、70℃条件下分别测定 β -葡萄糖苷酶酶活。设最高酶活为100%。

1.2.5 粗酶最适作用pH值

用不同pH值的柠檬酸缓冲液(0.1 mol/l)调节反应体系中的pH值,在最适反应温度条件下,分别在pH值3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7环境下测定 β -葡萄糖苷酶酶活。设最高酶活为100%。

1.2.6 粗酶的热稳定性实验

将粗酶液分别放在30、40、50、60、70℃条件下保温6 h,每1 h测定一次 β -葡萄糖苷酶酶活。未经过保温处理的为对照组,活性设为100%。

1.2.7 金属离子对粗酶酶活的影响

在反应体系中添加一定浓度的金属离子至终浓度为0.01 mol/l,考察其对 β -葡萄糖苷酶酶活的影响。

以未加入金属离子的酶液为对照组,活性设为100%。

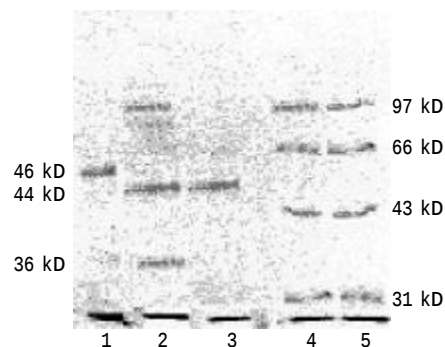
1.2.8 底物浓度对粗酶反应速度的影响及热力学动力学参数 K_m 和 V_{max} 的测定

用pH值4.5的柠檬酸缓冲液(0.1 mol/l)配置0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.5%的水杨苷为底物,测定与不同浓度底物反应时的 β -葡萄糖苷酶酶活,考察不同底物浓度对酶反应速度的影响,同时采用双倒数作图法(Lineweaver-Burk)推导出 K_m 和 V_{max} 值。

2 结果与分析

2.1 β -葡萄糖苷酶分子量的测定

粗酶液经过35%~75%分步盐析和用DEAE-SephadexA50离子交换柱吸附、梯度洗脱等步骤分离纯化后,当氯化钠洗脱液浓度为0.2~0.4 mol/l及0.6 mol/l时得到两个有 β -葡萄糖苷酶酶活的蛋白峰,收集酶活峰各管,透析后用聚乙二醇浓缩后,用SDS-PAGE分析,其中一个酶活峰是一条单一的蛋白带,分子量为44 kD,见图2。



1号为标准 β -葡萄糖苷酶(46 kD);

2号为SephadexA50酶活峰1(洗脱液浓度为0.2~0.4 mol/l);

3号为SephadexA50酶活峰2(洗脱液浓度为0.6 mol/l);

4,5号为标准蛋白(97、66、43、31 kD)。

图2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

2.2 粗酶最适作用温度

在不同的反应温度下测定粗酶 β -葡萄糖苷酶酶活。图3显示,在30~55℃条件下, β -葡萄糖苷酶酶活随温度的升高而增加,在55℃时 β -葡萄糖苷酶酶活达到峰值,说明55℃是该酶最适作用温度。

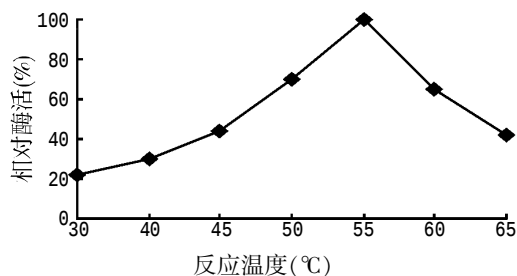


图3 温度对粗酶酶活的影响

2.3 粗酶最适作用 pH 值

按照文中方法,分别在 pH 值 3~7 环境下测定酶活。由图 4 表明,缓冲体系中的 pH 值小于 3.5 时显著影响 β -葡萄糖苷酶酶活,在 pH 值 3.5~5.5 内酶活相对稳定,最适作用 pH 值为 4.5。

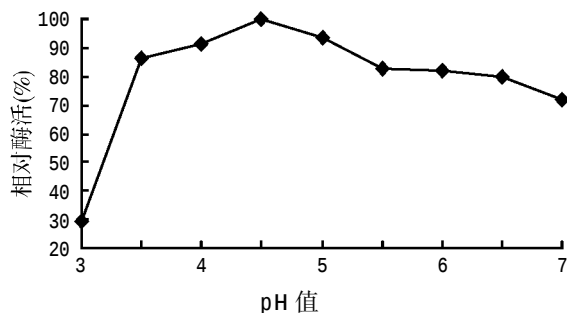


图4 pH 值对粗酶酶活的影响

2.4 粗酶的热稳定性(见表 5)

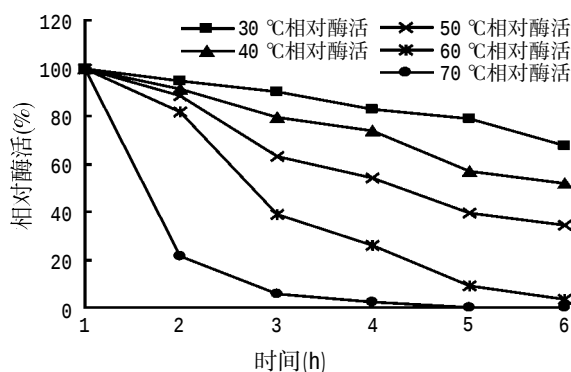


图5 温度对粗酶稳定性的影响

按照文中方法,考察温度对酶稳定性的影响。图 5 表明,温度对酶的稳定性有很大的影响,在 30~70 °C 范围内残留的酶活随着温度的升高和保温时间的延长酶活降低,且温度越高降低速度越快,在 50 °C 以下保温 1 h,酶活力降低缓慢,残留的酶活在 80% 以上,在 40 °C 下保存 5 h,残留的酶活在 50% 以上。

2.5 金属离子对粗酶酶活的影响(见图 6)

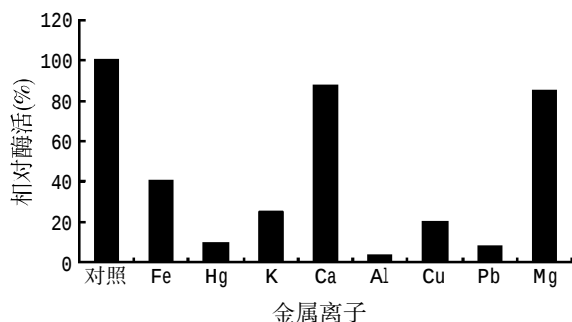


图6 金属离子对粗酶酶活的影响

在反应体系中添加一定浓度的金属离子,测定酶活。图 6 表明,金属离子不同程度的抑制粗酶 β -葡萄糖苷酶酶活性,其中以 Hg、Al、Pb 最为严重,可能是引起了蛋白质变性。

2.6 底物浓度对粗酶反应速度的影响及热力学动力学参数 K_m 和 V_{max} 的测定

按照文中的方法,分别测定酶与不同浓度底物反应时的反应初速度。图 7 表明:当底物浓度增大,酶反应速度增加;底物浓度在 0~0.2% 范围内为一级反应;底物浓度在 0.2%~0.6% 时随着底物浓度的增加,酶反应速度不再和底物浓度成正比例的方式增加,为混合级反应;底物浓度在大于 0.6% 时,酶被底物饱和,为零级反应。按照双倒数作图法求得热力学动力学参数 K_m 和 V_{max} 值分别为 0.729×10^{-2} g/ml、 1.36×10^{-2} mg/(ml·min)。

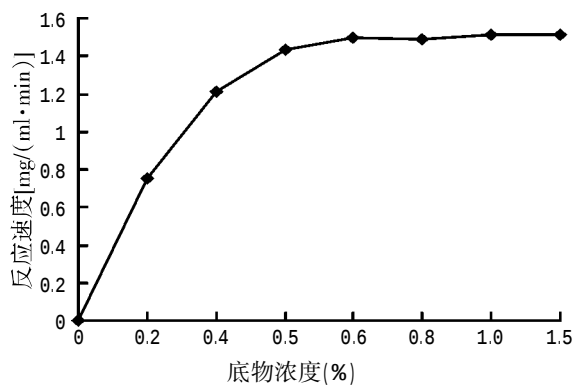


图7 底物浓度对粗酶反应速度的影响

3 讨论

3.1 液体发酵液经过除菌、硫酸铵分段盐析、DEAE-SephadexA50 离子交换柱梯度洗脱收集活性峰时,当氯化钠洗脱液浓度为 0.2~0.4 mol/l 时,收集到的蛋白活性峰为三条蛋白带,分子量分别为 97、44、36 kD,当氯化钠洗脱液浓度为 0.6 mol/l 时,分离纯化得到电泳纯的 β -葡萄糖苷酶,分子量约为 44 kD。可见,氯化钠洗脱液浓度为 0.6 mol/l 时分离效果最佳。

3.2 通过对菌源性 β -葡萄糖苷酶特性研究结果表明:粗酶最适作用温度为 55 °C,温度对该酶稳定性影响显著,但 1 h 内在 50 °C 以下酶稳定性良好;最适作用 pH 值为 4.5,在 pH 值 3.5~5.5 范围内酶活比较稳定;金属离子对酶活有不同程度的抑制作用;热力学动力学参数 K_m 和 V_{max} 分别为 0.792×10^{-2} g/ml、 1.36×10^{-2} mg/(ml·min)。初步的试验证明,该酶性质比较稳定,对底物亲和力和较强,具有较大的开发利用价值。

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

在饲料中添加 DDGS 对异育银鲫生长的影响

高红建 张邦辉 王燕波 高长利

摘 要 在饲料中添加 0(Ⅰ对照组)、10%、20%、30%和 40%(Ⅱ~Ⅴ试验组)的玉米干酒糟及其可溶物(Dried Distillers Grain with Solubles, DDGS),在室内循环养殖系统中经过 45 d 的异育银鲫养殖试验,研究 DDGS 对鲫鱼生长的影响。结果表明:在饲料中添加一定量的 DDGS(10%和 20%),异育银鲫的特定生长率、增重率、料肉比、蛋白质效率和日摄食率与对照组相比差异不显著($P>0.05$);添加 30% DDGS 时,特定生长率、增重率、蛋白质效率和日摄食率与对照组相比表现出下降的趋势($P>0.05$);而添加 40%的 DDGS 时,增重率、料肉比,蛋白质效率和日摄食率与对照组相比差异就十分显著了($P<0.05$)。根据上述生产性能指标综合评定,建议异育银鲫配合饲料中 DDGS 最适添加量为 10%~20%。

关键词 DDGS;异育银鲫;蛋白质效率;生长性能

中图分类号 S965.117

乙醇工业生产的副产物玉米干酒糟及其可溶物(Dried Distillers Grain with Solubles, DDGS)是一种廉价的蛋白质饲料,随着一些现代化发酵技术、精馏技术、低温干燥技术等用于燃料乙醇的生产工艺中,DDGS 的营养成分和营养价值发生了很大变化。目前在国内 DDGS 主要应用在奶牛^[1-3]、蛋鸡^[4-5]和猪^[6-8]饲料上,但对 DDGS 在鱼类饲料上的使用及对鱼类生长有何影响,国内至今未见报道。鲫鱼是我国主要的淡水养殖鱼类,具有生长快、个体大、肉质好、味道美、产量高等优点。本文以异育银鲫为试验对象,研究 DDGS 作为饲料蛋白源对其生长的影响,旨在探索这种新的饲料蛋白源的应用价值,为水产养殖上合理有效地使用 DDGS,为水产动物开辟新的饲料蛋白源提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 试验鱼

试验鱼均为从室外水泥池转移到室内玻璃缸水族箱内暂养的 1 龄异育银鲫,暂养过程中,把所要试验的饲料混在一起后,对鲫鱼进行训食。通过 12 d 的暂养,使鲫鱼完全能够采食试验饲料,然后选择健康、无异状、平均体重在 28 g 左右、大小基本一致的鲫鱼,经过食盐水的浸泡消毒后,放到试验缸内,每个试验缸放鱼种 40 尾,尾均重基本一致。

高红建,宁波天邦股份有限公司饲料研究院,315400,浙江余姚。

张邦辉、王燕波、高长利,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-04

1.2 试验饲料

试验设 5 个组,1 个对照组(Ⅰ),4 个试验组(Ⅱ~Ⅴ),对照组Ⅰ以进口鱼粉、豆粕和棉粕为基础蛋白源,试验组日粮采用 10%、20%、30%和 40%的 DDGS 等氮替代对照组Ⅰ中的豆粕,形成 5 种饲料;试验中所用的 DDGS(主要营养指标为 CP 50%、粗脂肪 3%、CF 8%、Lys 2.17%和 Met 2.05%)购自吉安生化。饲料原料均粉碎过 60 目筛,加工制成直径为 1.5 mm 的颗粒。饲料配方及营养组成见表 1。

表 1 饲料配方及基本营养组成(%)

成分	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
智利鱼粉	10	10	10	10	10
豆粕	42	32	22	11	0
DDGS	0	10	20	30	40
棉粕	10	10	10	10	10
次粉	20	20	20	21	22
麦麸	12	12	12	12	12
鱼油	1	1	1	1	1
豆油	2	2	2	2	2
矿物质预混剂	2	2	2	2	2
维生素预混剂	1	1	1	1	1
粗蛋白	34.82	35.06	35.25	35.11	34.89
粗脂肪	4.35	4.48	4.71	4.97	5.26

1.3 饲养管理

试验在室内循环养殖系统中进行,该养殖系统由养殖试验玻璃缸水族箱和一套水处理池组成,养殖水循环使用,用空气压缩机充空气进行增氧。单个水族箱容积为 0.6 m³(直径 120 cm、高 70 cm、水深 60 cm)的圆柱形玻璃缸水族箱。

将鲫鱼称重分组,每组有 3 个玻璃缸水族箱。试验正式开始后,各组分别投喂上述 5 种饲料,投饲率

为 1.5%~2%,并根据摄食情况做相应调整,每天投喂 2 次(8:00、16:00)。试验期间,每天早上排污 1 次,然后注入一部分新水。每天测定水温、pH 值。整个试验期间水温维持在 24~26℃,pH 值在 7.0~7.7,DO 值维持在 5 mg/l 以上。试验从 5 月 12 日开始,6 月 26 日试验结束,试验共进行了 45 d。试验结束时,停饲 1 d,空腹称重,计尾数,统计饲料量。

1.4 数据计算与统计分析

增重率(%)=(平均末重-平均初重)/平均初重;

特定生长率 (%/d)=(ln 终末均重-ln 初始均重)/试

验天数;

料肉比=摄食饲料/(终总重+死鱼重-初总重);

饲料蛋白效率(%)=(平均末重-平均初重)/饲料蛋白投喂量;

日摄食率(%)=(饲料摄入量×2)/[试验天数×(初总重+终总重)]。

所有试验数据平均数采用 SPSS.11 软件进行单因子方差分析,多重比较采用 Duncan's 检验方法。

2 结果与分析

2.1 不同水平 DDGS 对异育银鲫生长的影响(见表 2)

表 2 添加不同水平的 DDGS 对异育银鲫生长的影响

试验饲料	I	II	III	IV	V
平均初重(g/尾)	28.47±0.29	28.27±0.46	28.73±0.75	28.26±0.25	28.30±0.12
平均末重(g/尾)	46.86±3.19 ^a	48.09±2.38 ^a	47.51±2.83 ^a	45.08±2.24 ^{ab}	42.15±2.78 ^b
增重率(%)	64.59±4.72 ^{ab}	71.58±3.83 ^a	65.36±5.16 ^{ab}	57.40±4.36 ^{bc}	53.82±3.57 ^c
特定生长率(%/d)	1.10±0.07 ^{ab}	1.18±0.09 ^a	1.12±0.05 ^{ab}	1.04±0.06 ^{bc}	0.88±0.08 ^b

注:表中同行数据肩标字母相同者表示差异不显著(P>0.05),不同者表示差异显著(P<0.05)。下表同。

由表 2 可知,试验各组之间,随着 DDGS 水平的增加,异育银鲫的增重率、特定生长率呈现下降趋势,不同试验组之间存在着不同程度的差异。当添加 10% 的 DDGS 时,鲫鱼的增重率、特定生长率略高于对照组和试验组 III,差异不显著(P>0.05),但显著高于试验组 IV 和 V 组 (P<0.05); 当在饲料中添加 30% 的 DDGS

时,虽然鲫鱼的增重率、特定生长率与对照组相比差异不显著(P>0.05),但从数值表现出下降的趋势;添加 40% 的 DDGS, 鲫鱼的增重率与对照组相比下降十分显著(P<0.05),特定生长率差异不显著(P>0.05)。

2.2 不同水平 DDGS 对料肉比和日摄食率的影响(见表 3)

表 3 添加不同水平 DDGS 对料肉比和日摄食率的影响

试验饲料	I	II	III	IV	V
料肉比	2.31±0.15 ^{ab}	2.15±0.11 ^a	2.36±0.16 ^{ab}	2.44±0.16 ^{bc}	2.67±0.10 ^c
蛋白质效率(%)	1.24±0.04 ^{ab}	1.33±0.03 ^a	1.20±0.05 ^{ab}	1.13±0.05 ^{bc}	1.07±0.06 ^c
日摄食率(%)	1.13±0.05 ^a	1.12±0.04 ^a	1.16±0.05 ^a	1.09±0.07 ^{ab}	1.04±0.04 ^b

由表 3 可见,随着 DDGS 水平的增加,各试验组异育银鲫的料肉比呈现增加趋势,饲料蛋白质效率呈现下降趋势。在配合饲料中添加 10% 和 20% 的 DDGS 时,异育银鲫的料肉比和蛋白质效率与对照组无显著差异(P>0.05);添加 30% 的 DDGS 时,与对照组相比,表现出了料肉比增加和蛋白质效率下降的趋势;当在饲料中添加 40% 的 DDGS 后,其各项指标均与对照组、试验 II 和 III 组相比均有显著差异(P<0.05)。

当在配合饲料中添加 10% 和 20% 的 DDGS 时,对异育银鲫的日摄食率没有产生影响,与对照组相比差异不显著(P>0.05);当 DDGS 的添加水平为 30% 时,与对照组、试验 II 和 III 组相比,鲫鱼日摄食率下降,但差异不显著(P>0.05);而当 DDGS 添加到 40% 时,日摄食率大大下降(P<0.05)。

3 讨论

从本试验结果可以看出:不同水平的 DDGS 对异育银鲫的生长和料肉比的影响是不同的。在饲料中添加一定量的 DDGS(10% 和 20%)对异育银鲫的生长率与料肉比不仅没有负面影响,反而能进一步得到改善,但过量添加(40%)将会抑制异育银鲫的生长及其对饲料的利用率。

DDGS 是在生产燃料乙醇的过程中,微生物对玉米淀粉发酵产生乙醇后,经过蒸馏,大量微生物连同玉米中的剩余成分经过干燥形成的一种新型的饲料蛋白质原料^[9],具有高蛋白、高有效磷、低植酸磷和高维生素含量的特点^[10]。本试验中使用的 DDGS 的蛋氨酸含量较高,约为 2.05%,当在饲料中添加适量 DDGS 后,由于 DDGS 中的蛋氨酸可以补充豆粕中的蛋氨酸(0.67%)含量不足,使鲫鱼饲料中氨基酸达到平衡;而且由于经过发酵处理,DDGS 中的植酸磷含量减少,

有效磷含量增加,这些因素促进了异育银鲫的生长,料肉比的降低和蛋白质效率的提高,本试验结果证明了这一点。

DDGS 除了具有上述特点外,还存在一些缺点:DDGS 含有较高的粗纤维(8%)和一些象其它植物蛋白原料一样具有的未知抗营养因子,它们影响了鲫鱼对 DDGS 干物质和蛋白质的消化率,从而使配合饲料中的能量和蛋白满足不了鲫鱼生长的需求。林仕梅^[4]等测定草鱼对 17 种蛋白质原料的表观消化率,结果显示,草鱼对豆粕的蛋白消化率 (87.53%) 高于酒糟粉 (68.47%)。因此,一方面当饲料中 DDGS 添加过量时,虽然粗蛋白的含量不变,但其可消化蛋白减少,导致饲料蛋白质效率和饲料转化率降低;另一方面,当 DDGS 提高时,粗纤维含量和一些具有苦涩刺激性的抗营养因子逐渐增多,抑制了鲫鱼的食欲,使摄食率减少,生长受到影响,本试验中当饲料中 DDGS 过量添加到 40% 时,与对照组相比,其饲料蛋白质效率显著下降,料肉比明显升高,日摄食率严重下降,充分表明了这一点。

综上所述,根据上述生产性能指标综合评定,我

们建议在异育银鲫等杂食性鱼类的配合饲料中 DDGS 最适添加量为 10%~20%。

参考文献

- 1 姚军虎,王继平. DDGS 在奶牛日粮中的优化利用 [J]. 中国饲料, 1996 (20):28~30
- 2 姚军虎,张拴成. DDGS 饲喂泌乳奶牛效果的研究 [J]. 中国饲料, 1996(6):22~24
- 3 张忠臣,张显东,单安山. 瘤胃缓冲剂和 DDGS 对奶牛产奶量和乳成分影响的研究[J]. 饲料工业, 2003, 24(10):24~25
- 4 高泉,刘桂民. 产蛋鸡日粮中添加 DDGS 试验 [J]. 饲料与畜牧, 1991(3):6~7
- 5 徐奇友,王靖宇,单安山,等. 不同水平 DDGS 对蛋鸡生产性能的影响[J]. 饲料博览,2004(6):37~38
- 6 李玫,王树德. 干酒糟饲料(DDGS)饲喂瘦肉猪试验效果[J]. 国外畜牧学——饲料, 1992(5):9~13
- 7 李玫. 燃料乙醇副产品:猪用 DDGS 的新改良[J]. 饲料广角,2006 (6):37~38
- 8 魏文贵. 玉米 DDGS 的饲用价值及其在猪鸡日粮中的应用 [J]. 广东饲料,2005,14(6):16~18
- 9 沈少臣. DDGS 饲料的生产工艺及其重要作用[J]. 中国商办工业, 2001(6):24~25
- 10 柳尧波,黄金明,崔绪奎,等. 一种新型的蛋白质饲料——玉米 DDGS 的利用价值[J]. 饲料研究,2005(4):26~28
- 11 林仕梅,罗莉. 草鱼对 17 种饲料原料粗蛋白和粗脂肪的表观消化率[J]. 中国水产科学,2001,8(3):59~64

(编辑:徐世良,fi-xu@163.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
新编畜禽用药手册	葛宝伟等	17	实用鸡病防治图册	张爱民等	13
农家养兔技术	韩俊彦等	10	鸡主要传染病防治技术	贺伟等	7
禽病诊疗新技术	张英	13	养鸡技术大全	韩俊彦	25
观赏犬饲养调教服饰	郑雅文	51	饲料配制金点子	邵彩梅等	11
饲料工业标准汇编(1996~1999)		42	养鸡饲料手册	袁纛等	12
饲料工业标准汇编(1996)下		55	养鸡问答	孙长湖等	14
养鸡十大疫病防治		17	家禽孵化手册	王晓霞	17
百项养鸡新技术	卫广森等	21	家禽产蛋与综合效益	刘文奎	17
养猪十大疾病防治		24	养禽常用数据手册		35
1999 饲料添加剂要览		228	波尔山羊高效养殖	吴宓等	31
2000 饲料添加剂要览		26	新编鸡病诊断与防治		17
鲍鱼	高绪生等	18	实用禽蛋孵化新法		38

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

水产动物消化酶的研究

唐黎 王吉桥 程骏驰 许重

酶是生物体中具有催化功能的蛋白质,酶的显著特征是它们具有高度的催化能力和专一性,而且酶的活性可以被调节,与不同能量形式的转化密切相关。到现在为止,已知的酶类有近2 000种,消化酶是其中的一种,它主要是由消化腺和消化系统分泌的具有促消化作用的酶类。在消化酶中,依消化对象的不同而大致可划分为蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶和纤维素酶等几种。目前,国内外对于水产动物消化酶研究的报道主要以蛋白酶和淀粉酶为最多;从水产动物种类上来看,以鱼类、甲壳类等研究较多;近年来,对于棘皮动物、软体动物消化酶的研究也有较多的报道。

1 鱼类消化酶的研究

对鱼类消化道中消化酶的研究,是了解鱼类消化生理的重要内容,对于鱼类养殖过程中人工饵料的合理配制也具有重要意义。这方面的研究工作国外要比国内开展得早而多。研究消化酶在鱼体内的分布及其活性,可以将其中活性较高的酶提取利用,有利于水产加工过程中充分利用废弃物。如今,从大型的海水鱼中分离、提取的蛋白酶,已经广泛的应用于医药和生物化工领域。

1.1 鱼类蛋白酶

1.1.1 胃蛋白酶

有胃鱼类胃中作用最强的消化酶是胃蛋白酶,它先以不具有活性的酶原颗粒的形式贮存于细胞中,在盐酸或已有活性的蛋白酶作用下转变为具有活性的胃蛋白酶。一般软骨鱼类和有胃硬骨鱼类胃蛋白酶的最适pH值均在较强的酸性范围之内。鱼类胃内pH值主要受胃酸浓度的影响,胃液的分泌是由食物直接刺激胃而引起的,有食或进食一定时间后,胃液pH值较低,为偏酸性。因此,鱼类胃内pH值基本上能够满足胃蛋白酶的发挥,但视鱼种类不同而异。由于胃蛋白酶的活性随鱼类食性不同而变动,特别是肉食性

鱼类蛋白质的消化主要集中在胃,因此有必要在肉食性鱼类饲料中添加酸化剂或在饲料中添加促进胃液分泌的物质。

1.1.2 肝胰脏蛋白酶

硬骨鱼类的肝脏和胰脏大多是混在一起的,现已有研究证明,胰脏是分泌蛋白酶的主要器官,其分布极其复杂而散乱。关于鱼类肝胰脏蛋白酶活性及酶动力学方面的研究报道较多。鱼类肝胰脏蛋白酶的最适pH值多呈中性或弱碱性。软骨鱼类肝胰脏内的胰蛋白酶一般是没有活性的酶原,在肠致活酶的作用下被激活。Das(1991)对硬骨鱼类鲤鱼、黑鲈(*Micropterus sp.*)、丁鲷(*Phoxinus tinca*)的肝胰脏的研究表明,肠液能增强胰蛋白酶的作用,认为胰脏主要分泌蛋白酶原。而Fish(1960)发现,莫桑比克罗非鱼(*Tilapia mossambica*)的肝胰脏蛋白酶的活性比肠中的高。由此可知,不同鱼类其分泌蛋白酶的部位和形式不同,鱼类分泌的胰蛋白酶原,需在肠致活酶的作用下,使之激活,促进肠对食物蛋白质的消化吸收。

