

中国期刊方阵双效期刊

北方优秀期刊

辽宁省一级期刊

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

2007年第28卷第5期
(总第290期)
(1980年创刊)

主办单位:

辽宁省农业机械研究所

编辑出版:饲料工业杂志社

地址:沈阳市金沙江街16号6门

邮编:110036

电话:总编室(024)86391923

编辑一室(024)86391926(传真)

编辑二室(024)86391925(传真)

网络发行部(024)86391237

投稿信箱:lg@feedindustry.com.cn

网站:www.feedindustry.com.cn

总编辑:慕容雪

副总编辑:沈桂宇

责任编辑:崔政德

广告合作代理:沈阳同兴广告有限责任公司

总经理:林勇

副总编辑:袁向南 于晓楠

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:gggh@feedindustry.com.cn

印刷:辽宁省印刷技术研究所

国内发行:辽宁省报刊发行局

国外发行:中国国际图书贸易总

公司(北京399信箱)

出版日期:每月5日、20日出版

国外代号:M4290

国内统一连续出版物号:CN21-1169/S

国际标准连续出版物号:ISSN 1001-991X

邮发代号:8-163

发行范围:国内外发行

广告语:证:辽刊字01-82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
源自《饲料工业》杂志,并登样刊。

饲料

SILIAO GONGYE

(半月刊)

企业标识展示



通诚集团
(028)85118888



江苏中平
(0514)7848811



江苏正昌
(0519)7399988



江苏北方
(0412)3430018
(024)88080922



布勒(常州)
(0519)7966666



FDSP
江苏良友
(0519)8300988



康达饲料
(0571)86433111



康达饲料
(0571)86433111



立达饲料
上海盛平
(021)64197116



立达饲料
广州立达尔
(020)87636309



比克
广东中山比克
(0760)3113061



比克
新泰农机机械
(0538)7427566



BORN SUN
上海邦成
(021)64766200



武汉泛华
(027)83569722



Haid
广州海大
(020)84661699



北京爱绿
(010)88597542

目次

工艺设备

■ 1 浅杯一种液体酶后喷涂设备的系统设计

■ 6 如何正确维护和使用刮板输送机

饲养

■ 8 二肽 PEPTI 吸收方式通过 D-系统促进肠道氨基酸的吸收

■ 12 禽腺多肽对肉鸡增重及内分泌影响的研究

■ 16 脂肪酸对基因表达的影响及调控

■ 20 牛磺酸对动物免疫功能的影响

试验研究

■ 24 抗脂肪细胞膜蛋白抗体对猪内脏器官及红细胞比容的影响

■ 27 黑曲霉液体发酵产植酸酶条件的研究

■ 29 雏鸡日粮粗纤维和酶制剂添加量的研究

检测技术

■ 33 高效液相色谱法测定牛乳中 IgG 含量的方法研究

■ 39 甲基紫催化光度法测定饲料中的微量碘

饲养试验

■ 41 大豆乳清粉的营养价值及在肉鸡饲料中的饲养试验

■ 43 不同能量水平日粮对肉杂 817 生长性能的影响

■ 46 紫苏-月苋草复合提取物对肉鸡生产性能的影响

■ 51 RNA 干扰的实验方法及应用

■ 55 饲料级脱氧氟磷酸钙制备的研究

■ 57 蒸汽压片玉米加工工艺及其对牛生产性能的影响

生物技术

■ 48 鸡肝脏组织中防御素基因片段的克隆

■ 51 RNA 干扰的实验方法及应用

■ 55 饲料级脱氧氟磷酸钙制备的研究

■ 57 蒸汽压片玉米加工工艺及其对牛生产性能的影响

专题论述

■ 61 灰色多层次综合评价模型在饲料企业竞争力评价中的应用

企列纵横

■ 61 灰色多层次综合评价模型在饲料企业竞争力评价中的应用

■ 61 灰色多层次综合评价模型在饲料企业竞争力评价中的应用

■ 61 灰色多层次综合评价模型在饲料企业竞争力评价中的应用

■ 61 灰色多层次综合评价模型在饲料企业竞争力评价中的应用

■ 61 灰色多层次综合评价模型在饲料企业竞争力评价中的应用

■ 61 灰色多层次综合评价模型在饲料企业竞争力评价中的应用

■ 61 灰色多层次综合评价模型在饲料企业竞争力评价中的应用

■ 61 灰色多层次综合评价模型在饲料企业竞争力评价中的应用

浅析一种液体酶后喷涂设备的系统设计

郎洪明

自从1975年美国饲料工业首次把酶制剂作为添加剂应用于配合饲料中并取得显著效果后,饲用酶制剂日益受到养殖业的重视。饲料中加入酶可以提高养分的消化率,改善饲料的品质,降低饲料原料中抗营养因子的不利影响,补充动物内源酶的不足,提高家禽的整齐度,降低粪便的粘度,减少肉鸡及蛋鸡粘肛的发生率和脏蛋的比例,提高仔猪成活率,减少粪便的氮、磷排放,减轻环境污染。饲料中加入酶具有很好的经济效益,受到养殖业的青睐,这促使饲料加工厂争相购买、安装酶添加设备,也促使设备生产厂商研究设计性能可靠、使用方便的酶添加设备。

下面就一种酶添加设备的系统设计进行分析,探讨它的参数选择、机械结构的确定,供相关设计人员参考,也可供饲料生产厂家选用和使用设备时参考。

1 设备系统概述

1.1 系统设计

酶后喷涂设备是集电、液、气、机于一体的设备,它的设计也是一个系统工程。它主要由泵室、取样室、添加室、电控屏四部分组成。本文分析的一种是把取样室内的部件分置到泵室和添加室,所以只有三个部分。具体如图1所示。

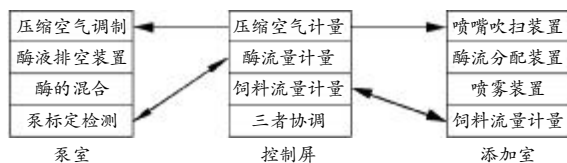


图1 工艺组成

其工作原理:添加室内的饲料流量秤测得饲料流下的信号和流量,传给控制屏,控制屏经计算传输给酶计量调制和压缩空气调制部分,将与饲料流量对应的酶流量和符合压力及流量的压缩空气同时送到喷嘴,在空气雾化喷嘴雾化后喷在饲料表面。在停机前,流量秤向控制屏发出将停机的信号,控制屏通知清扫装置打开清扫电磁阀,将喷嘴内的酶液吹干净。如换

用酶的品种或长期不用,则手动打开排空阀将管道内的酶排空。

1.2 工艺流程设计

根据系统设计,其工艺流程分泵室的流程、添加室的流程及电控流程。

1.2.1 泵室工艺流程

泵室的工艺流程有酶路流程和压缩空气调制流程。

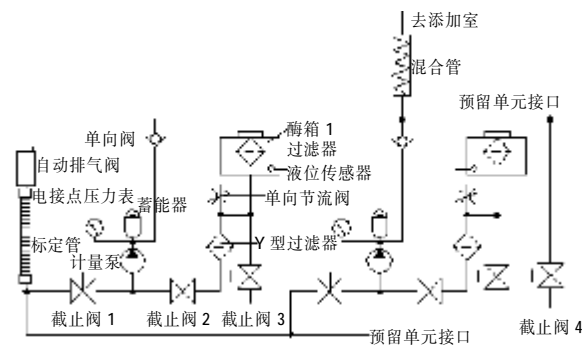


图2 酶路流程

酶路流程如图2所示,因幅面关系,只给出了二套泵的单元,其工艺流程是:液态酶加入酶箱时经过滤网(大约100目)过滤,酶箱上还装有一个液位传感器,当液位低于此位置时报警,提示工作人员加酶。酶液从酶箱底的接口分二路向下流,一路接在截止阀3上,当需更换酶和长期不生产时,用于排空酶箱和管道中的酶;另一路进入单向节流阀与Y型过滤器之间,单向节流阀用于放空管内的空气,酶液通过Y型过滤器(大约100目),经截止阀2进入计量泵和通过截止阀1到标定管,标定管内的空气通过自动排气阀排出。从计量泵出来的酶液进入蓄能器和电接点压力表,经测压,酶液经过单向阀到混合管去添加室。另一个单元的工作流程也是这样。

其中电接点压力表起到限压和报警的作用,工作原理是:预先设定压力范围,当泵的压力低于下限,说明泵工作不正常或没工作;当压力超过上限,说明管件(如阀、喷嘴等)有堵塞。超限报警在控制屏上显示。混合管的作用是,利用其内部的螺旋芯,使液体在前进时不断翻腾搅拌,将几种液体在无动力下混合均匀。

标定管的作用是标定计量泵在设定压力下的流量,这个标定的流量作为基准值用于控制计算的标

郎洪明,江汉大学文理学院,高级工程师,副教授,430056,武汉经济技术开发区。

收稿日期:2006-11-27

准。标定方法:打开截止阀 1,使酶液充到标定管的一定刻度,关闭截止阀 1,当计量泵工作正常时,关闭截止阀 2,打开截止阀 1,记下标定管内液面刻度,经过一段时间,再记下管内液面刻度,用时间除所用酶量,得出流量,为了准确,可重复做几次,取平均数。其它单元的计量泵标定也是用同样的方法。

蓄能器的作用:精确计量的计量泵一般是柱塞泵、隔膜泵,属于脉动泵,它的工作特点是脉冲式,输出的液体流量和压力是脉动的,特别是在低频率时很明显,用于带动喷嘴喷雾时,所喷出的雾是间断的。蓄能器的作用就是削减其脉动性,让喷雾呈连续状态。

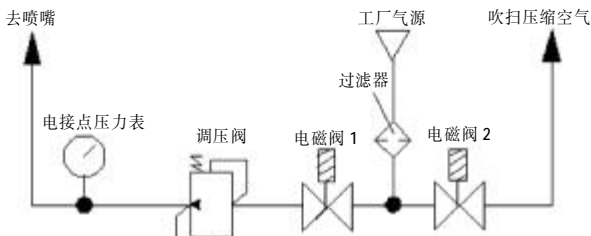


图3 压缩空气调制流程

压缩空气调制流程如图 3 所示。来自工厂气源的压缩空气经过滤器过滤掉水分和油,一路通过电磁阀 2 进入添加室吹扫管路。另一路通过电磁阀 1 到调压阀调压,通过电接点压力表测压,压缩空气进入添加室的雾化喷嘴空气输入端。电接点压力表事先设定一个可用压力范围,经调压的压缩空气压力过高或过低都会给控制屏一报警信号,让控制人员检查气源和调压装置。

1.2.2 添加室的流程

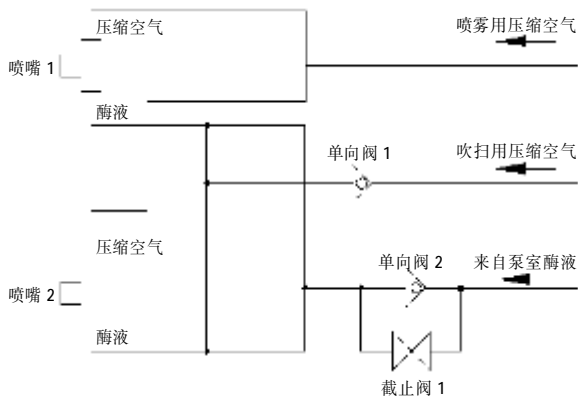


图4 添加室汽液流程

添加室的流程如图 4 所示。

来自泵室的喷雾用压缩空气分二路进入空气雾化喷嘴的空气进口。来自泵室的酶液通过单向阀 2,

分二路进入空气雾化喷嘴的液体进口。当需停机时,来自泵室吹扫用压缩空气通过单向阀 1 将喷嘴吹净,防止停机后酶液下滴,形成湿团饲料,引起饲料霉变,也造成酶的浪费。同时也防止粉尘粘在喷嘴,干涸后堵塞喷嘴。

单向阀 1 的作用是防止酶液倒流进吹扫用压缩空气管内。单向阀 2 的作用是在吹扫时防止吹扫用压缩空气进入酶液管内,再次开机时,有一段时间无酶喷出的现象。截止阀 1 的作用是在换酶品种或长期停机时,需清空管路时用。打开截止阀,旁通单向阀,利用吹扫用压缩空气的反吹作用加快酶的重力回流,将管路内的酶吹净。

1.2.3 电控流程

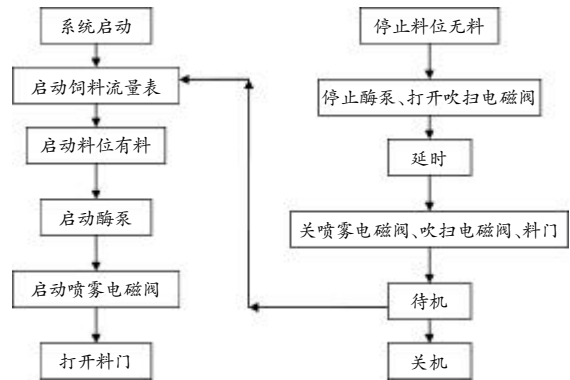


图5 电控流程

电控流程如图 5 所示。启动系统、启动饲料流量表处于待机状态,当饲料在缓冲仓内积累到启动料位时,则启动酶泵和压缩空气喷雾电磁阀,打开料门,可以正常生产。

当缓冲仓内饲料量低于停止料位时,传感器发出即将停机信号,酶泵停止,打开吹扫电磁阀,延长一段时间,关闭喷雾电磁阀、吹扫电磁阀、料门,进入待机状态,当缓冲仓内饲料达到启动料位时,再次进入正常生产。如生产结束了,则关机。

1.3 技术指标

生产率为饲料流量 5-25 t/h;酶的加入量为每吨饲料加酶 100-200 ml。

2 泵室

泵室的设计,要兼顾使用单一酶和多种酶或酶和其它药品的加入,或一个泵室供二条以上生产线喷酶用,因此,泵室内至少应安装 3 台以上的计量泵,本设计可装 4 台计量泵;泵室内应有用于标定计量泵流量的标定装置;另外还要有气源调制装置。

2.1 泵室本体

泵室尺寸:长×宽×高=1 000 mm×800 mm×900 mm。

横向(长):按一台计量泵横向占有 250 mm 左右,4 台需 1 000 mm。

高度:泵室的腿高,泵室下面要留有清理的空间,方便打扫卫生,一般选腿高 150 mm。泵室主体,计量泵是装在一块安装板上,再悬空装在泵室内,这样方便泵的拆卸和维护,这个悬空高度在 50 mm;计量泵总高度在 300 mm 左右(按饲料生产量 25 t/h 相对应的计量泵,各生产厂商生产的计量泵高度有所不同);计量泵上面要装管路配件及留有维护空间约 300 mm,加上泵室上下边框高度,泵室总高约 900 mm。

前后尺寸(宽):泵的长度约 350 mm,加上泵前边与门之间约 200 mm,泵后边要布管线等约需 300 mm,泵室前后尺寸约 800 mm。

综上尺寸及前述的工艺流程,泵室本体布局如图 6 所示。

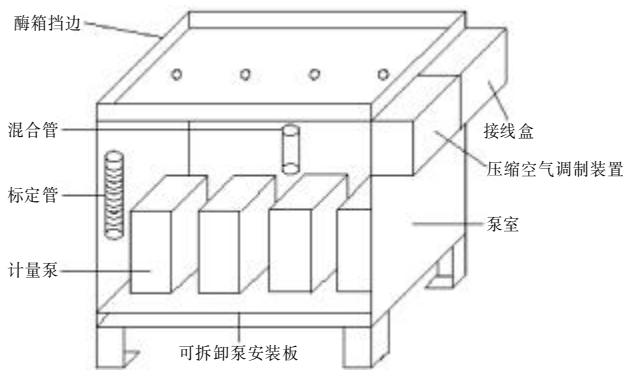


图6 泵室本体布局

2.2 共用标定装置

标定装置是用于标定计量泵在设定的压力下的流量,这个标定的流量作为基准值用于控制计算的标准。为了简化系统,减小泵室的尺寸和标定装置的数量,降低成本和简化操作,采用共用标定装置,共用标定装置见图 2。标定装置的组成是由标定管和其上边的自动排气阀构成,如图 7 所示。标定方法见泵室酶流程说明。



图7 共用标定装置

2.3 酶箱

酶箱是装酶的容器,可以是装 1 000 kg 以上酶液的大箱,也可以是装 100 kg 左右的小箱。大箱可以单独放在高于泵室的架子上,小箱可以放在泵室顶上。出液口要装在酶箱的底部,便于将酶用净,也便于清理酶箱。本文介绍的是用四个小酶箱,这样更换酶液方便,以适应多品种批量不大饲料的生产。小箱结构如图 8 所示。当然也可以接上大酶箱使用。

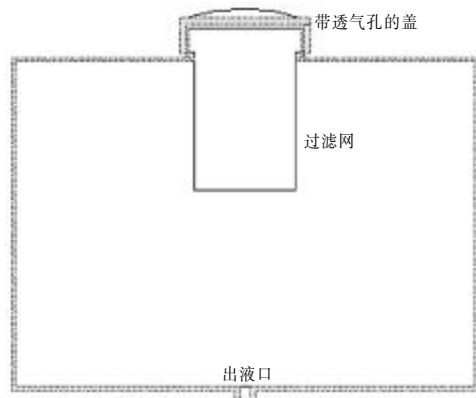


图8 小酶箱结构

小酶箱尺寸大约为 800 mm×250 mm×500 mm。

酶箱箱盖要带透气孔,防止产生负压。传感器的安装孔是按所配传感器的大小,组装时用开孔器开孔。

2.4 压缩空气调制

压缩空气作为液体酶雾化的载体,要有合适的压力和流量,本设计是通过气源调制来实现。气源调制流程见图 3,它由过滤器、吹扫电磁阀 1、雾化电磁阀 2、调压器、电接点压力表组成。工作原理见流程说明。

2.5 电气调制装置

气源调制装置装在侧面,方便组装、调试和维护。电气接线盒装在侧面也是方便组装和维护。

2.6 计量泵的选择

要选用自身计量精度高的计量泵,这样不需附加计量装置。本设计选用隔膜式脉冲计量泵,可避免酶对泵体的腐蚀。其计量精度为 0.5%。

2.7 输酶管

输酶管用透明无色 PU 软管,方便观察管内是否有堵塞等,管接头用快插接头,方便维修。

3 添加室

添加室是负责饲料流量称量和喷酶的装置,设计添加室要考虑饲料称重方式、有无料门及喷嘴的选择和酶液的分配等。

3.1 干流秤的称重方式

干流秤的称重方式有冲击式、秤斗式、皮带式等。

①冲击式称重是靠安装在称量板背面的称重传感器称重的,称重传感器安装方式可以是悬臂式或支撑式;②皮带式的称重采用料厚和速度计量;③秤斗式的称重传感器可采用吊起或支撑式。

3.2 料门

料门分无料门和有料门:①无料门,干流秤的进料是自然下;②有料门,是可控下料。

3.3 饲料流量秤的组合方式

综合以上的分析归结如图9所示,按照结构紧凑、计量准确的要求,可选择有门冲击式的,如图10所示。因为饲料生产过程中料流是不稳定的,在添加室上加一缓冲仓,配合料门的开度,可以在一段时间内保持恒流,避免了饲料流与喷酶滞后带来的不同步的影响。

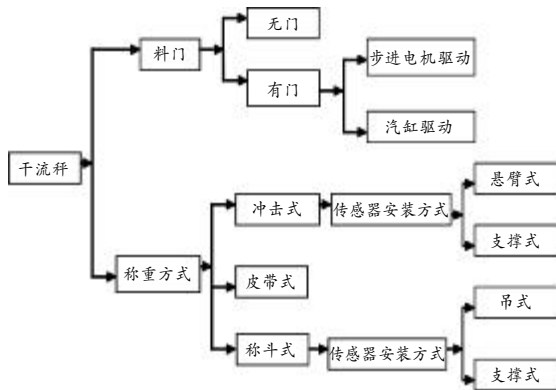


图9 干流秤的组合方式

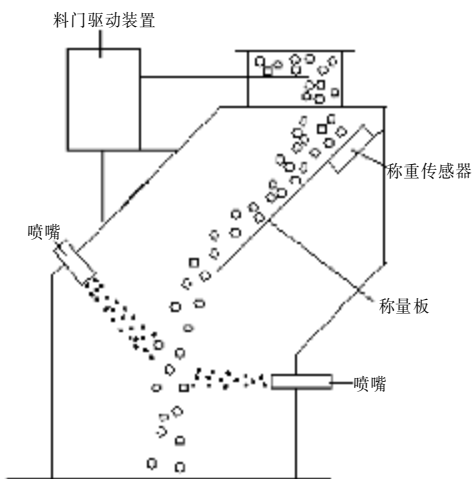


图10 添加室结构

3.4 料门的驱动方式

① 步进电机驱动:步进电机通过减速机降速,用丝杆带动料门底面的螺母套筒,达到开关料门。步进

电机驱动方式,优点是连续控制,缺点是成本高。

② 汽缸驱动:汽缸杆直接驱动料门,用汽缸上的节流阀调整开关的速度,用行程开关设定开度。汽缸驱动方式优点是成本低(设备和电控),缺点是不能连续控制,精度差。

3.5 结构尺寸设计

3.5.1 进料口的尺寸

进料口设计要考虑二个方面因素:饲料的最大生产率和饲料落到称量板上要摊成均厚一层以及饲料流的导向。综合以上因素,进料口形状如图11所示。

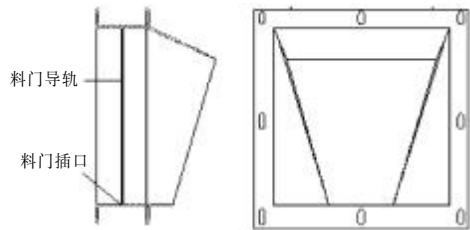


图11 进料口结构

进料口的形状是一个梯形,前大后小。大头×小头×二者间距的尺寸大约为 220 mm×120 mm×185 mm。

3.5.2 称量板

称量板设计要考虑的因素:饲料在上面摊开的厚度,以便下道工序喷酶尽可能的均匀,饲料在流到称量板后不要弹起,有利称重准确性,如图10。称量板的形状是直板,宽约 315 mm,两边有竖起的挡边,挡边高约 135 mm。称重传感器的安装方式可以是装在上端,用悬臂梁式的称重,也可以装在称重板的背面法线方向,通过测正压力称重。称量板安装角度约为 45度,如图10所示。

称量板的工作原理:饲料流到称量板上,对称量板有一个冲力 F ,这个冲力可分解成垂直称量板的法向力 $F_{法}$ 和平行与称量板的 $F_{平}$ 。称重传感器所测到的力是 $F_{法}$,因称量板的安装角度是固定的,因此 $F_{法}$ 只随冲力变化,如图12所示。

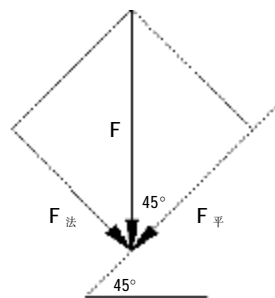


图12 称量板的受力情况

$$F_{法} = F \times \sin 45^\circ$$

冲力 F 与饲料流量的关系通过现场实际测量得到。

3.5.3 喷嘴安装

喷嘴安装要解决二个问题:喷嘴选择和喷嘴安装

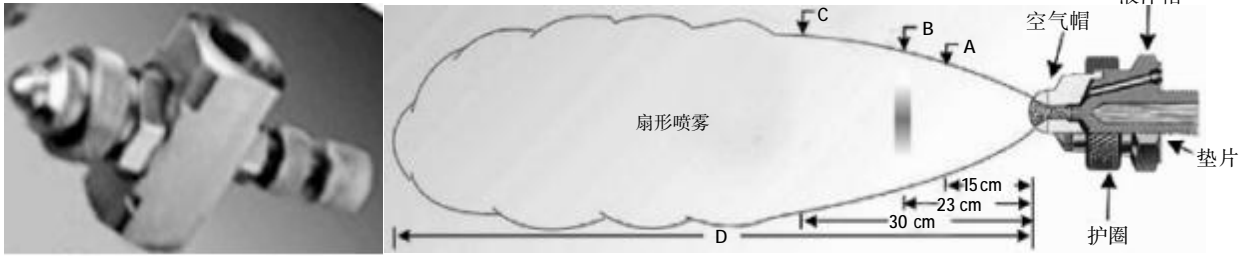


图 13 喷嘴

该喷嘴的液体流量是可调的,利用空气射流带动液体雾化喷出。根据最大设计液体流量、压力和压缩空气的压力、流量来选择喷嘴,同时要根据喷嘴的出口到目标饲料流表面的距离,选择喷嘴的喷射角,根据喷雾接触的均匀度来选择喷雾形状。本设计选用的是 SUNC13 型号的空气雾化喷嘴,其液体与空气的流量和压力搭配如下:空气压力 0.2~0.3 MPa,液体压力约 0.1 MPa,液体流量 1~2 L/h,喷射角为 110°。

喷嘴安装方向:喷嘴安装方向最好是斜向下,不宜斜向上。喷嘴斜向上时,在喷嘴工作时,由于液体的附壁效应,会有液体沿喷嘴外边倒流滴下,产生饲料湿团。

3.5.4 添加室尺寸

综合以上进料口尺寸、称量板尺寸及喷嘴的安装方式,添加室的形状如图 10 所示,添加室尺寸:长×宽×高约为 600 mm×400 mm×600 mm,左右装可开关的门,方便调试和维护。

4 安装

4.1 泵室尽可能地靠近添加室,以减少输酶管长度对酶流变化的滞后影响

滞后直接影响饲料喷酶量的正确性。如果饲料流是变化不定的,这种滞后影响很严重。例如起点为零时,饲料流量秤发出指令,控制屏计算后通知酶泵进行调整,经过滞后时间 t,达到要求压力和流量的酶液才喷到饲料上,这时的饲料流已不是发出指令时的饲料流,显然所喷的酶和饲料量不成对应关系。要保持饲料流为恒流,只是开机时有滞后的影响,正常生产时无影响。

影响滞后时间 t 的因素和改进措施:当添加室的

位置及方向。

喷嘴选择,喷嘴的种类很多,就其喷出的雾的形状而言,有圆锥形、矩形、扇形等。

本设计选用的是扁形可调空气雾化喷嘴,外形和喷雾状态如图 13 所示。

干流秤测得饲料流量值通知控制屏,控制屏经计算发出通知,这段时间为 t_1 ;酶泵接到通知调整流量和压力,这段时间为 t_2 ;输酶管有一定长度,酶液通过输酶管建立压力和流量需时间 t_3 ;全部滞后时间为 $t_1+t_2+t_3$ 。 t_1 作为电传导和计算时间是比较少的,可压缩量有限; t_2 是由酶泵的响应性能决定,也无法改变; t_3 是由输酶管的长度和直径决定的,如果泵室靠近添加室,输酶管短, t_3 就少。

4.2 喷嘴高度与酶箱高度的关系

因输酶管路中的电磁阀和单向阀的密封性不一定很可靠,特别是使用一段时间后,由于酶中的微小杂质如粘在密封件上,就会发生渗漏,所以,添加室内的喷嘴高度不能低于泵室酶箱的最高液面,否则就发生正向渗漏,酶从喷嘴滴下,在饲料中形成湿团。但喷嘴位置若高于酶箱过多,如中间停机时间长了,由于渗漏和回流的关系,会造成管路中的酶回流到酶箱,再开机时,就会有一段时间没有酶喷出,就有部分饲料没喷上酶。最好的安装高度应是喷嘴的高度略高于酶箱顶面高度,这样酶就不会正向或反向渗漏,一开机就可喷酶,同时也降低了对阀件的要求,降低成本,如图 14 所示。

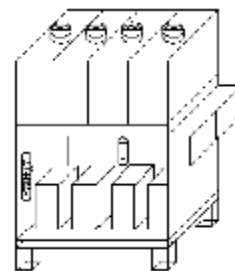


图 14 酶箱在泵室上的位置

如何正确使用和维护刮板输送机

伍新华

刮板输送机用途广泛,在饲料厂扮演着非常重要的角色,尤其是大型饲料厂不可缺少的设备。其类型包括:水平刮板输送机、倾斜刮板输送机和自清式刮板输送机。刮板输送机看起来简单,但在实际生产中,它是故障频率最高的设备之一,对刮板输送机正确的维护和使用就显得尤为重要。本文将借鉴一些国外的先进经验,结合国内饲料厂的实际,讨论一下这方面的问题。首先,简单介绍一下刮板输送机的设计思路,以便大家更好地理解有关维护和使用过程中的

伍新华,唐人神集团工程部,412002,湖南省株洲市古大桥唐人神集团工程部。

收稿日期:2006-11-13

5 调试

一套合格的设备能否正常工作,调试是否到位是重要因素之一。当酶后喷涂设备安装到位后,就开始调试。先不放饲料进行空调,空调正常,再带料调试。调试顺序分为调试电控程序、物料计量标定、酶泵标定、酶泵压力流量设定、喷雾状态调整。

5.1 调试电控程序

根据饲料生产率,打开电源,先初步设定压缩空气压力和流量、酶的压力和流量,起动电控程序运行,如整个程序运行正常,则进入下步调试。

5.2 物料计量标定

如前所述,物料的实际流量与物流冲击称量板的力F的关系是要实际测量得到的,它们是一个线性关系,但不同物料由于其粒度、形状、容重等不同,所得的线性关系的斜率是不同的。所以生产每种饲料前都要进行物料的计量标定,以后重复生产时就可直接调用。标定时要重复多次,每次标定的数值都记录在物料计量表内,它自动进行平均数计算,得出线性关系式,作为生产时饲料流量计算的依据。

5.3 酶泵标定

操作方法见泵室酶流程说明。

5.4 酶的压力和流量

酶液的压力要根据酶泵离喷嘴的距离来确定,原则上在喷嘴前的酶液压力要高于喷嘴处的压缩空气压力,否则酶就喷不出去。

问题。

1 刮板输送机的组成和结构特点

刮板输送机在饲料厂和粮食加工厂中使用很多。它可以水平或有一定角度向上或向下传送原料和成品。输送机的基本构造是由链条和上面的刮板组成,它可以设计成各种结构,如多入口、中间卸料、不同倾斜角度。设计的灵活性使现代刮板输送机在饲料厂中用途广泛。专业化的设计可以使刮板机以很陡的坡度运行,且有好的自清功能。有些输送机装有链条断裂或阻塞保护开关和尾轮轴速度监视。

刮板输送机有几种类型的入口:一种是标准入口,即在直接接收物料的刮板机的顶部设有简单的开口。这些入口要求控制进料,如用一台设备或一扇门

计量的流量是由冲程的长度和频率决定的,酶的流量根据该班预计饲料生产率来定,原则上用短冲程长度和高频率组配较好,这样可减少脉动性。

5.5 喷嘴喷雾状态调整

先将上下二个喷嘴的后边进液调节钮开到最大,由于液体重力的原故,酶液首先从下边喷嘴喷出,逐步关小下边的喷嘴的液体调节钮,观察二喷嘴的喷雾状态,直到二喷嘴喷雾状态一致为止。

6 小结

①系统设计以简约为原则,让泵室兼容取样室,同时使标定装置共用。电控设计为闭环设计,实现自动循环。②泵室设计兼顾多种液体共用,大酶箱、小酶箱通用。同时从方便组装、维护出发,将接线盒、压缩空气调制装置装在泵室侧面。用蓄能器平抑酶流的脉动。用混合管实现多种液体的无动力混合。③添加室设计上,设计为有料门,调节饲料流量,把酶流滞后的影响减少到最低,保证酶与饲料的混合均匀度。双面喷雾,提高酶与饲料的混合度。增加吹扫装置,保证喷嘴干净畅通。④泵室安装尽量靠近添加室,泵室的酶液面高度要低于喷嘴出口高度。⑤调试的顺序是初调压缩空气压力流量、酶的压力流量和喷雾状态,调试电控程序,进行物料流量标定,精调压缩空气压力流量、喷雾状态,进行酶泵的标定,精调酶的压力和流量。

(编辑:崔成德, cuicengde@tom.com)

来控制,以免物料阻塞。第二种是旁路或分流入口,引导物料到刮板机缓冲斗,然后由入口来控制到刮板机的流量。物料的厚度由这些入口控制,因此,即便堵塞入口,也不会发生阻塞。另外还有一些其它进料方式。刮板输送机需要一些方法来支承链条,因为链条是从刮板机的上边回来的。链条有几种返回的方式:①滚筒或链轮。链条直接摆在塑料滚筒或链轮上。一般来讲,这种方式最经济,当链条没有完全张紧时,有空间下垂。但它不太适用于较宽的刮板机,因为如果链条不太紧,刮板有倾斜的可能。②导轨。链条上的塑料或“聚乙烯”刮板摆在刮板机的整个导轨上。③托链槽。在物料输送层和链条回来层之间有一条托链槽,聚乙烯刮板就放在这条托链槽上。这种返回类型常常装在陡坡的刮板上。

2 刮板输送机的日常维护

根据刮板输送机的结构特点,结合本人的实际经验,日常维护应从以下几个方面来进行:①经常检查运转是否正常,是否有不正常的噪声,发现故障应及时停车排除。②运行过程中严防铁块、大块硬物等混入槽内,以免损坏机器。③定期清除输送机里的麻绳等杂物,以免缠绕链条后使电机过载,损坏电机和减速器。④检查链条销子是否断裂或松动,及时更换或修复;检查刮板是否损坏或磨损。如果有弯曲变形或丢失的刮板,及时更换或修补。“聚乙烯”刮板有划痕或沟槽也许表示有其它问题。⑤检查链条、滚筒和链轮是否过度磨损。⑥严格按照制造商的产品说明书,定期润滑轴承、齿轮和减速器等。⑦定期检查所有安全保护装置,确保它们能可靠工作。⑧定期检查所有螺栓联接的紧固程度,如发现松动应及时拧紧。⑨经常检查和调整驱动皮带或链条的张紧度。

对于刮板输送机来说,保持合适的链条张紧度是最关键的日常维护工作之一。链条既不能太紧也不能太松,链条过紧易引起过早磨损,以及链条、链轮和轴承等问题,链条张紧度不够可能引起链条断裂。如果链条不够紧,它就可能挂住滚筒或导轨而损坏。

当刮板输送机正常运转时,链条一般应有少许松弛。滚筒式返回输送机的滚筒间,一般应该有 6.35~12.7 mm 的链条垂度。对于导轨式或托链槽式返回输送机,当链条从头部齿轮下来时,应该有少许链条垂度,一般是 12.7~25.4 mm。链条运转一段时间后,会慢慢变长或下垂,刮板有可能绊住导轨或托链槽,因此要经常检查,防止这种情况发生。尽管刮板输送机有较好的可靠性,但是必须经常维护和保养,才能保证它的有效运转。

3 使用中的问题及解决方法

3.1 提高输送量

刮板输送机使用中遇到的问题之一是非满负荷运转。它的输送量是由被传送物料的横截面积和链条速度决定的。一般来讲,如果一条输送机有输送量问题,无外乎这两个因素。要想解决这个问题,首先必须精确地测出输送机的输送量。如果刮板输送机达不到额定输送量,可以从以下几个方面来寻找原因,从而找到解决问题的办法。

3.1.1 检查刮板输送机的速度

核查输送机是否在驱动轴速度下运转。在安装和维护时,驱动装置上的滑槽可能安装不正确,或者驱动装置上的皮带松了而打滑,使输送机在低于额定转速下运转。

3.1.2 检查刮板输送机内的物料厚度

物料厚度不合理有几个原因:一是输送机安装的倾斜角度不合理,而通常设计的输送机只能在某个坡度范围内运行才最佳。另一个原因是由于输送机进料不顺畅或不充足,如进料设备不匹配、进料门不正常、进料口有障碍物等。针对不同的原因采取相应的措施,增加物料的厚度和进料均匀度。

3.2 防止积料

对于中间卸料的刮板输送机来说,积料是使用中的另一大问题。刮板输送机可以设计成多个中间卸料点的方式,但是多个中间卸料点使积料的可能性大大增加,最终使物料塞住输送机的头部或者引起交叉污染。这里有几个措施来应对积料问题。

① 尽量加长中间卸料口的长度,这样物料在到达卸料口的末端前,有足够的时间卸掉。卸料口的长度多少合适随物料的厚度和链条速度的不同而不同。一般来说,卸料口长一些为好。大多数典型卸料口(谷物输送)长度应该在 90 cm 以上。另外,卸料门下的过渡部分不应该阻碍物料通过。

② 如果为了增加刮板输送机的输送量,链条速度增加了,卸料口也要加长。

③ 设有中间卸料口的刮板输送机一般应在链条上加装一些回料斗。少量的谷物或饲料不能在中间口卸掉,而传送到输送机的头部,如果头部的门是关的,物料最终会在头部堆积起来。回料斗拾起没有下去的物料,带到输送机的尾部,然后它又被传送到卸料口。

刮板输送机是大型饲料厂的通用设备,对其进行精心维护和使用,可以大大减少故障,从而提高饲料厂生产的连续性,进而提高整个加工过程的生产效率。

(编辑:崔成德, cuiengde@tom.com)



小肽营养 全球共享

美国华达(VBC)中国广州技术中心

有奖征文

[本栏目由美国华达(VBC)中国广州技术中心协办]

二肽 PEPT1 吸收方式通过 $b^{0,+}$ 系统促进肠道氨基酸的吸收

马小珍(译) 薛晓生 王碧莲 周 围 姚雄军(校)

摘 要 小肽和游离氨基酸是日粮蛋白在小肠中主要的消化产物,目前尚不明确这两种物质间的转运干扰。本试验用 Caco-2 细胞来研究 PEPT1 转运的二肽吸收是否会改变游离酸性、中性氨基酸的吸收。L-[3 H]Arg 转运到 Caco-2 细胞是非依赖 Na^+ ,而主要是受 $b^{0,+}$ 转运系统的调节。10 mmol/l 二肽培养的细胞能将 L-Arg 流速提高到 4 倍。本试验首次证明,小肠细胞内游离氨基酸和小肽的吸收相互影响,并能改变氨基酸吸收的动力学。

关键词 二肽 PEPT1; $b^{0,+}$ 系统; 肠道氨基酸

中图分类号 Q517

日粮蛋白和内源性蛋白经胰蛋白酶、小肠刷状缘蛋白酶和肽酶消化后形成小肽和游离氨基酸。小肠细胞顶端细胞膜内几种直接的转运系统调节游离氨基酸的吸收,但二肽与三肽的吸收是基于 PEPT1 系统完成。虽然肽与氨基酸的转运均会导致氨态氮收入小肠,但不同转运系统对氨基酸吸收的影响仍不明确。虽然氨基酸不会影响 PEPT1 系统转运肽,但尚不明确细胞水解后肽的吸收是否会影响游离氨基酸进入上皮细胞。Caco-2 细胞来源于人体肠道上皮细胞,是一个有价值的体外研究模型,可以模拟酸性、碱性、中性氨基酸转运系统及 PEPT1 转运系统。

