

中国期刊方阵双效期刊

北方优秀期刊

辽宁省一级期刊

《中国畜牧学杂志》综合评价数据排名来源期刊
《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4期

(总第289期)

(1980年创刊)

主办单位:

辽宁省农业机械研究所

编辑出版:饲料工业出版社

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:葛春智

副总编辑:沈桂宇 陈广鹏

责任编辑:高 雁

广告合作代理:沈阳同兴广告有限责任公司

总经理:林 勇

副总经理:荣立南 王晓楠

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)第42号

开户行:中信银行沈阳分行皇姑支行

帐号:72214101826000548-49

每份定价: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)

目次

饲料添加剂

■1 饲料抗生物素在富禽体内残留及消除规律研究进展

..... 周桂莲 蒋崇勇 林映才

■9 多酶对河蟹免疫功能的影响

..... 马贵华 陈道印 刘六英等

■12 中草药多糖对断奶仔猪肠道微生物菌落的影响

..... 刘 惠 李丽立 张 彬等

■15 天然风味剂在水产动物饲料中的应用

..... 王渊源 蔺子敏

酶制剂

■17 诱变选育高产木聚糖酶 Nystatin 抗性菌株的研究

..... 吴小刚 徐 燕 曾 莹

■20 植酸酶在饲料中的应用研究进展

..... 代发文 周响艳 李富伟

■23 酶制剂在家禽麦类饲料中的应用

..... 刘莉君 程茂基

水产养殖

■25 肉毒碱和果寡糖对鲢鱼幼鱼消化率影响的研究

..... 蔡立胜 吴天星 潘晓东等

■27 乌电配合饲料中最适运动植物蛋白比的研究

..... 潘凤莲 周贵谭 吴遵霖

■29 几种饲料对斜带石斑鱼种生长和摄食量的影响

..... 王广军 谢 骏 余德光等

试验研究

■31 微生物制剂培养技术——正交法研究光合细菌的混合培养

..... 曹希亮 倪学勤 曾 东等

■34 植物乳杆菌发酵生产共轭亚油酸

■37 耐高温酵母菌对啤酒糖发酵效果的影响

..... 郭 辉 李丽莉 黄兴国

营养研究

■40 腺苷一磷酸激活蛋白激酶与采食量调节

..... 郑 萍 陈代文 张克英

■43 鱼类磷脂营养研究进展

..... 张 辉 牟振波 单安山

疫病防治

■47 猪繁殖与呼吸综合征疫苗研究进展

..... 何丽华 陈浩杰 李晟阳等

■50 牛梨形虫病的诊治

..... 王 坤 毕聪明 李冬梅

动物免疫

■51 共轭亚油酸的免疫应激调控作用

..... 赵金伟 周安国 王之盛

池塘管理

■53 包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物在中华鳖

外塘养殖上的应用

..... 姚志通 夏枚生 胡彩虹

问题探讨

■57 水产饲料中大豆蛋白替代鱼粉的应用研究

..... 曹 玲 王卫民 杨承泰

专题论述

■62 乳酸菌的耐酸性机制

..... 张祖国 田 雷

信息采编

■22 越南市场发现“苏丹红”禽蛋

企业标识展示



通仁集团
(028)85118888



江苏康平
(0514)7848811



江苏正昌
(0519)7349988



江苏北方
(0412)343018
(0418)8080922



布勒(常州)
(0519)7966666



江苏友力
(0519)8309988



康康建兴
(0571)86433111



上海福福
(021)57687881



上海福福
(021)57687881



新泰兴机械
(0538)7427566



广东中山世宝
(0760)3113061



立达尔
(020)87050309



东莞立达尔
(0769)22892600



广州海大
(020)84661699



红星机械
(0794)4382462

饲用抗生素在畜禽体内残留及消除规律研究进展

周桂莲 蒋宗勇 林映才

抗生素原称抗菌素,由微生物产生的在低浓度下具有抑制或杀死其它微生物的化学物质。按其用途和用法,可将抗生素分为 3 类:饲用抗生素(Feed Antibiotics)、非处方药(Over The Counter Drugs)和处方药(Verterinary Prescription Drugs)(Barton,2000)。饲用抗生素主要包括以促进动物生长、预防和治疗疾病为目的,添加到健康动物饲料中的抗生素(Prescott,1997)。1950 年美国 FDA 正式批准允许在饲料中添加抗生素,时至今日,饲用抗生素的应用已有 50 多年的历史,其对畜牧业,尤其对集约化畜牧业的发展发挥了至关重要的作用。

但是,随着人们生活质量和对动物性食品安全卫生要求的提高,以及对抗生素研究的不断深入,饲用抗生素作为饲料添加剂应用于食品动物生产受到了广泛质疑,主要表现在:①在食用动物组织中的残留;②病原菌抗药性对人类健康潜在的威胁(Elder 等,1993;Kunesh 等,1994;Phillips,1994)。对饲用抗生素在畜禽体内的残留和消除规律的研究是准确确定其休药期的基础,而严格执行休药期是确保饲用抗生素在动物性食品中无(或低)残留的前提。本文主要针对饲用抗生素在畜禽体内的残留及其消除规律进行研究。

1 抗球虫类饲用抗生素

抗球虫类饲用抗生素主要包括莫能菌素、盐霉素、拉沙洛西、甲基盐霉素和马杜霉素等,按其化学成分,也可将它们归为聚醚类离子载体型抗生素。其主要用于防治禽类球虫病,有些也可用于促进畜禽生长。

1.1 莫能菌素(Monensin)

莫能菌素在畜禽体内的残留和消除规律的研究,国内尚未见研究报道,国外相关研究也不多见。Crooks

等(1997)在 6 周龄肉仔鸡上的研究表明,以 120 mg/kg 剂量将莫能菌素加入配合饲料中饲喂试鸡 14 d,停药当天屠宰取样,测得肝脏中莫能菌素平均含量为 120 ng/g,但经 3 d 休药期后,肝脏中莫能菌素含量迅速下降至低于检出限(2.91 ng/g)。可见,莫能菌素可以被肉仔鸡吸收,并在肝脏中蓄积,但停药后能很快消除。

1.2 盐霉素(Salinomycin)

Atef 等(1993)通过强饲法给肉仔鸡每千克体重灌服盐霉素 20 mg,试验发现,肉仔鸡对盐霉素的吸收率较高;同时,以含盐霉素 60 mg/kg 的饲料饲喂肉仔鸡 2 周发现,试鸡体组织中盐霉素含量显著低于通过强饲一次性获得盐霉素的试鸡,说明作为饲料添加剂,在一定时间内低浓度饲喂盐霉素,其安全性高于作为治疗用药的浓度。Atef 等(1993)在试验中测定了停药后不同时间点肉仔鸡组织中盐霉素的残留量,结果表明,盐霉素残留量以肝脏中最高,之后依次为肾脏、肌肉、心脏和皮肤;停药 48 h,只有肝脏中检出盐霉素残留;而停药 72 h,则所有组织均未检出盐霉素残留。Kennedy 等(1995b)向肉仔鸡饲料中全期添加盐霉素 60 mg/kg,结果发现,在没有休药期时,仅在试鸡肝脏和肌肉中检出盐霉素,但浓度较低;在 2 d 休药期后,肝脏和肌肉中盐霉素残留量已低于检出限(0.2 ng/kg)。Akhtar 等(1996a,b)在蛋鸡上的研究表明,富含脂肪的组织(如蛋黄、皮下脂肪)盐霉素残留量最高,其次为肝脏、肾脏和胸肌、腿肌;通过梯度试验证明,蛋鸡组织中盐霉素的残留量与饲料中盐霉素添加量呈强正相关,且在 3 d 休药期内,组织中残留量迅速下降。也有研究者以猪为受试动物进行了研究,日粮中盐霉素的添加量为 41 mg/kg,试验期 29 d,结果显示,除猪肝脏中检出盐霉素残留外(1.8 ng/g),肾脏、脂肪和肌肉中均未检出盐霉素。可见,尽管盐霉素可以被畜禽吸收,并在组织中蓄积,但其在机体内代谢速率很快,经过一定的休药期(大于 3 d),其在组织中的残留量可降至检出限以下。

但是,Cabadaj 等(2002)在其研究中,以不同盐霉素添加量(60、90、180 mg/kg)的饲料饲喂肉仔鸡 42 d,分别在试验结束后(停药)的第 0、2、3、4、5、6、7 d 屠宰取样,分别测定了胸肌、腿肌、肝脏、肌胃和心脏中盐霉素的残留量,结果表明,在停药第 4~6 d 的样品中

周桂莲,广东省农业科学院畜牧研究所、广东省动物育种与营养公共实验室,510640,广州。

蒋宗勇、林映才,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-22

★ “十五”国家重大科技专项“食品安全关键技术”课题“猪肉食品安全关键技术应用综合示范区”(2001BA804A31)和广东省重大科技攻关重大专项“畜产品安全生产技术体系研究与示范”(2003A20503)

均检出盐霉素残留,且残留量与盐霉素添加量相关。该试验结果表明,在实际生产中,应控制盐霉素的添加剂量和添加时间,以确保动物性食品的安全性。

1.3 马杜霉素(Maduramicin)

Brown 等(1986)研究表明,动物食入体内的马杜霉素主要通过粪便排泄。限于动物组织中马杜霉素检测方法的灵敏度问题(Kennedy 等,1997),关于马杜霉素在畜禽体内残留和消除规律的研究,直至1997年才见报道。Kennedy 等(1997)研究认为,蓄积在肉仔鸡体内的马杜霉素可以迅速消除。以含马杜霉素5 mg/kg的饲料饲喂28日龄肉仔鸡14 d,停药后,连续7 d屠宰取样,结果表明,停药当天,肝脏中马杜霉素浓度最高(160 ng/g),消除半衰期为20 h,其次为胸肉,消除半衰期为39 h;停药5 d,肝脏和胸肉中仍有马杜霉素残留检出,分别为1.6 ng/g和1.5 ng/g;停药7 d,两组织中残留量低于检出限(1.0 ng/g)。沈建忠(2000)研究了马杜霉素在肉仔鸡组织的残留消除规律,试验共设5个组,分别饲喂添加0、3.0、5.0、7.0、9.0 mg/kg马杜霉素的试验饲料,试验期42 d。于停药当天(0 d)及以后连续7 d屠宰取样,测定结果表明,7.0和9.0 mg/kg添加组的试鸡表现出明显的中毒症状,试鸡脂肪和肝脏中马杜霉素的残留量最高;其次是肾脏,胸肉中残留量最少,而且随着添加剂量的增大,马杜霉素在试鸡各组织中的残留量也相应增加。有研究认为,马杜霉素在组织中的消除速度很快,停药2~3 d,试鸡组织中马杜霉素的残留量已经低于我国对马杜霉素在鸡组织中的最高残留限量规定的要求。以上研究表明,在实际生产中应用马杜霉素时,应特别注意正确的使用剂量和混合均匀度,否则,不仅可能造成产品中残留量超标,而且可能造成严重的经济损失。

1.4 其它抗球虫类

1.4.1 拉沙洛西(Lasalocid)

Kennedy 等(1995a)研究了拉沙洛西在肉仔鸡体内的残留和消除规律,拉沙洛西在肉仔鸡日粮中的添加量为90 mg/kg,试验期14 d,停药当天(0 d)及以后连续7 d屠宰取样测定,结果表明,拉沙洛西在肝脏中的消除半衰期为36 h,肌肉中为41 h;经5 d停药期后,肝脏中拉沙洛西残留量为40 ng/g;到停药7 d,肝脏中仍可检出拉沙洛西(10 ng/g)。可见,拉沙洛西在鸡体内消除速率低于马杜霉素(Kennedy 等,1997)。我国《饲料药物添加剂使用规范》中规定拉沙洛西的停药期为3 d,马杜霉素的为5 d,因此,上述研究结果对拉沙洛西的3 d停药期提出质疑。

1.4.2 甲基盐霉素(Narasin)

Sweeney 等(1996)用 ^{14}C 示踪法研究了甲基盐霉素在肉仔鸡组织中的残留及代谢规律,以添加甲基盐霉素50 mg/kg的饲料饲喂肉仔鸡5 d,试验结束当天屠宰取样,测得肝脏、腹脂、皮肤(带皮脂)、肾脏和胸肌中甲基盐霉素的残留量分别为320、120、80、40和<40 ng/g。可见,甲基盐霉素在肝脏等组织中的蓄积量高于马杜霉素(Kennedy 等,1997)。经过分离、定量和定性研究发现,在腹脂中甲基盐霉素主要以药物原型存在,而在肝脏和排泄物中,存在15种代谢物和药物原型(2,3-羟甲基盐霉素和2,3-羟甲基盐霉素B占50%)。但该项研究投药期短,未测定不同停药期肉仔鸡组织中甲基盐霉素的残留量,因此,为探明甲基盐霉素在畜禽体内的残留消除规律,有必要进一步深入研究,为其在实际生产中应用提供指导依据。

1.4.3 赛杜霉素(Semduramicin)

Lynch 等(1992)进行了赛杜霉素在肉仔鸡组织中残留消除规律的试验(日粮中赛杜霉素添加量25 mg/kg,试验期7 d),研究结果发现,赛杜霉素可在试鸡肝脏中蓄积,停药24 h后,肝脏中残留量迅速降至0.017 ng/g。可见,我国《饲料药物添加剂使用规范》中规定的塞杜霉素停药期为5 d,足以使鸡体内蓄积的塞杜霉素耗竭至要求范围内。

对于其它抗球虫类饲用抗生素(如海南霉素)尚未见有关研究报道。

2 驱虫保健类抗生素

迄今为止,仅见有关伊维菌素(Ivermectin)作为驱虫保健类抗生素在畜禽体内残留和消除规律的研究报道。伊维菌素主要用于防治猪的胃肠道线虫病和疥螨病。Chiu 等(1990)以每千克体重0.4 mg的剂量给猪皮下注射 ^3H 标记的伊维菌素,结果显示,脂肪和肝脏中伊维菌素的残留量最高,残留物质主要是药物原型,注射的伊维菌素主要通过粪便和胆汁排出体外。Slanina 等(1989)和Park 等(1999)也曾研究过经皮下注射给药后,伊维菌素在猪体内的残留和消除规律,得到与Chiu 等(1990)类似的结果。Slanina 等(1989)研究认为,伊维菌素经皮下注射给药的停药期应为21 d。Park 等(1999)则认为,皮下注射的伊维菌素在猪体组织的消除半衰期为3.0~3.5 d,且残留量与注射剂量和停药时间呈强正相关。未见有关伊维菌素经饲料投喂给猪后的残留和消除规律方面的研究报道。

3 抗菌促生长类抗生素

3.1 四环素类

土霉素 (Oxytetracycline, OTC) 和金霉素 (Chlortetracycline, CTC) 是目前我国批准使用的两种四环素类饲用抗生素。

3.1.1 土霉素

土霉素的吸收率是四环素类抗生素中最低的,原因主要在于其亲脂性(Lipophilicity)最差(FAO 和 WHO,

2002)。吸收进入体内的土霉素并不进一步代谢,而是以原型进行转运和发挥作用(Kelly 等,1960)。动物体内的土霉素主要分布于肝脏、肾脏、骨骼和牙齿;粪和尿是土霉素的主要排泄途径(WHO,1990)。

诸多研究者研究了土霉素在畜禽体内的残留和消除规律,FAO 和 WHO 曾将之归纳总结见表 1。

表 1 有关土霉素在畜禽体内残留和消除规律的研究^①

动物种类	添加量(mg/kg)	试验期(d)	检测组织	不同停药期的平均残留水平(μg/g)					
				0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
肉仔鸡	550	5	肝脏	0.93(6/6) ^②	NR ^③	NR	NM ^④	NM	NM
			肌肉	0.35(6/6)	NR	NR	NM	NM	NM
			肾脏	1.70(2/2)	0.28(2/2)	<0.16(1/2)	NM	NM	NM
			皮肤(带脂)	NR	NR	NR	NM	NM	NM
猪	550	21	肝脏	NM	<0.31(2/3)	NM	NR	NM	NM
			肌肉	NM	<0.25(1/3)	NM	NR	NM	NM
			肾脏	NM	0.89(3/3)	NM	<0.25(2/3)	NM	NM
			脂肪	NM	NR	NM	NR	NM	NM
蛋鸡	600	7	全蛋	0.24	0.21	0.14	0.11	NM	NM
			蛋黄	0.50	0.49	0.33	0.25	<0.20	NM
蛋鸡	300	7	全蛋	NM	0.12	0.10	NM	NM	NM
			蛋黄	NM	0.22	0.20	<0.20	NM	NM

注:①资料来自(FAO 和 WHO,2002);②括号中数字表示阳性样品数量/检测样品总数;③NR 表示检测结果为阴性,即检出量低于检出限;④NM 表示没有检测;⑤添加量以日粮计;⑥下表同。

由表 1 可见,土霉素在畜禽体内的残留量很低,且消除速度很快;肾脏和肝脏中土霉素的残留量最高,其次是肌肉,而脂肪中无土霉素残留。Villa 等(2001)用兔和 Capolongo 等(2002)用火鸡的研究同上述结论一致。表 1 中对蛋鸡的研究表明,向蛋鸡饲料中添加土霉素,可在蛋中检出土霉素残留,而且残留量及消除时间与添加量相关。Donoghue 等(1999)通过研究认为,向蛋鸡饲料中添加 50 或 200 mg/kg 土霉素(试验期 5 d),没有在蛋中检出土霉素残留,可见,添加量非常关键。尽管如此,我国《饲料药物添加剂使用规范》规定产蛋期蛋鸡禁用土霉素及其钙盐,以保证蛋品的安全。

Yoshimura 等(1991)通过比较强力霉素和土霉素在蛋鸡体内的残留和消除规律,指出亲脂性、消化道吸收率和组织渗透性是决定饲用抗生素残留量的主要因素。

3.1.2 金霉素

金霉素的消化道吸收率较土霉素高,二价阳离子(如 Ca²⁺、Mg²⁺)对金霉素的吸收有抑制作用(Wahlstrom 等,1982;Pollet 等,1984)。已有充分证据证明,吸收进入体内的金霉素以原型转运并发挥作用。但在测定动物组织金霉素的残留过程中,在提纯时常产生 4-差向异构体,因此,将金霉素和 4-差向异构体之和作为

残留标志物。金霉素的排泄途径与投药方式有关,经饲料摄入的金霉素主要通过粪便排泄(Eisner 等,1963)。诸多研究者研究了金霉素在畜禽体内的残留和消除规律见表 2。

由表 2 可见,对于肉仔鸡和猪,通过饲料摄入体内的金霉素,在肝脏和肾脏中的残留量最高,消除速度最慢;在脂肪中残留量最低,消除速度也最快。金霉素在饲料中的添加量和用药时间均影响其在畜禽体内的残留量和消除时间。表 2 中试验 6 研究所用试验猪平均体重为 33.6 kg,而试验 7 所用试验猪平均体重为 83.8 kg,月龄小、体重低的猪单位体重采食量较高,相应地,单位体重摄入体内的金霉素量也高,所以出现了表 2 所列结果,投药期短,残留量反而高。可见,年龄和体重也是影响残留量的因素之一。鸡蛋中金霉素的残留量的 70%在蛋黄中,30%在蛋白中。

Korsrud 等(1996)以 3 倍推荐剂量添加金霉素于肉猪饲料中,试验期 14 d,肝脏、肾脏、肌肉中金霉素的残留检测结果显示,停药当天,各组织中金霉素含量均低于加拿大规定的最高残留限量(肝脏、肾脏和肌肉中残留限量分别为 2、4、1 mg/kg),停药后 4 d,各组织中均没有检出金霉素残留。由此,Korsrud 等认为,金霉素的安全性很高。

表 2 有关金霉素在畜禽体内残留和消除规律的研究

序号	动物种类	添加量 (mg/kg)	试验期	检测组织	不同停药期的平均残留水平(μg/g)							
					0 d	3 d	4 d	5 d	7 d	8 d	9 d	10 d
1	肉仔鸡	220	0~3 周	肝脏	0.53	NM	NM	NR	NR	NM	NM	NM
				肾脏	2.01	NM	NM	0.21	0.09	NM	NM	NM
2	肉仔鸡	110	51 d	肌肉	0.27	NR	NR	NM	NM	NM	NM	NM
		随后		肝脏	0.79	NR	NR	NM	NM	NM	NM	NM
		550	5 d	肾脏	3.9	0.38	0.25	NM	NM	NM	NM	NM
				皮肤	NR	NR	NR	NM	NM	NM	NM	NM
3	肉仔鸡	220	7~8 周	脂肪	NR	NR	NR	NM	NM	NM	NM	NM
				肝脏	0.71	NR	NR	NM	NM	NM	NM	NM
4	肉仔鸡	300	7 d	肾脏	0.75	0.30	0.28	NM	NM	NM	NM	NM
				肝脏	0.99	NM	NM	NM	NR	NM	NM	NM
5	蛋鸡	600	7 d	肾脏	2.72	NM	NM	NM	0.211	0.144	NM	0.091
				蛋黄	0.48	0.37	0.30	0.23	0.11	0.08	0.06	<0.06
6	猪	110	31 d	全蛋	0.19	0.12	0.10	0.08	0.04	0.03	0.02	NR
				肝脏	0.85	0.09	NM	0.08	0.08	NM	NM	NM
7	猪	110	98 d	肾脏	1.01	0.15	NM	0.15	0.14	NM	NM	NM
				肝脏	0.35	NM	NM	NR	0.04	NM	NM	NR
8	猪	330	98 d	肾脏	0.39	NM	NM	0.06	0.1	NM	NM	0.04
				肝脏	0.71	NM	NM	0.11	0.13	NM	NM	0.07
9	猪	440	14 d	肾脏	0.83	NM	NM	0.16	0.14	NM	NM	0.09
				肌肉	0.75	0.14	NM	NM	NM	NM	NM	NM
				肝脏	1.88	0.53	NM	NM	NM	NM	NM	NM
				肾脏	>3.78	0.8	NM	NM	NM	NM	NM	NM
10	猪	165	7 d	脂肪	0.2	0.04	NM	NM	NM	NM	NM	NM
				肝脏	0.96	NM	NM	NM	NM	NM	NR	NR
11	猪	165	7 d	肾脏	1.38	NM	NM	NM	NM	NM	NR	NR
				肝脏	0.943	NM	NM	NM	NR	NR	NR	NR
12	猪	300	7 d	肾脏	1.38	NM	NM	NM	0.041	NR	0.031	NR
				肝脏	1.67	NM	NM	NM	NM	NM	0.044	NR
13	猪	300	7 d	肾脏	1.57	NM	NM	NM	NM	NM	0.051	NR
				肝脏	1.23	0.129	0.102	0.069	0.058	NR	0.036	NR
14	猪	400	7 d	肾脏	2.29	0.121	0.087	0.080	0.060	0.041	0.038	NR
				肝脏	1.32	0.111	0.083	0.067	0.034	NR	0.046	NR
				肾脏	2.69	0.148	0.107	0.069	0.047	0.047	0.048	0.035

3.2 多肽类

杆菌肽锌、粘杆菌素、恩拉霉素、维吉尼亚霉素、那西肽是目前我国允许作为畜禽饲料添加剂使用的多肽类抗生素。

3.2.1 杆菌肽锌

杆菌肽锌在动物肠道内几乎不被吸收,口服的杆菌肽锌绝大多数通过粪便排出体外 (Yoshida 等, 1976),因此,杆菌肽锌在畜禽体内的残留量很低。向猪饲料中添加 0.1%~0.2%的杆菌肽锌,饲喂 3 个月后,停药当天检测各组织中药物含量,都低于检出限(李美同,1991)。Yoshida 等 (1974) 向蛋鸡饲料中添加 480、12 000、24 000 mg/kg 杆菌肽锌,在蛋中没有检出杆菌肽锌残留。Furusawa(2001)的试验研究也得到了类似结果(杆菌肽锌添加量为 500 mg/kg)。

3.2.2 粘杆菌素

粘杆菌素几乎不被畜禽消化道吸收,因而其在畜

禽体内的残留量很低。日本旭化成工业株式会社对粘杆菌素的残留问题进行了系统研究,在肉鸡的 8 周试验期内,向饲料中添加 100 或 500 mg/kg 粘杆菌素,未在其肝脏、肾脏、肌肉等组织中检出粘杆菌素残留(检出限为 0.25 mg/kg);在猪的 12 周试验期内,向饲料中添加 400 mg/kg 粘杆菌素,未在其肝脏、肾脏、肌肉等组织中检出粘杆菌素残留(检出限为 0.28 mg/kg)。另有研究表明,向猪饲料中添加 40 mg/kg 粘杆菌素,停药当天,只在肝脏中检出残留,停药 1 d 后,肝脏中也未检出;但当添加量为 200 mg/kg 时,直到停药 3 d 后,肝脏中粘杆菌素才未被检出(检出限为 0.025 mg/kg,明治制药株式会社,1996)。

3.2.3 恩拉霉素

有研究者将恩拉霉素分别按每千克体重 100 mg 或 1 000 mg 剂量给兔和鸡强制性口服,给药后 24 h 内以一定时间间隔采血,测定血样中恩拉霉素含量,

检测结果显示,所有血样中均未检出恩拉霉素(检出限为 0.15 mg/kg),表明兔和鸡口服恩拉霉素极少被吸收。给大鼠口服一定剂量的恩拉霉素,在给药后 72 h 内收集粪便,测定恩拉霉素的总排出量,结果显示,有 83%~97%的恩拉霉素以有活性的形式从粪便中排出体外(卜仕金,2003)。由此表明饲用恩拉霉素在动物体内的残留量很低。

Lin 等(1998)以 5、10、20 mg/kg 的剂量将恩拉霉素添加于饲料中,投喂给肉鸭,试验期 10 周,于停药后 0、5、10 d 屠宰取样,测定肝脏、肾脏、胸肌中恩拉霉素含量,结果发现,在所有组织中均未检出恩拉霉素残留。谢明权等(1995)测定了饲喂含恩拉霉素 10 mg/kg 日粮 8 周的试验鸡,于停药后 0、1、2 d 采集的肝脏、肾脏、肌肉和脂肪样品检测恩拉霉素残留情况,结果在所有待检组织中,没有检出恩拉霉素残留(检出限为 0.025 mg/kg)。另外,用含恩拉霉素高达 100 mg/kg 的饲料分别连续饲喂肉鸡 9 周和猪 3 个月,停药后立即测定其组织残留,测定结果表明,在停药后 0~2 d 内,肉鸡或猪的任何组织中药物残留量均低于检出限(0.15 mg/kg,卜仕金,2003)。以上研究结果表明,饲用恩拉霉素在畜禽体内的残留量极低。

3.2.4 维吉尼亚霉素(Virginiamycin)和那西肽(Nosi-heptide)

维吉尼亚霉素主要作用在畜禽肠道中,但几乎不被肠道吸收,所以无组织残留问题发生(王振来等,1998)。迄今为止,未见有关维吉尼亚霉素在畜禽体内残留和消除规律的研究报道。

那西肽可以通过化学反应进行人工合成(Horii 等,2000)。研究表明,口服那西肽主要通过粪便排出体外,几乎不被畜禽消化道吸收(Clavde,1979),故不在畜禽体内残留。小林功(1988)报道,给鸡连续 8 周饲喂含那西肽 0~250 mg/kg 的饲料,给猪连续 90 d 饲喂含那西肽 200 mg/kg 的饲料,在给药期间和停药 0~7 d 屠宰,检测发现,肝脏、肌肉、脾脏和心脏等组织中那西肽的残留量均小于 0.025 mg/kg(检出限)。周佩(1995)将饲喂含那西肽 2.5 和 5 mg/kg 饲料的肉鸡在停药 16、48 以及 72 h 后屠宰,检测肌肉、肝脏、脾脏、肾脏、心脏等组织中那西肽的残留量发现,各组织残留量均低于 0.01 mg/kg。

3.3 氨基甙类

3.3.1 新霉素(Neomycin)

动物和人对新霉素的吸收率很低(3%~10%),吸收进入体内的新霉素大部分集中于肾脏。新霉素在体

内的代谢主要是在消化道内发生磷酸化、腺苷酸化或已酰化,被吸收的新霉素绝大部分以原型存在,故新霉素在动物体内的残留标志物为新霉素原型化合物。口服新霉素主要通过粪便排泄(>90%),被吸收的新霉素主要通过尿排泄(FAO,2000)。

一些研究者对新霉素在畜禽体内残留及消除规律进行了研究。Fagerberg 等(1993)报道,连续 14 d 通过饮水给猪服用每千克体重 22 mg 的新霉素,分别在停药后的 0、1、3、7 和 14 d 屠宰取 4 个样品,检测结果显示,在所有时间点,肌肉、脂肪和肝脏的检测结果均为阴性。在停药 0 d,肾脏中新霉素平均含量为 2.174 $\mu\text{g/g}$;停药 1、3 d 平均含量分别为 1.920 和 0.958 $\mu\text{g/g}$;停药 7 d,一个样品为阴性,2 个样品含量 < 0.5 $\mu\text{g/g}$,另一个样品含量为 0.991 $\mu\text{g/g}$;停药 14 d 时,除一个样品含量为 0.906 $\mu\text{g/g}$ 外,其余样品检测结果均为阴性。在另一对猪的试验中,连续 14 d 按每千克体重添加 18.5 mg 的新霉素,对停药后 0、5、8、10 和 14 d 的样品进行新霉素含量测定,结果发现,在肝脏、肌肉、心脏和脂肪中均未检出新霉素残留;在肾脏中,停药 0 d 的样品新霉素平均含量为 1.95 $\mu\text{g/g}$;停药 8 d 的样品含量降为 0.84 $\mu\text{g/g}$ (Barbiers 等,1984)。

Ibayashi 等(1994)以每天每千克体重 10 mg 或 30 mg 的新霉素剂量,通过饲料连续 7 d 饲喂给 4 周龄肉鸡,在 10 mg 剂量组,停药后 10 d,在肾脏中仍能检出新霉素残留;而在 30 mg 剂量组,停药后 3 d 和 13 d,在肾脏和肝脏中均能检出新霉素残留。这与 Strauss 等(1987)的研究结果不同。Strauss 等(1987)的试验显示,新霉素的饲喂剂量为每天每千克体重 36.7 mg,但在停药 0、1、2、3、4、5 d,肝脏和肌肉样品中均未检出新霉素残留。分析其原因主要在于两试验所用检测方法的最低检出限不同,前者检出限为 0.05 $\mu\text{g/g}$,而后者肌肉检出限为 0.45 $\mu\text{g/g}$,肝脏检出限为 0.75 $\mu\text{g/g}$ 。沈川等(1999)也研究了新霉素在肉鸡体内残留和消除规律,以含新霉素 140 mg/kg 的饲料连续饲喂 3 周龄肉鸡 14 d,检测结果显示,新霉素主要残留在肾脏,停药 0、1、3 d 的平均残留量分别为 1.10、0.78 和 0.58 $\mu\text{g/g}$,肌肉、肝脏和脂肪中未检出(检出限为 0.45 $\mu\text{g/g}$)。

由上述研究可见,肾脏是新霉素在畜禽体内残留的靶组织。畜禽品种、投药剂量、投药期、检测方法等均影响新霉素在动物组织中的残留和消除规律研究结果。

3.3.2 壮观霉素(Spectinomycin)

研究表明,口服壮观霉素在动物消化道内的吸收

率很低,绝大多数通过粪便排出体外(Jaglan 等,1991; Davis 等,1991)。壮观霉素在动物体内残留的靶组织是肾脏,其原型化合物是残留标志物(FAO,1999)。

对壮观霉素在畜禽体组织残留和消除规律的研究表明,壮观霉素在肾脏的残留量最高,其次为肝脏,肌肉和脂肪的残留量较低。Jaglan 等(1991)报道,给体重 10 kg 的猪一次性灌服每千克体重 44 mg ^3H 标记的壮观霉素,24 h 后屠宰取样,检测结果显示,肾脏、肝脏、肌肉和脂肪组织中壮观霉素的残留量分别为 9.36、4.99、2.78 和 1.34 $\mu\text{g/g}$ 。Brabies 等(1968)、Bergwerff 等(1998)的研究也证实肾脏中壮观霉素的残留量最高。Keppens 等(1992)分别以含壮观霉素 110、165 和 220 mg/kg 的饲料饲喂产蛋鸡,没有在蛋中检出壮观霉素残留(所用检测方法的检出限较高,为 2 $\mu\text{g/g}$)。

3.3.3 安普霉素(Apramycin)

关于安普霉素在畜禽体内残留和消除规律的研究不多。动物消化道对安普霉素的吸收能力很差(Thomson 等,1991;Aziza 等,1994),故口服安普霉素大部分随粪便排出体外。Afifi 等(1997)连续 5 d 将混有安普霉素(每千克体重 75 mg)的饲料强饲给肉鸡,于停药 0.25、1、3、6、12 和 24 h 屠宰取样,对样品中安普霉素含量的分析结果表明,肾脏中残留量最高,其次为肝脏、肺脏、小肠、胸肌、大脑;停药 6 h,肺脏、小肠、胸肌和大脑无安普霉素检出;停药 12 h 时,肝脏和肾脏中也无安普霉素检出。可见,组织中安普霉素的消除速度很快。Thomson 等(1991)的研究也得到类似结论。

3.4 大环内酯类

仅见有关泰乐菌素(Tylosin)的研究报道。研究表明,动物消化道对泰乐菌素的吸收能力较强(Cherlet 等,2002)。有很多研究者研究了畜禽采食含泰乐菌素的饲料后,泰乐菌素在体组织的残留情况。Sieck 等(1978)采用 ^{14}C 示踪法研究了给猪连续 4 d 饲喂添加泰乐菌素 110 mg/kg 的饲料后,检测组织器官中泰乐菌素的含量,结果表明,停药后 4 h,肝脏(0.24 mg/kg)和肾脏(0.18 mg/kg)中泰乐菌素残留量最高。但 Moran 等(1990b)在取自连续 28 d 采食含 200 mg/kg 泰乐菌素饲料猪的肌肉、皮肤、脂肪、肝脏和肾脏组织中没有检出有泰乐菌素残留(检出限为 0.02 mg/kg)。Madsen 等(1986)以含泰乐菌素 0、100、200、400 mg/kg 的饲料饲喂 90 kg 体重的肉猪,试验期 17 d,停药后 3 h 屠宰取样,测定脂肪、肝脏和眼肌中泰乐菌素残留量,结果显示,在最高剂量组(400 mg/kg),肝脏中泰乐菌素的含

量仅为 0.05 mg/kg,而在所有眼肌样品中,均未检出泰乐菌素残留。Moran 等(1990a)对肉鸡进行了研究,泰乐菌素添加剂量 1 000 mg/kg,试验期 7 d,分别于停药后 0、1、5、10 d 取样,测定肌肉、皮肤、脂肪、肝脏和肾脏中泰乐菌素残留量,结果表明,仅在停药 0 d 的肝脏样品中检出泰乐菌素残留含量低于 0.05 mg/kg,其它样品均为阴性。可见,尽管泰乐菌素可以被畜禽很好地吸收,但其在畜禽体内基本无残留。我国《饲料药物添加剂使用规范》仍然规定泰乐菌素的休药期为 21 d。

Nagy 等(2000)通过饮水将泰乐菌素提供给蛋鸡(1 000 mg/l),在腿肌样品中检出较高的泰乐菌素残留量(273.3 和 139.4 mg/kg),而且泰乐菌素在蛋中的残留量较高(Richards 等,1960),故应该禁止其在蛋鸡饲料中使用。

3.5 林可胺类

林可霉素(Lincomycin)是林可胺类饲用抗生素中研究和应用较多的。Hornish 等(1987)以 ^{14}C 放射性同位素示踪法研究了猪对林可霉素的吸收代谢规律,结果表明,以每千克体重 15 mg 的剂量强制性口服林可霉素后,有 79%~86%林可霉素存在于粪便和消化道内容物中,有 14%~21%林可霉素存在于尿中。经过定性测定发现,在肝脏中有以林可霉素原型化合物为主的 26 种代谢产物。Hornish 等(2000)对鸡的研究发现,肝脏和肌肉中林可霉素代谢物的种类和含量均不同。FAO(2001)在总结前人研究基础上提出,林可霉素原型化合物是猪和鸡体内唯一具有抗菌活性的残留物,因而将其作为残留标志物。

诸多对林可霉素在猪和鸡体内残留和消除规律的研究表明,肝脏和肾脏中林可霉素残留量最高,其次为肌肉和脂肪。Hornish 等(1987)以原子示踪技术研究了连续 3 d 给猪饲以不同水平林可霉素的饲料后,林可霉素在猪体组织的残留和消除规律,结果见表 3。

表 3 饲喂不同水平林可霉素在猪体组织中的残留量(mg/kg)

添加剂量	屠宰时间	肝脏	肾脏	肌肉	脂肪
20mg/kg	停药后 12 h	0.40	0.22	0.01	0.02
40mg/kg		0.64	0.41	0.02	0.02
100mg/kg		1.60	1.20	0.05	0.13
200mg/kg		3.40	3.10	0.15	0.35
200mg/kg	停药后 24 h	0.82	0.64	0.09	0.10

可见,肝脏和肾脏中林可霉素的残留量远高于肌肉和脂肪中的,但消除速度很快。林可霉素的添加剂

量和停药后取样时间对各组织中林可霉素残留量有极显著影响。Nappier 等(1996a、b,1997,2001)数次对猪、Hornish 等(2000)对肉鸡的研究均证明,猪、鸡组织中林可霉素的残留量与饲料中林可霉素的浓度呈强线性相关。Proudfoot 等(1990)向肉鸡饲料中添加 2.2 mg/kg 的林可霉素,肉仔鸡出栏后屠宰测定发现,没有在胸肌、腿肌和肝脏中检出林可霉素残留。因此,在实际应用中,应特别注意按照相关规范使用,超量添加可导致林可霉素在动物性食品中残留超标。

3.6 其它

3.6.1 黄霉素(Flavomycin)

黄霉素是第一个动物专用的饲用抗生素,有专家将其归类为含磷多糖类(陈杖榴,2002)。Sambeth 等(1974)对肉鸡的平衡试验表明,黄霉素通过口服给药后,极少量(约 0.2%)被消化道吸收,大部分以原型经粪便排出体外。因此,饲用黄霉素极少在畜禽体内残留。Schmidt 等(1975)在猪上的研究证实,向饲料中添加黄霉素,任何组织和器官中均未检出黄霉素残留。Sambeth 等(1974)在试验中给肉鸡饲喂推荐使用量 800 倍(875mg/kg)的黄霉素,仅在肾脏和肝脏中检出少量黄霉素残留。

由于黄霉素的安全性高、应用效果好,目前国内已得到广泛使用。我国《饲料药物添加剂使用规范》规定黄霉素的休药期为 0 d。

3.6.2 卑霉素(Avilamycin)

卑霉素是以糖为骨架的低聚糖(沈咏舟等,1997)。Magnussen 等(1991)用 ^{14}C 示踪法的研究证实,食入动物体内的卑霉素,有 95%由粪中迅速排出体外,在尿中仅有 5%。欧盟的动物营养科学委员会(Scientific Committee on Animal Nutrition,SCAN)认为肉鸡对卑霉素的吸收能力很低。

SCAN(1997)报道,向火鸡饲料中添加 20 mg/kg 的卑霉素(推荐使用剂量的两倍),饲喂 16 周后,分别在停药后 6 h、2 d 和 4 d 屠宰取样,检测结果显示,肝脏、肾脏、肌肉、腹脂和皮肤(带皮脂)均未检出卑霉素残留(检出限为 0.05 mg/kg)。但 Magnussen 等(1991)用 ^{14}C 示踪技术对猪的研究表明,试验猪连续 14 d 采食含 60 mg/kg 卑霉素的饲料后,在 0 d 停药期,肝脏、肾脏和肌肉中卑霉素残留量分别为 0.66、0.34 和 0.14 mg/kg。出现的上述两种相反的试验结果,主要原因在于试验方法不同。SCAN 的报告是以化学分析方法检测组织中卑霉素的含量,而 Magnussen 等则是通过测定各组织中 ^{14}C 的放射性含量得到的卑霉素含量。Magnussen 等

(1991)在其报告中分析认为,尽管在各组织中检出卑霉素残留,但多数已被降解失去抗菌活性。

SCAN(1997)根据其调查和研究结果,认为卑霉素对肉食品消费者是安全的,并确定其休药期为 0 d。卑霉素也因此成为目前欧盟允许作为饲料添加剂使用的 4 种抗生素之一。

4 减少(或消除)动物性食品中饲用抗生素残留的对策

4.1 加强科研力度,提供强有力的技术支持

畜禽养殖场使用饲用抗生素的主要目的在于促进畜禽生长,改善饲料效率,预防和控制疾病发生,减少畜禽发病率和死亡率,提高养殖场的经济效益。减少或停止使用饲用抗生素的前提是保证畜禽健康和生产潜力得到充分发挥。因此,应大力开展满足畜禽最佳免疫力、抗应激和抗氧化能力的营养物质需求参数及调控机制,加强无残留的安全饲料添加剂的研发以及畜禽安全生产模式的探索等领域的研究工作。在实际生产中推广应用后,使畜禽自身体质增强,抗病力、抗应激能力提高,减少对饲用抗生素的依赖性,从而实现在不影响畜禽生产成绩的条件下,减少甚至停止向饲料中添加饲用抗生素。