1.1.3 肠道蛋白酶

肠粘膜可以分泌有活性的蛋白酶和肠致活酶,肠致活酶作用就是激活胰蛋白酶原。此外,肠内还有来源于肝胰脏、幽门垂等器官分泌的胰蛋白酶,这样使肠蛋白酶的研究较为复杂。肠蛋白酶最适pH值大多为微碱性。黄耀桐(1988)认为,有胃鱼类和无胃鱼类肠蛋白酶最适pH值是不同的,不同食性的鱼类最适pH值也有一定的差异,冷水性鱼类偏高;肠道蛋白酶的活性还受到鱼类饱食情况和饲料蛋白质水平的影响,草鱼肠道蛋白酶在蛋白质为32%~40%范围内,随蛋白质水平的增加肠道蛋白酶活性增强。黄峰(1996)指出,饲料性质不同,肠蛋白酶的活性也有差异。总之,鱼类肠道蛋白酶活性受多种因素的影响,而蛋白酶活性又直接影响鱼类营养物质吸收利用的程度,从而影响鱼类的生长发育。

1.2 鱼类淀粉酶

1.2.1 胃淀粉酶

关于胃淀粉酶的研究资料较少,但可以肯定胃内存在淀粉酶。大多数硬骨鱼类胃淀粉酶最适pH值是弱酸性或中性。由于胃淀粉酶的活性明显地低于肠、

唐黎,大连水产学院生命科学与技术学院、贵州大学动物科学学院,550025,贵州省贵阳市花溪区贵州大学(南校区)。

王吉桥、程骏驰、许重,大连水产学院生命科学与技术学院。

收稿日期:2006-10-11

肝胰脏和幽门垂等器官的淀粉酶活性,且胃内 pH 值在较强的酸性范围内,因此认为淀粉酶在胃内的消化作用微乎其微。

1.2.2 肝胰脏淀粉酶

关于鱼类肝胰脏淀粉酶的研究报道较多,其研究结果显示,淀粉酶最适 pH 值从弱酸性到弱碱性,平均值接近中性,对热不稳定,其活性要比哺乳动物低得多。肝胰脏是淀粉酶生成的中心器官,其分泌机能的强弱直接影响鱼类对食物中淀粉的消化能力。

1.2.3 肠道淀粉酶

鱼类的肠道存在淀粉酶,最适 pH 值从酸性到弱碱性,但大多在中性范围内,不同食性以及有胃鱼类和无胃鱼类淀粉酶的最适 pH 值差异不大。对鱼类肠道淀粉酶的研究认为,淀粉酶主要是由胰脏分泌的,但不同的鱼类分泌器官亦有差别,有的鱼类是由肝胰脏一种器官分泌的,有些鱼类肠道也是分泌淀粉酶的重要器官。

鱼类各种消化器官中均存在淀粉酶,淀粉酶活性的强弱因鱼种类、消化器官不同而异。因此,有必要在饲料中添加外源性淀粉酶,提高淀粉利用率,减少有机物排泄量,从而减轻水体污染。

1.3 鱼类食性和消化酶的关系

动物的食性因种类不同而异,即使是同一种类,在不同的环境条件和不同的发育阶段也不尽相同,但动物的食性总是和其本身的消化酶组成状况密切相关。有学者做了大量的研究工作,所有这些研究大都得出了一个共同的结论,即鱼类有什么样的食性就有什么样的消化酶组成状况,而且消化酶活力大小的变化程度与食物组分的变化程度也有一定的相关性,这也是生物本身的一种适应。

1.4 季节变化与消化酶的关系

环境条件的变化对生物的生理生化反应有很大的影响,鱼类随季节的变化其消化酶的活力和组成也有一定的变化。目前,国内外对于消化酶与季节变化关系的研究报道较少。有学者研究指出,由于季节的不同、环境水温的变化,鱼类消化酶活力发生变化,进而直接影响动物对营养物质吸收利用的程度,因而鱼类在不同的季节会有不同的生长速度。

1.5 生长与消化酶活性的关系

随着鱼体的生长,鱼体需要营养成分的质与量也随之变化。随着生长、消化器官相对增大,内分泌机能增强,从而使消化酶也随之发生适应性变化。北御门(1960)、川合真一郎(1975)和李广丽(1994)对鱼类生长

与消化酶活性的关系进行了研究,结果表明,鱼类在个体发育过程中,不同时期存在着相应的消化生理特点,从而为各发育阶段合理安排饲料各成分含量提供了可靠的参考依据。

1.6 消化酶在鱼体内的分布

不论是有胃鱼类还是无胃鱼类以及鱼类的食性如何,其前肠是消化蛋白质的主要场所。关于肠道淀粉酶的分布,不同的研究有不同的结果。Shinichi 等(1973)分别对草鱼、莫桑比克罗非鱼应用淀粉底物条带法确定各消化器官中淀粉酶存在的位置,对黑鲈、铜吻鲈、太阳鱼、鲤鱼、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、草鱼等淀粉酶活性研究发现,后肠活性最强,而前肠最弱。倪寿文(1992)对草鱼、鲤鱼、鲢鱼、鳙鱼、尼罗非鲫淀粉酶活性及分布情况进行研究后指出,淀粉酶在肠道分布有 2 种类型,草鱼、鲤鱼的淀粉酶活性在后肠活性最强,而前肠最弱;鲢、鳙、尼罗非鲫这 3 种鱼淀粉酶活性分布在中肠最强。Kawai 等(1973)对草鱼、真鲷、香鱼(*Lecoglossus altivelis*)的各种碳水化合物酶在各个消化器官中的分布进行了研究表明,淀粉酶在肠道分布因鱼而异,与鱼类的摄食情况有关。通过这些研究可以清楚地了解鱼体是在何部位消化吸收食物中相应的营养成分的,同时也为研究消化酶的分泌、贮存机制提供了依据。

1.7 天然饵料中的消化酶及外源消化酶在鱼类消化过程中的作用

水环境中存在着鱼类的天然饵料生物,被鱼类摄食后其本身具有的消化酶对鱼类消化有着较大的影响。Lauff(1984)对白鲢属(*Coregonus*)、鲑属(*Salmo*)和拟鲤进行研究后指出,饵料生物本身消化酶对孵化后仔鱼生长起着极其重要的作用。Das(1991)在研究草鱼消化酶过程中发现了外源性纤维素酶和细菌产生的纤维素酶,并阐述了其作用;还发现草鱼消化酶的形式和活力依赖于其摄取的饵料种类,并建议人工饵料中需加入动物蛋白以适应草鱼中存在的较高活性的蛋白酶和淀粉酶。

随着对鱼类消化酶的深入研究可知,鱼类本身分泌的消化酶还不能够满足其快速生长发育的需要,且会造成饲料系数较高,饲料浪费,甚至造成水体严重污染。因此,在饲料中添加适量外源酶,可以弥补内源酶的不足,促进鱼类生长发育,提高饲料的利用率,同时又能减少鱼类粪便中氮、磷的排泄量,从而减轻水体有机负荷,保护水质。

1.8 胚后发育阶段消化酶的发生和演变

有关消化酶发生的研究不论在理论上还是在生产实践上均有相当重要的意义。研究鱼类各阶段酶活力的出现与变化有助于人们了解各期幼体如何利用饵料,以及需要什么样的营养成分。Kawai等(1973)研究了虹鳟鱼、鲤鱼和黑鲈鱼消化酶的发生和演变情况,发现幼体期存在消化酶种类的变化。井健二等(1992)研究了真鲷鱼从孵化后到仔稚鱼发育过程中消化酶的发生和演变,结果表明,随着肠道的发育完善,消化酶的种类和活力大小发生了变化。在仔稚鱼期,人工饵料的投喂致使胰蛋白酶大幅度增加,同时也导致仔稚鱼的低生长率和最终的死亡。总之,各种消化酶的发生并不是完全同步的,而是随着鱼体的生长发育逐步演变和完善。

1.9 鱼类消化酶酶促反应与酶动力学方面的研究

酶的蛋白质性质决定了温度和pH值是酶促反应的两个重要影响因素。不同生物种类、不同的组织器官以及不同的酶类具有不同的最适pH值和最适温度,同时最适pH值和最适温度随不同的反应条件而有所不同。最适pH值和最适温度与生物本身消化道的pH值及生活温度常常不一致甚至有极大的差别,一般来说,生物消化道内的pH值条件能够极大的满足其不同种消化酶活力的表现。最适温度的测定是在实验规定的反应时间条件下进行的,实际上生物体内酶起作用的时间会长得多,所以最适温度只是在一定条件下才有意义,但也在一定程度上反映消化酶的耐热性,由此计算而来的活化能的大小可用来比较不同种酶活力的大小。

2 甲壳类消化酶的研究

目前,国内外对于甲壳类动物消化酶的研究主要集中在虾类消化酶的研究上。研究发现,甲壳动物消化液中存在蛋白水解酶、脂肪酶、淀粉酶、麦芽糖酶和蔗糖酶。以往关于这些酶的特征描述主要根据粗提物的最适温度和最适pH值,但由于试验条件不同,不同研究的结果很难比较;同时,对实验控制不严格,上述酶的存在也受到怀疑,因为这些酶的活性完全有可能来自肠道中共生的微生物、摄食的饵料生物或不纯的药品。近十多年来随着甲壳动物养殖的兴起,饵料短缺问题显得尤为突出,因此,甲壳动物消化酶的研究日益受到重视。目前,国内外对于甲壳类动物消化酶的研究主要集中在虾、蟹类消化酶的研究上,其中又以虾类消化酶的研究最为深入。

2.1 发育不同阶段酶活力的变化

Patricia等(1990)对美国龙虾早期发育过程中前

肠腺至中肠腺各组织器官的蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶做了分析,在龙虾的5个幼虫阶段以及卵孵化中的几个时期分别予以测定,阐明了这3种消化酶在各个阶段的发生和变化。刘玉梅等(1984、1990)先后对中国对虾消化酶进行了两次研究,测定了稚虾期、生长中期、收获期3个阶段的肝、胃、肠中酶的活力;将稚虾期按蚤状幼体、糠虾幼体和仔虾3个时期分析其食性转化、消化酶的转变以及每个时期其消化酶的组成,从而在更深的层次上丰富了这项研究,同时也为各发育阶段合理安排饵料各成分含量提供了可靠的理论依据。魏华等(1996)对罗氏沼虾幼体和成虾的消化酶进行研究后指出,在罗氏沼虾幼体发育过程中,类蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶活性在中期最高,而在发育早期和后期较低;胃蛋白酶活性在发育后期较高。消化酶的这种变化形式与刘玉梅(1984)得出的中国对虾随着幼体发育消化酶上升有所不同。Lovett(1990)认为,在虾幼体发育的不同时期消化酶活性的变化是与虾的食性相一致的。潘鲁青(1997)采用酶学分析方法测定了中国对虾、日本对虾、中华绒螯蟹和三疣梭子蟹各期幼体的4种消化酶活力,并对它们在幼体发育过程中消化酶活力的变化规律进行了分析研究。实验结果表明,4种虾蟹类在整个幼体发育过程中,4种消化酶活力表现出3种不同的变化模式,其中虾类和蟹类幼体消化酶活力的变化模式有各自的相似性,而且它们的胃蛋白酶、类胰蛋白酶和淀粉酶活力较高,纤维素酶活力极微;在食性转换过程中,胃蛋白酶、类胰蛋白酶和淀粉酶活力出现较明显的变化。

2.2 饵料因素对消化酶活力的影响

许实荣(1987)分析了维生素B对中国对虾消化酶的影响,阐明了VB在对虾体内碳水化合物代谢和蛋白质代谢中所起的重要作用。Maugle(1982)则专门针对一种食物即短颈蛤(Shortneck clam)对对虾生长和消化酶的作用进行研究,结果表明,只有短颈蛤鲜活投喂时才会对虾类消化酶有影响。分析饵料对消化酶活力的影响,不仅可以作为饵料各营养成分消化吸收和利用的重要指标,且对人工饵料的合理配制意义重大。

3 棘皮动物消化酶的研究

3.1 不同发育阶段的棘皮动物消化酶的活性

海胆和海参是重要的海水养殖对象,海胆一直是用来研究受精和胚胎发育的好材料,所以,关于海胆与其相关的研究进行得较多、较早。但关于海胆消化

酶的研究仅有少量报道,研究也是结合海胆的生长发育进行的。美国学者 Victor 等 (1971) 研究了海胆 (*Dendraster excentricus*) α -淀粉酶的活性,指出它随着海胆长腕幼体的肠分化而出现,并且与 β -1,3-葡聚糖酶同步增加。这种 α -淀粉酶还兼有麦芽糖酶的作用,同时还证明了海胆幼体阶段的 α -淀粉酶和海胆成体的 α -淀粉酶具有不同的最适 pH 值范围,进而判断这两种酶是不同的两种蛋白质。同年,Victor 等还对海胆长腕幼体肠分化阶段 β -1,3-葡聚糖酶的发生和活力大小进行了探讨和测定。

3.2 棘皮动物消化酶酶促反应与酶动力学

日本学者田岛健一郎(1993)和泷襄(1992)对海胆消化酶进行过一些定性的分析。李大志(2002)研究了虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)蛋白酶的主要特性,如酶动力学等。实验结果表明,虾夷马粪海胆消化道内含有两种蛋白酶(类胃蛋白酶和类胰蛋白酶),它们的最适温度分别为 50、40 $^{\circ}\text{C}$,最适 pH 值分别为 2.0、8.6。类胃蛋白酶的抗热性大于类胰蛋白酶,因此在饵料配制过程中应根据季节变化,调整主要配料的比例,提高饵料的转化率。虾夷马粪海胆蛋白酶的最适温度与其它水生动物主要消化酶的最适温度的比较发现,水生动物消化酶反应的最适温度一般都高于它们的生理极限温度。生物在正常生理条件下的酶促反应是在低于酶本身的最适温度下进行的。这可以认为是生物在长期进化过程中的一种适应,因为温度越高,对酶蛋白的破坏越大;而在较低温度,比较温和又能保证正常生理机能条件下进行酶促反应是对生物本身的一种保护。

4 软体动物消化酶的研究

近年来随着水产养殖业的大力发展,相继有不少学者对不同的软体动物进行了研究。刘万顺等(1988)研究了紫贻贝(*Mytilus edulis*)和滨螺(*Littorina brevicula*)的消化酶活性大小。朱仁华(1983)对 3 种海产螺类即朝鲜花冠小月螺(*Lunella coronata*)、单齿螺(*Monodonta labio*)和疣敌荔枝螺(*Thais clavigera*)进行了研究。小玉修嗣等对柔鱼(*Todarodes pacificus*)的胰凝乳蛋白酶进行了研究。杨蕙萍等(1997、1998)曾针对皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)的蛋白酶、淀粉酶和褐藻酸酶的最适温度和最适 pH 值进行了测定,同时又测定了 10 种金属离子对这 3 种酶的影响,其中 Ag^+ 、 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 对酶活性有极显著的抑制作用,而 Ca^{2+} 、

Mn^{2+} 和 Fe^{3+} 则对其活性有促进作用。张硕等(1997)研究了温度和 pH 的变化对栉孔扇贝蛋白酶和淀粉酶活性的影响,试验结果表明,栉孔扇贝的蛋白酶不但与酶性质有关,也与栉孔扇贝对温度的适应密切相关。淀粉酶的最适 pH 值为 6.45,与所在的体内环境 pH 值一致,说明无脊椎动物之间淀粉酶的最适 pH 值差异不大。

就目前对软体动物的消化酶类的研究状况来说,单纯针对消化酶及其各方面特性的研究并不是太多,而大多数则集中在对软体动物消化酶的利用上,且主要的用途范围又集中在对海藻细胞壁的解壁作用,从而得到其原生质体,利用原生质体培养植株或是进行杂交等,在生物工程技术上有极大的利用价值。目前已做过研究的藻类很多,且取得了较好的效果。

对水产动物消化酶的研究,是认识酶的结构与功能的关系,探讨酶作用机理的一种重要手段;是了解水产动物消化生理的重要内容。一方面,酶在体内的活性水平反映了水产动物机体内的生理状况;另一方面,如果控制机体内酶的活性水平,就能对水产动物的机能活动做出相应的调整。因此,了解消化酶特性的生物学规律对于养殖饲料研制具有重要的意义。目前,关于水产养殖消化酶的研究也存在一些问题:①外源性物质对水产动物消化的贡献问题,即外来酶源在促进消化酶活性中的机制是什么?这里的外源性物质主要指消化道内存在的微生物和生物活饵料带来的外来酶源。由于肠道中的微生物也存在简单的酶系,因此对水产动物消化饵料和饲料中的营养物质也起到作用。②蛋白质合成评价问题。我们通过对消化酶活力的测定,可以对水产动物消化营养物质做出评定,但是机体不仅要消化蛋白质,而且要进行蛋白质的合成,并且后者是最重要的,因为我们最终关心的是动物的生长情况,但对于这一点目前还很少有研究,将来可能会是一个研究热点。

(参考文献 61 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:沈桂宇,guiyu62@tom.com)

两种饲料对大口黑鲈生长、 消化道指数和消化酶活性的影响

关胜军 吴锐全 谢 骏 王广军 牛纪锋

鱼类消化酶的分泌受到多种因素的影响,饵料的组成是重要影响因素。大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)是我国重要淡水鱼养殖品种,但人工饲料一直是制约其养殖规模发展的重要因素,本文探讨了不同饲料对大口黑鲈生长及消化酶活性的影响,旨在为人工饲料的开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 养殖试验设计

试验在中国科学院珠江水产所内池塘网箱中进行,试验分为人工软颗粒配合饲料的试验组(I组)和冰鲜鱼饲喂的对照组(II组)。每种饵料组设3个重复,共6个网箱,网箱规格为(1×1×1) m³,悬挂于池塘中,两种饵料组的网箱为随机设置,将环境因子影响降低到最小。试验鱼为前期投喂人工软颗粒饲料的幼鱼,试验开始时鱼的规格为:体重(48.2±4.6) g、体长(13.5±3.2) cm。

每个网箱放入30尾大口黑鲈,称量每个网箱鱼的总体重。每天早晚投喂2次,投饵量为鱼体重的2%,并随着试验的进行随时调整投饵量。每天记录水温、溶氧、pH值,夜间开增氧机。对比试验饲养时间为60 d,从2005年10月8日正式开始,每隔10 d取样一次,每次每个网箱取3条,实验室进行消化组织常规测定(长度与重量)和消化酶分析。

1.2 两种饵料成分

人工饲料为湿软颗粒饲料,其具体配方比例为:进口鱼粉42%、国产鱼粉10%、豆粕26%、淀粉10%、复合维生素1%、复合矿物质4%、鱼油4%、豆油2%、乌

贼膏1%(上述原料均购于珠江水产研究所饲料厂)。试验人工软颗粒饲料中的粗蛋白、粗脂肪、粗灰分、水分按国标方法测定,人工软颗粒饲料与冰鲜鱼中的营养成分见表1。

表1 人工软颗粒饲料与冰鲜鱼营养成分对比(%)

饲料种类	水分	粗蛋白	粗脂肪	灰分
人工软颗粒饲料	34.33	34.47	8.26	11.21
冰鲜鱼	68.19	20.55	8.21	3.05

1.3 酶液制备

将大口黑鲈置冰盘毁髓处死,解剖分离肝脏、胃、幽门盲囊和肠,并称重,测量肠长,剔除消化道内容物及肠系膜,用去离子水冲洗干净。用剪刀将各组织剪成小块,按样品重的9倍加入预冷去离子水配制成缓冲液,并在高速组织匀浆机中冰浴匀浆,10 000 r/min离心30 min,取上清液置于4℃冰箱中保存,进行酶活力检测,24 h内分析完毕。

1.4 酶活性测定

1.4.1 淀粉酶样品测定

在DNS法(3,5-二硝基水杨酸法)测定的基础上稍加改进,将0.5 ml淀粉溶液(浓度为2%)与1 ml粗酶提取液混合(对照样品为先将酶液在沸水中失活,然后加淀粉溶液),在40℃恒温水浴中酶解反应15 min,用浓度为2 mol/l的NaOH溶液1 ml终止反应,再加1 ml的DNS试剂显色,在沸水中煮5 min,然后在冰浴中迅速冷却,加9 ml蒸馏水至12.5 ml,于520 nm下比色。

淀粉酶活力:以1 g鲜活消化组织中所含酶每15 min水解产生1 mg麦芽糖为一个酶活力单位,以U/g表示。

1.4.2 蛋白酶样品测定

采用福林酚法测定,将1 ml酪素溶液(浓度为1%)与1 ml粗酶提取液混合(对照样品为先将酶液在沸水中失活,然后加酪素溶液),在40℃恒温水浴中酶解反应10 min,用0.4 mol/l三氯乙酸5 ml终止反应,定性滤纸过滤,取1 ml滤液与0.4 mol/l Na₂CO₃ 5 ml混合,

关胜军,中国水产科学研究院珠江水产研究所,510380,广州荔湾区芳村。

吴锐全(通讯作者)、谢骏、王广军、牛纪锋,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-22

★ 广东省科技计划项目(2004B20301005);中国水产科学研究院人才基金项目

再加 1 ml 福林试剂,混匀,40 ℃显色 20 min,于 680 nm 处检测吸光值。

蛋白酶活力:以 1 g 鲜活组织中所含酶每分钟水解酪素产生 1 μ g 酪氨酸为一个酶活力单位,以 U/g 表示。

1.5 数据分析

所有数据均采用 Spss11.0 统计软件处理, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 不同饵料对大口黑鲈消化道系数、消化酶分布和生长的影响

①对肝脏重与体重比的影响: I 组大口黑鲈在饲养第 10 d 开始肝重与体重比明显高于 II 组($P < 0.05$),而且呈不断增大趋势,而 II 组则维持在比较稳定的水平(见图 1)。②对胃重与体重比的影响: I 组先呈下降趋势,从第 20 d 开始维持在稳定水平;而 II 组从开始到第 30 d 呈下降趋势,第 30 d 之后呈上升趋势,并且比值大于 I 组($P < 0.05$)(见图 2)。③对幽门盲囊重与体重比的影响: I 组始终高于 II 组($P < 0.05$)(见图 3)。④对肠重与体重比的影响:两组均呈上升趋势, I 组明显高于 II 组($P < 0.05$)(见图 4)。⑤对肠长与体长比的影响:两组均呈上升趋势,相互差异并不显著($P > 0.05$)(见图 5)。

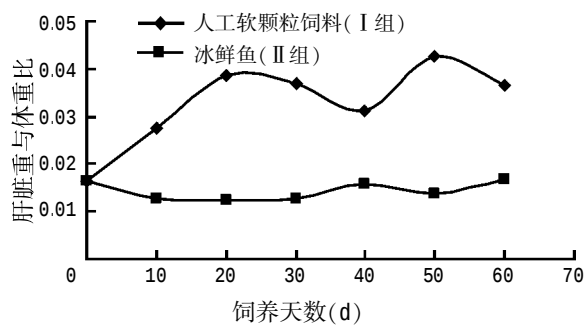


图 1 不同饵料对肝脏重与体重比的影响

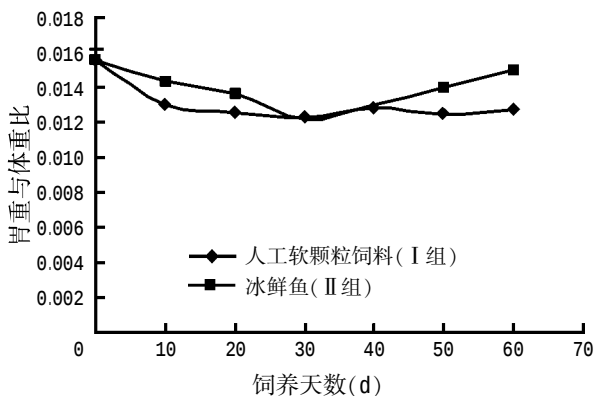


图 2 不同饵料对胃重与体重比的影响

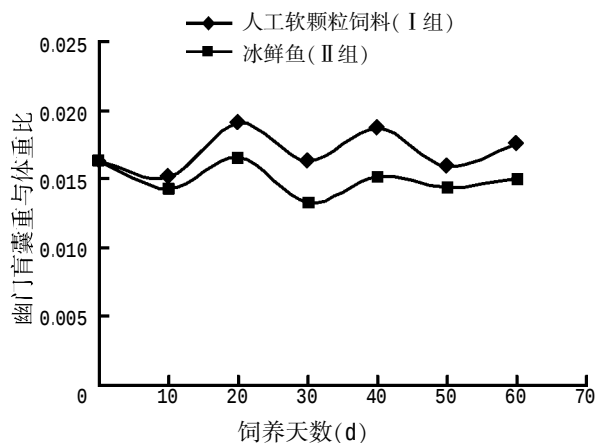


图 3 不同饵料对幽门盲囊重与体重比的影响

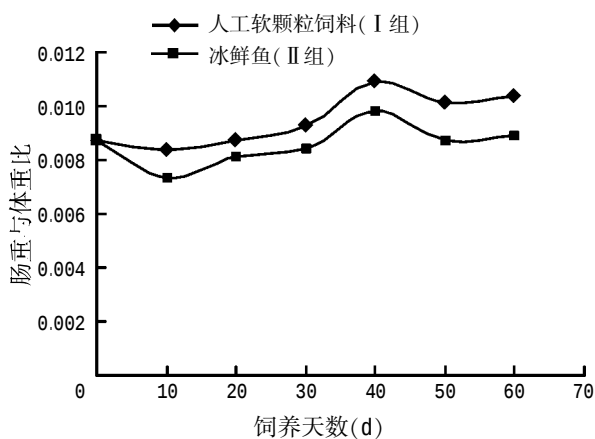


图 4 不同饵料对肠重与体重比的影响

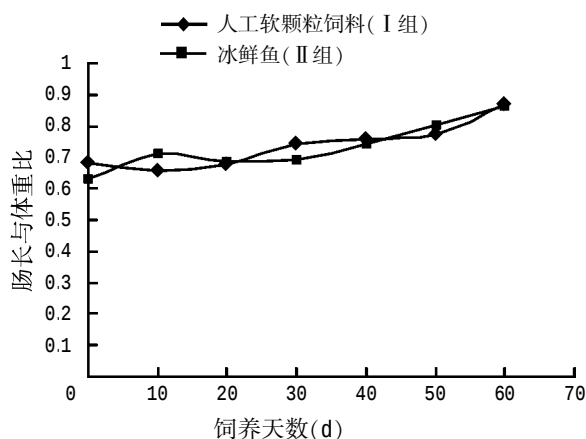


图 5 不同饵料对肠长与体长比的影响

I 组各消化道蛋白酶活力大小依次为胃>幽门盲囊>肠道,而 II 组为胃>肠道>幽门盲囊(数据来自试验结束第 60 d,见表 2); I 组淀粉酶活力在各消化道依次为肝脏>幽门盲囊>肠道>胃,而 II 组为幽门盲囊>肠道>肝脏>胃(数据来自试验结束第 60 d,见表 2)。

表2 试验组消化道蛋白酶活力和淀粉酶活力(U/g)

项目	蛋白酶活力		淀粉酶活力	
	I	II	I	II
胃	460.9±25.2	650.1±20.5	9.3±1.2	3.1±0.6
幽门盲囊	400.3±40.6	355.9±30.2	15.4±1.5	25.6±0.5
肠道	291.3±35.8	400.7±20.5	11.3±3.5	17.6±2.5
肝脏	-	-	23.1±2.8	12.6±0.7