本次研究中,为了能模拟不同的转运系统,试验采用的是融合后 14 d 的 Caco-2 细胞。首先,试验明确了不同转运系统对放射性标记的酸性左旋精氨酸(L-Arg)、中性左旋丙氨酸(L-Ala)吸收的影响。本次试验主要目的是研究细胞经用含有精氨酸、丙氨酸的二肽处理后,对 L-Arg 与 L-Ala 转运率的影响。为了便于研究二肽对氨基酸流速的影响,试验应用胶原蛋白培养的 Caco-2 细胞,降低非特异性转运系统对氨基酸、肽转运的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

合成 D-[3 H]Phe-L-Ala(9 Ci/mmol)和未标记的 D-

Phe-L-Ala 分别购自 Biotrend 和 Bachem 公司, L-[3 H]Arg(50 Ci/mmol)由 Amersham 公司提供, L-[3 H]Ala(96 Ci/mmol)由 ICN 提供,其它的氨基酸和肽均购自 Sigma 公司。细胞培养皿和培养瓶购自 Renner 公司,细胞培养所需的其它材料来自 Gibco 公司,胶原蛋白购自 Serva 公司。

1.2 细胞培养

Caco-2 细胞(ATCC)培养、传代均用 DMEM 培养液(含 10%胎牛血清,2 mmol/l 谷氨酰胺,1% MEM 非必需氨基酸,70 μ g/ml 庆大霉素),在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下进行。

1.3 转运研究

Caco-2 细胞的流动研究是在 Krebs 缓冲器中进行,其内配有 137 mmol/l $NaCl$ 、5.4 mmol/l KCl 、2.8 mmol/l $CaCl_2$ 、1.0 mmol/l $MgSO_4$ 、0.3 mmol/l NaH_2PO_4 、0.3 mmol/l KH_2PO_4 、10 mmol/l 葡萄糖和 10 mmol/l HEPES/Tris(pH 值 7.4)。在无 Na^+ 缓冲器中,137 mmol/l 氯化胆碱替代 137 mmol/l $NaCl$ 、0.3 mmol/l KH_2PO_4 替代 0.3 mmol/l NaH_2PO_4 ,其它成分相同。研究吸收率时,洗脱培养在 24 孔板中的单层细胞以去除培养液,然后在 37 $^{\circ}$ C 下与竞争底物和放射性标记底物或仅与放射性标记底物一起培养 30 min,然后用冰点的培养缓冲液洗脱 3 次,每孔加 50 μ l TEN 缓冲液,并加 50 μ l 组织增溶剂进行消化。通过检测细胞放射性来确定示踪元素的导入。细胞培养条件:培养时间为 30 min,培养温度 37 $^{\circ}$ C,二肽及二肽组成氨基酸的浓度均为 10 mmol/l。

1.4 统计

所有分析(线性或非线性回归分析)均用 Prism 2.01 完成,数据以平均值 \pm 标准误(SEM)表示,差异显著性用 Student t 检验。

马小珍,福建出入境检验检疫局,850001,福州市湖东路 312 号。

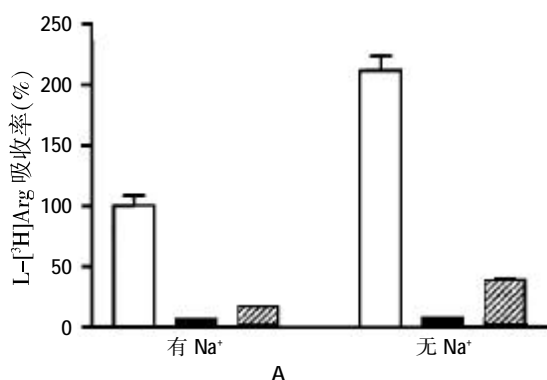
薛晓生、王碧莲、周围、姚雄军,华达生化科技饲料(湖北)有限公司。

收稿日期:2007-01-23

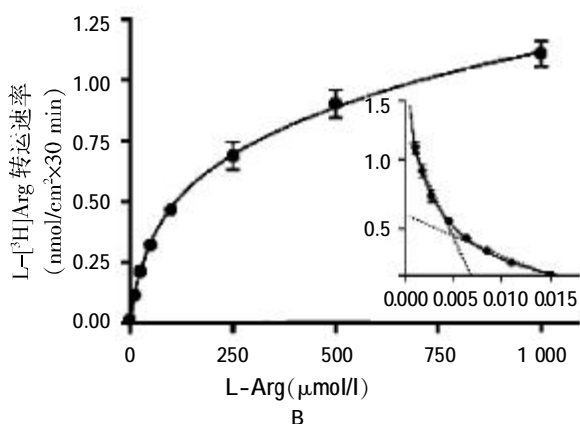
注:译自细胞生理学杂志,2001(186):251~259

2 结果与分析

2.1 Caco-2 细胞中 L-[3 H]Arg 和 L-[3 H]Ala 的转运特点(见图1、图2)

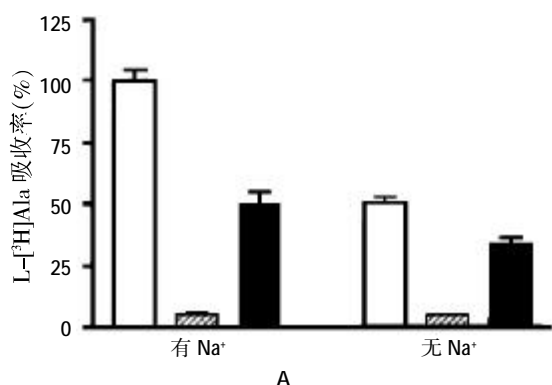


注:A 表示在 pH 值 7.4, 5 μ mol/l L-[3 H]Arg 吸收情况。□表示对照组(既无 L-Arg 又无 L-Ala 底物); ■表示底物为 10 mmol/l L-Arg; ▨表示底物为 10 mmol/l L-Ala,且设定有 Na^+ 参与下的对照组吸收率为 100%。

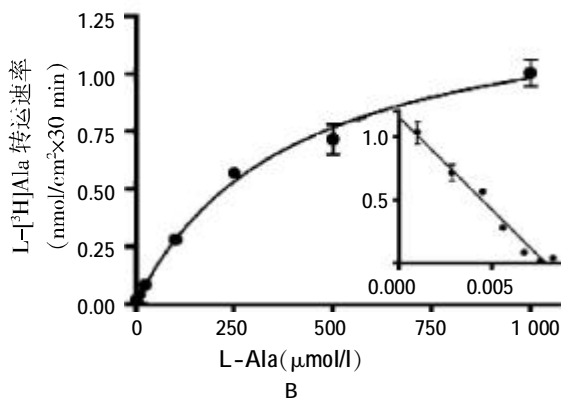


注:B 表示在 pH 值 7.4, Na^+ 参与条件下, L-Arg 转运吸收率。 $V_{max}=(1.25\pm 0.06)$ nmol/ $cm^2\times 30$ min, $K_m=(182.3\pm 24.4)$ μ mol/l; $V_{max}=(0.52\pm 0.03)$ nmol/ $cm^2\times 30$ min, $K_m=(34.9\pm 2.2)$ μ mol/l。

图1 L-Arg 流入 Caco-2 细胞的特点



注:A 表示在 pH 值 7.4, Na^+ 参与条件下, 5 μ mol/l L-[3 H]Ala 转运情况。□表示对照组(既无 L-Arg 又无 L-Ala 底物); ▨表示有 10 mmol/l L-Ala; ■表示有 10 mmol/l L-Arg。



注:B 表示 Na^+ 参与下, L-[3 H]Ala 转运动力学。 $V_{max}=(1.16\pm 0.05)$ nmol/ $cm^2\times 30$ min, $K_m=(146.9\pm 8.1)$ μ mol/l。

图2 Caco-2 细胞对 L-Ala 的吸收

氨基酸转运试验是在 pH 值 7.4 条件下进行的, 以降低 H^+ 依赖转运体系对氨基酸吸收的影响。无论是否有 Na^+ 的参与, 在 10 mmol/l L-Arg 试验组中, 5 μ mol/l 有放射性标记的酸性 L-[3 H]Arg 吸收率都下降到对照组的 7% (见图 1A)。在 Na^+ 参与下, 10 mmol/l L-Ala 试验组与对照组相比, 5 μ mol/l 有放射标记的酸性 L-[3 H]Arg 吸收率下降了 83% (见图 1A); 在既无 L-Arg 又无 L-Ala 底物的对照组中, 在无 Na^+ 参与时 5 μ mol/l L-[3 H]Arg 的吸收率是有 Na^+ 的条件下的 2 倍 (见图 1A)。无 Na^+ 参与下, 酸性氨基酸 (如 L-Lys) 吸收率更高, 这是由于电敏感机制引起的, 该机制会受到 Na^+ 的抑制。L-Ala (10 mmol/l) 降低了非依赖 Na^+ L-[3 H]Arg 吸收率的 85%, 这表明氨基酸的移动是由 $b^{0,+}$ 系统转运的, 该系统可在无 Na^+ 的条件下转运酸性、中性氨基酸。15% 的 L-[3 H]Arg 吸收是不受 L-Ala 的影响, 而是由 Y^+ 系统 (不依赖 Na^+ 可转运酸性氨基酸) 转运或者是由 Y^L 系统 (在无 Na^+ 的条件下转运酸性氨基酸, 在有 Na^+ 的条件下转运中性氨基酸) 转运。

为评定 L-Arg 的吸收是否被这两种转运通道所调节, 我们作出了一个流速与底物浓度间的函数图。转运率表示饱和和动力学 (见图 1B), 速率的变化表示相关性的高低, 这两种转运通道的 K_m 值分别是 (182.3 ± 24.4) μ mol/l、 (34.9 ± 2.2) μ mol/l (见图 1B)。

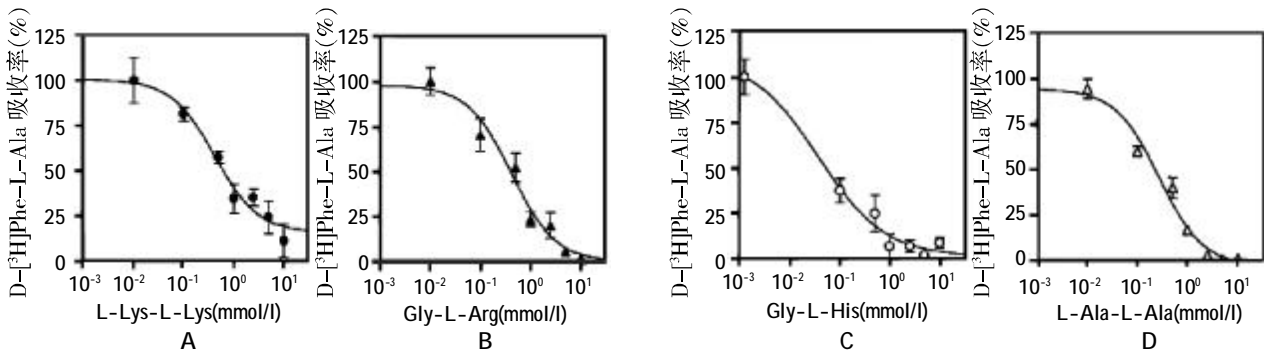
L-[3 H]Ala 转运到 Caco-2 细胞主要受转运系统的调节而不受 L-[3 H]Arg 吸收的影响。无 Na^+ 参与下, L-[3 H]Ala 的转运仅是有 Na^+ 条件下的一半 (见图 2A)。无 Na^+ 条件下, 10 mmol/l L-Arg 抑制了 30% 的 L-[3 H]Ala 吸收 (见图 2A)。在有 Na^+ 条件下, L-[3 H]Ala 的吸收是无 Na^+ 条件下的 2 倍, 这是由于 Na^+ 存在时, $b^{0,+}$ 系统转运了 15% L-Ala。研究表明, 几种转运系统均参与了 L-Ala 的吸收转运, L-[3 H]Ala 速率动力学显示 K_m 值基本是一常数, 约为 150 μ mol/l (见图 2B), 这也说明参与

L-Ala 吸收转运的不同转运系统的 Km 值基本相同。

2.2 二肽和游离氨基酸处理过的 Caco-2 细胞对 L-[³H]Ala、L-[³H]Arg 流速的影响

二肽浓度不断升高的情况下,测量 5 μmol/l D-[³H]Phe-L-Ala 吸收率,从而研究二肽与 PEPT1 的相关性(见图 3)。EC₅₀ 值分别是:L-Lys-L-Lys 为(411.1±15.3) μmol/l,Gly-L-Arg 为(412.7±13.7) μmol/l,Gly-L-His 为(42.0±6.5) μmol/l,L-Ala-L-Ala 为(271.3±12.4)

μmol/l(见图 3)。上述任一种二肽浓度为 10 mmol/l 时,转运系统的转运速度均达最大值 V_{max}。在前处理过程中,分别用 10 mmol/l L-Lys-L-Lys、Gly-L-Arg、Gly-L-His、L-Ala-L-Ala 培养 Caco-2 细胞;同时用同摩尔浓度的氨基酸(二肽的组成氨基酸)进行预培养,并比较二肽与游离氨基酸转运系统间的影响作用。阴性对照(底物为 10 mmol/l Gly-Gly 或 20 mmol/l Gly)说明 b⁰⁺系统对 L-[³H]Arg 吸收的影响,然后计算 L-[³H]Arg



注:pH 值 7.4,二肽浓度不断升高时,5 μmol/l D-[³H]Phe-L-Ala 的吸收率。A 是二肽为 L-Lys-L-Lys,EC₅₀ 为(411.1±15.3) μmol/l;B 是二肽为 Gly-L-Arg,EC₅₀ 为(412.7±13.7) μmol/l;C 是二肽为 Gly-L-His,EC₅₀ 为(42.0±6.5) μmol/l;D 是二肽为 L-Ala-L-Ala,EC₅₀ 为(271.3±12.4) μmol/l。

图 3 不同二肽对 D-[³H]Phe-L-Ala 吸收率的影响

(50 Ci/mmol)和 L-[³H]Ala 进入 Caco-2 细胞的速度。

除了 Gly(无论是以二肽形式还是以游离形式)外,其它任一种前培养方式均明显提高了 Caco-2 细胞对 L-[³H]Arg 的吸收速度(见表 1)。用二肽培养后的吸收速度较氨基酸的快,二肽与氨基酸混合物培养后吸收速度最快。用 Gly-L-Arg、Gly、L-Arg 混合物或 L-Ala-L-Ala、L-Ala 混合物前培养 Caco-2 细胞后,L-[³H]Arg 的吸收速度提高了 4.6 倍(见表 1)。与 L-[³H]Arg 转运相反,用 L-Ala-L-Ala、Gly-L-Arg、L-Lys-L-Lys 或其

组成氨基酸或二肽与氨基酸的混合物培养 Caco-2 细胞后,L-[³H]Ala 的吸收速度均没有显著提高(见表 2)。

2.3 二肽胞内水解促进 L-[³H]Arg 吸收

以下试验证明了二肽胞内水解是 L-[³H]Ala 的吸收前提条件:①非水解的 D-Phe-L-Ala 不能促进 L-[³H]Ala 的转运(见表 3);②先用氨肽酶抑制剂(Amastatin)前处理细胞以抑制胞内水解,然后再与 Gly-L-Arg 进行前培养抑制胞外水解后,不能促进转运(见表 3)。Amastatin 广泛用作肽水解抑制剂,且其不会干扰上皮

表 1 分别用二肽组成氨基酸、二肽、二肽与氨基酸的混合物前培养后,L-[³H]Arg 转运到 Caco-2 细胞的情况

氨基酸	二肽	氨基酸+二肽	吸收率(%)
L-Lys	L-Lys-L-Lys		246.7±17.0 ^{1***}
			293.1±5.7 ^{2*}
		L-Lys+L-Lys-L-Lys	350.0±6.3 ^{3***}
Gly+L-Arg	Gly-L-Arg		183.1±4.8 ^{1***}
			297.6±26.6 ^{2***}
		Gly+L-Arg+Gly-L-Arg	460.8±6.6 ^{3***}
Gly+L-His	Gly-L-His		136.9±4.8 ^{1***}
			160.5±7.6 ^{2*}
		Gly+L-His+Gly-L-His	194.3±4.1 ^{3**}
L-Ala	L-Ala-L-Ala		332.8±20.7 ^{1***}
			417.5±13.8 ^{2*}
		L-Ala+L-Ala-L-Ala	461.7±7.2 ^{3*}
Gly	Gly-Gly		102.6±2.4
			110.6±7.0
		Gly+Gly-Gly	102.4±2.0

注:pH 值 7.4 条件下,对照组未用底物,二肽浓度为 10 mmol/l,氨基酸浓度为 10 mmol/l。培养 Caco-2 细胞数值表示为平均值±标准误(n=4),* 表示 P<0.05,** 表示 P<0.01,*** 表示 P<0.001,表 2、表 3 同。1 与对照组比较;2 与氨基酸试验组比较;3 与二肽试验组比较。

表 2 分别用二肽组成氨基酸、二肽、二肽与氨基酸的混合物前培养后, L-[³H]Ala 的吸收率

氨基酸	二肽	氨基酸 + 二肽	吸收率(% ,与对照组相比)
L-Ala			100.1±8.3
	L-Ala-L-Ala		107.1±4.0
		L-Ala+L-Ala-L-Ala	109.3±3.5
Gly+L-Arg			107.7±4.8
	Gly-L-Arg		107.6±3.0
		Gly+L-Arg+Gly-L-Arg	102.1±4.5
L-Lys			105.0±2.6
	L-Lys-L-Lys		102.5±7.1
		L-Lys+L-Lys-L-Lys	98.6±5.8

注: pH 值 7.4 条件下, 对照组未用底物, 二肽浓度为 10 mmol/l, 氨基酸浓度为 10 mmol/l, 培养 Caco-2 细胞数值表示为: 平均值±标准误(n=4)。

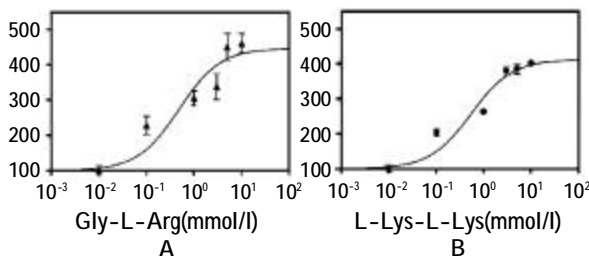
细胞肽转运系统, 因此 Amastatin 是通过抑制 Gly-L-Arg 的水解阻碍 Gly-L-Arg 的吸收。细胞经游离氨基酸前处理后, Amastatin 不能影响细胞跨膜转运, 这也说明了 Amastatin 对水解的特殊作用(见表 3)。

表 3 Caco-2 细胞经前培养后对 5 μmol/l L-[³H]Arg 吸收率的影响

前培养底物	吸收率(% ,与对照组比较)
D-Phe-L-Ala	94.8±8.5
Gly-L-Arg	297.6±26.6***
Gly-L-Arg+Amastatin	102.5±10.3
Gly.L-Arg	183.1±4.8***
Gly.L-Arg+Amastatin	175.8±6.2***

注: Caco-2 细胞前培养条件: pH 值 7.4, 底物为 10 mmol/l D-Phe-L-Ala, 10 mmol/l Gly-L-Arg, 10mmol/l Gly, 10 mmol/l L-Arg, 100 μmol/l Amastatin, 培养时间 30 min。

L-[³H]Arg 吸收的限速步骤是二肽转运到细胞还是二肽胞内水解呢? 试验证明, 限速步骤是转运而不是水解(见图 4)。通过 Gly-L-Arg 或 L-Lys-L-Lys 前处理细胞试验发现 L-Arg 流速达 1/2 V_{max} 时 Gly-L-Arg 是 (489.7±46.8) μmol/l, L-Lys-L-Lys 是 (534.7±26.3) μmol/l (见图 4)。L-[³H]Arg 跨膜转运 EC₅₀ 值的大小类似于同 PEPT1 作用的肽的引力(见图 3)。



注: A 是二肽为 Gly-L-Arg, EC₅₀ 为 (489.7±46.8) μmol/l; B 是二肽为 L-Lys-L-Lys, EC₅₀ 为 (534.7±26.3) μmol/l。

图 4 随着与细胞培养的酸性二肽浓度升高, L-[³H]Arg 的吸收率变化

3 讨论

小肠中氨态氮吸收既以游离形式, 又以二肽、三肽的形式, 但不同的转运系统对氨基酸吸收影响程度

尚不明确。以往试验没有在细胞水平研究氨基酸和二肽吸收的相互作用, 因这种研究适宜于在类似提取细胞的组织环境下进行。本试验选用的是 Caco-2 细胞。通过 Caco-2 细胞研究试验, 证明了二肽转运和酸性氨基酸转运间的相互作用。酸性 L-Lys 受到两种转运系统的调节, 一个是非依赖 Na⁺酸性、中性氨基酸转运系统, 另一个是特定氨基酸转运系统。在以前研究中, 第一个系统即 b⁰⁺系统能转运 47%L-Lys, 特定酸性氨基酸转运系统 Y⁺转运 27%, 浓度差转运 26%。64%是由载体转运系统 b⁰⁺转运, 36%由系统 Y⁺转运。在本次研究中, L-[³H]Arg 85%由系统 b⁰⁺调节, 15%由系统 Y⁺调节。经系统 b⁰⁺转运 L-Arg 的比率更高, 原因是细胞不同、生长因子不同。

酸性、中性氨基酸吸收必须要有系统 b⁰⁺转运, 对 L-Ala 吸收比依赖 Na⁺转运低 15%。在 Na⁺存在下, 转运中性、酸性氨基酸的 b⁰⁺系统只转运 L-Ala 吸收总量的 35%。b⁰⁺转运系统仍未在肠道组织分子水平上得以证实。原名为 NBB 转运系统更名为系统 b, 能更好地反映出与系统 b⁰⁺的关系。

显然, 与 L-Arg 及其转运系统相反, L-Ala 的流速不受前培养物(无论是酸性、中性氨基酸还是二肽)的影响。15%L-Ala 吸收量是系统 b⁰⁺转运, 内源氨基酸不能显著影响 L-Ala 流速。

本次试验第一次在细胞水平证实小肽与游离氨基酸吸收之间相互作用, 并为 PEPT1 对氨基酸吸收的调节作用提供了证据。小肽转运系统可转运 400 多种二肽和 8 000 种三肽, 能显著改善肠道游离氨基酸的转运。PEPT1 可转运大量小肽到肠道上皮细胞, 这些小肽水解后释放出游离氨基酸, 从而促进必需氨基酸的吸收。小肽转运系统能促进肠道氨基酸的吸收。首先, 二肽、三肽(含有必需氨基酸)的转运避免了必需氨基酸参与氨基酸转运系统的竞争; 其次, 由于增加细胞内游离氨基酸含量, 从而能促进必需氨基酸的吸收。

(编辑: 刘敏跃, lm-y@tom.com)

禽胰多肽对肉鸡增重及 内分泌影响的研究

张剑锋 傅伟龙

摘 要 选取 1 日龄艾维茵鸡 160 只, 随机分为 4 组, 每组 40 只。基础日粮含 ME 12.91、12.90 MJ/kg, CP 23%、21%。1~21 日龄期间, 分别按体重在 I~IV 组鸡基础日粮中添加 0、1.16、3.48 和 10.44 mg/kg 禽胰多肽(APP)制品。鸡只自由采食及饮水, 24 h 光照, 试验期 44 d。试验结果表明: 禽胰多肽能促进鸡甲状腺的发育, 显著提高血浆甲状腺素(T_4)浓度($P<0.05$); 促进鸡只的生长发育, 显著提高肉鸡的增重($P<0.05$), 并改善饲料报酬。本试验中 APP 适宜添加量为每天每千克体重 1.16 mg。

关键词 禽胰多肽; 甲状腺素; 生长激素; 肉鸡增重

中图分类号 S831

Studies of the effects of APP crude products on growth and endocrine in broiler

Zhang Jianfeng, Fu Weilong

Abstract 160 Avain chickens aged 1 day were randomly divided into four groups ($n=40$). The birds were fed a commercial diets containing ME 12.91 MJ/kg, 12.90 MJ/kg; CP 23%, 21%. Group 1 serve as control. Avain pancreatic polypeptide (APP) crude products were added to the diets of groups 1~4 at doses of 0, 1.16, 3.48 and 10.44 mg/(kg BW·d) respectively from 1st to 21th day. Feed and water were provided ad libitum and 24-hour lighting was adopted. Every 10 day from 14th to 44th, birds were weighted respectively, and 10 blood samples from each group were collected. Plasma concentrations of triiodothyroine(T_3), thyroxine(T_4), growth hormone(GH) and insulin were measured by radioimmunoassay (RIA).

The results suggested that APP crude products could promote development of chicken thyroid gland, significantly increase plasma T_4 concentration, promote broiler growth ($P<0.05$) and improve feed efficiency. The optimum supplemented dose was 1.16 mg/(kg BW·d) in this trial.

Key words avian pancreatic polypeptide; thyroid hormones; growth hormone; broiler growth

禽胰多肽(Avian pancreatic polypeptide, 简称APP)是一种由胰岛 PP 细胞分泌、36 个氨基酸残基组成的小分子单链多肽(Kimmel J. R.等, 1975)。APP 具有类似胃分泌素的作用, 能显著地刺激鸡腺胃胃液、胃酸、胃蛋白酶及蛋白的分泌, 并可导致肝糖原分解, 但不伴随血糖升高, 且使血浆甘油水平下降(Hazelwood R. L.等, 1973); APP 还具有降低血浆氨基酸特别是丙氨酸水平的作用(Kimmel J. R.等, 1978)。离体试验表明, APP 能显著抑制胰高血糖素刺激的脂肪分解(Adamo

M. L.等, 1992)。Denbow D. M.等(1988)给白莱航鸡大脑室注射 APP 后, 显著地增加了鸡的采食量。饮水中添加 APP 粗品, 能显著提高粤黄鸡血浆 GH、 T_4 和 T_3 浓度, 显著提高鸡的增重(代建国等, 2000)。肌注 APP 粗品, 能提高粤黄公鸡血浆中 T_3 的含量, 提高鸡的采食量和饲料转化率, 促进鸡的生长发育(朱晓彤等, 2002)。可见, APP 通过某些途径参与了鸡的采食及胃肠道消化功能的调控, 也直接或间接地参与了鸡体内某些营养物质的代谢过程。本研究将探讨 APP 作为鸡的一种生理营养调节剂, 饲喂鸡只, 研究其对肉鸡生长发育和内分泌水平的影响及可能的作用机理, 以及将其应用于家禽生产的可行性。

1 材料与方法

1.1 APP 的制备及含量测定

张剑锋, 广西省贺州市八步区渔牧兽医局, 542800, 广西贺州市爱民路爱群巷 2 号。

傅伟龙, 华南农业大学动物科学学院。

收稿日期: 2006-11-13

1.1.1 APP 的制备

参照许英镐等(1991)的方法,并做少许修改,即加入吸附剂后离心所获得的沉淀直接作为添加物,而不进一步酸解制成丙酮干粉。

取洗净、去除脂肪及结缔组织后的胰腺,切成 1 cm³左右的小块,高速捣碎匀浆后,按每千克胰腺组织加入 85% H₃PO₄ 40 ml 和 76% 乙醇 3 500 ml 的混合液(pH 值为 3.0),室温搅拌 2 h,用冷冻高速离心机在 15 000×g 离心 30 min,取出上清液,上清液中加入 50 g CaCl₂,用 4 mol/l NaOH 调 pH 值至 5.5,20 ℃ 搅拌吸附 2 h,冷冻高速离心,除去上清液,沉淀用冷风吹干,置冰箱保存,用时溶解于蒸馏水,以便喷雾添加。

1.1.2 APP 制品多肽含量的测定

参照 Folin 酚试剂法(刘玉斌等,1989)。空白对照与标准液同时进行测定。以吸光度为横坐标,标准液浓度为纵坐标,绘制标准曲线。根据标准液与样品液

的吸光度及标准液浓度,计算样品液中多肽的含量。本试验测得自制 APP 粗品的肽含量为 21.64 mg/g。

1.2 饲养试验

1.2.1 试验动物的分组与处理

试验在华南农业大学试验鸡场进行,采用单因子完全随机化设计。试验动物选用 1 日龄健康无病的艾维茵商品代肉鸡 160 只,随机分成 4 组,每组各 40 只。逐只称重,并使各组鸡的初始重差异不显著。

1.2.2 基础日粮及添加方法

试验所用的基础日粮由广东正大康地有限公司提供。前期(1~25 日龄)日粮含 ME 12.91 MJ/kg、CP 23%;后期(26~44 日龄)日粮含 ME 12.90 MJ/kg、CP 21%(见表 1)。第 I 组为对照组,饲喂基础日粮;第 II~IV 组为试验组,分别在基础日粮中添加 APP 制品,添加量分别为每天每千克鸡体重 1.16、3.48 和 10.44 mg。APP 制品喷洒于少量日粮中,预混合后再与大量的日粮混合。添加期为 1~21 日龄。

表 1 试验基础日粮组成

项目	主要原料组成(%)					合计	主要营养成分			
	玉米	豆粕	鱼粉	油脂	添加剂		ME(MJ/kg)	CP(%)	Ca(%)	P(%)
前期	58.5	30	6	3.5	2	100	12.91	23	1.0	0.65
后期	63	28	4	3	2	100	12.90	21	0.9	0.6

1.2.3 饲养管理方法

地面铺设垫料,平养,鸡只自由采食及饮水。24 h 光照,1~20 日龄用红外线灯保温,并按鸡场常规免疫程序进行接种。每天观察鸡群的采食、饮水及健康状况,记录耗料量及死亡数。

1 日龄时,各组随机抽取 10 只鸡做翅号,以便日后固定采集血样。14 日龄开始,每隔 10 d,各组鸡逐只称重,称重前一天晚上断料,称重当日早上 9:00~11:00 将各组有翅号的鸡翅静脉采集血样 2 ml,肝素钠抗凝血,2 500 r/min 离心 15 min,收集上层血浆,-20 ℃ 保存。

1.3 试验测试指标

艾维茵肉鸡增重、饲料报酬和成活率。鸡血浆中甲状腺素(T₄)、三碘甲腺原氨酸(T₃)、生长激素(GH)和胰岛素(Insulin)含量的测定,采用放射免疫分析法(RIA)。I¹²⁵-T₄、I¹²⁵-T₃、I¹²⁵-GH 和 I¹²⁵-Insulin 测定试剂盒由天津九鼎医学生物工程有限公司提供,操作方法各按试剂盒说明书进行。

1.4 数据统计分析

各组间鸡的体重及血浆中 T₄、T₃、GH 和 Insulin 浓

度采用 Duncan's 检验,成活率采用两个样本百分数差异性检验。数据以平均值±标准差($\bar{X}\pm SD$)表示。

2 试验结果与分析

2.1 艾维茵肉鸡的增重情况(见表 2)

表 2 各组鸡不同日龄时的平均体重(g/只)

项目	1 日龄	14 日龄	24 日龄	34 日龄	44 日龄
I 组	43.3±2.7	311.8±26.9 ^a	681.8±55.6 ^a	1251.3±134.5 ^a	1921.7±243.8 ^a
II 组	43.0±3.2	345.2±27.2 ^b	772.8±58.4 ^b	1393.3±138.2 ^b	2113.5±253.2 ^b
III 组	43.3±3.5	321.8±30.5 ^{ab}	734.7±60.4 ^{ab}	1346.8±142.5 ^{ab}	2047.1±265.7 ^{ab}
IV 组	43.4±3.1	307.8±29.3 ^a	680.4±63.2 ^a	1239.7±153.4 ^a	1902.3±283.6 ^a

注:组间字母相同或不标者为差异不显著(P>0.05),组间字母不同者为差异显著(P<0.05)。以下各表同。

从表 2 中可见,1 日龄时,各组鸡平均体重差异不显著(P>0.05)。14~44 日龄试验结束时,第 II、III 组鸡平均体重均不同程度地高于对照组,其中第 II 组与对照组比较差异显著(P<0.05);第 IV 组的体重则与对照组相似。结果显示,饲喂 APP 制品可提高肉鸡增重,但并非以添加剂量越大效果越好,本试验以第 II 组 1.16 mg 添加量对肉鸡的增重效果较好。

2.2 艾维茵肉鸡料肉比和成活率(见表 3)

表 3 各组鸡不同日龄的料肉比、成活率

项目	料肉比				成活率		
	1~14 日龄	15~24 日龄	25~34 日龄	35~44 日龄	1~44 日龄	校正死亡数	校正成活率(%)
I 组	1.49	1.73	1.94	2.30	1.97	3	92.5
II 组	1.41	1.63	1.81	2.17	1.82	1	97.5
III 组	1.43	1.66	1.84	2.21	1.86	2	95
IV 组	1.53	1.79	1.99	2.37	2.05	2	95

表 3 反映了各组鸡的饲料报酬及成活率。整个试验期间,除第 IV 组的料肉比比对照组稍高之外,II、III 组料肉比均低于对照组,即饲料报酬高。表明 APP 添加剂量在 1.16~3.48 mg 范围内,饲料报酬有所改善。另外,从本次试验观察到,试验组鸡的成活率与对照组无明显的差异。

2.3 艾维茵肉鸡内分泌水平的测定结果

2.3.1 艾维茵肉鸡血浆 T₄、T₃ 的浓度(见表 4、表 5)

表 4 不同日龄鸡血浆 T₄ 的浓度(ng/ml)

项目	14 日龄	24 日龄	34 日龄	44 日龄
I 组	11.84±2.57(10) ^a	16.78±4.57(9) ^b	17.55±6.19(9) ^b	18.23±7.56(9) ^a
II 组	14.25±2.27(10) ^b	19.46±4.12(9) ^b	22.56±5.33(9) ^b	22.03±8.21(9) ^b
III 组	13.28±1.37(9) ^b	18.25±3.42(10) ^b	22.04±6.37(9) ^b	20.56±7.82(9) ^b
IV 组	12.57±4.36(10) ^a	17.65±5.26(10) ^a	19.18±7.51(10) ^a	17.59±5.27(8) ^a

注:括号内数据为样品数,以下各表同。

表 5 不同日龄鸡血浆 T₃ 的浓度(ng/ml)

项目	14 日龄	24 日龄	34 日龄	44 日龄
I 组	1.34±0.14(8)	1.26±0.07(8)	1.11±0.25(8)	0.96±0.31(8)
II 组	1.57±0.33(9)	1.42±0.15(9)	1.17±0.21(9)	1.01±0.28(8)
III 组	1.55±0.24(8)	1.32±0.10(8)	1.15±0.14(8)	1.00±0.21(8)
IV 组	1.31±0.30(8)	1.25±0.13(8)	1.10±0.22(8)	1.09±0.24(8)

从表 4 可见,整个试验期,对照组鸡血浆 T₄ 浓度在(11.84±2.57)~(18.23±7.56) ng/ml 范围。除第 IV 组在 44 日龄时血浆 T₄ 浓度稍低于对照组之外,不同试验期各试验组鸡血浆 T₄ 水平均不同程度地高于对照组,其中以第 II 组最为明显,显著地高于对照组(P<0.05);而第 III 组鸡血浆 T₄ 在后期也显著地高于对照组(P<0.05)。此外,各组鸡血浆 T₄ 浓度是随着鸡年龄的增长而递增的,但在试验结束时,除对照组外,I、II 稍有下降。

表 5 反映了各组鸡不同时期血浆 T₃ 浓度水平。对照组鸡血浆 T₃ 浓度在(0.96±0.31)~(1.34±0.14) ng/ml 之间波动。第 II、III 组鸡血浆 T₃ 浓度稍高于对照组,第 IV 组则与对照组相近,但各组间差异都不显著(P>0.05)。与 T₄ 浓度变化有所不同的是,各组鸡血浆 T₃ 浓度并不像 T₄ 一样随着鸡年龄的增长而上升,相反

却呈缓慢下降趋势。

2.3.2 艾维茵肉鸡血浆生长激素(GH)的浓度(见表 6)

表 6 不同日龄鸡血浆 GH 的浓度(ng/ml)

项目	14 日龄	24 日龄	34 日龄	44 日龄
I 组	1.85±0.20(9)	1.72±0.26(9)	1.63±0.15(10)	1.56±0.69(10)
II 组	2.25±0.25(9)	1.99±0.26(9)	1.85±0.18(10)	1.73±0.65(9)
III 组	2.03±0.17(8)	1.97±0.23(8)	1.82±0.21(10)	1.71±0.71(8)
IV 组	1.91±0.16(9)	1.78±0.15(8)	1.61±0.23(10)	1.53±0.37(8)

由表 6 可见,对照组鸡血浆 GH 浓度在(1.56±0.69)~(1.85±0.20) ng/ml 范围波动。整个试验期间,第 II、III 组鸡血浆 GH 浓度均稍高于对照组,而第 IV 组则与对照组相似,但各组间差异都不显著(P>0.05)。随着鸡年龄的增长,各组鸡血浆 GH 浓度呈缓慢下降的趋势,这可能与鸡的相对生长速度下降有关。

2.3.3 艾维茵肉鸡血浆胰岛素(Insulin)的浓度(见表 7)

表 7 不同日龄鸡血浆胰岛素的浓度(μIU/ml)

项目	14 日龄	24 日龄	34 日龄	44 日龄
I 组	6.22±1.30(9)	9.04±1.78(9)	12.54±3.25(9)	15.76±2.88(9)
II 组	5.85±0.58(9)	8.54±1.56(9)	12.66±2.73(9)	17.35±3.39(9)
III 组	6.72±0.93(8)	8.38±2.04(8)	12.05±2.14(8)	16.82±2.29(8)
IV 组	5.96±0.78(9)	7.91±0.91(10)	11.28±2.65(9)	14.53±3.57(10)

从表 7 可见,整个试验期,对照组鸡血浆胰岛素浓度在 6.22~15.76 μIU/ml 之间。尽管各试验组鸡血浆胰岛素浓度与对照组略有差异,但差异不显著(P>0.05)。此外,在不同的时期各组鸡血浆胰岛素浓度均随着鸡年龄的增长而呈明显上升趋势。

3 讨论

3.1 APP 的生理作用

胰多肽(PP)在哺乳动物方面研究较多,但在家禽方面的研究较少。现有的研究资料表明,APP 可通过中枢神经系统和其它途径直接或间接地参与鸡的采食、胃肠消化功能等的调控以及体内某些营养物质的代谢(Hazelwood R. L 等,1973; Kimmel J. R 等,1975、1978; Duke G. E 等,1985、1988; Denbow D. M 等,1988; 朱晓彤等,2002)。