4.2 加强管理和监督,确保饲用抗生素使用规范化

通过部分饲用抗生素在畜禽体内残留和消除规律的讨论可知,饲用抗生素在畜禽体内的残留量与其添加剂量、使用时间和休药期密切相关,只要根据饲养对象,选择合适品种,严格按照使用方法,不超量添加,屠宰前给予充分的休药期,就可保证畜禽体内残留的抗生素不超过最高残留限量。我国于 2001 年颁布了《饲料药物添加剂使用规范》,详细规定了饲用抗生素的适用畜禽品种、用法用量、休药期等,为养殖者和监督管理者提供了可依之据。

4.3 加强饲养管理,改善畜禽生长环境条件

Precott 等(1993)曾指出,畜舍的环境条件与饲用抗生素的应用有关,畜舍的环境越差,畜禽越容易生病,抗生素使用量越大,因此,加强养殖过程中各个环节的管理,改善畜禽生长环境和卫生条件是减少饲用抗生素使用量的措施之一。

4.4 加强饲料生产管理,避免交叉污染

加强饲料生产从业人员的教育和培训,提高其业务素质,增强安全质量意识。避免饲料生产过程中饲用抗生素的错投、误投;保证投药饲料生产结束后,机械设备清洗干净,防止对非投药饲料的污染;或者购置非投药饲料生产专用设备,彻底清除交叉污染的可能。

另外,选择饲用抗生素合适的剂型也是避免或减

少交叉污染的措施之一。颗粒状抗生素由于静电性小、粉尘少,可以大大降低交叉污染的程度。Kennedy等(1996、1998)比较了粉状和颗粒状拉沙洛西的交叉污染情况,两种投药饲料(添加量为 100 mg/kg)加工完成后,继续用各自混合机生产蛋鸡用洁净饲料,经抽样检测,粉状,第一槽饲料拉沙洛西含量为 6 mg/kg,第九槽的含量则介于 0.5~1 mg/kg 之间;颗粒状,第一槽饲料拉沙洛西含量略有降低为 4 mg/kg,到第三槽含量就降至 0.1 mg/kg 左右。对粉状和颗粒状金霉素的研究得到类似结果(McEvoy, 2002)。

4.5 饲用抗生素的联合应用

有些饲用抗生素联合使用,可获得“协同”效果——抗菌谱更广、促长作用增强、添加量减少,从而减少其在产品中的残留。已经证明杆菌肽锌和硫酸粘杆菌素联合使用(商品名万能肥素)、盐酸林可霉素和硫酸大观霉素联合使用(商品名利高霉素)可发挥协同作用。

4.6 适当缩小畜群规模

Dewey 等(1997)报道了 1989~1991 年在美国进行的一项调查结果表明,中(100~499 头母猪)、大(500 头母猪以上)型猪场使用饲用抗生素的数量远高于小型(99 头母猪以下)猪场,而且小型猪场使用饲用抗生素的规范性(指严格按照标签用药)优于中、大型猪场。由此,他们认为适当缩小畜群规模,有利于控制和规范抗生素的使用。

4.7 使用绿色安全饲料添加剂

停止使用饲用抗生素是减少(或消除)动物性食品中饲用抗生素残留的最直接、最彻底的手段,但必须配合以更精确的饲料养分供给、更精细的饲养管理和使用具有抗菌促生长作用的绿色安全饲料添加剂。绿色安全饲料添加剂的研制开发和应用技术研究是目前动物营养研究的热点,但顾君华等(2003)指出,就目前应用情况来看,绿色安全饲料添加剂不能完全替代抗生素(见表 4)。

表 4 绿色安全饲料添加剂与饲用抗生素促生长效果比较^①

类型	功能	名称	与抗生素促长功效比	安全性评价
酶制剂	促进饲料中部分营养成分的消化,从而更易被动物体吸收	植酸酶、纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶等	60%	对环境无污染,对动物及人体安全,但对基因工程菌株需进行严格评估
微量元素添加剂 ^②	高剂量可以促进猪生长,改善饲料报酬	氧化锌、硫酸铜等	60%~80%	高剂量对环境污染严重,对人体有潜在危害
有机酸	降低胃肠道 pH 值,促进幼畜生长,并能防止饲料霉变	甲酸、延胡索酸、柠檬酸、乙酸、乳酸等	20%	对环境无污染,对动物及人体安全
益生元	干扰病原菌在肠壁表面上定植,提高动物机体免疫活性	低聚甘露糖、低聚果糖等	40%~60%	对环境无污染,对动物及人体安全
益生菌	增加肠道中有益菌数量	乳杆菌、酵母菌、肠球菌、芽孢杆菌等	40%~50%	对环境无污染,对动物及人体安全,但应禁止使用基因工程菌株
中草药提取物	抑制病原菌生长,提高动物机体免疫活性等多方面效果	大蒜素等	60%~80%	有效组分结构复杂,对动物及人体安全需做长期评估

注:①资料来自顾君华(2003);②作者认为应该使用有机微量元素,因已有研究证明,低剂量有机微量元素可获得与高剂量无机微量元素相近的促长效果。

最后,加强宣传力度,提高消费者安全意识,杜绝抗生素残留的畜产品出现,使之失去消费市场;建立健全检测、监控体系和政策法规,加大执法力度等,这些都是减少(或消除)动物性食品中饲用抗生素残留应采取的措施。

5 结语

根据瑞典 1986 年全面禁止在饲料中使用抗生素的经验教训,以及我国目前畜禽养殖业的发展现状,饲用抗生素在我国畜禽生产中仍处于不可替代的地位。随着人们生活水平的提高以及我国加入 WTO,只有安全优质的畜禽产品才具有更强的国内和国际消

费市场竞争力,而降低或消除畜禽产品中饲用抗生素残留是保证其安全优质的前提。

综上所述,饲用抗生素在畜禽产品中残留的现象比较普遍,问题也相当严重,其原因多种多样,但都源于畜禽产品生产过程中的各个环节。根据不同饲用抗生素在畜禽体内的残留和消除规律,通过提高认识、严格管理、加强监督等综合治理措施配合以精确的营养供给和绿色安全饲料添加剂的应用,可以达到降低或消除畜禽产品中饲用抗生素残留的目的。

(参考文献 85 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:王 芳,xfang2005@163.com)

多酚对河蟹免疫功能的影响

马贵华 陈道印 刘六英 钟 青

摘 要 用一种多酚类物质—— α -苯基苯并吡喃作为饵料添加剂添加在河蟹饲料中,设添加量分别为每千克饲料 2(A 组)、4(B 组)、6 mg(C 组)3 个试验组,饲喂河蟹 15 d,测定其对河蟹血淋巴细胞中相关免疫因子的影响。结果表明: α -苯基苯并吡喃添加剂量为 4 mg/kg 时,可显著地提高河蟹血淋巴细胞中酚氧化酶(PO)、溶菌酶(LSZ)和超氧化物歧化酶(SOD)的酶活($P<0.05$),说明具有生物活性的 α -苯基苯并吡喃可刺激河蟹机体免疫功能的提高。

关键词 多酚;河蟹;免疫功能;提高活性

中图分类号 S968.25

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*),俗称河蟹,是我国特有的经济甲壳动物,由于近几年河蟹疾病爆发频繁,给养蟹业造成巨大损失。目前防治河蟹疾病的抗菌素及一些化学药物,虽对有关疾病有一定的疗效,但存在着耐药性、毒副作用大、蟹体自身免疫力下降以及药物残留对人类健康造成诸多影响等问题。因此,寻找、研制、开发能有效激活河蟹相关的免疫酶以达到提高其免疫力的免疫增强剂应该是今后防治河蟹疾病的主要研究方向。

α -苯基苯并吡喃是一种从分布较为广泛的植物中提取的多酚类物质。由于具有较强的生物学活性,对动物免疫系统有一定的激活作用,且具有无毒副作用、无残留、不产生耐药性等优点,因而成为鱼类及水产甲壳类动物的免疫增强剂。但关于 α -苯基苯并吡喃对河蟹免疫酶活性的影响目前尚未见报道。本研究旨在揭示河蟹摄食了添加一种多酚类物质—— α -苯基苯并吡喃的饲料后对其免疫功能的影响,从而为免疫增强剂在河蟹养殖业上的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

河蟹购于南昌市水产市场,蟹体健康,规格为 50~65 g;河蟹采购后,先用 5% 的食盐水浸泡 20 min

消毒,然后饲养在(100×75×50) cm³ 的水族箱中。饲料为不含 α -苯基苯并吡喃的河蟹饲料,由广东省佛山市德宁生物技术有限公司友情提供。

1.2 试验设计

试验共设 4 组,试验期间 3 个试验组分别饲喂在基础饲料中添加不同剂量的 α -苯基苯并吡喃的饲料,即 2(A 组)、4(B 组)、6 mg/kg(C 组),1 个对照组(D 组)饲喂基础饲料。每组 2 只箱,每箱饲养 15 只,用拱形瓦片作隐蔽物,水体中放入水葫芦等水生植物用以调节水质及作辅助饲料。

1.3 饲养管理

经食盐水消毒后的试验蟹,分别放养在 8 只水族箱中,第 2 d 投喂不含 α -苯基苯并吡喃的饲料,暂养 5 d 后开始试验,每天每箱各投喂饲料 2 次,上午 8:30、下午 17:30(每次略有余饵),水温 23~25 ℃,养殖用水为经过曝气的自来水。每天上午 8:00 排除残余饵料及污物,全日充气增氧,饲养 15 d 后供试验用。

1.4 试验取样

在饲养 15 d 后从每箱取 10 只蟹,用 16 号针头于河蟹的第三、四步足收集血淋巴 1 ml 放入 Eppendorf 管中,4 ℃ 静置过夜后,将血淋巴在 4 ℃、15 000 r/min 条件下离心 20 min,小心吸取上清液,分别测血清的酚氧化酶(PO)、溶菌酶(LSZ)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。

1.5 相关酶的酶活测定方法

1.5.1 PO 酶活的测定

以 L-DOPA 为底物,参照 Ashida(1971)的方法进行。将 2.8 ml 的 0.1 mol/l、pH 值为 6.24 的磷酸盐缓冲液与 0.1 ml 的 0.01 mol/l 的 L-DOPA 和 0.1 ml 待测血清于室温下混匀,30 ℃ 保温 5 min 后,在 490 nm 下测

马贵华,江西生物科技职业学院,副教授,330200,江西省南昌市南莲路 608 号。

陈道印,南昌莲塘鱼病防治所。

刘六英、钟青,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-30

★ 江西省农牧渔业科研项目基金(编号:20060302)

吸光率,每隔 2 min 读取 OD 值,测定 30 min。以试验条件下每分钟 OD_{490nm} 增加 0.001 作为一个酶活单位(U)。为简单起见,本试验采用控制相同条件的方法,直接用酶活单位表示酶活性。

1.5.2 LSZ 酶活的测定

按 Hultmark 等的改进方法进行。将经二次活化的溶壁微球菌接种于营养琼脂培养基内,于 37 ℃ 的恒温箱内培养 20 h 后用 0.1 mol/l、pH 值为 6.47 的磷酸盐缓冲液将其洗脱,收集菌体。并用 0.1 mol/l、pH 值为 6.47 的磷酸盐缓冲液配成底物悬液(OD_{570nm}=0.3)。取 3 ml 该悬液于试管内置冰浴中,再加入 50 μl 待测血清,混合,测 A₀ 值。然后将试液移入 37 ℃ 温浴中作用 30 min,取出后再置于冰浴 10 min 以终止反应,测其 A 值。溶菌酶(LSZ)酶活 U_L 按下式计算:U_L=(A₀-A)/A₀。

1.5.3 SOD 酶活的测定

按邻苯三酚自氧化法进行,将 0.05 mol/l、pH 值为 8.2 的 Tris-HCL 缓冲液在 25 ℃ 保温 20 min,取出 3.0 ml 置于试管中,加入 0.045 mol/l 适量的邻苯三酚(7.5 μl 左右),加血淋巴 20 μl,迅速摇匀倒入 1 cm 比色皿,在 325 nm 波长下,每隔 30 s 测吸光值 1 次,调整邻苯三酚的加入量,使之自氧化速率控制在 0.070 A/min。计算 25 ℃ 下反应 3 min 时在波长 325 nm 处的吸光度数值变化。

酶活单位定义:在 1 ml 反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 时的酶量。

$$\text{单位体积酶活 (U/ml)} = \frac{0.070 - \text{样液速率}}{0.070} \times \frac{100\%}{50\%} \times \text{反应液总体积} \times \frac{\text{样液稀释倍数}}{\text{样液体积}}$$

1.6 数据统计

统计分析使用的软件为 Excel,各处理的数据进行单因素方差分析,当差异显著(P<0.05)时,用 Duncan's 检验法进行均值间多重比较。

2 结果

关于 α-苯基苯并吡喃对中华绒螯蟹酚氧化酶、溶菌酶和超氧化物歧化酶等相关酶酶活的影响见表 1。从表 1 中可见,PO 酶活的变化,B 组和 C 组与对照组相比差异极显著(P<0.01),A 组与对照组、B 组与 A 组相比差异显著(P<0.05);LSZ 酶活的变化,C 组、B 组和 A 组与对照组相比差异均极显著(P<0.01),C 组与 A 组相比差异显著(P<0.05);SOD 酶活的变化,C 组和 B 组与对照组相比差异均极显著(P<0.01),C 组

和 B 组与 A 组相比差异均显著(P<0.05),A 组与对照组相比差异不显著(P>0.05)。

表 1 饲料中添加 α-苯基苯并吡喃对河蟹免疫相关酶的影响

组别	PO(U)	LSZ(U)	SOD(U/ml)
对照组(D 组)	1.623±0.545 ^{Aa}	0.031 0±0.006 7 ^A	156.56±37.11 ^A
A 组	2.101±0.350 ^b	0.040 3±0.004 9 ^{Ba}	177.56±53.41 ^A
B 组	2.560±0.772 ^{Bc}	0.045 2±0.008 6 ^B	209.94±37.42 ^{Bb}
C 组	2.495±0.750 ^B	0.049 7±0.008 0 ^{Bb}	234.29±32.33 ^{Bb}

注:表中同列肩标大写英文字母不同表示差异极显著(P<0.01);同列肩标小写英文字母不同表示差异显著(P<0.05);相同字母或不含字母表示差异不显著(P>0.05)。

3 小结与讨论

α-苯基苯并吡喃是一种从植物中提取的多酚类物质,通过激活酚氧化酶系统,将酚氧化酶原氧化成酚氧化酶,而酚氧化酶是一类氧化还原酶类,可以进一步将酚氧化成醌,并最终合成黑色素,黑色素直接参与河蟹一系列防御反应,产生、激活溶菌酶等。然而,α-苯基苯并吡喃(或其分解产物)是如何通过消化道被吸收、如何通过血细胞而激活酚氧化酶系统、如何激活超氧化物歧化酶等,还有待于进一步研究。

3.1 α-苯基苯并吡喃对酚氧化酶的影响

酚氧化酶作为一个类似补体系统在甲壳动物中的作用日益受到人们的重视,国内外学者在虾类等水生甲壳动物的酚氧化酶与免疫的关系方面作了许多研究工作,认为免疫增强剂可激活甲壳动物血细胞中的酚氧化酶原系统,从而促进其血细胞的吞噬与包掩、介导凝集和凝固功能,而产生杀菌物质。刘晓云等(2002)对中国对虾淋巴器的酚氧化酶的研究后认为,中国对虾淋巴小管受病毒感染后,小管细胞中的 PO 通过破坏其细胞内膜系统和直接溶解病毒,起到了破坏、杀死进入淋巴小管的病毒的作用,由此证明了 PO 在甲壳动物免疫反应中发挥着重要的作用。本试验研究表明,在饲料中添加 2 mg/kg 剂量的 α-苯基苯并吡喃就可显著地提高酚氧化酶的活性,添加 4 mg/kg 和 6 mg/kg 剂量的 α-苯基苯并吡喃则能极显著地提高酚氧化酶的活性。因此我们认为在河蟹的饲料中添加 4 mg/kg 剂量的 α-苯基苯并吡喃则可以极明显地提高其酚氧化酶的活性而起到免疫的功效。

3.2 α-苯基苯并吡喃对溶菌酶的影响

溶菌酶是一种专门作用于微生物细胞壁的水解酶,具有抗菌、抗病毒的功效,又有一定的溶菌作用,是河蟹防御系统的重要组成成分,可以通过增强溶菌酶的酶活来提高其抗病能力。本研究表明,在饲料中

添加 2、4 和 6 mg/kg 剂量的 α -苯基苯并吡喃均能极显著地提高河蟹溶菌酶的活性,可见只要在河蟹的饲料中添加 2 或 4 mg/kg 剂量的 α -苯基苯并吡喃就能明显地提高其杀菌能力。

3.3 α -苯基苯并吡喃对超氧化物歧化酶的影响

作为活性氧自由基清除剂的超氧化物歧化酶,还具有抗菌、抗病毒等作用,其活性与河蟹等水生甲壳动物的免疫水平密切相关。因此,SOD 可作为动物机体非特异性免疫指标,来评判其机体非特异性免疫的能力。研究表明,在河蟹的饲料中添加 4 和 6 mg/kg 剂量的 α -苯基苯并吡喃均能极显著地提高超氧化物歧化酶的活性,添加 2 mg/kg 的剂量组与对照组相比差异不显著。

因此,从本次试验所添加不同剂量的免疫增强剂对河蟹免疫相关酶的影响的研究结果显示,在饲料中添加 4 mg/kg 剂量的 α -苯基苯并吡喃饲喂河蟹可以在很大程度上提高河蟹的免疫能力。这与我们养殖生

产实践中,在河蟹饲料中添加该剂量的 α -苯基苯并吡喃添加剂饲养河蟹所达到明显降低其疫情的效果是相一致的。

参考文献

- 1 沈锦玉,尹文林,钱冬,等.中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病原的研究[J].中国水产科学,2000,7(3):89~92
- 2 马贵华,钟青,曹义虎,等.中华绒螯蟹溶菌酶的初步研究[J].江西农业学报,2006,18(1):41~44
- 3 马贵华,钟青,曹义虎,等.中华绒螯蟹免疫因子-溶菌酶的初步研究[J].淡水渔业,2006,36(1):25~27
- 4 马贵华,刘六英,钟青,等.中华绒螯蟹超氧化物歧化酶的研究[J].水利渔业,2006,26(4):24~25
- 5 刘晓云,张志峰,于利,等.中国对虾组织细胞中酚氧化酶活力的研究[J].高技术通讯,2002(8):89~92
- 6 王雷,李光友,毛远兴,等.口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J].海洋与湖沼,1994,25(5):486~491

(编辑:徐世良,fi-xu@163.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:xjleng@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

详情请登录中国水产网 <http://www.china-fishery.net> 和上海水产大学校园网 <http://shfu.edu.cn> 查询

中草药多糖对断奶仔猪肠道微生物菌落的影响

刘 惠 李丽立 张 彬 杨坤明 印遇龙 王 洁

摘 要 选择 28 日龄断奶的杜长大三元杂交阉公仔猪 60 头,平均体重 7.50 kg 左右,随机分为 6 个处理组,每个处理 10 个重复,每个重复 1 头猪。处理 1 组为对照组,饲喂玉米—豆粕型基础日粮;处理 2 组在基础日粮中添加 0.3% 中草药复合多糖;处理 3 组在基础日粮中添加 0.6% 复合多糖;处理 4 组在基础日粮中添加 0.9% 复合多糖;处理 5 组在基础日粮中添加 0.6% 白术多糖;处理 6 组在基础日粮中添加抗生素。正式饲养 14 d 后屠宰,取肠道内容物进行大肠杆菌和乳酸杆菌的培养。结果表明,处理 2 组能显著降低仔猪回肠中大肠杆菌数量($P<0.05$);处理 2 组和处理 6 组能显著降低仔猪结肠中大肠杆菌数量($P<0.05$);添加白术多糖和抗生素均能显著降低盲肠中大肠杆菌数量($P<0.05$)。在饲料中添加中草药复合多糖和单一白术多糖能显著增加断奶仔猪结肠和盲肠乳酸杆菌数量($P<0.05$);复合多糖也能显著增加回肠中乳酸杆菌数量($P<0.05$),但是单一白术多糖对回肠中乳酸杆菌数量影响不显著($P>0.05$)。同时,抗生素对结肠和盲肠中乳酸杆菌数量影响显著($P<0.05$),对回肠中乳酸杆菌数量影响不显著($P>0.05$)。

关键词 中草药;复合多糖;乳酸杆菌;大肠杆菌;断奶仔猪

中图分类号 S811.6

1 材料与方法

1.1 供试多糖

本试验所用多糖是以白术等 7 种中药粉碎后经过水浸醇沉提取的中草药复合多糖。

1.2 试验动物与管理

选用 28 日龄断奶、平均体重 7.5 kg 左右的杜长大三元杂交阉公仔猪 60 头,随机分为 6 组。饲养栏舍为漏缝地板、封闭式猪舍,仔猪自由采食,自动饮水器供水。仔猪进栏前对猪舍进行全面消毒,按照常规饲养操作规程和免疫规程进行饲养和免疫。

1.3 试验日粮

本试验采用玉米—豆粕型基础日粮,其配方及营养水平见表 1。

1.4 试验设计

本试验预试(过渡)期为 3 d,正式试验期为 14 d。共设 6 个处理组,每个处理组 10 个重复,每个重复 1

头猪。采用单栏饲养,试验设计见表 2。试验所用的中草药复合多糖、白术多糖、抗生素分别添加在 4% 的预混料中,其中抗生素采用金霉素和杆菌肽锌联合使用。

表 1 基础日粮组成与营养水平

日粮成分	含量(%)	营养水平	
玉米	55	消化能(MJ/kg)	14.15
豆粕	24.1	粗蛋白(%)	20
麦麸	8.6	钙(%)	0.8
鱼粉	4	磷(%)	0.6
预混料	4	赖氨酸(%)	1.2
血浆蛋白粉	2	蛋氨酸(%)	0.75
植物油	2.3		

注:预混料向每吨全价料中提供(kg):石粉 3.0、磷酸氢钙 11、抗氧化剂 0.2、罗氏多维 0.4、氯化胆碱 0.8、防霉剂 1.0、食盐 3.0、甜味剂 0.6、蛋氨酸 0.5、赖氨酸 2.3、苏氨酸 0.5、硫酸亚铁 0.6、硫酸铜 0.03、硫酸锌 0.45、硫酸锰 0.02、1% 亚硒酸钠 0.005、1% 碘化钾 0.002 75,其余为米糠,做为载体。

表 2 试验设计

处理 1 组	处理 2 组	处理 3 组	处理 4 组	处理 5 组	处理 6 组
基础日粮	基础日粮+ 0.3% 中草药复合多糖	基础日粮+ 0.6% 中草药复合多糖	基础日粮+ 0.9% 中草药复合多糖	基础日粮+ 0.6% 白术多糖	基础日粮+抗生素

刘惠,湖南农业大学动物科学技术学院,410128,湖南长沙。

李丽立(通讯作者)、印遇龙,中国科学院亚热带农业生态研究所。

张彬、王洁,单位及通讯地址同第一作者。

杨坤明,正虹科技发展有限公司。

收稿日期:2006-12-13

★ 国家自然科学基金资助项目(30571351)

1.5 稀释液的配制

本试验用到的稀释液配方如表 3 所示,按配方配制好后,加热融化,121 ℃灭菌 15 min 备用。

表 3 稀释液配方

品名	用量	品名	用量
磷酸二氢钾	4.5 g	磷酸氢二钾	6.0 g
L-半胱氨酸盐	0.5 g	吐温	0.5 g
琼脂	1.0 g	蒸馏水	1 000 ml

1.6 大肠杆菌培养与记数方法

在饲养试验结束后,试猪空腹屠宰,各取一段回肠、盲肠和结肠,用包装袋装好后,置于冰盒中保存,立即于灭菌工作台上称取 1.0 g 左右的肠道内容物于无菌试管中,加入先配好并已灭菌的稀释液 9 ml,并震荡摇匀,此为 10^{-1} 稀释液;静置一段时间,吸取上清液 1 ml 于 9 ml 稀释液的试管中进行 10^{-2} 倍稀释,震荡均匀后依次稀释到 10^{-3} ~ 10^{-7} 倍。用微量取液器取 10^{-4} ~ 10^{-6} 倍内容物稀释液 0.1 ml 涂布接种于麦康凯培养基平皿上(各稀释度设两个重复),置于 37 ℃ 培养箱中有氧培养 24 h 后取出,选取粉红色或红色、表面光滑、凸起、边缘整齐不透明、质地软、直径在 1.0~3.0 mm 的菌落进行记数。根据公式 $\log_{10} \frac{n \times 10 \times 1}{N}$ 得出数据,其中 n 表示培养皿中活菌数, N 表示稀释倍数。

1.7 乳酸菌的培养与计数方法

屠宰、取样及稀释的方法同 1.6。用微量取液器移取 10^{-5} ~ 10^{-7} 稀释液 0.1 ml 涂布接种于琼脂培养基平皿上(各稀释 2 个重复并编号),置 37 ℃ 培养箱中有氧培养 48 h 后,选取乳白色、表面光滑、凸起、边缘整齐不透明并且质地柔软,直径 0.6~2.7 mm 的菌落进行计数,根据公式 $\log_{10} \frac{n \times 10 \times 1}{N}$ 计算得出数据,其中 n 表示培养皿中活菌数, N 表示稀释倍数,并对数据进行显著性分析。

1.8 统计与分析

试验数据采用 SAS 统计软件进行方差分析,用邓肯氏法进行多重比较。试验数据采用平均数±标准误表示。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌的结果与分析

表 4 各组仔猪回肠、结肠、盲肠中大肠杆菌的数量(CFU/g)

项目	回肠	结肠	盲肠
处理 1 组	7.11±0.810 ^a	7.54±0.349 ^a	8.68±0.580 ^a
处理 2 组	6.17±0.592 ^b	6.50±0.428 ^c	6.74±0.68 ^c
处理 3 组	6.36±0.650 ^{ab}	7.19±0.15 ^{ab}	6.29±0.38 ^c
处理 4 组	6.90±0.659 ^{ab}	7.39±0.36 ^a	7.49±0.59 ^b
处理 5 组	6.65±0.374 ^{ab}	7.14±0.56 ^{ab}	7.72±0.26 ^b
处理 6 组	6.96±1.06 ^{ab}	6.65±0.39 ^{bc}	7.50±0.19 ^b
P 值	0.043	0.009	0.000 1

注:表中同列数据肩标相同字母表示差异不显著($P>0.05$),肩标不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

由表 4 可以看出,试验各组回肠中大肠杆菌平均数均低于对照组,说明添加中草药复合多糖和抗生素可抑制仔猪回肠中大肠杆菌生长,减少活菌数量。添加 3% 中草药复合多糖(处理 2 组)能明显减少仔猪回

肠中大肠杆菌数量($P<0.05$)。处理 2 组和处理 6 组显著减少结肠中大肠杆菌的数量($P<0.05$),但两者之间差异不显著($P>0.05$);处理 6 组与处理 3 组、处理 5 组相比差异不显著($P>0.05$);处理 3 组、处理 4 组与处理 5 组减少了结肠中大肠杆菌的数量,但效果不显著($P>0.05$)。对于盲肠中大肠杆菌数量而言,添加中草药复合多糖和抗生素都可显著减少其数量($P<0.05$),其中处理 3 组效果明显好于处理 4 组、处理 5 组以及处理 6 组($P<0.05$),但与处理 2 组相比效果差异不显著($P>0.05$);添加 9% 中草药复合多糖组(处理 4 组)、添加 0.6% 白术多糖组(处理 5 组)与抗生素组(处理 6 组)相比差异不显著($P>0.05$)。

2.2 乳酸杆菌的结果与分析

表 5 各组仔猪回肠、结肠、盲肠中乳酸杆菌的数量(CFU/g)

项目	结肠	回肠	盲肠
处理 1 组	6.87±0.25 ^b	6.94±0.31 ^c	6.99±0.51 ^c
处理 2 组	7.80±0.12 ^a	7.86±0.10 ^a	7.77±0.21 ^a
处理 3 组	7.80±0.10 ^a	7.69±0.10 ^{ab}	7.67±0.08 ^{ab}
处理 4 组	7.77±0.19 ^a	7.76±0.15 ^a	7.61±0.15 ^{ab}
处理 5 组	7.66±0.26 ^a	7.00±0.23 ^c	7.89±0.20 ^a
处理 6 组	7.73±0.19 ^a	7.40±0.35 ^b	7.22±0.54 ^{bc}
P 值	0.000 5	0.000 1	0.009 5

从表 5 可以看出,对照组仔猪结肠中乳酸杆菌数量显著低于处理 2、3、4、5 组以及处理 6 组仔猪结肠中乳酸杆菌数量($P<0.05$);处理 2、3、4、5 组与处理 6 组仔猪结肠中乳酸杆菌数量之间差异不显著($P>0.05$)。处理 2、4 组仔猪回肠中乳酸杆菌数量显著高于处理 6 组仔猪回肠中乳酸杆菌数量($P<0.05$);处理 3 组与处理 6 组仔猪回肠中乳酸杆菌数量差异不显著($P>0.05$);处理 6 组仔猪回肠中乳酸杆菌数量显著高于处理 5 组(单一白术多糖组)以及处理 1 组(对照组)仔猪回肠中乳酸杆菌数量($P<0.05$);而处理 5 组(单一白术多糖组)与对照组仔猪回肠中乳酸杆菌数量相比差异不显著($P>0.05$)。由此可见,添加单一白术多糖对仔猪回肠中乳酸杆菌的作用极其有限。处理 2、3、4、5 组仔猪盲肠中乳酸杆菌数量之间差异不显著($P>0.05$);处理 2、5 组与处理 6 组仔猪盲肠中乳酸杆菌数量差异显著($P<0.05$),但是处理 3、4 组与处理 6 组仔猪盲肠中乳酸杆菌数量差异不显著($P>0.05$);同时,处理 2、3、4、5 组仔猪盲肠中乳酸杆菌数量均显著高于对照组($P<0.05$),但处理 6 组与对照组相比,仔猪盲肠中乳酸杆菌数量差异不显著($P>0.05$)。三段肠道乳酸杆菌数量横向比较中,添加复合多糖的处理 2、3、4 组肠道乳酸杆菌数量均显著多于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 大肠杆菌

试验结果表明,在饲料中添加中草药复合多糖和抗生素均可抑制断奶仔猪肠道内容物中大肠杆菌的数量和活性,但中草药复合多糖效果要比抗生素好。中草药复合多糖对仔猪肠道内大肠杆菌有明显抑制作用,可以有效降低仔猪的发病率。武瑞等(2001)用复方中草药(苍术、白术等)对雏鸡进行抑菌试验与临床效果观察。结果表明,该组方对大肠杆菌、沙门氏菌等有较好的抑制作用。韩剑众等(2002)用中药(黄芪、当归、紫胡、大黄等组成)有效成分提取物对仔猪的饲养实验表明,复合提取物可显著促进小猪生长,有效调节肠道微生物区系;抑菌试验表明,抽提物对猪肠道主要致病菌,如大肠杆菌、沙门氏菌等有较强的抑制效果。崔锦鹏等(2001)研究也发现,复方中草药(党参、白术、黄芩、板蓝根、蒲公英等)能有效杀灭大肠杆菌和沙门氏菌。赵银丽等(2006)在黄芩抗鸡大肠杆菌作用的研究中指出,黄芩可显著降低鸡肠道中大肠杆菌数量,降低家禽的发病率。高微微等(1999)用中草药(连翘、白头翁等)提取物进行抑菌试验表明,该组方的水提物和醇提物对大肠杆菌有较强的抑制作用。王自然等(2005)用中草药口服液进行治疗人工感染仔猪大肠杆菌病的试验,结果表明,中药口服液对大肠杆菌有较好的体外抑制作用,临床有效率为100%,治愈率达90%以上。

猪大肠杆菌病是以仔猪腹泻为主的肠道传染病,大肠杆菌是主要病原,而仔猪腹泻是造成幼畜死亡率高的主要原因,且大肠杆菌病防治较困难,因为:①大肠杆菌群体大,形态和生化特征相似,血清类型多,不同血清型大肠杆菌对药物的敏感性也不同;②由于长期使用抗生素等药物,大肠杆菌产生严重的抗药性,已经影响到兽医对药物的选用;③该病病因错综复杂,母乳质差、营养不全、猪舍阴冷潮湿、卫生环境差、通风不良、气温突变等因素都可诱发仔猪感染大肠杆菌病。

降低该病的发病率,提高畜禽机体免疫力是根本。大量研究证明,中草药复合多糖可提高畜禽免疫力。杨铁红等(2005)研究表明,10~100 mg/kg 剂量范围内的当归多糖能显著提高小鼠脾细胞功能;牛膝多糖能升高血清溶血素和脾脏内抗体形成的细胞数,提高血清免疫球蛋白IgG的水平。王莉等(1999)在小鼠体内试验和体外试验的结果表明,芦荟多糖可促进小鼠免疫器官脾脏、胸腺增长,显著提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬

百分数和吞噬指数。同时张俊平(1990)报道指出,商陆多糖、党参多糖、马齿苋多糖均能显著增强小鼠腹腔巨噬细胞的功能,增加小鼠巨噬细胞的数目。

从本次试验对大肠杆菌的监测结果可以看出,中草药复合多糖可有效降低肠道大肠杆菌的数目。大肠杆菌是人和动物消化道内的正常菌群,一般在消化道后段较多,在正常情况下对宿主无害。健康的人和动物肠道内有益菌和有害菌通常处于生理性动态平衡。但有研究表明,大肠杆菌可导致畜禽下痢,仔猪下痢时大肠杆菌增多。试验选用大肠杆菌作为目标菌,研究中草药复合多糖对大肠杆菌的抑制作用,结果表明,添加中草药复合多糖的处理组其肠道内大肠杆菌数量明显降低。这可能是以下两个原因:①中草药多糖中有效成分具有类似抗生素作用,从而抑制大肠杆菌的增殖;②中草药复合多糖可以调节肠道内微生物生态平衡,促进肠道优势菌数的增殖,产生生长优势,从而削弱了大肠杆菌的繁殖。这些机理还有待进一步更加深入的研究。

3.2 乳酸杆菌

本试验除了处理5组(单一白术多糖组)与对照组仔猪回肠乳酸杆菌数量差异不显著($P>0.05$),处理2、3、4组仔猪三段肠道中乳酸杆菌数量均显著高于对照组($P<0.05$),而处理5组(单一白术多糖组)仔猪结肠以及盲肠中乳酸杆菌数量也显著高于对照组($P<0.05$)。说明了中草药复合多糖在三段肠道中均对乳酸杆菌有一定的促进生长作用。多糖一方面可以竞争性的与病原菌细胞表面的外源凝集素结合,减少病原菌与肠黏膜上皮细胞受体结合的机会,使其饥饿而死亡,从而失去致病力,另一方面也能刺激机体对病原菌的免疫反应。同时,多糖也能作为有益菌如乳酸菌的生长底物,促进乳酸杆菌的生长。很多研究有同样的结论。金岭梅(2000)研究了仔猪日粮中添加复合多糖的效果,结果试验组仔猪比对照组仔猪断奶重提高4.55%。聂实践(1999)的试验结果表明,在猪常规饲料中添加0.1%~0.4%的复合多糖,增重提高6.9%~16.5%。黄一帆(1999)的报道表明,苦参、风轮菜均能显著地降低番泻叶所导致的小鼠腹泻的频率,由此可推测这些药物能对番泻叶所导致的肠蠕动亢进具有抑制作用,促进水和钠从肠腔向肠黏膜上皮细胞转移。

处理5组(单一白术多糖组)与对照组仔猪回肠乳酸杆菌数量差异不显著($P>0.05$),而处理2、3、4组与对照组仔猪回肠乳酸杆菌数相比差异显著($P<0.05$)。这是因为多糖之间在促进有益菌生长、抑制有害菌生长

天然风味剂在水产动物饲料中的应用

王渊源 蔺子敏

天然风味剂是指带有气味和滋味的、能刺激嗅觉受体和味觉受体的天然物质和其提取物,风味包括香、鲜、甜、酸、苦、咸和口感物质的辣与涩。天然风味剂大都是化学结构明确的单一物质,由两种以上物质复合而成的混合物。水产饲料添加天然风味剂可以掩盖饲料原料的非选择性气味,促进水产动物食欲,增加采食量,刺激唾液和胃液分泌,提高饲料消化率,达到促进生长与减少饲料耗费的目的。本文就水产动物选择性风味剂作以概述,为风味剂在水产动物饲料中的开发和利用提供参考。

1 风味剂的作用机理

王渊源,集美大学水产学院,教授,361021,厦门市集美区印斗路 43 号。

蔺子敏,厦门牡丹饲料科技发展有限公司。

收稿日期:2007-01-12

风味剂的作用包括“气味”和“滋味”,气味的作用机理有两种说法,一是产生特殊气体的原子官能团(如芳香团、三甲胺)与水结合,由水介质的流动传递到水生动物的嗅觉器官;二是气体电子波由水介质传递到水生动物的嗅觉器官。至于滋味则普遍认为是溶解在水中,由水介质的流动传递到水生动物的味觉器官。最后,由嗅觉神经与味觉神经传递到中枢神经,产生物理效应,表现在动物对风味剂是趋向或是避向,趋向才是有效的。

2 常用水产饲料风味剂

2.1 鲜味剂

鲜味剂是一类增味剂,包括氨基酸类鲜味剂和核糖核苷酸类鲜味剂。前者最常用的是味精,可按生产需要安全地用于食品和饲料中。此外,还具有其它一些氨基酸所具有独特的风味,如丙氨酸具有甜味、甘氨酸具有虾和墨鱼味、蛋氨酸具有海胆味,这些风味往往是水产动物嗜好的味质。藤卷正生等(1998)报道,幼鳗饲料

的功能上有一定的协同作用。因此,添加复合多糖的处理 2、3、4 组仔猪肠道乳酸杆菌数量得到提高。王慧贤等(1994)将 6 种中草药按照中药配伍的原则配成复合多糖液,研究其对动物免疫系统的影响,试验结果发现,复合多糖液效果优于单一的多糖液。这与本文观点一致。

抗生素组仔猪回肠乳酸杆菌数量显著高于对照组($P<0.05$),同时处理 2、4 组仔猪回肠中乳酸杆菌数量也显著高于处理 6 组($P<0.05$)。抗生素能抑制体内有害菌的生长,促进肠道健康,对肠道的微生物平衡有一定的促进作用,但是由于抗生素的使用会产生抗药性,并且在动物体内残留,抗生素不宜长期使用。而复合多糖作为一种绿色添加剂,通过调节微生物的平衡来达到促进动物健康的作用,因而它的效果要好于抗生素组。但抗生素与复合多糖的适当配伍或者先用抗生素清理肠道,再添加复合多糖往往会收到较好的效果。

对比添加复合多糖的处理 2、3、4 组和处理 6 组仔猪盲肠中乳酸杆菌数量,只有复合多糖添加量为 0.3%的试验 2 组仔猪盲肠乳酸杆菌数量显著高于抗

生素组($P<0.05$),而复合多糖添加量分别为 0.6%、0.9%的处理 3、4 组仔猪盲肠乳酸杆菌数量与抗生素组相比差异不显著($P>0.05$)。由此可见,添加 0.3%的复合多糖对动物机体的影响最大。

4 结论

4.1 大肠杆菌

中草药复合多糖可降低断奶仔猪的肠道大肠杆菌数量,从而在降低仔猪腹泻率、促进仔猪健康生产、减少疾病、提高生产性能方面发挥作用。

4.2 乳酸杆菌

日粮中添加白术等 7 种复合多糖能够显著的提高回肠、盲肠、结肠中乳酸杆菌的活力($P<0.05$),增进乳酸杆菌的数量。单一白术多糖也能显著地提高结肠与盲肠中乳酸杆菌数量,但是对回肠中的乳酸杆菌影响效果不显著。抗生素对结肠和回肠中乳酸杆菌数量影响显著,但对盲肠中乳酸杆菌数量影响不显著。

(参考文献 16 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

中所添加的鲜味剂主要是用蛤子香味、虾香味和海扇香味。另外,鲜味剂复合应用比单一应用的效果更好,如味精与食盐复合物能使味更浓,效果更好;鳗鲡的诱食物是由4种氨基酸复合配制:即饲料用丙氨酸 $2\ 850\times 10^{-6}(\text{m/m})$ 、甘氨酸 $5\ 080\times 10^{-6}(\text{m/m})$ 、脯氨酸 $2170\times 10^{-6}(\text{m/m})$ 、组氨酸 $390\times 10^{-6}(\text{m/m})$ (张乔,1995)。

核糖核苷酸类鲜味剂,最常用的是动植物的水解物或萃取物,如海藻提取物。把大型海藻(巨藻、海带)切碎后加水煮开,让水溶性物质溶出,经沉淀、浓缩,加进必要的填充剂制成核糖核苷酸类鲜味剂。动植物蛋白的水解物也同样具有鲜味,尤其是乌贼加工下脚料经酵母水解或自溶后所得物质具有浓烈的鱼腥味,俗称鱼腥香,在饲料中作为诱食剂添加。总之,凡是由天然食物提取的核糖核苷酸类鲜味剂都具有无毒性,可以安全地用于饲料,其限量范围是出于味质的刺激性和成本的考虑。

2.2 甜味剂

甜味剂可以作为饲料原料,也可作为饲料添加剂使用。作为原料时,蔗糖可以占对虾饲料原料的1%,糖蜜占鱼类饲料的2%;不用作原料时,其用量不超过原料成分的1%,主要是为提高饲料的甜度风味。

天然甜味剂分为营养型与非营养型,后者的甜度高于蔗糖,但相同重量的热值低于蔗糖。营养型甜味剂有蔗糖和葡萄糖,蔗糖是以糖类作物甘蔗、甜菜的茎经压榨后澄清、蒸发结晶而得,是公认为安全的添

加剂;葡萄糖是由食用淀粉类水解、干燥的产物,应用安全。非营养型甜味剂的天然品主要是甘草。甘草是多年生草本植物,将其根和根茎部清洗、干燥、粉碎后即可掺入饲料。甘草为天然品,无毒,是我国中医药最常用的解毒保肝药剂。

2.3 香味剂

天然香料作为食用的品种繁多,在日常生活中经常接触的“五香粉”、“咖喱粉”、“蒜泥”都是一些香味剂。香味剂在饲料中开发与应用的目的是提高饲料诱食性,并改变其水产品的风味,从而提高商品价值。

表1 几种天然香味剂的功能与安全用量

香味剂	功能	食品允许量($\times 10^{-5}$, m/m)
八角茴香	增香,抑制呕吐	500~1 050
桂皮	促进胃液分泌与血液循环	1 900
木香	促进肠蠕动,抗菌、抗病毒	1 500~9 000*
小茴香	减少胃肠气胀,抑吐增食	420~800
陈皮	健胃、驱风	3 000~9 000*
大蒜	杀菌、诱食	16(油)
丁香	促进胃液分泌,抗菌、抗病毒	810

注:*为中药用量。

表1介绍的是一些常用的食用香料及其安全用量,其安全用量以美国食用香料制造协会(Flavour Extract Manufacture's Association, FEMA)提出的食品允许量标准(凌关庭等,1999)。

3 香味剂的养殖试验

在鳗鲡粉末型饲料中添加风味剂,投喂白仔阶段幼鳗,养殖30 d后,试验结果见表2。

表2 欧洲鳗鲡饲料中添加香味剂的养殖试验结果(%)

组别	箱号	香味剂用量	成活率	成活率均值	增重率	增重率均值	增重率比例
A	1	0	96.4	95.7	-0.70	4.01	100
	2	0	95.0		8.74		
B	3	0.125	97.1	96.1	3.60	4.61	115
	4	0.125	95.0		5.62		
C	5	0.250	95.0	97.5	8.60	7.15	178
	6	0.250	100.0		5.69		
D	7	0.375	95.0	97.5	2.20	3.60	90
	8	0.375	100.0		5.00		

表2中的结果表明,饲喂添加风味剂饲料的欧鳗的成活率都比不添加风味剂的对照组的高;风味剂添加量在0.125%~0.250%范围欧鳗的增重率比对照组的高,但过高的添加量(0.375%)没有得到更高的增重率。

参考文献

1 张乔. 饲料添加剂大全 [M]. 北京: 北京工业大学出版社, 1995.