从饲养第 20 d 开始, II 组体长增长明显高于 I 组($P<0.05$)(见图 6),从饲养第 30 d 开始, II 组体重增长明显快于 I 组($P<0.05$)(见图 7)。

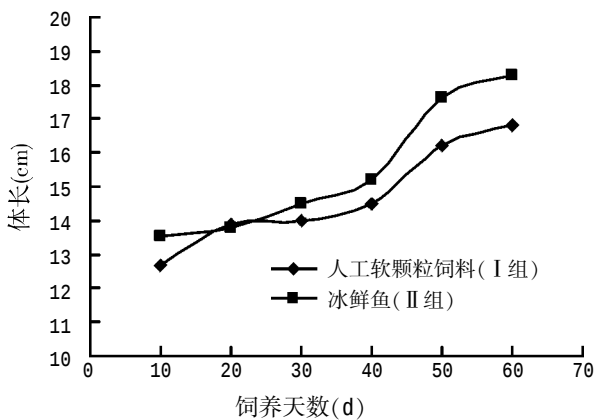


图6 不同饵料对体长增长的影响

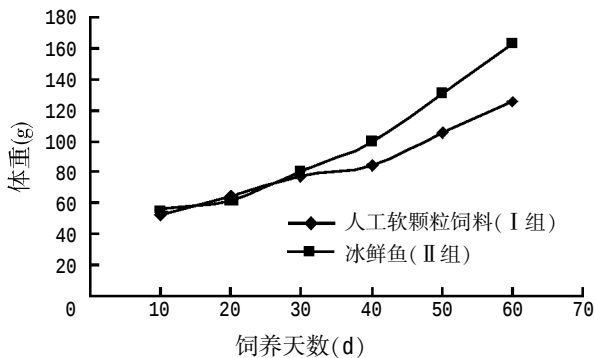


图7 不同饵料对体重生长的影响

2.2 不同饵料对蛋白酶活力的影响

I 组胃蛋白酶活力在饲养开始至第 30 d 呈上升趋势,之后保持平稳水平;II 组胃蛋白酶活力呈上升趋势,在饲养第 20 d 开始明显高于 I 组($P<0.05$)(见图 8)。I 组幽门盲囊蛋白酶活力由开始至饲养第 40 d 呈上升趋势,之后呈下降趋势,从饲养第 30 d 开始明显高于 II 组($P<0.05$);II 组从饲养第 30 d 开始呈下降趋势(见图 9)。肠道蛋白酶在两个对比组均呈不断升高趋势,II 组从饲养的第 10 d 开始就高于 I 组($P<0.05$)(见图 10)。

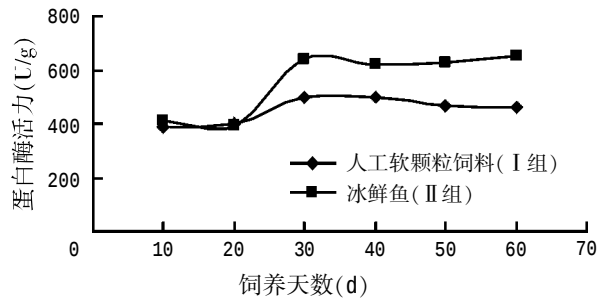


图8 不同饵料对胃蛋白酶活力影响

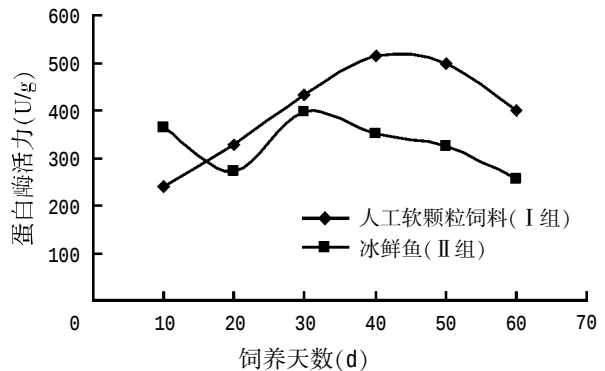


图9 不同饵料对幽门盲囊蛋白酶活力影响

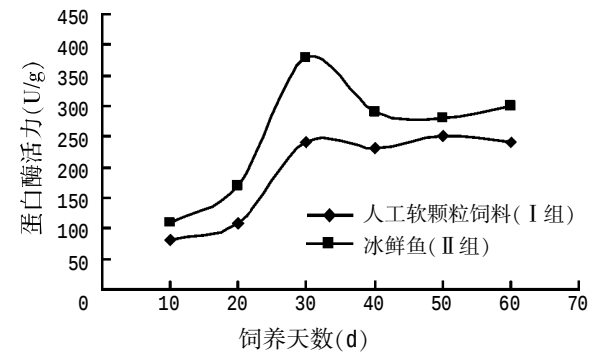


图10 不同饵料对肠道蛋白酶活力影响

2.3 不同饵料对淀粉酶活力的影响

I 组胃淀粉酶活力在饲养的第 10 d 开始就明显高于 II 组($P<0.05$),两组胃淀粉酶活力变化趋势较为相似(见图 11)。I 组幽门盲囊淀粉酶活力在饲养的第 30 d 开始呈上升趋势,第 50 d 开始保持稳定活力,且开始高于 II 组($P<0.05$);II 组幽门盲囊淀粉酶活力从开始至饲养第 40 d 呈上升趋势(见图 12)。肠道淀粉酶在两种饵料组对比生长中整体均呈上升趋势,在饲养第 30 d 开始, I 组肠道淀粉酶活力明显高于冰鲜鱼组($P<0.05$),两个对比淀粉酶活力变化趋势在饲养第 30 d 之后较为相似(见图 13)。I 组肝脏淀粉酶活力从饲养的第 10 d 开始明显高于 II 组($P<0.05$),并且在饲

养第 20 d 开始维持在较高活力;Ⅱ组肝脏淀粉酶活力从开始至饲养第 30 d 呈上升趋势,然后维持在稳定活力(见图 14)。

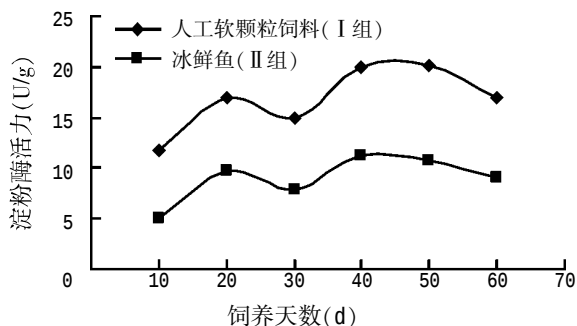


图 11 不同饵料对胃淀粉酶活力影响

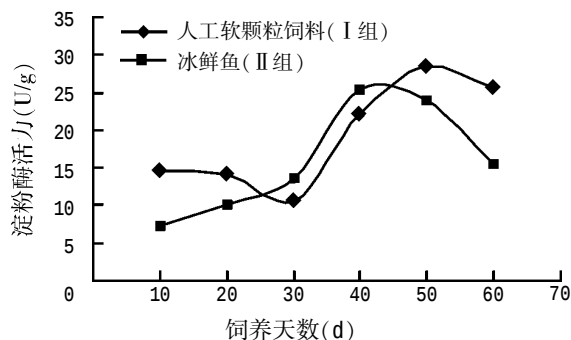


图 12 不同饵料对幽门盲囊淀粉酶活力影响

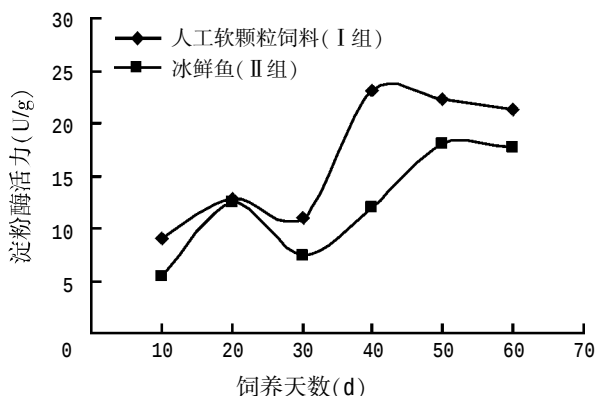


图 13 不同饵料对肠道淀粉酶活力影响

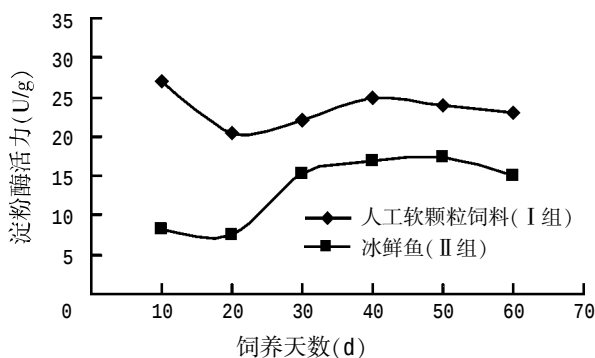


图 14 不同饵料对肝脏淀粉酶活力影响

3 讨论

鱼类消化酶活力与摄食的饵料组成密切相关,饲喂人工配合饲料和动物性鲜活饵料对鱼类不同消化酶的活力具有不同的影响。Rosch 认为配合饲料组白鲢(*Coregonus lavretus*)肠中氨肽酶、麦芽糖酶和非特异性酯酶的活性比活饵料组的高。Munilla 认为,6 日龄仔鱼、30 日龄大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)摄食桡足类时的消化酶分布形式、活性与不摄食桡足类的存在显著性差异。鲫鱼(*Carassius auratus*)饲养 2~3 周后,胰蛋白酶活力因饲料(活饵料、混合饲料和干饲料)不同而不同。Caruso 等用鲜活饵料和配合饲料喂养腋斑小鲷(*Pagellus acarne*)20 d 后发现,摄食鲜活饵料的鱼蛋白酶、弹性蛋白酶的总量比摄食人工配合饲料的要高,且蛋白酶的活性的增加与鱼的生长相关。王重刚等用轮虫、水丝蚓、鱼糜和配合饲料投喂 40 日龄的真鲷(*Pristigenys nipponia*)稚鱼,2 d 后蛋白酶活力以轮虫组为最高,鱼糜组次之,水丝蚓和配合饲料组活性极低;淀粉酶活力以配合饲料组最高,轮虫和鱼糜组次之,水丝蚓组最低。Nagase 用蛋白质饵料(兔肉)、糖类饵料(面包)、脂肪饵料(含脂牛肉)饲喂杂食鱼类莫桑比克罗非鱼(*Tilapia mossambica*),其胃蛋白酶活性不受饵料影响,但胰蛋白酶活性与饵料中蛋白质含量呈正相关关系。本试验所用的饲料分别为人工软颗粒饲料(I组)和冰鲜鱼(II组),对不同组织间的蛋白酶和淀粉酶活力分布产生影响,I组各消化道蛋白酶活力依次为胃>幽门盲囊>肠道,而II组为胃>肠道>幽门盲囊;I组各消化道淀粉酶活力依次为肝脏>幽门盲囊>肠道>胃,而II组为幽门盲囊>肠道>肝脏>胃。Ragyanszki 研究鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的幼鱼消化酶、Barahi 等研究带纹白鲈(*Roccus saxatilis*)的消化酶、Pedersen 等研究大西洋鲱(*Clupea harengus*)的幼鱼的消化酶均发现,鱼类蛋白酶的分泌和活性大小与所摄取的食物性质和数量有关,大口黑鲈蛋白酶和淀粉酶在各个消化组织的分布和活力受饵料影响十分明显。

本试验的不同阶段,两种饵料对各组织蛋白酶和淀粉酶活力影响各不相同。胃蛋白酶活力在I组呈上升趋势,在 30 d 之后达到较高水平,并维持到试验结束,而II组在第 20 d 后开始增大,明显高于I组。I组胃淀粉酶活力始终明显高于冰鲜鱼组,两种饵料对胃淀粉酶活力变化的趋势影响十分相似,这一特点同样体现在幽门盲囊淀粉酶和肠道淀粉酶上。试验I组的肝脏淀粉酶活力始终高于II组,这与 10 d 之后其肝脏重与体重比就开始高于冰鲜鱼组相对应,但同时

也表明,肝脏的病理症状开始产生。试验 20 d 之后,Ⅱ组体长增长速度明显快于Ⅰ组,30 d 开始体重增长高于Ⅰ组。高蛋白酶活力是消化吸收蛋白质的重要保证,虽然Ⅱ组幽门盲囊蛋白酶活力低于Ⅰ组,但Ⅱ组胃蛋白酶和肠道蛋白酶活力明显高于Ⅰ组,而且Ⅱ组各消化道总的蛋白酶活力也高于Ⅰ组,这说明胃蛋白酶在大口黑鲈蛋白质消化中占有主要地位。上述结果与Ⅰ组幽门盲囊重与体重比、肠体比和肝体比始终高于Ⅱ组存在的联系有待于研究。

由试验结果可以看出,Ⅰ组淀粉酶活力一般都高于Ⅱ组,这可能与其所含淀粉诱导所致。配合饲料虽然营养全面,但蛋白质来源不同。当试验采用鱼粉和豆粕作为蛋白源时,鱼类利用动物性蛋白质效率明显高于植物性,同时人工饲料淀粉含量较高,这可能是引起蛋白酶活性降低、淀粉酶活性升高的原因。Jollivet 对大菱鲈 (*Scophthalmus maximus*) 和 Roseh 对白鲢 (*Coregonus lacaretus*) 的研究也证实了这一结果。Nagase 用不同饵料喂饲莫桑比克罗非鱼,得到淀粉酶活性与饵料中淀粉含量呈正相关关系,说明淀粉酶的活性可以受到饲料中淀粉的诱导,这也说明鱼类对饲料的适应。Kawai (1972) 和 Ikeda (1973a) 试验证明了鱼类肠道的消化酶活性可以适应饲料性质,或者说饲料性质可以影响消化酶活性。本试验Ⅱ组生长中后期明显快于Ⅰ组,这主要缘于Ⅱ组蛋白酶活性高(除盲囊外)。分析其原因:①动物性鲜活饵料可能为大口黑鲈直接提供了生长所必需的未知酶类。陈品健和 Boulhic M 认为仔鱼不能利用配合饲料是因为消化酶活性低,而活饵料体内的消化酶能弥补这种不足。但 Tadahide 等的试验表明,来自活饵料的蛋白酶对仔鱼消化的直接贡献不显著。②饵料的适口性问题。试验人工软颗粒饲料的含水量为 34.33%,而冰鲜鱼的含水量为 68.19%,几乎为前者两倍,因此适口性方面人工软颗粒饲料不及冰鲜鱼。③冰鲜鱼蛋白质成分为动物性,人工软颗粒饲料则由多种成分组成,蛋白质组成复杂,经过加工,消化液很难充分渗透,这些都为鱼类的充分消化带来困难和额外负担。虽然实际人工软颗粒饲料的粗蛋白为 34.47%,冰鲜鱼为 20.55%,但人工软颗粒饲料蛋白质消化率低于冰鲜鱼,因此应进一步考虑提高蛋白质消化率,而并不简单从提高饲料的粗蛋白含量入手。对于大口黑鲈人工饲料蛋白酶活力不够,应考虑外源添加消化酶,如蛋白酶等,使鱼类摄食的蛋白质真正转化为鱼体蛋白质。改善饲料适口性,合理调控营养成分,加强鱼类的驯化,最终使人工饲

料完全替代鲜活饵料。

参考文献

- 1 王宏田,张培军.牙鲆体内消化酶活性的研究[J].海洋与湖沼,2002,33(5):472~476
- 2 Shinichi Y. Localization of amylase activity in digestive organs of carp determined by a substrate film method. Bull Japan Soc. Sci. Fish, 1973, 39(5): 497~504
- 3 Roseh R, Senger H. Development of dry food for larvae of *Coregonus lavretus* L. I. Growth, food digestion and fat absorption [J]. Aquaculture, 1990, 91: 101~115
- 4 Munilla Moran R, Stark J R. Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.) [J]. Aquaculture, 1989, 81(3/4): 315~327
- 5 Abi. Ayad A, Kestemont P. Comparison of the nutritional status of goldfish (*Carassius auratus*) larvae fed with live, mixed or dry diet [J]. Aquaculture, 1994, 128(1/2): 163~176
- 6 Caruso G, Genovese L, Greco S. Effect of two diets on the enzymatic activity of *Pagellus* (Brunnich 1768) in intensive rearing [J]. European Aquaculture Soc., 1993, 19: 332~342
- 7 王重刚,陈品健,顾勇,等.不同饵料对真鲷稚鱼消化酶活性的影响[J].海洋学报,1998,20(4):103~107
- 8 Nagase G. Contribution to the physiology of digestion in *Tilapia mossambica* - digestive enzymes and the effects of diets on their activity. Z. Vergl. Physiol., 1964(49): 270~284
- 9 Ragyanszki M. Preliminary investigations on the proteolytic digestive enzymes of carp fry [J]. Aquaculture, Jung (Szarvas), 1980, 2: 27~30
- 10 Barahi V, Lovell R T. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development [J]. Trans. Am. Fish Soc., 1986, 115: 478~484
- 11 Pedersen B H, Nilssen E M. Variations in content of trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii [J]. Mar Biol., 1987, 94(2): 171~181
- 12 Jollivet D, Gabaudan J. Some effects of physical state and dietary level of starch, temperature and meal size on turbot (*Scophthalmus maximus*) digestive process. Copenhagen - Denmark - Ices, 1988. 17~20
- 13 Kawai S, S Ikeda. Studies on digestive enzymes of fishes - III. Development of the digestive enzymes of rainbow trout after batching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzyme in the juvenile stage [J]. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 1973a, 39(7): 819~823
- 14 陈品健,王重刚,黄崇能,等.真鲷仔、稚、幼鱼期消化酶活性的变化[J].台湾海峡,1997,16(3):245~248
- 15 Boulhic M, Gabaudan J. Histological study of the organogenesis of the Dover sole, solea (Linnaeus 1758) [J]. Aquaculture, 1992, 102: 373~396
- 16 Tadahide Kurokawa, Manabu Shiraishi, Tohru Suzuki. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanotictus*) Larvae [J]. Aquaculture, 1998, 161: 491~499

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

在体外模拟瘤胃发酵条件下 N-乙酰-DL-蛋氨酸稳定性的研究

武安泉 杨开伦 胡炳义 朱自学 胡建勇 牛朝锋 李文华

摘要 通过两个试验,研究在体外模拟瘤胃发酵条件下 N-乙酰-DL-蛋氨酸的降解率。试验 1: N-乙酰-DL-蛋氨酸在 pH 值 6.5、温度为 39 ℃ 的缓冲液中孵育 9 h,其降解率为 3.3%。试验 2: 运用瘤胃体外发酵技术研究 N-乙酰-DL-蛋氨酸不同添加量对 pH 值、氨态氮、微生物蛋白动态变化的影响。结果表明,添加 0.4、0.6 g N-乙酰-DL-蛋氨酸发酵 3~6 h,均能够显著降低体系的 pH 值;添加 0.6 g N-乙酰-DL-蛋氨酸发酵 12 h 能够显著提高氨态氮的浓度;N-乙酰-DL-蛋氨酸在发酵过程中不影响微生物蛋白产量。以上结果显示,N-乙酰-DL-蛋氨酸在体外模拟瘤胃发酵的条件下可以稳定存在。

关键词 N-乙酰-DL-蛋氨酸;体外发酵;稳定性

中图分类号 S816.6

Study on the stability of N-Acetyl-DL-Methionine in vitro simulating
rumen fermentation system

Wu Anquan, Yang Kailun, Hu Bingyi, Zhu Zixue, Hu Jianyong, Niu Chaofeng, Li Wenhua

Abstract Two experiments are conducted in this paper to study the degradation rates of N-Acetyl-DL-Methionine in vitro simulating rumen fermentation system. In Exp.1, under the conditions of pH 6.5 and 39 ℃, the degradation rate is about 3.3% after 9 hours of culture. In Exp.2, the kinetic effects of gradient doses of N-Acetyl-DL-Methionine were carried out on pH value and concentrations of ammonia nitrogen and microbial protein. The results indicated: that pH value is reduced significantly by the dosage of 0.4 and 0.6 g respectively after adding 3~6 hours; that the concentrations of ammonia nitrogen is increased significantly by the dosage of 0.6 g after fermenting 12 hours. During the fermentation, the microbial protein was not affected. It is inferred that N-Acetyl-DL-Methionine is stable under the condition of in vitro simulating rumen fermentation system.

Key words N-Acetyl-DL-Methionine; in vitro; stability

蛋氨酸作为高产反刍家畜限制性氨基酸之一,越来越受人们重视。Chalupa(1976)研究发现,蛋氨酸在瘤胃内 3 h 几乎完全降解,日粮中添加蛋氨酸对于反刍动物来说不能被有效利用。因此,人们试图用蛋氨酸的化学衍生物取代蛋氨酸,但首先要解决瘤胃降解

问题。Ayoade 等(1982)研究发现,蛋氨酸的衍生物——油酯酰蛋氨酸(OM)、蛋氨酸乙酯盐酸盐(MEE-HCl)、蛋氨酸羟基类似物甲酯(MHAM)可以耐受瘤胃微生物的降解,并能被动物所利用。作为蛋氨酸的另一化学衍生物——N-乙酰-DL-蛋氨酸,它在瘤胃内能否稳定存在,国内外报道不多,结果也不一致。Amos 等(1974)做的绵羊体内试验表明,日粮中添加的 N-乙酰-DL-蛋氨酸在真胃中的回收率很低,在瘤胃内很容易降解。而 Digenis(1974)的体外试验研究发现,N-乙酰-DL-蛋氨酸可以稳定存在。因此,我们对 N-乙酰-DL-蛋氨酸在接近瘤胃液的 pH 值和模拟瘤胃环境下的稳定性进行了试验研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 N-乙酰-DL-蛋氨酸和 pH 值为 6.5 的缓冲液

武安泉,新疆农业大学动物营养实验室、周口师范学院生命科学系,466000,河南省周口市七一路东段。

杨开伦(通讯作者)、胡建勇、牛朝锋,新疆农业大学动物营养实验室。

胡炳义、朱自学,周口师范学院生命科学系。

李文华,周口职业技术学院。

收稿日期:2006-11-21

★ 国家自然科学基金项目(30471262);新疆教育厅优秀青年学者奖励计划项目(XJEDU2005E04)

N-乙酰-DL-蛋氨酸购自国内某公司,其纯度为98.5%以上,产品不含任何氨基酸。pH 值 6.5 的缓冲液,采用磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液。

1.1.2 瘤胃液、人工唾液、培养底物

1.1.2.1 瘤胃液

取自 4 只(每天饲喂 400 g 混合精料)安装瘤胃瘘管的健康中国美利奴新疆细毛公羊。混合精料分两次饲喂,自由采食玉米秸秆、自由饮水。瘤胃食糜液采集后,用 4 层纱布过滤,将滤液直接盛于预先装满二氧化碳并预热的医用输液瓶中,然后盖紧瓶塞放在预热的 39 ℃左右的保温桶中,带回实验室备用。

1.1.2.2 人工唾液

按照 Mc.Dougall(1948)的配方,使用前向其中通入二氧化碳,使其 pH 值在 7.35 左右,并在 39 ℃的水中温浴 30 min。

1.1.2.3 培养底物

淀粉 3 g、氯化铵 0.172 9 g、硫酸钠 0.026 9 g,以上试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 试验 1

用 pH 值为 6.5 的缓冲液配制浓度为 1.67 mg/ml N-乙酰-DL-蛋氨酸,置于 39 ℃水浴锅中孵育,在孵育后的 1、3、6、9 h,分别取 1 ml 孵育液,测定孵育液中蛋氨酸含量,推算 N-乙酰-DL-蛋氨酸的量,计算其降解率。将孵育 1 h 的降解率设为对照,其它各点降解率与之比较,进行 3 个重复。

1.2.2 试验 2

将 N-乙酰-DL-蛋氨酸按照 0、0.2、0.4、0.6 g 分别添加在预先盛放培养底物的 4 个三角瓶中,设为试验 1、2、3、4 组,每组设 4 个重复。将试验 1 组作为对照组,其余为试验组。每个发酵瓶分别加入 60 ml 瘤胃液和 120 ml 人工唾液,充入二氧化碳后,盖紧瓶塞置于水浴摇床上,39.5 ℃左右进行培养,并缓慢摇动摇床。并在培养开始混匀后 0、1.5、3、6、9、12 h,分别采集样品 20 ml,立刻测定其 pH 值。

1.3 样品的保存

采集的样品加入 2~3 滴饱和氯化汞后,立即放入冰箱冻存。

1.4 测定指标

pH 值用 model SA720 pH 计直接测定;氨态氮含量测定按照冯宗慈、高民(1993)的比色法进行;微生物蛋白含量采用赵小刚(2004)的方法测定;蛋氨酸含量按照张龙翔等(1997)茚三酮显色法测定。

1.5 数据统计

数据采用平均数±标准差(X±SD)表示。采用 SPSS 11.0 统计软件中的 One-Way ANOVA 进行统计分析,显著性检验采用邓肯氏新复极差法。

2 结果与分析

2.1 N-乙酰-DL-蛋氨酸的降解规律(见表 1)

表 1 N-乙酰-DL-蛋氨酸在 pH 值 6.5、温度 39 ℃条件下的动态降解率(n=3)

时间(h)	1	3	6	9
降解率(%)	1.4±0.1 ^b	3.2±0.1 ^a	3.3±0.2 ^a	3.3±0.1 ^a

注:肩标小写字母不同表示差异显著(P<0.05),相同表示差异不显著(P>0.05)。下表同。

从表 1 可知,N-乙酰-DL-蛋氨酸在 pH 值 6.5,温度 39 ℃条件下,随时间变化其降解率为 1.4%~3.3%。在孵育的第 3、6、9 h 的降解率分别为 3.2%、3.3%、3.3%,显著地高于 1 h 时的降解率(1.4%)(P<0.05),但是 3~9 h 间的降解率无显著差异(P>0.05),可见它在此条件下是很稳定的。

2.2 不同水平的 N-乙酰-DL-蛋氨酸对培养体系 pH 值的影响(见表 2)

表 2 不同水平的 N-乙酰-DL-蛋氨酸对培养体系 pH 值的影响(n=4)

时间(h)	1 组	2 组	3 组	4 组
0	6.95±0.07 ^a	6.85±0.12 ^{ab}	6.74±0.12 ^b	6.77±0.10 ^b
1.5	6.80±0.02	6.72±0.10	6.72±0.14	6.65±0.13
3	6.70±0.04 ^a	6.68±0.08 ^{ab}	6.59±0.09 ^{ab}	6.56±0.10 ^b
6	6.44±0.07 ^a	6.33±0.12 ^{ab}	6.25±0.13 ^b	6.22±0.11 ^b
9	5.91±0.23	5.95±0.20	5.81±0.32	5.81±0.24
12	5.27±0.05	5.42±0.24	5.35±0.27	5.33±0.17