本试验结果表明,给 1~21 日龄艾维茵肉鸡饲喂 APP 制品,能增强甲状腺的分泌功能,显著提高肉鸡

血浆 T_4 浓度和肉鸡的增重 ($P < 0.05$), 并改善饲料报酬; 而且 APP 对鸡只的作用和影响似与剂量有关。结果提示, APP 参与了鸡的胃肠消化功能的调控及体内某些营养物质的代谢, 这与上述 Duke G. E. 等的报道是相符的。

3.2 APP 制品对肉鸡甲状腺分泌 T_4 、 T_3 的影响

甲状腺激素是调节动物机体生长发育的重要激素, 甲状腺激素对生长发育的促进作用包括细胞体积的增大、数量增多和形态功能分化。APP 对甲状腺的影响目前文献报道较少。本试验给鸡饲喂 APP 制品的结果显示, APP 能促进甲状腺分泌 T_4 和 T_3 , 显著提高鸡血浆 T_4 的浓度 ($P < 0.05$), 鸡血浆 T_3 浓度也有明显提高的趋势 ($P > 0.05$)。而且与试验鸡增重情况是相符的, 这与代建国等 (2000) 和朱晓彤等 (2002) 报道的结果是相似的, 但在 APP 对鸡的作用时期及血浆 T_3 浓度差异显著性方面有所不同, 可能与试验条件不同有关。

此外, 从本次试验检测鸡血浆 T_4 和 T_3 水平变化的结果发现, 鸡血浆 T_4 水平随鸡年龄的增长而明显上升, 而鸡血浆 T_3 水平则呈缓慢下降趋势, 即鸡血浆 T_4 和 T_3 并非是平行波动的。结果提示, 在促进鸡后期的生长发育方面, 似乎以 T_4 的作用为主, 这与 Scanes C. G. 等 (1986) 的报道相似。

3.3 APP 制品对肉鸡腺垂体分泌生长激素(GH)的影响

GH 对促进机体骨骼的生长及蛋白质、脂肪等营养物质的代谢有重要的影响, 是促进机体生长发育的主要激素。本次试验在添加 APP 制品期间, 试验 II、III 组鸡血浆 GH 浓度比较明显地高于对照组 ($P > 0.05$), 停止添加后, 仍然稍高于对照组, 这与试验鸡的增重结果是一致的。这一结果与代建国等 (2000) 和朱晓彤等 (2002) 的报道相似, 但在血浆 GH 浓度差异显著性方面不同。此外, 本试验结果与 McDonal J. K. 等 (1985) 采用 APP 对摘除卵巢大鼠的第三脑室进行注射的方法获得血浆 GH 浓度显著提高的结果也有所差异。鉴于此类研究工作较少, 试验诸多条件不同, 所得结果也有差异, 有待于进一步研究证实。

3.4 APP 制品对肉鸡胰腺分泌胰岛素的影响

胰岛素是调节糖代谢的主要激素, 对脂肪和蛋白质也有多方面的调节作用; 它促进三大营养物质的合成, 在机体内以不同形式储存。本试验结果表明, 给鸡饲喂 APP 制品, 添加试验组鸡血浆胰岛素浓度稍低于对照组 ($P > 0.05$), 而停止添加后, 试验组鸡血浆胰岛素恢复到对照组水平, 但增重 (II、III 组) 都比对

照组的大, 提示 APP 可能直接或间接地参与了机体内糖等营养物质的代谢。这与 Hazelwood R. L 等 (1973) 和 McCumbee W. D 等 (1977) 人的观点是一致的; 但与曲瑞瑶等 (1984) 经兔侧脑室注射牛 PP 增加了兔糖耐量和血浆中胰岛素浓度的结果不同。Sun Y. S 等 (1986) 采用大鼠的试验结果显示, 牛 PP 可能通过增强肝葡萄糖对胰岛素的反应而影响糖的代谢。这些试验结果的差异可能与实验动物及方法等条件不同有关。

3.5 APP 在家禽生产中应用的可行性

以往的研究认为, 饲料中的蛋白质和多肽必须在胃肠道分解为氨基酸才能被吸收, 而肽类物质只有在其结构完整的前提下才能发挥作用, 这一理论限制了活性肽的研究和应用。近年来多数的研究表明, 小肽可由肠道直接吸收, 某些肽进入肠壁的速度比游离氨基酸快、载体不易饱和而且耗能少 (Webb K. E 等, 1990、1992; Jensen L. S 等, 1993)。现有的文献报道表明, APP 是一种具有特殊生理功能的小分子活性肽 (Hazelwood R. L 等, 1973; Kimmel J. R 等, 1975; Adamo M. L 等, 1992)。因此, 推测其是可能通过肠道吸收的。我们的试验结果也反映了 APP 的作用。

因此, 在发展家禽生产中, 将 APP 作为一种生理营养调节剂添加于饲料中, 以提高肉鸡的生产性能及经济效益, 我们认为是可行的, 具有现实的意义。目前, 国外已有氨基酸合成的 APP 产品, 随着生物技术的不断发展, APP 的生产成本必将不断降低; 同时, 肉鸡加工厂有大量废弃的胰腺组织, 若能充分地提取利用, 作为 APP 的丰富来源, 将会给家禽生产中的实际应用带来广阔的前景。

4 小结

在肉鸡饲料中添加一定量的 APP 制品, 可促进肉鸡甲状腺发育及甲状腺激素的分泌, 显著提高鸡血浆 T_4 的浓度, 并使血浆 T_3 和 GH 浓度有升高的趋势; 可显著地促进鸡只的增长, 并改善饲料报酬。APP 的作用与剂量有关, 添加剂量过高, 反而会抑制机体的内分泌活动及生长发育; 本试验中适宜添加量为每天每千克体重 1.16 mg。其作用机理可能是 APP 通过中枢神经系统或其它途经参与了鸡的腺垂体、甲状腺以及胃肠消化分泌功能的调控, 并直接或间接地参与机体内某些营养物质的代谢, 而促进鸡只的生长发育。APP 可作为一种生理营养调节剂, 添加于饲料, 在家禽生产中应用。

(参考文献 21 篇, 刊略, 需者可函索)

(编辑: 刘敏跃, lm-y@tom.com)

脂肪酸对基因表达的影响及调控

徐盛玉 吴德

摘要 脂肪酸是一类重要的营养物质,是动物体内的能量来源,同时也是生物膜的组成成分,在细胞生化过程中也同样起着重要作用。研究发现,脂肪酸可通过对基因表达的影响,对代谢、生长发育以及细胞分化发挥重要的调控作用。真核生物基因表达的调控大致可分为转录前、转录、转录后、翻译和翻译后等5个阶段的调控。脂肪酸通过细胞膜受体信号途径和转录因子活化途径调节基因表达,而多不饱和脂肪酸主要从基因转录和 mRNA 的稳定性两个方面调节基因表达。文章综述了脂肪酸,尤其是多不饱和脂肪酸对基因表达的影响及调控机制。

关键词 脂肪酸;多不饱和脂肪酸;基因表达;调控

中图分类号 Q344⁺.13

Effect and regulation of fatty acid in gene expression

Xu Shengyu, Wu De

Abstract Fatty acids are a kind of important nutrients, which has been recognized as important energy source and biological membrane components and it's also important in the process of cell biochemistry reaction. Researches indicated that from affecting gene expression, the fatty acids could have important regulation effects on metabolism, growth and cell differentiation. Regulation of eukaryote gene expression divided to 5 levels: pre-transcription, transcription, post-transcription, translation and post-translation. Fatty acids regulate gene expression by the way of signal of cellular membrane receptor and of transcription factor activation. Polyunsaturated fatty acids regulate gene expression in the two level of genetic transcription and stability of mRNA. This paper overviews the effects and the regulation mechanism of gene expression of fatty acids especially the polyunsaturated fatty acid.

Key words fatty acid; polyunsaturated fatty acids; gene expression; regulation

20世纪80年代,人们发现脂肪酸作为一种基因表达的调控物可以直接和独立地调控基因表达,尤其是n-3和n-6系列的多不饱和脂肪酸(PUFA)与基因调节之间的关系最为密切。近年来的研究发现,脂肪酸可以调控一些编码代谢关键酶的基因表达,对脂肪酸的生化合成和氧化起独特的调控作用。这充分说明了脂肪酸不仅是供能物质和生物膜的重要组成部分,而且可通过细胞膜受体信号途径和转录因子活化途径调节基因表达而发挥重要的生理功能。本文综述了脂肪酸对基因表达调控的机制,旨在通过脂肪酸对基因的表达调控机制给人们对其它脂类的功能和作用机制的深入研究提供参考。

徐盛玉,四川农业大学动物营养研究所,625014,四川省雅安市新康路46号。

吴德(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-13

1 脂肪酸

脂肪酸是由碳、氢、氧三种元素组成,一端含有一个羧基的长脂肪族碳氢链的一类化合物,脂肪酸是最简单的一种脂,也是中性脂肪、磷脂和糖脂的主要成分^[1,2]。在组织和细胞中,绝大部分的脂肪酸是作为复合脂类的基本结构成分而存在的,以游离形式存在的脂肪酸含量极少。从动物、植物、微生物中分离出的脂肪酸已有百种以上。不同脂肪酸之间的区别主要在于碳氢链的长度及不饱和双键的数目和位置。根据碳链长度的不同,可将脂肪酸分为短链、中链及长链脂肪酸。依据饱和度的不同,又可分为饱和脂肪酸(Saturated fatty acid, SFA)和不饱和脂肪酸(UFA),其中不饱和脂肪酸又分为单不饱和脂肪酸(Monounsaturated fatty acid, MUFA)及多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)^[3,4]。

多不饱和脂肪酸又可分为n-3和n-6系列。亚油酸(linoleic acid, LA)和亚麻酸(α -linolenic acid, α -

LNA)分别是 n-6 和 n-3 脂肪酸系列中的“母体”,是动物必需脂肪酸。LA 主要来自于玉米油、芝麻油、葵花籽油和红花油等,去饱和及碳链延长而演变产生花生四烯酸(arachidonic acid 20:4, n-6, 简称 AA); α -LNA 主要来自于大豆油、亚麻籽油、低芥酸菜籽油,去饱和及碳链延长可以转化为二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid 20:5, n-3, 简称 EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid 22:6, n-3, 简称 DHA),深海鱼及鱼油中富含这两种 PUFA。而 AA、EPA 和 DHA 是类二十碳烷酸(主要包括前列腺素、白三烯等)的前体^[5,6]。

2 基因表达及其表达调控

2.1 基因表达

所谓基因表达,是指按基因组中特定的结构基因所携带的遗传信息,经转录、翻译等一系列过程,指导合成特定氨基酸序列的蛋白质而发挥特定生物学功能的过程^[7]。

2.2 基因表达调控的基本理论

真核基因的表达是一个多阶段过程,因此,真核基因表达调控也是通过多阶段水平来实现的,其大致可分为转录前、转录、转录后、翻译和翻译后等 5 个阶段。

2.2.1 转录前调控

转录前调控是指发生在基因组水平上基因结构的改变。这种调控方式较稳定持久,甚至有些是不可逆的,主要见于机体发育过程中体细胞的分化。其调控方式主要包括:基因丢失、基因扩增、基因重排、甲基化修饰及染色体结构改变等^[7]。

2.2.2 转录阶段调控

转录阶段调控是指以 DNA 上的特定基因为模板,合成初级转录产物这一过程的调节。转录阶段的调控是真核基因表达中最重要的一环,主要涉及以下 3 种因素的相互作用:①RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAPol),真核生物的 RNA 聚合酶有 3 种,即 RNA 聚合酶 I、II、III;②顺式调控元件(cis-acting element),是与结构基因串联的特定的 DNA 序列,它们对基因转录的精确起始和活性调节起着举足轻重的作用,顺式调控元件一般含有蛋白结合位点;③反式作用因子(trans-acting factor)又称为反式作用转录因子,是由位于不同染色体或同一染色体上相距较远的基因编码的蛋白质因子。反式作用因子与顺式调控元件相结合,从而调节基因表达^[7,8]。

2.2.3 转录后阶段的调控

真核基因转录后,必须经过一系列的加工过程才能成为成熟的 mRNA,对此过程的调节,称为转录后水平的调控。其调控方式主要包括戴“帽”、加“尾”、拼接(splicing)等。

2.2.4 翻译阶段的调控

翻译过程主要涉及 mRNA、tRNA、核糖体和可溶性蛋白因子四大类物质,其中可溶性蛋白因子可分为肽链起始因子、肽链延长因子和肽链终止因子等。翻译水平的调控主要涉及以下环节:①对 mRNA 从细胞核迁移到细胞质过程的调节。②对 mRNA 稳定性的调节。许多因素可影响 mRNA 稳定性,从而影响作为翻译模板的 mRNA 的数量,最终影响蛋白质表达的数量。③对可溶性蛋白质因子的修饰。主要是通过磷酸化作用对肽链起始因子、延长因子和终止因子进行修饰,从而影响翻译效率。④对特异 tRNA 结合特异氨基酸运输至 mRNA 过程的调节^[9]。

2.2.5 翻译后阶段的调控

蛋白质合成后,还需经过一系列的加工过程才能成为有活性的功能蛋白质,包括切除信号肽、磷酸化、糖基化、乙酰化等化学修饰,以及蛋白质切割后的连接等。

了解基因表达及调控的一些基本理论,对于理解脂肪酸及多不饱和脂肪酸是如何对基因表达起调控作用是非常必要的。

3 脂肪酸对基因表达的影响及调控

3.1 脂肪酸对部分基因表达的影响

到目前为止,已发现多种基因表达受到 PUFA 的调节,如对编码脂肪酸合成酶(FAS)、糖酵解酶、L-丙酮酸激酶(UK)和白细胞介素等的基因表达的抑制,以及对编码脂肪酸氧化酶的基因表达的诱导^[9]。摄入脂肪酸的类型、数量和持续时间决定了其具有不同的生理作用。许多学者研究表明,PUFA 能有效地调控脂肪组织中多种基因的表达。Clarke 认为,日粮中脂肪酸对 FAS 基因转录的抑制能力与脂肪酸的碳链长度、双键位置和双键的数量有关,并且还存在着剂量依赖性,尤其 n-3 和 n-6 系列 PUFA 对基因表达调控效果显著^[10]。

3.1.1 脂肪酸对 CPT I 和 HMG-CoA 合成酶基因表达的影响

体内的脂肪酸是不能够直接进入细胞进行氧化

作用的,必须先转化为脂酰 CoA 后,再经由肉碱棕榈酰转移酶(含有 CPT I 和 CPT II 2 种不同形式的酶)的转运才能够进入肝脏细胞进行氧化。在脂肪酸氧化过程中,存在生成酮体的一个途径,这个途径在体内很重要,可以节约动物机体葡萄糖的使用。在此途径中, HMG-CoA(3-羟基-3-甲基-戊二酰 CoA)合成酶是其限速酶,发挥重要的作用。长链脂肪酸可以调节肝细胞中 CPT I (肉碱棕榈酰转移酶 I)和 HMG-CoA 合成酶的基因表达,使其 mRNA 的水平提高 2~4 倍^[11,12]。在各种脂肪酸中,多不饱和脂肪酸对基因表达的控制更为明显。与棕榈酸(饱和)和油酸(单不饱和)相比,亚麻酸(多不饱和)使 CPT I 的 mRNA 水平提高 2 倍,将其半衰期延长 50%。所以,动物出生后吸收大量的脂肪可使肝脏线粒体中 HMG-CoA 合成酶基因的转录加强^[13]。

3.1.2 脂肪酸对脂肪合成酶基因表达的影响

脂肪酸,尤其是多不饱和脂肪酸,能抑制生脂基因的转录,同时又能诱导编码脂质氧化和生热蛋白的基因进行转录。PUFA 抑制的生脂基因包括脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase, FAS)基因, S14 基因等许多参与脂质合成的基因^[14]。Clarke 等(1990)研究发现,饲料中多不饱和脂肪酸使大鼠肝脏中 FAS 的 mRNA 水平降低了 75%~90%,鱼油比红花油更有效。Nobuko 等(1998)在培养的肝细胞中添加紫苏子油(富含多不饱和脂肪酸),FAS、ACC (乙酰 CoA 羧化酶)、ATP-CL (ATP 柠檬酸裂解酶)等的 mRNA 丰度显著降低^[15,16]。

3.1.3 PUFA 对脂肪氧化有关酶基因表达的影响

脂肪酸在体内的氧化分解是从羟基端 β -碳原子开始的,碳链逐个断裂,每次产生一个二碳单位,即乙酰 CoA,这就是 β -氧化学说。脂肪酸在氧化分解之前,首先必须在胞液中活化为脂酰 CoA,脂酰 CoA 需进入线粒体内进行氧化分解。脂酰 CoA 或是游离的脂肪酸都不能直接通过线粒体内膜进入线粒体,需借助肉碱(一种小分子的脂酰载体)。在线粒体内膜两侧存在肉碱脂酰转移酶,催化脂酰基于肉碱之间的转移反应,肉碱脂酰转移酶是脂肪酸 β -氧化的主要限速酶。

Wilson 等(1990)的研究表明,PUFA 具有抑制肝脏丙二酰 CoA 的量的作用,丙二酰 CoA 是肉毒碱棕榈酰转移酶的负代谢调控因子,丙二酰 CoA 的减少有利于脂肪的氧化分解。Krey 等(2000)研究表明,

PUFA 可以直接激活过氧化物酶体增殖剂激活受体 α (PPAR α),但 PUFA 的代谢产物二十烷类和氧化脂肪酸对 PPAR α 的影响更强,并且它对 PPAR α 依赖型基因的作用更大。PPAR α 是类固醇受体中的一员,与族中其它受体一样具有一个 DNA 结合域和一个配体结合域。它可以调整基因表达,使肝脏脂肪酸氧化^[17]。Latruffe 研究表明,PPAR α 是长链脂肪酸 β -氧化所需的一种物质,它对过氧化物酶体乙酰 CoA 氧化酶、烯酰 CoA 水合脱氢酶和硫解酶都具有诱导作用^[18]。事实上 PPAR α 调控脂质的动态平衡,它的转录活性受类脂化合物浓度改变的影响,而且 PUFA、二十烷类化合物和降血脂药物是 PPAR α 的配合体,可以间接影响动物的脂肪代谢^[19]。

3.2 脂肪酸对基因表达调控可能存在的几种途径

3.2.1 G 蛋白相关细胞表面受体途径

脂肪酸在线粒体和微粒体发生多步骤氧化反应,产生花生四烯酸、前列腺素、血栓素和白三烯等,这些生物活性物质可通过自分泌和旁分泌作用于细胞表面的 G 蛋白偶联受体,活化 G 蛋白,使细胞内 cAMP 和钙离子浓度发生改变,作为第二信使活化信号机制,使转录因子功能上调。

3.2.2 PPAR 途径

PPAR 存在几种不同的亚型,分别为 PPAR α 、PPAR δ 及 PPAR γ_1 和 PPAR γ_2 ,有 3 种独立的基因编码 3 种不同的 PPAR(α 、 δ 、 γ)。PPAR γ_1 和 PPAR γ_2 来自于同一基因,由于 PPAR γ 基因有两个启动子,按照上游转录起始点的不同,又通过不同的剪接,所以产生了 PPAR γ_1 和 PPAR γ_2 。这些不同亚型又统称为 PPARs。PPARs 的结构与类固醇-甲状腺超级基因核受体家族的成员相似,由于能被过氧化物酶体增殖剂如氯贝酸、降脂萘、WY14643 等激活,故被称为过氧化物酶体增殖剂激活受体。PPARs 的不同亚型在组织中分布不同,并且受不同的配体激活,因此具有不同的生理功能^[20]。例如,PPAR α 在肝细胞、心肌细胞、肾近端小管细胞和肠细胞中表达;PPAR δ 比 PPAR α 表达的范围广;PPAR γ 在脂肪细胞、脾细胞、肾细胞、造血细胞、结肠上皮细胞、前列腺上皮细胞和乳腺上皮细胞中表达,可诱导细胞分化。

根据 PPARs 开放阅读框推测出的氨基酸序列表明,其结构上有激素受体的特征,即一个配体结合区和一个锌指 DNA 结合区。配体结合区是与脂肪酸等

配体结合的部分,配体与受体的这种结合可活化受体(即 PPARs);DNA 结合区是与基因上的 DNA 特异反应元件相结合的部分,通过这种特异性结合调节基因转录。已发现编码许多酶(微粒体酰基辅酶 A 氧化酶、肉碱软脂酰转移酶、脂酰 CoA 合成酶、线粒体 HMG-CoA 合成酶、脂蛋白脂肪酶和脂肪酸结合蛋白)的基因上都存在 PPARs 反应元件(PPAR-REs)。PPAR-REs 的特征是 5' 端侧翼区有一个直接的重复序列 -1(direct repeat-1, Dr-1), 即 AAC-TAGNCAAAGTCA。另外,PPARs 常与类维生素 A 的 X 受体(retinoid X receptor, RXR)形成异源二聚体,共同作用于 PPAR-REs。当 PPARs 与 RXR 形成异源二聚体时,可增加 PPARs 与 PPAR-REs 的结合能力^[21,22]。另外,PPARs 与 PPAR-REs 的结合,还需要类固醇受体辅助激活剂-1(steroid receptor co-activator-1, SRC-1)和 PPAR-结合蛋白(PPAR-binding protein, PBP)等辅助激活因子的共同参与。因此,脂肪酸调节基因转录的途径为:

脂肪酸(其代谢产物) → PPARs $\xrightarrow{\text{RXR 参与下}}$ PPARs-RXR
 异源二聚体 $\xrightarrow{\text{SRC-1/PBP}}$ PPAR-REs → 基因表达(或↓)

3.2.3 其它转录因子途径

脂肪酸还可通过调节 HNF-4 α 、NF- κ B 和 SREBP-1c 等转录因子活性,从而调节基因表达。

4 结语

脂肪酸既在细胞表面信号传导中有着重要作用,又在细胞生化过程中起着同样重要的作用。脂肪酸可通过与 G 蛋白相关细胞表面受体途径和转录因子 PPAR 活化途径调节基因表达等而发挥重要的生理功能。

多不饱和脂肪酸对基因的表达调控可以在转录水平和 mRNA 的稳定性两个方面进行调节。多不饱和脂肪酸对基因表达调控至少存在两种机制:一种为 PUFA-PPAR 依赖性机制;另一种为 PPAR 非依赖性或 PUFA 特异性机制,即通过效应因子来调控基因表达的 PPAR 非依赖性机制。

参考文献

- 唐传核,徐建祥,彭志英.脂肪酸营养与功能的最新研究[J].中国油脂,2000,25(6):20~23
- 杨凤主编.动物营养学.北京:中国农业出版社,2000
- 何欣.动物营养与饲料.北京:中央广播电视大学出版社,2003
- 姚军虎.动物营养与饲料.北京:中国农业出版社,2001
- Kinsella J E. α -linolenic acid: function and effects on linolenic acid metabolism and eicosanoid-mediated reaction[J].Adv.Food Nutr.Res., 1993,35(1):176~184
- 郑宗林,黄朝芳,王蒙. n-3 多不饱和脂肪酸营养研究进展[J].饲料博览,2001(9):36~38
- 王镜岩,朱圣庚,徐长法主编.生物化学.北京:高等教育出版社,2002
- 孙长颖.分子营养学(上)[J].国外医学卫生学分册,2004,31(1):1~5
- Gustafsson J A.Fatty acids in control of gene expression [J]. Nutr. rev., 1998, 56:20~21
- Clarke S D, Jump D B. Dietary polyunsaturated fats uniquely suppress rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA cotent [J]. Nutr, 1993,120:225~231
- F Chatelain, C Kohl, V Esser, et al. Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyl transferase I gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes [J]. European Journal of Biochemistry, 1996, 235: 789~798
- 于昱,袁纭.多不饱和脂肪酸的营养研究.中国饲料,2003,24:21~23
- 吴国豪.分子营养学的研究及进展.中国实用外科杂志,2004,24(1):13~15
- 熊文中.饲料中脂肪酸对动物脂肪合成酶及其基因表达的影响[J].饲料研究,1998(1):11~14
- Nobuko Iritani, Masumi Komiya, Hitomi Fukuda, et al. Lipogenic Enzyme Gene Expression Is Quickly Suppressed in Rats by a Small Amount of Exogenous Polyunsaturated Fatty Acids [J]. Nutr.,1998,128:967
- Clarke S D, Hembree J. Inhibition of Triiodothyronine's induction of rat liver lipogenic enzymes by dietary fat.J.Nutr.1990,120:625~630
- Sander Kersten, Josiane Seydoux, Jeffrey M. Peroxisome proliferator-activated receptor mediates the adaptive response to fasting [J]. J Clin Invest, 1999,103:1 489~1 498
- Latruffe N, Hassell S J. Peroxisomes: biochemistry, molecular biology and genetic diseases—a video programme for teaching students [J]. Biochem Educ, 2000,28(3):136~138
- Jump D B, Clarke S D. Regulation of gene expression by dietary fat [J]. J. Annul. Rev. Nutr.,1999,19:63
- 赵法及,郭俊生.分子营养学概述.营养学报,2006,28(1):1~3
- Xu Jing, Margarita Teran-Garcia, Jung H Y, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulation element binding protein-1 expression by acceleration transcript decay [J]. Biol. Chem., 2001,276:9 800~9 807
- Nakamura M T, Cho H P, Clarke S D. Regulation of delta26 desaturase expression and its role in the polyunsaturated fatty acid inhibition of fatty acid synthase gene expression in mice [J].Nutr., 2000,130: 1 561~1 565

(编辑:张学智, mengzai007@163.com)

牛磺酸对动物免疫功能的影响

曾得寿 黄冠庆 高振华 吴秋小

摘要 牛磺酸具有广泛的生物学效应,是调节正常生理功能的重要物质。文章从免疫器官发育、免疫细胞、抗体和细胞因子以及抗炎症反应等方面重点讨论牛磺酸对动物免疫功能的影响。

关键词 牛磺酸;免疫;淋巴细胞;抗体

中图分类号 S852.4

牛磺酸(taurine)化学名为2-氨基乙磺酸,其结构式为 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ 。牛磺酸又名牛黄酸、牛胆酸、牛胆碱、牛胆素,因1827年首次从牛胆汁中分离出来而得名。牛磺酸在哺乳动物的脑、心、肝、肾、视网膜、骨骼肌和白细胞等组织器官中含量丰富,是体内含量最高的游离氨基酸。牛磺酸不是蛋白质的组成成分,却是一种条件性必需氨基酸,它不仅作为一种营养物质参与机体的生长代谢,而且参与维持机体的免疫功能,对神经、消化、生殖、心血管、免疫和内分泌等生理功能的正常发挥具有重要的调节作用。

1 牛磺酸的来源与代谢

1.1 牛磺酸的来源

机体牛磺酸的来源有两种:一种是通过自身合成,另一种是从膳食中摄取。在哺乳动物体内,牛磺酸的生物合成主要通过半胱亚磺酸脱羧酶(cysteine sulfinic acid decarboxylase,CSAD)的作用,由蛋氨酸和半胱氨酸代谢的中间产物半胱亚磺酸经脱羧形成亚牛磺酸,再经氧化获得。肝、脑、心是合成的主要器官。一般认为CSAD是哺乳动物生物合成牛磺酸的限速酶,其活力反映了生物合成牛磺酸的能力。CSAD活力在不同动物种属间及同一动物的不同组织间、不同生长阶段都有很大差异。幼年动物体内合成牛磺酸不足,需从食物中补充。

1.2 牛磺酸的代谢

牛磺酸相对分子量小,无抗原性,各种给药途径均易吸收。肾脏是排泄牛磺酸的主要器官,它可以依据机体的需要和膳食中牛磺酸的含量调节体内牛磺酸的含量。当体内牛磺酸过量时,多余部分随尿排出;

牛磺酸不足时,肾脏通过重吸收减少牛磺酸的排泄,以此维持体内牛磺酸的平衡。牛磺酸在动物体内主要有以下4种代谢途径:①生成牛磺胆酸。牛磺酸在肝脏中和胆酸生成牛磺胆酸,并随胆汁排出到消化道中,可促进脂肪及脂溶性维生素的消化吸收。②生成氨基甲酰牛磺酸(牛磺脲酸)。牛磺酸在肝脏中经转氨基、甲酰基作用生成氨基甲酰牛磺酸,其具体功能尚不清楚。③生成脘基牛磺酸。牛磺酸接受精氨酸的胍基,在ATP-脘基转移酶催化下生成脘基牛磺酸,然后磷酸化生成磷酸脘基牛磺酸,它在低等动物中可作为一种磷酸源,参与机体的能量代谢。④生成乙基硫氨酸。乙基硫氨酸是牛磺酸分解为硫酸的中间产物,具有与牛磺酸一起调节离子生物膜的转移作用。

2 牛磺酸对动物免疫功能的影响

对大鼠、家禽、猪、猫、兔、鱼类等的研究表明,牛磺酸能促进脂肪和脂溶性物质的消化吸收,促进糖类、蛋白质和矿物质元素的代谢,并且作为抗氧化剂和膜稳定剂保护机体细胞(Kim等,1996),以及对神经、内分泌、生殖等系统进行调节(Chen等,1998;何天培等,2000;肖世平等,1997)。临床上,牛磺酸被广泛用来治疗动脉粥样硬化、支气管炎、急(慢)性肝炎、脂肪肝、心力衰竭、高血压、糖尿病等疾病,以及添加到动物饲料中防止鱼类、猫、狗等动物的疾病,使得牛磺酸不仅作为一种营养物质参与机体的生长代谢,而且间接地参与维持和改善机体的免疫功能,牛磺酸对机体的免疫功能有重要影响。

2.1 牛磺酸对免疫器官发育的影响

胸腺、脾脏是动物的主要免疫器官,参与机体的体液免疫和细胞免疫;法氏囊是家禽特有的体液免疫中枢器官。胸腺指数、法氏囊指数和脾脏指数反映了机体3个主要免疫器官的生长发育程度,是从免疫器官发育的角度评价机体免疫状态的主要指标。牛磺酸是猫的必需氨基酸,因而猫是研究牛磺酸理想的动物

曾得寿,广东海洋大学农学院,524088,广东湛江主校区24#。

黄冠庆、高振华(通讯作者)、吴秋小,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-27

模型。Schuller 等(1990)研究发现,猫缺乏牛磺酸时,其脾脏缩小变硬,包膜增厚并呈灰白色。镜检发现主要是 B 淋巴细胞区受损,随着网状细胞的耗竭,滤泡中心发生退化,网状基质增生,网状内皮细胞的吞噬功能下降。淋巴结的副皮质区内主要是小的、比较成熟的淋巴细胞,偶见免疫母细胞和浆细胞,并且还伴随轻微的血管外溶血。田庆伟等(1999)报道,添加适量的牛磺酸后,两个年龄小鼠牛磺酸组脾脏指数与各自对照组相比,差异均显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$);胸腺指数的增加仅见于幼龄鼠各牛磺酸组;不同鼠龄各对应剂量组相比较,老龄鼠胸腺、脾脏指数均呈现明显减小($P<0.001$)。何天培等(1995)报道,在肉仔鸡日粮中添加 0.1% 的牛磺酸,显著地提高了 3 周龄时肉仔鸡法氏囊和脾脏的相对重量,对胸腺的相对重量未见显著影响。

2.2 牛磺酸对免疫细胞的影响

2.2.1 牛磺酸对淋巴细胞的保护作用

牛磺酸在淋巴细胞中的含量占整个游离氨基酸的 50%。牛磺酸在末梢血液淋巴细胞中的含量是血浆中的 12 倍,在非粘着性淋巴细胞中的含量是血浆中的 35 倍,在粘着性淋巴细胞中的含量是血浆中的 20 倍,而 B 细胞中牛磺酸含量也是血浆中的 8~23 倍 (Porter 等,1991)。但是淋巴细胞合成牛磺酸的能力有限,主要从血浆中摄取牛磺酸以维持其胞内的浓度。研究证明,人淋巴细胞转化来的成淋巴细胞株中,存在着牛磺酸的主动转运系统。刘武(1990)研究发现,虽然在无牛磺酸培养基中体外培养淋巴细胞能够存活和增殖,但随着细胞内牛磺酸的逐步耗尽,细胞存活率和增殖率均下降,而加入牛磺酸后细胞内牛磺酸含量恢复,增殖率也升高,且牛磺酸浓度和细胞增殖间存在剂量对应关系,并在 0.1 mol/l 时达到最大值,此浓度恰好相当于正常培养的人血浆中牛磺酸的浓度。以上试验说明牛磺酸对淋巴细胞具有保护作用,这种保护作用主要是因为牛磺酸具有稳定细胞膜,保护细胞膜磷脂免受降解,对抗膜通透性变化能力增强,防止细胞肿胀变形,从而减少了细胞的死亡。牛磺酸对细胞膜的保护作用是通过其分子中的氨基与有害因子相互作用,抵抗 Na^+ 、 Cl^- 等渗透性细胞膜离子和水的转移,维持渗透平衡,保护细胞膜(李金芳等,2006)。

2.2.2 牛磺酸对淋巴细胞增殖的影响

Kuriyaman 等研究报道,牛磺酸能够使 DBA/2 小鼠脾脏的 DNA 合成增加近 4 倍,从而促进淋巴细胞

的增殖,但牛磺酸并不能使其胸腺细胞 DNA 合成增加,因此牛磺酸仅对脾脏成熟的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞起到增殖的作用。也有学者认为,牛磺酸改善 T 淋巴细胞增殖是由于细胞中钙离子摄入增多,使其活性增加,T 淋巴细胞增殖力也随之增强。据报道,长期用缺乏牛磺酸的食物喂猫会引起 B 淋巴细胞区出现成熟和不成熟淋巴细胞,T 淋巴细胞区动脉周围出现淋巴细胞耗竭,并发生轻微的进行性血管外溶血。因此,在牛磺酸缺乏的雌猫所生的幼猫中,因其抗感染能力受损而使化脓性关节炎的发病率增高(刘晓军等,1997)。牛磺酸还可改善白细胞介素-2(IL-2)免疫疗法引起的淋巴细胞减少症,进而增进免疫疗法的潜力(Maher 等,2005)。也有报道牛磺酸可以非种属特异性方式抑制淋巴细胞增殖,并且这种作用是双重的,既能抑制 T 淋巴细胞的作用,又能减轻 T 淋巴细胞对血管内皮细胞的损伤(Finnegan 等,1998)。

2.2.3 牛磺酸对中性粒细胞功能的影响

中性粒细胞是血液中的主要吞噬细胞,具有高度的移动性和吞噬功能,在防御感染和促进炎症反应中起重要的作用。中性粒细胞中含有大量的牛磺酸,占其所有游离氨基酸的 76%,这种高含量可能与牛磺酸作为氧化物清除剂而保护细胞有关。中性粒细胞通过产生次氯酸发挥抗细菌、真菌和病毒的作用,但次氯酸产生过多则会破坏中性粒细胞本身,而牛磺酸与次氯酸反应,生成更加稳定但毒性较弱的牛磺氯胺(Tau-Cl),从而清除次氯酸的氧化作用,使细胞免受攻击。牛磺酸还能被中性粒细胞释放到胞外的组织液及血液中,保护组织液和血液免受卤化物氧化剂的杀伤。

Schuller 等(1990)研究发现,长期用缺乏牛磺酸的食物喂猫所引起的一系列机体失调与免疫系统的变化有关;与添加牛磺酸组相比,对照组白细胞总数显著减少,多形核白细胞和单核白细胞百分比发生变化,单核白细胞绝对数量增加;同时白细胞的沉降特性也发生改变,中性粒细胞的功能明显降低,多形核白细胞发生呼吸链中断,并且对表皮葡萄球菌的吞噬功能和细胞内杀灭作用均明显减弱,血清 γ -球蛋白水平显著升高,揭示牛磺酸缺乏可能影响其它免疫细胞。当给 Wistar 大鼠饮用含牛磺酸的水 3 周后,中性粒细胞内牛磺酸浓度明显上升,吞噬艾希氏大肠杆菌的能力增强,中性粒细胞膜的流动性和稳定性也有增强。以上结果都说明牛磺酸对中性粒细胞的防御机制

起着重要作用。

2.2.4 牛磺酸对红细胞免疫功能损伤的治疗作用

研究表明,红细胞具有识别抗原,清除血液循环中的免疫复合物,免疫粘附细菌、病毒及肿瘤细胞,效应细胞样作用及免疫调节等重要免疫功能。红细胞膜上存在 C3b 受体,正常情况下,红细胞通过其膜上 C3b 受体的免疫粘附功能,将免疫复合物(CIC)粘附在红细胞膜上携带至肝脏等处,经巨噬细胞系统吞噬并分解,有效地清除血液循环中的 CIC,防止 CIC 沉积在某些敏感部位而引起的炎症等疾病。薛承斌等(2005)报道,补充牛磺酸可以提高铅中毒大鼠红细胞免疫功能损伤的红细胞 C3b 受体花环率和调节红细胞膜 C3b 受体活性,使红细胞清除血液中 CIC 的能力升高,增强红细胞免疫功能。

2.3 牛磺酸对细胞因子的影响

细胞因子是免疫细胞受抗原或丝裂原刺激后产生的非抗体、非补体的具有激素活性的蛋白质分子,在免疫应答和炎症反应中有多种生物学活性作用。据报道,牛磺酸可明显减弱由自然杀伤细胞介导的重组白细胞介素-2(rIL-2)活化的内皮细胞毒性而不降低 rIL-2 抗肿瘤反应;同时降低淋巴因子活化杀伤细胞介导的内皮细胞溶解。牛磺酸可以诱导巨噬细胞产生白细胞介素-1(IL-1),其具有生物活性,可以促进 DBA/2 小鼠胸腺细胞的增殖。牛磺酸还可以通过 IL-1 的正向调节,增加 γ -干扰素(IFN- γ)的产生,但它不能诱导小鼠脾脏细胞产生白细胞介素-2(IL-2)。邢颖等(2005)报道,牛磺酸可有效抑制大鼠海马组织中炎症因子:肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)的水平,从而起到改善大鼠学习记忆功能的作用。异位性皮炎(atopic dermatitis)的发生可能与患者血清中牛磺酸水平降低有关(张玉环等,2005)。阳忠辉等(2005)报道,牛磺酸能通过促进特异性皮炎患者 IFN- γ 的分泌,降低白细胞介素-4(IL-4)的水平,使 Th1 与 Th2 比值升高,从而调节 Th1/Th2 失衡,提示牛磺酸可以用于异位性皮炎的治疗。

2.4 牛磺酸对抗体的影响

抗体是机体对抗原物质产生免疫应答的重要产物,由抗体介导的免疫称为体液免疫。何天培等(1997)报道,给 Wistar 大鼠饲喂高脂、高胆固醇饲料 5 周后,血清中 IgG 水平显著低于饲喂普通颗粒料的大鼠,当向饲料中添加 1%牛磺酸后可提高血清中 IgG 水平,使其显著高于对照组,由此可见,导致高胆