398~399

2 凌关庭. 食品添加剂手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 1999. 114~244

3 王渊源. 水产配合饲料[M]. 北京: 海洋出版社, 2005. 112~115

4 藤卷正生(夏云译). 香料科学 [M]. 北京: 轻工业出版社, 1988. 364~368

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

本栏目由北京挑战生物技术有限公司协办



诱变选育高产木聚糖酶

Nystatin 抗性菌株的研究

吴小刚 徐 燕 曾 莹

自然界中植物性原料主要由纤维素、半纤维素和木质素 3 种成分组成,其中半纤维素(主要是木聚糖)的含量可达 30%~35%,其在禾本科植物中含量最高。木聚糖是由木糖分子以 β -1,4 糖苷键连接而成的多聚体,外连阿拉伯糖和葡萄糖醛酸构成的侧链基团。木聚糖酶是专一降解木聚糖的一种复合酶,此外还有一些脱支链酶^[1]。由于木聚糖在植物性原料中大量存在,使得木聚糖酶的应用非常广泛,如可用于纸浆的制造和漂白,降低含氯化物用量,减少环境污染;在饲料上可以通过添加木聚糖酶来提高饲料的能量值和畜禽对饲料的利用率;在生物转化方面,木聚糖酶与其它酶共同作用可使农作物秸秆降解为戊糖、己糖等可发酵性糖,再用其它菌株发酵生产乙醇,从而可以解决能源日益短缺的问题。另外,木聚糖的水解产物——低聚木糖是一种很好的功能性低聚糖,可以添加到面包、酸性饮料以及发酵食品中,能够抗龋齿,促进肠内双歧杆菌的增殖,并可以促进机体对钙的吸收^[2]。

啤酒糟是啤酒酿造生产的主要副产物之一,据测定,鲜啤酒糟含水分 79.25%、粗蛋白 5.19%、粗脂肪 1.86%、粗纤维 1.41%、无氮浸出物 11.51%、灰分 0.78%。其中无氮浸出物的主要成分是木聚糖,可作为木聚糖酶合成的诱导物^[3]。长期以来,我国的啤酒糟主要直接用作农家饲料,用途有限,利用率低。本研究以黑曲霉为出发菌株,用 NaNO_2 单因素诱变方法及 NaNO_2 和其它理化因素(LiCl 、UV)的复合诱变方法,对出发菌株进行诱变筛选,从而得到具有 Nystatin 抗性的高产木聚糖酶菌株。这不仅为综合开发利用啤酒糟这一再生资源开辟新途径,还可有效避免啤酒糟对环境的污染。因此,该研究具有显著的社会效益和经济效益。

1 材料与仪器

吴小刚,湖北工业大学生物工程学院,430068,湖北武汉。

徐燕,湖北轻工职业技术学院。

曾莹,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-01-15

★ 湖北省科技厅攻关项目(2004AA104B03)

1.1 菌种

黑曲霉:由湖北工业大学微生物实验室提供。

1.2 培养基

初筛培养基(出发株筛选): NaNO_3 2 g、 K_2HPO_4 1 g、 KCl 0.5 g、 MgSO_4 0.5 g、 FeSO_4 0.01 g、CMC-Na 10 g、水 1 000 ml。

复筛培养基(基础培养基):葡萄糖 0.5 g、 NH_4NO_3 2 g、 CaCl_2 1 g、Tween80 1 g、啤酒糟 60 g、麸皮 20 g、玉米芯 20 g、水 100 ml。

木聚糖培养基(突变株筛选): NaNO_3 2 g、 K_2HPO_4 1 g、 KCl 0.5 g、 MgSO_4 0.5 g、 FeSO_4 0.01 g、木聚糖 10 g、水 1 000 ml。

1.3 主要试剂及仪器

木聚糖由武汉市华顺生物技术有限公司提供;亚硝酸钠为分析纯,由河南焦作市化工三厂提供;氯化锂为分析纯,由无锡市民丰试剂厂提供;其它均为国产分析纯试剂。

722S 可见分光光度计由上海精密科学仪器有限公司提供;洁净工作台由天津市泰斯特仪器有限公司提供;HQ45 恒温摇床由中国科学院武汉科学仪器厂提供。

2 方法

2.1 出发菌株的筛选^[4]

2.1.1 出发菌株的初筛

利用透明圈法,将菌种点植于初筛平板培养基上,置 30℃下培养 48 h,分别测定菌落直径和透明圈直径,计算 HC 值(透明圈直径/菌落直径)。

2.1.2 出发菌株的复筛

利用固态发酵法,将 HC 值高的 4 个菌株的孢子悬浮液定量接入复筛培养基中,摇匀后置 30℃培养 72 h,测定酶活。

2.2 出发菌株的诱变选育

用 NaNO_2 单因素诱变及 NaNO_2 和其它理化因素(LiCl 、UV)的复合诱变,对出发菌株进行诱变处理,将经诱变处理过的菌液涂于含有抑菌浓度的 Nystatin 选择培养基上,置 30℃培养,从中筛选得到具有 Nystatin 抗性的高产木聚糖酶菌株。

2.2.1 Nystatin(制霉菌素)对出发菌株最低抑菌浓度

(MIC)的测定

制成含系列浓度 Nystatin 的平板(0、5、10、15、20、25、30、35、40 $\mu\text{g/ml}$)。用单孢子悬液点植平板,倒置 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。

2.2.2 菌种的理化诱变^[5]

诱变方法: NaNO_2 单因素诱变; NaNO_2 与 LiCl 、UV 的复合诱变。

致死率(%)=(未诱变处理的总菌数-诱变处理后长出的菌数)/未诱变处理的总菌数。

2.2.2.1 用亚硝酸钠诱变(亚硝酸钠的致死曲线)

用 0.6 M NaNO_2 在梯度时间段内诱变单孢子悬液,用上述处理过的单孢子悬液 0.2 ml 涂平板,最后倒置 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 60 h,计算致死率,绘制致死曲线。

2.2.2.2 用氯化锂(LiCl)诱变(氯化锂的致死曲线)

在培养基中加入 LiCl ,使 LiCl 的浓度分别为 0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%,然后用单孢子悬液 0.2 ml 涂平板,最后倒置 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 60 h,计算致死率,绘制致死曲线。

2.2.2.3 复合因素诱变

NaNO_2 与 LiCl 的复合诱变; NaNO_2 与 UV 的复合诱变。

2.2.3 突变株的筛选^[6]

2.2.3.1 用含有 Nystatin 的选择性培养基筛选 Nystatin 抗性菌株(双层平板法)

将经诱变处理过的单孢子悬液直接涂在含有 MIC 的 Nystatin 的双层平板上,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养。其中,上层平板为加入 MIC 的 Nystatin 的木聚糖培养基,下层平板为初筛培养基。

2.2.3.2 突变株的初筛

将诱变出来的菌株点植于初筛平板培养基上,置 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 40 h,分别测定菌落直径和透明圈直径,计算 HC 值,挑选透明圈大的突变株。

2.2.3.3 突变株的复筛

将初筛出来的透明圈大的突变株接入复筛培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 60~65 h,测定酶活。

2.3 酶活的测定^[7]

DNS 法:取 0.1 ml 适当稀释的粗酶液,将 0.9 ml 用 pH 值为 4.6 的醋酸缓冲液配制的 1% 木聚糖液于比色管中,40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min,取出加入 2 ml DNS,沸水浴加热 3 min,用 DNS 法测定还原糖(以木糖计);取 0.9 ml 用 pH 值 4.6 醋酸缓冲液配制的 1% 木聚糖液于比色管中,40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min,取出加入 2 ml DNS,再加入 0.1 ml 适当稀释的粗酶液,沸水浴 3 min,用于作对照。用 722S 分光光度计在 495 nm 处测定其吸光值。

酶活单位定义为:在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下,每克鲜曲每分钟

水解木聚糖产生相当于 1 μmol 还原糖(木糖)所需的酶量为一个酶活单位(IU)。

即:木聚糖酶酶活= $0.1 \times N \times G / (150.13 \times 10 \times \text{鲜曲重})$ 。

式中:N——酶液稀释倍数;

G——每毫升酶解液中木糖的含量(μg);

150.13——木糖分子量;

10——酶解时间(min);

0.1——加酶量(ml)。

3 结果与分析

3.1 出发菌株的筛选结果

3.1.1 出发菌株的初筛

出发菌株初筛时,筛出 HC 值较大的菌株 4 株,它们的 HC 值见表 1。

表 1 初筛时测得的 HC 值

菌号	1	2	3	4
HC 值	1.412	1.385	1.348	1.377

3.1.2 出发菌株的复筛

对初筛出的 1~4 号菌株固体发酵培养,测定木聚糖酶酶活,结果如图 1。

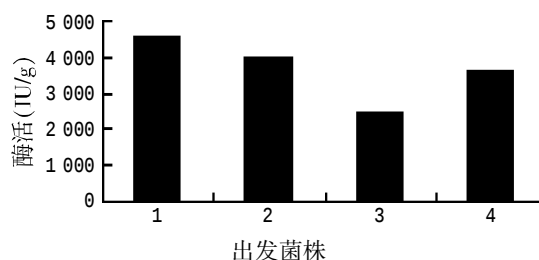


图 1 出发菌株复筛时酶活测定

由图 1、表 1 可知,1 号菌株 HC 值最大,酶活也最高,其酶活达到了 4 589.4 IU/g。所以,决定以 1 号菌株为出发菌株。

3.2 Nystatin 对出发菌株最低抑菌浓度(MIC)的测定

含系列浓度 Nystatin 的平板菌落的生长情况见表 2。

表 2 平板菌落的生长情况

抑菌浓度	0	5	10	15	20	25	30	35	40
黑曲霉 1	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
黑曲霉 2	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
黑曲霉 3	+++	+	-	-	-	-	-	-	-

注:“+”表示长菌;“-”表示不长菌。

由表 2 可见,Nystatin 对出发菌株的最低抑菌浓度(MIC)为 20 $\mu\text{g/ml}$ 。

3.3 菌种的理化诱变

3.3.1 NaNO_2 诱变处理致死曲线(见图 2)

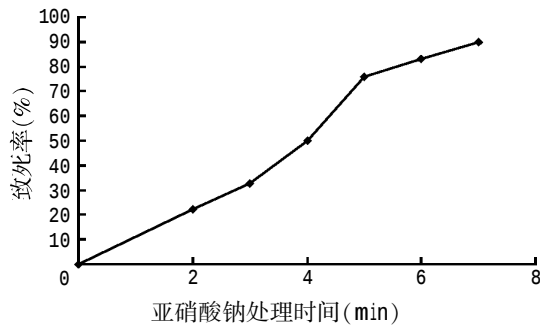


图2 NaNO₂ 诱变处理致死曲线

3.3.2 LiCl 诱变处理致死曲线 (见图 3)

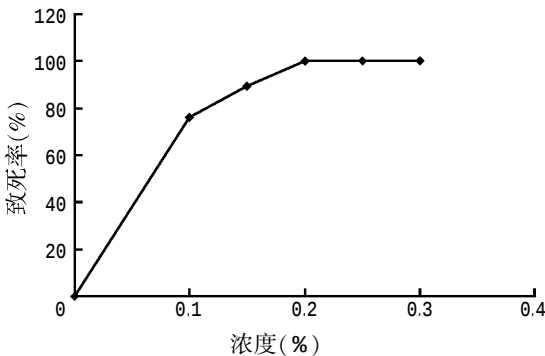


图3 LiCl 诱变处理致死曲线

从图 2、图 3 中可以看出: 处理时间为 3 min 的 NaNO₂ 致死率为 32.9%; 处理时间为 5 min 的 NaNO₂ 致死率为 75.77%; 处理时间为 7 min 的 NaNO₂ 致死率为 89.99%。为此, 选用处理时间为 7 min(致死率为 89.99%) 的 NaNO₂ 进行单因素诱变; 选用处理时间为 5 min(致死率为 75.77%) 的 NaNO₂ 与处理剂量为 0.05% (致死率为 20%~30%) 的 LiCl 进行复合诱变; 选用处理时间量为 5 min(致死率为 75.77%) 的 NaNO₂ 与处理时间为 0.5 min(致死率为 20%~30%) 的 UV 进行复合诱变。

3.4 突变菌株的筛选

3.4.1 突变菌株的初筛

诱变处理的突变菌株点植平板测得的 HC 值见表 3。

表 3 突变株初筛时测得的 HC 值

菌号	HC 值	菌号	HC 值	菌号	HC 值
H-1	1.650	H-Li-1	1.673	H-UV-1	无
H-2	1.693	H-Li-2	无	H-UV-2	1.681
H-3	1.701	H-Li-3	无	H-UV-3	1.647
H-4	无	H-Li-4	1.677	H-UV-4	无
H-5	1.473	H-Li-5	1.340	H-UV-5	无
H-6	1.680	H-Li-6	无	H-UV-6	1.457
H-7	无	H-Li-7	无	H-UV-7	无
H-8	无	H-Li-8	无	H-UV-8	无

注: H-表示 NaNO₂ 单因素诱变菌株; H-Li-表示 NaNO₂ 和 LiCl 复合诱变菌株; H-UV-表示 NaNO₂ 和紫外线复合诱变菌株。

由表 3 可见, 突变株的初筛得到 HC 值大于 1.6 的菌株有: NaNO₂ 单因素诱变菌株 4 株; NaNO₂ 和 LiCl 复合诱变菌株 2 株; NaNO₂ 和 UV 复合诱变菌株 2 株。

3.4.2 突变株的复筛

从初筛中挑选出 HC 值>1.6 的菌株 8 株进行斜面传代接种, 固态发酵复筛, 测定酶活, 结果见表 4。

表 4 突变株复筛测得的酶活(IU/g)

菌株编号	酶活	菌株编号	酶活
H-1	5 195.5	H-Li-1	5 303.7
H-2	5 811.6	H-Li-4	5 511.9
H-3	6 044.8	H-UV-2	5 686.7
H-6	5 520.2	H-UV-3	4 979.0

由表 4 数据可得, 突变菌株 H-3 的酶活最大, 酶活达到 6 044.8 IU/g, 其酶活比出发菌株提高了 31.71%。所以, 可以决定选用突变菌株 H-3 来进行产酶条件的优化。

用 NaNO₂ 单因素诱变菌株所得的突变株的酶活较高, 比 NaNO₂ 与 LiCl、UV 复合诱变的效果要好。

4 结论

用稀释平板法进行分离纯化菌种(黑曲霉), 用经过改进的查氏培养基进行初筛, 用固态发酵法并通过测酶活进行复筛得到出发菌株。用 NaNO₂ 单因素及 NaNO₂ 与 LiCl、UV 的复合诱变因素对出发菌株进行诱变, 用含有 MIC 的 Nystatin 选择培养基筛选 Nystatin 抗性菌株, 得到具有 Nystatin 抗性的产木聚糖酶的高产菌株, 其酶活达到 6 044.8 IU/g, 比出发菌株的酶活提高了 31.71%。

参考文献

- Woodward J. Xylanase functions, propertise and applications[J]. Topics in Enzyme and Fermentation Technology, 1984(8): 29~30
- 江正强. 微生物木聚糖酶的生产及其在食品工业中应用的研究进展[J]. 中国食品学报, 2005, 5(3): 25~27
- 牟德华, 李艳. 啤酒糟的成分分析及综合利用[J]. 食品科学, 1991(9): 28~31
- 曾莹, 熊志刚, 李彦. 固态发酵啤酒糟产木聚糖酶的菌种筛选及其产酶条件研究. 中国酿造, 2005, 14(4): 22~24
- 陈红歌, 刘新育, 张世敏, 等. 木聚糖酶高产菌株的诱变. 微生物学通报, 2004, 31(6): 22~23
- 汪世华, 胡开辉. 木聚糖酶高产菌株的诱变育种及产酶条件研究. 江西农业大学学报, 2005, 27(4): 17~19
- 李彩霞, 房桂干, 刘书钗. 木聚糖酶酶活的具体测定方法. 林产化工通讯, 2001, 35(1): 15~16

(编辑: 高 雁, snowyan78@tom.com)

植酸酶在饲料中的应用研究进展

代发文 周响艳 李富伟

近年来植酸酶在畜牧业中的应用越来越普遍,其使用效果也得到认同。试验证明,在猪和鸡日粮中添加适量植酸酶能取得很好的应用效果,一方面植酸酶水解植酸盐释放出很大比例植酸结合态的磷,既降低了无机磷添加量,又增加了饲料配方空间,同时降低粪磷排泄量可达 20%~50%;另一方面,植酸酶具有潜在的营养价值,添加适量的植酸酶可以提高微量元素、蛋白质和能量的利用率。本文针对当前植酸酶在畜牧业中的应用情况进行综述,探讨植酸酶应用效果及其影响因素,以期对植酸酶的合理应用进行适当的总结和思考。

1 植酸的抗营养作用

植物性饲料原料中大约 60%~80%磷以植酸盐形式存在,表 1 列出了一些常见饲料原料中植酸磷的含量。在猪和鸡肠道内平均每摩尔植酸能够结合 3~6 mol 钙形成不溶性植酸钙,降低钙和磷利用率。植酸还可络合微量元素使其难以被动物吸收利用,其中络合 Zn 和 Cu 能力最强。此外,植酸对蛋白质和氨基酸吸收也存在负面作用。在动物胃肠道内植酸能抑制胃蛋白酶和胰蛋白酶的作用。在酸性条件下,植酸的碱性磷酸基团结合赖氨酸、组氨酸和精氨酸等;在中性条件下,一些氨基酸的羧基还可与植酸、或与植酸结合的二价或三价金属离子络合形成植酸-蛋白质或植酸-金属离子-蛋白质复合物,从而降低蛋白质利用率。

表 1 一些常见饲料原料中植酸磷含量(%)

原料	总磷	非植酸磷	植酸磷占总磷的百分比
玉米	0.28	0.08	71.5
大麦	0.36	0.17	52.8
麦麸	1.15	0.20	82.6
豆粕(44% CP)	0.65	0.27	58.5
豆粕(48% CP)	0.62	0.22	64.6
棉籽粕(41% CP)	0.97	0.22	77.4
菜籽粕(38% CP)	1.17	0.30	74.4
葵花籽粕(45% CP)	1.00	0.16	84

注:资料来源(NRC,1994)。

代发文,华南农业大学动物科学学院,510642,广州。

周响艳,单位及通讯地址同第一作者。

李富伟,北京挑战生物技术有限公司。

收稿日期:2007-01-17

2 植酸酶的来源和特点

植酸酶广泛存在于微生物、植物和一些动物组织中。Nys 等(1996)指出,在猪和家禽消化道内降解植酸的植酸酶有 4 种可能来源:动物肠道组织分泌的植酸酶;饲料原料中存在的内源性植酸酶;肠道内微生物产生的植酸酶;外源微生物产生的植酸酶。Liebert 等(1993)报道,鸡的胃和小肠内容物植酸酶活性很低。Yi 等(1996)报道,猪的胃和肠道中的内容物植酸酶活性也存在类似的情况。不同来源的植酸酶作用机理也有所不同。微生物来源的植酸酶水解磷酸盐基团首先发生在 3 号碳原子位置,而植物来源植酸酶作用位置不同,首先发生在 6 号碳原子。此外,外源微生物(曲霉)产生的植酸酶有两个最适 pH 值,分别为 2.5 和 5.5;而植物性饲料原料中内源性植酸酶只有一个最适 pH 值,为 5.2。植酸酶作为畜禽饲料中植酸水解最为有效的催化剂,是近年来畜牧业应用研究的热点。

3 植酸酶在猪和鸡饲料中的应用效果

3.1 提高钙、磷的利用效率

大量文献报道显示,在猪和鸡日粮中应用植酸酶能够有效提高钙和磷的生物利用效率,降低磷排泄量,有助于降低畜牧业对环境所造成的压力。Leske 等(1998)报道,在肉鸡和蛋鸡豆粕、玉米和米糠日粮中添加 300 U/kg 植酸酶,植酸磷水解率分别提高 36.7、29.0 和 14.8 个百分点,总磷存留率分别提高 16.6、16.1 和 7.1 个百分点。张洁等(2005)在含 8%的双低菜籽饼的肉鸡日粮中添加 600 U/kg 的植酸酶替代不同比例的磷酸氢钙,结果表明,使用植酸酶替代 1/2、4/5 的磷酸氢钙,可显著提高钙、磷的利用率,并且明显地降低磷的排泄量。于明等(2004)报道,用 35~70 kg 的杜长二元杂交阉猪进行代谢试验,添加植酸酶可使小麦、高粱和稻谷总磷表观消化率分别提高 27.64%、47.87%和 41.84%($P>0.05$),磷的沉积率也分别提高 27.98%、47.35%和 40.63%($P>0.05$);粪磷含量分别减少 49.05%、52.88%和 58.82%。植酸酶在提高磷利用率的同时也增加钙的沉积。陈文等(2005)报道,仔猪饲料中添加植酸酶后血清磷浓度趋于升高,血清钙、碱性磷酸酶活性有降低趋势,钙、磷利用率提高。

在实际生产中人们常用钙、磷等价量来描述植酸酶能够替代的钙或磷添加量,表 2 中总结了一些关于植酸

酶等价量的报道。从现有植酸酶应用研究报道可以看出,在低磷日粮中添加植酸酶效果更佳,钙和磷沉积并

不会随植酸酶的添加剂量增加而呈线性增加,在生产中应该根据实际情况确定植酸酶的适宜添加剂量。

表 2 植酸酶在猪和鸡日粮应用中的钙磷等价量

植酸酶添加量	试验动物	等价量	资料来源
500 U/kg	猪	1.0 g 无机磷	Radcliffe 等(1998)
500 U/kg	猪	0.8 g 可吸收磷和 0.4~0.7 g 可吸收钙	Jongbloed 等(1996)
500~750 PTU/kg	猪	0.15%饲料无机磷	易中华等(2004)
750 FTU/kg	仔猪	1 g 以上无机磷	陈文等(2005)
200~300 U/kg	蛋鸡	0.5~1.2 g 磷酸氢钙	Gordon 等(1997)
500 U/kg	肉鸡	0.46 g 钙	Schoner 等(1994)

3.2 提高蛋白质和氨基酸的利用率

植酸在酸性和中性条件下都能结合蛋白质和氨基酸,如果植酸被植酸酶水解,就能降低其抗营养作用。易中华等(2005)报道,添加植酸酶显著提高艾维茵肉鸡日增重和日采食量,显著提高了肉鸡氮利用率并大幅度降低氮排放量。猪日粮中植酸酶的应用也存在类似的情况。Kemme(1998)通过瘰管手术测得添加 800 U/kg 和 900 U/kg 微生物源植酸酶能提高猪对氮和大多数氨基酸的回肠表观消化率。蔡青和等(2004)报道,断奶仔猪日粮中添加植酸酶,日粮中蛋白质消化率提高了 2.8%,改善了氨基酸回肠表观消化率,His、Ile、Leu、Lys、Met 的消化率分别提高 11.7%、2.7%、6.2%、5.4%、1.1%。由此可见,应用植酸酶可以改善猪和鸡蛋白质和氨基酸利用率,同时降低蛋白质和氨基酸的排泄量。

3.3 对微量元素利用率的影响

植酸可结合微量元素 Fe、Cu、Mn、Zn、Co 和 Se 等,其中结合 Zn 和 Cu 能力最强。大量文献报道揭示,在猪和鸡日粮中应用植酸酶对微量元素的利用有积极作用。Revy 等(2004)通过比较在含 32 mg/kg 锌的仔猪基础日粮中添加 20 mg/kg 锌或 1 200 U/kg 植酸酶的锌生物利用率,结果发现,添加植酸酶的效果优于添加锌组,血清碱性磷酸酶和锌浓度及骨中锌浓度和锌沉积都较好,同时植酸酶还改善了仔猪 Ca、P、Mg、Fe 和 Cu 的利用率。而 Zacharias 等(2003)报道,25~55 kg 猪日粮中添加植酸酶会导致铜需要量有轻微的提高,而高铜日粮可以克服植酸酶对铜利用率的负面效果,并指出这可能是由于植酸酶水解植酸盐释放出锌,进而锌拮抗铜的吸收利用。Morris 等(1980)认为,用植酸与锌的比值(不超过 15~20)和植酸与钙、锌摩尔比的乘积(不超过 3.5)评定锌的利用率比仅用日粮锌的含量更准确。戴求仲等(2004)指出,这两个值在临界值以上时添加植酸酶或锌能够提高动物的生产性能

和锌的利用率,但当这两个值降到接近临界值时,添加植酸酶并同时增加日粮锌水平,对改善动物生产性能的效果并不理想。关于添加植酸酶对猪、鸡微量元素吸收利用的影响仍需进一步研究验证,需注意各种微量元素之间固有的协同和拮抗关系。

3.4 促进能量代谢

大量研究显示,应用植酸酶能够促进猪和鸡的能量代谢。Selle(1999)等研究指出,在肉鸡高粱—豆粕—菜粕—棉粕—麦麸配合日粮中添加植酸酶,代谢能显著升高。Johnston 等(2004)为测定植酸酶对猪能量消化率的影响,试验设计了 4 种日粮:①含 0.50% 钙和 0.19% 有效磷的玉米—豆粕型日粮;②含 0.40% 钙和 0.09% 有效磷的玉米—豆粕型日粮;③日粮①+ 500 U/kg 植酸酶;④日粮②+500 U/kg 植酸酶,通过回肠瘰管收取食糜,结果显示,在低钙磷日粮中添加植酸酶显著提高回肠淀粉和干物质及能量消化率。植酸酶能够促进猪和鸡的能量代谢可能是由于植酸酶水解植酸释放出淀粉或者淀粉酶,增加了对碳水化合物的消化代谢。

4 植酸酶应用中的影响因素

4.1 日粮原料组成

植酸酶的应用效果主要体现在其对植物性饲料原料的作用,故在哺乳仔猪料中添加植酸酶的效果不佳。不同的饲料日粮由于原料组成的差异植酸酶的应用效果和效果增幅空间也有所不同。孙育平等(2005)通过体外法研究了外源植酸酶对不同饲料原料中钙和磷利用率的影响表明,添加外源植酸酶显著提高豆粕、花生粕和菜粕中钙和磷的释放量,但对大麦和高粱中无机磷的释放没有显著影响。随着非常规饲料原料,如菜粕、棉粕、花生粕、高粱等的使用日益普遍,需加强植酸酶在非常规饲料中的应用研究,为合理设计饲料配方提供应用理论基础。

4.2 日粮钙磷比

植酸酶的添加效果将会受到日粮中钙磷水平、钙磷比值以及植酸磷水平的影响。如果钙磷比例过高,过量的钙在肠道内形成大量的不溶性植酸钙,从而植酸酶难以接近植酸分子而发挥作用。在肉鸡日粮中总钙与总磷比值在 1.1~1.4 时效果相当,超过这个比例时生产性能、磷利用效率和骨骼矿化效率都会降低。花薇等(2006)研究了植酸酶、非植酸磷和钙水平的不同组合对艾维茵肉仔鸡生长性能、死淘率、屠宰性能及肉品质的影响,结果表明,饲粮中添加非植酸磷 0.28%+钙 0.80%+植酸酶 600 FTU/kg 时,肉仔鸡的综合效益较佳。

植酸酶应用效果随着日粮中钙磷比值的增大而降低。Liu 等(1998)报道,当生长肥育猪日粮中钙磷比值从 1 增加到 1.5 时,平均日增重、磷消化率和掌骨硬度分别下降了 4.5%、8.2%和 9.7%。这可能是由于过量的钙结合植酸形成难溶性复合物或是过量的钙直接竞争植酸酶酶活位点而抑制酶活性,从而降低磷和其它养分的释放。

4.3 酸化剂

日粮中添加有机酸降低日粮 pH 值,进而能降低畜禽胃肠道内 pH 值。如前所述,微生物来源植酸酶有两个最适 pH 值位点 2.5 和 5.5,胃肠道内低 pH 值将有助于植酸酶作用的发挥。陈冬梅(2004)采用 2×2 因子试验设计,研究肉鸡日粮添加植酸酶和柠檬酸对钙、磷利用率的影响,结果表明,300 g/t 植酸酶和

0.5%柠檬酸合用存在协同效应,能进一步提高钙、磷利用率。龚一峰等(2005)研究了内源性及细菌性植酸酶和柠檬酸在低营养日粮中对肉鸡生长的作用,结果表明,3 者同时添加时蛋白质和钙的利用率极显著提高。汪莉等(2005)研究植酸酶和柠檬酸结合使用对蛋鸡生产性能的影响,蛋鸡日粮中添加 0.2%柠檬酸与 50 mg/kg 植酸酶,提高了蛋鸡的生产性能。而 Brenes 等(2003)报道,添加柠檬酸对植酸酶促进肉鸡生产性能作用产生负面影响,但有提高钙、镁和锌等矿物元素生物利用率的效用。关于植酸酶和酸化剂之间的关系仍需大量的试验进一步研究论证。

5 结语

当前在猪和鸡配合饲料中应用植物性饲料原料的比例很大,而植物性饲料中植酸会结合大量的矿物质、氨基酸、蛋白质和淀粉,降低了营养成分的利用率。当添加植酸酶时,这些营养成分的利用率会得到一定程度的改善。同时适当添加植酸酶,磷、钙和氮的排泄量减少,又可降低畜牧业对环境污染的潜在威胁。植酸酶应用效果受到很多因素的影响,如饲料的原料组成、植酸磷含量、钙和磷水平及钙磷比和酸化水平等。随着植酸酶应用机理研究的深入,植酸酶在畜牧业中的应用必将越来越广泛。

(参考文献 30 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

· 信息采撷 ·

越南市场发现“苏丹红”禽蛋

据越南媒体日前报道,越南南方部分省市的禽蛋被发现含有致癌物“苏丹红”,这已经导致越南各地禽蛋销量大幅下跌。

据报道,越南胡志明市色谱发展中心对部分省市的禽蛋进行抽样检验发现,在南部胡志明市、芹苴市、前江省、同塔省等越南南部省市市场上采集的 19 个禽蛋样本中,有 9 个含有“苏丹红”,其中 4 个样本所含“苏丹红”的比例相当高。

报道说,这一消息披露后,越南禽蛋销量大跌,南部市场禽蛋销量目前已减少 60%至 80%。尽管河内禽蛋尚未发现有“苏丹红”的消息,但禽蛋销量也下降了一半。

目前,越南卫生部门已经针对这一事件展开市场取样检验。越南国家营养学院 1 月 30 日曾表示,常规检测结果显示,越南北部地区禽蛋中尚未发现“苏丹红”。

“苏丹红”学名叫苏丹,共分为 I、II、III、IV 号,都是工业染料。其中“苏丹红 IV 号”不但颜色更红艳,毒性也更大。国际癌症研究机构将“苏丹红 IV 号”列为三类致癌物。

酶 制 剂 在 家 禽 麦 类 饲 料 中 的 应 用

刘莉君 程茂基

在家禽饲养上,人们通常把玉米作为主要的能量饲料。随着我国规模养禽业的迅速发展,对饲料原料的需求量日益增加,很多地区玉米已供不应求,这就促使人们考虑用小麦、大麦和燕麦等来饲养家禽。但是,由于大麦、小麦、燕麦、黑麦等含有大量的非淀粉多糖(non-starch polysaccharides, NSP),妨碍营养物质充分消化吸收,往往造成家禽饲料利用率降低、家禽生长不良以及排泄粘粪、污染环境等,限制了这类饲料原料在家禽日粮中的广泛应用。大量实验证明,在以大麦、燕麦为基础日粮的家禽饲料中添加酶制剂能有效提高饲料利用率,改善家禽生产性能,可以充分发挥大麦、小麦这类低能值饲料的生物学潜能。

1 家禽麦类饲料中非淀粉多糖的种类

非淀粉多糖是指植物组织中除淀粉外所有碳水化合物的总称,包括纤维素、半纤维素和果胶类物质等。阿拉伯木聚糖和 β -葡聚糖属于半纤维素类,是与家禽关系最为密切的两类非淀粉多糖,是当前研究的热点。其中阿拉伯木聚糖主要存在于小麦和黑麦中, β -葡聚糖主要存在于大麦和燕麦中。 β -葡聚糖又称 β -1,3,1,4 葡聚糖,是自然界合成量最多的多聚糖。 β -葡聚糖分子类似纤维素分子,比纤维素易溶于水。阿拉伯木聚糖主要由两种戊糖——阿拉伯糖和木糖组成。另外,根据 NSP 的水溶性分为可溶性 NSP 和不溶性 NSP。许多研究者已经证明,与抗营养反应有关的主要是可溶性 NSP,而并非所有的 NSP。

2 家禽麦类饲料中非淀粉多糖的抗营养机理

2.1 物理屏障

由于细胞壁的主要成分是由非淀粉多糖构成的,它们包裹着淀粉、蛋白质等养分,阻止其和消化酶的相互作用。由于家禽体内不存在分解 NSP 的酶,因而这种阻碍作用可能会相当大。

2.2 粘度效应

β -葡聚糖和戊聚糖进入消化道后会部分溶解,增加食糜的粘度,并且会吸水膨胀,增大肠道的体积。肠

道内容物的体积和粘度的任何增大都会降低酶和底物的扩散率,阻止它们在肠粘膜上的有效反应。

2.3 引起消化道生理变化

粘性多糖与小肠上皮粘膜细胞上的糖蛋白相结合,形成一层加厚的不动水层,限制了吸收速度,同时粘性多糖引起动物消化系统生理及形态上的改变,导致水、蛋白质、电解质及脂类内源分泌的大量增加,这种代谢过程的消耗将会相当大,这种变化的结果是消化器官增大,消化液分泌增多,但养分的吸收却下降。

2.4 对肠道微生物区系的影响

粘性多糖能降低食糜的通过速度,使食糜在小肠中的停留时间增加,明显增加了小肠微生物的生长。目前尚不知区系的改变是否带来负面效应,但是已知有些微生物的迅速繁殖会在体内产生一些毒素。有试验证明,日粮中添加抗生素能缓解高水平 NSP 的抗营养作用。

3 酶制剂的一般作用机理

3.1 直接分解底物,供给机体营养

酶制剂最主要的特点是作为一种生物催化剂,常温、常压下高效地催化专一的底物。植物饲料中的营养物质大多是由生物多聚体组成,而动物本身往往缺乏或分泌不足消化它们的酶类,需添加外源酶制剂帮助其消化。外源酶制剂的添加可以帮助机体有效地将一些大分子多聚体消化成可直接供肠道吸收的营养物质,或分解成为小片段,供其它酶进一步消化。

3.2 去除抗营养因子,改善消化机能

在燕麦、大麦、小麦等饲料中含有较多的非淀粉多糖(NSP),尤其是可溶性 NSP,具有粘稠性,可增加肠道食糜的黏度。如饲喂大麦和黑麦日粮的 21 日龄肉鸡的肠道黏度分别为饲喂玉米日粮的 10 倍和 100 倍以上(De Silva, 1983; 韩正康, 1996)。肠道食糜黏度的增加可明显减慢消化速度,从而减慢营养物质从日粮中溶出的速度,影响肠道消化能力。在饲料中加入含 β -葡聚糖酶的酶制剂,可以将饲料中的 NSP 降解成小分子片段寡糖或二糖,消除因肠道食糜粘度增加而引起的抗营养作用,改善消化机能。

3.3 激活内源酶分泌,提高饲料消化率

在大麦日粮中添加粗酶制剂,能使鸡小肠食糜的淀粉酶酶活升高;在 21 日龄鸭日粮中添加粗酶制剂,

刘莉君,安徽农业大学动物科技学院,230036,合肥。

程茂基(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-06

能使小肠食糜中淀粉酶酶活增加;鹅饲料中添加外源酶制剂,能影响鹅胰腺和小肠食糜的消化酶活性;未成年以及在病态、应激状态下畜禽的体内,酶分泌量会明显不足,酶制剂的添加可提供更多可供分解的基质而刺激内源消化酶的分泌增多,从而提高饲料的消化率。

3.4 参与动物内分泌调节,影响血液成分

有研究报道,在日粮中添加粗酶制剂可影响动物血液中蛋白质、血糖、尿酸以及激素水平。饲喂大麦基础饲料的肉鸭,42日龄时血清蛋白含量显著高于21日龄时的,而血糖和尿酸水平则明显降低。在高蛋白饲料条件下添加酶制剂,能提高21日龄及42日龄肉鸭的血清蛋白含量,明显降低血液中尿酸及21日龄时血糖水平。血液中蛋白质和尿酸水平的改变,增进了动物健康,改善了胴体品质。

粗酶制剂可提高雏鹅血清中IGF-1的浓度,增加生长鹅和成年鹅血浆中IGF-1和GH水平,从而促进生长(艾晓杰等,2001)。大麦饲料中添加粗酶制剂还能提高雏鸡淋巴细胞对植物血凝素(PHA)刺激的反应,提高雏鸡细胞免疫能力(赵志辉等,1999)。

4 在以麦类饲料为基础日粮中添加酶制剂对家禽的影响

4.1 促进家禽对饲料中营养物质的消化吸收

研究表明,酶制剂可裂解饲料中纤维的细胞壁,使家禽有利于消化其中的营养物质,提高饲料的利用率;还可以使消化过程转移至肠道,促进机体对养分的吸收,提高饲料的消化率和利用率。

4.2 提高家禽生产性能,降低料肉比

大量试验表明,在饲料中添加酶制剂可以提高禽类的生产性能,降低料肉比。H. Gahan报道,在以小麦为基础的肉鸡日粮中添加木聚糖酶为主的非淀粉多糖酶制剂,可以改善胴体品质,减少胴体脂肪含量。另据国外资料显示,饲料中添加0.1%粗酶制剂,可以提高鸡对大麦日粮中淀粉、脂肪和蛋白质的消化率,从而提高鸡的生产性能。