由表 2 可见,在培养即刻,试验 3、4 组的 pH 值为 6.74、6.77,与对照组相比,分别下降 3.02%、2.59%,差异显著(P<0.05)。这种差异可能与 N-乙酰-DL-蛋氨酸本身酸性有关。在培养的第 3 h,试验 4 组的 pH 值为 6.56,显著地低于对照组(P<0.05),降低 2.09%;在培养的第 6 h,试验 3、4 组的 pH 值为 6.25、6.22,比对照组降低 2.95%、3.42%,差异显著(P<0.05)。这可能与 N-乙酰-DL-蛋氨酸的添加量有关,每组的 pH 值均随培养时间的延长而降低,表现为同样的变化趋势。在培养的第 9、12 h 各组之间的 pH 值无显著差异,这可能是发酵底物中的淀粉持续发酵产酸对 pH 值的影响起主导作用的结果。

2.3 不同水平的 N-乙酰-DL-蛋氨酸对发酵体系氨态氮浓度的影响(见表 3)

表3 不同水平的N-乙酰-DL-蛋氨酸对
发酵体系氨态氮浓度的影响(mg/dl, n=4)

时间(h)	1组	2组	3组	4组
0	26.1±1.0	24.3±8.3	27.7±2.9	28.8±2.0
1.5	27.9±1.5	24.1±5.5	29.5±3.6	28.4±3.4
3	25.5±3.6	23.1±6.3	25.1±4.6	22.1±1.6
6	18.1±7.6	15.5±5.5	15.6±2.8	17.4±3.5
9	12.1±7.5	10.2±3.7	11.4±3.5	12.1±3.1
12	3.6±2.9 ^a	5.0±2.9 ^{ab}	6.7±3.2 ^{ab}	8.5±2.1 ^a

由表3可见,对照组和各试验组氨态氮浓度均随培养时间的延长而降低,表现为相同的变化趋势。在培养的前9h,各试验组和对数组之间并没有显著差异;在培养的第12h,试验4组的氨态氮浓度为8.5 mg/dl,显著的高于对照组(3.6 mg/dl)($P<0.05$)。试验2、3、4组间差异不显著,但随N-乙酰-DL-蛋氨酸添加量的增多呈上升趋势。氨态氮是评价瘤胃微生物发酵体系的一项综合指标,其浓度的高低是含氮物质的分解释放和微生物利用氨态氮合成微生物蛋白二者共同作用的结果。在发酵的前9h各组氨态氮浓度差异不显著,说明N-乙酰-DL-蛋氨酸对发酵体系氨态氮浓度没有明显的影响。然而在发酵的第12h,试验4组的氨态氮浓度显著高于对照组,这可能是部分的N-乙酰-DL-蛋氨酸降解所引起的。

2.4 不同水平的N-乙酰-DL-蛋氨酸对发酵体系微生物蛋白含量的影响(见表4)

表4 不同水平的N-乙酰-DL-蛋氨酸对发酵体系
微生物蛋白含量的影响(mg/g, n=4)

时间(h)	1组	2组	3组	4组
0	2.90±0.49	2.81±1.04	2.52±1.03	2.57±0.56
1.5	2.68±0.53	2.47±0.28	2.39±0.87	2.90±1.45
3	2.60±0.60	3.20±0.96	3.29±1.15	3.48±1.46
6	2.35±0.65	2.46±0.89	3.61±2.14	2.85±1.31
9	2.82±1.23	4.32±2.33	2.73±0.76	3.23±2.04
12	2.92±0.60	4.38±1.54	4.74±1.33	3.35±0.68
平均值	2.71±0.58	3.27±0.71	3.21±0.96	3.06±1.01

由表4可见,试验各组在发酵的各个时间点的微生物蛋白的量与对照组相应的时间点的含量无显著差异($P>0.05$)。在培养的第3、12h试验组发酵体系微生物蛋白含量均高于对照组。而且各组随培养时间的延长,微生物蛋白含量有增加的趋势。微生物蛋白的合成需要充足的氮源和能量,可见,试验各组与对照组相比各时间点微生物蛋白含量没有显著的差异,可能是由于N-乙酰-DL-蛋氨酸在瘤胃微生物的作用下很稳定,这一点和氨态氮浓度的变化是相吻合的。

3 小结

N-乙酰-DL-蛋氨酸在pH值6.5、温度39℃条件下的降解率仅为3.3%。在本试验条件下,添加不同水平的N-乙酰-DL-蛋氨酸对人工瘤胃发酵体系的pH值影响呈降低趋势,尤其是添0.4、0.6 g N-乙酰-DL-蛋氨酸发酵3~6h,均能够显著降低体系的pH值;对氨态氮、微生物蛋白含量没有显著影响。以上结果显示,N-乙酰-DL-蛋氨酸在体外模拟瘤胃体系中是相当稳定的。

参考文献

- 1 Amos H E, C. O. Little, G. A. Digenis, et al. Methionine, DL-homocysteine thiolactone and N-Acetyl-DL-methionine for ruminants[J]. J. Animal Science, 1974, 39(3):612-617
- 2 Digenis G A, H. E. Amos, K. Yang, et al. Methionine substitutes in ruminant nutrition. 1. Stability of nitrogenous compounds related to methionine during in vitro incubation with rumen microorganisms[J]. J. Pharm. Sci., 1974, 63(5):745-751
- 3 John A. Ayoade, Peter J. Buttery, Dyfed Lewis. Studies on methionine derivatives as possible sources of protected methionine in ruminant rations[J]. J. Sci. Food Agric., 1982(33):949-956
- 4 Patterson J A, L. Kung. Metabolism of Met and MHA by rumen Microorganism[J]. J. Dairy Sci., 1988(71):3 292-3 301
- 5 William Chalupa. Degradation of amino acids by the rumen microbial population[J]. J. Anim. Sci., 1976, 43(4):828-834
- 6 冯宗慈,高民.通过比色法测定瘤胃液氨态氮含量方法的改进[J]. 内蒙古农业科学, 1993(4):40-41
- 7 杨凤.动物营养学[M]. 北京:中国农业出版社(第一版), 1991
- 8 张龙翔,张廷芳,李令媛主编.生化实验方法和技术(第二版)[M]. 北京:高等教育出版社, 1997

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

征订启事

欢迎订阅 2007 年《饲料工业》

本刊为半月刊,大16开本,每期正文64页,公开发行,各地邮局均可订阅,也可直接向本刊发行部订购。国际标准连续出版物号ISSN 1001-991X,国内统一连续出版物号CN21-1169/S,邮发代号:8-163。每期定价6元,全年24期共144元。

地址:沈阳市金沙江街16号6门

邮编:110036

发行部电话:024-86391237

豆渣固态发酵生产纳豆芽孢杆菌的研究

李晓晖 沈 涛 潘俊杰

摘 要 通过单因素和正交试验,得出用豆渣培养纳豆芽孢杆菌的最佳工艺条件为 $m_{\text{豆渣}} : m_{\text{麸皮}} : V_{\text{磷酸盐缓冲液}}$ 为 5 : 1 : 10、添加 3% 的豆饼粉、15%(v/m)接菌量,培养时间 48 h,最终含菌量为 1.5×10^{11} cfu/g。

关键词 豆渣;发酵;纳豆芽孢杆菌;培养条件

中图分类号 S816.6

我国是世界上大豆的主产国之一,大豆的产量很高,但在豆制品加工过程中作为副产品的豆渣却没有得到有效地利用,仅作为饲料或作为废弃物处理,经济效益很低,同时也造成了大量环境污染。豆渣具有较高的营养,每 100 g 干豆渣中含蛋白质 13.21 g、脂肪 19.18 g、淀粉 3.75 g。由于豆渣含有的抗胰蛋白酶、皂素和血凝素等,影响其适口性和动物消化,不适于直接作为饲料应用。利用微生物转化豆渣中的纤维物质,改善其消化性能,生产菌体蛋白饲料,具有成本低、周期短、产量高等优点,可以缓和饲料短缺的矛盾,对发展环保型、节能型畜牧业具有重大意义。

纳豆芽孢杆菌作为微生物饲料添加剂应用效果的研究表明,纳豆芽孢杆菌能产生多种消化酶,帮助动物对营养物质进行消化吸收。纳豆芽孢杆菌具有较强的蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性,同时还具有降解饲料中复杂碳水化合物的酶,如果胶酶、葡聚糖酶、纤维素酶等,其中很多是动物本身不具有的酶。由于固体发酵具有成本低、设备简单、产酶活力高、易推广的优点,笔者以豆渣为主要原料进行固体发酵豆渣工艺条件的研究,以期对豆渣的综合利用提供参考。

1 试验材料及方法

1.1 菌种

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*),由食品生物技术实验室提供。

1.2 原料

鲜豆渣取自上海市清美豆制品厂,初始含水量 83% 左右,60 ℃ 烘干备用;麸皮取自面粉加工厂;豆饼粉取自饲料加工厂,粉碎后备用。

1.3 培养基

液体种子培养使用营养肉汤培养基,平板计数使用营养琼脂培养基。

1.4 试验方法

1.4.1 液体种子培养

250 ml 三角瓶中液体种子培养基装量为 30 ml,在 121 ℃ 条件下灭菌 20 min,降温后从斜面接一环菌苔至种子培养基,置 37 ℃ 控温摇床培养,转速 200 r/min,培养 16 h。

1.4.2 发酵培养

取烘干的豆渣,按照不同比例加入麸皮、豆饼粉,并补加适量氮源,用磷酸缓冲液调节含水量,放入 250 ml 三角瓶中,厚度控制在 3 cm,灭菌,按一定比例接入种子液,培养 2 d,中间翻动几次使物料混合均匀。

1.4.3 检测方法

活菌计数:采用平皿活菌计数法,准确称取 1 g 发酵后的豆渣,按 10 倍稀释法制成不同浓度的稀释液,从 3 个合适的稀释液中分别吸取 100 μ l 置于营养琼脂平皿中,每一稀释度做 2~3 个平行。37 ℃ 培养箱中倒置培养 24 h 后,进行菌落计数。

1.5 正交试验设计

选择豆饼粉、磷酸盐缓冲液浓度、接种量这 3 个因素,各设 3 个水平,以发酵后豆渣中活菌数为考察指标,进行 $L_9(3^3)$ 正交试验。正交试验因素见表 1。

表 1 正交试验设计

编号	豆饼粉(%)	磷酸盐缓冲液浓度(mol/l)	接菌量(%)
1	1	0.05	5
2	2	0.10	10
3	3	0.15	15

2 结果与讨论

2.1 固体发酵条件的研究

2.1.1 豆渣与麸皮的含量比对菌体数的影响

豆渣比较细腻,发酵容易结块,所以发酵时以豆渣为基质,加入不同比例的麸皮为碳源和疏松介质,37 ℃

李晓晖,上海水产大学食品学院,200090,上海市军工路 334 号。

沈涛、潘俊杰,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-09-25

培养 48 h,平板计数测定菌体数量。试验结果见表 2。

表 2 豆渣与麸皮的含量比对菌体生长的影响

豆渣:麸皮	5:0	5:1	5:4
菌体数(10^9 cfu/g)	30	101	109

由试验结果可知,添加麸皮有利于纳豆芽孢杆菌生长,麸皮加入的量越多,最终的含菌量越大。考虑到成本及参考本试验结果,所以选择 $m_{\text{豆渣}}:m_{\text{麸皮}}$ 为 5:1 的配比。

2.1.2 不同氮源因素对菌体数的影响

菌体的生长离不开良好的碳氮比例,因豆渣中缺乏氮源,结合对成本的考虑,选择加入尿素、硫酸铵、豆饼粉作为氮源加入豆渣中。将豆渣、麸皮、蒸馏水按最适配比配好,均分成 4 份,编号后 1 份为对照,另 3 份中分别加入 2%(m/m)的尿素、硫酸铵、豆饼粉,灭菌后接入 10%(v/m)的菌液,放入 37℃的恒温培养箱中培养 48 h 后,进行平板计数以确定最佳的配比。

表 3 不同氮源对菌体生长的影响

氮源(2%)	对照	尿素	硫酸铵	豆饼粉
菌体量(10^9 cfu/g)	5	10	4	40

由表 3 结果可知,加入含 2%豆饼粉的豆渣的活菌数达到 4×10^{10} cfu/g,是 3 个氮源中效果最好的一个,因此选择豆饼粉为氮源。

2.1.3 磷酸盐对发酵条件的影响

根据王发祥等(2003)的方法操作,在 pH 值 7.5 的条件下,更利于纳豆芽孢杆菌菌体的生长,同时磷又是菌体生长必需的营养元素,所以选择磷酸盐缓冲液来调节豆渣培养基的 pH 值和水分。将豆渣、麸皮、豆饼粉以最适配比混合好,用 pH 值为 7.5 的 0.2 mol/l 磷酸盐缓冲液来代替蒸馏水加入物料中。灭菌后接入 10%(v/m)的菌液,放入 37℃的恒温培养箱中,培养 48 h 后,进行平板计数。结果使用磷酸盐缓冲液可使发酵效果更佳,菌体数为对照组的 6 倍。因此选择 pH 值为 7.5 的磷酸盐缓冲液来代替蒸馏水与豆渣进行配比。

2.1.4 正交试验结果与分析(见表 4)

由表 4 可知,最佳的试验组合为豆饼粉 3%,接种量 15%,磷酸盐缓冲液浓度 0.05 mol/l,最终的菌体含量为 1.6×10^{11} cfu/g。可以看出豆饼粉是促进纳豆芽孢杆菌生长的良好氮源,含量越高纳豆芽孢杆菌生长的越好;通过极差分析,可以看出接种量的极差最大,其次是豆饼粉和磷酸盐缓冲液深度的极差,接种量越多,纳豆芽孢杆菌生长的越多,所以可以适当考虑加大接种量。

表 4 正交试验数据

编号	豆饼粉	磷酸盐缓冲液浓度	接种量	含菌量(10^9 cfu/g)	菌体含量平均值(10^9 cfu/g)
1	1	1	1	I 16	18.5
				II 21	
2	1	2	2	I 45	37.5
				II 30	
3	1	3	3	I 60	65
				II 70	
4	2	1	3	I 30	30
				II 30	
5	2	2	2	I 100	87.5
				II 75	
6	2	3	1	I 70	75
				II 80	
7	3	1	3	I 200	160
				II 120	
8	3	2	1	I 18	29
				II 40	
9	3	3	2	I 20	15
				II 10	
K1	120	210	120		
K2	190	160	140		
K3	200	160	260		
极差	80	50	140		

2.2 发酵周期的确定

按照正交试验得到的最佳配比,接种后放入 37℃的恒温培养箱中培养。分别在 24、48、72 h 取样进行平板计数,确定最佳的发酵时间。结果见表 5。

表 5 发酵时间的确定

培养时间(h)	含菌量(10^9 cfu/g)
24	3.5
48	150
72	165

由表 5 的结果可看出,培养 24 h 的效果不是很理想,含菌量仅为 3.5×10^9 cfu/g;培养 48 h 后,含菌量迅速增加,含菌量达到 1.5×10^{11} cfu/g;培养 72 h 后,菌体量增加趋势已趋于平稳,含菌量为 1.65×10^{11} cfu/g。从成本和经济效益上考虑,选择 48 h 为最佳培养时间。

3 结论

通过单因素和正交试验,得出用豆渣培养纳豆芽孢杆菌的最佳工艺条件,发酵豆渣成分的配比是 $m_{\text{豆渣}}:m_{\text{麸皮}}:v_{\text{磷酸盐缓冲液}}$ 为 5:1:10,磷酸盐缓冲液 pH 值为 7.5、浓度 0.05 mol/l,加入 3%(m/m)的豆饼粉,接种量 15%(v/m),培养时间 48 h,其含菌量为 1.5×10^{11} cfu/g。固态发酵工艺简单,设备投资低,具有很高的应用价值,是充分利用豆渣废弃物的一条新途径。

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

CpG 寡脱氧核苷酸对中华绒螯蟹 3 种血清酶活性的影响

李红霞 李 义 刘永贵 陈 星 谭夕东

摘 要 以每千克体重 1、5、25 μg 的剂量,对中华绒螯蟹分别注射“人最适免疫刺激序列(ODN-2006)”和“鱼合适免疫刺激序列(ODN-1670)”,在注射开始之前(即第 0 d)和注射后的第 1、3、5、8 d 采集血清,对血清溶菌酶(LSZ)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)活性进行测定。结果显示:剂量为每千克体重 5、25 μg ODN-2006 能使血清 ACP 和 ALP 活性显著增加($P<0.05$),但对 LSZ 活性没有显著影响;与此同时,剂量为每千克体重 5、25 μg ODN-1670 对 3 种酶活性均有显著的促进作用($P<0.05$)。由此表明,ODN-1670 和 ODN-2006 能增强中华绒螯蟹的免疫功能,可作为甲壳动物潜在的免疫增强剂加以研发和利用。

关键词 中华绒螯蟹;溶菌酶;酸性磷酸酶;碱性磷酸酶

中图分类号 S981.22

自从 Krieg 等^[1](1995)发现未甲基化的 CpG 寡脱氧核苷酸(CpG ODN)具有较强的免疫刺激活性以来,CpG ODN 的研究越来越受到重视。大量的研究表明,细菌的 CpG DNA 和人工合成的 CpG ODN 在人和动物的天然免疫系统中识别微生物并产生相应的免疫应答过程中起着重要的作用。然而,迄今有关 CpG ODN 对水产动物免疫功能影响的研究报道较少。Tassakka 等和 Meng 等的研究发现,CpG ODN 能增强鲤鱼和草鱼的先天性免疫反应,是鱼类有效的免疫增强剂^[2-4]。在甲壳动物中,迄今仅见 CpG ODN 对罗氏沼虾酚氧化酶原激活系统影响的研究报道^[5]。本文首次研究了 2 种人工合成的 CpG ODN 对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)血清溶菌酶、酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的影响。研究结果不仅可丰富甲壳动物免疫学的研究内容,而且可为 CpG ODN 在水产养殖业中应用提供参考依据。

李红霞,苏州大学生命科学学院,215123,苏州市工业园区苏州大学独墅湖校区生科院 702 幢 2223 室。

李义(通讯作者)、刘永贵、陈星、谭夕东,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-06

★ 苏州市科技攻关项目(SNZ-0303)

1 材料与方法

1.1 试验设计

360 只健康、活泼的中华绒螯蟹(每只均重 52.8 g)购于江苏省吴江市某水产养殖场,运回后饲养于室内循环水养殖系统中,暂养 1 周后进行试验。暂养期和试验期均 24 h 充气,控制水温在(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,每天以蟹体重的 3%投喂成蟹颗粒饲料。

CpG ODN:①含 3 个 CpG 基序(5'-GTCGTT-3')的人最适免疫刺激序列(ODN-2006),即 5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3';②含 1 个 CpG 基序(5'-AACGTT-3')的鱼合适免疫刺激序列(ODN-1670),即 5'-ACC GAT AAC GTT GCC GGT GAC G-3'。2 种 CpG ODN 均由上海某生物工程公司提供,全硫代修饰,聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)纯化,纯度 99.99%。用 0.85%灭菌生理盐水将 2 种 ODN 分别配成 0.5、2.5 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度备用。

试验设每千克体重 1、5、25 μg ODN-2006 处理组,每千克体重 1、5、25 μg ODN-1670 处理组和生理盐水对照组共 7 个处理组,每个处理组均设 3 个平行,每个平行 12 只蟹。在蟹的第 3 或第 4 步足的基关节膜处,给每只蟹分别注射 0.5、2.5 及 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的 ODN 溶液约 0.1 ml 左右,使每一处理组注射 ODN 的量分别达到每千克体重 1、5、25 μg 的剂量,对照组每只蟹注射 0.85%的灭菌生理盐水 0.1 ml。注射

之前(即 0 d)和注射后第 1、3、5、8 d, 分别在每个平行中随机抽取蟹 2 只, 剪肢采集血淋巴液, 分离血清备用。

1.2 溶菌酶(LSZ)活性的测定

以溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)冻干粉(苏州大学医学院提供)为底物, 按照 Hultmark 等^[6]的方法适当修改后进行。用 0.1 mol/l (pH 值 6.4)的磷酸钾盐缓冲液配成一定浓度的底物悬液($OD_{570} \approx 0.3$), 取 3 ml 该悬液与 50 μ l 待测血清于试管中混匀, 测初始光吸收值(A_0), 然后置于 28 $^{\circ}$ C 水浴中温育 45 min, 取出后立即置于冰浴中 10 min 终止反应, 测 570 nm 处的光吸收值(A), LSZ 活性按下式计算:

$$U_L = (A_0 - A) / A$$

1.3 酸性磷酸酶(ACP)活性的测定

按照 ACP 测定试剂盒(南京建成生物研究所生产)的要求, 将反应改在 96 孔酶标板中进行。各种试剂及血清的使用量定为试剂盒标准量的 1/10。分别在测定孔、标准孔和空白孔中加入血清和各反应液, 充分混匀后置湿盒中于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中温育 30 min, 然后于各孔中加入碱液和显色液, 混匀后于 520 nm 处测定吸光值。

ACP 活性定义为 100 ml 血清在 37 $^{\circ}$ C 与底物作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。

ACP 活性(金氏单位)=测定管吸光值/标准管吸光值 $\times$ 酚含量 $\times$ 稀释倍数。

1.4 碱性磷酸酶(ALP)活性的测定

按照 ALP 测定试剂盒(南京建成生物研究所生产)的要求, 将反应改在 96 孔酶标板中进行, 各种试剂及血清的使用量定为试剂盒标准量的 1/10。分别在测定孔、标准孔和空白孔中加入血清和各反应液, 充分混匀后置湿盒中于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中温育 15 min, 然后于各孔中加入酸液和显色液, 混匀后于 520 nm 处测定吸光值。

ALP 活性定义为 100 ml 血清在 37 $^{\circ}$ C 与底物作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。

ALP 活性(金氏单位)=测定管吸光值/标准管吸光值 $\times$ 酚含量 $\times$ 稀释倍数。

1.5 统计分析

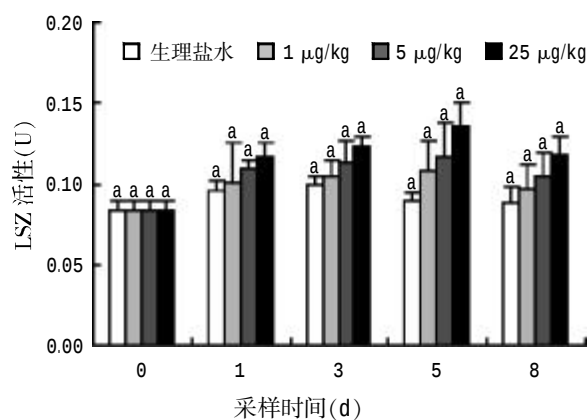
采用 SPSS 13.0 对数据进行单因素方差分析, 当差异显著($P < 0.05$)时, 用 LSD 检验法进行均值间多重比较。

2 结果

2.1 CpG ODN 对血清 LSZ 活性的影响

2 种 CpG ODN 对中华绒螯蟹血清 LSZ 活性的影

响见图 1、图 2。



注: 同一采样时间内, 字母相同者表示差异不显著($P > 0.05$), 字母不相同者表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

图 1 ODN-2006 对中华绒螯蟹 LSZ 活性的影响

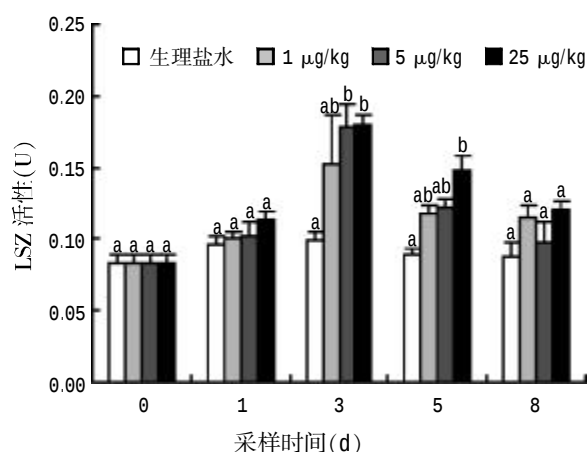


图 2 ODN-1670 对中华绒螯蟹 LSZ 活性的影响

由图 1 可知, 在以剂量为每千克体重 1、5 和 25 μ g 的 ODN-2006 对中华绒螯蟹注射后的 1、3、5、8 d, 各剂量组的 LSZ 活性均高于用生理盐水注射的对照组, 但没有显著差异($P > 0.05$)。

由图 2 可知, 在 ODN-1670 处理后的 1、3、5、8 d, 各剂量组的 LSZ 活性均高于对照组。其中, 在注射后的第 3 d, 5 μ g/kg 和 25 μ g/kg 剂量组的 LSZ 活性显著高于对照组($P < 0.05$), 与 1 μ g/kg 组相比没有显著差异($P > 0.05$); 处理后第 5 d, 高剂量(25 μ g/kg)组的 LSZ 活性仍显著高于对照组($P < 0.05$), 但各剂量组间无显著差异。此外, 在 LSZ 活性随时间变化方面, 各剂量组在处理后的第 1 d 即升高, 到第 3 d 达到最高值, 然后下降, 至第 8 d 时仍略高于对照组。

2.2 CpG ODN 对血清 ACP 活性的影响

2 种 CpG ODN 对中华绒螯蟹血清 ACP 活性的影响见图 3、图 4。

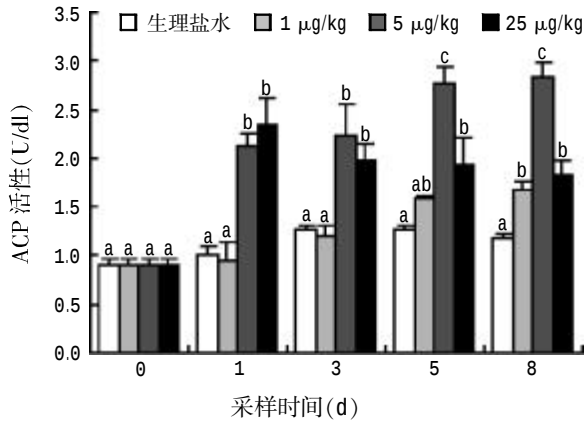


图 3 ODN-2006 对中华绒螯蟹 ACP 活性的影响

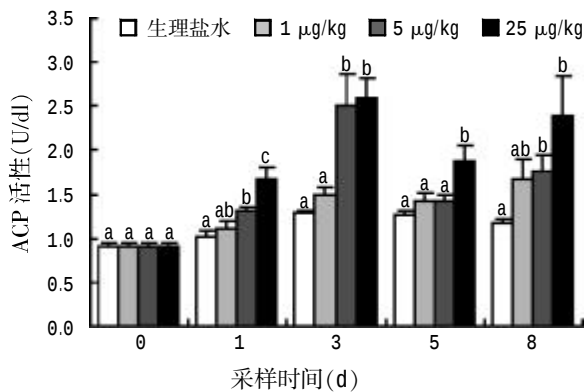


图 4 ODN-1670 对中华绒螯蟹 ACP 活性的影响

由图 3 可知,在 ODN-2006 处理后的第 1、3、5、8 d,5、25 μg/kg 剂量组的 ACP 活性均显著高于对照组($P<0.05$),其中,中剂量(5 μg/kg)组的 ACP 活性随处理时间的延长有增加的趋势,高剂量(25 μg/kg)组的 ACP 活性则随处理时间的延长而呈下降趋势。此外,低剂量(1 μg/kg)组直到处理后的第 8 d,ACP 活性才显著高于对照组。