固醇血症的饲料损害了机体免疫力,而牛磺酸有利于患高胆固醇血症大鼠血清 IgG 水平的恢复和提高。牛磺酸还可促进鼠形成特异性抗体及抗羊红细胞抗体的产生,而且这种作用是依赖巨噬细胞的,一旦巨噬细胞被清除,则牛磺酸刺激 B 淋巴细胞产生抗体的量明显降低,但脂多糖(LPS)的刺激作用并未受到影响,因而牛磺酸主要是通过巨噬细胞起作用的。

李学俭等(2002)研究报道,每千克饲料中添加 20~320 mg 牛磺酸的试验组成年蛋鸡群,在接种鸡新城疫疫苗后,与对照组相比其 ND-HI 效价明显提高,而且牛磺酸的添加量与 ND-HI 效价提高之间存在一定的正相关。这对于预防免疫接种后空白期内的保护具有重要意义。张秀珍等(1996)研究发现,补充 1%牛磺酸的小鼠其廓清指数和校正廓清指数均显著高于正常饮水的对照组,而血清溶血素抗体(IgM)的含量也显著高于对照组,而缺乏牛磺酸的小鼠其廓清指数、校正廓清指数及血清溶血素抗体都明显低于对照组。说明添加牛磺酸对网状内皮系统吞噬功能具有明显的激活、增强作用,具有增强机体体液免疫的能力,而牛磺酸缺乏则可降低网状内皮系统的吞噬功能。牛磺酸对维持机体的正常体液免疫功能具有重要作用,但其作用机理尚待进一步研究。

2.5 牛磺酸阻止动物模型发生炎症反应

大量研究表明,在各种氧化破坏的炎症模型中,牛磺酸疗法可以防止组织受损,是一种防止炎症发生的有效保护剂。外源性的牛磺酸可降低由三硝基苯磺酸(trinitrobenzene sulfonic acid)引起的结肠炎炎症反应(Son 等,1998),以及减弱由免疫抑制剂环孢素 A(cyclosporine A)引起的小鼠高血压和肾功能不全(Hagar 等,2006),这些都与牛磺酸的抗氧化功能密切相关。牛磺酸还可以作为游离的自由基清除剂,降低由蛙皮素(cerulein)引起的鼠胰腺炎(Ahn 等,2001),以及改善甲氨喋呤(methotrexate)引起的组织氧化损伤和抑制白细胞程序性死亡,可作为潜在的减轻化疗引起的系统副作用的治疗方法(Cetiner 等,2005)。Mochizuki 等(2004)报道,用 Caco-2 细胞与人类巨噬细胞相似的 THP-1 细胞共培养,以研究牛磺酸对发炎肠上皮细胞的作用,发现牛磺酸显著地抑制了与人类巨噬细胞相似的 THP-1 细胞分泌的 TNF- α 对人类肠上皮 Caco-2 细胞引起的损坏,因此,牛磺酸可能是一种很有效的抗肠炎物质。

牛磺酸与机体过多的次氯酸反应生成更加稳定

但毒性较弱的牛磺氯胺(Tau-Cl)。Tau-Cl的生物学效应是近年来免疫学、神经学、传染病学研究的热点。从一些实验室的数据显示,Tau-Cl在免疫系统中是一种强大的调节剂,它被证实在啮齿类动物和人类炎症反应中作为细胞的信号分子下调一系列涉及炎症反应的介质因子:诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、TNF- α 、前列腺素 E2(PGE2)、环氧化酶-2(COX-2)(Liu等,1998; Marcinkiewicz等,1995)。Schuller等(2004)研究其作用机理,发现 Tau-Cl可以抑制核转录因子 κ B(NF κ B)的激活,而 NF κ B是一种潜在的体内炎症因子的信号转录蛋白。

3 结语

牛磺酸作为动物的条件性半必需氨基酸,参与维持机体免疫功能,提高机体的特异性和非特异性免疫。我国已开始把牛磺酸作为免疫增强剂和诱食剂应用于水产饲料,作为单胃动物添加剂的应用还处于研究阶段。国外的相关研究大多集中在中枢神经系统、视觉系统、心血管系统等方面,且多数成果已得到实际应用,但还存在一些问题,尤其牛磺酸对机体免疫的调节机制还有待于从分子水平和基因操作上做进一步的研究和探索,以便使其在饲料工业中合理应用及对疾病预防发挥积极作用。

参考文献

- Kim S M, Kim H K, Yang W B, et al. Protective effect of taurine on indomethacin-induced gastric mucosal injury [M]. In: Huxtable R J, Azuma J, Kuriyama K, Kakagawa M, Baba A. (Eds.), Taurine. New York: Plenum Press, 1996. 147-155
- Chen X C, Pan Z L, Liu D S, et al. Effect of taurine on human fetal neuron cells proliferation and differentiation [J]. Adv. Exp. Med. Biol., 1998, 442: 397-403
- 何天培, 冯于明, 周毓平. 牛磺酸对肉仔鸡卵黄囊吸收及甲状腺激素代谢的影响[J]. 动物营养学报, 2000, 12(1): 38-41
- 肖世平, 傅伟龙, 江青艳. 饲料中添加牛磺酸对黄鸡性腺发育及其内分泌的影响[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(2): 94-99
- Schuller-Levis G, Mehta P D, Rudelli R, et al. Immunologic consequences of taurine deficiency in cats[J]. Journal of Leukocyte Biology, 1990, 47(4): 321-331
- 田庆伟, 高瑞明. 牛磺酸对小鼠抗氧化能力及免疫器官重量的影响[J]. 营养学报, 1999, 21(1): 88-90
- 何天培, 周毓平, 王玉江. 牛磺酸对肉仔鸡生产性能的影响及其作用机制的研究[J]. 吉林农业大学学报, 1995, 17(2): 68-73
- Porter D W, Martin W G. The effect of taurine on chicken B-cell calcium uptake[J]. J. Inorg. Biochem., 1991, 41(5): 591
- 刘武. 牛磺酸对体外培养的淋巴细胞的影响[J]. 生命的化学, 1990, 10(3): 12-14
- 李金芳, 周荫庄, 屠淑洁. 牛磺酸对细胞的保护功能[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2006, 27(1): 63-66
- 刘晓军, 李任声. 牛磺酸缺乏对机体各器官、系统的影响[J]. 国外医学: 卫生学分册, 1997, 24(5): 286-299
- Maher S G, Condon C E M, Bouchier-Hayes D J, et al. Taurine attenuates CD3/interleukin-2-induced T cell apoptosis in an in vitro model of activation-induced cell death (AICD) [J]. Clinical and experimental immunology, 2005, 139(2): 279-286
- Finnegan N M, Redmond H P, Houchier-Haves D J. Taurine attenuates recombinant interleukin-2-activated lymphocyte-mediated endothelial cell injury[J]. Cancer, 1998, 82(1): 186-199
- 薛承斌, 高秋华, 黄蕾蕾, 等. 牛磺酸对铅中毒大鼠红细胞免疫功能损伤的治疗作用[J]. 中国职业医学, 2005, 32(1): 29-31
- 邢颖, 艾厚喜, 等. 牛磺酸对 β -淀粉样肽海马注射大鼠学习记忆能力和细胞因子的影响[J]. 营养学报, 2005, 27(1): 51-57
- 张玉环, 于广新, 阳忠辉, 等. 异位性皮炎患者血清牛磺酸水平的测定[J]. 天津医药, 2005, 33(12): 765-766
- 阳忠辉, 张玉环, 焦振山, 等. 牛磺酸对特异性皮炎患者 Th1/Th2 细胞因子的影响[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期刊, 2005, 4(2): 51-57
- 何天培, 周毓平. 牛磺酸对饲喂高脂饲料大鼠脂肪代谢及免疫作用的影响[J]. 营养学报, 1997, 19(1): 7-10
- 李学俭, 潘树德, 袁纛, 等. 牛磺酸对鸡 ND-HI 抗体产生的影响[J]. 动物科学与动物医学, 2002, 19(5): 29-32
- 张秀珍, 杜卫, 沈芳兰, 等. 牛磺酸对小鼠免疫功能的影响[J]. 青岛医学院学报, 1996, 32(1): 37-38
- Son M W, Ko J I, Doh H M, et al. Protective effect of taurine on TNBS-induced inflammatory bowel disease in rats[J]. Arch. Pharmacol Res., 1998, 21: 531-536
- Hagar H H, El Etter E, Arafa M. Taurine attenuates hypertension and renal dysfunction induced by cyclosporine A in rat [J]. Clinical and experimental pharmacology and physiology, 2006, 33(3): 189-196
- Ahn B O, Kim K H, Lee G, et al. Effects of taurine on cerulein-induced acute pancreatitis in the rat[J]. Pharmacology, 2001, 63: 1-7
- Cetiner M, Sener G, Sehirli A O, et al. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death[J]. Toxicology and applied pharmacology, 2005, 209 (1): 39-50
- Mochizuki T, Satsu H, Nakano T, et al. Regulation of the human taurine transporter by TNF- α and an anti-inflammatory function of taurine in human intestinal Caco-2 cells [J]. BioFactors, 2004, 21: 141-144
- Liu Y, Tonna-DeMasie M, Park E, et al. Taurine chloramine inhibits production of nitric oxide and prostaglandin E2 in activated C6 glioma cells by suppressing inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression[J]. Mol. Brain Res., 1998, 59: 189-195
- Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, et al. Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators [J]. J. Leukocyte Biol., 1995, 58: 667-674
- Schuller-Levis G B, Park E. Taurine and its chloramine: Modulators of immunity[J]. Neurochemical research, 2004, 29 (1): 117-126

(编辑: 刘敏跃, lm-y@tom.com)

抗脂肪细胞膜蛋白抗体对 猪肉脏器官及红细胞比容的影响

呼红梅 朱荣生 高士争

摘要 为了研究抗脂肪细胞膜蛋白抗体对猪肉脏器官重量及红细胞比容的影响,试验首先制备了兔抗猪脂肪细胞膜蛋白抗体,然后进行动物饲养试验。选择健康、胎次相近、体重为13~15 kg的6周龄云南长撒二元杂交仔猪20头,公母各半,随机分为4组,每组5头。I、II、III组为试验组,腹腔内分别注射抗脂肪细胞膜蛋白抗体10、20和30 ml;IV为对照组,注射20 ml非免疫血清。研究表明:抗脂肪细胞膜蛋白抗体免疫对心脏和肾脏重量有一定影响,而且随剂量的增加而增大;对红细胞比容有一定的影响,但一般2周后恢复正常。

关键词 猪;抗脂肪细胞膜蛋白抗体;内脏器官;红细胞比容

中图分类号 Q241

Effect of antibodies against adipocyte plasma membrane proteins on
viscera and red cell specific volume in swine

Hu Hongmei, Zhu Rongsheng, Gao Shizheng

Abstract In order to study the regulation of antibodies to adipocyte plasma membrane proteins on viscera and red cell specific volume of swine, antibodies were firstly prepared in rabbit against purified plasma membrane proteins from swine's adipocytes, then this experiment chose 20 large white x saba weaning pigs, weighting approximately 13~15 kg and aged 6 weeks. 20 weaning pigs were allocated randomly to four groups (five pigs in each). Group I, II, III were intraperitoneally treated antibodies to adipocyte plasma membrane proteins of different dosage at diverse stage, group IV was control group and intraperitoneally immunized with non-immune serum while weighting 15 kg, group I, II, III were respectively injected with 10, 20, 30 ml antibodies at weighting 15 kg. The results indicated that: compared with other viscera, antibodies to adipocyte plasma membrane proteins greatly affect heart and kidney weight, and the influence of heart and kidney weight increased along with dosage.

Key words swine; antibodies to adipocyte plasma membrane proteins; viscera; red cell specific volume

研究表明,一般情况下脂肪细胞膜蛋白抗体免疫对动物内脏器官无影响,但由于脂肪细胞膜蛋白的类似性,使得抗脂肪细胞膜蛋白抗体除作用于脂肪细胞外,对肾脏细胞、肝脏细胞、心脏细胞、肺脏细胞、红细胞等也表现出一定的细胞毒性,从而引起肝脏等组织损伤和红细胞溶解,而且细胞毒性的出现可能与抗体的特异性有关,也可能与动物注射抗体后产生的免疫反应有关。为了验证本试验制备的抗脂肪细胞膜蛋白

抗体的特异性,在仔猪阶段(13~15 kg体重)免疫不同剂量抗脂肪细胞膜蛋白抗体,研究抗脂肪细胞膜蛋白抗体对猪肉脏器官和红细胞的影响,为实际应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验室自制抗脂肪细胞膜蛋白抗体。

1.2 试验动物

选择健康、胎次相近、体重为13~15 kg的6周龄长撒(长白x撒坝)二元杂交仔猪20头,公母各半,随机分为4组,每组5头。I、II、III组为试验组,注射抗脂肪细胞膜蛋白抗体;IV为对照组,注射非免疫血清。每组猪分圈饲养,饲喂市售不同阶段日粮,自由采食、饮水。日粮营养成分见表1。

呼红梅,山东省农业科学院畜牧兽医研究所,250100,山东省济南市桑园路10号。

朱荣生,单位及通讯地址同第一作者。

高士争,云南省动物营养与饲料重点实验室。

收稿日期:2006-12-25

表1 日粮营养成分(%)

阶段	干物质	粗蛋白	粗纤维	粗灰分	钙	总磷	赖氨酸
14~20 kg	87.5	21.0	4.5	8.0	0.6~1.2	0.50	1.20
20~30 kg	86.0	18.0	5.0	9.0	0.6~1.2	0.50	1.00
30~90 kg	85.5	12.5	9.0	10.0	0.4~1.0	0.35	0.05

1.3 抗脂肪细胞膜蛋白抗体免疫方式

试验采用腹腔内注射抗脂肪细胞膜蛋白抗体方式进行免疫。I、II、III组于试验开始第一天进行免疫,每头猪分别注射10、20和30 ml抗脂肪细胞膜蛋白抗体;对照组(IV组)每头猪注射20 ml非免疫血清。试验设计见表2。

表2 试验设计

组别	I	II	III	IV
注射剂量(ml)	10	20	30	20

1.4 动物试验

正式试验开始前进行7 d的预试,预试期结束后进入正式试验期。试验分三个阶段:第一阶段14~20 kg,

第二阶段20~30 kg,第三阶段30~90 kg。试验开始第一个月内日饲喂5次,而后至试验结束时日饲喂3次,试验期间自由采食、饮水,注意观察猪的采食、排泄、精神状态和行为等,并作记录。

试验结束时每组随机选择4头猪屠宰,取心脏、肝脏、脾脏和肺脏进行称重。

1.5 血样的采集和处理

从免疫后第1、7、14、28、42、56 d和试验结束前空腹,腔静脉采血3 ml,用草酸盐抗凝剂抗凝,测定红细胞比容。

1.6 数据统计分析

试验数据均采用SPSS软件进行单因素方差分析,并进行多重比较。

2 试验结果与分析

2.1 抗脂肪细胞膜蛋白抗体对猪内脏器官重量的影响(见表3)

由表3可以看出,各试验组间脾脏和肺脏的重量

表3 抗脂肪细胞膜蛋白抗体对内脏器官的影响(g)

组别	I	II	III	IV
心脏	275.43±8.55 ^{bc}	291.83±4.76 ^{ab}	294.11±5.89 ^a	273.26±5.27 ^c
脾脏	120.37±6.56	121.51±6.12	123.92±4.29	120.07±2.88
肾脏	263.67±11.32 ^{ab}	240.66±8.65 ^{bc}	238.00±4.95 ^c	266.66±6.59 ^a
肝脏	1 323.33±25.95 ^{cd}	1 393.52±25.04 ^{ab}	1 403.33±29.74 ^a	1 310.16±20.61 ^d
肺脏	1 053.22±19.73	1 054.67±18.15	1 056.67±32.93	1 053.67±29.49

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)。

无明显变化(P>0.05)。与对照组相比,II、III组心脏的重量明显增加,分别增加6.80%、7.63%(P<0.05);II、III组肾脏的重量明显减小,分别减小9.75%、10.75%(P<0.05);II、III组肝脏的重量明显增加,分别增加6.36%、7.11%(P<0.05);而I组心脏、肾脏和肝脏的重量与对照组相比无显著差异(P>0.05)。I、II、III组间随剂量的增加对心脏、肾脏和肝脏的影响增大;II、III组间影响差异不显著。

2.2 抗脂肪细胞膜蛋白抗体免疫对血液红细胞比容的影响(见图1)

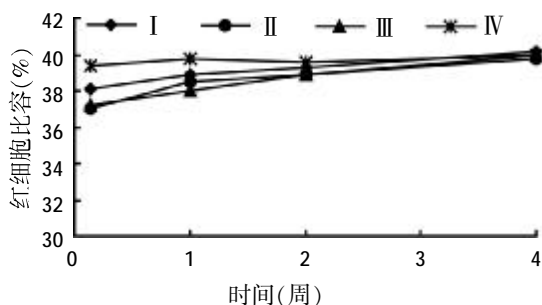


图1 同一时间不同剂量抗体免疫后猪红细胞比容的变化

由图1可以看出,免疫后2周内各试验组红细胞比容低于对照组,其后试验组红细胞比容逐渐升高,2周后恢复正常。第1 d时各试验组(I、II、III组)红细胞比容比对照组分别降低3.30%、6.14%、5.63%(P>0.05),第1周分别降低2.24%、3.18%和4.38%(P>0.05),I、II、III组间红细胞比容无明显差异(P>0.05)。由此可见,抗脂肪细胞膜蛋白抗体可在一定程度内影响猪血液红细胞的比容,而且在免疫后2周内与剂量正相关,但是2周后可恢复正常。

3 讨论

通过皮下多位点注射猪脂肪细胞膜蛋白,制备的兔抗猪脂肪细胞膜蛋白抗体,其ELISA检测结果显示抗体效价可达1:12 800。虽然抗体并不完全是脂肪细胞膜蛋白特异性的,但与其它组织的交叉反应较小,这与文献报道一致。另外,在动物试验中观察到抗脂肪细胞膜蛋白抗体免疫后动物行动迟缓、精神不振,但并未出现过敏反应,免疫后2周内红细胞比容减少,屠宰时发现抗体对心脏、肝脏、肾脏重有影响,但未观察到内脏器官有其它异常变化。这与

Kestin 等(1993)和 Futter 等(1992)的报道一致,他们的研究表明,给仔猪和小鼠免疫脂肪细胞膜蛋白抗体后虽然并未发现严重的过敏反应,但免疫后 1 周内试验动物精神不振。但是 Hu 和 Suryawan(1992)给小鼠注射抗脂肪细胞膜蛋白抗体后出现严重的过敏反应。这可能是与抗体特异性及免疫后产生的免疫复合物有关。

Moloney 和 Allen(1989、1998)研究表明,给羔羊免疫抗脂肪细胞膜蛋白抗体后 4~5 周内红细胞比容显著减少,但 8 周后即恢复正常。赵伟和唐保定(1999)研究表明,抗猪脂肪细胞膜蛋白抗体免疫后第 1 周红细胞比容虽有所降低,但与对照组相比无明显差异。本试验也发现了此类现象,仔猪 15 kg 体重免疫抗体后 2 周内与对照组相比试验组红细胞比容均有所减少($P>0.05$),但随后试验组红细胞比容逐渐升高,2 周后恢复正常,并趋于稳定。而 Nassar 和 Hu(1991、1992)认为抗体免疫不影响红细胞比容。这可能与抗体的特异性高低有关,由于脂肪细胞膜与红细胞膜表面存在某些相同的抗原决定簇,因而使得抗体除作用于脂肪细胞外,对红细胞也表现为细胞毒性,从而引起红细胞脆性增加和红细胞溶解。Moloney 和 Allen(1998)还认为红细胞比容减小与动物体内脂肪分解有关。

一般情况下,抗脂肪细胞膜蛋白抗体免疫对动物内脏器官无影响,但也有研究表明,抗体免疫对部分内脏器官重有一定的副作用。Flint 等(1986)、Nassar 和 Hu(1991)、Hu 等(1992)报道,注射抗脂肪细胞膜蛋白抗体后,被免疫动物的脾脏、心脏重量增加,而且脾脏略呈灰色。Panton 等(1990)的试验结果也表明,鼠的肾脏和脾脏重量在注射抗脂肪细胞膜抗体 3 周后增加,但至第 7 周时,肾脏和脾脏重又恢复正常。本试验也发现,试验组心脏、肝脏的重量增加,肾脏重量减少,II、III 组与对照组相比差异均显著($P<0.05$),而且对心脏、肝脏和肾脏的影响随剂量的增加而增大,但是屠宰时未发现内脏器官有其它明显的异常变化。研究表明,肝脏增大可能是损伤引起肝脏代偿性增生的缘故,组织学鉴定发现肝脏淋巴细胞浸润类似脂肪组织(Panton 等,1990)。而 Declercq 和 Mourot 等(1997)、William 等(2000)在给动物免疫抗脂肪细胞单克隆抗体后,未发现内脏器官有任何异常变化,由此可见,这些副作用并不是抗脂肪细胞膜蛋白抗体发挥作用的

必然结果,而是可能与抗体的特异性高低相关,抗血清特异性差,与部分内脏细胞膜有交叉反应,也可能是由于动物注射抗体后产生的免疫反应而引起的。由于膜及膜上蛋白的类似性,使得抗体除作用于脂肪细胞外,对肝细胞、心脏细胞和肾脏细胞也表现为细胞毒性,从而引起心脏、肝脏和肾脏的组织损伤,确切机理有待于进一步研究。

到目前为止对小鼠(Hu 和 Suryawan,1992;Panton 和 Futter,1990;Flint 等,1986)、兔(Dulor 等,1990)、牛(Cryer 等,1984)、绵羊(Moloney 和 Allen,1989;Nassar 和 Hu,1992)、猪(Kestin 和 Kennedy,1993)、鸡(Dong 和 Froman,1991;Butteerwith 和 Kestin,1992a,b)的研究表明,抗脂肪细胞膜蛋白抗血清与脂肪细胞膜蛋白可高度特异性结合,但与其它组织质膜也有不同程度的交叉反应,从而导致产生一些负反应,如过敏反应;另外对肝脏和红细胞等也表现为细胞毒性,致使肝脏损伤、红细胞溶解等,但用非脂肪组织制备的质膜吸附抗血清可除去绝大部分交叉反应,提高抗血清对脂肪细胞识别的特异性,而且抗血清也缺乏再生性,这使它长期使用的可能性减小,而单克隆抗体能特异性识别脂肪细胞表面的特异性膜蛋白抗原,且与其它类型细胞和组织都无交叉反应性(Declercq 和 Mourot 等,1997;Hausman 和 Wright 等,1993;Killefer 和 Hu,1990a,b;Wright 和 Hausman,1990)。因此,采用单克隆抗体技术能更好地发挥抗脂肪细胞膜蛋白抗体的免疫作用,特异性地抑制动物体脂肪沉积,还可以用作探针特异性识别脂肪细胞,研究脂肪细胞的生长发育、结构、代谢,以制定更完善的免疫学方法。

4 结论

抗脂肪细胞膜蛋白抗体免疫可在一定程度引起对肝脏、心脏和肾脏的组织损伤,而且与免疫剂量正相关,这主要是由于抗脂肪细胞膜蛋白抗体特异性低。而抗脂肪细胞膜蛋白单克隆抗体不仅特异性高,而且再生性强,是抗脂肪细胞膜蛋白抗体免疫应用技术发展的必然趋势。

(参考文献 24 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

黑曲霉液体发酵产植酸酶条件的研究

杨亚珍 张建民 余欢

摘要 试验以黑曲霉(*Aspergillus niger*)30132为材料,研究了碳源、氮源、培养基、起始pH值、接种量、温度对该菌株产植酸酶活力的影响。结果表明:黑曲霉30132的最适发酵温度为28℃,产酶pH值为5,最佳接种量为10%;在此条件下,以8%麸皮为碳源、0.5%硫酸铵为氮源时,产酶活力最高,发酵3d后发酵液中植酸酶活力高达35.5 U/ml。

关键词 植酸酶;黑曲霉;液体发酵

中图分类号 S816.6

植酸酶主要存在于植物和微生物中,特别是霉菌中的曲霉属一直被认为是植酸酶主要产生菌而被大量研究。饲料中添加植酸酶,可减少粪便排泄物中磷含量,从而减少高磷所造成的环境污染;尤其是在水体中的含量,有利于保护生态环境。本文对黑曲霉发酵产植酸酶的条件进行了初步研究,以期找到高产植酸酶的最适发酵条件,为工业大规模生产植酸酶提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌种:黑曲霉(*Aspergillus niger*)30132由长江大学生命科学学院微生物学实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 培养基

斜面培养基:PDA(马铃薯-葡萄糖-琼脂)培养基。

液体种子培养基(质量百分数):麸皮2%、葡萄糖3%、硫酸铵0.15%,pH值5.5~6.0。

发酵培养基(质量百分数):在3%葡萄糖、0.15%硫酸铵、0.2%CaCl₂·0.05%MgSO₄·7H₂O、0.05%KCl、0.03%MnSO₄的基础上稍做改变。

1.2.2 培养方法

1.2.2.1 斜面培养

斜面接种后,28℃培养2d,待长出均匀、较厚的一层绿色孢子后,贮存于冰箱中备用。

1.2.2.2 种子摇瓶培养

取新鲜的斜面种子一管,用无菌生理盐水将孢子洗下,振荡使孢子分散,适当稀释,用血球计数板测定,保持孢子含量在10⁷~10⁸个/ml。按10%的接种量将孢子悬液接入装有100ml液体种子培养基的三

角瓶(250ml)中,然后将三角瓶置30℃恒温摇床上,以150r/min振荡培养48h。

1.2.2.3 发酵培养

按5%的接种量将摇瓶种子接入装有100ml发酵培养基的三角瓶(250ml)中,然后将三角瓶置28℃恒温摇床上,以150r/min振荡培养72h,测植酸酶活力。

1.2.2.4 酶活力测定

植酸酶活力的定义:37℃,pH值5.5条件下每分钟从植酸钠中释放出1μg无机磷所需的酶为1U。

酶活力测定方法:①取1ml含酶液加至一洁净试管中;②加入3ml反应液,反应液为含质量浓度为0.5%植酸钠的乙酸-乙酸钠缓冲液(pH值为5.5);③在37℃恒温反应30min;④加入1ml浓度为10%的三氯醋酸终止反应;⑤加入5mol/l的硫酸1ml,摇匀;⑥加入2%的钼酸铵2ml;⑦加入2%的硫酸亚铁2ml,混匀,放入沸水浴中5min,冷却后将以上蓝色溶液在721型分光光度计上于780nm处比色,读出吸光度A_{780nm},查标准曲线计算酶活力(标准曲线为KH₂PO₄中磷含量与A_{780nm}的关系曲线)。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对黑曲霉产酶活力的影响

本试验对所选4种碳源分别以8%的添加量加入到发酵培养基中,测定不同碳源对植酸酶活力的影响,结果见表1。

表1 不同碳源对黑曲霉产酶活力的影响

碳源(8%)	葡萄糖	蔗糖	麸皮	乳糖
酶活(U/ml)	23.4	24.4	29.7	18.6

从表1可以看出,以麸皮做为碳源时,产生植酸酶的活力最高,达29.7 U/ml;其次为蔗糖、葡萄糖;用乳糖作为碳源时,产植酸酶的活力最低,为18.6 U/ml。说明麸皮是产植酸酶的良好碳源。

2.2 不同碳源添加量对黑曲霉产酶活力的影响(见表2)

杨亚珍,长江大学生命科学学院,434025,湖北荆州。

张建民、余欢,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-16

表 2 不同碳源添加量对黑曲霉产酶活力的影响

麸皮含量(%)	6	7	8	9	10
酶活(U/ml)	14.5	26.0	29.3	27.2	24.5

试验以麸皮作为唯一碳源,按不同接种量加入发酵培养基中。试验发现,当碳源含量从 6% 增长至 8% 时,植酸酶的活力逐步增强,且在 8% 时达最大。此后,随碳源含量增加,植酸酶活力呈现下降趋势。原因可能由于培养基中碳源过高或过低,而使碳氮比例失调,导致菌体代谢产物酶活力下降。

2.3 不同氮源对黑曲霉产酶活力的影响(见表 3)

表 3 不同氮源对黑曲霉产酶活力的影响

氮源(0.5%)	酵母膏	硫酸铵	硝酸铵	尿素
酶活(U/ml)	27.6	31.7	25.9	23.4

试验以酵母膏、硫酸铵、硝酸铵、尿素为氮源,分别以 0.5% 的添加量加入发酵培养基中,从表 3 中可知,在含氮量相同的条件下,硫酸铵作为唯一氮源时,植酸酶的活力最高。而用其它氮源来发酵,产植酸酶活力相对较低。

2.4 氮源含量对黑曲霉产酶活力的影响(见表 4)

表 4 氮源含量对黑曲霉产酶活力的影响

氮源含量(%)	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
酶活(U/ml)	20.4	21.7	31.5	22.9	21.1

试验以不同浓度的硫酸铵作为唯一氮源,测定不同氮源含量对植酸酶活力的影响,由表 4 可知,当氮源含量为 0.5% 时,产生的植酸酶活力维持在一个最高的水平。氮源含量过高或过低,均不利于代谢产物的累积,植酸酶活力下降。

2.5 起始 pH 值对黑曲霉产酶活力的影响(见图 1)

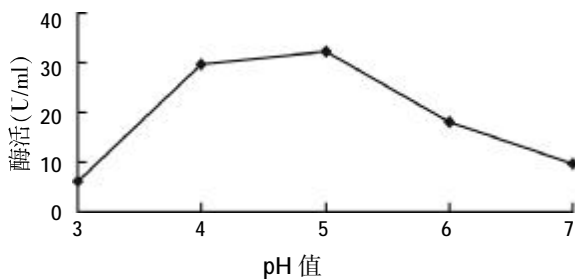


图 1 pH 值对黑曲霉产酶活力的影响

在 250 ml 三角瓶中装入 100 ml 不同起始 pH 值的发酵培养基,接种黑曲霉培养 3 d 后,测其酶活力。结果表明,培养基起始 pH 值对产酶影响很大,pH 太低或太高都会对酶活产生不利影响,而在 pH 值 5.0 时该菌株发酵产生植酸酶的活力最高。

2.6 接种量对黑曲霉产酶活力的影响(见图 2)

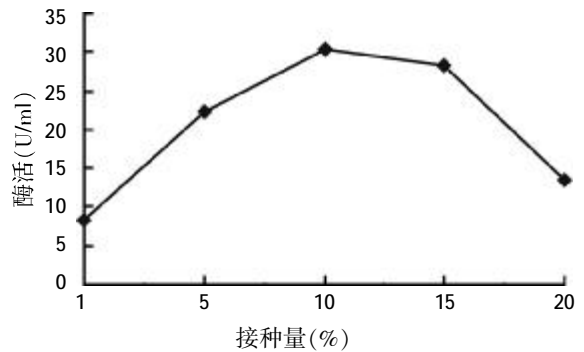


图 2 接种量对黑曲霉产酶活力的影响

在 250 ml 三角瓶中装入 100 ml 发酵培养基,然后以发酵液的不同体积比接种摇瓶种子培养液,测定接种量对酶活力的影响。由图 2 可知,当接种量为 10% 时,产酶活力最高,菌体浓度过高或过低,均不利于植酸酶的产生。

2.7 温度对黑曲霉产酶活力的影响(见图 3)

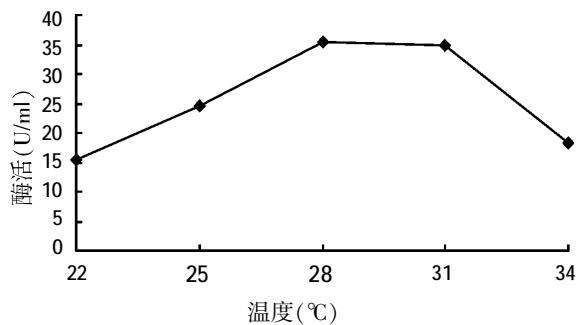


图 3 温度对黑曲霉产酶活力的影响

将装有 100 ml 发酵培养基的三角瓶分别置于 22、25、28、31 和 34 °C 5 个温度条件下培养 3 d 后,发现在 28~31 °C 时,产酶较高。高于此温度,产酶活力随温度升高呈现下降趋势;低于此温度,产酶活力随温度降低也呈减少趋势。在 28 °C 时,酶活力高达 35.5 U/ml。

3 结论

黑曲霉 30132 液体发酵产植酸酶的最适条件是:碳源为 8% 的麸皮,氮源为 0.5% 硫酸铵,接种量为 10%,pH 值为 5.0,发酵温度为 28 °C。在这种培养基条件下,黑曲霉 30132 产植酸酶活力可达到 35.5 U/ml。

(参考文献 5 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

雏鹅日粮粗纤维和酶制剂添加量的研究

毛宗林 刘长忠 曹爱青 何瑞国

摘要 试验采用两因素二次回归正交旋转组合设计,研究雏鹅对粗纤维和酶制剂的营养需要量。结果表明,粗纤维和酶制剂水平分别为 5.098%和 0.258%时,平均日增重取得最大值 43.38 g;粗纤维和酶制剂水平分别为 4.741%和 0.241%时,料重比取得最小值 2.01。

关键词 二次回归正交旋转组合设计;雏鹅;粗纤维;酶制剂;添加量

中图分类号 S835

Study on supplementation of crude fibre and enzyme preparation for goslings

Mao Zonglin, Liu Changzhong, Cao Aiqing, He Ruiguo

Abstract The experiment was conducted to study the requirement of crude fibre and enzyme preparation for goslings by using two factors quadratic regression orthogonal rotational combing design. The results showed as follows: The addition levels of crude fibre and enzyme preparation in diet were 5.098% and 0.258% respectively when the maximal average daily gain was 43.38 g; When the addition levels of crude fibre and enzyme preparation in diet were 4.741% and 0.241% respectively, the optimum feed conversion rate was 2.01.