Szczurek W(2005)报道,在罗斯肉鸡日粮中添加酶制剂可以明显提高肉鸡的胸肌和大腿肌的重量。Osei S A和Oduro S(2000)研究发现,在小麦基础型日粮中添加酶制剂,试验组比对照组饲料消耗率减少10%~15%,并且明显的增加了饲料转化率和生长率;在7周龄肉鸡中添加的酶水平分别为100和200 g/kg比对照组中鸡大约增重1.9%和5.8%,并且试验组鸡的屠体重也显著增加($P<0.05$)。

4.3 保护生态环境

由于酶制剂的使用,使饲料养分利用率提高,降低了粪便中有机物的排泄量,减少了环境污染。如肉鸡中应用植酸酶使磷的排泄量降低40%(Simons PCM等,1991)。另外,酶制剂降低NSP的抗营养作用,消化道食糜黏度降低,排泄物中粘性和水性粪便的发生率下降(Braufau等,1993),改善了环境,并减少脏蛋造成的损失。

另有研究显示,添加酶制剂通过对微生物发酵及微生物区系产生影响而改善动物健康有一定益处(Morgan和Bedford,1995)。

5 影响酶制剂使用效果的因素

酶制剂的添加效果存在很大差异,这是因为有许多因素都会对酶使用效果产生影响,如原料、动物因素、施药途径等都会显著影响饲用酶制剂的使用效果。

酶制剂作用具有高度的专一性,只能作用于具有特定化学键的底物,饲料原料结构不同,酶作用的底物也不同,因而效果不同。即使是同一种物质由于来源不同、产地以及不同品种的饲料其营养成分及抗营养因子含量、结构已存在差异,因而效果也就不同。不同动物以及同一动物的不同年龄阶段的消化生理存在差异。施药途径的不同也能够影响酶制剂的作用效果。酶制剂在麦类饲料代替玉米作为家禽日粮中的应用有着非常重要的作用,应用前景十分广阔。

(参考文献18篇,刊略,需者可函索)

(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

肉毒碱和果寡糖对鲢鱼幼鱼消化率影响的研究

蔡立胜 吴天星 潘晓东 丁雪艳 董本详

鲢鱼(*Milichthys miiuy*)原产于北太平洋西部,为我国名贵的海洋经济鱼类之一。近年来,由于鲢鱼人工繁育技术取得了较大成功,已逐步成为我国东南沿海养殖的优良品种。试验研究了肉毒碱和果寡糖对鲢鱼基础日粮各主要营养素消化率的影响。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验鱼采自象山沪港网箱养殖区,选用健康且体重为(1.5±0.5) g 的鱼。配合饲料由宁波天邦股份有限公司精加工而成,主要原料是红鱼粉、豆粕、玉米蛋白粉、面粉、鱼油等。饲料粒径 0.25 cm,饲料在水面漂浮时间大于 20 min(静水条件下)。基础日粮主要成分见表 1。

表 1 基础日粮主要成分

粗蛋白(%)	脂肪(%)	酸不溶灰分(%)	水分(%)	钙(%)	磷(%)	总能(MJ/kg)
46.41	9.85	1.49	5.76	1.25	1.89	19.30

1.2 试验设计与饲养管理

试验分 3 个处理组,基础日粮组 I(对照组)、基础日粮+100 mg/kg 果寡糖组 II、基础日粮+肉毒碱 200 mg/kg 组 III。每组 3 个重复,每个重复 150 尾鲢鱼,放入 720 L 的蓝色水族箱饲养(80 cm×90 cm×100 cm)。试验期间水温(26±1)℃,全天充氧,保持溶解氧为(8.3±0.5) mg/L,盐度 27.5±0.5,养殖采用沙滤并用生石灰提前杀毒处理的海水,并过 300 目塞绢网,在室内保持正常的光照周期(14 h 有光/10 h 无光),日换水量保持在 300%。

用基础日粮驯化 14 d 后,开始投喂对应的试验饲料。试验期间进行严格的日常管理,日投喂率为体重的 4%,残饵迅速除去,每天投喂时间是 7:00、13:00 和 18:00。

蔡立胜,浙江大学宁波理工学院分子设计与营养工程市重点实验室,315100,浙江宁波。

吴天星(通讯作者),浙江大学理学院。

潘晓东,浙江大学动物科学学院。

丁雪艳,浙江水产推广总站。

董本详,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-06

★ 浙江省科技局招标项目(021102181-2),宁波市农业与社会发展科研攻关项目(2004C100030)

1.3 样品收集与分析

试验鱼在饲喂基础饲料驯化 14 d 后开始进入正式试验,分组投喂不同的饲料,20 d 后开始收集样品。在投饵 45 min 后开始收集粪便,采用虹吸法随时吸出粪便样品,并在 25 min 内收集完粪便,用定量滤纸洗脱盐分,用电扇风干后转入液氮罐保存,并尽快运回实验室完成各指标的测定。

1.4 测定指标与仪器

粗蛋白测定使用 2300 凯氏定氮仪;脂肪采用 SOXTEC2050 全自动脂肪抽提仪;总能采用 Parr1281 氧弹分析仪;酸不溶性灰分、水分等测定方法都依据饲料指标国家相关测定标准。表观消化率采用以下计算公式:

营养素及能量的表观消化率(%)=100-[(C₁×N₂)/(C₂×N₁)];

干物质表观消化率(%)=100-(C₁/C₂)。

式中:C₁——饲料中酸不溶灰分百分含量;

C₂——鱼粪中酸不溶灰分的百分含量;

N₁——饲料中营养素百分含量(%)或能量含量(MJ/kg);

N₂——鱼粪中营养素百分含量(%)或能量含量(MJ/kg)。

本试验的消化率是采用饲料中内源性的酸不溶性灰分作为指示剂,试验数据采用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析(ANOVA)。

2 试验结果

2.1 鲢鱼对饲料中各营养素及能量的表观消化率

鲢鱼对各处理组饲料中的粗蛋白、粗脂肪、干物质以及总能的消化率结果见表 2,粪便中各营养素的变化情况见表 3。

表 2 鲢鱼对饲料中各营养素及能量的表观消化率(%)

组别	粗蛋白消化率	干物质消化率	脂肪消化率	总能消化率
基础日粮组 I	87.81±0.62	77.25±0.79	91.85±0.35	85.80±0.37
添加肉毒碱组 II	89.42±0.50*	78.60±0.53*	91.73±0.56	86.45±0.34
添加果寡糖组 III	89.23±0.28*	77.13±0.49	91.83±0.34	86.06±0.59

注:*表示与对照组相比差异显著(P<0.05);表中数据为平均值±标准差。下表同。

表 3 鲢鱼粪便中主要成分的含量(%)

组别	粗蛋白	粗脂肪	酸不溶性灰分
基础日粮组 I	23.21±0.17	3.44±0.13	6.39±0.22
添加肉毒碱组 II	22.90±0.10	3.52±0.22	6.85±0.34
添加果寡糖组 III	21.89±0.12	3.62±0.19	6.59±0.07

从表2可以看出,鲢鱼对对照组以及两个添加剂处理组的日粮消化率都很高。鲢鱼对3种饲料粗蛋白的表观消化率都达到了87%以上,而且,添加肉毒碱组和添加果寡糖组可以显著提高粗蛋白的消化率,但是,添加肉毒碱组和添加果寡糖组之间无显著的差异。可以看出基础日粮的蛋白质组成基本是经济合理的,而两种非营养性添加剂也可以明显提高鲢鱼对蛋白质的利用效率。

干物质消化率以酸不溶性灰分的变化为基础,虽然鲢鱼对3种饲料的干物质利用效率都比较高(>77%),但是添加果寡糖对提高干物质的消化率却没有明显效果($P>0.05$),而肉毒碱却显著提高了这种效果,它对干物质消化的影响明显超越了基础日粮和果寡糖添加组。这一点也可以从表3的鱼粪便中酸不溶性灰分的量看出,肉毒碱添加组鲢鱼所排放的粪便中酸不溶性灰分的量要高于其它两组。

鲢鱼对3种试验饲料中脂肪的利用都大于91%,基础日粮中粗脂肪的高消化率表明了这两种添加剂几乎没有进一步提高其消化能力的空间了。方差分析也表明,鲢鱼对3种饲料粗脂肪的消化率是没有差异的。除了对脂肪利用的高效外,试验中鲢鱼对3种饲料总能的利用效率也较高(>85%),没有发现肉毒碱或果寡糖对能量利用的显著提高效果($P>0.05$)。

2.2 鲢鱼各组成活率的变化(见表4)

表4 饲喂鲢鱼3种不同饲料的成活率

组别	放养尾数(条)	成活尾数(条)	成活率(%)
基础日粮组 I	450	346	76.89±2.69
添加肉毒碱组 II	450	378	84.00±3.06 [*]
添加果寡糖组 III	450	409	90.89±2.14 [*]

注: *表示与对照组相比差异显著($P<0.05$)。

从表4可以看出,两种添加剂对鲢鱼幼鱼成活率有显著影响,果寡糖添加组和肉毒碱添加组鲢鱼的成活率显著的高于基础日粮组,而且果寡糖添加组的成活率要高于肉毒碱添加组。

3 讨论

3.1 鲢鱼对基础日粮各成分消化率的影响

鲢鱼对本试验配制的基础日粮各营养组分都有较高的利用效率,尤其是对饲料中粗脂肪的利用,说明适当提高饲料中脂肪的含量有利于蛋白质的吸收利用,当然这还需要进一步深入的研究。该鱼对基础日粮粗蛋白的消化率是比较高的,对饲料能量的利用也是比较高效的,所以本试验的基础日粮配方较好地满足了鲢鱼的生长需要。

3.2 肉毒碱对鲢鱼消化率的影响

肉毒碱作为一种类维生素的营养物质,是动物体内脂肪氧化不可缺少的载体。近些年来,肉毒碱开始作为一种很好的饲料添加剂在水产养殖上应用。本研究表明,肉毒碱可以显著提高鲢鱼对饲料中粗蛋白和干物质的消化率,这与Cho等的研究相近。作为一种有效的添加剂,肉毒碱不仅能促进动物生长,提高饲料的利用率,更由于其促进了蛋白质的沉积,增加了体蛋白的含量,对于改善肉质也有较大的意义。本研究虽然没有发现肉毒碱对饲料中脂肪消化吸收利用的显著提高作用,可能由于饲料配方中脂肪含量并不高(<10%),在饲料脂肪含量升高以后,能否发现它对饲料脂肪的利用效率的提高,仍然需要进一步的研究。肉毒碱对氨基酸的节约作用和对脂肪的代谢促进作用说明我们可以利用它来减少体蛋白的供能需要,从而降低粪氮的排出,减少氮对水体环境的污染,这尚需要更深入的研究。

本研究中,可以看出肉毒碱组鲢鱼幼鱼的成活率显著高于基础日粮组,说明该组鱼抗病与抗应激能力增强,这也许与肉毒碱作为抗氧化剂参与清除体内自由基,有效防止体内氨中毒,促进应激反应时的脂肪酸供能有关。

3.3 果寡糖对鲢鱼幼鱼消化率和成活率的影响

果寡糖在饲料行业的应用有了一定的基础,本研究中果寡糖显著的提高了鲢鱼幼鱼对基础饲料中粗蛋白的消化率,在相关研究中也表明了果寡糖可以减少鲢鱼幼鱼氨氮的排泄。这与对中华鳖的研究结果相近,其结果表明,果寡糖对中华鳖蛋白酶和脂肪酶活性都有一定的影响,可以提高蛋白的吸收,降低粪中蛋白的排放。Ohta等发现,果寡糖提高了小鼠对钙、镁等矿物质的消化率。Kok发现了果寡糖对脂肪代谢的促进作用,而在本次研究中没有发现果寡糖对脂肪消化率的影响。

果寡糖对鲢鱼幼鱼成活率的显著提高,表明果寡糖可以显著增强鲢鱼幼鱼的体质和抗病能力。O'carga等发现,果寡糖不但可以调节动物消化道的微生物区系,促进有益菌生长与抑制有害菌的繁殖,而且能够促进机体的体液和细胞免疫能力。本研究中果寡糖对鲢鱼幼鱼成活率的显著提高,表明它是一种优良的鲢鱼饲料添加剂,因为鲢鱼在华东地区秋季繁殖后马上面临越冬难题,鲢鱼的仔、稚鱼阶段成活率比生长率显得更为重要,因此在秋季鱼苗日粮中添加果寡糖是值得推荐的。

(参考文献11篇,刊略,需者可函索)

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

乌龟配合饲料中最适动植物蛋白比的研究

潘凤莲 周贵谭 吴遵霖

摘要 以白鱼粉、红鱼粉为动物蛋白源,豆粕、花生粕为植物蛋白源,添加 α -淀粉、复合多维矿物质、油脂及甲基纤维素,配制粗蛋白为 39.90%的等氮、等能饲料,进行乌龟配合饲料动植物蛋白比的研究。试验龟平均体重(34.18 ± 2.60) g,在室内塑料箱内饲养 56 d。结果表明,饲料中动植物蛋白比为 2.82 时,龟相对增重率处于最优水平,但组间差异不显著($P > 0.05$);饲料系数最小,蛋白质效率最高,组间差异显著($P < 0.05$)。

关键词 乌龟;配合饲料;动植物蛋白比

中图分类号 S816.32

在自然环境条件下乌龟是杂食性的爬行类动物,以植物的种子、植物茎叶、小鱼虾、螺、昆虫等为食。人工饲养条件下,配合饲料既要满足其营养需求,又要考虑饲料的来源、价格、消化吸收等因素。因此,研究其配合饲料中动植物蛋白比,适当提高植物蛋白饲料的比例,具有显著经济意义,对环境保护也有益。为此,我们在乌龟配合饲料 4 因素正交试验的基础上,对其配合饲料动植物蛋白比单因子进行试验研究,以期得到最适动植物蛋白比例,用于生产实践。

1 材料和方法

1.1 试验龟及分组

试验龟为幼乌龟,在同一批中挑选大小基本一致且健康的龟苗 500 只。先投放在 40 m² 水泥池适应性养殖 20 d,然后挑选体重一致的龟苗,逐只称重,均匀搭配分成 7 组,每组 3 个重复,共 21 箱,每箱 10 只,总重基本相等,平均个体重为(34.18 ± 2.60) g。

1.2 试验环境条件

试验在 16 m² 室内进行,采用固定铁架塑料箱式养殖。铁架在墙壁四周摆放,分上、中、下 3 层,保持 3 层间空气、温度一致。养殖容器为 66 cm×32 cm×25 cm 的白色塑料箱。塑料箱呈 15°角倾斜摆放在架上,以适应半水生环境。养殖所用水为浅地表渗透水。用大塑料箱盛水,曝气 4 h 后使用,水质符合渔业水质标准。

1.3 试验饲料配制

白鱼粉、红鱼粉、豆粕、花生粕等试验原料全部微粉碎,粒度 100%通过 60 目;脂肪为自制鱼油。用凯氏定氮法测定蛋白原料的粗蛋白含量。通过计算,设计成基本上等氮、等能的饲料。将混合均匀的粉状饲料,添加一定比例的鱼油后,再加一定比例的净水,揉制成面团状,现配现用。试验饲料的主要指标见表 1。

表 1 乌龟动植物蛋白比试验饲料的主要指标

试验配方	1	2	3	4	5	6	7
动植物蛋白比	0.81	1.31	1.79	2.29	2.82	3.29	3.93
粗蛋白(%)	39.90	39.90	40.02	39.82	39.87	39.84	39.97
代谢能(计算值, MJ/kg)	16.68	16.68	16.73	16.66	16.68	16.69	16.72

1.4 投饲与管理

每天下午 4:00 投喂一次,饱食投饵;次日早晨回收残饵,将湿残饵 65 ℃烘干 2 h 称重,从总投饵量(包括鱼油)中扣除,为实际摄食量;精细管理,如发现死龟,按等重龟苗及时补足;定时称重,认真作好记录。

1.5 评定指标及计算公式

蛋白质效率(PER)(%)=(末重-初重)/(摄食量×饲料粗蛋白含量);

饲料系数(PCR)=摄食量/(末重-初重);

日摄食率(%)=摄食量/[(初重+末重)/2×饲养天数];

相对增重率(%)=(末重-初重)/初重。

1.6 试验数据统计分析方法

先对数据进行方差分析,若有显著性,再作多重比较,显著水平采用 0.05。

2 结果分析

试验养殖结果与统计分析分别见表 2 和表 3。

潘凤莲,广州城市职业学院生物与环境工程系,510405,广东广州。

周贵谭,广东绿卡实业有限公司。

吴遵霖,湖北省水产科学研究所。

收稿日期:2006-11-16

表2 乌龟配合饲料动植物蛋白比试验养殖结果

配方	初放总重(g)	收获总重(g)	净增重(g)	相对增重率(%)	摄食量(g)	日摄食率(%)	饲料系数	蛋白质效率(%)
1	343.3	383.3	40.0	11.65	166.7	0.82	4.17	0.60
	341.3	383.2	41.9	12.28	197.5	0.97	4.71	0.53
	342.2	388.2	46.0	13.44	185.1	0.91	4.02	0.62
2	341.2	390.8	49.6	14.54	190.4	0.93	3.84	0.65
	341.7	402.9	61.2	17.91	186.6	0.90	3.05	0.82
	341.3	394.8	53.5	15.68	214	1.04	4.00	0.63
3	341	407.2	66.2	19.41	227.6	1.09	3.44	0.73
	341	382.1	41.1	12.05	159.4	0.79	3.88	0.64
	341	404.8	63.8	18.71	191.4	0.94	3.00	0.83
4	342	400	58.0	16.96	221	1.06	3.81	0.66
	340.9	428.3	87.4	25.64	303.3	1.41	3.47	0.72
	341	405.9	64.9	19.03	217.3	1.04	3.35	0.75
5	341.2	451.3	110.1	32.27	314	1.42	2.85	0.88
	342.2	410.6	68.4	19.99	248.6	1.18	3.63	0.69
	342.6	421.4	78.8	23.00	263.9	1.23	3.35	0.75
6	342.5	393.3	51.6	15.07	244.5	1.19	4.74	0.53
	342.8	395.5	53.0	15.46	209.8	1.02	3.96	0.63
	342.1	446.4	103.6	30.28	386.2	1.75	3.73	0.67
7	342.1	409.9	67.87	19.84	283.3	1.35	3.03	0.60
	342	419.7	77.67	22.21	298.8	1.40	3.86	0.65
	342.3	422	79.7	23.28	335.1	1.57	4.20	0.60

表3 试验统计分析结果

配方组号	动植物蛋白比	初均重(g)	末均重(g)	相对增重率(%)	饲料系数	蛋白质效率(%)	摄食率(%)
1	0.81	34.23±2.15	38.49±4.23	12.45±0.92 ^a	4.30±0.36 ^a	0.58±0.05 ^b	0.90±0.08 ^b
2	1.31	34.14±2.33	39.62±4.53	16.09±1.71 ^a	3.63±0.51 ^{bc}	0.70±0.10 ^{ab}	0.95±0.08 ^b
3	1.79	34.10±2.85	39.80±5.03	16.72±4.06 ^a	3.44±0.44 ^{bc}	0.73±0.10 ^{ab}	0.94±0.15 ^b
4	2.29	34.13±2.78	41.42±4.91	20.54±4.53 ^a	3.54±0.24 ^{bc}	0.71±0.05 ^{ab}	1.17±0.21 ^{ab}
5	2.82	34.2±2.77	42.78±4.82	25.09±6.40 ^a	3.28±0.40 ^c	0.77±0.10 ^a	1.28±0.12 ^{ab}
6	3.29	34.23±2.48	41.17±5.03	20.27±5.67 ^a	4.14±0.53 ^b	0.61±0.07 ^b	1.32±0.38 ^a
7	3.93	34.21±2.83	41.72±5.35	21.94±3.76 ^a	4.07±0.19 ^b	0.62±0.03 ^b	1.44±0.12 ^a

注:表中同列数据右上角肩标字母相同,表示差异不显著(P>0.05);字母不同,表示差异显著(P<0.05)。

2.1 相对增重率

随着饲料中动植物蛋白比的增大,相对增重率先增加,至动植物蛋白比为 2.82 时达到最大值,然后呈减小趋势,方差分析组间差异不显著(P>0.05)。

2.2 饲料系数

不同的动植物蛋白比对饲料系数影响较大。动植物蛋白比为 2.82 时,饲料系数最低,方差分析各组间存在着不同程度的差异,第 5 组与第 1、6、7 组差异显著(P<0.05)。

2.3 蛋白质效率

动植物蛋白比为 2.82 时,蛋白质效率最高,方差分析,第 5 组与第 1、6、7 组差异显著(P<0.05)。从表 3 还可看出,动植物蛋白比例过高,蛋白质效率均较低,说明动植物蛋白的合理搭配有利于乌龟对蛋白质的利用。

2.4 摄食率

随着饲料动植物蛋白比例增加,摄食率随之增加,在动植物蛋白比为 3.93 时达到最大,方差分析,第 6、7 组与第 1、2、3 组差异显著(P<0.05)。说明饲料中

蛋白源种类对乌龟摄食率有一定影响。

3 小结

3.1 试验结果表明,各组乌龟试验饲料中不同动植物蛋白比对相对增重率影响不大,组间差异不显著(P>0.05),但对饲料系数、蛋白质效率影响较大,组间差异有所不同。

3.2 当乌龟试验饲料的动植物蛋白比为 2.82 : 1 时,相对增重率、蛋白质效率均最高,饲料系数最低。而高于或低于这一比例时,生长速度均较慢,饲料效率、蛋白质效率均较低。这与吴遵霖等(2001)所做的乌龟配合饲料 4 因素正交试验结果相吻合。

3.3 植物蛋白饲料(如花生粕、豆粕等)比动物蛋白饲料价格低廉,来源广泛。虽然植物蛋白质量和某些氨基酸组成不如优质鱼粉等动物蛋白,但将它们同鱼粉等动物蛋白按一定比例配合,所得饲料养殖效果往往优于高鱼粉的饲料。本试验证实了这一点,从降低饲料成本与环境保护的角度,这无疑是很意义的。

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

几种饲料对斜带石斑鱼鱼种生长和日摄食量的影响

王广军 谢 骏 余德光 乌 兰 牛纪锋

摘 要 用带鱼、大头鱼(鳙鱼)、小杂鱼以及人工配合饲料投喂斜带石斑鱼,研究斜带石斑鱼鱼种对不同种类饵料摄食量的差异,并通过测定相对增重率、成活率以及肝体比来评价几种饲料的效果。结果表明,几种天然饵料中,斜带石斑鱼鱼种对带鱼的摄食量最大,而对大头鱼的摄食量相对较少。以相对增重率、成活率以及肝体比等指标来评价饲料的效果,人工饲料和带鱼组及小杂鱼组之间相比无显著差异,证明在石斑鱼养殖过程中投喂人工饲料是可行的,为开发石斑鱼人工配合饲料奠定了基础。

关键词 斜带石斑鱼;饵料种类;摄食量

中图分类号 S965.334

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*),俗称青斑,属于鲷科(Serranidae)石斑亚科(*Epinephelinae*)石斑属(*Epinephelus*)。它属于暖水性鱼类,遍布于亚洲西太平洋海域。石斑鱼共有约 100 多种,我国大陆沿岸大致有近 30 种,台湾沿海约有 27 种,日本则有 25 种。石斑鱼最适温度为 20~28℃,水温低于 16℃停止摄食,盐度的适应范围是 15~45。石斑鱼是东南亚和地中海一些国家和地区最主要海水养殖鱼类,其肉质鲜美、营养丰富,经济价值高,市场前景好。石斑鱼的养殖已从粗放型跨入现代化池塘养殖、工厂化养殖和网箱养殖。国内的石斑鱼养殖主要集中在广东、广西、福建、浙江和海南五省区的沿海地带。

目前,对斜带石斑鱼营养需求研究很不充分,配合饲料的开发仍处于起步阶段。我国石斑鱼养殖主要投喂冰鲜小杂鱼,而在苗种培育的过程中,则主要投喂海水带鱼以及部分小杂鱼。但投喂海水小杂鱼对环境造成的污染已成为不争的事实,且休渔期来临时,价格也较为昂贵。为此,我们进行了本试验,对几种不同饵料进行了对比研究,为斜带石斑鱼的饲养及其饲料开发、减少饲料资源的浪费及对海水养殖区域的环境污染,促进海水养殖健康持续发展提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

斜带石斑鱼鱼种取自深圳农科中心水产试验基地,体重 11.2~21.6 g,体长 8.9~16.8 cm,外观、活动正

常。试验鱼购回后暂养 15 d 后,挑选出规格健壮、大小均匀的石斑鱼进行分组试验。

投喂配合饲料的石斑鱼要先进行驯化,即采用小杂鱼加配合饲料,配合饲料每两天以 20% 的梯度递增,最后全部采用配合饲料,驯化时间共 15 d。

1.2 试验饵料

饵料共 4 种,分别为带鱼、小杂鱼、大头鱼(鳙鱼)以及自配饲料。带鱼、小杂鱼、大头鱼均购自大鹏镇鹏城市场,购回后切碎后于 -20℃ 冰冻保存备用。自配人工饲料主要成分为鱼粉(60%)、玉米淀粉(15%)、鱼油(5%)、多维(3%)、多矿(2%)、豆粕(7%)、诱食剂(3%)以及其它成分(5%)等。鱼粉、豆粕和玉米淀粉经粉碎后全部过 40 目筛后,再添加鱼油、诱食剂等作成软颗粒饲料后于 -20℃ 冰冻保存备用。

1.3 试验条件

试验是在室内水泥池中进行,规格为 400 cm×400 cm×70 cm。池内水深 50 cm,24 h 充气,自然光照。养殖过程中盐度为 28~30,水温 27~32℃,溶解氧 6.0 mg/l 以上。

1.4 饲养试验

首先将试验斜带石斑鱼鱼种随机分成 4 组,每组 25 尾,各组设 3 个平行。试验前逐一测量每条鱼的体长和体重。

试验从 2006 年 7 月 8 日开始,9 月 3 日结束,共 56 d。试验期间每天投喂两次,分别在上午的 9:00~10:00 和下午的 4:00~5:00 进行,每次投喂直至其饱食为止(以试验鱼不再上来摄食为准),准确测量所投喂的饲料重。每天吸污一次,并测量水温和盐度。

1.5 结果计算与统计分析

试验结束时,逐一数出各组的存活尾数,并将所有鱼称重。并随机挑选 3 尾鱼进行肝体比分析。

各试验参数的计算指标如下:

相对增重率(%)=(末重-初重)/初重;

王广军,中国水产科学研究院珠江水产研究所,助理研究员,510380,广州市荔湾区芳村西朗兴渔路 1 号。

谢骏(通讯作者)、余德光、乌兰、牛纪锋,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-06

★ 广东省科技计划项目(2005B33201012)资助

成活率(%)=终末尾数/初始尾数;

肝体比(%)=肝脏重/体重。

所有数据均采用 SPSS 软件进行分析处理,采用方差分析(ANOVA)来检验不同饵料对生长影响的显著性,并采用 Duncan's 法进行多重分析, $P<0.05$ 为显著性水平。

2 结果与分析

2.1 斜带石斑鱼对不同饵料种类的摄食量

斜带石斑鱼对带鱼、小杂鱼、大头鱼、人工饲料的平均日摄食量为每 100 g 体重 20.83、18.95、14.87、5.22 g。

试验结果表明,斜带石斑鱼对带鱼的摄食量是比较多的,而对淡水性的大头鱼的摄食量则较少(由于人工饲料是干重,所以不好和其它 3 种饲料比较)。这可能和饵料的口味等有关。

2.2 不同饵料对斜带石斑鱼相对增重率的影响

增重率是反应鱼类生长状况的一个指标。从表 1 可以看出,带鱼组的相对增重率最大;而小杂鱼组和人工饲料组的相对增重率相当,统计分析表明无显著差异;大头鱼组的相对增重率最小,与其它各组之间存在显著差异。

表 1 投喂不同饵料对斜带石斑鱼的影响

饵料种类	初重(g/尾)	终重(g/尾)	相对增重率(%)	成活率(%)	肝体比(%)
带鱼组	16.17±1.24	64.31±4.65	297.71±13.38 ^a	86.67±2.31 ^a	1.98±0.55
小杂鱼组	16.22±2.38	60.50±3.87	273.00±23.45 ^b	84.00±4.00 ^b	1.79±0.28
大头鱼组	16.31±0.95	57.81±2.76	254.45±22.65 ^c	76.00±4.00 ^b	1.92±0.46
人工饲料组	16.26±1.71	59.89±3.34	268.33±38.57 ^b	82.67±2.31 ^a	1.74±0.36

注:同列肩标相同字母表示无显著差异($P>0.05$);不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.3 不同饵料对成活率的影响

成活率是反应生长状况的另一指标。从表 1 可以看出,带鱼组、小杂鱼组和人工饲料组的成活率在统计学上不存在差异。证明人工饲料可以达到与带鱼和小杂鱼一样的饲养效果。

2.4 不同饵料对肝体比的影响

肝脏是中间代谢的主要器官,肝细胞的肥大与萎缩、肝组织的增生与减少都与营养有关,取决于摄食物的质和量,一旦不适应就会引发病态肥大或增生,营养不良会影响肝脏的重量。在本次试验中,投喂 4 种饵料后肝体比的变化范围在 1.74~1.98 之间,但所有饵料组之间并不存在显著差异。

3 讨论

3.1 人工饲料与其它几种饲料的效果对比

由斜带石斑鱼对几种饲料的日摄食量表明,斜带石斑鱼对带鱼的摄食量最大,对其余几种试验饵料,特别是人工配合饲料也有不同程度的摄食,说明经过驯化后的斜带石斑鱼能很好地摄食人工配合饲料。而对淡水性鱼类——大头鱼的摄食量较少,说明淡水性鱼类不适宜作为石斑鱼的饲料。从相对增重率和成活率的结果来看,也是大头鱼的效果最差,也可以证明这一点。究其原因,可能是淡水鱼的肌肉组成和海水鱼有一定的差异,特别是高不饱和脂肪酸的含量较低,难以满足斜带石斑鱼的生长需求,从而表现为相对生长率和成活率较差。

而人工饲料在配方设计时,由于主要蛋白源为白

鱼粉(主要以海水性鱼类为主),并且添加了适量的鱼油,以及适量的诱食剂,最大程度上做到诱食性好,营养丰富,满足了石斑鱼的营养需求和口味需求,提高了饲料的转化率,节约了自然资源,减少了对养殖环境的污染。所以,开发、研制、推广使用人工配合饲料是未来水产养殖的发展方向。

3.2 人工饲料适口性问题

关于湿颗粒饲料(湿料、软颗粒饲料)和干颗粒饲料(干料)对鱼类生长和摄食的影响,已有较多的研究。刘镜恪(1996)对黑鲷的研究结果表明,在养殖初期,湿料有促进作用,同时也可以获得良好的饵料效率,但在两周以后就无此现象,因此认为没有明显的差异。林利民(1995)在石斑鱼方面也观察到了同样的效果。我们在进行本试验时,也特意观察了此现象,发现石斑鱼对软颗粒饲料的摄食效果好。如果投喂干饲料,石斑鱼很容易吐出,而软颗粒饲料则没有此现象的发生。

此外,饲料的适口性还和饲料粒度有关。本次研究也发现,整个试验期间不同时间斜带石斑鱼鱼种的摄食量均随粒径增大而减少,各组均对粒度较小的饵料摄食量较大,对粒度较大的饵料摄食量较小,说明饲料粒度在一定程度上影响了石斑鱼的摄食量。所以在饲养斜带石斑鱼时,应投喂粒度大小适宜其摄食的饵料,才可以保证其有较高的摄食量。至于粒度与摄食量的关系,尚需进一步研究。

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

微生物制剂培养技术——正交法研究光合细菌的混合培养

曹希亮 倪学勤 曾东 周小秋

摘要 利用光合细菌和蜡样芽孢杆菌协同生长的特点进行混菌培养试验。蜡样芽孢杆菌好氧,光合细菌兼性厌氧,通过两种细菌的不同添加比例,寻找一种最好的添加比例,使光合细菌活菌数在最短的时间内达到最大值。试验过程中,采用正交试验对两种菌的比例进行了科学的组合,从而找到两种菌的最佳配比:在光合细菌 1%或 5%、芽孢杆菌 1%的添加量的情况下,可以在最短的时间内使光合细菌菌数达到理想值。

关键词 光合细菌;混菌培养;正交法

中图分类号 Q93-33

近年来,随着生活水平的提高,人们对畜禽产品质量的要求越来越高,绿色食品越来越受到消费者的青睐。因光合细菌营养丰富,提高畜禽免疫力方面效果显著,而且在水产养殖方面,能净化水质,提供一部分活性氧,所以很多研究者对其尤为重视^[1-3]。但因为光合细菌培养周期长,菌数很难达到人们要求,所以,研究者采用各种方法进行了光合细菌混菌培养试验的研究。Giraud E Z 和 Fleischman D(2004)研究发现,当光合细菌与根瘤菌共同培养时,可增强根瘤菌抗干扰能力,储藏的时间更长,在豆科植物上能形成更有效的根瘤,从而增加植物的产量^[4]。李勤生等(1998)采用光合细菌不同菌株、光合细菌菌株与异养菌株混合培养,试验结果发现,不同组合的混合培养物其生长量均不同程度的高于单株培养物,最高增长量高达 17.4%,最低也高于对照组^[5]。

本试验是在光合细菌单菌培养的基础上,进行了光合细菌和芽孢杆菌的混菌培养,目的就是提高光合细菌的生长速度,缩短培养周期,增加光合细菌的活菌数。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

光合细菌(9.0×10^8 CFU/ml)和蜡样芽孢杆菌(1.0×10^9 CFU/ml)均由本实验室分离、筛选、鉴定、保存。

1.1.2 培养基

1.1.2.1 光合细菌富集培养基

乙酸钠 3.0 g、丙酸钠 0.3 g、NaCl 1.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3 g、 MgSO_4 0.2 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 K_2HSO_4 0.3 g、CaCl₂ 50 mg、 MnSO_4 2.5 mg、 FeSO_4 5 mg、酵母膏 0.1 g、蛋白胨 10 mg、谷氨酸 0.2 mg、 H_2O 1 000 ml,将以上组分溶于水后调 pH 值为 7.4,然后在 121.0 °C 蒸汽灭菌 30 min。

1.1.2.2 芽孢杆菌肉汤培养基

牛肉膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 5.0 g、 H_2O 1 000 ml, pH 值 7.4~7.6, 121.0 °C 下蒸汽灭菌 30 min。

1.1.2.3 芽孢杆菌平板普通培养基

在肉汤培养基的基础之上,加入琼脂 1.0%, 121.0 °C 下蒸汽灭菌 30 min。

1.1.2.4 光合细菌计数培养基

NaHCO_3 1.0 g、 CH_3COONa 3.0 g、酵母膏 2.0 g、 K_2HPO_4 0.5 g、Fe-EDTA 0.005 g、 NH_4Cl 1.0 g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、NaCl 5.0 g、 H_2O 1 000 ml, pH 值 7.4~7.6, 121.0 °C 下蒸汽灭菌 30 min。

1.1.3 仪器

微量加样器、平板、1 ml 移液管、漩涡振荡器、试管等。

1.2 培养方式和条件

1.2.1 蜡样芽孢杆菌摇床培养

用接种环刮取斜面保存的蜡样芽孢杆菌,平板划线,进行活化,37 °C 培养 24 h。使用灭菌的 250 ml 三角瓶装芽孢杆菌肉汤培养基 30~40 ml,从平板上刮取菌落,接种到肉汤培养基上,37 °C、130 r/min 摇床培养 24 h。

1.2.2 光合细菌富集培养^[6]

使用光合细菌富集培养基,在温度 28 °C,光照 60 W,光源距离培养物 10~20 cm,光照强度大约在 600~1 900 LX 之间。选择 1 000 ml 的三角瓶,装入 1 000 ml 光合细菌富集培养基,按不同比例接菌,使用封口膜封口,然后光照培养 6~8 d,观察颜色变化。颜色黑红色时保存,供混菌培养使用。

曹希亮,四川农业大学动物微生物生态研究中心,625014,四川雅安。

倪学勤(通讯作者)、曾东,单位及通讯地址同第一作者。

周小秋,四川农业大学动物营养研究所。

收稿日期:2006-11-06

★ 教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT0555)资助

1.2.3 光合细菌和蜡样芽孢杆菌混合培养

光合细菌富集培养基分装于消毒后的 200 ml 三角瓶中,接种时采用光合细菌与蜡样芽孢杆菌同时接种,其中光合细菌 1%、5%、10%、20% 4 个水平,而蜡样芽孢杆菌采用 0.1%、0.5%、1%、2% 4 个水平,用正交组合法接种,然后按光合细菌富集培养条件进行光照培养。每隔 24 h 采样一次,进行光合细菌计数培养,连续采样 8 d,每天计数培养一次。

1.2.4 细菌计数培养

1.2.4.1 菌液稀释

采用常规方法对菌液稀释,即用移液管 0.5 ml 菌液移于盛有 4.5 ml 无菌水的试管中,漩涡振荡 5 次,每次 10 s,以此类推,将菌液稀释至 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 。

1.2.4.2 光合细菌计数培养

用 1 ml 移液管取不同稀释度 (一般为 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8})和不同接种比例的混合培养后的菌液 1 ml,加到灭菌的平板上,然后加 20 ml 灭菌的 (45±1) °C 光合细菌计数培养基,琼脂含量 0.8%,摇匀;培养基冷凝后

上层加 5 ml 灭菌的 (45±1) °C 1.0% 的琼脂,冷却后置 25~30 °C,2 000~3 000 LX 下培养 48 h, 如果菌落不明显,则继续培养 24~48 h。

1.2.4.3 蜡样芽孢杆菌计数培养

用微量加样器取不同稀释度(一般为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4})的混合培养菌液 20 μl,同一稀释度在芽孢杆菌平板普通培养基上重复点样 3 次,37 °C 培养,12 h 后观察计数。

1.3 分析方法

1.3.1 光合细菌的计数方法^[7-9]

一般采用双层培养基,上层是 1% 的琼脂,底层是 0.8% 的琼脂。这种方法既解决了试管计数过程中出现的重复多次计数的问题,使计数在同一平面进行,计数更准确,而且上层 1% 的琼脂和底层 0.8% 的琼脂在不影响光合细菌生长的情况下,不但解决了光照问题,还解决了琼脂渗水的问题。

1.3.2 正交试验设计^[10]

表 1 为正交试验设计方案。正交法进行组合 $L_{16}(2^4)$ 。

表 1 正交试验因素与水平设计(%)

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
光合细菌	1	1	1	1	5	5	5	5	10	10	10	10	20	20	20	20
蜡样芽孢杆菌	0.1	0.5	1	2	0.1	0.5	1	2	0.1	0.5	1	2	0.1	0.5	1	2

2 结果(见表 2)

2.1 光合细菌计数培养基中的形态观察

光合细菌的典型特征是菌落呈粉红色、红色、红褐色或深红色,在计数培养基中菌落呈铁饼状。

表 2 $L_{16}(2^4)$ 正交试验结果

处理组	光合细菌 接种比例(%)	蜡样芽孢杆菌 接种比例(%)	Max2 (10^7 CFU/ml)	Max3 (10^7 CFU/ml)	Max5 (10^7 CFU/ml)	Max6 (10^7 CFU/ml)	Max7 (10^7 CFU/ml)	Max8 (10^7 CFU/ml)	Means (10^7 CFU/ml)
1	1	0.10			64.5		82.5		73.5
2	1	0.50					72.5	77	74.75
3	1	1					130	114	122
4	1	2			150	117			133.5
5	5	0.10				90	85		87.5
6	5	0.50					97.5	78	87.75
7	5	1					82.5	87	84.25
8	5	2			77.5	79			78.25
9	10	0.10	41	42					41.5
10	10	0.50	41	43					42
11	10	1	57	43					50
12	10	2			54.5	51			52.75
13	20	0.10	52.5	37					44.75
14	20	0.50		47	47				47
15	20	1	46	57					51.5
16	20	2	50	58					54
K1	400.58	244.08							
K2	380.25	251.5							
K3	186.25	350.25							
K4	197.25	318.5							
R	214.33	106.17							

注:Maxn 表示在第 n 天光合细菌菌数达到最大值;Means 表示整个培养过程中,同一个处理选取的两个菌数最多时的平均值;第 1 d 和第 4 d 光合细菌菌数未有最大值。

2.2 光合细菌正交试验

从表 2 极差分析可以看出, 光合细菌 K1 和 K2 的值都明显大于 K3 和 K4 的值, 即光合细菌在 1% 和 5% 的两个水平上, 细菌计数明显高于其它两组; 而芽孢杆菌的 K3 和 K4 明显大于 K1 和 K2, 即芽孢杆菌 1% 和 2% 的接种量, 效果比其它两组更好。而光合细菌和芽孢杆菌的极差分析表明, 光合细菌的 $R=214.33$, 明显高于芽孢杆菌的 $R=106.17$, 从而得出如下结论, 光合细菌的接种量对光合细菌的总菌数的影响高于芽孢杆菌的接种量对光合细菌总菌数的影响。