由图 4 可知,在 ODN-1670 处理后的第 1、3、5、8 d,各剂量组的 ACP 活性均高于对照组。其中,低剂量(1 μg/kg)组的 ACP 活性始终与对照组无显著差异($P>0.05$);中剂量(5 μg/kg)和高剂量(25 μg/kg)组的 ACP 活性均在处理后的第 1 d 即显著高于对照组,到处理后的第 3 d 达到峰值,到第 8 d 时仍显著地高于对照组($P<0.05$),不过,在处理后的第 5 d,5 μg/kg 组的 ACP 活性与对照组相比无显著差异。

2.3 CpG ODN 对血清 ALP 活性的影响

2 种 CpG ODN 对中华绒螯蟹血清碱性磷酸酶(ALP)活性的影响见图 5、图 6。

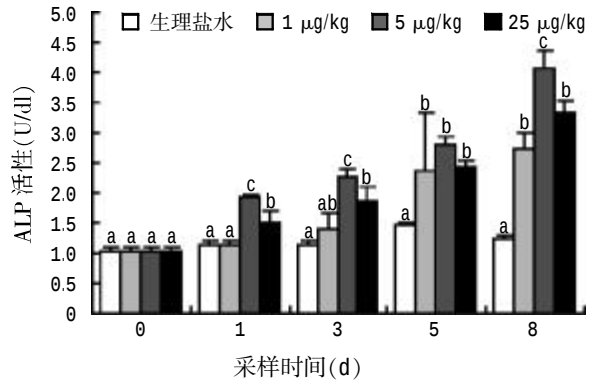


图 5 ODN-2006 对中华绒螯蟹 ALP 活性的影响

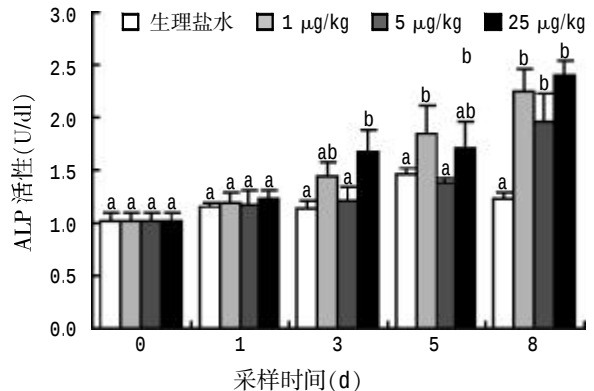


图 6 ODN-1670 对中华绒螯蟹 ALP 活性的影响

由图 5 可知,在 ODN-2006 处理后的第 1 和 3 d,5 μg/kg 和 25 μg/kg 剂量组的 ALP 活性均显著高于对照组。其中,第 1 d 时各剂量组间差异显著,第 3 d 时,5 μg/kg 组的 ALP 活性显著高于 1 μg/kg 和 25 μg/kg 组($P<0.05$)。在 ODN-2006 处理后的第 5~8 d,各剂量组的 ALP 活性均显著高于对照组($P<0.05$),由图 5 还可以看出,在各个采样时间点,均以中剂量(5 μg/kg)组的 ALP 活性为最高。此外,各剂量组的 ALP 活性均有随处理后时间的延长而增加的趋势。

由图 6 可知,在 ODN-1670 处理后的第 1、3、5、8 d,各剂量组的 ALP 活性基本上均高于对照组。其中,25 μg/kg 组的 ALP 活性在处理后的第 3 d 显著高于对照组,第 5 d 时与对照组相比无显著差异,到第 8 d 时又显著高于对照组;1 μg/kg 组从处理后的第 5 d 开始到第 8 d,ALP 活性均显著高于对照组;5 μg/kg 组的 ALP 活性则直到处理后的第 8 d 时才显著高于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

已有研究表明,含有 CpG 基序的细菌 DNA 和人工合成的 CpG ODN 是鼠和人的天然免疫系统的有效激活剂^[7-9],也是鱼类的良好的免疫增强剂^[2-4]。Tassakka 等^[2-3]报道,人工合成的 CpG ODN 能增强鲤鱼吞噬细胞的吞噬活性和头肾巨噬细胞产生超氧阴离子 (O_2^-) 的能力及血清 LSZ 活性。Meng 等^[4](2003)报道,CpG ODN 可增强草鱼巨噬细胞产生 O_2^- 和过氧化氢(H_2O_2) 的能力,并能使血清 ACP 活性和杀菌活性增加。本研究表明,CpG ODN 能增强中华绒螯蟹血清 LSZ、ACP 和 ALP 活性,这与 Tassakka 等报道的 CpG ODN 能增强鲤鱼血清 LSZ 活性与 Meng 等报道 CpG ODN 能增强草鱼血清 ACP 活性的结果相一致。

LSZ 是吞噬细胞杀菌的物质基础,体内许多组织和体液中都含有 LSZ,血清 LSZ 主要来自血液中,是一种碱性蛋白,能水解革兰氏阳性细菌的细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖,并使之裂解被释放出来,形成一个水解酶体系,破坏和消除侵入体内的异物,从而担负起机体防御的功能^[10]。ACP 是高等动物巨噬细胞溶酶体的标志酶^[11],也是无脊椎动物吞噬溶酶体的重要组成部分,在血细胞进行吞噬和包裹反应中,伴随有 ACP 的释放^[12]。在酸性条件下,ACP 可使磷酸单酯水解生成酚和磷酸,在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢。因此,ACP 的功能之一是加速物质的摄取和转运,以便为 ATP 磷酸化提供更多所需的无机磷酸^[13]。本试验结果显示,CpG ODN 能增强 ACP 的活性,说明 CpG ODN 能促进 ACP 参与细胞中的物质代谢,从而提升粒细胞中的溶酶体酶的防御和杀菌作用。ALP 是生物体内的一种重要的代谢调控酶,直接参与磷酸基团的转移,参与钙、磷代谢。ALP 也是溶酶体酶的重要组成部分,在免疫反应中发挥作用^[14]。在碱性条件下,ALP 可使磷酸单酯水解生成乙醇和磷酸。因此,ALP 的功能之一也是加速物质的摄取和转运,为 ADP 磷酸化形成 ATP 提供更多所需的无机磷酸^[13]。本研究表明,CpG ODN 能使 ALP 在细胞物质代谢中的作用加强,从而增强中华绒螯蟹的非特异性免疫功能。由于甲壳动物依赖非特异性免疫来进行防御,因此,LSZ、ACP 和 ALP 活性的增加,表明 CpG ODN 增强了中华绒螯蟹的免疫功能。

Li 等^[15](2004)报道,在饲喂添加从啤酒酵母中提取的 RNA 寡核苷酸的饲料后,杂交条纹鲈鱼的免疫功能和对抗链球菌感染的能力都明显增强了。这似乎表明口服 CpG ODN 也是有效的。由此可见,新型免疫

增强剂 CpG ODN 在动物养殖中应用将具有十分广阔的前景,当然这有待进一步研究予以证实。

参考文献

- 1 Krieg A M, Yi A K, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation [J]. *Nature*, 1995, 347(6):546~549
- 2 Tassakka, A C M A R, Sakai M. CpG oligodeoxynucleotides enhance the non-specific immune responses on carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Aquaculture*, 2002, 209:1~10
- 3 Tassakka, A C M A R, Sakai M. The in vitro effect of CpG-ODNs on the innate immune response of common carp, *Cyprinus carpio* L [J]. *Aquaculture*, 2003, 220:27~36
- 4 Meng Z, Shao J Z, Xiang L X. CpG oligodeoxynucleotides activate grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) macrophages [J]. *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, 27: 313~321
- 5 Chuo C P, Liang S M, Sung H H. Signal transduction of the prophenoloxidase activating system of prawn haemocytes triggered by CpG oligodeoxynucleotides [J]. *Fish shellfish Immunol.*, 2005, 18: 149~162
- 6 Hultmark D, Seiner H. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1980, 106:7~16
- 7 Wagner H. Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger [J]. *Adv Immunol.*, 1999, 73: 329~368
- 8 Hartmann G, Weeratna R D, Ballas Z K, et al. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo [J]. *J. Immunol.*, 2000, 164:1 617~1 624
- 9 Tokunaga T, Yamamoto T, Yamamoto S. How GCG led to the discovery of immunostimulatory DNA [J]. *Jap. J. Infect. Dis.*, 1999, 52: 1~11
- 10 陈竞春, 石安静. 贝类免疫生物学研究概况 [J]. *水生生物学报*, 1996, 20(1):74~78
- 11 王鑫, 马桂荣, 郑宝灿, 等. SL- 益生素对小白鼠体重及其单核吞噬细胞功能的影响[J]. *微生物学报*, 1995, 35(6): 455~459
- 12 Lackie A M. invertebrate immunity [J]. *Parasitology*, 1980, 80: 393~412
- 13 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(3):278~283
- 14 江晓路, 刘树青, 牟海津, 等. 真菌多糖对中国对虾血清及淋巴细胞免疫活性的影响[J]. *动物学研究*, 1999, 20(1): 41~45
- 15 Li P, Lewis D H, Gatlin III D M. Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection.[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004(16):561~569

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

壳聚糖对 0~3 周龄三黄肉仔鸡生产性能和免疫力影响的初探

吴秋小 黄冠庆 潘俊福 曾得寿

壳聚糖(chitosan, CTS)又称为几丁聚糖、可溶性甲壳素,是迄今为止惟一发现的阳离子动物纤维,惟一的碱性多糖^[1]。壳聚糖是 D-氨基葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键结合而成,是甲壳素(chitin)脱乙酰后产生的,可溶于酸性水溶液,无毒、无刺激性、无致敏性、无致突变作用,具有良好的生物相容性和生物降解性^[2,6]。壳聚糖具有激活淋巴细胞、提高免疫力、调节脂肪代谢、降低血脂胆固醇等多种生理功能^[3-5],因此在畜牧方面被认为是一种新型畜禽生长促进剂和免疫增强剂。本文通过在三黄肉仔鸡日粮中添加不同水平的壳聚糖来研究其对三黄肉仔鸡生产性能和免疫力的影响,旨在为壳聚糖作为饲料添加剂的推广应用以及合理利用提供一定的参考。

1 试验材料及方法

1.1 基础日粮

玉米—豆粕型的基础日粮配方及营养水平见表 1。

表 1 0~3 周龄三黄肉仔鸡基础日粮配方及营养水平

原料	组成 (%)	营养水平	
玉米	61.4	代谢能 (MJ/kg)	11.62
麸皮	5.0	粗蛋白 (%)	20.17
豆粕	30.0	钙 (%)	0.99
磷酸氢钙	1.30	总磷 (%)	0.69
石粉	1.25	赖氨酸 (%)	1.02
食盐	0.35		
蛋氨酸	0.20		
添加剂预混料	0.50		
合计	100		

注:每千克饲料提供华罗一号多维 200 mg、氯化胆碱 1 300 mg、金霉素 450 mg、硫酸铜 40 mg、硫酸铁 250 mg、硫酸锌 150 mg、硫酸锰 350 mg。

1.2 试验材料

壳聚糖:为食品级。

吴秋小,广东海洋大学,524088,广东海洋大学 05 研 2 班 24 信箱。

黄冠庆、潘俊福、曾得寿,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-14

试验动物:1 日龄三黄肉仔鸡,购自广东省湛江市畜牧局。

试验试剂盒:总胆固醇测定试剂盒、甘油三酯测定试剂盒、总蛋白测定试剂盒、游离脂肪酸测定试剂盒,以上试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供(按试剂盒说明书进行测定)。

试验仪器:772S 型分光光度计。

1.3 试验设计

选择 1 日龄健康三黄肉仔鸡 100 只,随机分成 4 个处理组,1 个对照组、3 个试验组,每组设 2 个重复。对照组饲喂基础日粮,试验组分别饲喂在基础日粮基础上添加 0.1%、0.2%、0.5% 壳聚糖的饲粮,分别为试验 1、2、3 组。

1.4 饲养管理

进鸡之前对鸡舍进行全面冲洗、消毒,闲置 1 周以上。单层网养,每个重复设为一个单元。试验开始的前两周室温控制在 34~36℃,采用红外线照射保温,以后每周降温 2℃。1~3 日龄的仔鸡采用 24 h/d 的光照,光照强度为 20 LX;4~7 日龄至少 22 h/d 的光照,光照强度为 15 LX,相对湿度为 55%~85%。饲料的形状为干粉料,每天喂料 3 次,自由采食、饮水。每天早晚清扫鸡舍两次,每天清洗饮水器至少一次。按正常免疫程序进行免疫。

1.5 试验检测指标和方法

试验期为 21 d。试验开始时进行逐只空腹称重,每天观察记录鸡群的精神状况、死亡情况和采食、饮水是否正常。在 21 日龄(试验结束)时,以每组为单位空腹称重,并记录总的采食量。同时每组随机抽出 6 只鸡,逐只称重,心脏采血 3~5 ml/只,制血清,置于 -20℃ 条件下保存备用,用 GPO-PAP 法测定其血清中的总胆固醇、甘油三酯、游离脂肪酸、总蛋白含量。

1.6 统计分析

数据分析用 SPSS11.5 统计软件的单因素方差分析,组间差异采用邓肯氏多重比较。试验数据以平均值±标准差表示。

2 试验结果及分析

2.1 壳聚糖对肉仔鸡生产性能的影响(见表 2)

表 2 壳聚糖对肉仔鸡生长性能的影响(平均值±标准差)

组别	平均增重(kg)	料重比
对照组	0.156±0.001	2.081±0.168
试验 1 组	0.146±0.002	2.127±0.070
试验 2 组	0.159±0.008	1.930±0.191
试验 3 组	0.154±0.013	2.135±0.196

注:同列数据肩标无字母或标记相同字母者表示差异不显著($P>0.05$);不同字母者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

从表 2 可以看出,各组间平均增重和料重比差异不显著($P>0.05$)。添加 0.2% 壳聚糖组较对照组有提高肉仔鸡增重的趋势,但添加 0.1% 壳聚糖组和 0.5% 壳聚糖组饲喂效果不太理想,有增加料重比的趋势。

2.2 壳聚糖对肉仔鸡血清中脂肪代谢的影响(见表 3)

表 3 壳聚糖对肉仔鸡血清中脂肪代谢的影响(平均值±标准差)

组别	总胆固醇(mmol/L)	甘油三酯(mmol/L)	游离脂肪酸(μ mol/L)
对照组	2.150±0.783	0.398±0.144	1 152.777±166.992
试验 1 组	2.493±0.722	0.317±0.056	3 912.963±1 835.003
试验 2 组	2.214±0.646	0.398±0.092	1 749.073±443.388
试验 3 组	1.561±0.617	0.440±0.091	2 885.187±1 555.475

从表 3 可以看出,3 个壳聚糖添加组分别与对照组相比,总胆固醇的含量差异均不显著($P>0.05$),同时 3 个壳聚糖添加组间的差异也不显著($P>0.05$),但添加了 0.5% 的壳聚糖组相对其它组,总胆固醇有所降低。

3 个壳聚糖添加组分别与对照组相比,甘油三酯的含量差异均不显著($P>0.05$),同时 3 个壳聚糖添加组间的差异也不显著($P>0.05$),但添加 0.1% 的壳聚糖组相对其它组,甘油三酯有所降低。

3 个壳聚糖添加组与对照组相比,游离脂肪酸的含量差异均不显著($P>0.05$),同时 3 个壳聚糖添加组间的差异也不显著($P>0.05$),但是 3 个壳聚糖添加组分别与对照组的游离脂肪酸含量相比,都有了不同程度的提高,其中,添加了 0.1% 的壳聚糖组与对照组相比提高了 3 倍多,添加了 0.5% 的壳聚糖组与对照组相比提高了 2 倍多。

2.3 壳聚糖对肉仔鸡血清蛋白含量的影响(见表 4)

表 4 壳聚糖对肉仔鸡血清蛋白含量的影响(平均值±标准差)

组别	总蛋白(g/L)
对照组	2.217±0.774 ^a
试验 1 组	0.772±0.323 ^{ab}
试验 2 组	0.553±0.199 ^b
试验 3 组	0.484±0.468 ^b

从表 4 可以看出,添加壳聚糖各组与对照组相比,总蛋白含量降低,且 0.2%、0.5% 的壳聚糖组与对照组相比差异显著($P<0.05$),至于形成这个试验结果的原因还不能定论,有待进一步研究。

2.4 壳聚糖对肉仔鸡免疫器官的影响(见表 5、表 6、表 7)

表 5 壳聚糖对肉仔鸡脾脏的影响(平均值±标准差)

组别	器官指数	器官重量(g)
对照组	3.086±0.387 ^a	0.807±0.095 ^a
试验 1 组	2.648±0.111 ^{ab}	0.627±0.233 ^{ab}
试验 2 组	2.831±0.261 ^{ab}	0.735±0.054 ^{ab}
试验 3 组	2.140±0.343 ^b	0.576±0.083 ^b

表 6 壳聚糖对肉仔鸡法氏囊的影响(平均值±标准差)

组别	器官指数	器官重量(g)
对照组	4.892±0.348	1.281±0.087
试验 1 组	5.161±0.295	1.218±0.045
试验 2 组	4.923±0.313	1.290±0.082
试验 3 组	4.065±0.607	1.081±0.109

表 7 壳聚糖对肉仔鸡胸腺的影响(平均值±标准差)

组别	器官指数	器官重量(g)
对照组	6.947±0.550	1.824±0.141
试验 1 组	7.067±0.615	1.673±0.139
试验 2 组	6.736±0.641	1.764±0.161
试验 3 组	7.085±0.950	1.891±0.172

由表 5 可见:添加 0.5% 壳聚糖组较对照组的脾脏器官指数和重量降低,差异均显著($P<0.05$);其它两组较对照组相比差异均不显著($P>0.05$);3 个添加组间差异不显著($P>0.05$)。可见,日粮中添加 0.5% 的壳聚糖对肉仔鸡脾脏生长影响较大。

由表 6 可见,添加壳聚糖组和对照组的法氏囊重量和器官指数相比,差异均不显著($P>0.05$),但添加 0.1%、0.2% 壳聚糖组的器官指数相对对照组有增加的趋势,同时添加 0.2% 壳聚糖组法氏囊的重量也有所提高。

由表 7 可见,添加 0.1% 壳聚糖组和添加 0.5% 壳聚糖组的器官指数相对对照组有不同程度的提高,同时添加 0.5% 壳聚糖组胸腺的重量也有所提高,但差异均不显著,无生物学统计意义。

3 讨论

本试验结果显示:①壳聚糖对肉仔鸡生长性能的影响可能与添加剂量有关。当壳聚糖添加剂量为 0.2% 时对肉仔鸡生长性能的影响表现为促进作用,对生长速度影响不明显,但料重比有降低的趋势;当壳聚糖添加剂量为 0.1% 和 0.5% 时则表现为抑制作用。

②壳聚糖能提高肉仔鸡血液中游离脂肪酸的含量,抑制脂肪的沉积,但总体对肉仔鸡的脂肪代谢的影响效果不显著。这可能与肉仔鸡的日龄、饲养环境等因素相关。③壳聚糖可降低血清总蛋白含量,但至于如何影响本试验结果还不能定论,相关这方面报道也比较少,有待进一步研究。④壳聚糖对胸腺和法氏囊的重量和器官指数有增加的趋势,但添加0.5%的壳聚糖对肉仔鸡脾脏生长影响较为明显,甚至对脾脏的生长有抑制效应。

壳聚糖对动物脂肪代谢的影响研究报道虽多,但其对生长性能影响的研究报道不多,且结果也不尽一致。一些研究认为,壳聚糖对动物生长性能有促进作用,也有人认为对动物生长性能有负效应。壳聚糖刺激动物生长的机制尚不清楚,也未见系统的研究报道。为此,本试验研究了壳聚糖对三黄肉仔鸡生长性能的影响,但得出的结论是效果不显著,这与多数人认为壳聚糖不影响肉仔鸡的生长性能是一致的。多数研究认为,壳聚糖可干扰动物对日粮脂肪的消化吸收,降低回肠脂肪消化率,增加粪中脂肪的排出量,降低脂肪吸收,从而减小体脂的沉积量^[7,8]。本试验关于壳聚糖影响肉仔鸡脂肪代谢方面得出的结论与前人

的研究结果基本一致,但也存有某些差异,这可能是与肉仔鸡日龄、饲养环境等因素有关。另外,本试验初步认为壳聚糖可提高肉仔鸡的免疫力,这与多数研究得出的结论是一致的,但壳聚糖能否降低血清总胆固醇的含量还有待进一步研究。因此,需要在这些方面继续深入地研究方能定论。

参考文献

- 1 朱斌.甲壳素壳聚糖在饲料工业上的应用[J].四川职业技术学院学报,2005,11,15(4):103~105
- 2 沃兴德,洪行球,赵革平,等.壳聚糖对低密度脂蛋白的脂蛋白(a)代谢的影响[J].中国药理学通报,2000,16(5):530~533
- 3 姜明明,贾永全,陈建华,等.甲壳素壳聚糖在畜牧业中应用的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2005(12):27~28
- 4 王敦,翟少伟,白耀宇.虫源性壳聚糖对0~3周龄AA肉仔鸡生产性能的影响[J].当代畜牧,2004(1):35~36
- 5 刘阳,于勇,范文今,等.甲壳素调节血脂和免疫的作用[J].环境与职业医学,2002,19(3):204
- 6 何乃普,宋鹏飞,王荣民.甲壳素壳聚糖及其衍生物抗肿瘤活性的影响[J].高分子通报,2004(6):14~18
- 7 田德峰,王彦辉,张景英,等.壳聚糖调节血脂活性研究概况[J].中国海洋药物,2000(6):37~41
- 8 丁晓岚.壳聚糖对动物脂肪代谢及生长性能的影响[J].饲料工业,2005,26(12):7~8

(编辑:王芳,xfang2005@163.com)

征 稿 启 事

2007年,《饲料工业》杂志社和北京挑战生物技术有限公司联合推出“酶制剂”专栏,计划出版12期、刊发30~40篇论文。欢迎广大业界人士积极踊跃投稿。

酶制剂是所有活的有机体产生的由氨基酸组成的蛋白质,是借助生物技术手段研发的一种饲料添加剂,它是通过参加生化反应促进动物对蛋白质、脂肪、纤维素、淀粉以及其它营养物质的吸收和利用,补充动物体内某些消化酶的不足,提高饲料的利用率和畜禽的生产性能,减少氮、磷的排泄量,保护生态环境。正是因为酶制剂所具有高效、专一、无毒副作用、无残留的特点,使其成为目前饲料行业研究的热点。

“酶制剂”专栏主要是介绍酶制剂在饲料生产中的研发和应用进展。从酶制剂的生产、研发、检测、动物试验、最佳发酵条件的优化及在饲料中的具体应用等方面进行全方位、深层次的报道,同时对酶制剂的活性单位制定、检测标准、酶制剂质量评定以及实际应用中存在的问题及对策进行讨论。希望“酶制剂”专栏的推出能对行业的研究人员、生产企业有所提示和帮助,使酶制剂的应用更合理、更安全。真诚希望从事酶制剂研究的科研院所和相关生产企业的科研人员能积极参与,踊跃投稿,借助《饲料工业》这个平台把你们最新、最先进的技术信息和研究成果呈现给读者,共同把这个栏目办好,为饲料工业的发展做贡献。

大豆黄酮对肉仔鸡体内脂肪合成代谢的影响

张桂春 李绍龙

大豆黄酮(Daidzein, Da)是异黄酮类植物雌激素的一种,具有强心、降血脂、对抗雌激素依赖性肿瘤生长的作用,还具有抗溶血、抗氧化等作用。Da 能改变血中 GH 和 IGF-1 等激素的水平,促进动物生长,并使胎儿生长加速,促进大鼠和猪的体液免疫和细胞免疫功能。虽然对 Da 的研究取得了一定的进展,但有针对性地研究其对机体内与脂肪合成代谢密切相关的激素及酶的影响还未见报道,本研究旨在探讨 Da 对肉仔鸡体内胰岛素、苹果酸脱氢酶(MDH)及血清中脂蛋白酯酶(LPL)水平的影响。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试验设计

选择来源相同、体重一致、健康的 21 日龄艾维茵肉仔鸡(公鸡)96 只,随机分为 2 组,即饲喂基础日粮组和添加 3 mg/kg Da 组,每组 6 个重复,每个重复 8 只鸡。

1.2 药品特征及投喂方法

Da 为白色粉末,无毒、无味,按比例混合加入日粮中,每日饲喂。

1.3 试验日粮与饲养管理

按 NRC(1994)肉鸡营养需要配制玉米—豆粕型基础日粮,日粮组成及营养水平见表 1。试验组在基础日粮基础上添加 3 mg/kg Da。试验鸡全部笼养,按常规的肉仔鸡饲养管理方法进行饲养,自由采食、饮水。

表 1 基础日粮组成及营养水平

日粮组成(%)	0~3 周龄	4~8 周龄	营养水平	0~3 周龄	4~8 周龄
玉米	57.5	60.0	ME(MJ/kg)	12.12	12.55
豆粕	26.0	23.0	CP(%)	21.60	19.45
麦麸	5.00	5.54	Ca(%)	0.92	0.90
鱼粉	7.00	5.00	P(%)	0.50	0.45
植物油	1.00	2.50	Met(%)	0.40	0.34
磷酸氢钙	1.28	1.28	Met+Cys(%)	0.72	0.65
蛋氨酸	0.20	0.16	Lys(%)	1.18	1.10
石粉	1.40	1.40			
食盐	0.30	0.30			
维生素	0.02	0.02			
微量元素	0.15	0.35			
沸石	0.15	0.45			

张桂春,鲁东大学生命科学学院,264025,烟台市芝罘区世学路 184 号。

李绍龙,鲁东大学政法学院。

收稿日期:2006-10-22

★ 黑龙江省科委“十五”攻关课题“半胱胺与大豆黄酮协同应用促进畜禽生产的研究”(GB01B504-02)

1.4 采样与分析

分别于 28、35、42、49、56 日龄屠宰,颈静脉采血,分别放入两只离心管内,其中一只加入抗凝剂肝素钠,用于制备血浆,4 500 r/min 离心 15 min,低温分离血清及血浆。同时取肝脏样品,装入密封塑料袋内。血样及肝样放于-20℃冰箱冷冻保存,供测试用。

1.4.1 血浆胰岛素含量的测定

采用放射免疫法。 I^{125} 标记的胰岛素测定试剂盒由北京北方生物技术研究所提供,测定用日本 KUBOTAKR/160 低温离心机和美国 DPC 公司生产的 DOCGAmBYTCR 型 γ -计数器。