Key words quadratic regression orthogonal rotational combing design; goslings; crude fibre; enzyme preparation; supplementation

酶制剂以无毒、无副作用、无残留的优点,被称为“绿色”添加剂。越来越多的试验显示添加酶制剂可以明显提高动物的生长性能,但关于酶制剂适宜添加量的研究试验多为单因素设计,关于酶制剂与粗纤维互作效应尚未见报道。本试验研究粗纤维与酶制剂的互作对雏鹅生产性能的影响,寻求雏鹅对粗纤维与酶制剂适宜的需要量,为粗纤维和酶制剂合理应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物与分组

选取 800 只 1 日龄、体质健壮的二元杂交(朗德鹅×豁眼鹅)鹅,随机地分为 16 组,每组设 5 个重复,每个重复 10 只鹅,进行为期 28 d 的试验,各组间初始体重无显著差异。网上平养,自由采食和饮水,按常规程序进行免疫。

1.2 试验设计与实施方案

试验以粗纤维和酶制剂为试验因子,在保证相同的代谢能、粗蛋白、钙、有效磷、赖氨酸和蛋氨酸+半胱氨酸水平下,采用两因素二次回归正交旋转组合设计(余家林,1993)。试验设计和实施方案见表 1。

表 1 试验设计和实施方案

组别	编码值		实施方案	
	粗纤维	酶制剂	粗纤维(%)	酶制剂(%)
1	1	1	8.88	0.341
2	1	-1	8.88	0.059
3	-1	1	3.47	0.341
4	-1	-1	3.47	0.059
5	1.414	0	10	0.2
6	-1.414	0	2.35	0.2
7	0	1.414	6.175	0.4
8	0	-1.414	6.175	0
9-16	0	0	6.175	0.2

1.3 试验日粮

各试验组代谢能、粗蛋白、钙、有效磷、赖氨酸、蛋氨酸+半胱氨酸相同,日粮组成及营养水平见表 2。酶制剂主要含纤维素酶 741 U/g(在 40 ℃、pH 值 4.8 的条件下,1 h 分解羧甲基纤维素钠产生 1 mg 葡萄糖为 1 个酶活单位)、木聚糖酶 1 744 U/g(在 50 ℃、pH 值 5.3 的条件下,1 min 催化木聚糖产生 1 μmol 还原糖为 1 个酶活单位)和 β-葡聚糖酶 38 U/g(在 40 ℃、pH 值 5.0 的条件下,1 min 分解 β-葡聚糖产生相当于 1 μmol 葡萄糖的还原糖为 1 个酶活单位)。

1.4 测定指标及方法

试验开始和试验结束时各空腹称重一次,记录耗料量,计算平均日增重、料重比。

1.5 数据统计

运用 SAS8.1 软件进行回归分析,Excel 2003 进行规划求解。试验数据采用平均值±标准差表示。

毛宗林,华中农业大学动物科技学院,430070,湖北武汉。

刘长忠、曹爱青、何瑞国(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-13

表2 日粮组成及营养水平

原料	配比(%)								
	1组	2组	3组	4组	5组	6组	7组	8组	9~16组
麸糠	7.00	6.92	0	0	8.32	0	4.03	4.00	4.02
玉米秸秆	10.5	10.37	0	0	12.48	0	6.04	6.01	6.03
玉米	41.58	24.44	19.32	19.50	35.49	25.51	27.44	27.53	27.56
麦麸	1.00	4.30	14.31	14.38	1.00	1.00	1.25	1.32	1.35
豆粕	14.17	8.98	9.19	9.22	6.65	19.00	17.00	17.22	16.93
菜籽粕	0.90	0.50	2.89	2.78	0.50	1.36	3.00	3.00	3.00
鱼粉	3.00	3.00	2.00	2.00	3.00	3.00	3.00	2.93	3.00
赖氨酸	0.067	0	0.074	0.073	0.024	0.002	0.049	0.045	0.05
蛋氨酸	0.263	0.268	0.267	0.267	0.261	0.277	0.274	0.273	0.274
食盐	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
油脂	3.000	3.000	2.528	2.369	3.000	0	1.480	1.381	1.379
粘结剂	0	0	5	5	0	5	0	0.19	0
预混料	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
碳酸钙	0.553	0.543	0.721	0.723	0.516	0.695	0.59	0.59	0.59
磷酸氢钙	1.166	1.207	1.311	1.310	1.162	1.280	1.236	1.245	1.235
血粉	3.00	2.93	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	2.92	3.00
氯化胆碱	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
酶制剂	0.341	0.059	0.341	0.059	0.200	0.200	0.400	0	0.200
膨化大豆	12.78	22.65	19.82	19.84	23.7	11.82	10.94	10.94	10.95
玉米淀粉	0	10.13	18.53	18.79	0	27.17	19.57	19.69	19.74
营养水平									
CF(%)	8.88	8.88	3.47	3.47	10.00	2.35	6.175	6.175	6.175
ME(MJ/kg)	11.491	11.495	11.495	11.495	11.491	11.495	11.495	11.495	11.495
CP(%)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Ca(%)	0.8	0.81	0.81	0.81	0.8	0.81	0.81	0.81	0.81
P(%)	0.604	0.615	0.642	0.642	0.601	0.585	0.605	0.607	0.606
AP(%)	0.40	0.41	0.41	0.41	0.40	0.41	0.41	0.41	0.41
Lys(%)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Met+Cys(%)	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78

2 结果与分析

2.1 试验结果

0~4周鹅平均日增重、料重比见表3。

表3 0~4周鹅平均日增重、料重比

组别	平均日增重(g/d)	料重比
1	39.25±1.62	2.20±0.05
2	37.77±2.28	2.25±0.04
3	42.87±2.44	2.03±0.03
4	42.23±3.27	2.05±0.03
5	36.24±2.12	2.31±0.06
6	41.96±1.31	2.05±0.07
7	42.71±1.70	2.06±0.04
8	40.21±1.91	2.17±0.05
9	42.61±2.87	2.05±0.05
10	44.35±2.09	2.09±0.04
11	42.24±2.34	2.04±0.07
12	41.82±1.51	2.03±0.07
13	43.49±1.60	2.07±0.05
14	43.08±1.68	2.06±0.05
15	42.41±2.11	2.04±0.03
16	40.87±1.17	2.01±0.03

2.2 回归分析

2.2.1 回归模型的建立与检验

将表1的结果用SAS8.1中RSREG过程统计,得

平均日增重、料重比与各因素(X_1 对应粗纤维, X_2 对应酶制剂)之间的编码回归方程。

平均日增重与各因素之间的编码回归方程为:

$$Y_0 = 42.61 - 2.86X_1 + 1.00X_2 + 0.42X_1X_2 - 3.38X_1^2 - 1.02X_2^2$$

饲料转化率与各因素之间的编码回归方程为:

$$Y_{(2)} = 2.05 + 0.13X_1 - 0.04X_2 - 0.01X_1X_2 + 0.12X_1^2 + 0.06X_2^2$$

对方程(1)、(2)统计量的显著性检验结果见表4。

表4 方程(1)、(2)统计量的显著性检验

项目	总回归	失拟	X_1	X_2	X_1X_2	X_1^2	X_2^2
方程(1)	<0.001**	0.950 ^N	<0.001**	0.052 ^N	0.653 ^N	<0.001**	0.142 ^N
方程(2)	<0.001**	0.559 ^N	<0.001**	0.007**	0.542 ^N	<0.001**	0.006*

注:^N表示差异不显著,P>0.05;*表示差异显著,P<0.05;**表示差异极显著,P<0.01。

2.2.2 模型的解析

2.2.2.1 主因素效应分析

因素水平已经无量纲线性编码代换,偏回归系数已标准化,因此方程中偏回归系数绝对值大小代表该变量对Y作用的大小,故方程(1)、(2)两因素中作用大小均为:粗纤维>酶制剂。

2.2.2.2 单因素效应分析

对方程(1)、(2)采用降维分析,将其中一个因素固定在零水平,分别描述单因素对Y的影响,单因素效应方程分别如下:

$$Y_{(1)1}=42.61-2.86X_1-3.38X_1^2;$$

$$Y_{(1)2}=42.61+1.00X_2-1.02X_2^2;$$

$$Y_{(2)1}=2.05+0.13X_1+0.12X_1^2;$$

$$Y_{(2)2}=2.05-0.04X_2+0.06X_2^2.$$

根据以上方程做图,可以分别得到单因素效应曲线,如图1、图2所示。

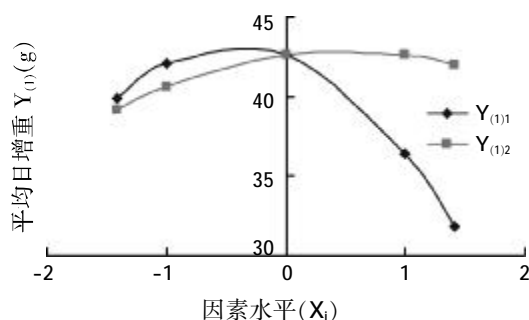


图1 平均日增重与两因素的单对应函数关系

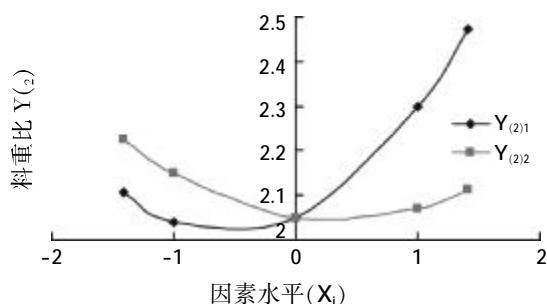


图2 料重比与两因素的单对应函数关系

从图1可得出,粗纤维在编码值范围内有最大值,粗纤维在编码值为-0.423时取最大值,即粗纤维实际水平为5.031时取最大值43.22;当编码值小于-0.423时,随着粗纤维含量的增加,平均日增重增加;当编码值大于-0.423,随着粗纤维含量的增加,平均日增重降低。酶制剂在编码值范围内有最大值,酶制剂在编码值为0.490时取最大值42.86,即酶制剂实际水平为0.269时取最大值;当编码值小于0.490时,随着酶制剂含量的增加,平均日增重增加;当编码值大于0.490时,随着酶制剂含量的增加,平均日增重降低。

从图2可得出,粗纤维在编码值范围内有最小值,粗纤维在编码值为-0.542时取最小值,即粗纤维实际水平为4.710时取最小值2.01;当编码值小于-0.542时,随着粗纤维含量的增加,料重比降低;当编码值大于-0.542,随着粗纤维含量的增加,料重比增加。酶制剂在编码值范围内有最小值,酶制剂在编码

值为0.333时取最小值,即酶制剂实际水平为0.247时取最小值2.04;当编码值小于0.333时,随着酶制剂含量的增加,料重比降低;当编码值大于0.333时,随着酶制剂含量的增加,料重比增加。

2.2.2.3 模型寻优

采用Excel 2003规划求解,通过对目标函数(1)、(2)寻优,得出目标函数的最佳值及各因素最佳组合。

平均日增重目标函数的最大值: $Y_{\max}=43.38$,其组合方案为: $X_1=-0.398, X_2=0.408$ 。即最佳比例为:粗纤维5.098%,酶制剂0.258%。

料重比目标函数的最小值 $Y_{\min}=2.01$,其组合方案为: $X_1=-0.530, X_2=0.289$ 。即最佳比例为:粗纤维4.741%,酶制剂0.241%。

3 讨论

3.1 雏鹅对粗纤维和酶制剂的需要量

国内外学者对日粮粗纤维适宜需要量做了一些研究。张慧(1995)研究不同水平纤维对豁鹅雏鹅增重的影响,指出0~4周龄雏鹅日粮中粗纤维含量以3.61%为宜。Cao(2003)研究不同水平纤维对2月龄鸡生长的影响,结果显示纤维水平在3.5%效果最好。高妍(2004)研究表明,0~35日龄肉鹅日粮含3.5%粗纤维料重比最低,平均日增重最高。梁远东(2005)报道15~35日龄仔鸭宜用2.97%粗纤维水平的日粮。王宝维(2005)分别研究不同水平(5.15%~9.59%)粗纤维对饲料中各种纤维素消化率的影响,结果表明,粗纤维消化率分别以7.76%最高。周世霞(2006)用等能等氮、不同粗纤维水平(4%、8%、12%)的日粮饲喂41~69日龄朗德鹅,结果发现,8%组平均日增重显著高于其它两组。

目前关于酶制剂适宜添加量的研究比较少。黄健(1997)采用三因素二次饱和D-最优设计,研究酸性蛋白酶、纤维素酶和糖化酶对仔猪生产性能的影响。结果表明:酶制剂单独使用时,以每千克饲料酸性蛋白酶3万U、纤维素酶3万U和糖化酶5万U为宜;结合添加时,以每千克饲料酸性蛋白酶和纤维素酶各3.0万U最好。倪志勇(2001)采用二因素饱和D-最优设计,研究复合酶添加量(0%~0.23%)对肉鸡生产性能和养分利用率的影响。结果表明,复合酶的适宜添加量为0.1%。崔朝霞(2002)研究小麦日粮添加不同含量(0~800 XU/kg)酶制剂对肉仔鸡生产性能的影响,结果表明,平均日增重和料重比以500 XU/kg添加量最佳。Barrera(2004)研究添加不同活性(5 500 XU、11 000 XU、16 500 XU)木聚糖对生长猪生长性能影响,结果显示,平均日增重和料肉比以添加11 000 XU最佳。Jackson(2004)报道添加50 MU/t β -甘露聚糖酶

于肉公鸡玉米-豆粕型日粮中效果不明显;80 MU/t β -甘露聚糖酶显著提高体增重和饲料转化率;而 β -甘露聚糖酶增加到 110 MU/t 时并没有增加额外效果,因此最佳添加量为 80 MU/t。杨彬(2004)研究在日粮中添加不同水平(0.05%~0.2%)纤维素酶对肉鸡生长的影响,结果表明,7~9 周平均日增重和料重比以 0.1%水平最佳。阎秋良(2004)在杂粕基础日粮中分别添加 0.05%~0.15%复合酶制剂,0.10%时产蛋率、平均蛋重、料蛋比最高。习海波(2005)报道日粮分别添加 0.012%、0.015%、0.018%、0.021%酶制剂后,0.015%组增重最高,0.021%组料重比最低。王继强(2005)研究不同水平(0.05%~0.20%)酶制剂对蛋鸡生产性能的影响,产蛋率、产蛋量、饲料转化率以 0.10%水平最高。莫芳(2006)在仔猪日粮中分别添加 0.1%、0.15%、0.2%、0.25%的 NSP 酶进行生长试验,结果表明添加 0.2%水平的 NSP 酶仔猪增重、料重比最佳。

本试验日粮中粗纤维的水平为 2.35%~10%,酶制剂水平为 0%~0.4%,结果显示,为满足雏鹅获得最大平均日增重和最佳饲料转化率,粗纤维和酶制剂需要量分别为 4.741%~5.098%和 0.241%~0.258%。本试验结果之所以与前人研究结果在数值上不一致,可能原因是纤维源及其水平、日粮组成和营养水平、动物种类和年龄、酶制剂的种类和添加量、酶制剂的来源及配伍等不同而造成的。

3.2 粗纤维和酶制剂对雏鹅的影响

本试验显示,平均日增重、料重比与粗纤维和酶制剂添加水平呈二次曲线关系。这与 Barrera(2004)、王芬(2004)、黄新(2005)、黄金秀(2006)等报道一致,而与 Chen(1992)、O'Doherty(2002)、廖玉英(2004)、Högberg(2006)等结果不一致。另外,酶制剂对平均日增重没有显著影响,这与 Waldroup(2005)、Mikulski(2006)、Orda(2006)等报道一致,而与 Lazaro(2004)、Cowieson(2006)、Jozefiak(2006)等报道结果不一致。试验设计、粗纤维和酶制剂来源及添加水平、动物种类等的不同可能是导致这种结果的主要原因。

动物摄入适量的粗纤维,对于维持胃肠道的正常蠕动和功能有重要作用。日粮中的纤维成分能减少肠绒毛上皮中的杯状细胞的数量,而杯状细胞的减少可使之分泌的粘蛋白量减少,进而减轻粘蛋白的屏障作用,利于饲料养分通过肠壁被机体吸收利用。适量的纤维还能刺激禽盲肠微生物群的生长,动物消化液不能分解的粗纤维通过盲肠微生物的发酵产生挥发性脂肪酸,被动物吸收和利用,作为部分能量。当饲料日粮粗纤维水平过高时,增加肠道食糜的粘度,而肠内

内容物的高粘稠性会通过降低溶质的通过速度,阻碍肠道内容物的机械混合、与酶和底物结合等一系列反应而降低动物的生长性能和养分利用率。同时,粗纤维是细胞壁的主要成分,不能被消化酶水解,大分子消化酶也不能通过细胞壁进入细胞内,因而对细胞内容物形成了一种包被作用(刘强,1998)。粗纤维添加水平越高,细胞内容物中的淀粉、蛋白质及脂肪等营养物质释放的越少,饲料利用率越低。故实际生产中应注意粗纤维的适宜添加水平。

添加外源酶制剂可使细胞壁中的纤维素、半纤维素和果胶等降解成小分子的片段,细胞壁中复杂交联结构受到破坏,使细胞壁包裹的各种营养物质充分释放出来,同时也降低食糜粘度,营养物质和肠道内的消化酶充分接触,从而提高各种养分的消化率,动物的生长性能也得到提高。酶的作用是酶与底物的互动,因而要求二者有适宜的比例关系。对于一定的底物,酶的添加量少,作用效果不佳;添加量过多,不仅造成酶的浪费,而且产生负面影响。韩正康(2000)报道,酶添加量高达日粮的 1%时,饲料利用率下降,增重降低。关于添加过量酶制剂降低生产性能和养分利用率的机理目前尚不清楚,其原因可能是添加过量酶制剂影响了家禽消化道的结构(Steenfeldt,1998)。Iji(2001)研究表明,在肉鸡小麦日粮中添加高剂量的酶制剂可使肉鸡小肠的绒毛高度和表面积显著降低,进而导致营养物质的吸收率降低。有人认为添加过量酶制剂会干扰内源性酶分泌,从而使养分利用率和生产性能下降。但 Inborr(1990)认为,从酶动力学角度考虑,外源酶制剂大多由细菌或真菌发酵而来,其自身结构及环境要求均有利于动物内源酶,不太可能出现“反馈抑制”。而且最近研究表明,外源酶的添加对内源酶的分泌有促进作用(许梓荣,2003;王敏奇,2003;Onderci,2006)。过量酶制剂的添加会产生多聚糖和寡糖等新的抗营养因子,不仅可以提高食糜的粘度(Zyla等,1999;Hughes,2000;Kocher,2000),还可以促进消化道后端有害微生物的繁殖(Vahjen,2005),这也可能是过量酶制剂降低生产性能和养分利用率的原因之一。关于添加过量酶制剂对养分利用率的影响,原因尚需进一步探讨。

4 结论

粗纤维和酶制剂水平为 5.098%和 0.258%时,平均日增重取得最大值 43.38 g;粗纤维和酶制剂水平为 4.741%和 0.241%时,料重比取得最小值 2.01。

(参考文献 42 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:张学智, mengzai007@163.com)

高效液相色谱法测定 牛初乳中 IgG 含量的方法研究

马燕芬 陈志伟 魏晓兵 王心刚

摘要 采用高效液相色谱法对牛初乳中 IgG 含量进行测定,并与琼脂双扩散法进行比较,筛选出一种快速、精确测定 IgG 含量的方法。在牧场(非热应激条件,平均温度-10℃)随机选取 7 头体况良好、体重、胎次、产奶量及分娩日期都相近的黑白花奶牛作为试验研究对象。分别在母牛分娩后不同时间内收集乳样,用液氮冷冻,然后于-70℃的冰柜中保存,分析测定时再进行解冻,分别用琼脂双扩散法和高效液相色谱法测定牛初乳中 IgG 效价和含量。结果表明:①选用反相键合相色谱柱 ZORBAX 300SB—C18,流动相 0.02 mol/l PBS(pH 值 6.8)与乙腈的比例为 95%:5%时,初乳各成分分离效果达到最佳;②选择流速为 0.2 ml/min 时,初乳蛋白组分得到有效分离。与琼脂双扩散法相比,高效液相色谱法测定牛初乳中 IgG 含量具有分析速度快、灵敏度和精确度高、分离效果好、回收率高等优点。

关键词 高效液相色谱;牛初乳;免疫球蛋白 G

中图分类号 Q512+.2

牛初乳通常是指奶牛分娩后 7 d,特别是 3 d 内所分泌的乳汁。目前牛初乳作为一种功能性食品的原料已经受到普遍关注,它的特殊性首先体现在其化学组成及活性物质的含量上。因此如何检测其活性物质含量是目前亟待解决的课题,我们提出以牛初乳中最重要免疫成分 IgG 为活性物质指标进行检测。牛初乳免疫球蛋白(Ig)总量约为 50~100 mg/ml,其中 80%以上是 IgG。免疫系统发育不健全的新生犊牛吸收的 IgG 以未消化的状态直接通过肠壁进入血液而获得被动免疫,这种被动免疫可保护犊牛免受外来疾病的侵袭。目前测定 IgG 含量的方法主要有:单向免疫扩散法、琼脂双扩散法、超滤法、酶联免疫吸附法、放射免疫法、火箭免疫电泳法、颗粒荧光检测技术、化学发光自显影法、紫外分光法等,其中液相色谱分离法具有分析速度快、样品用量少、灵敏度高、分离和测定一次完成,易于实现自动化,可在工业流程中应用等优点。并且液相色谱对其它生物成分的分析也存在广阔的应用空间。完善该方法对生物成分分析和物质鉴定具有巨大的借鉴和应用意义。特别是对免疫球蛋白这种具有特殊抗体活性的蛋白,把它从富

含众多蛋白的牛初乳中分离出来对其它蛋白质的分离具有重要参考价值。本文采用高效液相色谱法对牛初乳中 IgG 含量进行测定,并与琼脂双扩散法进行比较,从而筛选出一种快速、精确的测定 IgG 含量的方法。

1 材料与方法

1.1 试验乳样采集

在牧场(平均温度-10℃)随机选取 7 头体况良好、体重 600~650 kg、胎次为 3~4 胎、产奶量和分娩日期相近的黑白花奶牛作为试验研究对象。分别于母牛分娩后 72 h 内每隔 8 h 收集一次奶样,以后每天收集一次,共收集 7 d。奶样用液氮冷冻,然后于-70℃冰柜中保存,分析测定时解冻。

1.2 仪器、试剂及色谱分离条件

1.2.1 仪器

HP1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);反相键合相色谱柱 ZORBAX Poroshell 300SB—C18(75 mm×2.1 mm i.d.,粒度 5 μm,孔径 300 Å)、ZORBAX 300SB—C18(100 mm×2.1 mm i.d.,粒度 5 μm,孔径 300 Å)(美国 Agilent 公司);紫外检测器(VWD)(美国 Agilent 公司);0.45 μm 微孔滤膜(型号 GHP ACRODISC,美国 PALL 公司);超纯水机(型号 AKF Pcfic,美国 AKF 公司);Biofuge Stratos 低温高速离心机(德国 Heraeus 公司);超声波振荡器(SK5200LH 江苏扬中市电子器材公司);六孔梅花打孔器(孔径 3.5 mm,孔间距 3 mm)。

1.2.2 试剂

标准牛 IgG,每毫升含牛 IgG 10 mg,纯度>95%

马燕芬,内蒙古农业大学动物科学与医学学院,010018,内蒙古呼和浩特市昭乌达路 306 号。

陈志伟、魏晓兵,山东理工大学分析测试中心。

王心刚,山东理工大学生命科学院。

收稿日期:2006-11-13

★ 山东省自然科学基金(奶牛热应激的补偿生长机制研究,2004ZX27)

(美国 Sigma 公司); Na_2HPO_3 (AR); NaH_2PO_3 (AR); 乙腈(色谱纯)(德国 Merck KgaA 公司); NaN_3 (AR); 兔抗牛 IgG 血清(效价比为 1:32)(哈尔滨骆家军乳品研究所); 盐酸(AR); 琼脂糖(电泳级); 氯化钠(AR); 1% 硫柳汞。

1.2.3 色谱分离条件

流动相为 0.02 mol/l 磷酸缓冲液 (PBS)(pH 值 6.8)和乙腈; 进样量为 10 μl ; 检测波长: 280 nm; 操作温度为室温。实验用的水、流动相均经过预处理, 即先用 0.45 μm 孔径滤膜过滤, 再经过超声波脱气 30 min。

1.3 测定方法

1.3.1 琼脂双扩散法对牛初乳 IgG 效价的测定

① 平板制备: 取 1.0 g 琼脂糖, 加 PBS 100 ml, 置沸水浴中充分溶解后, 加 1.5 ml 硫柳汞混匀, 取 20 ml 此液倒于水平放置平皿中, 凝固后贮于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

② 打孔: 以平板中心为圆心, 用打孔器沿周边打孔 7 个, 中心打孔一个, 用针挑出孔内琼脂, 在酒精灯火焰上方加热封底。

③ 标准牛 IgG 标记: 中心孔加入 21 μl 一定稀释浓度兔抗牛 IgG, 周边孔加入 21 μl 一定稀释比例的标准牛 IgG。

④ 培养: 加样完毕, 静止几分钟后倒置于湿盒中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱水平放置。

⑤ 观察和计量: 于过夜或 24 h 后观察标准牛 IgG 出现的阳性最大稀释度。

⑥ 样品检测: 样品经适当稀释后, 按上述同样操作, 按下式确定样品 IgG 含量。

$\text{IgG 含量 (mg/ml)} = \text{样品阳性最大稀释度} \times \text{标准牛 IgG 含量} / \text{标准牛 IgG 阳性最大稀释度}$

1.3.2 高效液相色谱法对牛初乳 IgG 含量的测定

① 初乳清的制备: 牛初乳在 5 000 r/min(4 $^{\circ}\text{C}$)条件下离心 30 min 去除乳脂肪, 脱脂初乳在 4 000 r/min(4 $^{\circ}\text{C}$)条件下离心 35 min, 弃去上层的残余油脂和底部的酪蛋白沉淀, 得到初乳清。测定时需经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 然后上机分析。

② IgG 标准储备液: 称取 IgG 标准品 5 mg(精确至 0.000 1 g), 用流动相溶解并定容至 5.0 ml, 充分摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤。此液含 1.0 mg/ml IgG。

③ IgG 标准系列溶液: 以 IgG 标准储备液, 用流动相稀释成分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/ml 的标准系列, 平衡进样 3 次, 每次进样 10 μl , 记录色谱峰面积, 以峰面积为横坐标, 样品浓度增量为纵坐标绘制

标准曲线。

1.4 准确度与精密度试验

准确度试验: 称取同一样品 6 份, 3 份测本底值, 3 份添加不同浓度 IgG 标准溶液, 扣除本底均值, 计算平均回收率。

精密度试验: 称取同一样品 3 份, 测均值, 计算标准差、变异系数(CV)。

1.5 数据分析

试验数据利用 Excel 2000 及 SPSS 软件包进行处理。

2 结果与分析

2.1 琼脂双扩散法对 IgG 效价的测定

2.1.1 琼脂双扩散法精密度试验

准确量取 1.00 ml 初乳样品(记录样品实际重量), 平行称样 3 份, 测定 IgG 效价, 计算 IgG 效价变异系数, 结果见表 1。

表 1 牛初乳 IgG 效价精密度试验(n=3)

初乳样品	效价(U)	平均值(U)	标准差	CV(%)
1.00 ml	33 000			
1.00 ml	32 000	32 000	1 000	3.13
1.00 ml	31 000			

从表 1 可知, 该方法测定的牛初乳变异系数 CV 为 3.13%, 小于 5%, 符合要求。

2.1.2 琼脂双扩散法回收率试验

按照吴继尧等(2001)的方法进行回收率试验。试验重复 9 次, 结果显示: 阳性 8 次, 阴性 1 次, 回收率为 88.89%。

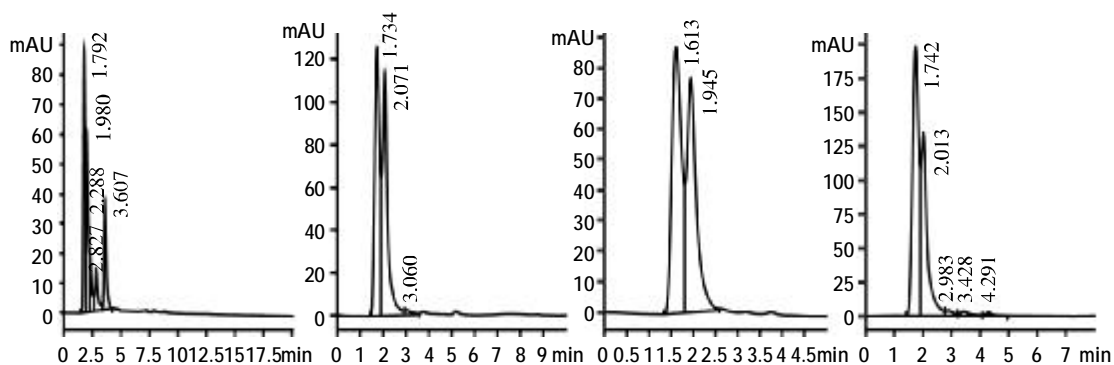
2.2 高效液相色谱法对 IgG 含量的测定

2.2.1 色谱柱 ZORBAX 300SB—C18、流动相及流速的选择

选择反相键合色谱柱 ZORBAX 300SB—C18, 流动相 0.02 mol/l PBS(pH 值 6.8)与乙腈的不同比例及不同流速, 对初乳蛋白组分进行分离, 见图 1、图 2。

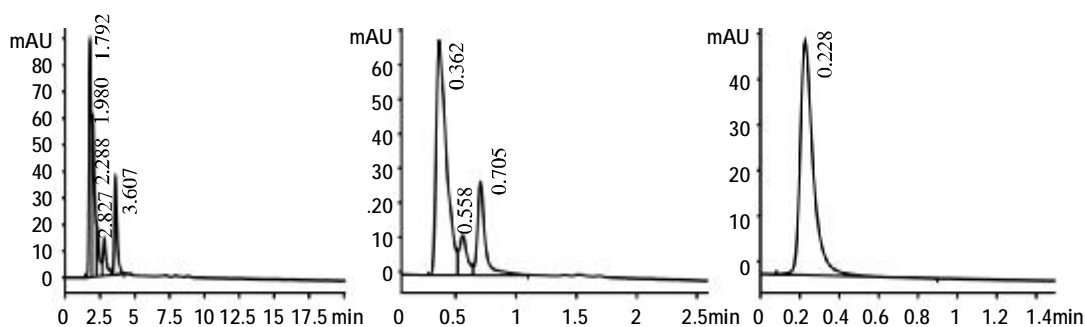
由图 1 可知, 当流动相为 PBS 与乙腈的比例为 95%:5%时, 初乳蛋白组分分离效果最好, 随着乙腈的增多在本柱上初乳蛋白受乙腈的影响越来越大。因此, 选择 PBS 和乙腈的比例为 95%:5%时作为色谱柱 ZORBAX 300SB—C18 的流动相。

由图 2 可知, 当流动相流速为 0.2 ml/min 时, 初乳蛋白组分可分离; 而当选择流速为 0.5 ml/min、1.0 ml/min 时, 初乳蛋白组分并未得到有效分离, 且峰面积逐渐降低。因此, 选择流速 0.2 ml/min 为色谱柱 ZORBAX 300SB—C18 的流速。



注:从左到右依次表示流动相 PBS 与乙腈的比例为 95% : 5%、85% : 15%、75% : 25%、65% : 35%对牛初乳的分离度。

图 1 不同 PBS 和乙腈的比例对牛初乳的分离度



注:从左到右依次表示流动相流速为 0.2、0.5、1.0 ml/min 时对牛初乳的分离度。

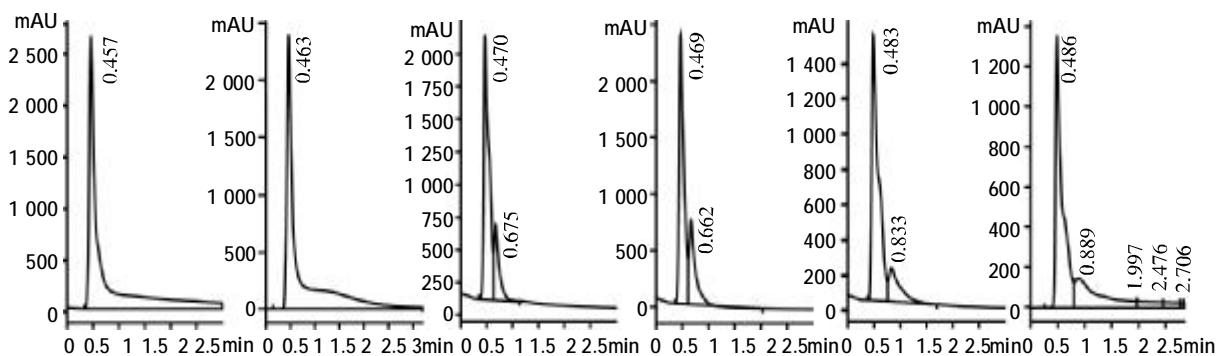
图 2 不同流速对牛初乳的分离度

2.2.2 色谱柱 ZORBAX Poroshell 300SB-C18、流动相及流速的选择

选择反相键合色谱柱 ZORBAX Poroshell 300SB-

C18,流动相 0.02 mol/l PBS(pH 值 6.8)与乙腈的不同比例及不同流速,对初乳蛋白组分进行分离,见图 3、图 4。

由图 3 可知,当流动相为 PBS 与乙腈的比例为

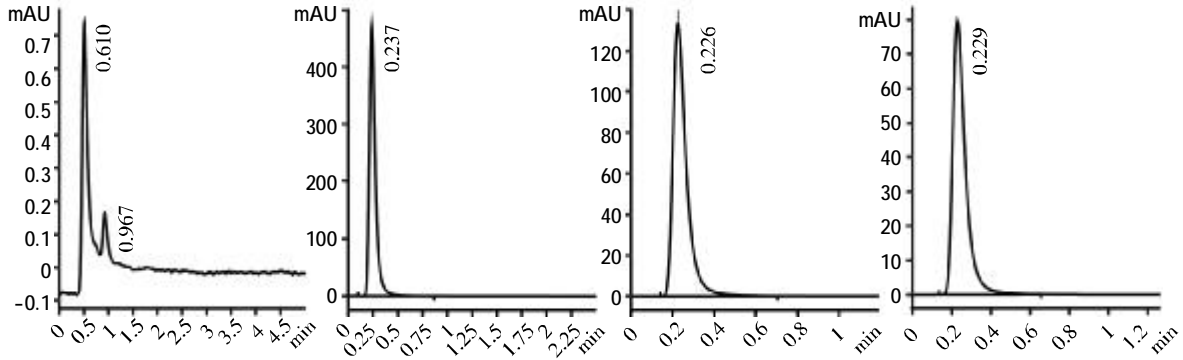


注:从左到右依次表示 PBS 与乙腈的比例分别为 100%、90% : 10%、80% : 20%、70% : 30%、60% : 40%、50% : 50%时对初乳的分离度。

图 3 不同 PBS 和乙腈的比例对牛初乳的分离度

100%、90% : 10%时,初乳蛋白组分没有完全分开;当 PBS 与乙腈的比例为 80% : 20%、70% : 30%、60% : 40%、50% : 50%时,蛋白组分都得到分离;且当比例为 70% : 30%时,蛋白组分分离效果最佳。因此,选择 PBS 和乙腈的比例为 70% : 30%时作为色谱柱 ZORBAX Poroshell 300SB-C18 的流动相。

由图 4 可知,不同流速对 IgG 在色谱柱上的分离情况是不同的。当选择流速为 0.5 ml/min 时,出现两个峰。当选择流速为 1.2、1.5 ml/min 时,初乳蛋白组分并未得到有效分离,且峰面积逐渐降低。因此,选择流速 0.5 ml/min 为色谱柱 ZORBAX Poroshell 300SB-C18 的流速。



注:上图从左到右依次表示流动相流速为 0.5、1.0、1.2、1.5 ml/min 时对牛初乳的分离度。

图 4 不同流速对牛初乳的分离度

综合比较两根柱子的色谱图,最为理想的色谱条件为 ZORBAX 300SB-C18 色谱柱,流动相 PBS 和乙腈的比例为 95% : 5%,流速为 0.2 ml/min。

2.2.3 IgG 标准曲线的绘制

精确称取适量 IgG 标准品,按照免疫球蛋白标样的方法配成系列浓度的标准品溶液(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/ml),每个浓度进样 3 次,每次进样 10 μl,以样品浓度增量为纵坐标,峰面积为横坐标,进行回归分析(见图 5)。选择二次回归曲线和回归方程为 IgG 标准品标准曲线: $Y=0.0782+0.0013X+3.2\times 10^{-7}X^2$, 相关系数 $R=0.9951(P<0.01)$ 。

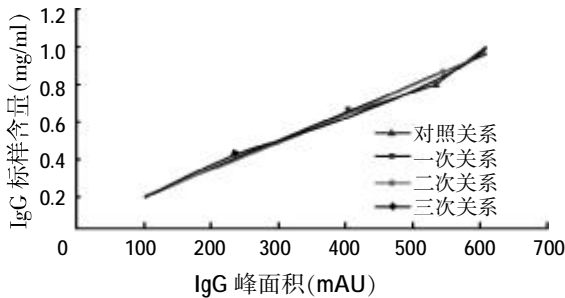


图 5 IgG 标准品的标准曲线

从图 5 可以看出,IgG 标准品浓度在 0.2~1.0 mg/ml 范围内,峰面积与浓度呈现良好的线性关系。

2.2.4 高效液相色谱法精密度试验

取浓度为 0.8 mg/ml 的对照品溶液,按 HPLC 色谱条件连续进样 3 次,记录峰面积,测定结果见表 2。

表 2 高效液相色谱法精密度试验

IgG 浓度(mg/ml)	峰面积(mAU)	平均值(mAU)	标准差	CV(%)
	533.0			
0.8	532.7	533.17	0.57	0.11
	533.8			

从表 2 可知,该测定方法的变异系数 CV 为 0.11%,小于 5%,符合测定要求。

2.2.5 高效液相色谱法回收率试验

精确量取同一份已知含量的样品 1 ml,共 6 份。其中 3 份用于测本底值;另外 3 份添加不同浓度的 IgG 标准溶液,按上述样品处理方法处理样品。分别取 10 μl 进样,每个样品重复 3 次,按峰面积计算回收率。结果见表 3。

从表 3 可以看出,利用该法测定牛初乳中 IgG 含量,测定结果较好,平均回收率为 99.96%,CV 为 0.06%。

表 3 高效液相色谱法回收率试验(n=3)

样品中 IgG 的量(mg/ml)	加入 IgG 标品的量(ml)	峰面积(mAU)	回收率(%)	平均回收率(%)	CV(%)
3.93	1.00	4.012	99.89		
3.93	1.00	4.052	99.99	99.96	0.06
3.93	1.00	4.092	99.99		

2.3 高效液相色谱法与琼脂双扩散法相关关系

对牛初乳 72 h 内 IgG 含量与 IgG 效价的原始数据进行相关关系分析,并在此基础上作曲线拟合(见图 6)。

由牛初乳 72 h 内 IgG 含量与 IgG 效价的原始数据进行相关关系分析可知,牛初乳 72 h 内 IgG 含量

与 IgG 效价的相关系数为 $R=0.9800(P<0.05)$,说明牛初乳 72 h 内 IgG 含量与 IgG 效价之间具有高度正相关关系。在高度相关关系的基础上,对牛初乳 72 h 内 IgG 含量与 IgG 效价作曲线拟合进一步验证。试验得到三条曲线,根据曲线估计过程、显著性检验($Sig_{Cubic}=Sig_{Quadratic}=Sig_{Linear}=0.00<0.01$)和线性相关系数($R_{Cubic}>$

$R_{\text{Quadratic}} > R_{\text{Linear}}$), 选择三次回归曲线和回归方程作为牛初乳中 IgG 含量与 IgG 效价的方程: $Y = -5.72 \times 10^{-4} X + 3.25 \times 10^{-7} X^2 - 7.57 \times 10^{-12} X^3 - 7.10$, 相关系数 $R = 0.993 0$ ($P < 0.01$)。因此高效液相色谱法与琼脂双扩散法之间具有高度相关性。

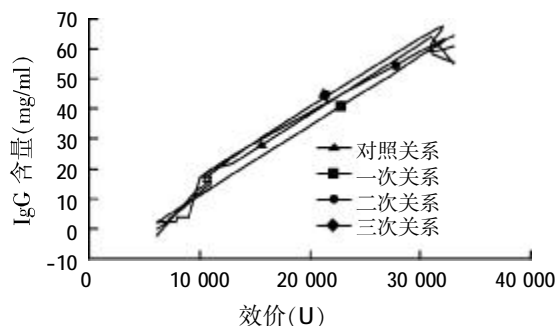


图6 牛初乳 72 h 内 IgG 含量与 IgG 效价的曲线拟合

2.4 非热应激生产条件下奶牛产犊后 7 d 内初乳 IgG 含量变化

取同一份样品,分别按照上述建立的方法进行测定,每个指标平行测定 3 次,取其平均值,结果如表 4 及图 7 所示。

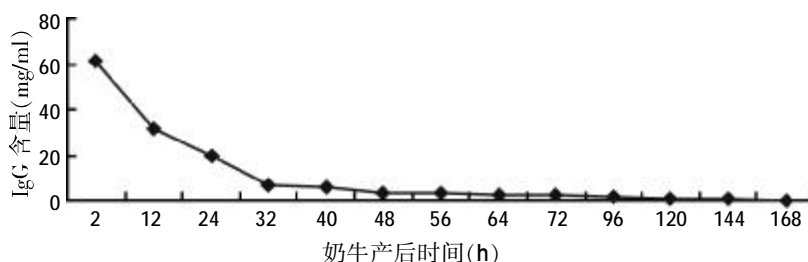


图7 非热应激生产条件下牛初乳 IgG 含量随时间的动态变化

2 h 为最高,差异极显著($P < 0.01$),初乳中 IgG 在较短时间内达到高水平对于犊牛尽快提高自身免疫力,适应外界环境是至关重要的。之后随着奶牛分娩时间的延长而递减,其中在 24 h 内递减迅速,下降了 68.75%,差异显著($P < 0.05$);48 h 以后递减缓慢,差异不显著($P > 0.05$);72 h 以后仍呈下降趋势,但变化趋于平稳,差异不显著($P > 0.05$)。递减速率依次为 24 h 内 $> 24 \sim 48 \text{ h} > 48 \sim 72 \text{ h}$ 。至 144 h 时 IgG 含量已接近常乳水平。所以生产初乳制品应以 72 h 内初乳为最佳。

3 讨论

从以上试验中 IgG 含量和 IgG 效价的相关关系和曲线分析结果可知,高效液相色谱法与琼脂双扩散法不仅具有高度的正相关关系,而且具有较好的曲线拟合关系。琼脂双扩散法是在琼脂糖凝胶介质中,在

表 4 非热应激生产条件下奶牛产犊后 7 d 内初乳 IgG 含量变化($n=7$)

奶牛产后时间(h)	牛初乳 IgG 含量(mg/ml)
2	61.48±2.93 ^a
12	31.32±3.45 ^c
24	19.21±2.14 ^c
32	6.83±0.11 ^e
40	6.24±0.65 ^e
48	3.81±0.08 ^f
56	3.47±0.95 ^f
64	2.74±0.09 ^f
72	2.17±0.12 ^g
96	1.81±0.05 ^h
120	1.22±0.05 ^h
144	0.77±0.05 ^h
168	0.30±0.00 ^h