2.3 蜡样芽孢杆菌菌数变化

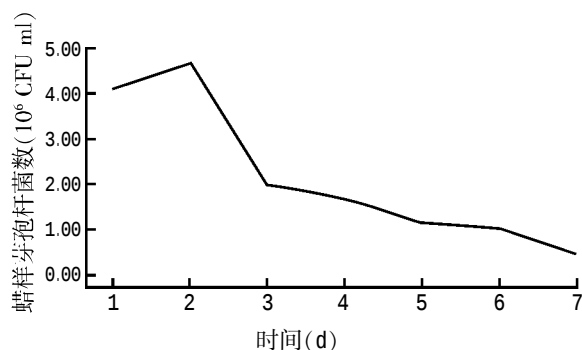


图 1 蜡样芽孢杆菌培养的动态方差分析研究

图 1 通过 SPSS13.0 对蜡样芽孢杆菌的菌数变化进行了方差分析。我们发现, 蜡样芽孢杆菌菌数第 1 d 接种后, 第 2 d 达到最大值, 第 3 d 迅速下降, 以后几天, 蜡样芽孢杆菌的数量没有明显的变化, 这可能是因为蜡样芽孢杆菌开始形成芽孢, 进入了休眠状态。

3 讨论

表 2 的结果说明光合细菌的添加比例 1% 和 5% 的时候, 光合细菌菌数高于 10% 和 20% 的接种量。而 10% 和 20% 的接种量, 最大值出现在第 2 d 或第 3 d (Max2 或 Max3)。虽然 10% 和 20% 的接种量生长速度增快, 但是, 由于菌数太低, 效果不好。综合考虑, 从表 2 中发现, 芽孢杆菌 1% 的生长效果好一些。添加了芽孢杆菌由于该培养基营养含量太低, 芽孢杆菌很快就处于休眠状态如图 1。所以对光合细菌的生长来说因为芽孢杆菌消耗一部分氧气, 给光合细菌创造了一个有利于生存的厌氧环境, 所以有利于光合细菌的生长。

在该试验中, 光合细菌的添加比例 1% 和 5% 的时候, 光合细菌总数可以达到 10^9 CFU/ml 左右, 明显高于 10% 和 20% 两个水平。并且光合细菌的添加对光合细菌总数的增加的影响, 明显高于芽孢杆菌的影响。

从试验结果可以看出, 不管是生长速度还是菌

数, 都没有达到一个理想的值, 即菌数达到最大值的情况下, 培养速度也提高了, 降低培养时间的情形并没有出现。究其原因, 可能是因为所使用的分离培养基里所含的酵母膏太少, 又加入了芽孢杆菌, 所以营养成分消耗殆尽。说明光合细菌虽然利用很少的营养成分, 但是仍然需要一定的营养。再有一种可能就是, 刚开始, 芽孢杆菌没有充分给光合细菌创造一个完全的厌氧环境, 所以, 当光合细菌的加入量比较大时, 很快就进入了衰退期, 而光合细菌加入量较少的情况下, 芽孢杆菌充分给光合细菌创造了厌氧环境, 光合细菌的菌数达到了最大。但是, 因为加入的营养成分太少, 所以光合细菌生长的速度比较慢。为了达到一个最佳的效果, 应该优化培养基, 加入一定量的酵母膏等营养成分, 为芽孢杆菌创造一个增殖的环境, 同时为光合细菌创造一个更好的厌氧环境, 使光合细菌生长速度更快。加入一定的营养成分对光合细菌生长很重要, 大多数营养都被芽孢所利用, 但剩余少量的营养成分可以促进光合细菌的生长, 可以在更短的时间内达到更大的产量。所以, 在光合细菌的光照、温度等条件达到最佳的情况下, 培养基优化对混菌培养来说是最重要的。

培养基的优化, 因为是光合细菌和芽孢杆菌混菌培养, 可以根据芽孢杆菌的营养成分设计不同的水平, 进行正交试验设计, 选择最佳培养基, 这方面的内容有待于进一步研究。

参考文献

- 1 刘如林, 刁虎欣, 梁凤来, 等. 光合细菌及其应用[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1991. 155~205
- 2 李东风. 光合细菌的开发应用动态[J]. 微生物学杂志, 1998, 18(2): 44~49
- 3 Paul F Weaver, Judy D. Wall, Howard Gest. Characterization of *Rhodospseudomonas capsulate*[J]. Arch. Microbiol., 1975, 105: 207~216
- 4 Giraud E, Fleischman D. Nitrogen - fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. Photosynth Res., 2004, 82: 115~130
- 5 李勤生, 卫翔. 混合培养对光合细菌生长量的影响[J]. 水生生物学报, 1998(6): 101~105
- 6 郭晨, 刘春朝. 光合细菌的培养及应用. 中国饲料, 1998(12): 18
- 7 刘军义, 汪文龙, 李娟. 正交法研究光合细菌计数培养基. 检验检疫科学, 2004, 14(1): 45~48
- 8 孙军德, 赵春燕, 黄晓明, 等. 光合细菌菌数测定数学模型的构建[J]. 沈阳农业大学学报, 2001, 32(5): 358~359
- 9 孙军德, 赵春燕, 李炳学, 等. 光合细菌双层平板计数方法的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2001, 32(2): 110~112
- 10 方开泰, 马长兴. 正交与均匀试验设计[M]. 北京: 科学出版社, 2001

(编辑: 高 雁, snowyan78@tom.com)

植物乳杆菌发酵生产共轭亚油酸

董明 齐树亭

摘要 共轭亚油酸是一种具有多种生理活性的天然脂肪酸。以盐生植物紫花苜蓿的种籽油为底物,用植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)6026催化紫花苜蓿籽油中的亚油酸转化为共轭亚油酸。通过单因素试验分析了发酵过程中pH值、预培养、温度和时间对生产共轭亚油酸的影响。

关键词 紫花苜蓿籽油;共轭亚油酸;植物乳杆菌;单因素

中图分类号 Q815

20世纪50年代末,一些科学家发现,在反刍动物中,亚油酸能被其转化成c-9,t-11的共轭亚油酸(conjugated linoleic acid,简称CLA),并且认为是厌氧的溶纤维丁酸弧菌亚油酸异构酶的作用。到70年代末,Pariza等最先发现烧烤牛肉的提取物具有抗癌作用,经过对提取物的分析最终鉴定认为抗癌成分是共轭亚油酸的混合物^[1-3]。自从Pariza发现CLA具有抗癌作用以来,人们越来越关注CLA,欧洲还成立了专门研究CLA的机构^[4]。CLA是一系列含有共轭双键、具有位置和构象异构的十八碳二烯酸的总称,是必需脂肪酸亚油酸(cis-9,cis-12-octadecadienoic acid,顺-9,顺-12-十八碳二烯酸)的异构体。在人类和动物中最主要的异构体是c-9,t-11-十八碳二烯酸^[5,6],被命名为瘤胃酸(rumenic acid)。c-9,t-11和t-10,c-12是自然界中含量最高的异构体。

我国盐生植物资源丰富,其利用率却不高。其中盐生植物紫花苜蓿的种籽油的含油量达到12%,在紫花苜蓿籽油脂中,亚油酸占总脂肪酸含量的30%~35%,另外还含有少量亚麻酸。

本试验以MRS作培养基,植物乳杆菌为出发菌株,以盐生植物紫花苜蓿的种籽油为底物,摸索了各个发酵条件对生产共轭亚油酸(CLA)的影响。试验中所用的乳酸菌为兼性厌氧菌,易培养,无毒,有较高的

实用价值和应用前景。

1 材料

菌株:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)6026由中科院微生物所提供。

培养基:MRS培养基。

主要试剂:紫花苜蓿籽油自行提取制得;共轭亚油酸纯品(CLA)购于Sigma公司(纯度>99%)。

2 方法

2.1 样品的预处理

2.1.1 菌种的活化

将保藏在冰箱的植物乳杆菌活化在液体的MRS培养基中,混匀后置37℃恒温箱中培养9~12h后,选取菌液作革兰氏染色、镜检,确定纯后,接种于液体培养基中反复活化。

2.1.2 菌种的预培养

在准备培养活化好的菌种之前,在培养基中加入紫花苜蓿籽油2.5~25μl,接种量为5%,摇匀后于37℃预培养8~26h作为接种物。

2.2 发酵方法

100ml三角瓶装20ml的MRS培养基,用磷酸钠溶液调pH值至5.8~8.0,将活化的菌种按5%接种,接入紫花苜蓿籽油10μl,混匀,在20~50℃下静置培养24h。

2.3 共轭亚油酸的提取方法

取发酵液0.5ml,溶解于1.5ml异丙醇,然后添加1ml正己烷,在漩涡振荡器上混匀3min,然后4000r/min离心10min,吸取上清液,用氮气吹干,然后溶解于5ml正己烷中进行检测。

2.4 培养基中CLA产量的测定

以正己烷为溶剂,将CLA标样配成不同浓度的

董明,河北工业大学化工学院,300130,天津市河北工业大学443信箱。

齐树亭,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-25

★ 国家863计划项目(2002AA648010)

溶液,以正己烷为参比,在 234 nm 处测定其吸光值,以 CLA 浓度(g/l)为横坐标,吸光值(ABS)为纵坐标,绘制标准曲线(见图 1)。

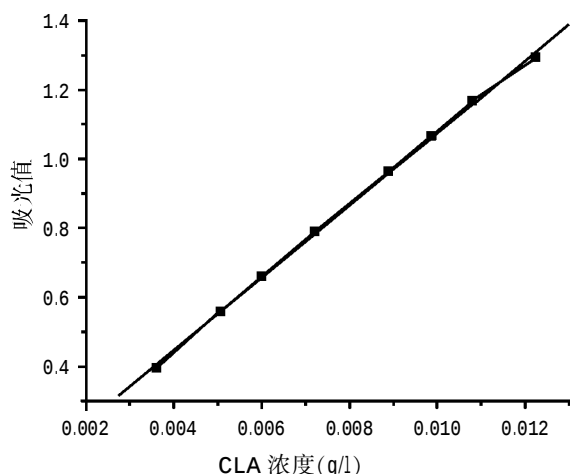


图 1 CLA 紫外吸光度标准曲线

以不接种的培养基为参比,用紫外分光光度计测定在特征吸收峰 234 nm 处的吸收值,根据标准曲线计算发酵液中 CLA 的含量。已知苜蓿籽油中含 LA 30%,通过公式 CLA 转化率(%)=生成 CLA 的量/苜蓿籽中含有 LA 的量,计算 CLA 转化率。参比培养基中加入与样品同量的苜蓿籽油,不接种菌,其它步骤同样品^[9,10]。

3 结果与讨论

3.1 预培养接入的油量对生产 CLA 的影响(见图 2)

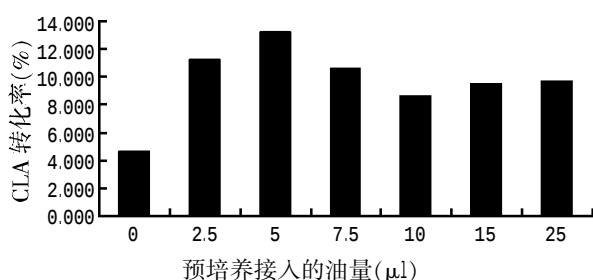


图 2 预培养过程中接入不同的苜蓿籽油量对 CLA 转化率的影响

预培养中添加苜蓿籽油和不添加苜蓿籽油对发酵培养基中 CLA 转化率会有一定影响。如图 2 所示,种子培养基中加入苜蓿籽油会较明显的提高 CLA 转化率。另外加入苜蓿籽油量的多少也会带来不同的 CLA 转化率,其中在加入苜蓿籽油 5 μl 时 CLA 转化率达到最高。这表明了催化 LA 生成 CLA 的该乳杆菌

中的氢化酶在预培养过程中受到了诱导作用。这与 Y. J. KIM^[11]在用全脂牛奶培养基发酵生产 CLA 中预培养的效果不同。说明不同培养基、不同的菌种对生产 CLA 的影响是不同的。

3.2 预培养时间对生产 CLA 的影响(见图 3)

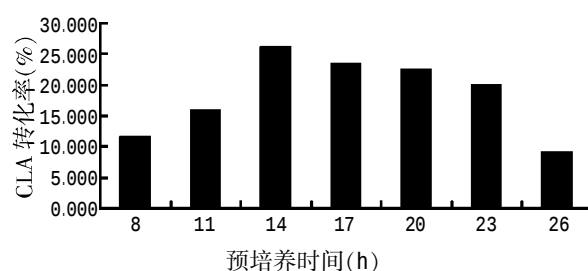


图 3 预培养时间对 CLA 转化率的影响

为了进一步研究预培养对生产 CLA 的影响,由图 3 可见,在预培养过程中,改变预培养的时间,研究其在发酵培养过程中对 CLA 转化率产生的影响。当预培养时间由 8 h 变为 14 h,CLA 转化率有较明显的提高。说明在预培养阶段,当种子液中接入种籽油后预培养的第 14 h 该乳杆菌被诱导产生的生物氢化酶效果最好。当预培养时间由 14 h 继续增加,CLA 转化率开始呈现下降趋势。可能由于时间的延长该乳杆菌产生生物氢化酶的过程发生了逆反应,其作用机理有待进一步研究。

3.3 pH 值对生产 CLA 的影响(见图 4)

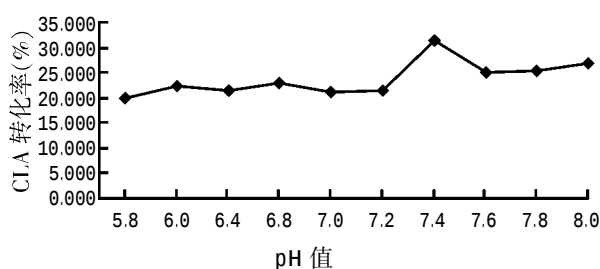


图 4 pH 值对 CLA 转化率的影响

用磷酸钠缓冲溶液将发酵培养基的 pH 值调至 5.8~8.0。通过图 4 可以看出,在 pH 值 7.4 时 CLA 转化率最高。生产 CLA 主要是依靠乳杆菌中的生物酶对 LA 进行转化^[12],这可能是因为 pH 值对乳杆菌中的亚油酸异构酶产生影响的综合表现,过酸或过碱都可能引起生物酶中分子构象的改变,从而影响酶的活性。另外试验中使用的植物乳杆菌本身生长的最佳 pH 值也在 7 左右,因此在 pH 值 7.4 时,由该乳杆菌催化转

化 LA 生成的 CLA 最多。

3.4 温度对生产 CLA 的影响(见图 5)

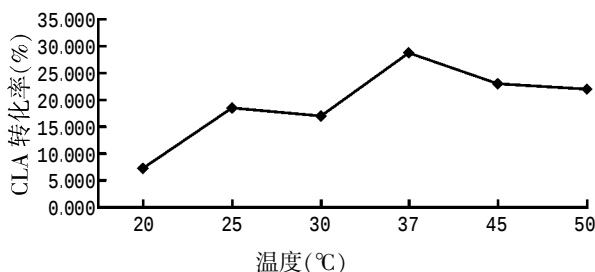


图 5 温度对 CLA 转化率的影响

由图 5 可以看出,在该乳酸菌发酵制取 CLA 的过程中改变发酵条件中的温度,CLA 转化率会有较明显的变化。在 20 °C 温度较低时,CLA 转化率不到 10%;随着温度升高至 37 °C,CLA 转化率也升高到 30%;而当温度继续升高到 50 °C,CLA 转化率呈下降趋势。分析其原因可能是该乳杆菌中的生物氢化酶的最适温度在 37 °C,过低的温度不能供应发酵反应需要的热量,不利于菌种的生长,导致菌体产酶的生化反应不能顺利进行;而过高的温度会加速酶的变性而使该酶失活。

3.5 CLA 转化率的时间曲线和菌体的生长曲线 (见图 6)

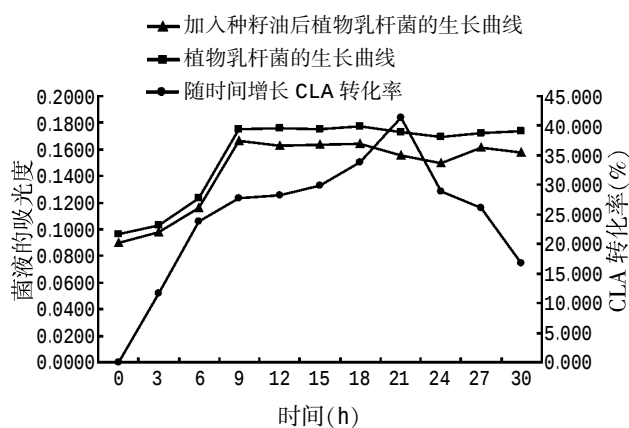


图 6 乳酸菌的生长曲线和 CLA 转化率的时间曲线

由图 6 可以看出,菌体在发酵进程中,5~10 h 之间为对数生长期,此期间生物量快速增加;生长约 12 h 进入稳定期,但是 CLA 转化率此时呈高速增长阶段;生长约 21 h 时,CLA 转化率达到最大,而后 CLA 转化率呈下降趋势。另外,从图 6 中也可以看出,加入油样的菌株生长会受到一些抑制。

4 结论

本试验以盐生植物紫花苜蓿的种籽油为底物,利用乳杆菌发酵生产 CLA。研究了预培养接入的油量、预培养时间,pH 值和温度对 CLA 转化率的影响,并研究了菌种的生长曲线和 CLA 转化率的时间曲线。研究表明,种子培养基中加入苜蓿籽油会较明显的提高 CLA 转化率,但是预培养的时间需要控制在一定范围内,经试验证实,在预培养时间为 14 h 时 CLA 转化率较高;在 pH 值 7.4 时,由植物乳杆菌催化转化的 CLA 最多;温度在 37 °C 时 CLA 转化率最大。本研究所采用菌株具有安全性和生物转化产生 CLA 异构体的专一性,同时充分的利用了我国大量的盐碱地和数量众多的盐生植物,为人类提高饮食行业中 CLA 产品的应用开辟了广阔的前景。

参考文献

- Pariza M W, Loretz L J, Storkson J M, et al. Mutagens and modulator of mutagenesis in friend ground beef[J]. Cancer Res., 1983, 43:2 444~2 446
- Pariza M W, Hargaves W A. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermaltumors by 7, 12-dimethybenz[a]anthracene[J]. Carcinogenesis, 1985, 6:591~593
- Ha Y L, Grimm N K, Pariza M W, et al. Anticarcinogens from fried ground beef:heat-altered derivatives of linoleic acid[J]. Carcinogenesis, 1987, 8:1 881~1 887
- Elin D. Scientific forum explores CLA knowledge[J]. Inform., 1998, 8 (1):69~72
- Parodi P W, et al. Conjugated octadecadienoic acid of milk fat[J]. Journal of dairy science, 1977, 60:1 550~1 553
- Britton M, et al. Diet as a source of phospholipids esterified 9, 11-octadecadienoic acid in humans [J]. Clinlcal science,1992, 83:97~101
- 赵可夫,李法曾.中国盐生植物[M].北京:科学出版社,1999
- 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第二十五卷第二分册)[M].北京:科学出版社,1979.139~140
- 张亚刚,樊莉,马莉,等.用紫外可见分光光度法测定共轭亚油酸的含量[J].中国科学院研究生院学报,2002,19(4):436~442
- Pariza M W, Yang X Y. Method of producing conjugated fatty acids[P]. 美国专利:5856149,1999
- Y. J. KIM, R.H. Liu. Increase of conjugated linoleic acid content in Milk by Fermentation with Lactic Acid Bacteria[J]. Food Chemistry and Toxicology,2002,67:1 731~1 737
- Jiang J, Bjorck L, Fonden R. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures[J]. Applied Microbiology, 1998,85:95~102

耐高温酵母菌对啤酒糟发酵效果的影响

郭 辉 李丽莉 黄兴国

摘 要 用出发菌、耐高温酵母菌发酵啤酒糟进行试验,结果表明:在 32 ℃的恒温箱中发酵,出发菌组和耐高温酵母菌组对啤酒糟的营养价值有较大提高,较未处理组 CP 分别提高 1.43、1.87 个百分点,TP 分别提高 1.43、2.71 个百分点,差异显著($P<0.05$);耐高温酵母菌组 CP 和 TP 较出发菌组提高 0.44、1.28 个百分点,差异显著($P<0.05$),而 TP/CP 值没有显著差异,但有增高趋势。

关键词 酵母菌;啤酒糟;发酵

中图分类号 S816.6

耐高温菌(thermophile)也称嗜热菌或好热菌,目前认为,耐高温菌包括生长温度跨度在 40~100 ℃之间的细菌。在高温条件下,高温菌所产生的酶具有热稳定性高、污染少等优点。由于具有耐高温的特性使得高温菌所产生的酶、蛋白质或其它代谢产物在生物技术领域有广阔的应用前景。

经酵母菌发酵的饲料具有芳香味,改善了饲料的适口性,耐高温酵母菌更能有效提高饲料中蛋白含量,提高其营养价值,这种新型的单细胞蛋白饲料可有效缓解我国蛋白质资源短缺的现状。本研究旨在就高温酵母菌株对啤酒糟发酵的效果进行初步研究,期望在非常规饲料开发上有所突破。

1 材料与方法

1.1 材料

啤酒糟:由湖南省白沙啤酒厂提供。

菌种:出发菌(热带假丝酵母、木霉、黑曲霉均由动科院提供)、耐高温酵母菌(由热带假丝酵母菌驯化后 50 ℃下生长良好的菌种)。

试验仪器:分析天平、凯氏定氮仪、移液管、粉碎机、消煮管、可调恒温烘箱等。

试验试剂:98%的浓硫酸、40%氢氧化钠、2%硼酸溶液、混合催化剂、甲基红-溴甲酚绿指示剂、盐酸标准溶液、10%硫酸铜溶液、2.5%氢氧化钠。

1.2 试验设计

本试验在动物营养实验室进行,分 3 个组进行发酵,未处理组(不添加任何菌种)、出发菌组(添加未驯化的酵母菌)、耐高温酵母菌组(添加经出发菌驯化后

的耐高温菌)。

1.3 方法

1.3.1 培养基

斜面培养基:将 20%马铃薯切碎,立即放入水中以免氧化,煮沸 30 min,经纱布过滤,向滤液中加入葡萄糖 2%、琼脂 7%,加入蒸馏水到 100%,煮沸 20 min,于 121 ℃、15 磅下灭菌 20 min。

二级培养基:用马铃薯汤,加入葡萄糖 10 g 作为液体培养基。

1.3.2 菌种的培养

1.3.2.1 菌种的一级培养

将原始耐高温酵母菌植入马铃薯琼脂斜面上,28~32 ℃下培养 24 h,然后把斜面上的菌落接种到装有马铃薯液体培养基的 100 ml 灭菌三角瓶中,32 ℃下培养 24 h,每隔 6 h 摇动三角瓶一次,产生大量泡沫和沉淀并有醇香味为合格。出发菌组的培养和处理与高温酵母菌组相同。

1.3.2.2 菌种的二级培养

取马铃薯汤 200 ml、葡萄糖 10 g、原一级培养高温菌液体 50 ml 混匀,过滤 500 ml 灭菌三角瓶中,32 ℃下培养 24 h,每隔 6 h 摇动三角瓶一次,产生大量泡沫和沉淀并有醇香味为合格。出发菌组的培养和处理与高温酵母菌组相同。

1.3.3 啤酒糟发酵处理与测定

1.3.3.1 发酵处理

将各组混合均匀的样品袋分别装入 32 ℃恒温箱中培养 48 h,期间每隔 6 h 翻动一次,测定在发酵 18、24、30、36、42、48 h 时耐高温酵母菌组和出发菌组发酵物的温度与 pH 值,嗅闻其发酵的气味。

耐高温酵母菌组样品包括:啤酒糟 170 g、麦麸 20 g、玉米粉 10 g、尿素 4 g、 KH_2PO_4 2.4 g、 MgSO_4 0.6 g、 CaCl_2 0.4 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8 g、高温菌二级培养液 40 ml。

出发菌组样品包括:啤酒糟 170 g、麦麸 20 g、玉米

郭辉,广西大学动物科技学院,530005,南宁。

李丽莉,单位及通讯地址同第一作者。

黄兴国,湖南农业大学。

收稿日期:2006-11-22

粉 10 g、尿素 4 g、KH₂PO₄ 2.4 g、MgSO₄ 0.6 g、CaCl₂ 0.4 g、(NH₄)₂SO₄ 8 g、出发菌(普通酵母菌)二级培养液 40 ml。

未处理组样品包括:啤酒糟 170 g、麦麸 20 g、玉米粉 10 g、尿素 4 g、KH₂PO₄ 2.4 g、MgSO₄ 0.6 g、CaCl₂ 0.4 g、(NH₄)₂SO₄ 8 g。

1.3.3.2 制样

将发酵后的样品置于烘箱中 75 ℃下干燥 24 h,回潮 3 h,粉碎过 40 目筛,装瓶备用。

1.3.3.3 测定项目

样品水分测定按 GB6435—86 执行;粗蛋白测定按 GB6432—86 执行;真蛋白测定按 GB6432—86 执行。

1.3.4 统计分析

采用方差分析进行数据统计。

3 结果与分析

3.1 发酵温度的测定(见表 1)

表 1 耐高温酵母菌组和出发菌组发酵期间温度变化(℃)

组别	发酵时间(h)					
	18	24	30	36	42	48
耐高温酵母菌组	33.0	33.0	34.0	34.0	34.2	33.5
出发菌组	33.2	33.5	34.0	34.0	34.0	33.0

从表 1 可以看出,随着发酵时间的延长,样品发酵的温度呈上升趋势,这与寇运同的报道是一致的。在发酵前期,出发菌组温度上升较快,而耐高温酵母菌组上升较为缓慢;后期耐高温酵母菌组温度上升较出发菌组快而且达到的温度较高,这说明了随着发酵时间的延长,耐高温酵母菌株表现了它温度耐受性的优势。

3.2 发酵 pH 值的测定(见表 2、图 1)

表 2 发酵期间出发菌组与耐高温菌组 pH 值的变化

组别	发酵时间(h)					
	18	24	30	36	42	48
耐高温菌组	6.0	6.3	6.5	6.8	6.8	6.3
出发菌组	6.0	6.0	6.3	5.8	5.5	5.5

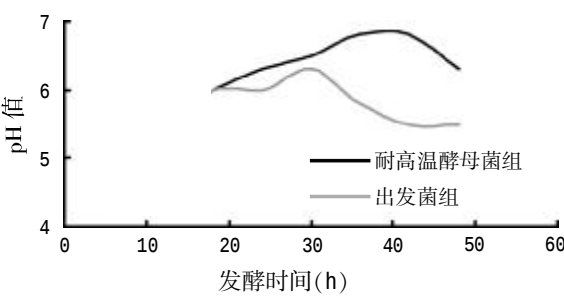


图 1 耐高温酵母菌组和出发菌组 pH 值的变化

从表 2、图 1 可以看到,耐高温酵母菌组 pH 值随

着发酵时间的延长而上升,在 40 h 左右出现高点;出发菌组 pH 值在发酵 30 h 左右出现高点。耐高温酵母菌组 pH 值比出发菌组要高,表明耐高温酵母菌组耐受的 pH 值范围较大。

3.3 发酵期间的气味变化(见表 3)

表 3 发酵期间的气味变化

组别	发酵时间(h)					
	18	24	30	36	42	48
耐高温酵母菌组	米糠味	微香味	微香味	微香味	酒香味	浓酸味
出发菌组	米糠味	微香味	酒香味	酒香味	浓香味	浓香味

从表 3 可以看出,发酵样品随着发酵时间的不断延长,气味发生较明显的变化,且前期出发菌发酵速度较快,香味较浓;而耐高温酵母菌组则后期发酵加快,香味变化明显。

3.4 粗蛋白和真蛋白的测定

测定发酵后样品粗蛋白和真蛋白水平见表 4、图 2,对不同处理组的发酵效果进行方差分析,结果见表 5。

表 4 发酵物中粗蛋白和真蛋白水平(%)

组别	CP	TP	TP/CP
耐高温酵母菌组			
1	37.08	26.88	72.49
2	36.50	26.50	72.60
3	38.20	27.30	71.47
4	37.26	26.89	72.17
5	35.90	26.00	72.42
6	38.93	27.47	70.56
平均	37.31±1.01	26.84±0.49	71.95±0.73
出发菌组			
1	36.24	25.17	69.45
2	37.58	25.80	68.65
3	36.61	25.21	68.86
4	36.81	25.39	68.98
5	36.99	26.00	70.29
6	37.00	25.76	69.62
平均	36.87±0.41	25.56±0.31	69.31±0.55
未处理组			
1	35.36	24.07	68.07
2	35.52	24.19	68.10
平均	35.44±0.44	24.13±0.05	68.09±0.04

注:表中蛋白含量都以干物质计。

表 5 耐高温酵母菌组和出发菌组发酵效果(%)

项目	未处理组	出发菌组	耐高温酵母菌组
平均 CP	35.44±0.44 ^a	36.87±0.41 ^b	37.31±1.01 ^c
平均 TP	24.13±0.05 ^a	25.56±0.31 ^b	26.84±0.49 ^c
平均 TP/CP	68.09±0.04 ^b	69.31±0.55 ^b	71.95±0.73 ^b
增效 CP	100	104	105
TP	100	106	111

注:同行肩标字母相同者表示差异不显著(P>0.05);字母不同者表示差异显著(P<0.05)。

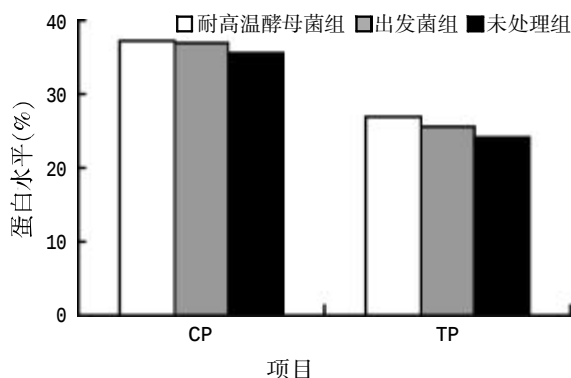


图2 发酵后蛋白水平

从图2可知,对啤酒糟发酵后耐高温酵母菌组和出发菌组较未处理组 CP 分别提高 1.87、1.43 个百分点,TP 分别提高 2.71、1.43 个百分点,差异均显著($P<0.05$)。比较两个处理组可知,耐高温酵母菌组发酵后 CP 水平和 TP 水平均较出发菌组有显著提高($P<0.05$),CP 和 TP 分别提高 0.44、1.28 个百分点($P<0.05$);而 TP/CP 值则没有显著差异($P>0.05$),但有增高的趋势。

4 讨论

4.1 本试验充分说明,耐高温酵母菌在较高温度条件下能够保持正常的生理活动,其最适温度高于出发菌,在较高温度下的生长状况也比出发菌好。

4.2 本试验结果表明,在对啤酒糟进行发酵,耐高温酵母菌组和出发菌组粗蛋白和真蛋白水平较发酵前有明显提高。比较两个处理组可知,耐高温酵母菌组和出发菌组发酵后相比,粗蛋白水平和真蛋白水平分别提高了 0.44、1.28 个百分点,差异显著($P<0.05$),虽 TP/CP 值并无显著差异,但具现有研究资料报道,酵母菌发酵后,由于啤酒糟中消化代谢率低的植物性蛋白变成了代谢率高、适口性好的微生物蛋白,并且粗纤维含量降低,可溶性糖类增多,发酵后总体营养水平大大高于发酵前的啤酒糟,可以用来代替部分豆粕,效果良好。所以我们应重复试验,全面考虑其发酵后的营养水平,也许单纯用粗蛋白和真蛋白来衡量发酵效果欠妥,进一步的研究除了重点研究提高 TP/CP 水平之外,还应该考虑测定样品中的纤维素、氨基酸等,全面评价其发酵效果,并用动物饲养试验来验证。

4.3 本发酵试验在 32℃ 恒温培养箱中进行,试验结果表明,在发酵前期出发菌组发酵速度明显比耐高温酵母菌组快,温度上升早,酒香味纯正且来得更早,其综合效果要优于耐高温酵母菌组,这与寇运同的研究结果是一致的;但到发酵后期随着产热量增多,发酵温度上升,耐高温酵母菌组的优势逐渐表现出来,温度

越高其发酵效果也越好。试验也证实了耐高温酵母菌耐受的 pH 值范围较宽。进一步的研究可以根据发酵前期出发菌组占优势而后期耐高温酵母菌占优势的特点来将耐高温酵母菌和出发菌进行混合,探索最佳混合配比,以提高发酵效果。

参考文献

- 1 和致中,彭谦,陈俊英. 高温菌生物学[M]. 北京:科学出版社,2000
- 2 华子安. 选育耐高温酒糟酵母的研究[J]. 酿酒,2003,30(3):36~39
- 3 王鹤祥,冯霖,熊秀娥,等. 以啤酒糟为原料采用液态混合发酵法生产饲料蛋白的初步研究[J]. 酿酒科技,1995(2):56~58
- 4 郭春雷. 高温菌研究进展[J]. 生物学杂志,2003,20(4):20~23
- 5 郭显章. 酶的工业生产技术[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1998
- 6 崔宗均,路鹏,于会泳,等. 高温菌生物学特征的应用[J]. 微生物学杂志,2003,23(4):28~31
- 7 寇运同,胡永松,王忠彦,等. 高温菌发酵特征及功能的研究[J]. 酿酒科技,1995(3):70~72
- 8 邱雁临. 多菌种发酵啤酒糟生产含酶蛋白饲料的研究[J]. 粮油食品科技,1997(5):24~27
- 9 蔡俊. 啤酒糟发酵生产蛋白饲料影响因子的研究[J]. 粮食与饲料工业,2000(4):30
- 10 陶贵玉,汤斌. 生物转化啤酒糟为饲料蛋白的研究[J]. 安徽机电学院学报,2001(2):33~36
- 11 曾云中,左小明,张冬妮,等. 耐高温酿酒酵母的选育 I: 出发菌株的选择及发酵特征分析[J]. 杭州大学学报,1997,18(4):468~472
- 12 邓芳席. 耐高温腐乳株的选育及产酶条件研究[J]. 湖南农业大学学报,1996,22(2):286~300
- 13 罗明朗. 论固体发酵对物料蛋白质含量的提高[J]. 粮食与饲料工业,1996(1):26~28
- 14 易绍金. 微生物提高石油收率发展现状与展望[J]. 石油与天然气化工,1994,23(4):149~153
- 15 吕福英. 嗜热性乙醇发酵的研究进展[J]. 工业微生物,1997,27(4):37~43
- 16 Pandery. A Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzyme[J]. Current Science, 1999,77(1):149~162
- 17 周群英,王士芬. 含酚废水高温生物处理效果的研究[J]. 城市环境与城市生态,1998,11(2):6~9
- 18 董昌金. 耐高温菌的诱变筛选及生理生化特征研究[J]. 湖北师范学院学报,2002,22(1):69~71
- 19 王修启,郑海刚. 发酵啤酒糟含酶蛋白饲料取代部分豆粕对育肥猪的影响[J]. 河南农业科学,2000(1):32~33
- 20 蔡俊. 啤酒糟发酵生产蛋白饲料的研究[J]. 粮食与饲料工业,2001(3):30~31

(编辑:王 芳,xfang2005@163.com)

腺苷一磷酸激活蛋白激酶与采食量调节

郑 萍 陈代文 张克英

腺苷一磷酸激活蛋白激酶(AMPK)的概念首次出现在 1988 年。近几年的研究表明,AMPK 在调节细胞能量代谢上起着重要作用,被称作细胞内的“燃料开关”,在动物抵御和适应环境应激的过程中也起着重要作用。最新研究显示,AMPK 通过一些激素和养分等途径参与采食量的调节。本文总结了 AMPK 在采食量调节中的作用和可能机制,揭示研究其与动物营养代谢的重要性关系。

1 AMPK 概述

AMPK 是一种能被腺苷一磷酸(AMP)激活的异三聚体蛋白,包括 α 、 β 和 γ 亚基。其中, α 亚基为催化亚基,分子量为 63 k,其 C 端负责与 β 和 γ 亚基结合,含有变构结合位点,参与和 AMP 的结合。 α 亚基存在 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 两种同工型,在哺乳动物组织中被广泛表达。其中, $\alpha 1$ 亚基普遍存在,但主要存在于胞液中; $\alpha 2$ 亚基的表达则受到一定的限制,只在心脏、肌肉、肝脏及胞液和细胞核中表达。 β 和 γ 亚基的分子量分别为 38 k 和 35 k,是 AMPK 的调节亚基,二者对于 AMPK 的活性都是必需的^[1],且对 α 亚基结构的稳定性有一定的作用^[2]。 β 亚基有 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 两种同工型, β 亚基通过后转录的豆蔻酰化作用或多位点的磷酸化作用参与 AMPK 活性的调节和亚细胞的定位^[3]。 γ 亚基有 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 三种同工型,与 α 亚基的 C 端结合,在决定 AMP 的敏感性方面起重要作用^[4]。其中 $\gamma 1$ 亚基在 AMPK 活性的调节,尤其是 AMP 对 AMPK 的调节上有重要作用^[5]。

AMPK 的作用底物包括 β -羟基- β 甲基-戊二酰单酰 CoA 还原酶(HMGCR)、乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)、激素敏感脂酶(HSL)、糖原合成酶等。AMPK 激活后,通过改变一些养分的代谢途径,增强脂肪酸的氧化来促进 ATP 的合成;当 ATP 水平上升,AMPK 则切断 ATP 的合成代谢途径,增强脂肪酸的合成代谢,使细胞恢复其能量平衡^[1]。应激激活 AMPK,通过抑制能量

消耗途径诱导 ATP 生成来调节细胞能量代谢^[6]。

2 机体采食量的调节机制

采食量是衡量动物摄入营养物质数量的尺度。动物的采食量主要受中枢神经系统的调控,而其它器官,如感觉器官、胃肠道、肝脏、血液和脂肪组织也通过神经-体液的反馈作用参与采食量的调节^[7]。

中枢神经系统(central nervous system,CNS)是调节采食量的关键,其作用是使动物产生饥饿感和饱感,调节食欲的大小,从而引起采食的开始和停止,控制采食量。下丘脑和脊髓走神经是中枢神经系统直接调节食欲的主要区域。其它器官(如感觉器官、胃肠道、肝脏、血液和脂肪组织等)的反馈信号进入大脑组织对采食量进行调节,包括化学调节和物理调节^[8]。化学调节即消化道食糜成分和吸收的养分通过其浓度的变化,参与采食量的调节。化学调控采食量的因素有葡萄糖的量、挥发性脂肪酸的量、氨基酸的量、矿物质的量、游离脂肪酸的量、渗透压、pH 值、激素等。Levin 等(2001)^[9]的研究证明,葡萄糖和脂肪酸能通过调节神经细胞的活性从而调节食欲。物理调节主要通过胃肠道紧张度、体内温度变化等来调节采食量。在动物的胃肠道中存在压力受体,能够感受紧张度变化,并将信息通过神经传递到饱食中枢,控制采食行为。

在调节能量稳态上,采食量的长期调节与短期调节交互作用。葡萄糖、胆囊收缩素是主要的短期调节因子。采食量的长期调节取决于动物体内的能量储备,与能量相关的物质可能作为反馈信号影响 CNS 活动,从而控制采食量^[9]。胰岛素和瘦素是摄食和能量平衡的两种重要的长期调节剂。Forbes(1999)^[10]认为,胰岛素和瘦素作用于 CNS 来抑制采食、增加能量消耗,很有可能是通过激活交感神经系统来实现的。

3 AMPK 调节采食量

3.1 AMPK 在采食量调节中的作用

AMPK 在调控细胞内的能量水平上的重要作用已得到证实。近来一些研究表明,AMPK 在调节机体能量代谢及动物采食量方面具有重要作用^[10-12]。Andersson 等(2004)研究发现,下丘脑 AMPK 的表达抑制能引起雄性大鼠的采食量减少和体重减轻;AMPK 的活化则使采食量和体重均增加,通过调节下丘脑 AMPK 的活性能改变大鼠的采食量和体重。

郑萍,四川农业大学动物营养研究所,博士,625104,四川雅安。

陈代文(通讯作者)、张克英,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-27

★ 国家自然科学基金项目(30170691)