1.4.2 肝脏 MDH 活性的测定

称取肝脏样品 1 g,加 0.25 mol/l 蔗糖溶液 5 ml,0~3℃下 12 000 r/min 离心 40 min,取上清液,按蒋传葵(1982)的方法测酶活性。测定用 NAD 由美国 Sigma 公司提供,所需仪器为 Beckman M70 超速低温离心机和 7 500 UV 分光光度计。

1.4.3 血清中 LPL 活性的测定

按蒋传葵(1982)介绍的方法进行测定。

1.5 数据的分析和处理

结果以平均值($\bar{X}$)±标准差(SD)表示,统计分析用 SAS 软件包的一般线性模型(GLM)过程进行。

2 结果与分析

各组鸡血浆中胰岛素、肝脏中 MDH 及血清中 LPL 的动态变化分别见图 1、图 2 和图 3。

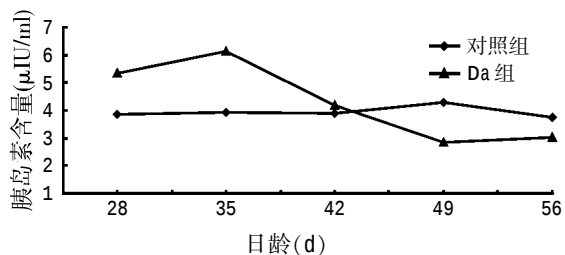


图 1 各组肉仔鸡血浆胰岛素含量的动态变化

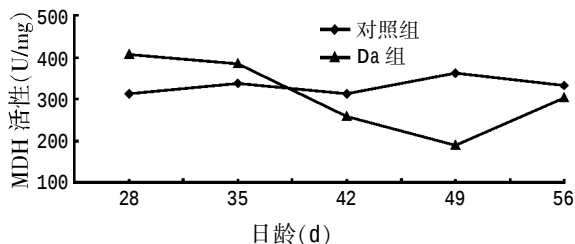


图 2 各组肉仔鸡肝脏中 MDH 活性的动态变化

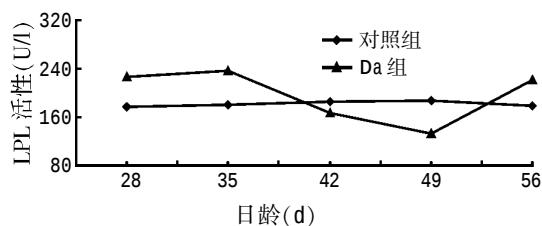


图3 各组肉仔鸡血清中LPL活性的动态变化

2.1 胰岛素含量

从图1可以看出,添加Da试验组28~42日龄肉仔鸡血浆胰岛素含量高于对照组,与对照组相比差异极显著($P<0.01$);而42~56日龄时低于对照组,其中49日龄时试验组鸡血浆胰岛素含量与对照组相比差异显著($P<0.05$)。整个试验阶段,胰岛素含量呈前期升高、后期降低的趋势。

2.2 MDH活性

从图2可以看出,添加Da试验组28~35日龄肉仔鸡肝脏中MDH活性高于对照组,其中28日龄时与对照组相比差异极显著($P<0.01$);试验组肉仔鸡42~56日龄时肝脏中MDH活性低于对照组,其中49日龄时与对照组相比差异极显著($P<0.01$),与胰岛素有基本相同的变化趋势。

2.3 LPL活性

从图3可以看出,添加Da试验组28~35日龄肉仔鸡血清中LPL活性高于对照组,差异显著($P<0.05$);42~49日龄时低于对照组,其中49日龄时与对照组相比差异显著($P<0.05$),56日龄时与对照组相比虽无统计学意义,但较对照组升高19.58%。Da对血清中LPL活性的影响呈阶段性,即前期升高、中期降低、后期又回升的趋势。

3 讨论

3.1 本试验中,试验组肉仔鸡血浆中胰岛素含量和肝脏中MDH活性均在试验的前半阶段高于对照组,后半阶段低于对照组,MDH与胰岛素变化趋势的吻合,可能是由于胰岛素提高了MDH的活性。胰岛素主要调节肝脏脂质的合成。Capuzzi等证实,胰岛素能促进体外培养鸡肝细胞的脂质合成;而Mccumbee通过试验证明,胰岛素对脂肪细胞中脂质的合成没有促进作用或作用微弱。胰岛素还能够抑制肝脏和脂肪组织中的分解代谢。MDH能促进体内的丙酮酸-苹果酸循环,此循环使NADP⁺转化为NADPH,为脂肪酸合成所利用,还使草酰乙酸进一步进入线粒体携带乙酰CoA,提供脂肪酸合成时所需的原料。Goodridge等曾报道,禽类脂肪组织中MDH活性与乙酰CoA羧化酶的活性平行,后者是脂肪酸合成过程中的限速酶。本试验的结果表明:Da在试验前期促进肝脏脂肪的合成

代谢,抑制肝脏脂肪的分解代谢;试验后期抑制肝脏脂肪的合成代谢。

3.2 肝脏合成和分泌的新脂质是以VLDL形态进入血液,VLDL转运甘油三酯到周围组织,在LPL催化下,VLDL中的甘油三酯水解为脂肪酸和甘油,LPL进一步引导游离脂肪酸进入脂肪组织,重新酯化,以甘油三酯形式保存起来,所以LPL的活性影响脂肪的沉积,可以控制鸡脂肪组织的生长。鸡脂肪组织中LPL的活性对营养条件的反应不如血浆中的敏感。从试验组LPL活性的曲线看,试验前期(28~35日龄)及末期(56日龄),Da促进了脂肪酸进入脂肪组织重新酯化;而中后期,尤其是在49日龄,Da明显的抑制了脂肪酸在脂肪组织的酯化。

3.3 综合以上的分析结果,Da对肝脏及脂肪组织中脂肪合成代谢的影响为:试验的前半阶段使肝脏合成脂肪的能力增强,试验的后半阶段,抑制肝脏脂肪的合成;在试验前期(28~35日龄)及末期(56日龄),Da促进了脂肪组织沉积脂肪的能力,而中后期,Da明显的抑制了脂肪组织中脂肪的沉积。

3.4 有学者研究大豆黄酮对仔鹅血浆总脂浓度和脂肪代谢关键酶影响的结果表明,大豆黄酮能使仔鹅血浆总脂浓度、肝脏中G-6-PDH活性、MDH活性降低,说明Da组血浆总脂浓度和脂肪合成代谢关键酶活性显著降低。肝脏中G-6-PDH和MDH糖代谢过程中提供乙酰乙酸去合成脂肪,由于此途径作用低,机体合成脂肪的原料减少。因而导致机体合成脂肪减少。其试验结果与本试验结果相吻合,即大豆黄酮不仅可以降低肉仔鸡的体脂含量,还可以降低仔鹅的体脂含量。

3.5 本试验中发现,Da能使28~42日龄肉仔鸡体内的脂肪合成能力及脂肪组织中脂肪的沉积能力增强,而在42~49日龄则使肉仔鸡脂肪合成能力及脂肪组织中脂肪的沉积能力降低。鸡体内脂肪的含量不仅取决于脂肪的合成能力及脂肪组织中脂肪的沉积能力,还取决于脂肪的分解能力。经过进一步的试验发现,其可能是由于在28~42日龄,体脂合成及沉积增强的程度大于体脂分解增强的程度,而在42~49日龄,Da使肉仔鸡脂肪合成及沉积能力降低,同时分解能力增强,从而使体脂含量降低。Da对肉仔鸡体脂含量的这种动态影响对生产实践有一定的指导意义,可以通过控制添加Da的时间来保证肉仔鸡在出栏时达到体脂含量最低,为生产低脂肪含量的肉仔鸡,提高经济效益具有一定的指导意义。

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

国产雨生红球藻藻粉质量安全性评价

张晓丽 刘建国 林 伟 刘 伟 史朋家 王增福 崔效杰 薛彦斌

虾青素 (Astaxanthin) 是类胡萝卜素的含氧衍生物,能够有效地淬灭活性氧,具有较高的营养和药用价值。许多学者通过动物和临床试验证明,虾青素能够越过动物血-脑屏障^[1],有抑制肿瘤发生^[2]、增强免疫^[3,4]、预防心血管疾病^[5]等多方面的生理功能,具有广阔的应用前景。目前,虾青素在国际上主要作为新型高效饲料添加剂应用于水产养殖业,已广泛应用于鲑鱼、鳟鱼、对虾等的养殖中,且已被美国、加拿大、日本及欧盟等国的食品监察机构确定为安全、高效的动物饲料。

雨生红球藻是自然界中虾青素含量最丰富的生物,其虾青素含量可达干重的 3.0%,甚至更高,被誉为天然虾青素的“浓缩品”。天然虾青素具有极强的抗氧化、维护动物机体健康及增色作用。作为饲料添加剂和生物保健品,虾青素在国际市场上的需求量很大。因此,雨生红球藻是继螺旋藻、盐藻之后的另一种经济微藻。

雨生红球藻藻粉在美国已经获得了 FDA 的批准,允许作为新的膳食成分进入保健品市场;日本也被批准将其应用于食品和饲料行业;欧共体也已有产品注册。我国雨生红球藻的研究主要停留在实验室阶段,规模化生产还没有进行。产品质量可能会受红球藻藻种、生产方式、收获和加工工艺等的影响而产生很大差异,因此,必需对国产雨生红球藻藻粉进行质量安全性评价。本文以中国雨生红球藻藻株和国内工艺流程生产的藻粉为原料,通过微生物学检验、重金属含量测定以及急性毒性试验,进行了质量安全性评价,以期为推动雨生红球藻产业化发展提供科学依据。

1 材料与方法

张晓丽,中国科学院微生物研究所,助理研究员,100080,北京市海淀区中关村北一条 13 号。

刘建国(通讯作者)、林伟、刘伟、史朋家、王增福,中国科学院海洋研究所。

崔效杰、薛彦斌,潍坊科技职业学院。

收稿日期:2006-10-04

★ 国家农业成果转化基金(02EFN216601213)、青岛市科技计划项目(02-1RCHHH-57)和中国科学院海洋研究所创新项目(L86032523)资助

1.1 试验材料

雨生红球藻藻株由本实验室提供,无菌保存在培养室中。藻粉生产在中国科学院海洋研究所微藻生物技术中心的生产车间进行。采用逐级放大培养和二步生产技术。第一步培养的目的是获得高生物量,由 3 级逐步放大完成。一级培养在实验室中进行,按照无菌要求操作;二级培养在光温控制的生产车间进行,采用柱状光生物反应器通气培养;三级培养在密闭的平行管道式光生物反应器中进行,并连续不断地搅动和补充二氧化碳。第二步培养的目的是获得高虾青素含量的藻粉,采用生物幕技术完成。藻体收获采用物理沉降和过滤技术,藻泥呈团状,冷冻贮藏,然后经真空冷冻干燥(Freeze Dryer 18, LABCONCO Corporation)加工为红褐色粉末,经测定,藻粉中的虾青素含量 $\geq 1.0\%$ 。试验前,藻粉用超高速气体细胞破壁机处理(CBF-250 型底部沸腾流化床气流粉碎机,四川绵阳),以提高藻粉中虾青素的生物利用率。

1.2 试验方法

1.2.1 卫生微生物学检验

无菌称取 25 g 样品,均质,加 225 ml 无菌生理盐水,混匀备用。按照《国家食品卫生微生物学检验标准》进行菌落总数、大肠菌、霉菌、酵母菌以及致病菌(包括沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌)的检测。

1.2.2 重金属含量测定

精确称取雨生红球藻藻粉 0.5 g,加入 HNO_3 (超纯)和 HClO_4 (分析纯)共 20 ml,比例为 1:5(体积比),加热溶解至液体透明,加入体积比为 1:1 的 HNO_3 (超纯)和 H_2O (超纯)2 ml 提取,定容至 25 ml,以备测定。铅、镉含量用原子分光光度计(原子分光光度计, PE-4100ZL, 珀金-埃尔默公司, 美国)测定;砷、汞、硒含量用荧光光谱法(原子荧光光谱仪 AF-610A, 北京瑞利公司, 中国)测定。

1.2.3 小鼠急性毒性试验

按照 GB15193.3—2003《食品安全性毒理学评价程序和方法》进行小鼠急性毒性试验。昆明种小白鼠二级,由青岛市动物中心提供。试验在青岛市疾病控制中心动物实验室进行,实验室温度范围为 22~24℃,相对湿度为 55%~60%。饲养方式为笼养。

试验前取藻粉 5.0 g,加蒸馏水至 20 ml,混匀以

备灌胃用。试验采用一次最大限度法。试验前先观察动物 3 d,选其中健康成年小鼠 40 只,雌雄各半,每只体重 19.0~21.0 g。试验分为 4 组,每组 10 只。试验组剂量设计为每千克体重 10.0 g,按每 10 g 体重 0.2 ml 的备用液 4 h 内分两次经口灌胃;对照组用同体积的生理盐水。灌胃前小鼠禁食 16 h,自由饮水。灌胃后继续禁食 2 h,然后给予正常饮食。

灌胃后,对中毒症状进行连续 4 h 观察,然后在 7 h 和 24 h 分别观察记录,以后每天上、下午各观察一次。连续观察 14 d,记录中毒症状及死亡情况。试验开始和 14 d 结束时分别测定小鼠体重。

2 结果与讨论

2.1 卫生微生物学检验

卫生微生物学检验是饲料和食品开发的基础指标,其中菌落总数和大肠杆菌是评价食品卫生质量的主要内容,也是评估食品质量的必检指标。国产雨生红球藻藻粉的微生物学检验结果见表 1,其中菌落总数为 480 CFU/g,远远低于国家规定限量值,也低于美国 FDA 对于食品和药品原料的卫生标准的规定值(菌落总数 $\leq 1\,000$ CFU/g);藻粉中大肠菌群 <30 MPN/100 g、霉菌 <20 CFU/g 和酵母菌 <10 CFU/g,均低于《保健食品通用卫生要求》所规定的标准,同时也符合 FDA 对于食品和保健品质量的规定。

表 1 雨生红球藻藻粉的卫生微生物学检验结果

检测项目	检测方法	检测结果	限量要求
菌落总数(CFU/g)	GB/T4789.2—2003	480	$\leq 1\,000$
大肠菌群(MPN/100 g)	GB/T4789.3—2003	<30	≤ 40
酵母菌(CFU/g)	GB/T4789.15—2003	<10	≤ 25
霉菌(CFU/g)	GB/T4789.15—2003	<20	≤ 25
沙门氏菌	GB/T4789.4—2003	未检出	不得检出
志贺氏菌	GB/T4789.5—2003	未检出	不得检出
金黄色葡萄球菌	GB/T4789.10—2003	未检出	不得检出

注:表中限量是指《保健食品通用卫生要求》规定中的微生物指标;MPN 为大肠菌群最近似数。

微生物检测的结果表明,25 g 藻粉中没有检出沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌等致病性菌。沙门氏菌是一种常见的致病菌,也是国内外食品微生物学常规检测对象菌,广泛存在于自然界中,主要集中在动物的肠道内。志贺氏菌常引起细菌性痢疾(菌痢),目前我国该菌痢的发病率仍居细菌性腹泻中的首位。金黄色葡萄球菌产生肠毒素导致急性肠炎,从而引起食物中毒。近年来,国内由于金黄色葡萄球菌引起的食物中毒现象时有发生。我国卫生部在《食品卫生法》释义中也规定:食品卫生标准中的致病菌

系指沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌等。微生物检测的结果表明,该藻粉符合 FDA 的质量标准,同时也达到了国家食品和保健品微生物学检验的要求。

2.2 重金属含量

藻粉中铅的含量为 0.24 mg/kg,此含量远远小于卫生标准的限量值,还不到限量的 1/8;镉的含量也只有限量的 5%;砷和汞的含量均小于国家标准中相应的重金属限量。在此藻粉中还检测到硒的存在,其含量为 0.025 7 mg/kg(见表 2)。

表 2 雨生红球藻藻粉中的重金属含量(mg/kg)

金属种类	含量	限量	FDA 的限量标准
铅	0.24	≤ 2.0	<5.0
砷	0.4	≤ 0.5	<2.0
镉	0.01	≤ 0.2	<0.5
汞	0.026	≤ 0.05	<1.0
硒	0.025 7	无	无
重金属总量	0.676	无	10.0

注:表中限量指《保健食品通用卫生要求》中以藻类为原料的保健食品卫生标准。

该雨生红球藻藻粉中重金属的检测结果表明,铅、镉的含量都远远低于保健食品卫生要求中的重金属限量,砷和汞的含量均小于相应的限量值。而且也符合 FDA 规定的食品中的重金属含量的标准,重金属总量还不到 FDA 规定金属总量的 1/10,说明该藻粉无论从重金属总量还是各项重金属指标上均符合国内外标准,证明此藻粉作为食品和保健品的原料是安全无毒的。

2.3 急性毒性试验

给小鼠饲喂雨生红球藻藻粉后,开始的一段时间内小鼠的活力稍有下降,3~4 h 恢复正常。以后观察未见异常现象,也没有死亡例发生。试验结束后,将全部小鼠杀死,进行解剖,肉眼观察。雌雄小鼠主要脏器(胃、肝、脾)均未见有任何异常,供试小鼠体重变化在试验组和对照组之间没有显著差异,见表 3。

表 3 雨生红球藻藻粉对试验小鼠体重的影响(n=10)

组别	性别	剂量(g)	死亡动物(只)	体重(g)	
				开始时	结束时
试验组	雄	10	0	19.8 $\pm$ 1.0	28.8 $\pm$ 0.6
	雌	10	0	19.4 $\pm$ 0.6	27.8 $\pm$ 0.9
对照组	雄	0	0	19.9 $\pm$ 0.9	29.2 $\pm$ 0.8
	雌	0	0	19.6 $\pm$ 0.8	28.0 $\pm$ 0.5

注:剂量按每千克体重计算。

国外对于雨生红球藻藻粉的安全性研究已有报道。Astafactor 在小鼠上所做的急性毒性试验(试验期 13 d)表明,雨生红球藻藻粉的半致死量(LD₅₀) >5.0 g

(按每千克体重计),更高的单次剂量 LD_{50} 为 10.4~18.0 g,都没有异常现象发生^[6]。Cyanotech 的另一急性毒性试验显示, LD_{50} 为 6.0 g、试验时间为 14 d 时,小鼠也正常发育,解剖观察也没发现有异常现象^[7];当剂量增至 LD_{50} 为 12.0 g 时也得到同样的结果。

本急性毒性试验表明,在 2 周的试验期间,试验组和对照组小鼠均表现发育正常,体重的变化也没有显著差异,解剖观察各脏器也无病变。这与其它雨生红球藻藻粉的急性毒性试验的报道具有一致性。说明本试验所用的雨生红球藻藻粉的 LD_{50} 为每千克体重 >10.0 g,根据 LD_{50} 剂量分级标准,不仅表明此藻粉为实际无毒物,也表明我国雨生红球藻藻种本身是安全的。

通过微生物学和重金属含量的检测分析可以看出,无论是微生物还是重金属含量,该藻粉都较美国 FDA 的标准低得多。美国雨生红球藻的生产主要在环境清洁、空气质量优良的夏威夷地区;生产方式主要采用两步法培养,开放池式生产。而国内雨生红球藻的生产环境条件比美国要差一些,但藻粉的质量上已符合标准,品质优良。这主要是因为:一方面,国外在虾青素积累阶段主要采用开放池式培养,而在本试验的整个培养过程中采用了封闭式的生产,避免了空气中污染物进入培养液,同时减少了池壁的污染,因此重金属含量较低;另一方面,我们采用三级放大式培养法,一级培养是在实验室无菌环境中进行的,二级和三级培养的光生物反应器在封闭的情况下更容易控制微生物和原生动物的污染,所以微生物指标更能满足食品和保健品原料的要求。从以上的结果也可以看出,此雨生红球藻藻粉的生产加工工艺完全符合食品质量的规定。

虾青素具有极强的抗氧化活性。体外试验证明,它是单线态氧的强大淬灭剂,雨生红球藻中的天然虾青素比角黄素(canthaxanthin)、 β -胡萝卜素(β -carotene)和玉米黄素(zeaxanthin)能更有效地阻止不饱和脂肪酸的过氧化作用^[8]。虾青素的抗氧化活性是 β -胡萝卜素、玉米黄素、叶黄素(lutein)和角黄素等类胡萝卜素的 10 倍之多^[9]。虾青素清除单线态氧的活性是维生素 E 的 100~550 倍^[10]。由于虾青素在体外试验中具有强大的保护细胞免受膜质过氧化作用,被誉为“超级维生素 E”、“超级抗氧化剂”^[9,11]。

本文检测的雨生红球藻藻粉虾青素含量大于 1.0%,而且,在此藻粉中检测到了微量硒(25.7 $\mu\text{g/kg}$)的存在。硒作为人和动物生命活动必需的微量元素,

近年来受到广泛的重视。硒是机体抗氧化系统的组成成分,有许多重要的生理功能,其中最重要的是硒在人体和动物机体中以硒代半胱氨酸(SeCys)的形式参与构成谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),从而清除体内过多的活性氧自由基^[12],具有消除自由基和脂质过氧化物,维护细胞膜稳定性的作用^[12,13]。适当补硒可提高谷胱甘肽过氧化物酶活力,从而提高机体的抗氧化能力^[14]。

3 结论

综上所述,通过微生物含量、重金属含量和急性毒性试验可以初步判定此雨生红球藻藻粉没有任何毒副作用,作为饲料和保健(功能)食品原料是安全的。

参考文献

- 1 Tso M O M, Lam T T. Method of retarding and ameliorating central nervous system and eye damage [J]. United States Patent, 1996,5: 527~533
- 2 Guerin M, Huntley M E, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition [J]. Trends Biotechnol., 2003, 21(5): 210~216
- 3 Chew. "Astaxanthin Stimulates Immune Response in Humans in a Double-blind Study" // Chew B P, Park J S, Chyun J H, et al. SupplySide West Seminar, 2003
- 4 Okai Y, K. Higashi -Okai. Possible immunomodulating activities of carotenoids in in vitro cell culture experiments. Int [J]. J. Immunopharmacol., 1996, 8(12):753~758
- 5 Jyonouchi H, Gross M. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action[J]. Nutr. Cancer, 2000, 36: 59~65
- 6 Astafactor. Technical Report 1-Haematococcus pluvialis and Astaxanthin Safety for Human Consumption; www.astafactor. com/techreports/tr 3005-001.htm (Accessed 10/02/04)
- 7 Cyanotech. Technical Report 1-A Technical review of NatuRose™ Haematococcus Algae Meal; www. cyanotech. com/Pdfs/axbul50. pdf. (Accessed 1/05/03)
- 8 Naguib Y M A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids[J]. J Agric. Food Chem., 2000, 48: 1 150~1 155
- 9 Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids[J]. Pure and Applied Chem., 1991,63(1):141~146
- 10 Shimidzu N, Goto M, Miki W. Carotenoids as singlet quenchers in marine organisms[J]. Fisheries Science, 1996, 62(1): 134~142
- 11 Kurashige M, Okimasu M, K. Utsumi. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin [J]. Physiol. Chem. Phys. Med. NMR, 1990, 22(1): 27~38
- 12 H. A. Schroeder, D. V. Frost, J. J. Balassa. Essential Trace Metals in Man: Selenium[J]. J. Chron. Dis., 1970, 23: 227~243
- 13 Simon A. Effect of selenium repletion on glutathione peroxidase protein level in rat liver[J]. J. Nutr., 1988, 118: 853~858
- 14 吴振荣. 微量元素与免疫功能 [J]. 国外医学——医学地理分册,1992 (1):20~24

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

气相色谱-串联质谱法检测猪肉组织中的磺胺二甲嘧啶残留量

赵晓凤 杨 中

摘 要 利用气相色谱-串联质谱法分析猪肉组织中的磺胺二甲嘧啶残留量。样品脱脂后,采用二氯甲烷提取样品中的目标化合物,经萃取、硅烷化衍生后,用气相色谱-串联质谱法检测,根据保留时间和质谱图谱与对照品比较进行定性与确认。所检测的磺胺二甲嘧啶的二级质谱图与标准的二级质谱图匹配良好,方法快速准确,干扰较少。该法测定磺胺二甲嘧啶的回收率为76%~110%,检出限为0.01 mg/kg,适用于磺胺二甲嘧啶残留量的检测。

关键词 串联质谱法;磺胺二甲嘧啶;猪肉组织;残留

中图分类号 S859

磺胺二甲嘧啶(Sulfamethazinum, SM2)为兽医临床常用的磺胺类药物,具有抗菌力强、毒性小、吸收迅速完全、在家畜体内药效维持时间较长、能透过血脑屏障进入脑脊液、排泄较慢、不宜损害肾脏和尿路、药价低廉等优点。兽医临床常用本药防治畜禽菌源性感染症和球虫病。由于磺胺二甲嘧啶在体内作用时间和代谢时间较长,通过任何途径摄入都有可能在人体中蓄积,蓄积浓度超过一定值对人体有害。短时间大剂量或长时间小剂量的刺激可分别引起急性或慢性中毒,损害机体的泌尿系统、免疫系统,破坏肌肉、肾脏和甲状腺等组织,诱发人的甲状腺癌。同时,SM2也可能导致“三致”。在我国,由于兽药的不合理使用或滥用,SM2的残留现象极其严重^[1]。

串联质谱技术具有定性准确、排除干扰能力强以及灵敏度高的特点。当样品基质较复杂或进行多残留检测时,需要经过复杂的前处理过程,耗费大量的时间;同时,对于某些复杂样品中的痕量兽药组分会由于分析仪器的灵敏度不足、化合物定性不够准确而得出错误的结论,串联质谱技术可以很好的解决此类问题。目前国外已有许多文献报道了串联质谱法在农药残留分析中的应用,但国内在这方面的研究较少。串联质谱的突出优点,使其成为兽药残留分析中最为可靠、灵敏的检测技术。本试验中使用气质联用仪GC/MS/MS对猪肉组织中磺胺二甲嘧啶的残留量进行检测,可以克服通常使用HPLC检测或GC检测时出现的假阳性的现象^[2]。

赵晓凤,新疆兽药饲料监察所,高级畜牧师,830063,新疆乌鲁木齐市克拉玛依东路45号。

杨中,新疆分析测试中心。

收稿日期:2006-10-16

1 试验材料与方法

1.1 仪器设备

气相色谱-质谱联用仪,CP-3800/Saturn-2000GC/MS/MS,美国瓦里安公司。

绞肉机、实验室高剪切分散乳化机、旋转蒸发器、电热炉、电热恒温鼓风干燥箱、涡轮混合器、循环水式多用真空泵、电子天平(感量为0.1 mg和0.01 g)、常用玻璃仪器。

1.2 试剂和兽药标准品

丙酮、正己烷(分析纯)、二氯甲烷(分析纯)、三氯甲烷(氯仿,分析纯)、甲醇(分析纯)、超纯水、柠檬酸三钠(分析纯)、盐酸(分析纯)、氢氧化钠(分析纯)、硅烷化衍生剂[N,O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 BFTFA,由Sigma公司提供]、磺胺二甲嘧啶标准品(含量99.5%,Sigma公司提供)。