注:表中同一列肩标相同字母表示差异不显著($P > 0.05$);相邻字母表示差异显著($P < 0.05$);相间字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

由表 4 和图 7 可知,奶牛分娩后的前 40 h,初乳中 IgG 含量很高,48 h 以后呈下降趋势。研究表明,第一天牛初乳 IgG 含量为 50~100 mg/ml,常乳 IgG 含量约为 0.5 mg/ml,试验测定结果与文献值吻合。从测定结果看,随着奶牛泌乳期的延长,IgG 含量呈明显下降趋势。非热应激生产条件下牛初乳中 IgG 含量以产后

一定的 pH 值和离子强度下,可溶性的抗原和抗体在介质中相向扩散,至相对应性抗原和抗体适合比例时,则可出现免疫沉淀线,再根据沉淀线的种类和特点,鉴别抗原和抗体的性质异同。运用琼脂双扩散法测定 IgG 的精密度和回收率分别为 3.13%、88.89%,与吴继续运用此法测定 IgG 的精密度和回收率较为相近。但琼脂双扩散法测定所需时间较长,且 IgG 的生理活性在加样扩散这一步因为培养箱的温度高而会有不同程度的损失,所需样品用量大。此外,琼脂双扩散法的测定值不能准确反应出被检测样品的原始数据,而且也不能用于准确定量,限制了对 IgG 含量准确测定的基础性研究。

高效液相色谱法是根据被测组分在固定相与流动相之间的吸附能力、分配系数、离子交换作用或分子尺寸大小的差异进行分离,即样品分子与流动相

及固定相的作用,作用力的大小决定色谱过程的保留行为。即被测组分在固定相与流动相之间的相互作用而进行分离,是一种非免疫学方法。高效液相色谱法所需样品用量少,仅需几微升,在前处理和上机分析时所用时间短。而且在前处理过程中 IgG 活性损失少,检测出来的是与 IgG 具有色谱行为相似的免疫球蛋白,高效液相色谱法也可用于对 IgG 的定量分析。因此,与琼脂双扩散法相比,高效液相色谱法具有分析速度快、分离效果好、精密度和回收率高、所需样品用量少、分离和测定一次完成、易于自动化等优点。

比较 ZORBAX Poroshell 300SB-C18 和 ZORBAX 300SB-C18 两根色谱柱的分离效果。ZORBAX 300SB-C18 柱明显优于 ZORBAX Poroshell 300SB-C18 柱,因为 ZORBAX Poroshell 300SB-C18 柱为快速分离蛋白柱,其填料与蛋白的表面作用力要明显低于非快速柱,而蛋白的色谱行为关键就在于蛋白与流动相和固定相之间的作用力,若这种力被降低则会大大降低柱效。ZORBAX Poroshell 300SB-C18 柱相比 ZORBAX 300SB-C18 柱对蛋白的保留作用很差,所以分离效果不佳。

两根色谱柱都采用 C18 填料,虽然这种填料对小分子来说很大,小分子可以在流动相和固定相之间进行分配。但对分子量高达 150 000 的免疫球蛋白来说,C18 的分子链则显得就很小了,蛋白对固定相之间的作用力也不会很强,这就要求必须降低流动相与样品之间力的大小。由于蛋白表面有亲水性基团,所以当减少流动相中的水相,并加入一定比例的有机相后会改善蛋白在色谱柱中的弱保留行为。通过对 ZORBAX Poroshell 300SB-C18 柱的有机相和水相的调节证明了以上的推论。但是这种改善也是在一定范围内有效,要想利用色谱对蛋白进行充分的分离就必须寻找对所分离的各种蛋白具有不同亲和作用力的固定相,然后选择调节流动相进行分离。因此,利用免疫球蛋白的抗原性制造对免疫球蛋白有特殊保留机制的亲蛋白柱会比本试验所用的柱子效果更好。

流动相对分离测定 IgG 含量影响较大。在本试验中对于两根柱子,当流动相为 100%PBS 时,初乳蛋白组分没有分开,当在 PBS 液中呈梯度的增加乙腈的比例时,蛋白组分都得到有效分离。这是因为水的极性很强,当流动相为 100%PBS 时,亲水蛋白和流动相的作用力很强,导致所有蛋白在色谱柱上的

保留时间很短,几乎同时出现在同一个色谱峰上。所以当在流动相中呈梯度的增加极性弱的乙腈的比例时,就会降低整个流动相与蛋白的亲水性,使不同蛋白在色谱柱上呈现不同的保留时间,从而使其得以很好的分离。因此,对于 ZORBAX Poroshell 300SB-C18 柱和 ZORBAX 300SB-C18 柱,当流动相中 PBS 与乙腈的比例分别为 70% : 30% 和 95% : 5% 时,蛋白组分分离得到最佳。

通过比较不同流速所检测到的峰面积表明,当流速越慢时所检测到的峰面积越大,根据试验结果推断,可能是因为蛋白质作为氨基酸的聚合物,对 280 nm 紫外光有吸收值的是几种含双键的氨基酸,蛋白通过检测器流通池时,如果速度过快,蛋白中的一些氨基酸并未完全吸收紫外光,造成因流速加快而峰面积降低的原因。所以当用紫外检测器对蛋白进行检测时,保持流动相在统一的流速下进行,否则不同的数据之间没有可比性。

采用上述建立的高效液相色谱法测定非热应激条件下牛初乳 IgG 含量,结果表明,母牛产犊后 7 d 内,乳汁中 IgG 含量变化很大,其中 2、12、24、48、72 h 的初乳中 IgG 平均含量分别为 61.48、31.32、19.21、3.81 和 2.17 mg/ml,与张和平和吴继绕的测定结果接近。到第 6 d 时已降到常乳水平。因此,本试验所建立的高效液相色谱法对牛初乳中 IgG 含量的测定具有特异性强、精密度和回收率高、所需样品用量少等优点,在试验室和企业中测定免疫活性物质含量均具有一定的实用性。

4 结论

牛初乳主要功能性组分是免疫球蛋白,而 IgG 又占总 Ig 的 80% 以上,所以具有免疫活性的 IgG 含量是衡量初乳及其制品的主要质量指标。结论如下:

① 选用反相键合色谱柱 ZORBAX 300SB-C18,流动相 0.02 mol/l PBS (pH 值 6.8) 与乙腈的比例为 95% : 5% 时,初乳各成分分离效果达到最佳。

② 选择流速为 0.2 ml/min 时,初乳蛋白组分得到有效分离。

③ 与琼脂双向免疫扩散法相比,高效液相色谱法测定 IgG 含量,具有分析速度快、灵敏度和精确度高、分离效果好、所需样品用量少等优点。

(参考文献 8 篇,刊略,需者可函索)
(编辑:崔成德, cuicengde@tom.com)

甲基紫催化光度法测定饲料中的微量碘

孙德辉 陈忠良

摘要 在磷酸介质中,微量碘离子与碘酸钾氧化反应能催化甲基紫褪色,而且褪色程度与碘离子的量有关,最大吸收波长在 575 nm,在 0~2 μg/ml 范围内呈线性关系。测试方法检测限为 0.062 μg/ml,回收率为 96.7%~99.3%。用于饲料中微量碘的测定,结果令人满意。

关键词 碘;饲料;甲基紫;催化光度法

中图分类号 O613.44

Spectrophotometric determination of micro iodine in feed by catalytic color fading of methyl violet

Sun Dehui, Chen Zhongliang

Abstract It is found that in the medium of H₃PO₄, the fading reaction of Methyl violet is quickened by IO₃⁻ with the presence of micro iodine. The fading of methyl violet is found to be directly proportional to the amount of iodinate, and linear range is 0~2 μg/ml. The Maximum absorption is at 575 nm and the detection limit is 0.062 μg/ml. The recovery is 96.7%~99.3%. The application of this method to analysis of feed gives satisfactory results.

Key word iodine; feed; methyl violet; catalytic spectrophotometry

饲料中含碘量的多少会直接影响家畜的生长发育。碘是动物不可缺少的重要元素,它的主要功能是参与甲状腺素的合成。关于饲料中碘的测定方法有淀粉显色法、硫氰酸铁催化动力学法等,利用甲基紫催化光度法的测定未见报道。试验表明,在磷酸介质中,碘酸钾在碘离子存在下发生的氧化反应,能催化甲基紫褪色,并且在 0~2 μg/ml 范围内线性关系良好,具有使用试剂数量少、操作简便快速等优点,适用于饲料中微量碘的测定。

1 材料与方 法

1.1 仪器

Lambda 40 分光光度计(美国 PE 公司)、烘箱、马福炉、数显恒温水浴锅、分析天平、镍质坩埚、25 ml 带刻度线比色管等。

1.2 试剂和溶液

碘标准溶液:准确称取经 120 °C 干燥 2 h 后于玻璃干燥器中冷却至室温的碘化钾 0.130 8 g,加水溶解后定容至 100 ml,配成 1.00 mg/ml 的储备液。碘工作溶液为稀释至 10 μg/ml 的使用溶液,避光可存放一周有效。

4%碘酸钾溶液、1%磷酸溶液、0.004%甲基紫溶

液、30%碳酸钾溶液、1%硫酸锌溶液。以上溶液均由分析纯试剂及符合分析试验要求的蒸馏水配制而成。

1.3 试验方法

在两支带刻度线的 25 ml 比色管中,分别依次加入 1%的磷酸溶液 3.0 ml、4%碘酸钾溶液 2.0 ml、0.004%甲基紫溶液 3.0 ml,在其中一支管中准确加入适量(3~5 ml)的碘工作溶液,将两支管加水至刻度线,摇匀,放置沸水浴中加热 10 min 后取出,流水冷却至室温,用 1 cm 比色皿,以水为参比,于 575 nm 波长处分别测定两支比色管的吸光度 A₀ 和 A,并计算 $\Delta A = A_0 - A$,式中 A₀ 为甲基紫+磷酸+碘酸钾;A 为甲基紫+磷酸+碘酸钾+碘工作液。

2 结果与讨论

2.1 吸收波长的选择

按试验方法扫描绘制两支比色管溶液的吸收曲线如图1所示。

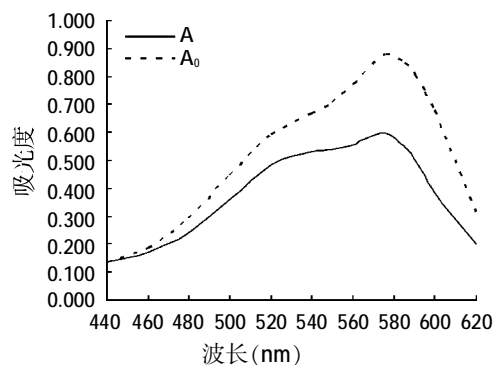


图1 两支比色管溶液的吸收曲线

孙德辉,福建省中心检验所,350002,福建省福州市杨桥西路山头角 121 号。

陈忠良,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-23

图 1 中曲线 A₀ 和曲线 A 均在 $\lambda=575\text{ nm}$ 处有最大吸收,且 ΔA 值在此处最大,故选用 575 nm 作为测定波长。

2.2 磷酸用量

试验表明,磷酸溶液的用量在 2.4~3.6 ml 之间 ΔA 值都较大且稳定,故选用 3.0 ml。

2.3 甲基紫用量

甲基紫溶液在褪色反应过程中作为指示物,其用量需精确移取。试验表明,加入量在 2.0~4.0 ml 时 ΔA 值最大,考虑到试验的灵敏度和准确度,本研究选用 3.0 ml。

2.4 反应温度及时间的选择

试验表明,在温度低于 50 °C 时,催化褪色反应十分缓慢,而在 100 °C 水浴中加热 5~20 min 可实现 ΔA 值最大,在流水冷却至 50 °C 以下时可终止反应,冷却至室温后溶液吸光度可保持 2 h 稳定。

2.5 工作曲线与检测限

准确移取不同量的碘工作溶液,在选定的试验条件下测得工作曲线在 0~2 $\mu\text{g/ml}$ 范围内具有良好的线性关系,其回归方程为 $\Delta A=0.046\text{ }1\text{C}(\mu\text{g/ml})+0.002\text{ }8$,相关系数为 0.998 9,方法检出限为 0.062 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.6 共存离子的影响

对于常见共存离子的影响,本试验选用 20 μg 碘,

相对误差在 $\pm 5\%$ 范围内验证,试验表明,共存离子允许量: K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 CO_3^{2-} (50 mg); Ca^{2+} 、 Mg^{2+} (1.5 mg); Cu^{2+} 、 Zn^{2+} (0.50 mg); Fe^{2+} 、 Co^{2+} (0.10 mg); Mn^{2+} 、 Pb^{2+} (0.30 mg); 对于 MnO_4^- 、 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 及 ClO_4^- 等会有严重干扰。

3 样品分析

饲料样品的预处理可以按 GB/T13882 中 7.1.1 的办法制取试样溶液。对于预混合饲料,因部分样品存在的高浓度金属离子会对甲基紫产生变色干扰,故本试验选用配合饲料样品进行回收试验。准确移取试样溶液 2.00 ml 置于 25 ml 比色管中,按试验方法测定饲料中的微量碘,结果见表 1。

表 1 样品分析结果(n=3)

样品	测定平均值 ($\mu\text{g/g}$)	加标量 ($\mu\text{g/g}$)	加标测定值 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)
554 中鸡料	0.172	0.150	0.321	99.3
419 产蛋鸭料	0.161	0.150	0.309	98.7
581 产蛋鸡料	0.207	0.150	0.352	96.7

4 小结

以上研究结果表明,采用本文的办法测定饲料中微量无素碘的含量,灵敏度高,操作简便,准确性良好,在饲料的生产和检测实际工作中具有实用价值。

(编辑:崔成德, cuicengde@tom.com)

2007 年“长三角”地区水产动物营养与饲料科技论坛

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: zgyang@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

大豆乳清粉的营养价值及在肉鸡饲料中的饲养试验

刘玉庆 张秀美 武英 孙彩云 尹建忠 毕伟民

随着农产品深加工日趋工业化,大量副产品用于饲料成为饲料营养研究的重要内容。低温豆粕用碱溶法提取大豆蛋白后剩余大量大豆乳清液,经中和后,喷雾干燥得到大豆乳清粉。本试验测定乳清粉的营养价值并通过饲养试验评价乳清粉对肉鸡的饲养效果,以期将乳清粉作为功能性新原料用于幼龄动物饲料配制。

1 材料与方法

1.1 常规营养成分测定

农业部食品质量监督检测中心(济南)按饲料常规方法测定大豆乳清粉营养成分。

1.2 乳清粉中的可溶性糖成分和含量及可溶性蛋白质和肽测定

可溶性糖成分和含量采用 SHIMADZU LC-10AD-VP 高效液相色谱仪进行测定。色谱条件为:Bio-Rad Animex HPX-42C 柱, RID10A 示差折光检测器,流动相为高纯水,流速 0.5 ml/min,进样量 10 μ l。用 Class-VP 6.12 处理软件分析其成分和含量。标准糖为水苏糖、棉子糖、蔗糖、木糖、葡萄糖、果糖(sigma)。

可溶性蛋白质和肽的测定采用 SHIMADZU LC-10ADVP 高效液相色谱仪进行测定。色谱条件为:ShimpackVP-ODS 柱(150 mm \times 4.6 mm),SPDM10A 二极管阵列检测器,以 0.1%三氟乙酸水溶液和甲醇混合液为流动相,采用二元高压梯度洗脱(梯度程序为 0.33~50min,甲醇 10% \rightarrow 90%;5~60 min,甲醇 90% \rightarrow 10%),流速 1.0 ml/min,检测波长 280 nm,进样量 10 μ l。

1.3 肉鸡饲养试验

试验采用单因子随机设计,参照六和集团的家禽营养需要量配制基础日粮(见表 1),不添加大豆乳清粉作对照组日粮;添加 2%大豆乳清粉的作试验组日粮,营养水平相近。

2006 年 7 月 2 日~6 日开始进行饲养试验。临沂六和肉鸡场 13 栋鸡舍,每栋约 1 万只鸡,设 1~6 栋为试验组,7~13 栋为对照组。试验期从 1 日龄到 35 日

龄,饲养管理按《AA 鸡饲养管理手册》进行,自由采食与饮水。每天记录死淘数、耗料量、饮水量、温度、湿度、光照,每周每栋随机抽样 150 只鸡称重,计算生长速度、料重比。每周为一个试验阶段,以栋为单元统计耗料量、体重、死淘数。

表 1 试验饲料配方和营养水平

配方(%)	雏鸡		中鸡		大鸡	
	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组
玉米	608.54	605	633.27	630.27	681.61	671.61
DDGS	10	10	20	20	20	20
猪油	11.56	11.56	26	26.41	33.43	33.43
半去皮豆粕	245.66	237.19	195.25	188.25	97.76	91.76
棉粕	10	10	30	30	45	45
花生粕	40	36	23.26	21.97	36.15	34.93
玉米蛋白粉	30	28	30	23	45	43
食盐	3.06	1.8	3	1.8	3.06	1.8
石粉	11.54	11.21	11.68	11.18	11.47	11.47
磷酸氢钙	17.95	17.95	16.11	16.11	15.34	15.34
氯化胆碱	1	1	0.8	0.8	0.5	0.5
赖氨酸	4.8	4.5	4.66	4.4	6.12	6.12
蛋氨酸	1.5	1.4	1.55	1.35	1.14	1.14
苏氨酸	0.44	0.44	0.58	0.58	0.62	0.62
微生态制剂	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
肉鸡多维	0.4	0.4	0.35	0.35	0.25	0.25
微量元素	2	2	2	2	2	2
玉米豆粕酶	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
盐霉素	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0
阿维拉酶素	0.05	0.05	0.03	0.03	0.03	0.03
大豆乳清粉	0	20	0	20	0	20
合计	1 000	1 000	1 000.04	1 000	1 000.48	1 000
营养水平						
粗蛋白(%)	20.8	20.8	19	19	17	17
ME(MJ/kg)	12.16	12.16	12.58	12.59	12.96	12.98

1.4 统计分析

各项数据均用 SAS 软件进行差异显著性检验。

2 结果与讨论

2.1 乳清粉的营养成分(见表 2)

大豆乳清粉最大的优点是水溶性好,可溶性糖和氨基酸总量较高,且较均衡。氯化钠为 6%,这限制了乳清粉在饲料中的用量,因为全价饲料一般盐分为 0.3%~0.4%,故即使饲料不加盐,乳清粉也不宜超过 5%。微量元素、维生素含量较低,对饲料影响不大。

2.2 乳清粉中的可溶性糖成分和含量、可溶性蛋白质和肽(见图 1、图 2)

大豆低聚糖是大豆中含有的可溶的低分子功能性寡糖,主要由水苏糖四糖、棉子糖和蔗糖等组成。

刘玉庆,山东省农业科学院畜牧兽医研究所,博士,研究员,250100,济南市桑园路 10 号。

张秀美、武英,单位及通讯地址同第一作者。

孙彩云,山东大学微生物技术国家重点实验室。

尹建忠、毕伟民,山东香驰豆业蛋白科技有限公司。

收稿日期:2007-01-10

表2 大豆乳清粉营养成分

检测指标	平均值	检测指标	平均值(%)
总糖(%)	47.59	天冬氨酸	2.8
粗脂肪(%)	0.36	苏氨酸	1.09
能量(MJ/kg)	13.02	丝氨酸	1.325
盐(%)	6	谷氨酸	5.505
水分(%)	5.94	甘氨酸	1.24
灰分(%)	15.17	丙氨酸	1.245
铜(mg/kg)	15.9	胱氨酸	0.115
铁(mg/kg)	349	缬氨酸	1.225
锰(mg/kg)	70.4	蛋氨酸	0.405
锌(mg/kg)	70.2	异亮氨酸	1.215
钙(%)	0.275	亮氨酸	2.015
磷(%)	0.99	酪氨酸	0.965
维生素 D(IU/kg)	7.275	苯丙氨酸	1.405
维生素 E(mg/kg)	1.8	赖氨酸	1.86
尿素酶活性(U)	0.18	组氨酸	0.845
色氨酸(%)	0.49	精氨酸	2.26
脯氨酸(%)	0.82	氨基酸总量	26.83

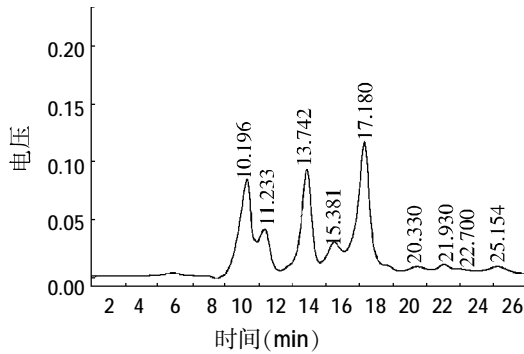


图1 乳清粉中寡糖 HPLC 图谱

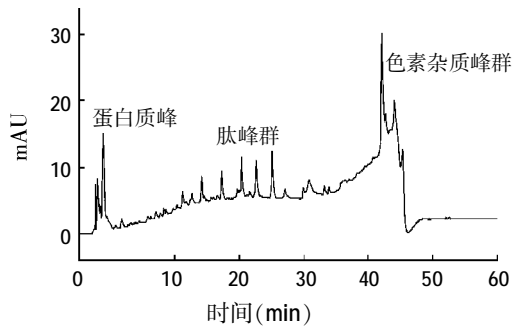


图2 乳清粉中肽和蛋白质 HPLC 图谱

水苏糖和棉子糖不能被人体消化酶分解,而在消化道下部大部分能被双歧杆菌利用,利用率超过果糖低聚糖。大豆低聚糖可使双歧杆菌在肠内含量提高2倍以上,而产气荚膜杆菌和结肠杆菌等肠道有害细菌几乎不能利用大豆低聚糖,因此会受到一定的抑制。试验表明,在温度 90℃、pH 值 3.5 酸性条件下保持 30 min,大豆低聚糖的残存率在 91%以上,蔗糖为 72%,耐受高温制粒和胃酸环境。

由图 1 可知,保留时间 13.742 min 处为水苏糖,占总糖含量的 21.42%;15.381 min 处为棉子糖,占总糖含量

的 7.98%;17.180 min 处为蔗糖,占总糖含量的 33.82%;10.196 min 和 11.233 min 处是聚合度更高的糖,占总糖含量的 30.07%。可见可溶性乳清粉中的可溶性糖(寡糖、蔗糖)占绝大多数,仅检测到少量木糖、果糖。

图 2 为乳清粉中肽和蛋白质分布情况,主要是蛋白质和游离的小肽提取的比较充分。

2.3 乳清粉的饲喂效果(见表 3)

表3 五周龄鸡群生长情况

栋号	入舍时间(月.日)	各周龄体重和饲料消耗(g)					料重比	
		1周	2周	3周	4周	5周		
1	7.2	186	458	820	1 200	1 730	25 520	1.64
2	7.4	182	452	800	1 178	1 742	25 120	1.60
3	7.2	178	449	786	1 210	1 760	25 520	1.61
4	7.2	180	452	800	1 200	1 700	24 960	1.63
5	7.2	185	468	879	1 300	1 774	25 580	1.60
6	7.4	178	448	780	1 140	1 692	24 680	1.62
试验组均值		181	455	811	1 205	1 733	25 230	1.62
7	7.4	163	427	780	1 120	1 610	23 520	1.62
8	7.5	164	424	790	1 078	1 636	23 720	1.61
9	7.5	164	416	755	1 150	1 640	25 360	1.72
10	7.6	176	416	795	1 190	1 730	26 080	1.68
11	7.6	180	417	796	1 172	1 710	25 640	1.67
12	7.6	180	417	780	1 200	1 684	24 720	1.63
13	7.6	180	441	779	1 200	1 680	24 160	1.60
对照组均值		172	422	782	1 158	1 670	24 742	1.65
差值		9	33	29	47	63	488	-0.03

在规范的大规模养殖条件下,乳清粉具有明显的促进生长作用。试验组(1~6 栋)平均体重比对照组(7~13 栋)平均体重逐周增加,到第五周末多增长 63 g,且试验组均匀度好。从料重比看,添加乳清粉使试验组比对照组低 0.03,按同样出栏重 1 700 g 计算,6 万只鸡节省 3 060 kg 饲料,3 t 饲料价值 0.6 万元。

3 结论

大豆乳清粉水溶性好,可溶性糖和氨基酸较均衡,总量分别高达 47.59%和 26.83%,其中主要是大豆低聚糖和小肽,这提供了一条廉价的提取大豆低聚糖的新途径。乳清粉能耐受高温制粒和胃酸环境,在使用中比益生菌更有优势。目前国内其它类型的低聚糖,如低聚果糖、低聚麦芽糖等销售形势都比较好,随着大豆深加工的规模扩大,大豆乳清粉将有更广阔的市场前景。

试验结果表明,乳清粉具有明显的促生长作用,能改善肉肉比和生长整齐度,10 万只肉鸡可节省饲料成本 1 万元。将乳清粉的营养成分代入饲料原料数据库,从饲料配方成本计算看,乳清粉饲用价值在 2 000~2 500 元/t。乳清粉也存在一些问题,在使用中需要注意:乳清粉中氯化钠为 6%,这需要通过配方调节,饲料中不再加盐,乳清粉不宜超过 5%;另外乳清粉含糖量高,容易吸潮结块,需要密封保存,并尽快使用。

(编辑:张学智, mengzai007@163.com)

不同能量水平日粮对肉杂817生长性能的影响

陈小鸽 王彩玲 刘应鹏 梅红

摘要 选择1日龄的肉杂817雏鸡540只,随机分为3组(I组、II组和III组),分别饲喂3种能量水平不同的肉鸡全价料,饲养至49日龄,分别在7、14、21、49日龄时称重,并记录采食量。结果表明:①体重变化在7、14日龄三组差异不显著($P>0.05$);21日龄II组和I组体重差异不显著($P>0.05$),II组和III组、III组和I组之间差异均显著($P<0.05$);49日龄III组和I组差异显著($P<0.05$),II组和III组、II组和I组之间差异均不显著($P>0.05$)。②前期采食量三组之间差异不显著($P>0.05$);后期采食量II组和III组差异显著($P<0.05$),而I组和III组、II组和I组之间差异均不显著($P>0.05$)。③I组、II组和III组全程料重比分别为2.07、2.07和1.99。综合比较III组效果最优。

关键词 肉杂817;日粮能量水平;生长性能

中图分类号 S831

众所周知,肉杂817以其肉质好、生长速度快、饲料报酬高等优点,深受广大消费者和养殖户的喜爱,目前它已经成为肉鸡养殖业中的主要品种之一。但对其营养需要和生长性能的研究还相对较少,本文对其生长性能进行研究,以期今后的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验地点和试验时间

2006年7月27日至2006年9月13日在河南宏展农牧集团试验场进行,共计49d。

1.2 试验设计

选择1日龄肉杂817雏鸡540只,随机分成3组,即I组、II组和III组,每组180只,每组内60只设为一个重复。

1.3 饲养管理

进行室内地面平养,每平方米饲养雏鸡11~12只,用锯末作垫料,雏鸡进入后第1周舍内温度在33~34℃,7~29日龄时鸡舍温度在30~31℃,30~49日龄时鸡舍温度在26~28℃。光照采用自然光照和日光灯光照相结合,基本上是采取24h光照。鸡舍通风状况一般,自由饮水,自由采食,22日龄开始换料,由肉鸡前期料更换成肉鸡后期料。每日分早、中、晚3次饲喂(1~3日龄时每日喂4~5次),饲养至49日龄时试验结束。

1.4 免疫和用药

陈小鸽,河南省饲料产品质量监督检验站,450008,河南郑州。

王彩玲,郑州牧业工程高等专科学校。

刘应鹏、梅红,河南宏展农牧集团。

收稿日期:2006-11-06

饲养期间共免疫3次,6日龄时用新城疫+传染性支气管炎二联苗,经点眼、滴鼻途径进行免疫;12日龄时用传染性法氏囊活毒苗经饮水途径进行免疫;21日龄时用新城疫+传染性支气管炎二联苗经饮水途径加强免疫1次。雏鸡进入后在饮水中添加适当的葡萄糖和多维,连续用药1周。饲养过程中根据实际情况分别在饮水中添加相应的药物进行疾病的控制和预防。

1.5 测定指标及方法

试验开始称出壳体重;前期(1~21日龄)在每周龄末于早饲前进行空腹称重;后期(22~49日龄)于49日龄时称重。记录每组每周的采食量。

1.6 日粮组成

试验各期日粮配方及主要营养成分见表1和表2。

表1 试验前期日粮组成及主要营养水平

日粮配方(%)	I组	II组	III组
玉米	62.0	61.0	60.0
豆粕	30.7	30.7	30.8
棉粕	2.0	2.1	2.1
磷酸氢钙	2.1	2.1	2.1
豆油	1.2	2.1	3.0
石粉(面)	1.0	1.0	1.0
肉鸡前期预混料	1.0	1.0	1.0
营养水平			
CP(%)	20.5	20.5	20.5
ME(MJ/kg)	12.12	12.33	12.54
Ca(%)	0.9	0.9	0.9
总磷(%)	0.77	0.76	0.75
可消化蛋氨酸(%)	0.5	0.5	0.5
可消化含硫氨基酸(%)	0.72	0.72	0.72
可消化苏氨酸(%)	0.68	0.68	0.68
可消化赖氨酸(%)	1.0	1.0	1.0

注:豆粕的蛋白含量为46%,棉粕的蛋白含量为42%。表2同。

表 2 试验后期日粮组成及主要营养水平

日粮配方(%)	I组	II组	III组
玉米	63.8	62.6	61.5
豆粕	26.0	26.0	26.2
棉粕	3.5	3.7	3.7
磷酸氢钙	1.7	1.7	1.7
豆油	2.7	3.7	4.6
石粉(面)	1.3	1.3	1.3
肉鸡后期预混料	1.0	1.0	1.0
营养水平			
CP(%)	19.0	19.0	19.0
ME(MJ/kg)	12.54	12.75	12.96
Ca(%)	0.9	0.9	0.9
总磷(%)	0.7	0.7	0.7
可消化蛋氨酸(%)	0.38	0.38	0.38
可消化含硫氨基酸(%)	0.65	0.65	0.65
可消化苏氨酸(%)	0.63	0.63	0.63
可消化赖氨酸(%)	0.9	0.9	0.9

1.7 统计分析

试验数据用 SPSS10.0 统计软件处理,采用单因素方差分析,并用 Duncan's 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同日龄的体重变化(见表 3)

表 3 不同日龄的体重变化(g/只)

日龄	I组	II组	III组
1	34.5	34.5	35.5
7	93.78±4.05	95.75±4.98	100.40±6.16
14	227.18±10.47	231.85±12.23	243.17±12.84
21	421.75±14.09 ^a	424.90±15.31 ^a	447.83±11.90 ^b
49	1 435.00±26.90 ^a	1 450.33±21.58 ^{ab}	1 479.50±19.08 ^b

注:同行肩标字母不同者表示差异显著(P<0.05)。表 5 同。

表 3 中可以看出,在 7 日龄和 14 日龄时,三组之间体重差异均不显著(P>0.05);在 21 日龄时, I 组和 II 组体重差异不显著(P>0.05),而 III 组和 I 组、II 组体重差异均显著(P<0.05);在 49 日龄时, I 组和 III 组体重差异显著(P<0.05),而 II 组和 I 组、II 组和 III 组之间体重差异均不显著(P>0.05)。三组相比较,在不同日龄都以 III 组体重相对较大。

2.2 各阶段的体增重变化(见表 4)

表 4 不同阶段体增重的变化(g/只)

日龄	体增重变化		
	I组	II组	III组
1~7	59.28±4.05	61.25±4.98	64.90±6.16
7~14	136.65±6.85	136.10±7.40	142.78±9.83
14~21	194.83±8.68	193.05±10.83	204.65±13.19
1~21	386.5	385.5	403.5
21~49	1 010.75±38.96	1 009.43±25.95	1 031.68±37.64
1~49	1 396.0	1 406.0	1 452.0

从表 4 中可以看出,在整个饲养周期内,三组之间体增重差异均不显著(P>0.05),以 III 组的体增重相

对偏高些。

2.3 采食量的变化(见表 5)

表 5 不同阶段采食量的变化(g/只)

日龄	I组	II组	III组
1~7	78.90±6.53	74.15±6.66	78.43±6.04
7~14	198.50±8.23	194.75±8.60	205.25±6.16
14~21	327.13±10.82	325.65±16.84	338.48±16.40
1~21	617.5	600.0	621.0
21~49	2 249.00±41.06 ^{ab}	2 295.28±32.03 ^b	2 236.08±21.82 ^a
1~49	2 889.0	2 904.5	2 882.0

从表 5 中可以看出,前期三组之间采食量差异均不显著(P>0.05),相比较而言, II 组的采食量偏少。后期 II 组和 III 组采食量差异显著(P<0.05),而 I 组和 II 组、I 组和 III 组之间采食量差异均不显著(P>0.05), II 组采食量最高。

2.4 料重比的变化(见表 6)

表 6 各阶段的料重比

日龄	I组	II组	III组
1~7	1.33 : 1	1.21 : 1	1.21 : 1
7~14	1.48 : 1	1.43 : 1	1.44 : 1
14~21	1.69 : 1	1.69 : 1	1.66 : 1
1~21	1.60 : 1	1.56 : 1	1.54 : 1
21~49	2.23 : 1	2.24 : 1	2.15 : 1
1~49	2.07 : 1	2.07 : 1	1.99 : 1

从表 6 中可以看出,前期料重比 I 组、II 组和 III 组分别为 1.60、1.56 和 1.54;后期料重比 I 组、II 组和 III 组分别为 2.23、2.24 和 2.15;全期料重比 I 组、II 组和 III 组分别为 2.07、2.07 和 1.99。全期料重比 III 组与 I 组、II 组相比较低 0.08。

2.5 死亡情况(见表 7)

表 7 死亡情况

组别	死亡数(只)				死亡率(%)	
	1周	2周	3周	4~7周	前期	后期
I组	4	1	0	3	2.78	1.71
II组	3	0	1	3	2.22	1.70
III组	0	0	0	3	0	1.67

从表 7 中可以看出,前期 I 组、II 组和 III 组死亡数分别为 5 只、4 只和 0 只,死亡率分别为 2.78%、2.22%和 0%;后期三组各死亡 3 只,死亡率分别为 1.71%、1.70%、1.67%。前期 I 组死亡主要发生在第 1 周龄阶段。

2.6 鸡群观察

试验过程中,随时注意观察鸡群的精神状态、采食量的变化。整个试验过程中,鸡群的精神状态整体上比较好,采食量无异常变化和大的波动。在饲养中

期阶段,鸡群中偶有互啄现象,尤其在有人进入圈舍或遇到其它惊吓时都会有鸡相互追啄。试验每组中都出现 1 只或 2 只僵鸡,生长严重受阻或停滞,应是个体因素或遗传因素所致。鸡群中有个别甩鼻、打呼噜、拉稀现象,尤其在 1~2 周龄甩鼻现象相对较为严重,使用相应的治疗药物后症状慢慢消失。整个饲养周期内没有出现严重疾病。

3 讨论

3.1 能量水平对体重的影响

从本试验结果看,在 1~2 周龄时,三组之间体重差异不显著;在第 3 周龄时,能量水平高的Ⅲ组体重明显高于 I 组和 II 组($P < 0.05$);在后期,高能量组(Ⅲ组)体重明显高于低能量组(I 组),二者差异显著($P < 0.05$),高能组与中能量组(II 组)之间差异不显著($P > 0.05$)。试验结果表明,随着日粮能量水平的提高,肉杂 817 体重呈现增加的趋势。

3.2 能量水平对体增重的影响

从本试验结果看,三组能量水平对肉杂 817 体增重影响差异不显著($P > 0.05$)。但从体增重的数值上看,高能量水平组(Ⅲ组)高于中能量水平组(II 组)和低能量水平组(I 组),II 组和 I 组之间基本相当。结果表明,随日粮中能量水平升高,体增重呈增加趋势,当能量水平达到一定程度时,体增重的效果相对比较明显。

3.3 能量水平对采食量的影响

本试验结果表明,肉鸡前期料中能量水平的高低对肉杂 817 采食量无明显影响;后期采食量的变化是中能量水平组(II 组) $>$ 低能量水平组(I 组) $>$ 高能量水平组(Ⅲ组),仅 II 组和 III 组之间差异显著($P < 0.05$),其它均差异不显著($P > 0.05$)。这同家禽随能量水平升高而采食量降低的规律并不完全一致。家禽虽然可通过调节采食量以取得最小的能量摄入,但这样调节有时并不精确。Morris 曾对 34 试验的数据进行总结,发现产蛋母鸡饲喂高能日粮时能量极易摄入过量,而具有摄取高能特性的品系鸡更是如此,这说明家禽采食量的变化同能量浓度变化并不一定成比例。

3.4 能量水平对料重比的影响

从试验结果看,高能量水平组(Ⅲ组)料重比要低于低能量水平组(I、II 组)。随着能量水平的增高,料重比呈现下降的趋势。试验结果表明,在同一蛋白条件下,日粮中能量水平升高,肉杂 817 的料重比要明显偏低。

参考文献

- 1 NRC. Nutrient Requirements of Poultry, 9th Edition. 1994
- 2 Karunajeewa H. Key factors influencing egg weight. Poultry International, 1984(4): 68-73
- 3 Leclercq B. Energy requirements of avian species. Poultry Science, 1978, 60: 2 044-2 054
- 4 张桂芝. 能量、蛋白水平对蛋雏鸡生产性能的影响[J]. 山东家禽, 1999(6): 4-6
- 5 Acar N, Barbato G F, Patterson P H. The effects of feeding excess methionine on live performance, carcass traits, and ascetic mortality. Poultry Science, 2001, 80: 1 585-1 589
- 6 刘东, 李忠, 张强. 不同能量水平日粮对肉仔鸡生长及屠宰性能指标的影响研究. 家畜生态学报, 2005(5): 32-35
- 7 沈立权, 朱江宁, 张康宁. 不同能量水平的日粮对雪山鸡生长性能的影响. 畜牧与饲料科学, 2005(5): 4-6
- 8 张中华, 杨琳, 蒋宗勇, 等. 日粮添加不同油脂对岭南黄鸡生产性能的影响[J]. 中国饲料, 2003(12): 17-18
- 9 姜宁, 张爱忠, 王玉艳, 等. 日粮中添加小肽制品对贵妃鸡育雏期生产性能和营养物质代谢率的影响[J]. 畜牧与饲料科学, 2005, (3): 3-5
- 10 崔文典, 赵国先, 左晓磊, 等. 环境温度与家禽采食量及日粮能量浓度的关系[J]. 饲料研究, 2005(8): 46-47
- 11 王生雨, 刘华阳. 不同能量、蛋白质水平对肉仔鸡生产性能的影响[J]. 山东农业科学, 2002(4): 43-44
- 12 樊红平, 郑旭阳, 侯水生. 肉鸡能量和蛋白质营养研究进展[J]. 中国饲料, 2002(2): 17-19
- 13 蒋守群, 丁发源, 林映才, 等. 饲粮能量水平对 0~21 日龄黄羽肉鸡生产性能、胴体品质和体组成的影响[J]. 广东饲料, 2002(3): 17-19
- 14 秦江帆, 梁祖满, 方瑞坤. 不同能量浓度和蛋白质水平及胆碱对康达尔黄羽肉鸡后期生长性能的影响[J]. 饲料博览, 2002(12): 20-31
- 15 欧阳克蕙, 王文君, 林树茂, 等. 能量和蛋白水平对崇仁麻鸡生产性能的影响[J]. 中国家禽, 2003(1): 10-13
- 16 乔艳芳, 宋代军. 优质肉鸡营养需要的研究进展[J]. 饲料博览, 2005(11): 28-30
- 17 吕进宏. 不同饲养方式和营养水平对北京油鸡生长性能和肉质的影响[D]. 华中农业大学, 2005
- 18 谢淑芳, 刘秀云. 饲粮不同能量水平对肉仔鸡生产性能的影响[J]. 黑河科技, 2003(1): 11-12
- 19 杨光, 钟鑫, 苑淑兰. 提高肉种鸡产蛋日粮能量水平的技术措施. 辽宁畜牧兽医, 2002(4): 22-23