3.2 AMPK 调节采食量的可能机制

在小鼠上的研究表明,通过药物作用激活下丘脑 AMPK,能增加采食量。激素调节 AMPK 活性,如注射瘦素降低下丘脑 AMPK 的活性;相反,注射 Ghrelin 则提高下丘脑 AMPK 的活性。AICAR (5-amino-4-imidazole carboxamide) 能够被细胞吸收转化成核糖酸的形式或 ZMP(AMP 的类似物)能激活 AMPK^[13],与 Ghrelin 的效果一致,注射 AICAR 到第三脑室或直接注射到下丘脑的室旁核,注射 8 h 后统计,其能显著提高食物的摄入量。Minokoshi 等(2004)报道,在下丘脑弓形核和室旁核中,瘦素抑制了 AMPK 的活性,降低了采食量。所以瘦素调节采食和体重是通过抑制下丘脑 AMPK 活性实现的,活化 AMPK 则阻碍了瘦素对采食和体重的作用。下丘脑 AMPK 参与采食量调节可能是通过激素和养分浓度途径实现的。

3.2.1 AMPK 通过激素调节采食量

AMPK 对采食量的调节作用可能通过参与食欲调节的激素来起作用。

3.2.1.1 瘦素

瘦素能激活骨骼肌中的 AMPK 活性,增加脂肪酸的氧化^[9]。但瘦素在骨骼肌和下丘脑中 AMPK 活性的影响是不同的,在骨骼肌表现为活化,在下丘脑则表现为抑制。

Andersson 等(2004)^[14]在大鼠腹膜内注射瘦素(1.1 mg/kg),结果表明,下丘脑 AMPK 的活性呈时间依赖性降低。注射 40 min 后 AMPK 活性没有下降,但是 60 min 后 AMPK 的活性下降了 25%~30% ($n=10, P<0.005$),AMPK 活性的下降持续到 180 min ($P<0.05$),在 300 min 时回复到对照组水平。注射瘦素 60 min 和 180 min 后,从下丘脑分离的磷酸化状态的乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)的量降低。相反的,在大鼠腹膜内注射 Ghrelin(30 nmol/只)后,下丘脑 AMPK 被激活。注射 40 min 后 AMPK 活性没有变化;但是 60 min 后,AMPK 的活性增加 45%~50% ($n=10, P<0.05$);180 min 时回复到对照组水平。AMPK 激活的同时,磷酸化的 ACC 的量在 60 min 后增加,但 180 min 后无变化。

有研究发现,瘦素对下丘脑 AMPK 活性的作用主要是降低 AMPK α 2 的活性。在禁食、自由活动的大鼠腹膜内注射瘦素,在注射后 3、6 h 检测 AMPK 的活性,发现下丘脑室旁核和弓形核的 AMPK α 2 的活性降低,但在下丘脑的其它区域,AMPK 的活性不受瘦素的影响。而且,在下丘脑的任何一个区域,瘦素都不能改变 AMPK α 1 的活性。在皮质层中,注射瘦素后

AMPK α 2 的活性不改变,可能由于 AMPK α 2 的活性在注射瘦素前就已经很高。在下丘脑中注射瘦素与腹膜内注射的效果相似,都抑制下丘脑室旁核和弓形核的 AMPK α 2 的活性。这种作用可能直接或间接地通过神经细胞网来起作用^[12]。

3.2.1.2 胰岛素

在下丘脑,胰岛素的作用比瘦素和 MC- II 的作用更广泛。因为脑室内注射胰岛素,除皮质层外,下丘脑所有区域的 AMPK α 2 的活性都降低了 25%~40%^[12]。

3.2.1.3 黑色肾上腺皮质激素(MC)

Minokoshi 等(2004)研究证明,注射 MC- II (一种 MC3 和 MC4 受体的激动剂)到脑室内的侧脑室,抑制下丘脑室旁核的 AMPK α 2 活性,其作用与瘦素相似。另外,注射 MC- II 对饱食中枢和饥饿中枢及皮质中的 AMPK α 2 活性均无影响。脑室内注射刺豚鼠相关蛋白(agouti-related protein,AGRP,一种诱食剂),则增加下丘脑室旁核的 AMPK α 2 活性^[8,12]。而刺豚鼠相关蛋白(AGRP)是 MC3 和 MC4 受体的特异性竞争拮抗物。AGRP 和 MC- II 对下丘脑室旁核(PVH)中 AMPK 的作用表明,PVH 中 AMPK 的活性受黑色肾上腺皮质激素 MC3 或 MC4 受体的调节。

3.2.2 AMPK 通过养分浓度调节采食量

在清醒大鼠腹膜内注射葡萄糖,抑制下丘脑除皮质外的所有区域的 AMPK α 2 的活性。因为体组织注射葡萄糖会导致高血糖,刺激胰岛素的分泌,改变了如脂肪酸等底物的水平,而脑葡萄糖的浓度调节神经细胞的燃烧速率,葡萄糖浓度的上升会抑制采食行为,改变细胞的自律性^[9]。实验组大鼠腹膜内注射(12.2 $\pm$ 1.3) mmol/l 葡萄糖,对照组大鼠腹膜内注射(5.1 $\pm$ 0.4) mmol/l 生理盐水。结果注射葡萄糖组大鼠的胰岛素分泌量是(0.89 $\pm$ 0.14) ng/ml,而注射生理盐水的胰岛素分泌量是(0.09 $\pm$ 0.01) ng/ml。脑室内注射葡萄糖并不能改变血浆葡萄糖的浓度及胰岛素的浓度,然而,在下丘脑的所有区域的 AMPK α 2 的活性都受到抑制,与腹膜内注射葡萄糖的效果相似^[13]。

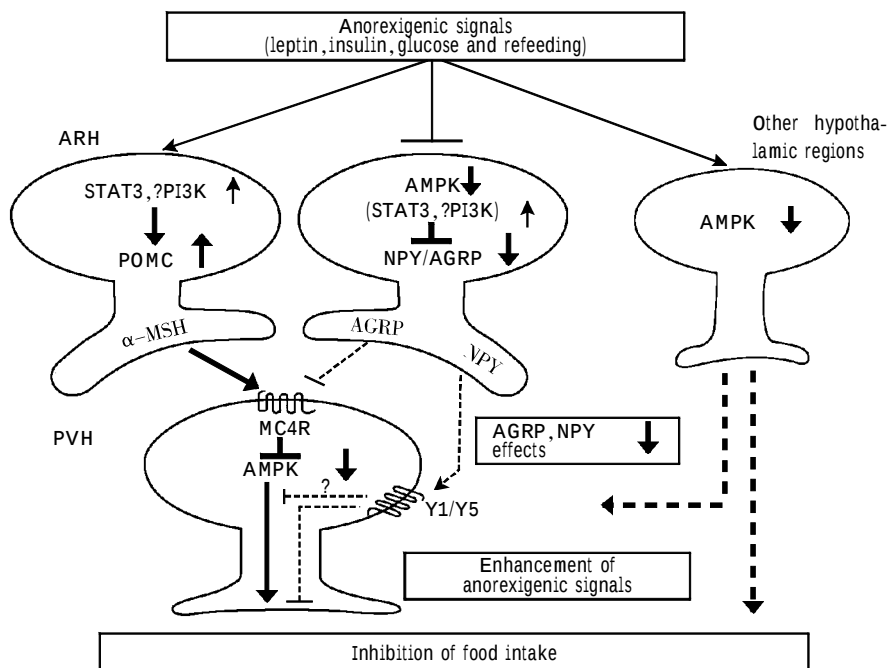
3.2.3 食欲抑制激素和养分调控 AMPK 的机制

食欲抑制激素调控 AMPK 的可能机制:下丘脑室旁核中食欲减退信号对 AMPK 活性的作用是通过 MC4 受体来调节的,其作用与 MC- II 相似,在 MC4 受体敲除大鼠上则缺乏这样的作用。研究认为,瘦素在下丘脑室旁核中的部分作用受到黑色肾上腺皮质激素(MC4)受体的调控作用^[12]。Minokoshi 等(2004)研究分析了 MC4 受体敲除大鼠的室旁下丘脑中 AMPK 的

活性调节,发现 MC4 受体敲除大鼠腹膜内注射的瘦素,室旁下丘脑中 AMPK α 2 的活性没有下降。因此,瘦素对下丘脑室旁核中的 AMPK α 2 活性的降低作用依赖于 MC4 受体的信号。而黑色肾上腺皮质激素受体信号传输则需要降低食欲信号(如瘦素或禁食后饲喂等)对下丘脑的 AMPK 活性的作用。研究者认为,AMPK 调节采食量的途径,可能是通过瘦素的作用,多数情况下与 STAT3 (信号传导蛋白及转录激活蛋白 3)和 PI3-K(磷脂酰肌醇 3-激酶)相协同作用的途径。AMPK 可能是作为 STAT3 的下游激酶起作用,也可能是与 STAT3 相平行的途径来调节采食量的。食欲减退剂通过 STAT3, 及可能的 PI3-K 激活下丘脑 POMC 神经元,产生由黑素细胞刺激激素调节的第二个食欲减退信号。相反,降低弓形下丘脑(ARH)中 AMPK 活性会

加强 STAT3 途径及可能的 PI3-K 途径对神经肽 Y 或刺豚鼠相关蛋白神经细胞的抑制作用,其中刺豚鼠相关蛋白(AGRP)竞争性地抑制黑色素原(鸦片样肽促黑素促皮质素原,POMC)神经元对 MC4 受体的刺激作用^[4]。神经肽 Y 则功能性地抑制下丘脑室旁核中 MC4 受体途径^[5],从而导致下丘脑室旁核中 MC4 受体信号的活化。而 MC4 受体信号的活化又抑制下丘脑室旁核中 AMPK 的活性,可能进一步加强了调节采食量和能量水平的神经传递作用。此外,在下丘脑,通过药理学的作用抑制瘦素对 PI3-K 活性的激活,就抑制了瘦素对采食量的调节作用^[6]。

因此,AMPK 途径似乎与几种降低食欲的输入途径相协调。Minokoshi(2004)作了 AMPK 在下丘脑降低食欲信号作用的可能模式图,见图 1。



注:厌食信号通过信号传导蛋白及转录激活蛋白 3(STAT3)及可能的磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)激活下丘脑弓形核黑色素原(POMC)神经元,产生由黑素细胞刺激激素(α -MSH)调节的第二个食欲减退信号;相反,厌食信号部分通过 STAT3 及可能的 PI3K 降低这些神经元中 AMPK 的活性,抑制神经元中神经肽 Y 或刺豚鼠相关蛋白(NPY/AGRP)的活性。降低弓形下丘脑(ARH)中 AMPK 活性会加强对神经肽 Y 或刺豚鼠相关蛋白(NPY/AGRP)的抑制作用,导致室旁核下丘脑黑色肾上腺皮质激素(MC4)受体信号的活化。MC4 受体的活化降低了室旁核下丘脑中 AMPK 的活性,可能进一步增强对采食量和能量调节的神经传递的需要。降低室旁核下丘脑中 NPY 信号能功能性的加强 MC4 信号途径。此外,降低其它下丘脑区域的 AMPK 活性也可能增强 MC4 受体信号途径而参与调节采食量。

图 1 AMPK 在下丘脑降低食欲信号作用的可能模式

4 结语

AMPK 调节采食量的研究已引起人们广泛兴趣,在人及动物生产领域越来越受到关注。通过激素或养分调节下丘脑 AMPK 的活性,从而对采食量进行调节。

根据下丘脑 AMPK 与采食量调节的关系预测,AMPK 可能是治疗肥胖症的新的有效途径,也可能是动物生产中解决采食量问题的新途径。目前的研究显示,各种激素对下丘脑 AMPK 调节作用的途径还不清楚,下丘

鱼类磷脂营养研究进展

张 辉 牟振波 单安山

近年来,作为脂肪成分之一的磷脂是鱼类营养研究十分活跃的领域。由于磷脂营养具有明确的营养价值,因此已经广泛的用于饲料生产。但是对于不同的鱼类以及鱼类发育的不同阶段,磷脂应用的原理和方法仍是近年来相关人士普遍关心的问题。

鱼类对脂肪的吸收和利用与哺乳动物相近。脂肪在肠道水解后,被肠道上皮细胞以甘油一酯微滴的方式吸收。主要有两种途径:①甘油一酯途径,即在光面内质网合成甘油三酯;②L- α -甘油磷脂途径,即在粗

糙和光面内质网合成甘油三酯和三磷酸甘油酯(Sire 等,1981)。吸收的脂肪最后以 VLDL(极低密度脂蛋白)和乳糜微滴的形式释放到粘膜下层(Sire 等,1981;Leger 等,1988)。这两种途径要受到饲料脂肪的影响。磷脂的吸收也同样遵循上述过程,不过在此过程中也会产生促进其它营养物质吸收的相关作用(Geurden 等,1997;Olsen 等,1999;Olsen 等,2003)。

1 磷脂的生理作用

磷脂是一类含磷的类脂化合物,是细胞原生质的固定成分。蛋黄、植物种子及胚芽、大豆、鱼卵中都含有丰富的磷脂。根据磷脂结合的化合物不同,其组成又可分为卵磷脂、脑磷脂、神经磷脂等。磷脂在鱼类生命活动中具有重要的作用,是鱼体的结构性物质,有调节信息传递功能等作用,对某些营养物质的吸收也具有促进作用。目前在鱼类营养中研究较多的是卵磷脂(Geurden 等,1998;Geurden 等,1997;Olsen 等,1999;Olsen 等,2003)。

张辉,东北农业大学动物营养研究所,150030,哈尔滨市香坊区公滨路木材街 59 号。

牟振波,黑龙江水产研究所。

单安山(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-23

★ 黑龙江省科技攻关项目“细磷鱼幼鱼营养需求研究”

脑 AMPK 对采食量的调节可能有多种途径及作用机理,至今还未研究清楚,都有待于进一步的研究。

目前的研究多数是以大鼠为实验对象,通过诱导作用激活或抑制下丘脑 AMPK 的活性,观察其对采食量及体重的影响。动物采食饲料的多少影响动物的生产效率和饲料转化率,适宜的采食量是提高饲料转化率的重要因素。

参考文献

- 1 Hardie D G, D Carling, M Carlson. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolite sensors of the eukaryotic cell[J]. Annu. Rev. Biochem., 1998, 67:821~855
- 2 Crute B E, K Seefeld, J Gamble, et al. Functional Domains of the α 1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase [J]. J. Biochem., 1998, 273:3 5347~35 354
- 3 Warden S M, C Richardson, O'Donnell jr, et al. Post-translational modifications of the β -1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization[J]. J. Biochem., 2001, 354: 275~283
- 4 Hamilton S R, D Stapleton, J T Kung, et al. An activating mutation in the γ 1 subunit of the AMP-activated protein kinase[J]. FEBS Letter, 2001, 500:163~168
- 5 Winder W, B Holmes, D Rubink, et al. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscles[J]. Appl. Physiol., 2000, 88:2 219~2 226
- 6 Hardie D G, J W Scott, D A Pan, et al. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system[J]. FEBS Lett., 2003, 546:113~120
- 7 Forbes J M. Natural feeding behaviour and feed selection, in regulation of feed intake. CABI Publishing, 1999
- 8 Schwartz M W, et al. Central nervous system control of food intake [J]. Nature, 2000, 404:661~671
- 9 Levin B E. Glucosensing neurons do more than just sense glucose. Int. J. ObesRelat. Metab. Disord. Suppl., 2001, 5: S68~S72
- 10 Minokoshi Y, Y B Kim, O D Peroni, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase [J]. Nature, 2002, 415:339~343
- 11 Andersson U, K Filipsson, C R Abbott, et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake [J]. J Biol. Chem., 2004, 279:12 005~12 008
- 12 Minokoshi Y, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus [J]. Nature, 2004, 428: 569~574
- 13 Yamauchi T, J Kamon, Y Minokoshi, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activated AMP-activated protein kinase[J]. Nature Med., 2002, 8:1 288~1 295
- 14 Ollmann M M, et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agoutirelated protein[J]. Science, 1997, 278: 135~138
- 15 Cowley M A, et al. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: Evidence of a cellular basis for the adipostat. Neuron., 1999, 24:155~163
- 16 Wan H, N Dedousis, A B Bankim, et al. Impaired activation of Phosphatidylinositol 3-kinase by leptin is a novel mechanism of hepatic leptin resistance in diet-induced obesity[J]. JBC., 2004, 3:1~33

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

饲料中的卵磷脂直接影响到鱼体对干物质的消化利用。用亚麻油和豆油饲喂北极虹点鲑时(Olsen等,1999)发现,添加豆油时鱼体对干物质的消化率最高,同时亚麻油使鱼体的幽门盲囊、中肠肠壁细胞内有脂滴累积,这种累积可能导致消化道细胞的损伤,产生疾病。在含有较高含量不饱和脂肪酸的饲料中添加磷脂后,可以保证体内的脂蛋白合成,从而促进脂肪吸收和转运。

消化道的不同部位对脂肪的吸收利用也有所不同。饲料中的大豆卵磷脂可以提高北极红点鲑幽门盲囊、中肠和后肠的表观消化率,而且与添加亚麻油的饲料相比,上述消化道部位没有脂滴累积。因此,北极红点鲑在饲喂高水平的多不饱和脂肪酸时,内源性合成的磷脂不能维持体内的脂蛋白合成,必需添加PL(磷脂酰甘油)(Olsen等,1999)。而且虹鳟饲料中的大豆卵磷脂也可以促进脂蛋白的合成(Olsen等,2003)。

在能量缺乏时,鱼体对作为生物膜组成的磷脂利用很低,以此来保证细胞的完整。Mourete(1999)研究饥饿舌齿鲈仔鱼对脂肪利用的试验发现,中性脂肪消耗明显高于对PC(磷脂酰胆碱)的利用,而且在试验前期有PE(磷脂酰乙醇胺)的净合成,TG(三酰甘油)和CE(胆固醇酯)的利用要明显高于PL(磷脂酰甘油)。中性脂肪作为能量源被优先利用,磷脂作为生物膜的组成成分被保留下来。

磷脂膜的流动性与磷脂中的脂肪酸种类有一定的关系。在环境水温为15℃以下时,淡水鱼白鲢、花鲢、草鱼和鲤鱼的胞膜磷脂膜流动性差异主要是由脂肪酸分子种类决定的。这种流动性的改变,不仅是食物中脂肪的作用,而且是鱼体在适应温度时,肝脏对细胞膜理化性质的特异反应调节而产生的(Roy等,1999)。

某些磷脂可能参与洄游性鱼类的渗透压调节。鳗鱼在水域环境转换过程中,随着盐度的下降,鳃部的PE能够最大程度的保持稳定,并能在环境盐度稳定后快速恢复。这说明鳗鱼可能依赖PE来完成渗透压的调解活动(Heinz等,2004)。

饲料磷脂为改善鱼体生长提供了营养前提。人工养殖牙鲆体内的磷脂与DNA的比率和生长速率呈正相关关系,与野生牙鲆相比变化范围小很多。这种差别可能受到环境因素的影响,但主要反映出营养状态与生长之间的关系(Fukuda等,2000)。

磷脂不仅是胚胎发育阶段的能量来源,而且还可

以参与仔鱼鱼体脂肪的合成。大西洋庸鲽受精卵在孵化时对三酰甘油的利用显著高于其它发育阶段,而且磷脂水平有明显的升高,这种现象的出现可能是游离氨基酸被用来合成脂肪的结果(Zhu等,2003)。狗鱼的受精卵在胚胎发育过程中(6d)CE和TG含量下降,而PE含量明显增加。卵黄囊吸收前(受精后7~10d),选择性的利用卵黄囊PC;鳔充气 and 开始游动时(孵化后11~13d),卵黄彻底消耗,卵黄中的PC和TG完全分解,其中的PE和CE用来合成为体脂肪(Desvillettes等,1997)。

脂蛋白酶在卵母细胞合成中性脂肪的过程中也有非常重要的促进作用,活性的升高可能与卵母细胞中的脂肪积累有关(Ib'añez等,2003)。

舌齿鲈和大菱鲆饲料中添加PL,增重得到明显提高。添加磷脂和未添加磷脂的饲料相比,能够影响鱼体脂肪酸组成,提高n-3和n-6PUFA吸收。这表明磷脂n-3HUFA与乙酯化n-3HUFA可以有效的参与合成脂蛋白(Geurden等,1997)。

细胞营养学试验证明,磷脂结构与脂肪酸吸收直接影响到细胞的生长。随虹鳟鱼皮肤细胞培养时间的延长,磷脂结合的脂肪酸会发生明显的变化。其中,经过18:3n-3培养后,PC的合成明显加快,表明磷脂对细胞生长具有重要的生理意义(Ghioni等,1997)。

饲料中脂肪含量,不仅影响到鱼体的脂肪酸组成,而且会改变亲鱼体内磷脂的组成,这种情况会影响到繁殖效果。金头鲷亲鱼投喂缺少n-3HUFA饲料,雌鱼肝脏、性腺和鱼卵脂肪酸组成中的PC、PE和PI与对照组相比差异显著,反映出饲料中脂肪酸水平对体脂肪的影响,而且试验组的产卵数量、受精率和孵化率明显低(Rodríguez等,1998)。

2 磷脂的吸收

鱼类对脂肪的吸收主要是通过肠道上皮细胞吸收乳化后的甘油一酯和脂肪酸微滴,最后合成为VLDL,磷脂的吸收也遵循这样的规律。

目前,磷脂吸收的研究主要集中在仔鱼阶段。某些鱼类的仔鱼在开始摄食外源性营养的时候可能会由肠道上皮细胞吸收脂肪,不同种类间消化道吸收的部位也有所不同。白鲢仔鱼的吸收部位在前肠(Seeger等,1989);金头鲷在肠的各个部位都可吸收(Izquierdo等,2000);与金头鲷相近,舌齿鲈仔鱼脂肪吸收也在肠的各部位吸收,但主要在末梢部位完成(Deplano

等,1991)。这种末梢部位贯穿于整个仔鱼发育阶段可能与消化道没有功能完全的胃有关。

磷脂的种类和数量对鱼体的影响有所不同。大菱鲆仔鱼摄食含有丰富 PC 的饲料生长良好,表明 PC 在肠道吸收中性脂肪上起到了重要的作用(Geurden 等,1998)。磷脂不仅可以促进中性脂肪的吸收,而且对长链不饱和脂肪酸也有促进吸收作用。舌齿鲈稚鱼经投喂含磷脂饲料生长有所提高,而且明显增强了 DHA 吸收(Geurden 等,1997)。

舌齿鲈仔鱼具备早期脂肪吸收机制(Izquierdo 等,2000),即卵黄营养末期肠道上皮细胞具有了吸收功能,但很不完善,主要表现为内质网和高尔基体数量不足(Deplano 等,1991)。因此只有很小一部分脂肪合成为脂蛋白颗粒,说明脂肪运输能力的低下。投喂几天的植物脂肪后发现,在肠道细胞内出现了大量的脂肪滴。舌齿鲈仔鱼脂肪转运能力可能在第 9 d 开始提高,这时脂蛋白合成与肝脏糖源沉积同时加强;自 18 d 起,粗面内质网和高尔基体系统高度发育,此时舌齿鲈仔鱼合成脂蛋白和转运的能力要高于成鱼。

采用人工饲料饲喂舌齿鲈,脂肪转运可能因为肠道上皮细胞的内质网和高尔基体发育的不完善而出现转运能力低下的问题(Deplano 等,1991)。在仔虾(Teshima 等,1986a、b)、鲤鱼仔鱼(Fontagné,1996)和一些海水种类鱼(Kanazawa,1993a)的人工饲料添加磷脂酰甘油时,脂肪由肠道上皮细胞转运至肝脏细胞的能力增强。

3 饲料中磷脂的作用

在香鱼(Kanazawa 等,1985)、鲤鱼(Radünz - Neto 等,1994)、牙鲆、眼带石鲷(Kanazawa 等,1983)和赤鲷(Kanazawa 1993)微囊饲料中添加 PL 对仔鱼有提高生长率和成活率的效果。虽然各类磷脂的作用有所不同,但主要组成部分 PC 和 PI(磷脂酰肌醇),它们可以起到提高生长率和成活率的效果。牙鲆仔鱼饲料中,PC 在提高生长率方面要好于 PI(Kanazawa,1993);而鲤鱼仔鱼 PI 在提高生长和防御骨骼畸形上好于 PC(Guerden 等,1995)。鲤鱼仔鱼饲料 PC 和 PI 虽然可以提高生长率,但不会对鱼体内肌醇和胆碱的缺乏起到改善作用,对脂肪乳化作用也没有影响(Guerden 等,1995)。

在对虾(Teshima 等,1986a)和金头鲷仔鱼饲料中添加大豆 PC 可以提高饲料消化效率,而且饲料中 PL 的提高可以改善金头鲷仔鱼对微囊饲料的消化(Koven 等,1993)。

鲤鱼仔鱼饲料中添加大豆 PC 可以提高对总脂肪的消化能力(Fontagne 等,1998),这种情况可能与 PLA2 酶活性提高以及 PC 与 PLA2 酶优先结合有关(Iijima 等,1998)。

饲料中添加大豆磷脂和大豆油显著影响到鱼体肠道的脂肪酸组成。将含鱼油的饲料投喂虹鳟后,再投喂含大豆 PC 和大豆油的饲料,肠道细胞脂肪酸成分发生了改变(Olsen 等,2003)。在投喂鱼油后,胃、中肠和后肠细胞膜脂肪成分相近,后肠比胃和中肠含有较高的磷脂酰丝氨酸,而中肠含有较高的磷脂酰胆碱而溶血 PC 较少。投喂大豆产品可能减少了游离胆固醇含量,同时脂肪酸组成有明显的区域性分布。

饲料磷脂在一定程度上有利于不饱和脂肪酸的吸收与利用。结束投喂活饵的欧洲鲈鱼和大菱鲆投喂添加磷脂的饲料,鱼体增重效果明显,但成活上却没有变化(Geurden 等,1997)。鱼体经过一段快速生长后,饱和脂肪酸的比例下降,单一脂肪酸经最初的下降后开始上升,整体 n-3 PUFA 下降而 n-6 PUFA(多不饱和脂肪酸)保持稳定。对鱼体脂肪酸组成影响上,饲料中添加磷脂和未添加磷脂的相比主要是 n-3 和 n-6 PUFA 含量分别增加了 50%;与乙酯化磷脂的饲料(1.6%)相比,这种现象并不由 n-3 HUFA 决定,因为 n-3 HUFA 仅在磷脂饲料中含有小部分(0.1%)。表明 n-3 HUFA 磷脂比 n-3 HUFA 乙酯可以有效的参与鱼体脂肪的合成。而且,饲料磷脂较乙酯化 n-3 HUFA 更适合于鱼体内脂肪合成(Geurden 等,1997)。

PC 可以明显提高大菱鲆仔鱼的增重,同时也可以提高鱼体脂肪中甘油三酯和 DHA 的含量(Geurden 等,1998)。PC 的存在对肠道吸收中性脂肪起到了促进作用,其中脂肪酸的饱和度在一定程度上也对仔鱼生长具有一定的刺激作用。

饲料中的 PC 可能对脂肪转运有明显的影响。用没有添加卵磷脂的饲料饲喂金头鲷仔鱼会使其肠道上皮细胞基部出现脂肪液泡累积,而且肝脏出现脂肪变性。这两种现象可因添加 2% 的大豆 PC 而减轻,表明肠道和肝脏对脂肪转运活动增加(Izquierdo 等,2000)。鲤鱼仔鱼前肠出现脂肪滴累积也与 PC 缺乏有关,说明 PC 具有和哺乳动物一样的合成 VLDL 的特殊作用。饲喂 PC 可以减少脂肪滴的累积,而 PI 不能预防这种变化(Fontagné,1996)。与其它 PL 相比,饲料中的 PC 引起的脂蛋白合成增加可能与其在鱼体内的脂蛋白占优势有关,而且可能同哺乳动物一样产生对脱辅基蛋白分泌的刺激作用(Field 和 Mathur,1995)。Teshi-

ma等(1986b)提供了饲料中PL可以提高脂肪转运的生化证据,即通过血淋巴产生的脂肪转运增加。

对很多种类来讲,增强脂肪转运可以提高脂肪沉积。因此,提高饲料中的磷脂酰甘油可以改善仔虾的脂肪沉积,尤其是PC和胆固醇(Teshima等,1986b);对金头鲷仔鱼则可以提高标记油酸的结合(Koven等,1993)以及改善PL和TG储留;也可以促进DHA结合到真鲷的极性脂肪中(Salhi等,1995)。

磷脂酰甘油中的脂肪酸组成决定了脂肪的有利影响的程度。含有PUFA的PC和PI可以提高香鱼仔鱼的生长与成活,而鸡蛋PC和棕榈酸PC对生长没有改善(Kanazawa等,1985)。用类似方法,大豆PC可以比鸡蛋PC更有效地提高牙鲆仔鱼的增重(Kanazawa,1993)。在金头鲷仔鱼饲料中添加0.1%PC(大豆或乌贼)可以使因饲料中添加PC而使肠道细胞基部产生的脂肪液泡消失。但是乌贼PC比大豆PC可以更有效减少肝脏脂肪变性,说明饲料PC与PUFA联合作用的结果是提高肝脏脂肪的利用,并且已经发现这两类分子具有增强脂蛋白合成的作用。

4 饲料中的磷脂与三酰甘油的利用效率

脂肪酸分子在饲料中存在形式对海水鱼类仔鱼的生长与成活非常重要。饲料中的游离脂肪酸与三酰甘油和磷脂酰甘油相比,游离脂肪酸结合到仔鱼体脂肪的量很低。饲料中来源于PL的n-3 HUFA或者是TG的n-3 HUFA比游离脂肪酸可以更有效地防止必需脂肪酸缺乏(Izquierdo,1988;Izquierdo等,1989;Geurden等,1997)。

用甲基酯脂肪酸替代三酰甘油强化培育的轮虫投喂海水仔鱼后,生长下降,这种现象与轮虫体内的n-3 PUFA主要以游离脂肪酸形式存在,而不是结合为三酰甘油和磷脂酰甘油有关(Izquierdo,1988;Izquierdo等,1989)。饲料中添加植物磷脂,不仅可以促进中性脂肪的吸收,而且还有助于舌齿鲈稚鱼对饲料中DHA的吸收(Geurden等,1997)。

用标记方法研究饲料中含有海洋来源的三酰甘油脂肪时发现,饲料中以游离脂肪酸形式存在的油酸,其结合到金头鲷仔鱼体脂肪的数量要比添加以油酸三酯形式的脂肪酸数量低;而且,不论脂肪种类如何,饲料中的磷脂酰甘油结合到仔鱼的体脂肪数量要高于游离脂肪酸结合到仔鱼体脂肪数量(Izquierdo,1988)。不同种类的游离脂肪酸结合也有不同,EPA(二

十碳五稀酸)要比油酸的结合量高。金头鲷投喂含有海洋PL后,结合到仔鱼PL上标记的EPA比标记的油酸数量要高。这可能反应出EPA与PL合成与转运酶的高亲和力有关。

研究认为,来源于PL的n-3 HUFA或者是TG的n-3 HUFA吸收快,而且能够有效地合成为体脂肪(Ackman等,1989;Geurden等,1997)。用含有海产PL替代含有海产TG的微囊饲料饲喂金头鲷仔鱼,虽然前者n-3 HUFA含量稍低于后者(分别为1.5%和1.8%),却可以明显提高金头鲷仔鱼生长(Salhi等,1999)。

植物来源的磷脂不仅可以改变鱼体内中性脂肪的含量,而且比不添加磷脂的饲料能提高海水鱼体内DHA的含量,有效地促进了中性脂肪的吸收和利用(Geurden等,1997)。海水来源的磷脂会明显提高脂肪中的PUFA含量。喂饲海产TG的仔鱼消化道细胞基部出现脂肪液泡和肝脏脂肪变性,表明TG的吸收较好,但也减弱了脂肪向外围组织的转运,而饲喂海产PL明显减少了脂肪在肠道和肝脏的沉积。喂饲含有海产TG的仔鱼,由于TG和CE的累积而呈现组织脂肪含量高,而饲喂含有PC和PE的海产PL,仔鱼脂肪中的n-3 HUFA含量高,且种类丰富(Salhi等,1999)。

目前,已经有组织学、组织化学和生物化学的证据表明,海水鱼类可以有效消化和吸收含有丰富n-3 HUFA的TG;饲喂PL,尤其是富含n-3 HUFA时,能够改善TG消化吸收,特别是具有提高n-3 HUFA结合到仔鱼细胞膜的物质合成作用,从而加快脂肪转运和生长。

5 结语

对于鱼类饲料磷脂的研究还有极为广阔的空间,其最终目的就是为解决养殖苗种生产中的成活和生长问题。如何通过现代研究手段,如组织化学、酶学、免疫组织化学等,进行脂肪吸收定位分析和提高鱼体对能量物质的新陈代谢,不仅可以提高苗种的生产规模,而且也会节省蛋白源(Fukuda等,2001;Heinz等,2004)。近年来,磷脂的添加工艺作为饲料工业的研究内容也有了一定的突破(ósaçr等,2003)。因此,如何添加磷脂和提高脂肪生物利用效率是未来研究的主要方向。

(参考文献37篇,刊略,需者可函索)

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

猪繁殖与呼吸综合征疫苗研究进展

何丽华 陈浩杰 李晟阳 沈国顺

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是 20 世纪 80 年代中后期出现的一种新的传染性疾病。由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起, 主要特点为怀孕母猪发生流产、早产、死胎、木乃伊胎等严重的繁殖障碍以及仔猪与育肥猪出现呼吸道症状。1987 年该病首先在美国发生, 随后在加拿大、欧洲各国和亚洲各地迅速流行。我国自 1995 年年底暴发此病, 现已成为危害我国养猪业的主要疫病之一^[1,2]。PRRSV 感染猪体的巨噬细胞系统引起机体的细胞免疫功能低下, 而体内高水平的病毒特异性抗体又不足以清除病毒, 造成猪体的持续性感染, 已有证据表明, PRRSV 感染引起脑脊液 (CSF) 疫苗产生的抗体水平下降^[3]。由于 PRRSV 感染引起的巨大危害, 关于 PRRS 疫苗的研究也逐渐开展起来。目前, 商品化或正在研究的 PRRS 疫苗有以下几类:

1 减毒活疫苗

在美国, Boehringer Ingelheim 公司 NOBL 实验室于 1995 年首次推出商品化减毒疫苗 Resp PRRS/ReproTM, 已获准用于 3~18 周龄仔猪的预防接种, 有些国家还将其用于繁殖猪群。该疫苗只需肌注一次, 初次免疫试验显示有一定的效果。Schering-Plough 动物保健公司生产的弱毒疫苗 Prime Pac® PRRS, 用于母猪或后备母猪配种前 3~6 周的预防接种, 但禁用于 PRRS 阴性猪群、妊娠母猪和育龄公猪。

弱毒苗使用后可产生一定的保护作用^[4]。何信群等 (2003)^[5]制备了 PRRSV 减毒活疫苗, 并进行了猪体试验, 结果发现, 免疫后 20~35 d 左右出现抗体高峰, 并可持续 3 个月以上, 有较长的免疫保护期, 免疫后第 14 d 即可检测出 PRRSV 中和抗体。Mavromatis 等人证实活疫苗可保护育肥猪抵抗 PRRSV 引起的呼吸道症状。Cheon 等 (2004)^[6]比较了 2 个 PRRSV 朝鲜分离株 (1 株为野毒、1 株为疫苗毒) 病原性的差别, 结果发现, 在预产期前 2 周接种野毒株的母猪出现了流产

及早产, 而接种疫苗的母猪没有出现这些症状。另外, 接种野毒株的母猪所产 65 头仔猪只有 18 头存活, 其中有 14 头出现间质性肺炎; 而接种疫苗株的母猪所产的 64 头仔猪中有 60 头仔猪存活, 其中只有 6 头出现间质性肺炎。从死产仔猪及活产仔猪体内进行病毒抗原及核酸的检测, 结果发现, 野毒株接种组的检出率为 73.8%, 而疫苗组的检出率只有 18.8%。

Mengeling 等 (2003)^[7]用单株或多株 PRRSV 致弱毒株免疫猪发现, 有 2 个毒株可对猪体产生高水平的免疫保护, 但免疫后猪的淋巴结出现肿大。Labarque 等 (2003)^[8]比较了 2 种减毒活疫苗 (欧洲株和美洲株) 的免疫效力, 免疫后用强毒力的 PRRSV LV 株攻毒, 结果发现, 经美洲株免疫的猪中有 15/16 比例分离到强毒力的 LV 株, 而且病毒滴度与单独 LV 攻毒猪的病毒滴度相当; 经欧洲株免疫的猪中有 11/16 的比例分离到 LV 强毒株, 但病毒滴度明显低于单独 LV 攻毒猪的病毒滴度。作者认为疫苗的保护效力不完全, 但相同亚群的毒株间可提供更好的保护效果。这提示疫苗免疫时应该针对当地流行的 PRRSV 亚群。

PRRS 减毒活疫苗免疫怀孕母猪后会产生一些副作用。Bouwkamp (1999) 发现, 在没有 PRRS 流行的猪场对母猪进行 PRRS 疫苗的免疫会导致配种失败及不发情, 认为如果没有进行很好的诊断调查, 在 PRRSV 污染场对母猪进行 PRRS 的免疫在经济上并不可行。Dewey (1999) 等发现, 母猪妊娠期间的任何时间免疫 PRRSV 减毒活疫苗都会导致产活仔数减少, 产死仔猪及木乃伊胎增多, 尤其在妊娠的最后 4 周免疫影响最大。

弱毒苗的不安全性, 尤其毒力返强的可能性成为人们关心的一个主要问题。有研究发现, 在商品化减毒活疫苗株 ingelvacPRRS MLV 使用过的猪场分离到 1 株 PRRSV^[9], 经测序表明, 该毒株来源于疫苗株, 但出现了疫苗株所不具有的致病性, 并引起免疫猪出现肺部病变。Nielsen 等^[10]在一项试验中发现, 仔猪免疫减毒活疫苗后, 从同一猪场的未免母猪的胎儿、死产猪、死亡仔猪体内分离到疫苗来源的病毒, 证明弱毒苗可引起猪场 PRRS 的发生。

为了研究加拿大 Quebec 省 PRRSV 分离株的分子流行病学, Larochelle 等 (2003)^[11]收集了 1998 年 3 月

何丽华, 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 110161, 沈阳市东陵路 120 号。

陈浩杰、李晟阳、沈国顺, 单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期: 2006-11-22

至2002年7月间分离的226株PRRSV(均引起过繁殖障碍或呼吸道症状或引起血清PRRSV相应抗体水平升高),并对其分离背景进行了调查。结果发现,69%的毒株其来源猪群进行过PRRS疫苗免疫,然而只有26%毒株其来源的猪只本身接受过疫苗免疫,对所有样品的分子流行病学分析发现,10%的毒株为疫苗毒。4年的时间内在41个猪群中分离到1株以上的病毒(2~8株)。数据分析显示,毒株可在猪群存在3.5年,期间ORF5会发生2%的变异。从78%的猪群的多次送检样品中分离到多株PRRSV,而且大多是在首次鉴定出PRRSV的1年内分离到。可见疫苗使用后病毒很容易发生变异,这些变异的毒株是猪场复发PRRS的主要原因。因此,虽然弱毒苗免疫后可以给猪体建立一定的免疫力,但由于使用后的不安全性限制了弱毒苗的临床使用。

2 灭活苗

抗PRRS与其它疾病的联合疫苗已面世,如RespPRRS/Pig-HPtM(含PRRS和副嗜血杆菌)、RespPRRS/Pig-HpetM(含PRRS、副嗜血杆菌和猪丹毒),商品化的灭活疫苗已经可以购得。Bayer公司于1997年推出了灭活疫苗PRRomiSetM,Oxford实验室也研制出了灭活疫苗;Bayer公司和Immtech Biologics公司还研制了自家疫苗;DeLong和Kimman应用一种灭活疫苗进行免疫接种,减少了PRRSV在猪群中的传播,据认为该疫苗有望用于PRRSV的控制;Cyanamid公司推出的油佐剂灭活疫苗是用一株西班牙分离株制备的,可用于防治后备母猪和经产母猪的繁殖障碍。初次免疫为肌肉注射2次,间隔21d,泌乳期加强免疫1次。我国学者用国内分离的PRRSVCH-1a株作为疫苗株制备了PRRS油佐剂灭活疫苗,并对3月龄仔猪间隔20d进行了2次免疫,结果在首次免疫后5d就可检测到病毒特异性抗体,28d达到高峰,在首免后56d还可检测到抗体。

灭活苗使用后不存在安全性的问题,但其主要刺激猪体产生体液免疫反应,对清除PRRSV感染的巨噬细胞无能为力,因此仅依靠灭活苗的免疫给猪体建立牢固的免疫力是不够的。

3 亚单位疫苗

目前对PRRSV各结构蛋白免疫原性的研究已比较清楚。PRRSV感染猪体后,血清中抗PRRSV的免疫球蛋白主要是针对N蛋白和M蛋白,GP3虽不能刺激中和抗体的产生,但可对仔猪提供保护^[2],GP4、GP5和M蛋白可产生中和抗体,GP5比GP4产生中