1.3 标准品溶液的配制

用感量为0.1 mg的电子天平准确称取50 mg磺胺二甲嘧啶标准品于容量瓶中,用甲醇定容至100 ml,作为标准储备液。移取1 ml上述溶液于100 ml容量瓶中,配制成标准工作液。

1.4 色谱条件

1.4.1 仪器条件

色谱柱:CPSIL 8 CB,30 m×0.25 mm×0.25 μm。

载气:氦气(>99.99%)。

载气流速:1.0 ml/min。

柱温:初温150℃,保持2 min后以每秒5℃的速率升至300℃,保持15 min。

进样口温度:300℃。

进样量:1 μl。

进样方式:不分流进样。

1.4.2 一级MS质谱条件

离子阱温度:170 ℃。

GC/MS 传输线温度:260 ℃。

离子源:EI 70 eV,灯丝电流 50 μ A。

溶剂延迟时间:4 min。

质量扫描: m/z 50~550。

1.4.3 二级 MS 检测器设置

多重电子轰击(AMD):选用多个电压对离子进行轰击,分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 V。最后选用轰击电压为 0.6 V。

选择离子(SIS):所选择离子的质量(荷质比)为 108、156、213、251。

1.5 操作步骤

1.5.1 样品的制备

将鲜肉(猪的精瘦肉)的骨头、筋骨等除去,切成大小适当的肉片,用孔径为 3 mm 的绞肉机绞 3 次,然后按四分法取样。

1.5.2 提取

在两个塑料离心管中各称取 5 g 样品(用感量为 0.01 g 的电子天平称取),并分别加入丙酮和氯仿(体积比为 1:1)50 ml,用实验室高剪切分散乳化机均质 5 min。然后将两个样品分别抽滤于两个圆底烧瓶中,在圆底烧瓶中分别加入 1 mol/l 的 HCl 10 ml,水浴 40 ℃旋转蒸发,将有机溶剂蒸出,蒸至不再有冷凝液滴落下即可,各加正己烷 50 ml,转入 100 ml 分液漏斗中。

1.5.3 净化

提取液于分液漏斗中轻摇 30 s,静置分层,取下层 HCl 相置于离心管中,再在分液漏斗中各加 1 mol/l HCl 5 ml,用正己烷提取,取下层 HCl 相同上次的 HCl 相一起并入离心管中。离心管放入沸水浴中加热 15 min,冷却,在两个离心管中各加入二氯甲烷 15 ml,混匀,分别转入两个分液漏斗,轻摇后静置分层,弃去二氯甲烷层(下层),各加饱和柠檬酸三钠 25 ml,用 3 mol/l 氢氧化钠溶液调 pH 值为 5.55~5.65。然后在分液漏斗中各加二氯甲烷 4 次(每次 15 ml),分次提取,每次 30 s。分别合并二氯甲烷于两个蒸发瓶中,于 30 ℃水浴中旋转蒸至溶液只有 2~3 ml。

1.5.4 衍生化

将蒸至 2~3 ml 的余液分别转入 10 ml 的两个具塞比色管中,在通风橱中用氮气吹干,并同时准确移取 0.5 ml 磺胺二甲嘧啶标准工作液于 10 ml 具塞比色管中,同样用氮气吹干,各加入 100 μ l BSTFA 衍生化试剂,加盖于涡旋混合器上震荡,在 80 ℃的电热恒温鼓风干燥箱中加热衍生 1.5 h(盖紧盖子)。衍生完毕后用氮气吹干,各加入 0.5 ml 苯,溶解,用涡旋混合器混匀,转入进样瓶中。将按上述 GC/MS/MS 条件上机

检测,得出谱图 1、2、3、4。

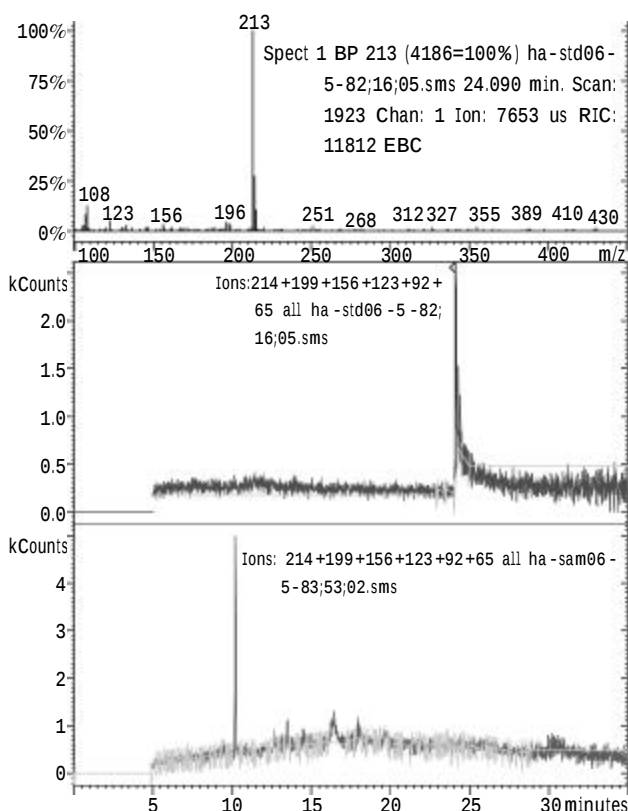


图1 磺胺二甲嘧啶标准溶液 GC/MS 总离子流谱图

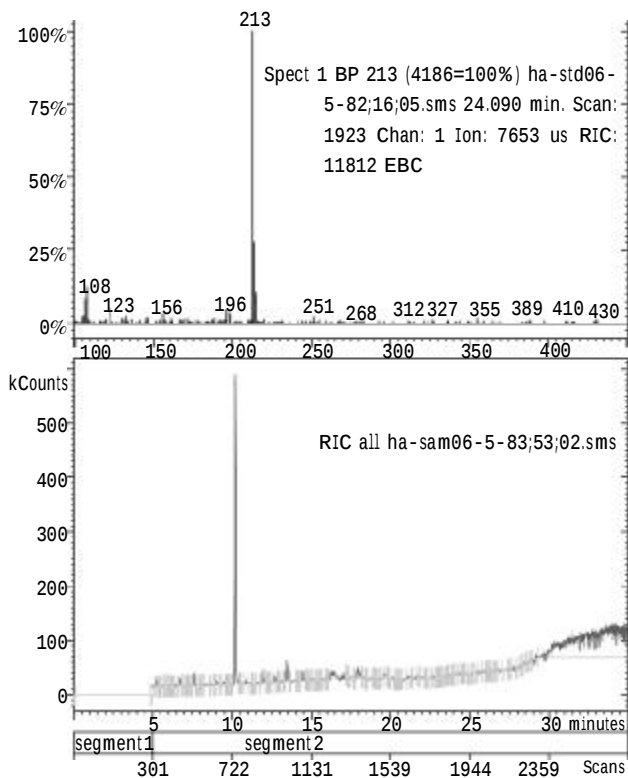


图2 空白猪肉组织加标后 GC/MS 总离子流谱图

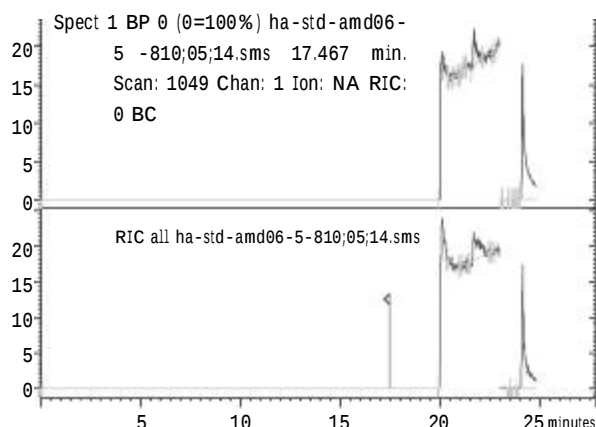


图3 磺胺二甲嘧啶标准溶液 MS/MS 总离子流谱图(上)
空白猪肉组织加标的 MS/MS 总离子流谱图(下)

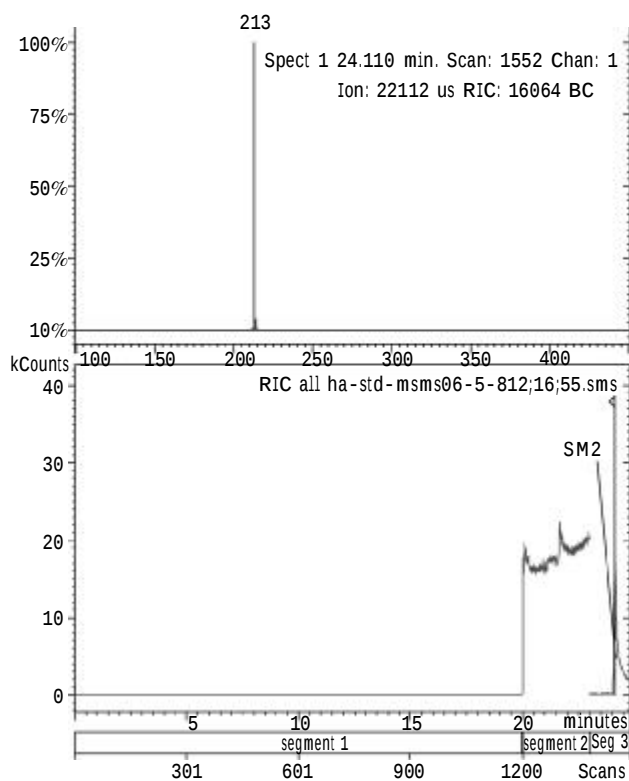


图4 磺胺二甲嘧啶标准的 MS/MS 总离子流谱图

2 讨论与分析

2.1 衍生化方法的选择

衍生化是分析磺胺二甲嘧啶残留量的一个重要环节。由于这些化合物是极性、低挥发性,并且有多个官能团,所以必须通过衍生化反应来使这些活跃的化合物转化为稳定的、易挥发的衍生物,这样才能构成进行气相色谱分析的首要条件。此外,衍生化还能增加检测的灵敏度和选择性。目前,衍生化分为酯化、烷基化、甲硅烷基化、全卤化和光化学技术等。

我们选择 BSTFA 作为分析方法的衍生化试剂,硅烷化过程简单、快速、有效、安全,完全能满足测试分析要求。从图1中可看出磺胺二甲嘧啶在气质联用仪上都能完全分离,杂质峰少说明硅烷化过程产生较少的干扰物质。

2.2 色谱条件的优化

样品按试验方法提取、衍生化后,GC/MS法及 GC/MS/MS法分析,GC/MS法杂峰干扰多,需要经过柱净化后才能测定,GC/MS法有背景干扰峰,结合质谱图可达到定性目的,但由于背景干扰对灵敏度有明显的影响,相应地,串联质谱法几乎无背景干扰。因此,气质联用法测定磺胺二甲嘧啶是既可定性又可定量的确证方法,它避免了气相色谱方法需要使用双柱或双检测器来确证的麻烦,在硅烷化后无需再进行过柱净化,仍能得到杂质峰较少、分离效果好的谱图。

2.3 串联质谱条件的优化

为了提高二级质谱的特异性,我们先用 GC/MS 确定了各组分的保留时间,设计出各分析时段。表1显示的是这些化合物硅烷化产生的主要的分子离子碎片。本方法选择了有结构代表性的基峰作为母离子,对每种成分的母离子分别用 AMD 法优化确定 CID 电压,建立串联质谱(MS/MS)分析条件,见表2。

表1 GC-MS-EI 经硅烷化的磺胺二甲嘧啶所产生的主要离子

磺胺二甲嘧啶(硅烷化)主要离子 质荷比(m/z)	基峰 213	特征离子 108、156、196、213、251
-----------------------------	-----------	-----------------------------

表2 二级质谱参数

化合物	相对分子量	硅烷化后的相对分子量	分析时间段(min)	保留时间(min)	CID 电压(mv)	母离子	定量离子
磺胺二甲嘧啶	278	350	23.50~24.50	24.09	0.60	213	156

2.4 磺胺二甲嘧啶的标准曲线

用感量为 0.1 mg 的电子天平准确称取 50 mg 磺胺二甲嘧啶标准品,用甲醇定溶至 100 ml 容量瓶中作为储备液,浓度为 0.5 mg/ml。准确移取 1 ml 储备液,用甲醇定溶至 100 ml 容量瓶中配制成浓度为 5 μg/ml

的工作液。分别从工作液中准确移取 0.1、0.2、1.0、2.0、4.0、8.0 ml,用甲醇定溶至 10 ml 容量瓶中,作为标准工作液,浓度分别为 0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、4.00 μg/ml。按 1.5.4 衍生化和 1.4 色谱条件上机检测。从结果(见表3)可得出在浓度 0.05~4.00 μg/ml 范围内,磺胺二

甲嘧啶标准溶液浓度与峰面积呈正比,是线性相关的,也对应方法中的检出限。此方法测得的磺胺二甲嘧啶的检出限为 0.01 mg/kg,远低于各国规定的最高残留限量 MRL,因此该方法完全能满足实际检测需要。

表3 磺胺二甲嘧啶不同浓度标准溶液及对应峰面积

浓度($\mu\text{g/ml}$)	0.05	0.10	0.50	1.00	2.00	4.00	相关系数
SM2 峰面积	513	961	1 762	8 931	20 802	36 289	0.99

2.5 回收率实验

表4 猪肉样品中回收率测定结果

兽药	添加 0.05 mg/kg 标样		添加 0.5 mg/kg 标样		添加 1.00 mg/kg 标样	
	实测值(mg/kg)	回收率(%)	实测值(mg/kg)	回收率(%)	实测值(mg/kg)	回收率(%)
磺胺二甲嘧啶	0.038	76	0.46	92	1.1	110

3 结论

应用气质联用仪(GC/MS/MS)测定动物肌肉组织中磺胺二甲嘧啶的方法,由于二级 MS 技术的运用,简化了前处理步骤,使前处理所用有机溶剂较少,硅烷化过程简单,无需进行可能造成损失的净化过程,快速、有效、安全,且可同时达到定性、定量的目的,可靠性更好,无疑是一种可行的检测方法。

采用在空白猪肉组织中添加不同浓度标准溶液的方法,按 1.5.2、1.5.3、1.5.4 处理方法对磺胺二甲嘧啶进行了添加回收率实验,每种组织在每个添加水平上重复 4 次实验,每次 5 个平行。实验结果见表 4。经过实验得出所建立的磺胺二甲嘧啶残留量的测定方法的回收率为 76%~110%,其准确性能满足残留分析测试要求。也证明了用二氯甲烷提取有较高的回收率。因为二氯甲烷有高的介电常数,并且在水中的溶解度远小于乙醚和乙酸乙酯。

参考文献

- 1 张仲秋,郑明. 畜禽药物使用手册[M]. 北京:中国农业大学出版社,1999
- 2 朱坚,王国伞,陈正天,等. 食品中危害残留物的现代分析技术[M]. 上海:同济大学出版社,2003
- 3 王秉栋. 食品卫生检验手册[M]. 上海科学技术出版社,2003

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

2007 年长三角地区水产动物营养与饲料科技论坛

长三角地区是我国重要的水产养殖基地,也是我国重要的水产饲料生产地区,在此区域内集中了众多从事水产养殖业、水产饲料业的大专院校、科研单位和生产企业。在水产养殖业和水产饲料业蓬勃发展的今天,应对原料紧缺的危机,加强区域内行业的交流合作显得尤为重要。为此特举办长三角地区水产动物营养与饲料科技论坛,诚邀各界人士与会,共谋水产动物营养研究和饲料发展大计。

1. 论坛主题

质量、安全、效益。

2. 会议日程

2007 年 3 月 22 日报到;2007 年 3 月 23~24 日开会。

3. 论坛交流

论坛将邀请国内著名专家学者就水产动物营养与饲料关键问题、热点问题作专题报告。主要内容有饲料原料质量与配方原料的选择、水产饲料加工工艺及设备、河蟹饲料质量控制技术、加州鲈饲料的研制、虾类饲料质量控制技术、水产饲料中氨基酸的使用技术、水产动物营养与免疫等。

同时,论坛将安排部分企业作技术报告。

4. 会议注册费(会务费)

每人 800 元,含会议资料费、会务费和餐费,住宿费自理。

5. 会议地址与住宿

报到地点:上海水产大学专家培训中心(上海市杨浦区军工路 334 号)。

6. 会议组织

主办单位:上海水产大学;上海市饲料工作办公室;上海市水产办公室。

协办单位:华东师范大学;苏州大学;浙江省淡水水产研究所;浙江万里学院;《饲料工业》杂志社。

承办单位:上海水产大学生命科学与技术学院;上海高校水产养殖学 E-研究院;农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室。

7. 会议赞助支持

会议接受单位赞助,有意者请与冷向军教授联系,电话:13371935255;E-mail:xljeng@shfu.edu.cn。

8. 会议秘书组联系方式

联系人:陈乃松 黄旭雄 杨志刚 华雪铭

地址:上海市军工路 334 号 上海水产大学生命科学与技术学院 邮编:200090

电话:021-65710025 传真:021-65710019 E-mail:zgzyang@shfu.edu.cn

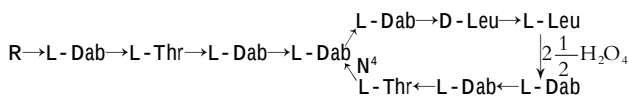
硫酸黏杆菌素研究概况

杨海峰 葛竹兴

硫酸黏杆菌素(Colistin Sulfate)又名黏杆菌素、抗敌素、多黏菌素 E,是从多黏芽胞杆菌变种(*Bacillus polymyxa* var. *colistinus*) 的培养液中提取的一种碱性多肽类抗生素。近十几年来,由于药物残留和耐药问题对人类产生的潜在危害日益突出,发达国家相继禁用了若干种饲用抗生素。硫酸黏杆菌素因内服胃肠道不易吸收,不易产生耐药性,对革兰氏阴性菌,如大肠杆菌、沙门氏菌、巴氏杆菌、绿脓杆菌等有强大的抗菌作用而引起畜牧兽医工作者的关注。美国和欧盟将其批准作为兽药使用,在日本还被用作饲料添加剂。我国在 20 世纪 90 年代末由山东鲁抗医药集团成功研制了硫酸黏杆菌素及其制剂,并于 2002 年被农业部批准为国家三类新兽药。

1 硫酸黏杆菌素的理化性质

硫酸黏杆菌素主要是硫酸多黏菌素 E₁ 和 E₂ 的混合物,其结构式组成见图 1。硫酸黏杆菌素为白色或类白色粉末,无臭、味苦,有吸湿性,易溶于水,不溶于酯、醚、酮、氯仿等有机溶剂。化学性质稳定、耐热。硫酸黏杆菌素在米糠、豆饼、淀粉等辅料中 4℃ 存放,5 年活力不变;37℃ 存放,活力最多只下降 5% 左右。硫酸黏杆菌素的水溶液在 pH 值 2~6 时相当稳定,在强酸及强碱中易于分解。



注:1.R 为 β -甲基辛酰(E_1)、 β -甲基庚酰(E_2),Dab 为 2,4-二氨基

丁酸,Thr 为苏氨酸,Leu 为亮氨酸,L 为左旋,D 为右旋;

2. 箭头表示前一个氨基酸的羧基与后一个氨基酸的 2 位上的氨基去 H_2O , 结合成肽链:

3. N^4 表示 L-Thr 的羧基与 L-Dab 的 4 位上的氨基结合成肽链。

图1 硫酸黏杆菌素的结构式

杨海峰, 江苏畜牧兽医职业技术学院动物药理学系,
225300, 江苏泰州市迎宾路 58 号。

葛竹兴,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-09-11

2 抗菌机理及活性

硫酸黏杆菌素对敏感菌的细胞膜有强大的吸附作用。细胞膜磷脂中存在的游离磷酸根具有很强的负电性,药物分子中带正电荷的游离氨基可与其结合,使细胞膜的表面张力降低和通透性增加,导致细胞膜解聚,丧失生物活性,使菌体内氨基酸、嘌呤、嘧啶和无机盐等外漏。此外,硫酸黏杆菌素还能影响核质和核糖体功能,导致细菌死亡。硫酸黏杆菌素对于繁殖期和静止期的敏感菌均可起到杀菌作用,为慢效杀菌剂。由于革兰氏阳性菌细胞壁的主要成分为黏肽而不是磷脂,因此硫酸黏杆菌素对革兰氏阳性菌无抗菌活性,对大肠杆菌、沙门氏菌、巴氏杆菌、布氏杆菌、弧菌、痢疾杆菌和绿脓杆菌等革兰氏阴性菌有较强的抗菌活性,对绿脓杆菌和弧菌的杀菌作用尤为强大。硫酸黏杆菌素对几种细菌的抗菌活性见表1。

表1 硫酸黏杆菌素对几种细菌的最小抑菌浓度(MIC)

菌种	菌株	MIC($\mu\text{g/ml}$)	敏感度
鼠伤寒沙门氏菌	WLR142	0.41	中度敏感
猪霍乱沙门氏菌	WLR101	0.01	中至高度敏感
埃希氏菌	WLR1 51R, 53	0.01~0.02	中至高度敏感
痢疾志贺氏菌	WLR194	0.01	中至高度敏感
肺炎克氏杆菌	WLR1217	0.01	中至高度敏感
铜绿色假单胞菌	WLR1216	1.2	中度敏感
金黄色葡萄菌	WLR196	11.1	中度敏感
化脓链球菌	WLR138	33.0	中度敏感
普通变形杆菌	WLR1204	>100.0	耐药
流产布氏杆菌	WLR181	>100.0	耐药

3 药动力学特征

硫酸黏杆菌素的药动学特征为:①内服给药时胃肠道不易吸收,内服后 60%~80%硫酸黏杆菌素随动物粪便排出,通常内服剂量不产生可检出的血药浓度,从尿中排出量较少,动物组织器官中分布极少;②注射给药吸收较快,体内分布广,主要组织均在 0.5~1 h 达到峰浓度,硫酸黏杆菌素与组织能够结合。由于硫酸黏杆菌素分子量较大,不易进入脑脊液、胸腔、关节腔和感染灶,从而限制了抗菌效果(一般不注射给药)。吸收后的药物主要以原形经肾小球滤过排泄。

以每 1 000 kg 仔猪饲料中添加 40 g 硫酸黏杆菌素,测定仔猪各组织的硫酸黏杆菌素的分布。饲喂 2 h

后,仔猪血液及主要脏器中未检出硫酸黏杆菌素,消化道几乎不吸收。硫酸黏杆菌素能迅速从粪便中排出,体内吸收的量极少,即使不完全从尿中排出,也会在体内很快失活。

青年牛肌注和静注硫酸黏杆菌素,给药剂量为 2.5 mg/kg,体内过程均为三室模型,肌注药动参数达峰时间(T_{max})为 0.5 h,消除半衰期($T_{1/2\beta}$)为 4.52 h;静注药动参数:表观分布容积(V_d)为 1.02 L/kg,血浆清除率(CL)为 0.1 L/(kg·h)。

4 药物残留

Leroy 等研究了硫酸黏杆菌在口服和肌注给药方式下在牛体内的残留情况,结果表明,口服无法检测到药残留,而肌注后于注射部位 15 d 内可检测到药残留。以每 1 000 kg 饲料添加 100~500 g 硫酸黏杆菌素连续喂鸡 8 周,停药当天组织中的药物残留量低于 0.28 mg/kg。每 1 000 kg 饲料添加 400 g 硫酸黏杆菌素连续喂猪 4 周,屠宰时脂肪、肾中有微量残留,停药 3 d 后,全部组织药物浓度均低于 0.025 mg/kg。Roudaut 研究表明,蛋鸡口服硫酸黏杆菌素,卵黄内无残留;而肌注给药于 8 d 内可在卵黄内检测到残留。陈绍峰研究表明,硫酸黏杆菌素作为肉鸡饲用抗生素使用,添加量为每 1 000 kg 饲料 4~100 g 时,从 1 日龄开始添加直至 35 日龄后休药 7 d,在第 36~42 d 每天上午 9 时采集鸡肉和肝脏样品,动态检测休药期内硫酸黏杆菌素的残留情况,结果显示,在停药期 7 d 内,在肉鸡体内的残留低于国家规定的最高残留限量标准。温芳等在鸡饮水中添加硫酸黏杆菌素 300 mg/l 和 60 mg/l,连续饮用 7 d,利用微生物法检测硫酸黏杆菌素的残留情况,60 mg/l 组的肌肉、肝脏和肾脏在停药后各阶段均未测得硫酸黏杆菌素残留;300 mg/l 组肝脏和肾脏在停药后立即检测,可测得有微量残留,分别为 180 μ g/kg 和 190 μ g/kg。硫酸黏杆菌素在动物性食品中的最高残留限量(MRL)如表 2 所示。

表 2 硫酸黏杆菌素最高残留限量(MRL)

动物品种	靶组织	MRL(μ g/kg)
牛、羊	奶	50
牛、羊、猪	肌肉	150
	脂肪	150
牛、羊、猪、鸡、兔	肝	150
	肾	200
鸡	蛋	300

5 毒性与不良反应

王丽平等进行了硫酸黏杆菌素的毒性研究,小鼠

口服硫酸黏杆菌素 LD_{50} 为 711.54 mg/kg,属低毒化合物,对小鼠骨髓无诱发微核作用,对小鼠精子无致突变作用。在大鼠饲料中分别添加硫酸黏杆菌素 100、500、1 000 mg/kg,饲喂 3 个月和 6 个月,无死亡和中毒症状,尿检、血检及组织检查均无异常。

硫酸黏杆菌素在内服给药时,由于其肠道不易吸收的药动力学特性,其不良反应是比较轻微的,动物能很好耐受,但内服大剂量硫酸黏杆菌素可引起食欲减退、恶心、呕吐和腹泻。全身应用可引起肾毒性、神经毒性和神经肌肉阻断效应,故一般不作注射给药。硫酸黏杆菌素的应用偶而会导致葡萄球菌、变形杆菌和真菌的二重感染,必须引起注意。

6 临床应用

硫酸黏杆菌素对革兰氏阴性菌有强大的抗菌作用,主要作为饲用抗生素使用,用于促进动物生长,提高饲料转化率,防止由大肠杆菌、沙门氏菌等革兰氏阴性菌引起的消化道疾病,提高幼畜、雏禽的成活率。硫酸黏杆菌素除单独使用外,还可与杆菌肽锌以 1:5 的比例联用制成复合预混剂。杆菌肽锌对革兰氏阳性菌有特效,因此两者合用可产生协同作用,使抗菌谱更宽,抗菌活性增强。体外抑菌试验表明,硫酸黏杆菌与杆菌肽锌合用时,对大肠杆菌、沙门氏菌的最小抑菌浓度(MIC)比单用硫酸黏杆菌素时降低 2~4 倍。此外,硫酸黏杆菌素在兽医临床上还可用于口服给药治疗动物肠道细菌感染,外用治疗烧伤或外伤引起的绿脓杆菌感染,与磺胺药、甲氧苄啶合用对大肠杆菌、绿脓杆菌等有协同作用。