(编辑: 张学智, mengzai007@163.com)

紫苏-月苋草复合提取物对肉种鸡生产性能的影响

孙婷婷 徐建雄

摘要 试验选用1日龄AA肉用种鸡17 000羽,随机分成对照组(饲喂基础日粮)和试验组(在基础日粮中添加0.25 g/kg紫苏-月苋草复合提取物),研究紫苏-月苋草复合提取物对肉种鸡生产性能和繁殖性能的影响。试验结果表明:添加该复合提取物后,试验鸡育成期体重、均匀度显著提高,死淘率降低,产蛋率和平均蛋重有较大的提高,受精率和入孵蛋健雏率分别提高1.04个百分点和5.35个百分点。

关键词 肉用种鸡;紫苏-月苋草复合提取物;生产性能;繁殖性能

中图分类号 S831

目前,对多不饱和脂肪酸(PUFA)作为饲料添加剂的研究尚不多,主要为含 ω -3 PUFA衍生物EPA、DHA较多的深海鱼油和鱼粉,为动物提供优质蛋白和生长因子,而以富含 α -亚麻酸和亚油酸的紫苏、月苋草提取物作为饲料添加剂的研究就更少了。本试验旨在研究以CO₂超临界流体萃取技术生产的紫苏-月苋草复合提取物(优生素)对肉种鸡生产性能和繁殖性能的影响。

1 材料与方法

1.1 试验动物及分组

试验选用1日龄来源相同的同批次的AA父母代肉用种鸡17 000羽,随机分为2组,每组8 500羽(每组一个栋舍)。

1.2 紫苏-月苋草复合提取物

由上海某生物技术有限公司提供,主要成分为 ω -3、 ω -6多不饱和脂肪酸(如 α -亚麻酸、 γ -亚麻酸)。

1.3 试验日粮

对照组饲喂基础日粮,日粮配方及营养水平见表1。试验组在每千克基础日粮中添加0.25 g优生素。

1.4 测试指标

试验开始时,随机抽样(抽样量10%左右)测定鸡只体重。育成期内,记录肉种鸡每周的饲料消耗量、体重,并对照标准计算体重均匀度,记录发病情况、死亡数及用药情况。记录产蛋期每周的死淘率、体重、产蛋率、蛋重、种蛋合格率。在肉种鸡第39、40周龄时每组分别采集成合格种蛋4 800、9 600枚,按常规法在同一

孵化器内孵化,记录种蛋受精率、受精蛋孵化率、出雏数和健雏率等。

表1 基础日粮配方及营养水平

组成(%)	育雏期	育成期	产前期	产蛋期
玉米	63.746	63.066	65.886	65.167
去皮豆粕	28.400	16.300	19.300	22.300
小麦麸	2.530	15.580	8.720	0.000
磷酸氢钙	1.936	1.393	1.638	1.698
促生脂	1.250	1.250	1.250	2.500
石粉	1.040	1.250	2.060	7.180
食盐	0.400	0.380	0.400	0.350
氯化胆碱	0.300	0.300	0.280	0.280
VC	0.150	0.150	0.150	1.150
蛋氨酸(88%)	0.149	0.100	0.164	0.166
种前/后多维	0.050	0.050	0.050	0.050
小苏打	0.410	0.087	0.048	0.123
赖氨酸盐酸盐	0.008	0.094	0.054	0.036
营养水平				
代谢能(MJ/kg)	11.932	11.514	11.723	11.597
粗蛋白(%)	18.498	14.983	15.482	15.500
精氨酸(%)	1.235	0.949	0.995	1.009
赖氨酸(%)	0.963	0.759	0.779	0.800
蛋氨酸(%)	0.440	0.329	0.402	0.412
蛋氨酸+胱氨酸(%)	0.755	0.599	0.679	0.685
粗脂肪(%)	3.396	3.450	3.450	3.930
钙(%)	0.950	0.880	1.248	3.207
有效磷(%)	0.460	0.380	0.410	0.400
总磷(%)	0.700	0.652	0.652	0.604

1.5 饲养管理及试验时间

试验期间,肉种鸡的饲养管理按常规方法进行。试验期从肉种鸡15日龄至产蛋结束(455日龄)。

2 结果与分析(见表2、表3、表4)

在整个试验期,试验鸡精神活泼,食欲旺盛,生长良好。

从表2可以看出,在育成期,试验组鸡的体重、采食量和饲料报酬略有提高,死淘率也略有降低,体重均匀度提高了1.6个百分点;在产蛋期,试验组鸡产蛋率提高了1.11个百分点,蛋重增加0.37 g/枚,入舍

孙婷婷,上海交通大学农业与生物学院,201101,上海市七莘路2678号上海交大七宝校区58号信箱。

徐建雄(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-11-27

种鸡的死淘率降低了 14.29%。说明添加优生素对育成期和产蛋期肉种鸡有改善生长性能的作用。

表 2 肉种鸡育成期、产蛋期的生产性能

项目	对照组	试验组
育成期		
育成期末重(g)	1 416.09	1 432.82
平均日采食量(g)	67.66	67.91
料重比	3.96	3.85
体重均匀度(%)	74.95	76.55
死淘率(%)	2.71	2.67
产蛋期		
平均产蛋率(%)	65.64	66.75
平均蛋重(g/枚)	63.80	64.17
平均日采食量(g)	155.49	155.39
体重(g)	3 706.34	3 728.68
死淘率(%)	0.35	0.30

表 4 全期饲养经济效益分析

组别	饲料成本(元/只)	产蛋数(枚)	种蛋收益(元)	入孵蛋健雏率(%)	孵化收益(元)	经济效益(元/只)	
						种蛋用	孵化用
对照组	73.39	189.42	284.13	83.85	349.42	210.74	276.03
试验组	73.70	192.29	288.44	89.20	374.35	214.74	300.65

注:按每只鸡为核算单位,优生素价格为 25 元/kg,种蛋按 1.5 元/枚,雏鸡按 2.2 元/只计算。

3 讨论

常景奋等(1995)发现少量的脂肪酸对免疫系统有促进作用。亚麻酸等多不饱和脂肪酸参与免疫功能的调节,具有抗感染、抗应激和促进繁殖的作用。PUFA 是细胞膜磷脂的重要成分,对机体的激素代谢和许多酶的活性起调控作用(赵春艳、敖长金,2005)。在动物日粮中增加 PUFA 含量,可以有效提高胰脂酶的含量和胰脂酶的活性,提高饲料中脂肪消化率,加强消化吸收作用。臧素敏等(2003)研究证明,向蛋鸡日粮中添加富含亚麻酸的紫苏,可显著提高鸡蛋黄中 PUFA 的含量,增大 ω -3 在脂肪酸中的比例,改善 ω -6/ ω -3 的比例。季学枫等(2003)指出,新型饲料添加剂紫苏-月苋草复合提取物对后期猪(体重 65 kg 以上)促生长和提高饲料转化率有积极作用。伍喜林和杨凤(2003)认为,PUFA 通过机体内脱氢酶和增碳酶作用,形成一系列前列腺素 PGE₁、PGE₂、PGE₃ 类衍生物,大大提高机体免疫功能,提高动物对疾病的抵抗力并加快病后的治愈和恢复。本试验所用的紫苏-月苋草复合提取物,是以紫苏和月苋草为原料经特殊工艺萃取有效成分预混加工而成,其主要活性成分为 ω -3、 ω -6 多不饱和脂肪酸(PUFA)(如 α -亚麻酸、 γ -亚麻酸)。本试验结果表明,肉种鸡日粮中添加 0.25 g/kg 的优生素,对肉种鸡育成期和产蛋期的生产性能有提高的趋势,特别对肉种鸡的繁殖性能有明显的促进作用,并能提高肉种鸡的经济效益。

表 3 肉种鸡的孵化性能(%)

指标	对照组	试验组
受精率	87.87	88.91
受精蛋孵化率	95.45	96.55
受精蛋健雏率	90.30	95.20
入孵蛋孵化率	88.70	90.40
入孵蛋健雏率	83.85	89.20

从表 3 可以看出,试验组鸡受精率和入孵蛋健雏率分别提高 1.04 个百分点和 5.35 个百分点,说明添加优生素可有效提高肉种鸡的繁殖性能。

由表 4 全期饲养经济效益分析得出,日粮中添加优生素可以提高饲养肉种鸡的经济效益,种蛋用种鸡可以增加收入 4.00 元/只;若种蛋孵化后,每只种鸡则可增加收入 24.62 元。

由于在用紫苏-月苋草复合提取物研发人类保健品、药品过程中,已进行了大量的动物试验,因此可以认为优生素是一种纯天然的、安全的饲料添加剂,在肉种鸡生产中,可作为一种具有强化营养、增强免疫、促进生长、改善动物产品品质的新型绿色饲料添加剂推广应用。

参考文献

- 1 鲍建民.多不饱和脂肪酸的生理功能及安全性.中国食物与营养,2006(1):45-46
- 2 常景奋,武素平,乔建华,等.CLA-类乳的营养价值及其在蛋鸡、肉鸡生产上的应用.当代畜牧,1995(2):34-35
- 3 季学枫,周明,王颖.紫苏-月苋草复合提取物替代仔猪饲料中抗菌药物效果的试验.中国饲料,2003(17):12-13
- 4 伍喜林,杨凤.共轭亚油酸(CLA)对动物营养效应研究进展.动物营养学报,2003,15(1):7-11
- 5 臧素敏,李同洲,何万红.日粮中添加紫苏籽对鸡蛋黄脂肪酸组成及影响的研究.河北农业大学学报,2003,26(1):65-69
- 6 赵春艳,敖长金.多不饱和脂肪酸对机体免疫机能的影响.饲料研究,2005(11):33-36
- 7 Farrell D J, Dornbusch M, Thomson E. The feeding of diets with various fish and vegetable oils to hens and the enrichment of eggs with n-3 fatty acids [J]. Proceedings of the Nutrition Society of Australia, 1991,(16):130
- 8 Ricketts J. Amount and type of dietary fat regulate pancreatic lipase gene expression in rats[J]. Nutrition, 1994,124:1 166-1 171

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

鸡肝脏组织中防御素基因片段的克隆

孙洁 祁克宗 李娜 刘红梅 高恒

摘要 作为动物体内防御系统最大的成员,鸡 beta-defensin 是鸡体内唯一存在的防御素种类,实验选取本实验室自行饲养的罗曼鸡作为实验材料,从鸡的肝脏提取总 RNA 运用 RT-PCR 技术克隆出鸡 β-防御素 cDNA 片段 Gallinacin-1、8、9、10,并进行测序,为进一步进行表达做了一项基础工作。

关键词 鸡;β-防御素;序列

中图分类号 Q785

动物体内的防御素(defensins)是动物内在防御系统最大的成员,它是一类富含半胱氨酸的阳离子活性肽。防御素广泛表达于动物的组织细胞中,具有广谱的抗菌、抗病毒活性和非特异的细胞毒性作用,同时,动物防御素还可以调节体内适应性免疫及其它抗微生物免疫活性。一旦可以通过基因工程将其大量表达,就有可能替代传统抗生素及一些化学性的防腐剂,对食品安全及临床治疗将会具有重要的意义。

防御素家族主要被分为 α、β 两个亚类,家禽体内只含有 β-防御素。因此该实验选取本实验室自行饲养的罗曼鸡作为实验材料,从鸡的肝脏提取总 RNA,运用 RT-PCR 技术克隆出鸡 β-防御素 cDNA 片段

Gallinacin-1、8、9、10,并进行测序,为进一步进行表达做了一项基础工作^[1-5]。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

罗曼鸡肝脏取自本实验室饲养的 15 日龄罗曼鸡;总 RNA 提取试剂盒采用 TRIzol LS RNA 提取试剂盒,购自上海生物工程公司;M-MLV 以及 PGEM-T easy 载体购自 promega 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PCR 引物的设计与合成

根据 genbank 中发表的基因序列结合 Primer5.0 进行分析,决定采用表 1 中的引物序列。

表 1 实验所用引物序列

名称	上游引物	下游引物
Gal-1	ATGCGGATCGTGACCTGCTC	TATGGGAAGGAAGTCAGATTG
Gal-8	ACAGTGTGAGCAGGCAGGAGGGA	CTCTTCTGTTCCAGCCTTTGGTG
Gal-9	GCAAAGGCTATTCCACAGCAG	AGCATTTCAGCTTCCCACCAC
Gal-10	TGGGGCACGCAGTCCACAAC	ATCAGCTCCTCAAGGCAGTG

注:引物由上海生物工程公司合成。

1.2.2 鸡肝总 RNA 的提取

按照 TRIzol 使用说明书进行:剪取少量肝脏组织,分别加入 1 ml TRIzol 试剂,用匀浆器进行研磨,研磨充分,室温静置 5 min;12 000×g 离心 5 min,弃去沉淀;加 200 μl 氯仿,振荡混匀后,室温放置 15 min;4 ℃、12 000×g 离心 15 min,吸取上层水相,加入 500 μl 异丙醇,室温放置 5~10 min;4 ℃、12 000×g 离心

10 min,弃上清液,RNA 沉于管底;加 75%的乙醇(DEPC 水配制)1 ml,温和振荡;4 ℃、800×g 离心 5 min,弃上清液,室温晾干。

1.2.3 RT-PCR 反应和 cDNA 扩增

cDNA 第一链的合成参照 M-MLV 反转录酶说明书进行。

反应体系(20 μl):RNA 3 μl;5×buffer 4 μl;dNTPs 6 μl;RNA 酶抑制剂 0.5 μl;Primer2 1 μl;M-MLV 2 μl;DEPC 水补足 20 μl。

混匀后室温放置 10 min,42 ℃水浴 1 h,RT 产物直接用于 PCR 扩增。

PCR 总反应体系为(50 μl):10×buffer 5 μl;25 mol/l MgCl₂ 4 μl;10 nmol dNTPs 2 μl;Primer1 1 μl;Primer2 1 μl;cDNA 5 μl;ExTaq 0.5 μl(约 3 U);加双蒸水至 50 μl。

孙洁,安徽农业大学动物科技学院,230036,安徽合肥。

祁克宗(通讯作者)、李娜、刘红梅、高恒,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-12-04

★ 基金项目:安徽省自然科学基金(03041204)、安徽省优秀青年基金资助。

在 PCR 仪上按照如下过程反应:94 °C 预变性 3 min,1 个循环;94 °C、40 s,55 °C、40 s,72 °C、1 min, 35 个循环;72 °C 延伸 10 min,1 个循环。产物用 2% 凝胶电泳进行检测⁶⁾, 然后进行 PCR 产物测序。

2 实验结果

2.1 RNA 提取结果(见图 1)

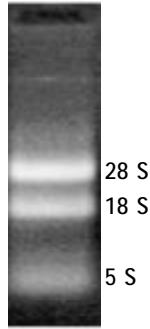
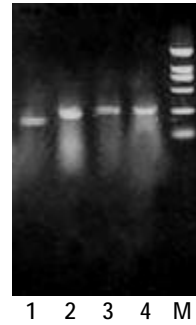


图 1 RNA 提取结果

2.2 RT-PCR 结果

从罗曼鸡的肝脏中提取的总 RNA, 经 RT-PCR 进行反转录合成 cDNA 第一链, 利用引物进行 PCR 扩增, 在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳, 各有一条大约 200 bp 的条带出现, 与预计的产物分子量大小吻合(见图 2)。



(1—GAL8;2—GAL9;3—GAL10;4—GAL10)

图 2 RT-PCR 结果

GAL8(同源性:99%)

Query 18 CACCTCCATACCAGAGCCTTTGGGCACTGCCAGAGAGGGTCCCCTGCTGCCGGACTGTG 77
Sbjct 237 CACCTCCATACCAGAGCCTTTGGGCACTGCCAGAGAGGGTCCCCTGCTGCCGGACTGTG 296
Query 78 TACGACTAATGTTCCGACGACCTCAAACCAGCTAAGCAGCTCTTCTGGTGATGTAAGAT 137
Sbjct 297 TACGACTAATGTTCCGACGACCTCAGACCAGCTAAGCAGCTCTTCTGGTGATGTAAGAT 356
Query 138 ATTCATCATCCTGCTACAAAACCTGGAATTTGGGGCTGAAAATACGGGTTAATGTGCAC 197
Sbjct 357 ATTCATCATCCTGCTACAAAACCTGGAATTTGGGGCTGAAAATACGGGTTAATGTGCAC 416
Query 198 CCATGCATGCATGCACCAAAGGCTGAACA 226
Sbjct 417 CCATGCATGCATGCACCAAAGGCTGAACA 445

GAL9(同源性:100%)

Query 1 GCAAAGGCTATTCCACAGCAGAGGACAATCATGAGAATCCTTTTCTTCCTTGTTGCTGTT 60
Sbjct 1 GCAAAGGCTATTCCACAGCAGAGGACAATCATGAGAATCCTTTTCTTCCTTGTTGCTGTT 60
Query 61 CTCTTCTTCCTCTTCCAGGCTGCTCCAGCTTACAGCCAAGAAGACGCTGACACCTTAGCA 120
Sbjct 61 CTCTTCTTCCTCTTCCAGGCTGCTCCAGCTTACAGCCAAGAAGACGCTGACACCTTAGCA 120
Query 121 TGCAGGCAGAGCCACGGCTCCTGCTCTTTTGTGTCATGCCGTGCTCCTTCAGTTGACATT 180
Sbjct 121 TGCAGGCAGAGCCACGGCTCCTGCTCTTTTGTGTCATGCCGTGCTCCTTCAGTTGACATT 180
Query 181 GGGACCTGCCGTGGTGGGAAGCTGAAATGCTG 212
Sbjct 181 GGGACCTGCCGTGGTGGGAAGCTGAAATGCTG 212

GAL10(同源性:100%)

Query 8	CTCTGCCTGCTCTTCGCTGTTCTCCTCTTCCAGGCTGCTCCAGGCTCAGCAGAC	67
Sbjct 10	CTCTGCCTGCTCTTCGCTGTTCTCCTCTTCCAGGCTGCTCCAGGCTCAGCAGAC	69
Query 68	CCACTTTTCCCTGACACCGTGGCATGCAGGACTCAGGGGAATTTCTGCCGTGCTGGGGCA	127
Sbjct 70	CCACTTTTCCCTGACACCGTGGCATGCAGGACTCAGGGGAATTTCTGCCGTGCTGGGGCA	129
Query 128	TGCCCCCACCCTTACCATCTCTGGGCAGTGCCATGGGGGGCTGTTAACTGCTGTGCC	187
Sbjct 130	TGCCCCCACCCTTACCATCTCTGGGCAGTGCCATGGGGGGCTGTTAACTGCTGTGCC	189
Query 188	AAGATTCCGGCGCAGTAA	205
Sbjct 190	AAGATTCCGGCGCAGTAA	207

3 分析讨论

鸡β-防御素含有6个稳定的半胱氨酸,分别以1-6、2-4、3-5连接形成3个分子的二硫键,构成稳定的反相平行的3股β-片层结构C-X₄₋₈-C-X₃₋₅-C-X₉₋₁₃-C-X₄₋₇-C-C。二硫键可以使小分子防御素紧密联结以防御蛋白酶水解,所以在富含蛋白酶的吞嗜溶酶体环境中仍能保持其特性,这也是防御素区别于其它抗微生物肽的主要因素。据报道,鸡体内的基因共编码了13种β-防御素,除此之外,目前仍没有新的报导,这些鸡防御素基因被命名为Gallinacin-1~Gallinacin-13,它们密集地分布在染色体的3q3.5~q3.7,长度为86 kb。其氨基酸残基的数目约有63~104个^[7],以上所得基因片段均包含完整的开放阅读框,为以后进行表达奠定了一定的基础。

随着人们对食品安全的关注,传统抗生素对动物机体有不同程度的毒害作用,且致病菌对目前几乎所有的抗生素产生耐药性,人们正在努力寻找抗生素的替代品,防御素作为一种新型的生物活性肽,可以替代抗生素而发挥更广谱的抗菌作用,同时也可以作为免疫调节剂在调节机体免疫系统感染中发挥重要作用。

在基因工程上应用的防御素具有广谱的抗微生物的活性,因此具有很大的应用潜力。一方面可以研究出高效的细菌或酵母表达系统,以大量生产防御素,应用到食品、医药领域;另一方面从动物的组织中分离出防御素基因,然后导入动、植物体内高效表达,增强动、植物抗菌能力,通过在植物抗病基因工程上的应用,减少化学抗菌剂在农业上的应用,人工合成抗菌肽比自然界提取的抗菌肽具有更高的活性已经成为现实。Jaynes等利用基因改造,获得了比天然提取有更高活性的新型抗菌肽;而人工合成得到的融合

抗菌肽有可能表现出比任何一个供体抗菌肽都高的抗菌活性。因此,人工合成抗菌肽并使之广泛应用于临床是完全有可能实现的。美国马盖宁制药公司现已开发出Magainin II、Magainin III两种人工合成抗菌肽,并进入临床III期研究,用于治疗肿瘤^[8]。

鸡β-防御素是一种重要的免疫因子,具有广谱抗病作用。对鸡β-防御素的开发利用将主要集中在两个方面:一是作为家禽抗病力的指标之一,在培育家禽抗病品种(品系)方面起辅助作用;二是作为抗菌肽的开发利用,但鸡防御素对鸡或其它动物的作用效果还需进一步验证,同时也必须认识到从抗菌肽的开发到最终的临床应用尚需很长的时间,诸如来源问题、如何保持活性问题,以及应用于人体后是否有潜在的致畸性、致癌性等问题,都有待进一步研究。

参考文献

- 1 Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003(3):710-720
- 2 Lehrer R I, Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol.* 2002(14):96-102
- 3 Schutte B C, McCray P B., Beta-defensins in lung host defense. *Annu Rev Physiol.*, 2002,64:709-748
- 4 Thomma B P, Cammue B P, Thevissen K. Plant defensins. *Planta*, 2002,216:193-202
- 5 Froy O, Gurevitz M. Arthropod and mollusk defensins--evolution by exon-shuffling. *Trends Genet.*,2003(19):684-687
- 6 萨姆布鲁克等,金冬雁,黎孟枫等(译).H 分子克隆实验指南(第二版).北京:科学出版社,1996.765-780,888-89
- 7 Yan jing xiao, AustinI, Hughes, et al. A genome-wide screen identifies a single beta-defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian defensins[J]. *BMC Genomics*,2004(5):56
- 8 陆莹瑾,王禾,屈贤铭.抗菌肽的固相合成、分离纯化与构效关系的研究[J].*生物工程学报*,1997,13(1):35

(编辑:崔成德, cuicengde@tom.com)

RNA 干扰的实验方法及应用

吴丹 胡兰 石娇 谭克 刘雷 杨群辉

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)就是把与内源 mRNA 编码区同源的长度为 19~23 bp 的外源双链 RNA(double stranded RNA, dsRNA)导入细胞中,通过一系列细胞内反应引发细胞中相应 mRNA 的降解,从而导致特定基因表达沉默的一种技术;是真核生物中普遍存在的抵抗病毒入侵,抑制转座子活性及基因表达的监控机制。《Science》和美国科学促进会将 RNAi 技术列为 2002 年度最重大的十大科学成就之首,《Nature》杂志也将该项技术评为 2002 年度最重要的科技发现之一,并在 2000~2003 连续四年列入十大科技进步成果之一。首次在《Nature》上报道该现象的 Andy Fire 和 Craig Mello 也因此而获得了 2006 年的诺贝尔生理学或医学奖。由于 RNAi 可以作为一种简单、有效的代替基因敲除的遗传工具,正在功能基因组学领域掀起一场真正的革命,并将加快这个领域的研究步伐。

1 RNAi 技术的发现及发展

1995 年,康乃尔大学的 Su Guo^[1]在利用反义 RNA 技术特异性地抑制秀丽新小杆线虫(*C. elegans*)中的 par-1 基因的表达时,发现反义 RNA 的确能够阻断 par-1 基因的表达。但奇怪的是,注入作为对照的正义链 RNA,也同样阻断了该基因的表达。对这个奇怪的现象,该研究小组一直未能给出合理解释。直至 1998 年 2 月,Andrew Fire^[2]等才首次解开这个疑问:Su Guo 遇到的正义链 RNA 抑制基因表达的现象,是由于体外转录所得 RNA 中污染了微量双链 RNA 而引起,当他们将体外转录得到的单链 RNA 纯化后注射线虫,基因抑制效应变得十分微弱,而经过纯化的双链 RNA 却正好相反,能够高效特异性阻断相应基因的表达。该小组将这一现象称为 RNAi^[3,4]。1999 年, Rillaomas Tuschl 等在哺乳动物中发现了 RNA 干扰。目前 RNAi 现象被广泛地发现存在于真菌、水螅、锥虫、斑马鱼和哺乳动物等大多数真核生物中。

2 RNAi 的基本原理

吴丹,沈阳农业大学畜牧兽医学院,110161,辽宁省沈阳市东陵路 120 号 107 信箱。

胡兰(通讯作者)、石娇、谭克、刘雷、杨群辉,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-12-04

★ 辽宁省自然科学基金资助项目。

RNA 干扰是一种序列特异性的转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)机制,它通过一段 dsRNA 导致同源 mRNA 降解从而使目的基因失表达。目前的研究表明 RNAi 过程分 4 步进行,其具体过程如下:①dsRNA 通过细胞膜进入细胞内,在胞浆内 Dicer (是 RNA 酶 III 家族中的一种序列特异性的核酸内切酶)的作用下,被分解为 21~22 bp, 3'端带有 2~3 核苷酸末端突出的双链 siRNA (短干扰 RNA) 分子;②siRNA 与 Ago2 等一些酶蛋白家族成员结合,形成 RNA 介导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),复合体分子量大约为 500 kDa,其组成成分目前还没有完全弄清楚;③这种复合物在 ATP 供能的情况下,将其携带的双链 siRNA 变成单链 siRNA 分子,携带了单链 siRNA 的 RISC 就变成了具有活性的 RISC,这种具有活性的 RISC 又被称为 Slicer;④Slicer 同目的 mRNA 分子结合,会导致目的 RNA 分子的断裂,这些断裂的 RNA 小分子在核酸酶的作用下被降解,从而导致目的基因的沉默。

在线虫和植物中的遗传学分析表明,因为有依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)存在,提出了一个随机降解的 PCR(random degradative PCR)模式,即 RdRp 以配对的 siRNA 为引物,以靶 RNA 为模板,类似 PCR 扩增形成 dsRNA,然后由 Dicer 切割形成新的 siRNA,进入下一步的反应。此模型可能解释了 RNAi 的高效性。与此相对应的是在哺乳动物和果蝇中的高效性是因为活性 RISC 是一种“酶”,可以催化多轮剪切反应,因此,无论是体内还是体外,少量 dsRNA 就能有效地抑制大量基因的表达。

3 获得 siRNA 的方法

通过 RNAi 的作用原理,我们知道在 RNAi 实验中真正发挥作用的是 siRNA。获得 siRNA 有两种途径,一个是外源性的,另一个是内源性的。外源性的包括化学合成 siRNA,体外转录获得 siRNA 和利用 Dicer 或 RNase 消化长的 dsRNA 成 siRNA;细胞中内源性 siRNA 的形成包括基因组中 DNA 反向重复序列的转录产物、同时转录反义和正义 RNA、病毒 RNA 复制中间体,以单链 RNA 为模板,由细胞或病毒的 RNA 依赖 RNA 聚合酶(RdRp)催化合成 dsRNA, RNAi 二元表达载体,在胞浆内 Dicer 的作用下,形成 siRNA。

体外制备 siRNA 的方法分为 3 种。①化学合成:根据设计好的 siRNA 序列进行化学合成^[5]。该方法制

备的 siRNA 纯度高,合成的量不受限制,可以大规模合成,能被标记,且容易转染,但是价格较昂贵,合成周期长,不可以进行抗生素筛选,也不能用于长期筛选研究。需要大量进行研究时,可用已知有效 siRNA。

②体外转录获取 siRNA: T7 启动子和目标序列正反两条链退火合成一条 DNA 双链,逆转录后形成正、反两条 RNA 链,杂交后用 RNA 酶消化形成 siRNA。该方法简单、成本低、速度快、毒性小、稳定性好、效率高,可以进行标记,转染效率高,但是反应规模和量始终有一定的限制,不可以进行抗生素筛选,也不能用于长期研究。花费中等,需要筛选时可制备多种 siRNA^[6]。

③利用 Dicer 或 RNase 消化长的 dsRNA 获得 siRNA: 目标序列进行 PCR 扩增,逆转录合成 RNA,退火后 Dicer 酶复合物消化成 siRNA。该方法可以制成多种 siRNA 混合物,保证有效的目的基因沉默,可以进行标记,容易转染,但是有可能引发非特异的基因沉默,大规模合成受限,不可以进行抗生素筛选,不能用于长期研究及某一特定 siRNA 的研究,不能用于基因治疗。费用低,可用来快速研究单基因功能缺失表型^[7]。

细胞内制备 siRNA 的方法分为 4 种。①依赖表达质粒在细胞内获取 siRNA: siRNA 载体依赖 RNA 聚合酶 III 启动子(pol III),操纵一段小的发夹 siRNA 在哺乳动物细胞中的表达,可使用人源和鼠源的 U6 启动子和人 H1 启动子, pol III 可在哺乳动物细胞中表达许多的小分子 RNA,并通过添加一串(3~6 个)U 来终止转录,该方法需要 2 段编码短发夹 RNA 序列的 DNA 单链,退火后再克隆到载体的 pol III 启动子下游。该方法因为载体可在细胞中持续抑制靶基因达数周或更久,所以可用于长期基因沉寂的研究,很容易转染,可以进行抗生素筛选;有可能进行大规模合成,但是克隆周期长,表达效率低,不可以进行标记,并且工作量很大,费用中等^[8]。②依赖病毒载体获得 siRNA,其优势在于可以直接高效率感染细胞进行基因沉默的研究,避免由于质粒转染效率低而带来的种种不便,而且转染效果更加稳定。这种方法最适用于已知一个有效的 siRNA 序列,需要维持较长时间的基因沉默;不适用于筛选 siRNA 序列(其实主要是需要多个克隆和测序等较为费时、繁琐的工作)。③通过 PCR 介导的 siRNA 表达试剂盒获取 siRNA: 基于 PCR 的 siRNA 表达框架(siRNA expression cassette, SEC),它由 RNA pol III 启动子、发夹结构 siRNA、RNA pol III 终止位点组成,制备方法为 PCR,无需克隆和测序。该方法直接由 PCR 得到,简便、省时,但是不易转染到细胞中(晶赛公司的 protocol 可以解决这个问题),结果可能不理想,且不可以进行标记和抗生素筛选,大规模合成受

限,不能进行长期研究,费用中等,适用于筛选 siRNA 序列^[9]。④RNAi 双元表达载体:通过 RCR 获得目的基因,克隆后与表达载体连接。这种方法使用的表达载体有三种形式:单一启动子,它介导反向重复序列的转录进而经退火而形成;双启动子体系,就是一个基因片段从两个方向进行转录;双向启动子。这种方法的优点是可以使用不同的选择性标志,通过构建可诱导的表达系统,可以在特定的时间表达 dsRNA,可进行大规模筛选并且成本低。但是质粒表达的 dsRNA 在体细胞中能否克服 dsRNA 产生的非特异性反应还有待证实。

4 转染方法

4.1 磷酸钙共沉淀

将氯化钙、RNA(或 DNA)和磷酸缓冲液混合,沉淀形成包含 DNA 且极小的不溶的磷酸钙颗粒。磷酸钙-DNA 复合物粘附到细胞膜并通过胞饮进入目的细胞的细胞质。沉淀物的大小和质量对磷酸钙转染的成功是至关重要的。在实验中使用的每种试剂都必须小心校准,保证质量,因为即使偏离最优条件十万分之一的 pH 值都会导致磷酸钙转染失败。

4.2 电穿孔法

电穿孔通过将细胞暴露在短暂的高场强电脉冲中转导分子。将细胞悬浮液置于电场中会诱导沿细胞膜的电压差异,此差异会导致细胞膜暂时穿孔。电脉冲和场强的优化对于成功的转染非常必要,因为过高的场强和过长的电脉冲时间会不可逆地伤害细胞膜而裂解细胞。成功的电穿孔过程都伴随高水平(50%或更高)的毒性。

4.3 DEAE-葡聚糖和 polybrene

带正电的 DEAE-葡聚糖或 polybrene 多聚体复合物和带负电的 DNA 分子混合使得 DNA 可以结合在细胞表面。通过使用二甲基亚砜(DMSO)或甘油获得的渗透休克将 DNA 复合体导入,DEAE-葡聚糖仅限于瞬时转染。

4.4 机械法转染技术

也包括使用机械的方法,比如显微注射和基因枪(biolistic particle)。显微注射使用一根细针头将 DNA、RNA 或蛋白质直接转入细胞质或细胞核。基因枪使用高 microprojectile 将大分子导入细胞。

4.5 阳离子脂质体试剂

在优化条件下将阳离子脂质体试剂加入水中时,它可形成微小的(平均大小约 100~400 nm)单层脂质体。这些脂质体带正电,可以靠静电作用结合到 DNA 的磷酸骨架上以及带负电的细胞膜表面,形成 DNA-阳离子脂质体复合物,容易导入培养的细胞,一个约

5 kb 的质粒会结合 2~4 个脂质体。

5 提高 siRNA 和表达载体转染效率的方法

为了达到高的转染效率,在转染实验过程中,需要注意以下几点。

5.1 纯化 siRNA

在转染前要确认 siRNA 的大小和纯度。为得到高纯度的 siRNA,推荐用玻璃纤维结合,洗脱或通过 15%~20% 丙烯酰胺胶除去反应中多余的核苷酸、小的寡核苷酸、蛋白质和盐离子。尤其是化学合成的 RNA 通常需要 PAGE 胶纯化。

5.2 避免 RNA 酶污染

微量的 RNA 酶将导致 siRNA 实验失败。由于实验环境中 RNA 酶普遍存在,如皮肤、头发及所有徒手接触过的物品或暴露在空气中的物品等,因此保证实验每个步骤不受 RNA 酶污染非常重要。

5.3 健康的细胞培养物和严格的操作

通常健康的细胞转染效率较高。此外,较低的传代数能确保每次实验所用细胞的稳定性。为了优化实验,推荐用 50 代以下的转染细胞,否则细胞转染效率会随时间明显下降。

5.4 避免使用抗生素

Ambion 公司推荐从细胞种植到转染后 72 h 期间避免使用抗生素。抗生素会在穿透的细胞中积累毒素,有些细胞和转染试剂在 siRNA 转染时需要无血清的条件,这种情况下,可同时用正常培养基和无血清培养基做对比实验,以得到最佳转染效果。

5.5 选择合适的转染试剂

针对 siRNA 制备方法以及靶细胞类型的不同,选择好的转染试剂和优化的操作对 siRNA 实验的成功至关重要。

5.6 通过合适的阳性对照优化转染和检测条件

对于大多数细胞,管家基因是较好的阳性对照。将不同浓度阳性对照的 siRNA 转入靶细胞,转染 48 h 后统计对照蛋白质或 mRNA 相对于未转染细胞的降低水平。过多的 siRNA 将导致细胞毒性以至死亡。

5.7 通过标记 siRNA 来优化实验

荧光标记的 siRNA 能用来分析 siRNA 稳定性和转染效率。标记的 siRNA 还可用作 siRNA 胞内定位及双标记实验(配合标记抗体)来追踪转染过程中导入了 siRNA 的细胞,将转染与靶蛋白表达的下调结合起来。

6 siRNA 干扰效果的检测方法

6.1 核酸水平

可以运用荧光定量 PCR 方法检测目的基因或者病毒全长是否转录,转录量是否减少。

6.2 蛋白水平检测

检测目的基因的蛋白产物是否减少,可以运用 western blot 或者细胞免疫化学法,也可以在目的基因前后连接一个标记蛋白(如 EGFP),运用此蛋白的荧光强度间接测出目的基因的表达量。

6.3 动物实验或 TCID₅₀ 检测

对于动物病毒,可在给动物攻毒后及时给予 siRNA,以动物死亡数作为干扰效果的指标;也可以将病毒进行细胞培养后,给予一定量的 siRNA,检测病毒的 TCID₅₀。

7 RNAi 的应用

7.1 在基因功能的研究方面

在哺乳动物中,同反义 RNA 和核酶技术相比, RNAi 在体内表达时间长;对同一靶基因作用,其用量低于其 10~1 000 倍^[10-13];对基因抑制水平比核酶更有效^[14];在被降解的 mRNA 中,被降解的小片段的 RNA 分子部分被用来继续作为小的 siRNA 分子,增加干扰的时限和干扰的效率^[15];同时对多个基因进行作用^[16]。这些优点使 RNAi 在真核基因功能的研究方面在近一二年内得到广泛的应用,成为一个很有潜力的基因功能研究工具。在鼠的基因功能研究方面, RNAi 的重组载体在小鼠的细胞系内已经能成功的传代^[17]。理论上,目前可以利用 RNAi 技术制造出同一染色体上两个近距基因敲除的小鼠。在人类基因功能的研究方面, Huang 等利用 RNAi 研究网格蛋白介导 EGF 受体的细胞吞引作用机制,他运用 RNAi 技术同时抑制了 HeLa 细胞中 13 种内吞蛋白的表达,这对于运用核酶技术和反义 RNA 技术是很难实现的。目前应用 RNAi 对基因功能的研究已经成为基因功能研究的主要工具之一。