和抗体的能力更强。亚单位疫苗及其它新型疫苗的研究多针对这些蛋白。

Plana等(1997)将PRRSV西班牙分离株Olott/91的ORF2-ORF7分别插入了杆状病毒表达载体,结果只有ORF2、ORF3、ORF5和ORF7基因在昆虫细胞中得到了表达。用ORF3和ORF5基因的昆虫细胞表达产物单独或混合免疫怀孕母猪,攻毒后以母猪所产活仔数及断奶前健康仔猪数作为评价疫苗免疫效果的指标。结果显示,ORF3表达产物可产生68.4%的保护率,ORF5的表达产物可产生50%的保护率。另外,用ORF3和ORF5的表达产物共同免疫母猪,所产仔猪断奶后血清抗PRRSV的抗体阴性,说明没有病毒在体内复制。

4 基因工程重组疫苗

Gagnon等(2003)^[3]将PRRSVIAF-Klop株的ORF5插入复制缺陷的人5型腺病毒载体中,并用其对仔猪进行免疫,结果证实猪体建立了特异性的免疫记忆。Bastos等(2004)^[4]构建了表达PRRSV GP5和M蛋白的重组牛结核分枝杆菌BCG,小鼠免疫后均检测到了特异性抗体,并且在免疫后60d可检测到中和抗体效价(1:8),在免疫后60d和90d淋巴细胞可出现病毒特异性的IFN- γ 反应。试验结果表明,BCG可表达PRRSV的抗原,并能刺激小鼠产生抗病毒蛋白的免疫反应,这为PRRSV新型疫苗的研究开辟了新领域。

用PRRSV人工制备重组病毒的工作也已展开。Verheije等(2003)^[5]构建了PRRSV LV株的感染性cDNA克隆,并由此得到3株人工突变的PRRSV,即vABV688、vABV707和vABV746。vABV688在GP2蛋白中出现2个氨基酸的替换,vABV707在M蛋白的胞外域用鼠乳酸脱氢酶增高病毒的相应部分取代,vABV746在N蛋白的C端缺失6个氨基酸,通过动物试验对突变毒株的安全性及免疫保护效力进行了检测。对重组病毒的安全性检测结果表明,在整个病毒血症期间,人工突变的部位一直存在。用重组病毒免疫后,再用同源或异源的PRRSV攻毒以检测重组病毒的免疫保护性,结果发现,重组病毒免疫组产生的病毒血症比LV株免疫组产生的病毒血症持续时间短。将哨兵猪再引入攻毒保护试验群,发现vABV688、vABV707和vABV746组的哨兵猪病毒血症持续时间缩短,但所有猪都发生了感染,说明重组病毒可给猪体提供一定的保护,但保护效果不完全,该试验结果给用重组病毒研究PRRS的疫苗开辟了新的天地。

5 DNA 疫苗

Kwang 等(1999)^[16]制备了分别表达 PRRSV ORF4、ORF5、ORF6 及 ORF7 的 DNA 疫苗并用于动物试验,结果发现,86%的猪产生了以 IFN- γ 的产生和域淋巴细胞增殖为特征的细胞免疫反应,通过 ELISA、中和试验以及 Western-blot 检测发现,71%的猪产生了病毒特异性抗体,对照组则没有产生针对 PRRSV 的免疫反应。试验结果表明,抗 PRRSV 的 DNA 免疫可诱导体液免疫和细胞免疫的产生,而且试验证实,PRRSV 的 ORF4 和 ORF5 表达的囊膜糖蛋白刺激产生的抗体具有中和活性。

Pirzadeh 等(1998)制备了针对 PRRSV GP5 蛋白的 DNA 疫苗,经小鼠和猪体免疫试验都可检测到中和抗体的产生,而且猪的 PBMC 在大肠杆菌表达的 GP5 的刺激下出现了淋巴细胞增殖,说明 DNA 疫苗诱导产生了病毒特异性的体液免疫和细胞免疫。随后用 PRRSV LAF-Klop 株攻毒,疫苗免疫猪没有出现广泛的病毒血症,而且肺部病变比攻毒对照猪要轻得多。这项试验证明,GP5 具有很好的免疫原性。

中国农业大学也开展了 PRRSV DNA 疫苗的研究,他们研制了针对 PRRSV BJ-4 株 GP5 的 DNA 重组质粒,经小鼠免疫和猪体免疫都产生了较高的体液免疫和细胞免疫水平,对猪体三免后 2 周所产生的中和抗体效价可达 1:19.2,猪体可产生较高水平的淋巴细胞增殖及 NK 细胞杀伤活性,攻毒后可使 PRRSV 阳性组织的检出率下降 39%。将该 DNA 重组质粒与表达 IL-4 或 IL-2 的重组质粒联合免疫后,这 2 种细胞因子佐剂均可提高猪体抵抗 PRRSV 感染的能力。研究小组还制备了泛素与 PRRSV GP5 融合表达的 DNA 重组质粒,经小鼠试验证实泛素可明显提高机体的细胞免疫功能。

尽管目前针对 PRRS 的疫苗研究种类繁多,但没有任何一种疫苗可对猪体产生完全的保护作用。开发新型的 PRRS 疫苗,将不同的疫苗免疫途径相结合,或将不同形式的疫苗联合应用,或寻找更好的免疫佐剂,这些是提高疫苗免疫效果的关键所在。

参考文献

- 董永毅,姜平,韩庆安,等.华东某猪场猪繁殖与呼吸综合征的诊断与防控[J].畜牧与兽医,2000,32(3):6-7
- 乔传玲,郑厚涟,甘孟侯,等.反转录-聚合酶链反应检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的研究[J].畜牧兽医学报,2000,31(3):262-266
- Li H, Yang H. Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the Antibody response to classical swine fever virus vaccination[J]. Vet. Microbiol., 2003,95(4):295-301
- Sipos W, Duvigneau C, Pietschmann P, et al. Parameters of humoral and cell- ular immunity following vaccination of pigs with a European modified-live strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)[J]. Vial. Immunol., 2003,16 (3):335-346
- 何信群,闫福栋,申咏红,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒弱毒株活疫苗抗体应答水平的观察[J].中国兽药杂志,2003,37(11):24-26
- Cheon D S, Chae C. Comparison of the pathogenicity of two strains (wild type and vaccine-like) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in experimentally infected sows[J]. J Comp Pathol., 2004, 130(2/3):105-111
- Mengeling W L, Lager K M, Vorwald A C, et al. Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome [J]. Vet. Microbiol., 2003, 93(1):25-38
- Labarque G, Van Gucht S, Van Reeth K, et al. Respiratory tract protection upon challenge of pigs vaccinated with attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines[J]. Vet. Microbiol., 2003, 95(3):187-197
- Opriessnig T, Halbur P G, Yoon K J, et al. Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (Ingelvac PRRS MLV), the parent strain of the vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRR-SV[J]. J. Virol., 2002, 76(23):11 837-11 844
- Nielsen J, Botner A, Bille-Hansen V, et al. Experimental inoculation of late term pregnant sows with a field isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine-derived virus[J]. Vet. Microbiol., 2002,84(1/2):1-13
- Laroche R, D'Allaire S, Magar R. Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Quebec[J]. Virus Research, 2003,96(1/2):3-14
- Dea S, Gagnon C A, Mardassi H, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates[J]. Arch. Virol., 2000, 145(4): 659-688
- Gagnon C A, Lachapelle G, Langelier Y, et al. Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions[J]. Arch. Virol., 2003, 148(5):951-972
- Bastos R G, Dellagostin O A, Barletta R G, et al. Immune response of pigs inoculated with Mycobacterium bovis BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine Reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Vaccine, 2004,22(3/4):467-474
- Verheije M H, Kroese M V, van der Linden I F, et al. Safety and protective efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome recombinant virus vaccines in young pigs[J]. Vaccine, 2003, 21(19/20):2 556-2 563
- Kwang J, Zuckermann F, Ross G, et al. Antibody and cellular immune responses of swine following immunisation with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7 [J]. Res. Vet. Sci., 1999, 67(2):199-201

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

牛梨形虫病的诊治

王 坤 毕聪明 李冬梅

牛梨形虫病是巴贝斯科和泰勒科的各种梨形虫在牛血液内引起的疾病的总称,本病是一种季节性的由蜱传播的血液原虫病,杂种牛、外来纯种牛易感性高,病情重,死亡率高。迄今为止,全世界已记载的各种哺乳动物的巴贝斯虫有 67 种,泰勒虫有 13 种。在我国的马、牛、羊、犬中,已发现 8 种巴贝斯虫和 4 种泰勒虫。我国牛梨形虫主要有双芽巴贝斯虫、牛巴贝斯虫、环形泰勒虫和瑟氏泰勒虫 4 种。2003 年至 2005 年,我们诊治辽宁省锦州市周边地区牛梨形虫病 213 例,由于诊治及时、措施得当,仅死亡 2 头,死亡率为 0.94%,其余均已治愈,现将诊治情况介绍如下。

1 发病情况

在锦州地区一般发病时间为 5~9 月份,其中以 6、7 月份发病最多。本地牛感染率低,发病数量少,主要是临产、体弱及 0.5~2 岁的小牛易感发病;而新从外地购入的牛群发病率高,几乎全群发病。发病牛群中,以奶牛为主。

2 临床症状

牛在发病初期,食欲减退、摄食量减少、反刍减少,偶有吃土,但不易查觉。牛在发病中期,随着时间的推移,症状逐渐明显,在可视粘膜、唇边、乳房及会阴等处的皮肤由白变黄,呈现黄疸;体温升高至 39.5~41.5℃,呈稽留热;心跳加快,90~126 次/min,第一心音明显增强;呼吸急促,45~90 次/min,肺泡音粗厉、流鼻涕、流涎;不食精料,少食青草,反刍停止,颈静脉怒张,呈嗜土癖;病牛迅速消瘦,产奶量急剧下降;体表淋巴结肿大,触摸有痛感,尤以肩前淋巴结的右侧淋巴结肿大显著,一般在 5~10 cm;病牛行走无力,跟不上牛群。牛在发病后期,食欲废绝,个别牛可视粘膜有出血斑点,病牛全身无力,站立不稳,目光呆滞,肘肌震颤,心率在 130 次/min 以上。分娩期的病牛,呈急性发作,病情加剧,多愈后不良。

3 病理剖检

主要病变是血液稀薄,全身淋巴结肿大,切面多

汁,呈暗红色,肝脏肿大 1.5~2 倍,脾脏肿大 2~3 倍,真胃粘膜肿胀、充血,有炎症变化。

4 实验室检查

采集牛耳尖血液涂片,用姬姆萨氏原液 1:20 倍稀释浸染 15 h,结果 213 头牛中检出红细胞感染虫体,其中黑白花奶牛 84 头感染双芽巴贝斯虫,68 头感染环形泰勒焦虫;肉牛中 26 头感染双芽巴贝斯虫,35 头感染环形泰勒焦虫。1 个红细胞内有双芽巴贝斯虫虫体 1~2 个,多数含有 2 个;虫体多呈梨形、圆形、环形、点状、不规则形,虫体位于红细胞中央,尖端成锐角。环形泰勒焦虫除红细胞内发现虫体,还在淋巴细胞和单核细胞内发现石榴体,1 个玻片有石榴体 1~4 个;虫体呈圆形、椭圆形、杆状、圆点状和十字形等,1 个红细胞中虫体数多在 4~9 个。

5 治疗与预防

5.1 治疗

将 0.5% 黄色素按牛的每千克体重 3~4 mg 静脉注射;贝尼尔按每千克体重 5~7 mg 静脉注射,每天 1 次,重病畜连用 2~3 d。此外,辅助药一般有 10%~25% 葡萄糖 300~500 ml,10% 维生素 C 50~100 ml,40% 乌洛托品 80~100 ml,10% 安钠咖 10~20 ml,分组静注。一般情况早确诊、早治疗,愈后良好,病至晚期愈后不良。

5.2 预防

预防的关键是灭蜱。要根据当地牛蜱的活动规律(如生活习性),制订灭蜱措施,严格执行。较简单又省钱的方法是用精制敌百虫粉,配成 1% 溶液局部涂擦或喷雾,效果很好;还要喷洒栏舍、牛场及蜱活动的田间野地等场所,但要注意人畜安全。在发病季节,可用贝尼尔、黄色素定期进行预防性给药,尤其对育成牛、新购入的奶牛尤为重要。对新购入的奶牛,在疫区应避免放牧,降低自然感染率。

6 小结与讨论

采用黄色素或贝尼尔配合葡萄糖、生理盐水、安钠咖、VC、乌洛托品静脉滴注治疗牛梨形虫病,经过临床观察效果很好。用上述方法在临床应用,可增强牛的抗病力,提高机体免疫力,且安全范围广,无不良反应。用贝尼尔静滴比肌肉深部注射疗效确切,效果也很不错。辅助疗法往往也很重要,所以不能忽视。

王坤,锦州医学院畜牧兽医学院,121001,辽宁锦州。

毕聪明,单位及通讯地址同第一作者。

李冬梅,锦州太和区女儿河动物卫生监督所。

收稿日期:2006-11-24

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

共轭亚油酸的免疫应激调控作用

赵金伟 周安国 王之盛

共轭亚油酸(CLA)是必需脂肪酸亚油酸的一组异构物的总称,由于其分子结构中 2 个双键被共轭连接,表现出顺式及反式两种空间构型,从而具有广泛而多样的生物学特性。近年来,共轭亚油酸在动物营养中的作用日益受到关注,并逐渐成为研究的热点。研究表明,共轭亚油酸具有营养重分配的作用,可降低机体脂肪含量,提高瘦肉率;共轭亚油酸还具有抗癌、抗动脉粥样硬化作用;低剂量的共轭亚油酸也有降低血脂和血液胆固醇的效应;另外,共轭亚油酸在不同动物模型中均表现出不同程度的免疫调控作用。

1 免疫应激的特点

免疫应激又称免疫激发,在免疫学中指注入抗原以激发免疫应答。在动物生命过程中,有许多因素(包括各种感染、创伤和内部肿瘤等)都可引起免疫应激。在免疫应激的整个过程中,细胞因子尤其是由单核细胞和巨噬细胞产生的炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 可介导系统的炎症反应,如发烧、食欲减退等,同时起着营养重分配的作用,即可使用于生长和骨骼肌蛋白质沉积的养分转而用于维持机体免疫应答的相关过程,主要包括免疫细胞的分化和增殖、抗体的合成及肝脏急性期蛋白质的合成等。炎性细胞因子的适量产生有利于机体抵御感染,但过多产生则会对机体造成不同程度的损伤。这些细胞因子特别是 TNF- α 在炎症条件下或某些炎症疾病中会引起病理反应。

2 免疫应激对动物生长和代谢的影响及免疫学机制

动物在免疫应激情况下,采食量明显下降,导致动物生长缓慢,饲料利用率也降低。免疫应激期动物食欲的降低主要由 IL-1 和 TNF- α 介导,而 IL-1 对食欲的影响比 TNF- α 更大。免疫应激可降低猪的肌肉组织、脂肪组织、体蛋白及脂肪的生长或沉积速度,但相对于肌肉组织和体蛋白的沉积速度而言,脂肪沉积速度的降低幅度低于肌肉组织。此外,免疫应激还降低猪的胴体品质,使热胴体重、眼肌面积和瘦肉率降低,背膘增厚。

免疫应激抑制生长的机制主要有两方面:一是通过激活免疫细胞分泌炎性细胞因子,如 IL-1、IL-6 和 TNF- α 而直接作用于外周组织,引起一系列降解代谢反应;二是通过直接作用于中枢神经系统或引发中枢神经系统细胞中细胞因子的合成。从而改变神经内分泌系统活动,减少了生长激素和 IGF-1 的分泌,增加了血浆类固醇激素水平,同时也促进了儿茶酚胺的分泌。而肾上腺素与糖皮质激素不仅对免疫系统有负反馈作用,同时也改变胃肠道机能,加速脂肪的分解与肌肉蛋白质的降解。因此,免疫应激对机体生长及畜牧生产造成很大的损失。

3 CLA 对免疫应激动物生长的调控

Cook 等(1993)在关于营养调控免疫诱导的生长抑制研究中,首先证实了 CLA 具有缓解免疫应激引起的生长抑制作用,发现在给鸡注射大肠杆菌脂多糖(LPS)后,饲喂 CLA 的鸡生长没有受到影响,而饲喂对照日粮的鸡生长停滞或体重减轻。Miller 等(1994)发现,注射 LPS 后,饲喂 CLA 日粮的小鼠体重损失及采食量的降低要低于饲喂对照日粮和鱼油日粮的小鼠。Park 等(1997)也发现,CLA 可防止小鼠因免疫引起的食欲降低和体重损失。

Bassaganya-Riera 等(2001)研究发现,较差的环境导致仔猪生长受阻,而日粮中添加 CLA 则可缓解这种由环境条件引起的生长抑制。Haiyan Yang 等(2002)的研究发现,CLA 能抑制 pHP (吡啶)刺激而引起小鼠的采食量下降和体增重损失。Mingder Yang 等(2003)研究也发现,CLA 能显著抑制由脂多糖引起体增重的损失,显著提高采食量。Josep Bassaganya-Riera 等(2003)发现,猪 II 型圆环病毒能降低猪的日增重和日采食量,但日粮中添加 CLA 能缓解猪 II 型圆环病毒的这种刺激作用,提高了日增重和日采食量。尹靖东等(2005)研究发现,断奶仔猪注射 LPS 后可引起仔猪生产性能下降,而添加 CLA 后,断奶仔猪的平均日增重和平均日采食量均呈二次曲线增加($P<0.05$),饲料转化效率也呈线性提高($P<0.01$),即 CLA 缓解了 LPS 对仔猪的刺激作用。

这些研究结果表明,CLA 可缓解免疫应激或其它应激引起的生长抑制。同时,这些结果也提示,CLA 的作用及其作用机制不存在种属差异。

4 CLA 对免疫应激动物免疫功能的调控

赵金伟,四川农业大学动物营养研究所,625014,四川雅安。

周安国、王之盛,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-06

共轭亚油酸对增加动物体免疫球蛋白含量、免疫细胞的增殖、T细胞和自然杀伤细胞的活化、细胞因子的产生及免疫应答具有不同的调节作用。

Sugano 等(1999)研究发现,CLA 对动物体液免疫的影响主要表现在对免疫球蛋白表达水平的影响上。R.Rossi 等(2004)研究发现,CLA 能显著提高母猪初乳中免疫球蛋白的水平及仔猪血清中免疫球蛋白的水平和溶菌酶浓度。Valentino 等(2004)在母猪和仔猪的试验中发现,CLA 也能显著提高母猪初乳和血清中及仔猪血清中免疫球蛋白的水平和溶菌酶浓度。

CLA 可参与免疫系统的调节作用,增强促有丝分裂原,促进淋巴细胞增殖和淋巴细胞的细胞毒性,增强巨噬细胞的杀伤活性(Wong 等,1997)。Hayek.M.G.等(1999)的研究表明,给不同年龄的老鼠饲喂不同日粮,处理组添加 CLA,在试验结束时杀死老鼠取淋巴细胞,分别添加两种促有丝分裂剂 ConA、PHA,结果发现,无论是否添加 CLA,年轻老鼠淋巴细胞增殖水平均比年老老鼠的强。Josep Bassaganya-Riera 等(2003)研究发现,当猪注射 PCV2 感染病毒,CLA 组能提高 CD8⁺在 T 细胞中的百分数及提高了胞毒 T 细胞的能力,而且增加了 B 细胞的数量。

细胞因子是 TH 细胞对抗原和 MHC 的免疫应答中分泌的各种生长因子,又称淋巴因子,试验表明,CLA 能降低鼠巨噬细胞 TNF- α 和 IL-6 的含量。Mingder Yang 等(2003)发现,小鼠在注射 LPS 后 2 h,CLA 能显著降低血浆中的 TNF- α 的水平,显著提高脾细胞中 IL-2 的水平,却显著降低 IL-4 水平,但能够显著提高 IL-2 与 IL-4 的比例。Lai 等(2005)研究发现,CLA 能够调节血浆、脾细胞和胸腺细胞中由于 LPS 刺激而引起细胞因子的表达。

对 CLA 不同的异构体的研究结果表明,顺-9,反-11 和反-10,顺-12 CLA 具有重要的免疫调控特性。Masao Yamasaki 等(2003)发现,10t,12c-CLA 能显著降低鼠脾淋巴细胞中 TNF- α 的增殖。Lai 等(2005)在断奶仔猪的试验上得出了相同的结论。但 Cook 等(2003)发现,9c,11t-CLA 对鼠巨噬细胞中 TNF- α 增殖的抑制程度大。Yainasaki 等(2003)研究发现,9c,11t-CLA 对鼠脾脏 CD8⁺T 细胞的增殖起主要作用;10c,12t-CLA 对鼠 B 细胞增殖有一点作用。Yamasaki 等(2003)研究表明,添加反 10,顺 12-CLA 提高腺淋巴细胞中的 IgM、IgA 和 IgG 的水平均高于混合组和顺 9,反 11-CLA 组。同年,Asuka Akahoshi 也得出了相同结论。这些研究结果表明,两种 CLA 异构体对机体的免疫反应都起着调控作用,但它们的作用有所不同。

5 CLA 对免疫应激的调控机理

近年有报道认为,CLA 对免疫应激尤其是炎症细胞因子(IL-1、IL-6 和 TNF- α)的调控可能与核转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR γ)有关。PPAR γ 几乎全在脂肪细胞中,并与细胞分化相联系。PPAR γ 含有 A、B、C、D、E、F 6 个区,其中 A、B、E、F 4 个区是 PPAR γ 的功能区,A 区与 B 区是铰链在一起的(A/B),统称为配体非依赖的转录激活区,调节配体和受体的亲和力;E 区和 F 区也是铰链在一起的(E/F),称为配合受体;C 区为 DNA 结合区,包含两个锌指结构和一个铰链区;D 区则发挥重要的辅助因子的作用。

Houseknecht 等报道,日粮 CLA 的抗糖尿病作用与 PPAR γ 有关,而且,CLA 的异构体混合物在体外也能激活 PPAR γ 的反应元件。Lai 等试验发现,CLA 增强了 LPS 刺激仔猪外周血淋巴细胞 PPAR γ 的活性与脾脏和胸腺中 PPAR γ mRNA 的表达,同时抑制了由 LPS 刺激引起的 IL-1、IL-6 和 TNF- α 的产生与 mRNA 表达。研究表明,PPAR γ 在多种生理功能中起着关键的调控作用。其中,PPAR γ 对炎症细胞因子基因表达的调控已有比较清楚的阐述。炎症细胞因子的基因表达是在转录因子核因子 NF- κ B 的调节下启动的,而 PPAR γ 的配体可抑制转录因子活化蛋白-1(AP-1)、信号转导和转录活化因子-1(STAT-1)及 NF- κ B 等的活性。对于 NF- κ B,PPAR γ 配体抑制可诱导 NF- κ B 抑制因子(I κ B)激酶的活性。正常情况下,I κ B 激酶促使 I κ B 磷酸化,导致 NF- κ B 靶基因的转录活化。而当 NF- κ B 受到抑制时,炎症反应则可得到缓解。研究表明,PPAR γ 可能就是通过抑制 NF- κ B 和丝裂原激活蛋白(MAP)信号通路,从而抑制结肠黏膜 IL-1 β 和 TNF- α 的产生。因此,Lai 等认为,CLA 是通过直接或间接作为 PPAR γ 的配体调节 PPAR γ 的 mRNA 表达和活性,后者再通过信号转导通路调控免疫应激过程中某些细胞因子的表达。

6 结语

为了缓解免疫应激,通常采用尽量减少致病源与动物接触的机会,从而减少环境病原性或非病原性微生物对免疫系统的刺激;而对免疫应激导致的生长抑制也常通过抑制免疫反应来缓解。能否通过营养调控缓解免疫应激一直是营养学家关注的问题。大量的试验表明,CLA 是一种既可增强动物免疫机能,同时又可降低炎症反应导致的诸如生长受阻等副效应的天然物质。因此,CLA 在动物疾病防治和健康养殖中将发挥重要作用。

(参考文献 28 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物 在中华鳖外塘养殖上的应用

姚志通 夏枚生 胡彩虹

摘 要 对包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物的稳定性和缓释性能进行分析,结果发现:该物质在空气中敞开放置 10 d 后过氧化氢分解率只有 0.62%;该物质投放进水中后迅速释放出过氧化氢,10 min 过氧化氢的释放率达到 18.6%,10 h 后过氧化氢的释放率为 82.4%。选取 5 口中华鳖外塘养殖池,其中 1 池为对照池,另 4 池为试验池。将包膜加合物分别按 1、2、3、4 g/m³ 水的用量投放到 4 个试验池,研究其对养殖水的增氧与水质改善效果。结果表明:试验开始后,与对照池相比,4 个试验池溶氧呈升高趋势,氨氮浓度、亚硝酸氮浓度、S²⁻浓度、COD 量、细菌数量呈下降趋势;随着包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物投放量的增加,相同时刻试验池中相关水质指标变化的幅度增大;包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物对养殖水体的作用持续时间达 10 h 以上。

关键词 包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物;稳定性;缓释性能;中华鳖;水质

中图分类号 S947.1

硫酸钠-过氧化氢-氯化钠的加合物称固体双氧水,是一种新型的精细化工产品,具有增氧、漂白、杀菌和消毒等作用,性质温和,饱和溶液的 pH 值为 6~8,无毒、无公害,与目前常用的过氧化物,如过碳酸钠、过硼酸钠、过磷酸钠等相比显示出更多的优越性。国外已将其广泛应用于纺织、造纸、洗涤剂、化妆品、医药卫生等工业部门^[1,2],我国对其开发研究较少,在水产养殖中的应用尚属空白。该加合物的分子式为 4Na₂SO₄·2H₂O₂·NaCl,由于过氧化氢易分解,加合物在空气中稳定性较差,而且加合物在水中极易溶解,快速释放出过氧化氢,因此过氧化氢的稳定性和缓释性能标志着加合物的稳定性能和缓释性能。提高加合物的稳定性和缓释性能是将其应用在水产养殖上的关键。目前已有不少研究^[3-5]介绍了该加合物,但未见关于包膜加合物的报道。本试验研究了包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物的稳定性能和缓释性能,并将其应用在中华鳖外塘养殖上,探讨其对养殖水质的改善效果,为硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物在水产养殖上的应用提供参考依据。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物

室温下将焦磷酸二氢钠(用量为硫酸钠质量的 1%)加入带有搅拌装置的反应釜中,加入过氧化氢水溶液,再加入硫酸钠,搅拌,使硫酸钠充分溶解,然后在搅拌下慢慢加入氯化钠,不断搅拌。过氧化氢、氯化钠和硫酸钠的反应质量配比为 6:4:32。反应 1.5 h 后将反应混合物结晶、过滤,部分母液循环,滤饼干燥即得硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物。将硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物投入包膜设备,使其处于运动状态,将壳聚糖(用量为加合物质量的 1%)配成水溶液,经喷嘴雾化在运动着的加合物上,水分蒸发后即得包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物。经分析测定,最终产物的活性氧含量为 4.5%。

1.1.2 中华鳖

由嘉兴市江南生态鳖科技示范基地提供。

1.2 试验方法

1.2.1 包膜加合物稳定性能分析

分别称取两份一定量的干燥样品,一份用高锰酸钾标准溶液滴定法测定过氧化氢含量 C₁;将另一份样品敞开放置于培养箱中,调节温度为 25℃、湿度为 70%,10 d 后测定过氧化氢含量 C₂。计算样品中过氧化氢的分解率(X):

$$X(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_1}$$

1.2.2 包膜加合物释放性能分析

室温下称取 0.2 g 样品 3 份,分别置于 250 ml 的锥形瓶中,加入 60 ml 水,一份加入 15 ml 的 1 mol/l H₂SO₄ 溶液,振荡使样品完全溶解,用 0.02 mol/l 高锰

姚志通,浙江大学动物科学学院,310029,浙江杭州。

夏枚生(通讯作者),浙江大学理学院地球科学系。

胡彩虹,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-23

酸钾标准溶液滴定,至溶液呈粉红色并在 30 s 内不褪色即为终点,记录消耗的 KMnO_4 标准溶液的体积,计算样品中的过氧化氢质量百分数 C_1 ;另两份分别于 10 min、10 h 后过滤,滤液于 250 ml 的锥形瓶中,加入 15 ml 的 1 mol/l H_2SO_4 溶液,用 0.02 mol/l 高锰酸钾标准溶液滴定,至溶液呈粉红色并在 30 s 内不褪色即为终点,记录各自消耗的 KMnO_4 标准溶液的体积,计算样品 10 min 和 10 h 时释放的过氧化氢质量百分数 C_2 和 C_3 ,最后计算过氧化氢释放率。

样品10 min 过氧化氢的释放率(X_1):

$$X_1(\%) = \frac{C_2}{C_1}$$

样品 10 h 过氧化氢的释放率(X_2):

$$X_2(\%) = \frac{C_3}{C_1}$$

1.2.3 包膜加合物对中华鳖外塘养殖水质改善效果试验

在中华鳖养殖外塘中选取 5 口外塘养殖池,1 个池为对照池,另外 4 池为试验池,各池面积约为 1 173 m²,平均水深约 50 cm,鳖的平均放养密度为 1 000 只/池,无机械增氧,平均水温(28±2)℃。

试验于凌晨 0:00 开始进行,4 个试验池中分别按

1、2、3、4 g/m³ 水的用量投放包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物,投放方式为全池均匀投撒,按照常规方式饲养。在包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物投放前(0 h)和投放后 1、2、4、6、8 和 10 h 取水样测定水中的溶氧(DO)量、氨氮($\text{NH}_4\text{-N}$)浓度、亚硝酸盐氮(NO_2^-)浓度、硫化物(S^{2-})浓度、化学耗氧量(COD)和细菌数量。

水化学指标测定:溶氧(DO)用 RSS-5100 型溶氧仪测定;氨氮($\text{NH}_4\text{-N}$)浓度用纳氏比色法测定;亚硝酸盐氮(NO_2^-)浓度用盐酸 α-萘胺比色法测定;硫化物(S^{2-})含量用碘量法测定;化学耗氧量(COD)用 Hach 水质分析仪测定。

细菌计数:取一定量养殖水作 10 倍系列梯度稀释,取其中 3 个稀释度在淡水鱼类琼脂培养基(FWA)平板上涂布,于 28~30℃下培养 24~48 h 后计数,并换算成 log₁₀ cfu/ml。

2 结果与分析

2.1 包膜加合物稳定性分析

对未包膜的硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物和包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物同时进行稳定性试验,结果见表 1。

表 1 2 种样品的稳定性比较(%)

种类	起始过氧化氢含量	10 d 后过氧化氢含量	过氧化氢的分解率
硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物	9.75	9.03	7.38
包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物	9.73	9.67	0.62

由表 1 可以看出,未经包膜的硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物在空气放置 10 d 后,过氧化氢的分解率高达 7.38%,包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物过氧化氢的分解率只有 0.62%。

2.2 包膜加合物释放性能分析

对包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物分别进行 10 min 和 10 h 的释放性能试验,结果见表 2。

表 2 包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物的释放性能

时间	10 min	10 h
过氧化氢的释放率(%)	18.6	82.4

表 2 反映了包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物的释放性能,样品投放进水中后迅速释放出过氧化氢,10 min 过氧化氢的释放率达到 18.6%;10 h 后,过氧化氢的释放率达到 82.4%,说明样品中还有过氧化氢未释出。

2.3 包膜加合物对中华鳖外塘养殖水质的影响

2.3.1 对溶氧(DO)的影响

试验开始后,中华鳖外塘养殖池溶氧(DO)的测定结果见表 3。

表 3 养殖池溶氧(DO)值的测定结果(mg/l)

时间(h)	0 g/m ³	1 g/m ³	2 g/m ³	3 g/m ³	4 g/m ³
0	3.2	3	3.2	3.2	3.1
1	3	2.9	3.1	2.9	3.1
2	3.2	3	3.5	3.4	3.7
4	2.8	2.8	3.4	3.7	3.8
6	2.7	3.1	3.5	3.6	3.6
8	3	3.1	3.4	3.6	3.7
10	3.1	3.2	3.6	3.5	3.7

由表 3 可以看出,投放包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物后,对照池的 DO 值基本维持在 3.0 左右,4 个试验池 DO 值与对照池相比呈升高趋势,随着包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物投放量的增加,相同时刻试验池中 DO 值增加的幅度增大,试验池中 DO 值最大值比相同时刻对照池提高了 35.7%。

2.3.2 对氨氮($\text{NH}_4\text{-N}$)和亚硝酸盐氮(NO_2^-)浓度的影响

试验开始后,中华鳖外塘养殖水体 $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 NO_2^- 浓度的变化情况见图 1 和图 2。

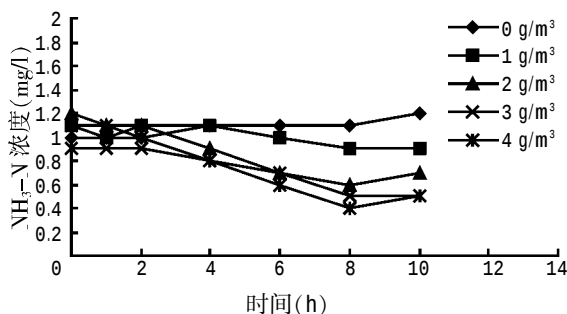


图1 外塘养殖池中氨氮($\text{NH}_4\text{-N}$)浓度的变化曲线

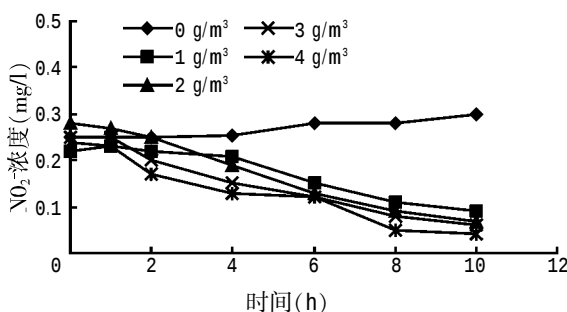


图2 外塘养殖池中亚硝酸盐氮(NO_2^-)浓度的变化曲线

由图 1 和图 2 可以看出,试验开始后 10 h 内,对照池中的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 NO_2^- 浓度略有上升,而 4 个试验池中的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 NO_2^- 浓度一直下降,下降的速度逐渐减慢。随着包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物投放量的增加, $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 NO_2^- 浓度在相同时刻下降的幅度增大。

2.3.3 对硫化物(S^{2-})浓度的影响

包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物对中华鳖外塘养殖水体 S^{2-} 浓度的影响结果见图 3。

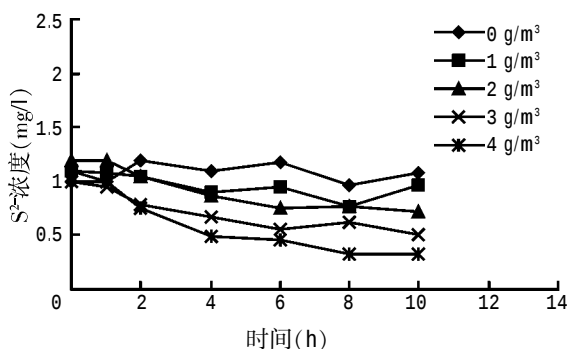


图3 中华鳖外塘养殖池中 S^{2-} 浓度的变化曲线

由图 3 可以看出,试验开始后 10 h 内,对照池中的 S^{2-} 浓度基本不变。与对照池相比,另 4 个试验池中

的 S^{2-} 浓度有所降低;随着包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物投放量的增加,水中 S^{2-} 浓度在相同时刻下降的幅度增大。

2.3.4 对化学耗氧量(COD)浓度的影响

包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物对中华鳖外塘养殖水体 COD 浓度的影响见图 4。

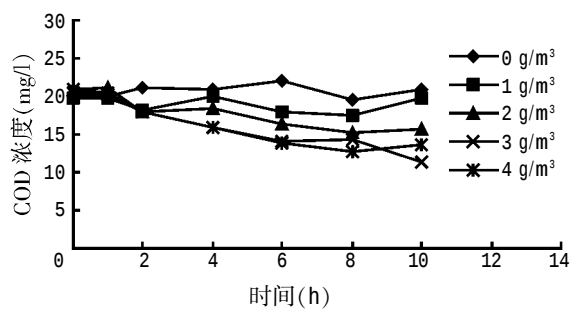


图4 外塘养殖池中 COD 浓度的变化曲线

由图 4 可以看出,试验开始后 10 h 内,对照池中的 COD 浓度基本保持在 20 mg/l 左右。4 个试验池中的 COD 浓度与对照池相比呈下降趋势。随着包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物投放量的增加,试验池 COD 浓度在相同时刻下降的幅度增大(除 10 h 时以外)。

2.3.5 对细菌数量的影响

试验开始后,中华鳖外塘养殖水体中的细菌数量的变化情况见图 5。

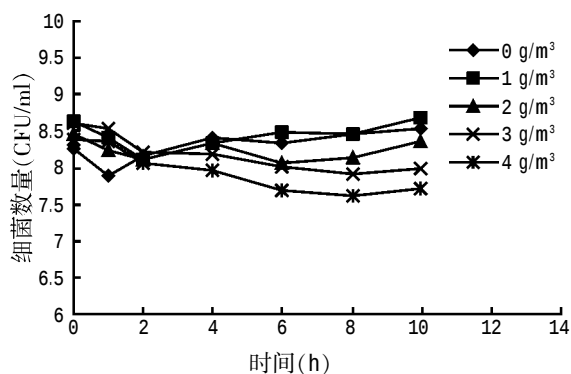


图5 外塘养殖池中细菌数量的变化曲线

图 5 反映了中华鳖养殖水中的细菌数量的变化情况。试验开始后 10 h 内,对照池中的细菌数呈现缓慢上升趋势,与对照池相比,试验池中的细菌数量有所降低,其中,投放量 3 g/m³ 和 4 g/m³ 水包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物投放池中的细菌数量呈下降趋势。

3 讨论

3.1 包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物的性能分析
研究结果表明,包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加

合物具有较好的稳定性能和缓释性能。硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物在空气中稳定性较差,过氧化氢很易分解,该物质水溶性好,投放进水中后快速释放出过氧化氢。壳聚糖是一种多糖类生物高分子,常用作包膜剂,能明显提高食品、药品的贮藏性能和缓释性能^[6]。用壳聚糖对硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物进行处理,能在加合物晶体外层形成一层较为致密的膜,有效地防止了空气中水分和杂质与加合物的接触,从而抑制了过氧化氢的分解,提高产品的稳定性和贮藏性能。同时,由于壳聚糖结构致密,在水中溶解慢,实现了水中过氧化氢的缓慢释放,故水中能长时间维持一定的过氧化氢浓度。

3.2 包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物对中华鳖外塘养殖水体的改善效果

中华鳖是水陆两栖动物,可以用肺呼吸,所以水体短期缺氧对其影响不大。但是,现今的外塘养殖换水次数很少,再加上大量底泥的蓄积,而且很难彻底清除,若水体长期溶氧不足时,底泥中的有机物质在不断的分解过程中产生大量的有毒有害物质,如氨氮、亚硝酸盐氮、硫化氢等,同时水中有害微生物大量孳生,影响中华鳖的健康生长,表现为食欲不振,生长缓慢,品质下降,严重的会导致生病甚至死亡,制约和影响了中华鳖养殖的稳产和高产。中华鳖养殖最关键的问题不是缺氧,而是水质的恶化。

试验结果表明,包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物使中华鳖外塘养殖水体的溶氧增加,水质明显得到改善。硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物在水中释放出过氧化氢,过氧化氢在水中一些金属离子的催化下迅速分解释放出氧气,满足水产动物的需求。同时,由于过氧化氢的强氧化性,能将水中还原性的氨氮氧化、将亚硝酸盐氮氧化成无毒的硝酸盐氮、将硫化物氧化成 SO_4^{2-} 、将有机物氧化分解,使这些有毒、有害物质的浓度降低。娄清香、韩丽君^[7]的研究表明,向模拟对虾养殖水中按0.5、1、2和3 ml/l水的用量施入3%的过氧化氢,1 h后水中的溶氧量分别增加了 3.5×10^{-6} 、 8×10^{-6} 、 8.7×10^{-6} 和 9.7×10^{-6} mg/l;氨氮浓度分别降低6%、32%、46%和53%;COD浓度分别降低了26%、28%、100%和100%。

硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物对养殖水体有很好的杀菌效果,这是因为过氧化氢具有很强的杀菌功能。根据对水处理试验考察,在100 mg/l H_2O_2 的作用下,一种具有最强烈的抗消毒作用的炭疽菌孢子完全失去活动能力,对一般消毒方法难以奏效的微生物梭状芽孢杆菌属, H_2O_2 也具有良好的灭杀效力,即

使是5个 *Cloetridium histoliticum*,在原始感染 10^8 个/l时,仅用6%的 H_2O_2 原始溶液就可使其完全丧失活动能力^[8]。陈胤忠等^[9]对过氧化氢复方消毒剂杀灭微生物效果进行实验观察,结果表明,以含9% H_2O_2 的复方消毒剂的2%溶液(含过氧化氢0.18%)对悬液中大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、白色念珠菌作用10 min,用其5%溶液对枯草杆菌黑色变种芽孢作用5 min,杀菌效果均为100%。

通过对硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物的包膜,实现了加合物在水中的缓释,因此,水中长时间保持一定的过氧化氢浓度,实现了对水体持续增氧以及与有毒有害物质充分作用,维持了水质的稳定。硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物分解的另两种产物均为中性盐,对水体的pH值没有不良影响,而目前常用的过氧化钙、过碳酸钠等增氧剂与水反应后使水体碱性增强,长期使用对水体不利^[10]。

综上所述,包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物能增加中华鳖外塘养殖水体的溶氧,降低水体氨氮、亚硝酸盐氮、硫化物、COD的浓度,并使水体细菌数量减少,对水体的pH值没有影响,其作用的稳定性和持久性好,对养殖水体起到了长时间增氧和稳定水质的作用,对于当前的集约化水产养殖具有十分重要的意义。本试验只是将包膜硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物应用在中华鳖外塘养殖上,关于其释放性能的控制以及在其它水产动物养殖上的应用,还需作进一步的研究。

参考文献:

- 1 Yunozuke Nakagawa, Shigetugu sugiura, Kinjiro Matsunaga, et al. Bleaching composition [P]. US:3979313, 1976-09-07
- 2 Werner Doetsch, Helmut Honing, Rudolf Siegel. Hydrogen peroxide adduct and process for preparation and use thereof [P]. US:4400367, 1983
- 3 王鸿显, 张湛斌, 王南平, 等. 硫酸钠-过氧化氢-氯化钠的制备及应用[J]. 应用化工, 2004, 33(3):1-2
- 4 赵红坤, 任保增, 雒廷亮, 等. 硫酸钠-过氧化氢-氯化钠加合物的制备及表征[J]. 化学工业与工程, 2003, 20(5):261-265
- 5 林文辉. 池塘养殖水质[M]. 广东:广东科技出版社, 2003
- 6 朱启忠, 赵宏, 韩晓弟. 壳聚糖及其应用[J]. 资源开发与市场, 2005, 21(1):63-64
- 7 娄清香, 韩丽君. 过氧化氢调控养殖水环境理化因子的研究[J]. 海洋科学, 1996, 4:18-20
- 8 王敏. 过氧化氢在水处理中的应用[J]. 甘肃化工, 2002(2):21-22
- 9 陈胤忠, 袁朝森, 胡琳, 等. 过氧化氢复方消毒剂杀灭微生物效果的实验观察[J]. 中国消毒学杂志, 1998, 15(2):65-69
- 10 蒋静南, 吴湛霞. 过氧化钙对淡水鱼类养殖的增氧作用[J]. 淡水渔业, 1992(6):25-26

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

水产饲料中大豆蛋白替代鱼粉的应用研究

曹 玲 王卫民 杨承泰

摘 要 凭借充足的供应源和低廉的价格,大豆蛋白成为我国最为常用且最具前途的鱼粉替代物。研究表明,豆类蛋白可部分或全部代替鱼粉而不影响鱼类的生长和发育,但也存在各种各样的限制因素,使得鱼类对其利用仍然不够理想。文章介绍大豆蛋白在水产饲料上的应用情况,探讨限制大豆蛋白利用的抑制因子及其相应的解决措施,以期为大豆蛋白的广泛研究和应用提供参考依据。

关键词 大豆蛋白;鱼粉;水产饲料

中图分类号 S916

Advances in replacement of fish meal by soy protein in aquiculture feed

Cao Ling, Wang Weimin, Yang Chengtai

Abstract Soy proteins, famous for their steady resources and considerably lower price, become the most promising protein sources for the replacement of fish meal. Researches indicate that soy proteins can be used partially or even completely to replace fish meal without affecting the growth of aquatic animals. However, several limited factors are also found to inhibit the utilization rate. A general review about the research results for soy proteins replacing fish meal, limited factors of soy proteins and their control is presented in this paper in order to provide useful information for further study on the fully utilization of soy proteins.