王彩玲等研究表明,在仔猪饲料中添加 20 mg/kg 的硫酸黏杆菌素,连续饲喂 52 d,与对照组相比,日增重提高 8.5%,料肉比降低 8.6%,同时发现硫酸黏杆菌素与黄霉素之间存在相加或协同作用。李德培报道,在肉鸡(4 日龄~8 周龄)和蛋鸡(54~74 周龄)饲料中添加 40 mg/kg 杆菌肽锌+10 mg/kg 硫酸黏杆菌素合剂,肉鸡增重提高 10.5%,料肉比降低 7.5%;蛋鸡产蛋率和产蛋量分别提高 16.26%和 16.8%。在仔猪(4~8 周龄)和生长猪(60~102 日龄)饲料中添加 100 mg/kg 杆菌肽锌+20 mg/kg 硫酸黏杆菌素合剂,仔猪增重提高 44.1%,料肉比降低 38.3%;生长猪增重提高 18.0%,料肉比降低 7.9%。

(参考文献 12 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:王 芳,xfang2005@163.com)

TMP 与氟苯尼考配伍应用对 鸡大肠杆菌病的疗效试验

王春华 袁建伟 韩喜彬

大肠杆菌病会引起鸡生长缓慢、饲料利用率降低,造成经济损失。目前防治这些疾病仍在使用各种抗生素,但耐药性问题越来越严重。氟苯尼考是较为敏感的药物,它抗菌谱广,与其它抗生素或抗菌药物之间不易产生交叉耐药性,而且多数呈协同作用。它使用安全(除妊娠动物外),应用十分广泛。为了进一步增加氟苯尼考的疗效,降低成本,我们用三甲氧苄啶(TMP)与氟苯尼考配伍应用对鸡大肠杆菌病的疗效进行研究测定。

在实验室工作的基础上,通过大量多次反复实验发现,用 TMP 与氟苯尼考配伍,配伍比例大约为 1:5,药物浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,即每毫升的药液浓度含 TMP 8 μg 、氟苯尼考 42 μg ,对鸡大肠杆菌病有确切的疗效。为了进一步证实其治疗效果,我们选择临床鸡大肠杆菌病进行治疗试验,并用氟苯尼考和恩诺沙星作对照,试验结果表明,TMP 与氟苯尼考配伍之后,无论从死亡率、治愈率、增重率上均好于氟苯尼考和恩诺沙星对照组。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品

氟苯尼考,含量为 90%,批号 040301;TMP,含量为 98%,批号 031101;恩诺沙星,含量为 99%,批号 031012。

1.1.2 试剂

蛋白胨、氯化钠、酵母膏、琼脂购自杭州天和试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 发病情况

发病时间为 2005 年 9 月,锦州市某鸡场所饲养

的海兰褐蛋鸡 15 000 只,50 日龄,发病 4 d,发病数为 5 000 多只,死亡 2 000 多只,曾用过卡那霉素、阿莫西林、恩诺沙星等药物进行治疗。

1.2.2 观察临床症状和剖检变化

病鸡表现为离群呆立、羽毛松乱、食欲减退,部分鸡排黄白色稀便。剖检主要表现为心包积液,心包膜混浊、增厚、不透明,严重的有纤维素渗出;肝脏有不同程度的肿胀,表面有不同程度的纤维素性渗出物,甚至整个肝脏为一层纤维素性薄膜所包裹;腹腔有不同程度的腹水,混有纤维素性渗出物。

1.2.3 实验室检查

采病料:无菌采取肝脏、腹水和心脏血液接种于普通琼脂斜面和麦康凯培养基中。

染色镜检:病料涂片,革兰氏染色,然后镜检。

生化试验:将分离的纯培养物移植到三糖铁琼脂上及生化培养基中培养。

致病性试验:将经过鉴定的大肠杆菌,用其 18 h 的肉汤培养物 0.4 ml 口服感染 5 日龄雏鸡,测定其致病力。

1.2.4 诊断

根据发病情况,结合主要表现、剖检变化,初步诊断为鸡大肠杆菌病,再经过实验室检查确诊该病为鸡大肠杆菌病。

1.2.5 治疗

1.2.5.1 分组

初步确诊后将病鸡分为 4 组:感染对照组、TMP 与氟苯尼考配伍应用组、氟苯尼考组、恩诺沙星组(见表 1)。健康鸡用氟苯尼考与 TMP 配伍应用预防。

表1 试鸡分组情况

组别	数量(只)	体重(g)	给药浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)
感染对照组	200	442.1 $\pm$ 68.45	0
TMP 与氟苯尼考配伍应用组	200	423.2 $\pm$ 66.6	50
氟苯尼考组	200	397.1 $\pm$ 74.3	100
恩诺沙星组	200	445.7 $\pm$ 65.5	100

注:体重为平均值 $\pm$ 标准差。

王春华,辽宁医学院畜牧兽医学院,121001,锦州。

袁建伟,辽宁禾丰牧业股份有限公司。

韩喜彬,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-11

对各组鸡进行饮水给药治疗, 各组鸡每天早、晚各饮水一次, 连续给药 5 d, 每次用药前观察临床症状, 并对死鸡进行剖检, 观察肝脏和腹腔病变情况, 以确定死因, 观察期为第一次用药后的第 15 d。

1.2.5.2 疗效评价标准

① 死亡率: 试验期间凡出现鸡大肠杆菌病典型症状死亡的, 以及尸体剖检肝脏和腹腔有典型病变特征死亡的均为鸡大肠杆菌病死亡, 根据死亡数计算死亡率。

② 治愈率: 凡在试验期间, 鸡用药后精神状态、食欲、粪便恢复正常, 不再出现腹泻等临床症状者, 均属治愈, 根据治愈鸡只数占整个试验组的比率计算治愈率。

③ 有效率: 用药后, 试验鸡只的精神、食欲、腹泻有明显好转, 体重较用药前增加者, 判断为有效。据此计算有效率。

④ 增重: 根据给药前及试验结束时的鸡只体重, 计算每只鸡的增重, 然后算出每组试验鸡的平均增重和标准差。

2 结果

2.1 临床上大肠杆菌病的鉴定结果

2.1.1 革兰氏染色

病料革兰氏染色发现红色阴性的短小杆菌。分离培养在 37℃ 恒温箱中, 在琼脂培养基上长出中等大小、半透明、露珠样菌落, 在麦康凯培养基上菌落呈红色。

2.1.2 生化试验

用此菌分解乳糖和葡萄糖, 产酸、产气; 不分解蔗糖, 不产生硫化氢, V-P 试验阴性, 利用枸橼酸盐阴性, 不液化明胶。

2.1.3 致病性试验

经口服感染 5 日龄雏鸡引起急性败血症死亡。

通过实验室检查(包括病料采集、培养、染色镜检、生化试验、致病性试验及临床诊断), 我们确认鸡只感染了大肠杆菌病。

2.2 治疗结果(见表 2)

表 2 临床疗效试验结果

组别	死亡率 (%)	治愈率 (%)	有效率 (%)	15 d 增重 (g)
感染对照组	33.33	-	-	55.2±60.2
TMP 与氟苯尼考配伍应用组	1.11	94.44	98.89	198.4±56.4
氟苯尼考组	5.56	88.89	94.44	168.2±65.7
恩诺沙星组	13.33	77.78	86.67	154.6±62.4

TMP 与氟苯尼考配伍应用组的死亡率最低, 其与氟苯尼考组和恩诺沙星组相比差异显著, 治愈率、有效率最高, 15 d 增重最多。

3 讨论

目前临床上鸡的肠道性疾病大多数是由细菌感染引起的, 如大肠杆菌病、沙门氏菌病、巴氏杆菌病等; 还有一部分是由病毒感染引起的, 如鸡新城疫、禽流感、鸡传染性法氏囊炎等。所以在防治鸡肠道性疾病时, 应根据其临床症状、剖检变化、染色镜检、生化试验、致病性试验等准确地作出诊断, 确定病原后, 再采取相应措施对其进行有效控制。针对细菌性的肠道性疾病一般常采用疫苗预防和药物治疗等措施进行控制。但在实际临床上由于缺乏科学的用药指导, 用药比较混乱导致细菌的耐药性增强, 特别是鸡的大肠杆菌病在集约化的养鸡场都不同程度的存在, 并且常和其它疾病混合感染, 对常见的抗生素普遍存在耐药性, 使得可供选择的治疗鸡大肠杆菌病药物越来越少, 给养禽业造成的损失日益严重。本研究对鸡大肠杆菌病临床治疗提供试验依据, 避免盲目用药, 在实验的基础上, 对 TMP 与氟苯尼考配伍应用在临床上的治疗效果作了进一步研究。首先通过临床症状、病理变化以及病原分离培养等方法, 证实了鸡感染了大肠杆菌病。然后把该鸡场发病鸡分成 3 组, 分别用 TMP 与氟苯尼考配伍应用、氟苯尼考、恩诺沙星进行对比治疗。结果表明, TMP 与氟苯尼考配伍应用对鸡大肠杆菌病的疗效显著, 无论从治愈率、有效率、增重率上均优于氟苯尼考组、恩诺沙星组。研究表明, TMP 与氟苯尼考配伍可作为此发病鸡的首选药物。

4 小结

用 TMP 与氟苯尼考配伍, 配伍比例分别为 1:5, 药物浓度为 50 μg/ml, 即每毫升的药液浓度含 TMP 8 μg、氟苯尼考 42 μg; TMP 与氟苯尼考配伍应用混饮适合浓度为 50 mg/l。能显著提高氟苯尼考抑制鸡大肠杆菌病的效果; 对于自然感染鸡大肠杆菌病的治疗, 氟苯尼考与 TMP 配伍应用的治疗效果优于氟苯尼考组以及恩诺沙星组。

(编辑: 高 雁, snowyan78@tom.com)

菜籽饼粕中硫代葡萄糖苷的危害与脱毒措施研究

臧海军 张克英

硫代葡萄糖苷(Glucosinolates, Gls)是十字花科植物中重要的次生代谢产物,在菜籽饼粕(RSM)中含量很高。其主要代谢产物为硫氰酸盐(SCN)、异硫氰酸盐(ITC)、腈和 5-乙烯基-2-硫代噁唑烷酮(5-VOT)。除了总硫代葡萄糖苷(T-Gls)外,SCN、腈和 5-VOT 的含量也是评定 RSM 品质的重要指标。由于菜饼粕中硫代葡萄糖苷含量很高,不仅降低了饲料的适口性,而且摄入过多容易引起动物中毒,从而影响动物健康,器官组织形态发生改变,生产性能下降。

1 硫代葡萄糖苷在植物中的分布

在天然植物中已发现 120 多种不同的硫代葡萄糖苷,它们存在于 11 个不同种属的双子叶被子植物中,最重要的是十字花科,所有的十字花科植物都能够合成硫代葡萄糖苷。硫代葡萄糖苷存在于这些植物的根、茎、叶和种子中,但主要存在于种子中。硫代葡萄糖苷在一些十字花科植物中的含量大约占干重的 1%,在一些植物种子中的含量达到 10%。硫代葡萄糖苷在植物中的含量变化很大,不同品种、不同生长环境以及同一植株的不同生长阶段、同一植株的不同部位含量都存在差别(Farnham 等,2000)。

2 硫代葡萄糖苷的结构及组成

硫代葡萄糖苷是一种含硫的阴离子亲水性植物次生代谢产物。1970 年,Marsh 和 Waser 等对硫代葡萄糖苷晶体的 x 射线分析证明,所有的硫代葡萄糖苷都具有相同的基本结构(见图 1),其共同的核心结构是 β -D-葡萄糖连接一个磺酸盐醛基基团和一个来源于氨基酸的侧链。根据侧链 R 的氨基酸来源不同,可以将硫代葡萄糖苷分为脂肪族硫代葡萄糖苷(侧链来源于蛋氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)、芳香族硫代葡萄糖苷(侧链来源于酪氨酸和苯丙氨酸)及吲哚族硫代葡萄糖苷(侧链来源于色氨酸)。

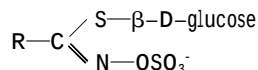


图 1 硫代葡萄糖苷的分子结构

3 硫代葡萄糖苷的降解

硫代葡萄糖苷在植物中不是单一存在的,它是以硫代葡萄糖苷-葡萄糖硫苷酶(GLs-Myrosinase)体系形式存在的。在完整的植物中,葡萄糖硫苷酶存在于特定的蛋白体中,硫代葡萄糖苷存在于液泡中,两者是分离的,但当植物细胞组织被破坏的时候,如在刀切或咀嚼的过程中,葡萄糖硫苷酶被释放出来,并将硫代葡萄糖苷水解。硫代葡萄糖苷的最初酶解产物是不稳定的糖苷配基和等摩尔的 D-葡萄糖及 KHSO_4 。根据侧链的不同,这些物质随后重新排列生成异硫氰酸盐、硫氰酸盐和羟基腈等化合物(Mithen 等,2000; Finiguerra 等,2001)。这些特殊降解产物的形成原因是很复杂的,如侧链不同、pH 值大小、金属离子和蛋白质的存在等都是决定其产物的重要因素。葡萄糖硫苷酶在人和动物体肠道中也可以由肠道微生物合成(Bernardi 等,2003; Cheng 等,2004)。

硫代葡萄糖苷在无酶(如加温、加压)的条件下也会发生降解,其降解过程十分复杂,主要产物是腈类化合物和异硫氰酸盐,反应产物和反应速度与外界条件有关。温度高,硫代葡萄糖苷降解反应速度快,生成腈的量;与体系的含水量有关,体系的含水量低,要在较高温度下发生反应,且降解反应速度较慢;碱性化学试剂(如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氨水等)和过渡金属离子都可催化硫代葡萄糖苷的降解反应,反应速度随碱性试剂浓度的增大而加快;加压也能使硫代葡萄糖苷的反应速度加快。

4 日粮中硫代葡萄糖苷对动物的危害作用

硫代葡萄糖苷的毒害作用不是由其自身引起的,而是由无毒的硫代葡萄糖苷被畜禽采食后经饲料中芥子酶或胃肠道细菌酶催化作用,降解生成异硫氰酸盐、噁唑烷酮、腈和硫氰酸盐等有害物质。噁唑烷酮阻碍单胃动物甲状腺素的合成,引起血液中甲状腺素浓

臧海军,四川农业大学动物营养研究所,625014,四川雅安。

张克英,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-22

度下降,促进垂体分泌更多的促甲状腺激素,使甲状腺细胞增生,最终导致甲状腺肿大(Wallig等,2002);硫氰酸盐抑制碘转换,造成甲状腺肿大;异硫氰酸盐产生的苦味严重影响菜籽饼粕的适口性(Mithen等,2000),并导致猪下痢,对动物皮肤、粘膜和消化器官表面具有破坏作用,同时也有致甲状腺肿大效应;腓主要对动物健康有影响,其毒性大约为噻唑烷酮的8倍,造成动物肝脏和肾脏肿大,严重时可引起肝出血和肝坏死(Burel等,2000b; Tanii等,2004)。日粮中硫代葡萄糖苷对动物生产性能的负面影响也与其引起的内分泌紊乱有关(Ahlin等,1994)。

日粮中硫代葡萄糖苷对动物毒害作用的程度取决于硫代葡萄糖苷及其降解产物的含量和组成,不同的动物种类对硫代葡萄糖苷的耐受能力也不同(Tanii等,2004)。反刍动物对日粮中的硫代葡萄糖苷的反应不太敏感;与兔、禽和鱼相比,猪对日粮中的硫代葡萄糖苷的反应要敏感的多。猪、兔、禽、鱼及反刍动物对日粮中硫代葡萄糖苷的耐受水平分别为0.78、7.0、5.4、3.6和1.5~4.22 $\mu\text{mol/g}$ 。

5 硫代葡萄糖苷的脱毒

5.1 微波、微粉碎和挤压

菜籽饼粕(湿度1.3%、24 h、4 $^{\circ}\text{C}$)在2 450 MHz的条件下微波辐射2.5 min可以灭活黑芥子酶,降低硫代葡萄糖苷含量。对于不同的菜籽饼粕,微波处理使硫代葡萄糖苷降低范围为70~254 $\mu\text{mol/mmol}$ (Aumaitre等,1989)。随着湿度的增加和微波热处理时间的延长,硫代葡萄糖苷的含量降低程度越大。给小鼠饲喂微波处理过的菜籽饼粕尽管能改善采食和营养价值,但产生的生长抑制作用仍然存在(Maheshwari等,1980)。

在195 $^{\circ}\text{C}$ 时对菜籽饼粕进行90 s的微粉碎是一种降低硫代葡萄糖苷含量的有效方法。微粉碎可以去除370 $\mu\text{mol/mmol}$ TGIs和所有的异硫氰酸盐,只有极少量的硫代噻唑烷酮残留。生长猪日粮添加微粉碎的菜籽饼粕能改善营养物质消化率(Fenwick等,1986)。

在对硫代葡萄糖苷脱毒上,对菜籽饼粕进行挤压处理比微波处理更为有效。菜籽饼粕干法挤压可以把总硫代葡萄糖苷含量降低到193~428 $\mu\text{mol/mmol}$ (Aumaitre等,1989)。对硫代葡萄糖苷含量高的菜籽饼粕进行湿法挤压处理(150 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min、2%氨气)能够使总硫代葡萄糖苷大量减少(670 $\mu\text{mol/mmol}$)(Huang等,1995)。日粮中添加挤压处理过的菜籽饼粕能提高干物质摄入量、肝脏重量和蛋白质生物学价值。

5.2 金属盐溶剂处理

在多种处理方法中(硫酸铜、硫酸亚铁、硫酸锌溶液),只有硫酸铜溶液处理法较为有效,能够使菜籽饼粕中的ITC和OT灭活。硫酸铜溶液处理菜籽饼粕(每千克的菜籽饼粕浸泡于2 L硫酸铜溶液,即6.25 g五水硫酸铜溶解于2 L的水中,60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下)能够有效降低900 $\mu\text{mol/mmol}$ 总硫代葡萄糖苷(Das和Singhal,2005)。肉鸡和猪日粮中添加硫酸铜溶液处理过的菜籽饼粕(80和160 g/kg),能够改善鸡和猪生长性能、甲状腺功能、碘利用率、血清锌溶液含量和碱性磷酸酶活性,也有关于用五水硫酸铜处理菜籽饼粕降低ITC和OT含量的报道,但硫酸溶液铜处理是如何去除菜籽饼粕中硫代葡萄糖苷及ITC、OT成分还有争议,有研究推测,可能硫酸铜溶液处理法将发生的硫代葡萄糖苷降解反应或代谢产物的重排转换成异硫氰酸盐或腓产物,这两种物质是具有挥发性的;另一种可能就是转换成胺产物,如丙烯胺和硫脲的重排反应(Rouzaud等,2003)。也有研究表明,硫酸铜溶液可以与硫代葡萄糖苷或其降解产物(异硫氰酸盐和噻唑烷酮)分别螯合成无毒产物。

5.3 固态发酵法

用Rhizopus oligosporus和Aspergillus sp在固态发酵条件下($m_{\text{菜籽饼粕}}:v_{\text{水}}=1:3$,25 $^{\circ}\text{C}$ 、有氧条件、10 d),对菜籽饼粕进行发酵(21 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌、103 kPa、15 min),能够灭活黑芥子酶,降低总硫代葡萄糖苷含量431 $\mu\text{mol/mmol}$ 和噻唑烷酮340 mg/g(Vig和Walia,2001)。在30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,对菜籽饼粕进行发酵60~96 h,使硫代葡萄糖苷全部降解(Rakariyatham和Sakorn,2002)。发酵时间越长,硫代葡萄糖苷的降解率越高,在发酵期间硫代葡萄糖苷及其降解产物的减少主要是由于微生物酶的作用,使这些化合物中的葡萄糖和硫利用增强。在这样的湿度和温度条件下,硫代葡萄糖苷也可以发生自身分解,挥发性的代谢产物会蒸发掉。

5.4 热处理

热处理能够降低菜籽饼粕中硫代葡萄糖苷的含量,且湿法热处理要比干法热处理效果好(Leming等,2004)。根据菜籽饼粕的情况,加热时间和温度不同,可以降低总硫代葡萄糖苷630~950 $\mu\text{mol/mmol}$ (Burel等,2000a)。给奶牛饲喂热处理过的硫代葡萄糖苷含量高的菜籽饼粕能够提高其产奶率、蛋白质转化率和日粮氮利用率(Shingfield等,2003),提高肉牛的生产性能(Tripathi等,2001b)。对单胃动物而言,菜籽饼粕高温处理(高于110 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min)会使蛋白质品质下降

(Newkirk 等,2003;Glencross 等,2004)。然而,这可以提供更多的非降解瘤胃蛋白,对反刍动物是有利的。对于单胃动物,菜籽饼粕的热处理要控制在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 30 min (Jensen 等,1995),这样的条件下总硫代葡萄糖苷可以降低 $500\text{ }\mu\text{mol}/\text{mmol}$,且保持较好的蛋白质质量。不同的硫代葡萄糖苷对热的感受能力不同,所以热处理后硫代葡萄糖苷的降低程度也不同。4-羟基-芸苔葡萄糖硫苷对热的敏感程度要比脂肪族的硫代葡萄糖苷高(Jensen 等,1995;Leming 等,2004)。异硫氰酸盐、硫氰酸盐是具有挥发性的物质;噻唑烷酮具有水溶性,在游离状态下没有活性,但通过酶的作用会产生有活性的噻唑烷酮而引起毒害作用,加热能破坏这种酶,因此高温可大大降低其致甲状腺肿大的有害作用;腈类化合物——CHB,包括环硫化物,含环硫结构的腈类不太稳定,容易聚合生成毒性较小的化合物。

5.5 水处理

硫代葡萄糖苷及其降解产物均易溶于水(有研究表明,水煮 10 min ,甘蓝中葡萄糖苷的含量可以降低 $30\%\sim 50\%$)。将去油的菜籽饼粕用水处理 $0\sim 12\text{ h}$ 后($m_{\text{菜籽饼粕}}:v_{\text{水}}=1:5$),硫代葡萄糖苷的降解($360\sim 900\text{ }\mu\text{mol}/\text{mmol}$)能力呈线性升高,这取决于硫代葡萄糖苷的含量和组成(Das 和 Tyagi 等,2001),水处理 $6\sim 8\text{ h}$ 后,硫代葡萄糖苷减少量最大。用水处理后,硫代葡萄糖苷的降解能力要比黑芥子苷和戊烯基硫代葡萄糖苷高(Tyagi, 2002)。肥育羔羊饲料水处理($v_{\text{水}}:m_{\text{饼粕}}=5:1,8\text{ h}$)过的菜籽饼粕,能够减轻硫代葡萄糖苷及其代谢产物的抗营养效应,从而改善养分利用率和生产性能(Tripathi 等,1999)。水处理是去除菜籽饼粕中硫代葡萄糖苷的一种经济有效的方法,蛋白质利用率可提高到与动物蛋白相媲美的程度(由 40% 提高到 69%),可消化程度的提高在小鼠的生长上得到明显反应(Tripathi 等, 2000),但该方法干物质损失严重,耗能较高。

5.6 补充给药法

在低硫代葡萄糖苷日粮中补充添加碘、碘化酪蛋白或碘酸钙对动物生产性能没有任何影响。日粮中($\text{GIs}<5\text{ }\mu\text{mol}/\text{g}$)单独添加铜 $20\sim 200\text{ mg}/\text{kg}$ 能够改善猪的回肠氨基酸消化率(Rowan 等,1991)。碘和铜联用有一定的协同效应,表现出更好的效果。生长猪(菜籽饼粕日粮型)日粮中添加 $1\text{ mg}/\text{kg}$ 碘和 $250\text{ mg}/\text{kg}$ 铜能够维持其采食量、体增重,使甲状腺和肝脏重量正常, T_3 和 T_4 水平升高,与豆粕日粮的饲养效果相当。经过硫酸铜处理后,在肥育猪(菜籽饼粕日粮型)日粮中补充添加碘 $0.125\text{ mg}/\text{kg}$ (Schone 等,1988)和肉鸡(菜籽饼粕

日粮型)日粮添加碘 $0.5\text{ mg}/\text{kg}$ (Schone 等,1993),硫代葡萄糖苷对生产性能和甲状腺激素的不良影响可消除。如果猪日粮中总硫代葡萄糖苷的含量每克干物质达到 $2\text{ }\mu\text{mol}$,补充添加 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ 的碘足以消除由硫代葡萄糖苷所引起的碘缺乏症状(Schone 等,2001)。犊牛日粮配有菜籽饼粕时,补充添加硫酸铜和碘化钾($500\text{ mg}/\text{kg}$)可改善其生长性能、甲状腺激素水平和血清碱性磷酸酶活性(Tripathi 等,2001a)。同样,在山羊日粮中添加碘 $0.075\text{ mg}/\text{d}$ (Pattanaik 等,2001)、公羊日粮中添加碘 $0.1\text{ mg}/\text{d}$ (Pattanaik 等,2004),可改善循环系统中甲状腺素的水平、生长速度、精液品质和精液中睾丸酮激素的水平。在猪日粮中添加 $10^6\text{ cfu}/\text{ml}$ 嗜酸性乳酸杆菌不会显著影响硫代葡萄糖苷的降解。然而,在补充添加硫酸铜会增强硫代葡萄糖苷的降解能力(Rowan 等,1991)。碘和铜联用可以改善动物的生产性能,因为铜是一种生长促进剂(Henning,1982),而碘是甲状腺素的组成部分,铜也可以延缓碘缺乏症的出现,碘可以减轻甲状腺的肥大和增生(Ludke 和 Schone,1988)。日粮单独添加铜可以改善菜籽饼粕的营养价值,添加硫酸铜可以改变硫代葡萄糖苷的降解产物,可能会有助于其吸收,也可能通过重排反应产生次级分解产物。

6 结语

饲喂菜籽饼粕可以增加动物外周脂肪含量和胴体及奶中不饱和脂肪酸($\text{C}22:2$ 和 $\text{transC}18:1$)的含量,然而菜籽饼粕中的硫代葡萄糖苷不仅具有抗营养作用,影响动物生产性能,而且其代谢产物在动物产品的残留,影响畜产品的品质。菜籽饼粕中硫代葡萄糖苷的含量和组成因其生长环境不同而变异较大,在饲料中添加菜籽饼粕要考虑总硫代葡萄糖苷的含量,对菜籽饼粕中硫代葡萄糖苷代谢产物的预测,有助于人们对其品质和对动物可能产生的影响有更深的认识。为了消除或缓解硫代葡萄糖苷的危害作用,使其对动物健康和生产的不良影响降到最低,在众多的脱毒处理方法中,水浸提法、加热和硫酸铜溶液处理效果较好,这方面还需作进一步的研究。综上所述,如果能采用一种有效的硫代葡萄糖苷脱毒工艺,菜籽饼粕在动物饲料中应用的前景必将很广阔。

(参考文献 44 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:王 芳,xfang2005@163.com)