Key words soy proteins; fish meal; aquiculture feed

蛋白质是鱼类生长和维持生命的必需营养物。鱼粉因适口性佳、营养丰富,尤其是氨基酸组成平衡,维生素 B₂、B₁₂ 等维生素及未知生长因子的含量丰富,一直以来是水产饲料中不可缺少的优质蛋白源。水产饲料中鱼粉的添加量远远高于畜禽的用量,在一些海水养殖品种,如对虾饲料中,鱼粉的添加量一般均高于 30%。然而,由于捕捞量的下降和气候变迁的影响,导致鱼粉价格上涨且供应不稳定。而且,还有研究报道,鱼粉中磷含量虽然高,但不易被鱼、虾充分利用,相当数量的磷会随鱼的代谢产物排入水体,易形成富营养化水体,因此开发适当的替代品是极为重要的。寻找替代鱼粉的新型蛋白源,特别是利用廉价的植物蛋白源来部分或者全部替代鱼粉,是国内外广大水产科技工作者关注的热点。

在植物性蛋白源中,以大豆为原料经加工后获得的主产品和副产品,如大豆粉、豆饼、豆粕等豆类蛋白

营养价值高,蛋白质含量高达 40%~48%,除缺乏含硫氨基酸外,必需氨基酸和半必需氨基酸组成较为完善,价格低廉且供应充足稳定,是我国最为常用的植物性蛋白。很多研究表明,大豆蛋白可部分或全部代替鱼粉,与鱼的种类、食性、大小、蛋白品质和养殖系统有关。然而大豆蛋白的应用也存在各种各样的限制因素,如抗营养因子——植酸的存在,使得鱼类对其利用仍然不够理想。针对这些限制因素,相应的解决途径包括热处理、酶制剂的添加也随之产生,从而促使大豆蛋白能够更加有效地替代鱼粉,也为其在水产饲料中得到广泛运用奠定了基础。

1 大豆蛋白的种类及营养特点

我国最为常见的大豆制品有全脂豆粉、脱脂豆粉、豆饼、豆粕、大豆浓缩蛋白、大豆分离蛋白。而发酵豆粕,又称发酵大豆多肽,虽然早在十几年前国外和我国台湾省就开始被广泛研究,但由于其价格昂贵还不能大量应用于养殖业,在我国的研究还处于起步阶段。豆饼和豆粕具有消化吸收率高、氨基酸组成较好、价格低廉和资源量丰富等特点,一直以来是水产饲料利用最多的豆类蛋白。而新兴的发酵豆粕较其它大豆蛋白更易消化吸收,能迅速供给机体能量,且无蛋白质变性和无豆腥味等特性,成为最具前

曹玲,华中农业大学水产学院,430070,武汉。

王卫民(通讯作者)、杨承泰,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-12-25

★ Collaborative Research Support Program, USAID

途的鱼粉替代蛋白源。

1.1 大豆蛋白的常见种类及营养特点

全脂大豆粉是整粒大豆经摩擦、蒸汽挤压及膨化处理的产品,其成分与生大豆类似。由于全脂大豆粉水分含量较低,其它营养成分相对提高,粗蛋白质含量为36%~39%,脂肪含量高达18%,且富含不饱和脂肪酸。脱脂豆粕是由豆粕经焙烤、粉碎制得的大豆制品,蛋白质含量在50%以上。全脂大豆粉和脱脂大豆粉的氨基酸组成相似,且胰蛋白酶抑制因子活度也相似。

豆饼是大豆经机械压榨提油后的残渣。压榨方式有水压法和螺旋压法,产出的豆饼蛋白质含量分别为39.8%和42%。豆饼含油脂比豆粕高,为4%~7%。豆粕是大豆经压片、溶剂浸提制油后的残渣。低温(40~60℃)浸提法制备的豆粕蛋白质含量在44.5%左右,脂肪含量为0.5%~1.5%,氨基酸组成较平衡,消化率高。

大豆浓缩蛋白是以大豆蛋白粉为原料,采用淋洗法去除低聚糖,进一步纯化蛋白质而制得的产品,其最大特点是除去了大豆的胀气因子及豆腥味物质,同时又最大限度地保留了大豆蛋白的营养成分,蛋白质含量达65%以上。大豆分离蛋白的蛋白质含量高达90%以上,其基本制作方法是脱脂大豆粉先用稀碱液浸泡,再离心除去不溶性残渣,获得母液,酸化母液沉淀蛋白,经多次淋洗除去可溶性非蛋白质成分,最后经中和、喷雾干燥即为分离蛋白。大豆组织蛋白是大豆蛋白经过组织化技术制得的产品,特点是抗营养因子相对较少,蛋白质的消化吸收率较高。

1.2 发酵豆粕及其营养特点

发酵豆粕是大豆浓缩蛋白的酶解产物,由于采用独特的菌种和发酵工艺,微生物发酵过程中分泌的蛋白酶使大豆蛋白被分解成小分子蛋白和小肽分子,因此又称为发酵大豆多肽。发酵豆粕具有以下优点:①蛋白质有序降解为多肽、小肽,且富含蛋白酶。小肽具有很好的溶解性、抗凝胶形成性、低粘度等特性,在动物体内吸收快、耗能低、不易饱和,各种小肽之间的运转无竞争性抑制,蛋白质利用率提高。②必需氨基酸含量丰富,结构合理。生物发酵过程中,微生物大量增殖,其结果不仅提高了发酵大豆蛋白基料的蛋白质水平,而且部分大豆蛋白质发酵时转化为菌体蛋白,这本身也改变了大豆蛋白质的营养品质。张玲华等(2005)研究显示,发酵后蛋白质含量较发酵前提高了20.9%,氨基酸含量提高了23.1%。③蛋白质品质优良,消化率较高,富含多种生物活性因子,且适口性好。与膨化大豆和浓缩大豆蛋白相比,发酵大豆蛋白生

产大豆多肽的工艺明显优于高温、高压的膨化工艺和乙醇浸提工艺对蛋白质的影响。膨化工艺对大豆蛋白造成的物理损伤和乙醇浸提造成的化学性损伤均会造成大豆蛋白质不同程度的变性。而经发酵生产的大豆多肽富含有机酸、菌体活性蛋白、叶酸和B族维生素及未知生长因子,适口性增加,且能有效改善水产动物消化道微生态环境,提高其生产性能及免疫力。④通过微生物发酵降解可有效去除多种抗营养因子,如胰蛋白酶抑制因子等,降低了对鱼类肠道的刺激。⑤减少了鱼类粪便中氨、氮、有机磷等物质的排出,减轻了对养殖水体的污染,免除了水质净化剂和抗生素的使用。

发酵大豆蛋白改进和提高了大豆蛋白资源的品质,有利于实现高效养殖,这对蛋白质资源相对不足条件下使我国养殖业保持可持续发展有重要意义。

2 大豆蛋白替代鱼粉的研究

由于鱼粉价格高昂加之供应紧缺,国内外学者早在30年前就开始了利用各种大豆蛋白替代水产饲料中鱼粉的研究。

Tacon A J等(1995)研究表明,虹鳟鱼饲料中添加66%的豆粕替代鱼粉对其生长无不良影响;而Olli J. J等(1995)研究认为,添加豆粕的量超过20%~30%,将导致虹鳟鱼生长下降和料肉比上升。在对大西洋鲑的研究中发现,用4种不同豆类替代鱼粉,结果表明,56%的大豆浓缩蛋白替代鱼粉,对其生长无不良影响;而当去皮豆粕、普通豆粕和全脂豆粉替代鱼粉的量超过14%,大西洋鲑生长速度显著降低。当豆粕替代鱼粉的量达到34%时,大西洋鲑的生长受到抑制(Olli J. J等,1994)。姜光莉等(2005)报道,当以鱼粉为蛋白源的饲料中蛋白质的含量为25%时,用豆粕替代其中40%的鱼粉不会影响鲤鱼的生长及对饲料的利用率。蔡鹰等(1990)以豆饼作为主要蛋白源取代50%的鱼粉饲养罗非鱼的试验发现,仅需再添加4.8%的油脂可取得较理想的饲养效果。程成荣等(2004)报道,发酵豆粕可替代40%以下的鱼粉而对杂交罗非鱼的增重率、特定生长率、饲料效率和蛋白质效率无显著影响,若代替比例达60%时,则罗非鱼生长显著下降。陈立侨等(1994)研究发现,用豆饼替代中华绒螯蟹饲料中30%的鱼粉而没有观察到任何不良影响。朱雅珠等(1995)用80%豆饼为蛋白源的饲料投喂罗氏沼虾,获得了比添加25%鱼粉的对照组更佳的生长效果。董云伟等(2000)报道,用豆粕蛋白替换50%的鱼粉没有降低罗氏沼虾的生长率,且降低了养殖成本。艾庆辉(2002)的研究表明,当大豆蛋白替代鱼粉蛋白

13%~39%时,南方鲇的生长及饲料利用率均高于对照组,当替代量超过 52%时,其生长率和蛋白质利用率则显著下降。罗智等(2004)在石斑鱼饲料中以发酵豆粕等量代替鱼粉,使鱼粉用量由 68%降为 58%,对鱼体增重率和成活率没有影响。王广军等(2005)报道,军曹鱼饲料中豆粕与鱼粉的比例为 1:1.8 较为合适。冷向军(2006)等在研究南美白对虾饲料时报道,常见的大豆蛋白和发酵豆粕均优于脱皮豆粕,但是常见的大豆蛋白和发酵豆粕替代鱼粉用量的 28.5%却引起了各试验组幼虾的增重和成活率显著下降。王桂芹等(2006)报道,翘嘴红鲌饲料中大豆蛋白对鱼粉蛋白的最大替代量为 40.5%,且只有适量替代才能使饲料氨基酸的配比符合鱼的营养需求,适合鱼的生长。

综上所述,饲料中豆类蛋白的适宜替代量因鱼的种类、食性、大小、大豆蛋白品质和养殖系统而异。草鱼、罗非鱼等草食性和杂食性动物对蛋白质的需求量较低,因此在草食性鱼和杂食性鱼饲料中,可用豆饼、豆粕、脱脂大豆蛋白做蛋白源,添加限制性氨基酸时,可以代替大部分甚至全部鱼粉。由于虾、虹鳟等肉食性养殖动物对蛋白质的需求量和饲料中动物蛋白源要求较高,在肉食性鱼类饲料中使用 10%~20%的大豆蛋白,如果氨基酸平衡,也不会影响生长,但当超过 30%时,增长率则显著降低。

3 影响大豆蛋白添加量的限制因素

3.1 氨基酸组成

饲料蛋白质的质量即氨基酸的平衡程度是影响动物对其蛋白利用的关键因素,水生动物对蛋白质的需求实际上就是对氨基酸的需求。与鱼粉相比,虽然大豆蛋白中的粗蛋白含量较为丰富,通过加工处理后的大豆制品粗蛋白含量甚至可以超过鱼粉,例如,大豆分离蛋白粗蛋白质含量可以达到 90%,且赖氨酸含量较高,但是由于某些必需氨基酸的缺乏,造成氨基酸的组成不平衡,影响了水产动物的生长性能。

3.2 适口性

与鱼粉相比,大豆蛋白的适口性较差,这是影响植物蛋白在饲料中添加量的主要因素之一。大豆蛋白中的抗营养因子会抑制水生动物的食欲,随着植物蛋白替代鱼粉量的增加,其中的促摄食物物质逐渐减少,从而导致动物摄食量减少。周盟等研究使用豆粕替代饲料中鱼粉对异育银鲫的生长及代谢的影响时发现,异育银鲫对两种蛋白源饲料的摄食率、生长率和食物转化效率均有显著差异,鱼粉优于豆粕,最终发现这是由于适口性差异引起摄食率不同而导致

了生长差异。

3.3 抗营养因子

Huisman 等指出,抗营养因子的抗营养作用主要表现为降低饲料中营养物质的利用率、动物的生长速度和动物的健康水平,把具有抗营养作用的这类物质称为抗营养因子。使大豆制品在水产动物饲料中的添加受到限制,主要的抗营养因子有植酸、蛋白酶抑制因子、凝集素、胀气因子、抗维生素因子等。其中,植酸、蛋白酶抑制因子和植物凝集素在饲料中含量及生物活性较高,对水产动物起着主要的抗营养作用。

3.3.1 植酸

植酸是维生素 B 族的一种肌醇六磷酸酯,具有极强的螯合能力,是影响多种矿物质吸收的最重要的因素。植酸及其盐类广泛存在于大豆制品中,占总重的 1%~3%,其中植酸磷的含量占植物总磷的 60%~90%,是磷和肌醇的主要储存形式。磷是动物生长所必需的无机元素,以植酸盐形式存在的磷不易被水产动物所消化利用,未被利用的磷随粪便排出体外,从而导致了水产养殖环境中磷污染的加重,容易引起水华的发生。此外,在动物胃肠环境条件下,植酸能强烈地螯合 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 等金属离子而形成不溶性的复合物,严重影响金属离子的吸收和利用。而且植酸也能和蛋白质、维生素等形成复合物,抑制其吸收和生物活性。研究还发现,植酸是淀粉酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、酸性蛋白酶等许多酶的强抑制剂。因此,植酸的存在使得多种常量和微量元素的利用率下降,降低了水产动物对蛋白质、淀粉、脂类物质等营养因子的消化吸收。

3.3.2 胰蛋白酶抑制因子

大豆蛋白中自然存在一些能抑制蛋白酶活性的物质,如可抑制胰蛋白酶和胃蛋白酶等 13 种蛋白酶活性的物质,称为蛋白酶抑制因子。其中以胰蛋白酶抑制因子的影响最大,可降低胰蛋白酶的功能,导致蛋白质的消化率降低。目前已分离出多种胰蛋白酶抑制物,其中以 Kunits 和 Bowman-Birk 两种抑制剂最具代表性,在大豆中含量分别为 1.4% 和 0.6%。抑制物可以和小肠内胰蛋白酶结合形成无活性复合物,降低胰蛋白酶的活性,抑制了水产动物对饲料蛋白的利用。另外,由于胰蛋白酶富含含硫氨基酸,胰蛋白酶的失活更加剧了大豆蛋白中含硫氨基酸的贫乏,造成体内氨基酸代谢失调。赵振山等发现,沟鲈幼鱼对溶剂抽提后的豆粕中胰蛋白酶抑制因子敏感,即使该抑制因子水平很低,仍然会降低幼鱼的生长速度和饲料利用率。另有研究发现,虹鳟鱼对豆粕中氨基酸的吸收速

度较慢,这是因为大豆中高含量的胰蛋白酶抑制因子影响了虹鳟鱼对蛋白质的消化吸收。

3.3.3 凝集素和胀气因子

大豆植物凝集素是由两个略有不同的亚基构成的糖蛋白,主要存在于植物籽实中,它的主要特性是能同糖体结合。大多数凝集素对肠道内的蛋白水解酶有抗性,因此能够与整个肠道内上皮表面的受体结合,损坏小肠壁刷状缘粘膜结构,干扰刷状缘分泌多种酶功能,对肠道消化和吸收产生严重抑制,妨碍消化道内蛋白质降解,并促使其随粪便排出,使得蛋白质利用率下降;凝集素还影响蛋白质和脂肪代谢。胀气因子是大豆中的低聚糖,主要是棉子糖和水苏糖,在大豆中含量分别为 1.1% 和 3.7%,很难被水产动物吸收利用,并出现胀气甚至腹泻。关于大豆低聚糖对于水产动物的抗营养作用还有待进一步研究证实。

3.3.4 抗维生素因子

大豆产品中具有抗维生素作用的化合物可以分为 3 种:①与维生素具有相似的化学结构,在动物代谢过程中能与该种维生素竞争并取而代之;②能与维生素结合或改变其结构而破坏其生化活性;③能破坏维生素的酶类。这些抗维生素因子氧化能力增强,不仅能氧化脂肪,同时可氧化脂肪内附着的多种维生素成分,从而破坏与其共存的维生素和胡萝卜素,阻碍鱼类对其的吸收利用。

4 清除大豆蛋白中的抗营养因子的途径

4.1 热处理

加热分为干热法和湿热法。干热法包括烘烤、微波辐射、红外辐射等;湿热法包括蒸、煮、热压、挤压等。热处理方法因成本低,效率高和工艺简单在生产上广泛应用。大豆中小部分抗营养因子对热不稳定,如凝集素、抗维生素因子和胰蛋白酶抑制因子,充分加热即可使之变性失活。经过充分、适当的加热,即可使胰蛋白酶抑制因子失活,同时适度的加热也可使蛋白质展开,氨基酸残基暴露,使之易于被动物体内蛋白酶水解吸收,从而提高蛋白消化利用率,减少有机物和氮的排泄。但是需注意高温也有可能造成某些必需氨基酸的损失,尤其是赖氨酸、精氨酸和胱氨酸的损失。目前最好的控制温度是 120℃ 下热处理 15 min,或者是 105℃ 下蒸煮 30 min。挤压处理能减少大多数抗营养因子的副作用,可以提高营养物质的消化率。

4.2 合成氨基酸的添加

虽然大豆中的一些抗营养因子可以通过加热的方法去除,但是加热的温度若超过 115℃ 时,会导致大豆蛋白中的氨基酸发生变性。既然加工工艺无法改变大豆制品氨基酸的不平衡性,那么,添加合成氨基酸是解决这一问题的最好方法,如蛋氨酸、赖氨酸等,改善饲料中氨基酸的平衡,提高饲料的营养价值来满足动物的需要。此外,大豆制品与一些蛋氨酸含量较高的植物蛋白饲料搭配使用,也可提高大豆制品替代鱼粉的比例。

4.3 诱食剂的添加

大豆制品的诱食性比鱼粉差,是导致大豆制品替代鱼粉效果差的一个主要原因。饲料中添加诱食剂可从颜色、散发的气味及口味等方面给鱼类以刺激,促进鱼类摄食,减少饲料由于诱食效果差引起的损失。诱食剂主要包括氨基酸类、动物提取物、生物碱和含硫化物等。添加诱食剂,如甜菜碱可以掩盖豆腥味,从而增加动物的摄食量;添加乌贼粉、肉骨粉也能提高含大豆制品饲料的诱食性。杨淑芬等发现,用添加诱食剂的饲料投喂鲤鱼,鲤鱼的饱食时间较对照组缩短 12~21 min。用诱食剂可使水产动物更好地利用不太喜食的植物蛋白,这对缓解当前动物蛋白饲料资源紧缺的问题具有重大意义。

4.4 植酸酶的添加

植酸是一种热稳定性抗营养因子,仅仅依靠加热处理不能消除植酸的抗营养作用。植酸酶是催化植酸及植酸盐水解成肌醇与磷酸(或磷酸盐)的一类酶的总称。国内外从 20 世纪 90 年代中期就开始研究植酸酶在水产饲料中的应用,证实了添加植酸酶能有效地水解植酸,降低大豆制品中植酸的抗营养作用,破坏它对矿物元素和蛋白质的络合能力,使被络合的大量矿物元素和蛋白质释放出来,提高磷的吸收率和沉积率,减少水产动物粪便中磷的排放。大量试验资料认为,植酸酶可提高植酸磷利用率 20%~45%。Rodehutsord 和 P feffer 以虹鳟鱼为试验对象,饲料以大豆为基础,在每千克日粮中添加 1 000 U 植酸酶,喂养试验表明,磷利用率从 17% 提高到 49%。Schafer 等用鲤鱼作试验,在以大豆粉、鱼粉和大麦为基础的饲料中,每千克日粮分别添加 500 U 植酸酶和 1 000 U 植酸酶,结果鱼体增重加快,灰分含量显著提高。植酸酶在鱼饲料中的添加量一般以每千克日粮 500~1 000 U 较为适宜,且能够部分或者全部代替饲料中无机磷的

添加,从而节约磷资源。

4.5 膨化处理

膨化处理的原理是在一定温度下,通过螺旋轴转动给予原料一定的压力,使原料从喷嘴喷出,原料因压力瞬间下降而被膨化,抗营养因子随之失活。挤压膨化通过加热和剪切力双重因素失活抗营养因子,通常可分为干法和湿法两种。大量研究表明,膨化加工可降低大豆中的抗胰蛋白酶(TIA)的活性,且不同膨化方式、不同方法、不同工艺参数对大豆 TIA 的灭活程度不同。席鹏彬等研究了不同温度下湿法挤压膨化对大豆中抗营养因子的影响发现,随膨化温度升高,胰蛋白酶抑制因子的失活程度增强。与其它大豆产品比较,膨化大豆抗原少,抗胰蛋白酶活性低,能提高营养物质的消化率。而且膨化处理使细胞壁破裂,增加其营养利用价值,尤其是提高了油脂的利用率。

4.6 微生物发酵

通过多菌种、多温相、多重发酵脱毒技术,可使大豆蛋白中的抗营养因子含量下降至饲用水平,基本上消除抗营养因子的抗营养作用。微生物发酵除了能消除大豆中的抗营养因子外,发酵后的大豆蛋白还有其它一些营养优势,如发酵后的大豆蛋白中的大分子蛋白质被降解为易溶解的小分子量蛋白、肽和氨基酸,在动物的消化系统中更易降解和直接吸收利用。姚晓红等利用多菌种混合微生物发酵豆粕,完全去除了豆粕中的胰蛋白酶抑制因子。发酵后的大豆蛋白中由于

含有一定数量的益生菌,如乳酸菌,可以明显改善水产动物肠道微生态环境,提高动物机体免疫力,促进动物生长。同时可大幅度减少疫苗、抗生素等药物使用量,提高水产动物的成活率,减少对养殖水体的污染,是最佳的绿色环保饲料蛋白源。微生物发酵处理大豆蛋白目前已有产品问世,但对产品的品质控制、发酵工艺参数控制以及规模化生产方面良莠不齐,需进一步地研究。

5 结束语

利用大豆蛋白替代鱼粉的研究有 3 个方面的意义:其一,在保证养殖动物正常生长的前提下,以廉价的大豆蛋白源替代昂贵的鱼粉可以大大节约饲料成本;其二,保护海洋渔业资源,限制鱼粉的产量,确保海洋渔业的可持续发展;其三,有利于促进绿色环保饲料的发展,降低对水产养殖环境的压力。今后的工作应特别重视利用多重发酵技术生产新型的发酵豆粕,研究如何降低其生产成本而促使其在水产养殖业上的广泛利用;其次,侧重研究大豆蛋白的加工,如何有效的降低或去除其抗营养因子,适当地补充缺乏的必需氨基酸,以增加水产动物的摄食率和饲料利用率。除此之外,要加强能量学机制的研究,探讨改进大豆蛋白饲料质量的方法和不同鱼类的最适替代鱼粉量。

(参考文献 32 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:王 芳,xfang2005@163.com)

· 光盘推荐 ·

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

邮局汇款地址:110036 沈阳市金沙江街 16 号 6 门(本社发行部收)

联系电话:(024)86391237

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

乳酸菌的耐酸性机制

张艳国 田 雷

乳酸菌是一类能利用可发酵糖产生大量乳酸的细菌的通称。乳酸菌在自然界分布广泛,可栖居于人和动物的肠道以及其它器官内。很久以前人们就利用乳酸菌来发酵动物制品(乳、肉、鱼等)和植物制品(蔬菜、葡萄酒、橄榄等)。随着食品发酵工业的不断发展壮大,开发利用乳酸菌的经济效益也不断在增长。虽然乳酸菌在发酵食品中的含量非常少,但是对食品的感官品质和质量却有决定性作用,因此,发酵剂菌株的质量功能特性和生长特性对于产品的成功发酵是非常必要的。乳酸菌不但包括在食品发酵中使用的一般认为安全(GRAS)的微生物,而且还包括胃肠道中普遍存在的共生体和具有潜在益生作用的益生菌。对这些微生物来说,食品和胃肠道中的酸性环境对它们的生存是一个很大的挑战。例如,益生菌的最佳载体是酸奶和发酵乳制品,益生菌要在其中生存就不得不适应这两类载体的酸性环境,而且益生菌需要能够在酸度更高的胃酸中生存,以便于它们能够顺利的通过胃肠道到达小肠,并在小肠中生存。因此,人们已经把耐酸性作为筛选理想益生菌株的特征之一。乳酸菌可以利用的耐酸性机制有许多种,大体上可以分成 8 类:质子泵、蛋白质修复、DNA 修复、调节因子、细胞密度的改变、细胞膜的改变、产生碱和代谢方式的改变,其中,对质子泵、产生碱的机制研究的比较多。

1 质子泵

乳酸菌调控其细胞内 pH 值的能力是乳酸菌细胞能够正常存活的重要的生理要求之一。乳酸菌在生长过程或在低 pH 值环境中时,如果它不能够维持其细胞内环境的近中性,那么它就可能会丧失活力或者细胞活性。Hutkins 等发现,当环境中的 pH 值低于细胞

正常生理 pH 值范围时,乳酸菌能够通过某些机制维持细胞内的 pH 值高于环境中的 pH 值,使其保持在正常的生理 pH 值范围内。但是当环境中的 pH 值非常低时,乳酸菌就不能够再维持细胞内 pH 值的稳定,胞内的 pH 值也开始下降,最终细胞内外的 pH 值达到一致,导致乳酸菌的生长停滞直至死亡。大量的研究表明, H^+ -ATPase 和谷氨酸脱羧酶(GAD)体系是乳酸菌维持胞内 pH 值稳定所使用的主要机制。

1.1 H^+ -ATPase

多亚基的 H^+ -ATPase(又可称为 F1F0-ATPase)将 ATP 的产生和跨膜的质子动力势(PMF)耦联起来,它既可以利用细胞呼吸作用产生的 PMF 来生成 ATP,又可以利用通过底物磷酸化产生的 ATP 来产生 PMF。PMF 能够促进细胞质中质子的外排,导致胞内 pH 值的降低。F1F0-ATPase 由 F0 蛋白和 F1 蛋白构成。嵌入细胞膜中的 F0 亚基复合体是由 a、b 和 c 三个亚基组成的,它是一个通道蛋白,具有质子转运活性。它的活性可以通过一些与特定 F1 蛋白的共同表达而得到提高,这表明 F1 蛋白可能在 F0 通道蛋白的装配或开启过程中发挥一定的作用。结合在细胞膜表面的 F1 亚基复合体是由 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ 5 个亚基组成的,当它从膜中释放出来后就具有 ATP 酶活性,当其同嵌在膜中的 F0 亚基复合体络合在一起之后就能够催化耦联的质粒转运和 ATP 的合成或者水解之间的相互转换。Kullen 和 Klaenhammer 鉴定了嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)中受 pH 值诱导的 F1F0-ATPase 操纵子,他们发现低 pH 值环境不但同 ATP 基因转录产物的增加相关,而且还同细胞膜中 H^+ -ATPase 活性的增加有关。

1.2 谷氨酸脱羧酶体系

Small 和 Waterman 描述了一个最简单的谷氨酸脱羧酶体系(GAD)的调控机制模型,它由一个谷氨酸脱羧酶、一个氨基酸通透酶和一个谷氨酸 γ -氨基丁酸反向转运体组成。乳酸菌细胞通过特异的转运体摄入谷氨酸之后,在细胞内经过谷氨酸脱羧酶脱羧消耗

张艳国,东北农业大学实验实习基地,150030,黑龙江哈尔滨。

田雷,哈药集团制药总厂哈尔滨康铃科技开发有限公司。

收稿日期:2006-12-06

一分子的胞内质子,反应的产物 γ -氨基丁酸(GABA),通过反向转运体被排到胞外。最终结果是胞内氢离子的消耗导致细胞内的pH值升高,胞外的谷氨酸被转变成碱性略强的GABA而导致胞外pH值的略微升高。

Waterman和Small在研究氯化物诱导的启动子表达时,鉴定了乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的GadCB操纵子。他们发现乳球菌的gadC基因同大肠杆菌(*E.coli*)的gadC蛋白基因具有同源性,根据此同源性和乳球菌中存在的12个跨膜疏水结构域,人们认为gadC基因编码是一个氨基酸反向转运体。Nomura等对大量乳酸乳球菌乳酸亚种(*L. lactis* subsp. *Lactis*)菌株的Southern blot分析表明,gadB基因是以单拷贝形式存在的。在其上游发现了一个组成型表达基因——gadR基因。GadR蛋白正调控氯化物诱导的gadC和gadB基因的表达。Sanders等的研究表明,乳球菌在低pH值下生长以及培养基中存在NaCl和谷氨酸时,当进入稳定期时其gadC和gadB基因的表达量最大,并且当基因插入而使gadB基因失活时会使得乳球菌的酸敏感性增加。氯化物诱导gadC和gadB基因的表达被假定是乳球菌能够在胃中存活的机制,因为在胃里微生物面对的是高酸、高氯化物的生存环境。人们推测gadCB基因可能对乳球菌在干酪生产过程中的存活非常重要。Nomura等对乳酸乳球菌乳脂亚种(*L. lactis* subsp. *Cremoris*)的研究表明,它含有一个gadB基因同源物,但是由于移码突变而导致其没有活性。这一发现至少可以在某种程度上解释为什么乳酸乳球菌乳酸亚种(*L. lactis* subsp. *Lactis*)和乳酸乳球菌乳脂亚种(*L. lactis* subsp. *Cremoris*)的耐酸性不同。

许多乳杆菌能够催化谷氨酸生成GABA的反应。在这些乳杆菌中短乳杆菌(*Lactobacillus Brevis*)的GAD已经被纯化出来,并发现其在30℃、pH值4.2并有0.2 M 嘧啶-HCl存在时活力最大,而不是被NaCl激活。此外,Andrea等在对嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)NCFM的研究中又发现了一个新的氨基酸脱羧酶-反向转运体系——鸟氨酸脱羧酶体系。

2 蛋白质修复

当细菌细胞处于酸性环境中时乳酸菌的某些伴侣蛋白、蛋白酶和热激蛋白会大量表达,从而能够保护蛋白的活性或者降解对细胞有害的蛋白。例如利用蛋白质组学的方法分析某些乳酸菌的酸耐受响应时

发现,某些热激蛋白总是增量表达,可能会修复酸诱导损伤的蛋白,有助于新合成蛋白的折叠。尽管经常能够在不同乳酸菌中发现Dnak和GroEL蛋白,然而在不同种的乳酸菌中,酸诱导表达的热激蛋白的种类各不相同。研究者对乳酸乳球菌(*L. lactis*)groE和clpP操纵子的特异性研究发现,低pH值诱导的酸耐受反应,通常是由它们自身的热激蛋白的调控子HrcA和CtsR介导的。

3 DNA修复

由于内部pH值降低,受损的DNA可以通过错误碱基序列的剪切或已停止的复制又重新起始复制而被修复。当乳酸菌细胞内的pH值过低时会导致DNA的脱嘌呤和脱嘧啶,这种现象的发生涉及碱基的质子化以及随后的碱基和戊糖之间的糖苷键的剪切,碱基丢失位点处的残基通常称为无碱基或AP(无嘌呤,无嘧啶)位点。通常只有单个碱基缺陷,乳酸菌才可以利用碱基切除修复方式来进行修复。如果DNA损伤造成DNA螺旋结构较大变形,则需要以核苷酸切除修复方式进行修复。最常见的是短片断修复,只有多处发生严重的损伤才会诱导长片断修复。损伤由切除酶切除,编码此酶的基因是uvr基因,由多个亚基组成。Hanna等发现,在低pH值环境中生存时,突变链球菌(*Smutans*)的野生型和含有recA基因的突变株中都具有能够切除AP位点的内切酶活性,而且还诱导了uvrA基因的表达。这说明,在细菌的酸应激过程中,它们可能同时使用碱基切除和核苷酸切除修复方式对DNA进行修复。

4 细胞膜的改变

细胞膜是细菌生存的外部环境中物理化学压力的首要侵袭目标之一。细菌能够通过改变细胞膜的结构、成分、稳定性和活性来保护细胞,而细胞膜的脂肪酸成分的改变是最常见的细菌对外部环境压力的一种反应。如Quivey等发现,突变链球菌(*S. mutans*)在低pH值环境中生存时,细胞膜中的单不饱和脂肪酸和长链脂肪酸会增多,这会降低细胞膜对质子的通透性。

5 产生碱

5.1 精氨酸脱亚氨酸酶体系

科学家在许多乳酸菌中都发现了ADI体系的存在。ADI体系主要由精氨酸脱亚氨酸酶、鸟氨酸转氨酶和鸟氨酸氨基甲酸激酶3种酶组成,它们分别是由arcA、arcB和arcC基因编码的,能够催化精氨酸生成

鸟氨酸、氨和二氧化碳,产生的氨会中和细胞内的 H^+ ,升高胞内 pH 值,从而提高细菌的耐酸性。普遍认为,口腔细菌所具有的 ADI 体系对人类来说是有益的,如格氏链球菌(*Streptococcus gordonii*)、副血链球菌(*S. Parasanguis*)和血链球菌(*S. sanguis*)以及某些乳杆菌都利用游离的精氨酸(平均分泌浓度为 $50 \mu M$),或者利用唾液中的多肽和蛋白质中的精氨酸。它们能够提高乳酸菌的耐酸性,这对某些很少具有固有的酸抗性的口腔乳酸菌(也就是说非突变体)来说是非常重要的。对这些细菌来说,ADI 体系非常重要,因为它使得那些有益的产酸较少的微生物能够同更嗜酸、产酸更强的微生物在牙菌斑上共生。虽然具有 ADI 体系的口腔细菌能够利用宿主膳食中的精氨酸,但是人们还发现,唾液中的精氨酸、赖氨酸或者含有这些氨基酸的多肽对降低人群龋齿率的发生有部分积极作用。

在许多不同发酵食品中的乳酸菌也都含有 ADI 体系,虽然需要量不同。在肉品发酵中使用的米酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)是非常特殊的,因为它是兼性异型发酵乳酸菌,并且也具有 ADI 代谢途径。Zuniga 等利用缺少 ADI 活性的米酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)的突变株来确定米酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)的 ADI 体系在肉品发酵中的重要性。虽然在突变株和野生型之间没有明显的不同,但是他们指出,这可能是由于菌株之间蛋白水解酶活性的差异,导致菌株生长环境中的游离精氨酸的浓度有很大的不同。De Angelis 等从来源于酸面团的 70 株乳酸菌中筛选具有 ADI、鸟氨酸转氨酶和鸟氨酸氨基甲酸激酶的菌株,结果发现,只有专性异型发酵的菌株同时具有这 3 种酶。他们对这些菌株中的旧金山乳杆菌(*Lactobacillus sanfranciscensis*)进行了详细的研究,结果发现,ADI 体系不但能够增加菌株的耐酸程度,而且还有助于细胞的生长,有助于细胞在 $7^\circ C$ 储存时的存活以及促进一种重要风味化合物前提物质——鸟氨酸的产生。

5.2 脲酶体系

脲酶能够催化一分子的尿素水解成一分子的 CO_2 和一分子的氨,而氨可以中和 H^+ ,升高 pH 值。人们已经在嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)和唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)中发现了脲酶的存在。Chen 等发现,当培养基中的尿素浓度为 $25 mM$ 、pH 值为 3 时,唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)能够将胞外的 pH 值升高到 7.6,与不添加尿素的对照组

相比,存活率提高了 1 000 倍。由于在唾液中存在尿素,因此尿素水解可能对唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)在其它嗜酸的乳杆菌和口腔链球菌正常生长导致的极低 pH 环境中生存尤其重要。

6 代谢方式的改变

虽然人们已经了解了微生物在温和酸性环境中生长、适应酸性环境和在极端 pH 值下存活的抗酸性机制,但是还不是很了解乳酸菌对其发酵过程中的自酸化作用的响应机制。但是,人们已经发现,随着生存环境的酸化,乳酸菌改变了 ATP 的代谢方式,它们利用 ATP 来产生质子梯度,同时伴随着供给细胞用于生物量合成和新陈代谢的能量减少,直到最后细胞的生长被抑制。代谢的紊乱是由于同主要代谢途径相关基因的转录方式改变导致的,令人感到惊讶的是,虽然这些转录方式的改变在 pH 值剧烈降低的过程中并不明显,但是在某些情况下,这种改变可能是由于 mRNA 稳定性的增加所致。实际上,在酸化后期同糖酵解相关的几种酶的浓度开始增加,这有利于当生存环境中的 pH 值回复正常之后细胞快速恢复生长。

7 小结

乳酸菌可以利用的耐酸性机制有许多种。乳酸菌在低 pH 值下生存的最有效的途径就是完全避免在极端酸性环境中生长,显然这种方式不可能所有的乳酸菌都具有。对于提高食品安全来说,可以筛选具有高 GAD 活性的发酵剂菌株,能够最大程度地降低食品中残留谷氨酸的含量,从而减少可供不良细菌代谢的谷氨酸,这些细菌通过分解谷氨酸而延长在低 pH 值下生存的时间。当然也可以合成谷氨酸类似物,能够特异性的抑制或者竞争细菌的脱羧酶,从而使得人们可以不依赖发酵剂菌株的 GAD 活性来生产更安全的食品。对于解决酸奶后酸化来说,可以筛选或者构建低 GAD 活性的发酵剂菌株,从而降低其耐酸性,使其在低 pH 值下生长停滞,甚至死亡,这就可以避免酸奶在发酵成熟后发生后酸化。以上仅仅列出了最可能应用的例子,然而,虽然本综述中阐述了许多乳酸菌的抗酸性机制,但是开发新的技术来增加或者减少微生物在低 pH 值下的存活率,仍然会受益匪浅。

(参考文献 26 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)