7.2 全基因组基因功能扫描

在人类基因组测序工作基本结束之后,下一步的重要工作是研究每一个基因的功能。RNAi 技术的突破,使得对某种基因的敲除变得更系统和准确。另外, RNAi 对于一些必需基因的研究具有自己独特的优势,它可以研究生物体基因敲除死亡前的一些表现型^[18]。这对于基因完全敲除技术来说是不能实现的。通过对线虫全基因组的功能扫描,确认了一些决定线虫细胞分裂、凋亡、细胞形态学的基因^[19,20]。近来 RNAi 对哺乳动物全基因组基因功能扫描的研究也在进行,通过对这些基因功能的研究,已经发现了细胞凋亡、信号传导、蛋白功能调节的一些基因^[21],显示了它在基因功能研究中的较大潜力。但是它也有一些缺点,对于一些基因 RNAi 的抑制效果并不理想,目前对于这种现象的原因尚不清楚。

7.3 疾病的基因治疗

大量在体外和体内应用 RNAi 的研究证实了 RNAi 的潜在基因治疗效果,如艾滋病、流感、病毒性肝炎、帕金森、肌萎缩性(脊髓)侧索硬化、癌症、风湿性关节炎、II 型糖尿病等都取得了令人欣慰的成果。Tian 等^[22]发现, hTERT dsRNA 可以特异性地沉默 hTERT 基因,从而抑制肺癌细胞 A549 的增殖。C-Myc 在乳腺癌的研究中起很重要的作用,通过 RNAi 降低 MCF-7 细胞中 c-Myc 蛋白的表达水平,可以抑制肿瘤细胞体内体外的增长,暗示了 RNAi 通过抑制过表达基因如 c-Myc 而达到治疗乳腺癌的可能性^[23]。

7.4 蛋白质功能的研究

在 RNAi 发现之前,对蛋白质功能的研究是对基因表达产物的分析、功能克隆的研究来对蛋白质的功能进行分析。随着人们对全基因组测序的完成,人类对基因的研究进入后基因组时代,即基因功能和蛋白质功能的研究。如前述 RNAi 已经用于对基因功能的扫描,在对基因功能的研究中起到了很大的作用,同样, RNAi 在对蛋白质的功能研究中也得到了应用。如 Saijou 等通过 RNAi 技术对 RDB-1 蛋白的功能进行了研究,发现它同 18S 核糖体的关系^[24]。Huang 等通过 RNA 干扰技术,研究了网格蛋白同 EGF 受体的吞引关系。这些研究说明在蛋白质功能的研究中, RNA 同样能发挥重要作用。它又为蛋白质功能的研究提供了一个有力的工具。

参考文献

- 1 Guo Su, Kempfues K J. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 1995, 81(4):611-620
- 2 Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6 669):806-811
- 3 曹国军, 邵宁生. RNA 干扰. 生命科学仪器, 2004(2):39-41
- 4 朱睿, 张开立, 邹向阳. RNA 干扰(RNAi)技术及其在功能基因组学研究中的应用. 大连医科大学学报, 2003, 25(2):105-107
- 5 Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 2004, 431(7 006):343-349
- 6 Xia Y, Lin R X, Zheng S J, et al. Effective siRNA targets screening for human telomerase reverse transcriptase. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(16):2 497-501
- 7 Hagerkvist R, Mokhtari D, Myers J W, et al. siRNA produced by recombinant dicer mediates efficient gene silencing in islet cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005(1 040):114-122
- 8 Qian Z K, Xuan B Q, Min T S, et al. Cost-effective method of siRNA preparation and its application to inhibit hepatitis B virus replication in HepG2 cells. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(9):1 297-1 302
- 9 Wang W, Wang C Y, Dong J H, et al. I Identification of effective

- siRNA against K-ras in human pancreatic cancer cell line Mia-PaCa-2 by siRNA expression cassette. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(13):2 026-2 031
- 10 Miyagishi M, Hayashi M, Taira K. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2003(13):1-7
- 11 Kretschmer-Kazemi F R, Sezakiel G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31: 4 417-4 424
- 12 Grunweller A, Wyszko E, Bieber B, et al. Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31(12):3 185-3 193
- 13 Xu Y, Zhang H Y, Thormeyer D, et al. Effective small interfering RNAs and phosphorothioate antisense DNAs have different preferences for target sites in the luciferase mRNAs. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 2003, 306(3):712-717
- 14 Yokota T, Miyagishi M, Hino T, et al. siRNA-based inhibition specific for mutant SOD1 with single nucleotide alternation in familial ALS, compared with ribozyme and DNA enzyme. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 2004(14):283-291
- 15 Svoboda P, Stein P, Hayashi H, et al. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development*, 2000, 127:4 147-4 156
- 16 Huang F, Khvorova A, Marshall W, et al. Analysis of clathrin-mediated endocytosis of EGF receptor by RNA interference. *Biol. Chem.*, 2004, 279(16):16 657-16 661
- 17 Carmell M A, Zhang L, Conklin D S, et al. Germline transmission of RNAi in mice. *Nature Struct. Biol.*, 2003(10):91-92
- 18 Carpenter A E, Sabatini D M. Systematic genome-wide screens of gene function. *Nature Rev. Genet.*, 2004(5):11-22
- 19 Ashratl K, Chang F Y, Watts J L, et al. Genome-wide germline-enriched and sex-biased expression profiles in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2003, 421:268-272
- 20 Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, et al. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol.*, 2001, 11(3):171-176
- 21 Aza-Blanc P, Cooper C L, Wagner K, et al. Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening. *Mol. Cell*, 2003, 12(3):627-637
- 22 Tian F J, Wang Z Y, Ma J Y, et al. Inhibitory effect of hTERT dsRNA on telomerase activity in lung carcinoma cell line A549. *Ai Zheng*, 2005, 24(3):257
- 23 Wang Y H, Liu S, Zhang G, et al. Knockdown of C-Myc expression by RNAi inhibits MCT-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res.*, 2005, 7(2):R220
- 24 Saijou E, Fujiwara T, Suzaki T, et al. RBD-1, a nucleolar RNA-binding protein, is essential for *Caenorhabditis elegans* early development through 18S ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32(3):1 028-1 036

(编辑:崔成德, cuicengde@tom.com)

饲料级脱氟磷酸钙制备的研究

薛宇波 戴志明 杨国明

磷酸钙是一种重要的无机化工原料和产品,由于磷矿资源丰富,磷酸钙的生产具有原料易得、生产工艺简单、投资省、成本低等优点。磷酸钙的用途非常广泛,在国民经济中具有重要的地位。

脱氟磷酸钙的生产有烧结脱氟法和熔融脱氟法两种,其基本原理都是在高温下蒸汽脱氟。由于熔融法以低品位磷矿为原料,杂质多、能耗大,产品质量差,作饲料级产品通常达不到要求,现已逐步被淘汰。烧结脱氟法是将磷矿粉及添加剂在高温下进行烧结,与水蒸气接触反应而脱氟。烧结脱氟法是目前世界上广泛采用的方法,美国、日本、俄罗斯以及西欧等主要的脱氟磷酸钙生产国均采用此法生产。

近年来我国饲料工业发展很快,年增长速度在5%~7%之间。饲料工业的发展促进了添加剂工业的发展,饲料磷酸盐的生产也有了长足的进步。但由于产量小、品种单一,仍赶不上饲料工业发展的要求,工业化的产品主要为磷酸氢钙,国外早已大量生产和使用的脱氟磷酸钙产品,在国内尚无大规模工业化生产,脱氟磷酸钙的发展仍未形成产业。

1 脱氟磷酸钙的工业应用

脱氟磷酸钙的用途较为广泛,主要用于制造陶瓷、玻璃,在饲料、牙膏、医药、橡胶、印染、纺织、电气、食品等工业部门也有十分重要的应用。作为特殊的功能制剂,脱氟磷酸钙可作为着色剂、塑料稳定剂、磨光剂、牙科粘结剂、糖浆澄清剂,医药行业用作胃酸抑制剂等。

脱氟磷酸钙产品质量由于生产方法、工艺路线和原料磷矿中杂质含量不同,加之各国生产技术水平存在差异,因此对饲料磷酸钙产品检测项目的确定不完全一致,指标要求也存在一些差别。但产品中对有效P、Ca的含量要求基本一致,一般分别大于或等于18%、30%,对有害元素F、Pb、As等的控制比较严格。

2 饲料级脱氟磷酸钙的生产方法

磷酸钙的生产一般使用磷酸三钠法、磷酸法和过磷酸钙法,而饲料级脱氟磷酸钙的生产通常采用高温处理法,即熔融脱氟法和烧结脱氟法两大类。

熔融脱氟法是将磷矿石、硅砂等配料在高温下熔

融,在熔融状态下脱出磷灰石中的氟,熔融体经水淬呈玻璃态,成为可被0.4%的盐酸溶解的脱氟磷酸钙。根据磷矿中杂质含量而酌量添加硅砂以调节其熔点,这是利用低品位磷矿的一种途径。但由于 P_2O_5 含量低,产品质量很难达到饲料级磷酸钙的要求,现已基本淘汰。

高温烧结法是将磷矿石配料在烧结状态下进行脱氟反应,反应过程要求配料在炉中产生一定量的液相以加速反应,但又要避免在炉料中形成过多液相,导致炉料互相粘结或粘附在生产装置壁上形成结圈或结瘤。配料中因添加剂不同而分为低硅法、高硅法、磷酸法和钠盐-磷酸法。

其中磷酸法和钠盐-磷酸法是目前脱氟磷酸钙工业化生产的主要方法。磷酸法以磷矿为原料,添加一定量的磷酸进行高温烧结脱氟,俄罗斯和其他独联体国家多采用此法生产;钠盐-磷酸法是将磷矿粉、磷酸和钠盐(纯碱、芒硝、氯化钠)按一定比例混合造粒,在回转窑进行高温烧结脱氟,美国IMC公司、日本小野田化学工业株式会社均采用此法生产。在配料中添加磷酸或钠盐-磷酸不仅可以强化脱氟过程,还相应提高了产品中的含磷品位。由于添加了磷酸,既可利用其中水蒸气促进脱氟,加酸还可以降低脱氟温度,同时也可利用磷酸的化学能促进磷灰石的分解。此外,添加磷酸还能改善产品颜色,因而是脱氟磷酸钙生产非常适合的工艺。采用磷酸法生产可以使烧成温度较其它方法低50~100℃,产品中有效 P_2O_5 含量高达36%~42%。从而使工艺容易控制、操作简单,产品质量符合要求。

以磷矿石直接烧结脱氟制取饲料磷酸钙是一个技术含量高、难度大的生产过程。合适的配料组成和工艺条件是充分脱氟的前提,而磷矿的结构、杂质含量是选择配料及其比例的重要依据。

3 基本原理

磷矿中含磷成分是氟磷灰石 $[Ca_5F(PO_4)_3]$ 。在氟磷灰石的化学结构中普遍存在原子取代,如 PO_4^{3-} 被 CO_3^{2-} 取代形成碳氟磷灰石;而F⁻可以被 OH^- 、 Cl^- 取代,形成羟基磷灰石和氯氟磷灰石。

一般而言,脱氟反应进行得越充分,在冷却过程中析出氟磷灰石的趋势就越低,故充分脱氟是制取脱氟磷酸钙的先决条件。水蒸气在1400℃的高温下可与氟磷灰石发生反应,氟磷灰石中的F⁻被 OH^- 取代形

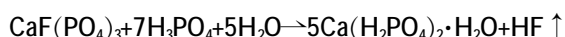
薛宇波,云南农业大学,650201,云南昆明。

戴志明、杨国明,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-30

成羟基磷灰石,然后羟基磷灰石分解为磷酸钙和磷酸氢钙。

高温下二氧化硅还能与羟基磷灰石反应生成磷酸钙与硅酸钙的固熔体,这对羟基磷灰石的转化起着重要的促进作用。在水蒸气与二氧化硅同时存在的条件下,对氟磷灰石脱氟和羟基磷灰石的进一步分解,都能显示出比两个因子单独存在时更优的效果。而在磷酸法脱氟磷酸钙的生产中,磷矿、磷酸的反应过程按下列反应进行:



这是一个液-固反应,其反应速率主要与反应温度、氢离子浓度、矿粉的比表面积和矿粉表面液膜中的扩散系数有关。提高反应温度、增大氢离子浓度、减小矿粉粒径以增大其比表面积都可以强化反应的进行。当温度较高时,水合磷酸一钙分解生成偏磷酸钙,偏磷酸钙在水蒸气的存在下与氟磷灰石反应生成焦磷酸钙,焦磷酸钙与氟磷灰石发生反应生成磷酸钙。由于磷矿组成复杂,包含的物质种类繁多,决定了磷矿烧结脱氟是一个非常复杂的过程。影响脱氟反应的因素也很多,磷矿的组成、性质、晶体结构及杂质含量,添加剂的种类及配料组成等,都可能对磷矿脱氟反应过程产生影响,在某些情况下还可能有两种或多种反应过程共存。

4 生产过程的注意事项

① 焙烧温度、磷酸配比对磷矿脱氟反应有显著影响。焙烧温度和磷酸配比的高低与过程中液相量的产生及多少紧密相关。熔融液相的产生使磷矿脱氟反应的温度大大降低,因而可以有效降低脱氟磷酸钙的生产能耗,同时还降低了对设备材质的要求,使实际的工业生产更容易实现;而液相量多少是影响炉料的粘结程度、透气性好坏的重要因素,从而影响过程的传热、传质并最终影响脱氟反应的进行。对本研究所用的四川磷矿,选择磷酸配比为 27%~30%,在温度为 1 180~1 230 ℃下焙烧,脱氟反应进行得最好。

② 磷酸浓度对磷矿烧结脱氟的影响不明显,选择多大浓度的磷酸应以配料容易混合均匀、方便造粒而定。

③ 焙烧时间对磷矿脱氟反应有明显的影。一定的焙烧时间不仅是磷矿脱氟得以完全进行的需要,也是反应生成的 HF 或者其它含氟化合物扩散进入气相主体的保证。焙烧时间不宜太短。

④ 最佳工艺条件为:磷酸浓度 45%左右;磷酸配比 27%~30%;焙烧温度 1 180~1 230 ℃;焙烧时间 ≥ 120 min。

参考文献

- 1 李春,郝晓刚.磷矿热分解法制饲料级磷酸钙的技术经济评价[J].磷肥与复肥,1998(3):54~56
- 2 王励生,金作美.饲料用脱氟磷酸钙盐的工艺研究[J].磷肥与复肥,2001,16(1):14~18
- 3 干佩琳.积极发展我国脱氟磷酸钙的生产[J].无机盐工业,1992(3):1~4
- 4 单光渝.脱氟磷酸三钙生产技术新进展[J].磷肥与复肥,2000,15(2):41~43
- 5 屠焰,霍启光.饲料磷酸盐的生产工艺和质量标准[J].中国饲料,1997(23):15~17
- 6 刘玉强.饲料用脱氟磷酸钙的生产[J].云南化工,1996(3):8~10
- 7 陈嘉甫,谭光薰.磷酸盐的生产与应用[M].成都科技大学出版社,1989
- 8 Authur D F,Toy,Edward N.Walsh. Phosphorus Chemistry in Everyday Living, Washington, D. C. American Chemical Society,1987.2~5
- 9 郝立勤,普万里.脱氟磷酸钙的开发利用和市场需求[J].云南化工,1996(3):11~14
- 10 Phosphates Fight for a Better Image Feed International.1995(2):10
- 11 Production and Mark Aspects of Feed-grade Phosphate World-wide. Phosphorous & Potassium.1980,(106):31
- 12 匡国明.关于赴俄罗斯考察脱氟磷酸钙生产情况的报告[J].贵州化工,1995(3):3~6
- 13 李克玉,张家明.浅谈我国饲料级脱氟磷酸钙的发展前景[J].湖北化工,1998(2):6~7
- 14 王佩琳.关于饲料磷酸盐的发展[J].化工技术经济,1995(6):7~9
- 15 熊家林.饲料脱氟磷酸三钙的生产技术及经济分析[J].粮食与饲料工业,1999(9):38~39
- 16 周军.育肥猪基础日粮中添加磷酸钙效果观察[J].畜牧生产,1995(8):9
- 17 刘岩,卞克明.饲料级脱氟磷酸钙对肉鸡的相对生物学效价[J].中国饲料,2001(19):17~19
- 18 曾波,赵海燕.饲料脱氟磷酸三钙的生产技术[J].云南化工,2003,30(3):13~20
- 19 宁培栋.旋风炉生产饲料脱氟磷酸盐问题的探讨[J].磷酸盐工业,1993(6):
- 20 匡国明.加速开发我国磷酸三钙饲料添加剂[J].现代化工,1991(2):38~40
- 21 贺江平.饲料级磷酸氢钙及磷酸钙的发展现状[J].河南化工,1997(3):5~6
- 22 章守陶.旋风炉烧制磷肥和饲料用磷酸盐[J].化工进展,1991(4):8~11
- 23 蔡孝载,陆坤荣.饲料脱氟磷酸三钙的生产应用和发展前景[J].磷肥与复肥,1994(4):6~11
- 24 王希鸿,卞克明.脱氟磷酸钙的中试生产研究[J].磷肥与复肥,1996(6):41~42
- 25 李春,徐世林.磷矿热分解法生产饲料级磷酸钙[J].磷肥与复肥,1997(5):14~16
- 26 S. Jaya, H. Das. The reaction of Phosphate rock and calcium phosphate[J]. Inorganic Chemistry,1977,22(1):29~33
- 27 Wetting of phosphate fines by the melt agglomeration Kompleksn. Ispol'z. miner Syr'ya, 1989(8):57~61
- 28 Jacob K D, Renolds D S. Ind Eng Chem, 1928, 20(11):1 204~1 210
- 29 Phosphate feed material for phosphorus electric furnace. Finley, Joseph H. (FMC. Corp), 1989(2):21~25
- 30 Pierce. Becker <Phosphates and Phosphoric Acid> Marcel Dekker, Inc, New York, 1987 (编辑:崔成德, cuicengde@tom.com)

蒸汽压片玉米加工工艺及其对牛生产性能的影响

梁国飞 李娜 杨加梅

摘要 蒸汽压片是一种对玉米进行湿热加工的加工工艺,可以提高玉米的生物学价值,改善其利用率,可以提高瘤胃淀粉、过瘤胃淀粉和总肠道淀粉消化率。同时还可以促进其它物质的消化代谢,减少氮、磷的排泄。经过严格质量控制的蒸汽压片玉米可以提高舍饲肉牛的肉料比和提高奶牛的产奶量和乳蛋白量。

关键词 蒸汽压片;牛;淀粉;玉米

中图分类号 S823

玉米作为舍饲牛的主要能量饲料,其消化利用率直接影响到牛的生产性能,而玉米的物理化学状态会影响到其可消化性和可吸收性。未经加工处理的玉米的种皮、淀粉颗粒外的蛋白质脂膜以及颗粒内淀粉分子的有序排列都会影响到微生物和酶与淀粉的接触,从而阻碍了动物对淀粉的消化利用。为了经济有效的利用玉米,饲喂前通常要对玉米进行加工处理。粉碎是最普遍的提高玉米消化利用率的加工处理方法,因其简单易行又经济,是现在我国养牛生产中最常用的加工方法。另外欧美地区普遍采用的有:干法压扁、蒸汽压扁、蒸汽压片、挤压处理和膨化等,其中蒸汽压片集机械处理和热处理于一体,应用最为广泛,Rowe等(1999)^[1]总结了不同加工处理方法对玉米的影响(见表1)。

表1 不同加工处理方法对玉米的影响

项目	破坏种皮	减少粒度	破坏晶体结构	破坏淀粉颗粒膜
干法压扁	+++	+	-	-
碾压处理	+++	+++	-	-
蒸汽压片	+++	++	+	+
挤压处理	+++	-	++	+
制粒	+++	-	+	?
青贮	+		++	-
微化	+	+	?	?
爆花	++	-	+	+++

注:“+++”表示影响大;“++”表示影响较大;“+”表示影响一般;“-”表示无影响;“?”表示不清楚。

1 蒸汽压片玉米加工工艺及相关参数

1.1 蒸汽压片

蒸汽压片的一般工艺流程为:原料→除杂→调制→蒸汽加热→压片→干燥冷却。具体方法是在原料

梁国飞,南京农业大学动物科技学院,210095,南京农大动科院颜培实验室。

李娜、杨加梅,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-10-30

除去混杂的石块、金属等杂质后加水和表面活性剂(调制剂)调制,一般加8%~10%的水保持12~18h,使水分渗入玉米中;然后将玉米输入一个立式的不锈钢蒸汽箱内,经100~110℃蒸汽处理40~60min;最后用两个预热的大轧辊把经调制和蒸汽处理过的玉米轧成期望的特定容重(通常309~386g/l)的玉米片,玉米片容重随着加工程度(挤压压力)的增加而降低(Preston,1999)^[2]。玉米片可以直接饲喂或待其“冷却干燥”(散失一些水分)后饲喂。Zinn(1997)^[3]比较了新鲜和干燥后的压片玉米的消化特性和饲喂价值,发现并不影响其饲喂效果。

1.2 工艺参数

蒸汽压片品质好坏取决于整个加工过程中热与力的综合效果,也就是说,工艺参数的不同对其营养价值具有很大的影响,主要的因素有蒸汽处理时间、挤压压力等。

1.2.1 蒸汽处理时间

蒸汽压片处理过程中对玉米进行调制和蒸汽处理使玉米达到一定的水分含量,并在一定温度下对玉米淀粉进行湿热处理使其糊化。

有关蒸汽时间的研究报道很少,理论上延长蒸汽时间可使玉米淀粉颗粒充分吸收水分,当其达到饱和状态时,就会到达一个平台期。Zinn(1990)^[4]选用3个时间段(34、47、67min)对其进行研究,得出的结论是:34min是消化道淀粉消化率达到最佳(99.5%)的时间段,延长蒸汽时间并不能改善压片玉米的营养价值。国外实际生产中通常采用40~60min的蒸汽处理时间。

1.2.2 挤压压力

经过调制和蒸汽处理后的玉米要通过两个预热的轧辊压制成一定密度的玉米片,两个轧辊一个是固

定辊,一个是活动辊。生产中通常有两种方法来调整挤压压力:一种是定压法,将两个轧辊紧贴一起,即二者之间的距离为零,然后减小挤压压力(约 3.5 MPa),以保证玉米通过轧辊时会形成一定的间隙;二是定距法,即先将两轧辊调到所需间距(一般为 0.8~1.0 mm),然后增大挤压压力(约 6 MPa)使二者固定,保证轧辊间的距离不会随着下落玉米的增加和不断的挤压而发生改变。这两种方法各有利弊,前者的优点在于它所施压力较小,原料中的一些杂物均能通过滚筒,减少了对机器的磨损,不足之处是在最开始两个轧辊之间无距离时,有可能造成玉米下落停滞而阻碍整个设备的正常运转,不易控制;而后者的优势在于它能提供一个稳定的加工环境,使加工后的压片玉米具有一致性,但是它需要有很大的压力来维持一个恒定的间距,耗能大,而且也需要特定的除杂设备。国内外往往采用第二种方法(Zinn, 2002)^[9]。

1.3 质量标准

评价蒸汽压片玉米的质量主要指标有压片密度、压片厚度、玉米淀粉糊化度和淀粉酶降解程度,压片厚度作为质量标准的优势是其不随时间条件、地点的改变而改变,而压片密度却受很多因素影响,如含水量、测定容器的形状以及压片玉米的破损程度等。Zinn(1990)^[6]报道压片厚度与压片密度之间呈中度相关,即 $FD(\text{密度, kg/l}) = 0.042 + 0.14 FT(\text{厚度, mm})$ ($r^2 = 0.74$), 而且压片密度与压片可溶性淀粉含量 ($r^2 = 0.87$) 和酶降解度 ($r^2 = 0.79$) 成线性相关。同时,压片密度测定时操作简单易行,加工过程中易于控制使其成为度量压片质量的主要单位,大量的实验结果表明:压片密度在 360 g/l 左右可以使牛发挥最大的生产性能。

1.4 加工机制

玉米籽粒中 70% 以上的都是淀粉,其中约有 27% 直链淀粉和 73% 的支链淀粉,淀粉以淀粉颗粒的形态紧密排列在胚乳中,淀粉颗粒外面包被蛋白质膜。淀粉链有的以氢键相互连接,有序排列形成结晶区,这些都不利于微生物和酶对淀粉进行消化利用。蒸汽压片之所以可以有效地提高玉米的消化率主要是将淀粉从蛋白膜包被中释放出来,同时破坏淀粉的有序排列,使之容易接受微生物和酶的作用。Mcdonough (1997)^[7]研究了蒸汽压片玉米的结构特征,发现了淀粉结晶度减少,原来淀粉颗粒的紧密排列变成凝胶样状态。Preston(1998)^[8]通过六个实验来研究蒸汽压片加工过程中玉米的变化,得出结论:可溶性蛋白在蒸汽处

理后降低和可利用淀粉只在压片后增加,显示蒸汽压片过程中淀粉颗粒的变化是分两部进行的;另外,压片前后灰分、P 和 K 含量分别降低 14%、23% 和 17%,但作用机理尚不清楚。

2 蒸汽压片玉米对牛生产性能的影响

关于蒸汽压片玉米对牛生产性能的影响有很多研究报告,经过严格质量控制的蒸汽压片玉米可以提高肉牛的增重效率和奶牛的大多数泌乳指标(特别是产奶量和乳蛋白量),表 2 是整理相关文献报道的不同加工处理玉米对牛生产性能和乳成分的影响。

表 2 不同加工处理玉米对肉牛和奶牛生产性能的影响

项目	干碾 ¹	高湿	蒸汽压片 ²	整粒	
肉牛	ADG(kg/d)	1.45 ^a	1.37 ^b	1.45 ^a	1.45 ^a
	DMI(kg/d)	9.45 ^a	8.72 ^b	7.85 ^c	8.56 ^b
	DMI/ADG	6.57 ^a	6.43 ^a	5.4 ^c	5.95 ^b
奶牛	DMI(kg/d)	26.5		26.6	25.3
	3.5%FCM(kg/d)	33.4		34.5	33.0
	FCM/DMI	1.27		1.33	1.31
	产奶量(kg/d)	35.6		38.0	34.6
	乳蛋白率(%)	3.00		3.08	3.01
	乳蛋白量(kg/d)	1.06		1.25	1.18
	乳脂率(%)	3.11		2.97	3.10
	乳脂量(kg/d)	1.11		1.12	1.09

注:1.干碾组包括干法碾压、干法压扁和粉碎;

2.肉牛蒸汽压片组压片密度为 0.28~0.37 kg/l,奶牛蒸汽压片组压片密度为 0.36 kg/l。

从表 2 我们可以看出,对肉牛来说,相对于干碾压玉米,蒸汽压片玉米降低干物质采食量 16.9%,但不影响日增重,可以降低料肉比 17.8% 左右。Reinhardt(1998)^[9]和 Barajas (1998)^[10]分别研究了蒸汽压片玉米与整粒玉米对肉牛生产性能的影响,发现蒸汽压片玉米可以降低干物质采食量,增加日增重,降低料肉比,但不影响胴体品质。蒸汽压片(约 0.36 kg/l)玉米较干碾压玉米使奶牛产乳量、乳蛋白率和乳蛋白量分别提高 6.7%、2.7%、17.9%,使泌乳奶牛乳脂率相对下降 4%~5%,但并没有影响乳脂量和干物质采食量。Plascencia(1996)^[11]研究不同密度蒸汽压片玉米对奶牛生产性能的影响,得出结论:相对于干碾玉米,蒸汽压片玉米可以提高采食量 5%,产乳量、乳蛋白量和乳蛋白率分别提高 11%、8% 和 16%,降低乳脂率 4%,但不影响乳脂量。研究者认为,蒸汽压片可以提高产乳量可能的原因包括:①微生物蛋白合成的提高;②丙酸的增加;③淀粉的过瘤胃消化率提高;④过瘤胃蛋白的提高。饲喂水平(限饲或自由采食)和精粗料比例也会影响到蒸汽压片玉米的饲喂效果。

3 对物质代谢的影响

3.1 对淀粉消化利用的影响

许多实验研究表明:蒸汽压片玉米可以提高瘤胃淀粉、过瘤胃淀粉和总肠道淀粉的消化率。Barajasa (1998)^[10]报道,相对于干碾玉米,蒸汽压片玉米提高瘤胃淀粉消化率 26%、过瘤胃淀粉消化率 41%、总消化道淀粉消化率 19%,但在 Joy(1997)^[15]经过实验发现,蒸汽压片的瘤胃淀粉消化率与干碾压玉米没有显著差异,而十二指肠和全消化道的消化率,压片玉米要明显好于干碾压玉米,这可能与试验中所选用的玉米品种及动物所处的生理时期不同有关。和干碾玉米或玉米相比,蒸汽压片增加肉牛的瘤胃和总肠道的淀粉消化率,并且消化的主要位点是瘤胃,但是对奶牛来说,蒸汽压片提高淀粉消化率主要归功于提高过瘤胃淀粉的消化率。表 3 是相关实验报告给出的不同玉米加工方法瘤胃淀粉、过瘤胃淀粉和总肠道淀粉消化率的数值。

表 3 不同玉米加工方法对肉牛和奶牛瘤胃、过瘤胃、总消化道淀粉消化率的影响

项目	干碾		高湿		蒸汽压片	
	奶牛	肉牛	奶牛	肉牛	奶牛	肉牛
实验头数(头)	4	10	2	3	5	14
瘤胃消化率(%)	47.2	60.6	76.3	91	53.3	84.2
过瘤胃消化率(%)	75.9	68.4	82.9	90.4	89.5	94.1
总消化道消化率(%)	89.1	89.3	96	91.8	94.2	99.1

Owens(2005)^[16]总结不同玉米加工处理方法对小肠淀粉消化率的影响时认为:干碾玉米只有 49.8%的过瘤胃消化淀粉在小肠中消化,而高湿玉米和蒸汽压片玉米小肠消化淀粉分别占过瘤胃消化淀粉的 57.8%和 96%。饲料组成、采食水平、饲喂方式和瘤胃流通速率都会影响到淀粉的消化利用。

3.2 对氮消化代谢的影响

Plascencia(1996)^[11]研究了蒸汽压片玉米对氮消化代谢的影响,发现相对于干碾玉米,蒸汽压片玉米可以提高微生物蛋白量 28%左右,提高微生物效率 10%,小肠和总肠道氮消化率分别提高 10%、8%。而 Theurer(1999)^[13]研究蒸汽压片玉米和干碾玉米认为,蒸汽压片可以提高微生物蛋白量 15%、微生物效率 17%,但不影响小肠和总肠道的氮消化率。淀粉在瘤胃内消化率提高为瘤胃微生物生长提供能量,从而促进微生物对氨氮的利用,提高了微生物蛋白的产量。碳水化合物作为能源物质为瘤胃微生物利用氮素来合成微生物蛋白提供大量能量,随着蛋白的不断合成及流向小肠,瘤胃中氨的浓度减少,机体就会动员血液中的尿素向瘤胃转运,进行尿素再循环,而被吸

收的氮在肝脏、乳腺等组织进行代谢转化。Theurer (1990^[17]、2002^[18])和 Alio (2000)^[19]研究了蒸汽压片玉米对氮在组织和器官的转运和吸收,结果表明,相对于蒸汽压扁和干法压扁,蒸汽压片玉米使玉米脲氮向肠道的转移量分别增加了 27%和 80%;肉牛肝脏和奶牛乳腺组织对 α -氨基酸氮的摄入各增加了 41%和 38%。

许多研究表明,蒸汽压片玉米可以减少氮的排出,可能与采食量降低导致氮摄入减少和氮的消化利用率提高有关。Burkholder(2004)^[20]用蒸汽压片和干碾玉米饲喂舍饲牛研究发现:蒸汽压片玉米排粪量和排尿量减少,粪氮和尿氮浓度增加,但是总排出氮量减少,氨氮浓度降低,这与氮的摄入量减少和氮的消化利用率提高有关。

3.3 对其它物质代谢的影响

蒸汽压片玉米对纤维素消化率的影响分歧比较大, Joy(1997)^[15]得出高瘤胃淀粉消化率会降低纤维素的消化利用率。Chen(1994)^[21]则提出高的瘤胃淀粉消化率会提高纤维素的消化利用率。而 Poore(1993)^[22]和 Knowlton(1998)^[23]得出:蒸汽压片玉米高的瘤胃淀粉消化率会降低瘤胃内纤维素的利用率,但是对总消化道纤维素利用率没有影响。

Guyton(2003)^[24]对比蒸汽压片玉米和干碾玉米对奶牛磷的代谢时发现:蒸汽压片玉米可以降低磷的排泄量,而对乳磷含量没有影响,对磷平衡也没有影响,可能是蒸汽压片玉米降低采食量,使得摄入磷量降低,从而降低磷的排泄量。

3.4 对能值的影响

NRC(1996)给出的蒸汽压片玉米的 NEm、NEg 分别为 9.36 MJ/kg、6.48 MJ/kg, 分别高出干法加工的玉米 9.3%和 11.5%,但是很多研究者的实验报告得出高于 NRC(1996)给出的数值。Zinn(2002)^[9]得出蒸汽压片玉米的 NEm、NEg 增长值平均在 15%~18%之间。表 4 是部分实验报告给出的蒸汽压片玉米 NEm、NEg 的数值。

对于 NRC 给出的蒸汽压片玉米 NEm、NEg 数值偏低, Zinn(2002)^[9]认为:一是 NRC 中 NEm 值是根据 TDN 值推算出来的,即 $NEm=0.030\ 5TDN-0.505\ 8$,并且 NRC 认为玉米经过蒸汽压片技术处理后,其 TDN 值上升了 5.7%,而将其全部增值归结为压片玉米淀粉利用率的提高。实际上,蒸汽压片技术不仅能大大提高淀粉的消化利用率,其它营养物质如蛋白质等的消化率也随之而改善。二是压片玉米的能值与其容重的相关系数很大,不同容重的压片玉米能值差异很

表4 蒸汽压片玉米的净能值及其与干法加工玉米相比提高的比例

项目	对照玉米	NEm(MJ/kg)	NEg(MJ/kg)	NEm 提高比例(%)	NEg 提高比例(%)
Matush(1967)	磨碎	10.07	7.11	12.2	17.3
Lee et(1982a)	整粒	10.58	7.56	6.4	8.4
Lee et(1982b)	整粒	9.82	6.90	12.4	17.1
Ramirez(1985)	干碾压	10.12	7.15	14.1	18.8
Zinn (1987)	干碾压	10.32	7.32	11.7	15.9
Barajas(1998a)	干碾压	10.12	7.15	20.2	27.2
Barajas(1998b)	干碾压	10.70	7.69	19.2	25.9
Ward (2000)	干碾压	10.62	7.61	15.6	20.0
试验平均		10.18	7.32	14.0	18.8
NRC		10.12	6.48	9.3	11.5

大,有的甚至超过了与干碾压玉米的差值,所以 NRC 所列出的能值是一个综合数值。

4 结语

蒸汽压片技术是一种有效的玉米加工方法,其主要是通过改变玉米的物理化学状态,从而提高瘤胃、小肠以及全消化道中的淀粉消化率,增加能值和机体内尿素再循环的次数,优化氮素在机体内的分配,提高牛的生产性能。玉米品种、产地、收获时间和降水量等都可以影响到玉米成分,这都可能影响到蒸汽压片玉米的加工;同时蒸汽压片玉米的饲用方式以及饲料精粗料比例不同对生产性能也会产生一定的影响。我国近几年刚刚引进该工艺,现在尚需对蒸汽压片加工工艺和玉米压片饲喂方式及其对其它物质代谢的影响进行进一步的研究,以促进蒸汽压片玉米在国内的推广和应用。

参考文献

- Rowe J B., M. Choct, D.W. Pethick. Processing cereal grains for animal feeding. *Aust. J. Agric. Res.*,1999,50:721-736
- Preston R L.Grain processing for beef and diary cattle. www.asachina.org/IMG/pdf/. 1999
- Zinn R A, R. Barajas.Comparative Ruminant and Total Tract Digestion of a Finishing Diet Containing Fresh vs Air-Dry Steam-Flaked Corn. *J. Anim. Sci.*,1997,75:1 704-1 707
- Zinn R A. Influence of steaming time on site of digestion of flaked corn in steers. *J. Anim. Sci.*, 1990,68:776-781
- Zinn R A,F. N. Owens, R. A. Ware.Flaking corn: Processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle *J. Anim. Sci.*, 2002,80:1 145-1 156
- Zinn R A. Influence of flake density on the comparative feeding value of steam-flaked corn for feedlot cattle.*J.Anim. Sci.*,1990,68:767-775
- Mcdonough C M, B. Janderson L W. Rooney. Structural characteristics of steam flaked sorghum. *Cereal Chem.*,1997,74(5):542-547
- Preston R L. Change in sorghum and corn grains during steps in the steam-flaking process. *J. Anim. Sci.*,1998,76(1):
- Reinhardt C D, Performance,Digestion,and Mastication Efficiency of Holstein Steers Fed Whole or Processed Corn in Limit-or Full-Fed Growing-Finishing Systems *J. Anim. Sci.*, 1998,76:1 778-1 788
- Barajas R, R. A. Zinn.The Feeding Value of Dry -Rolled and Steam-Flaked Corn in Finishing Diets for Feedlot Cattle: Influence

- of Protein Supplementation. *J. Anim. Sci.*,1998,76:1744-1752
- Plascencia A, R.A.Zinn.Influence of Flake Density on the Feeding Value of Steam-Processed Corn in Diets for Lactating Cows.*J. Anim. Sci.*,1996,74:310-316
- Swingle R S, Flake Density of Steam-Processed Sorghum Grain Alters Performance and Sites of Digestibility by Growing-Finishing Steers. *J. Anim. Sci.*,1999,77:1 055-1 065
- Theurer C. B, Invited review: Summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*,1999,82: 1 950-1 959
- Yu P, Effects of ground,steam-flaked, and steamrolled corn grains on performance of lactating cows. *J. Dairy Sci.*,1998,81:777-783
- Joy M T, E. J. DePeters, J. G. Fadel,et al.Effects of corn processing on the site and extent of digestion in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 1997,80:2 087-2 097
- Owens F N., R. A. Zinn. Corn Grain for Cattle: Influence of Processing on Site and Extent of Digestion Proc. *Southwest Nutr. Conf:* 2005.86-112
- Theurer C B, Blood flow and nitrogen (N) metabolism in beef steers fed diets containing 77% dry-rolled (DR) or steam-flaked (SF) sorghum grain. *J. Anim. Sci.*,1990,68(Suppl. 1):539
- Theurer C B. Net absorption and utilization of nitrogenous compounds across ruminal, intestinal, and hepatic tissues of growing beef steers fed dry-rolled or steam-flaked sorghum grain *J. Anim. Sci.*, 2002,80:525-532
- Alio A. Splanchnic nitrogen metabolism by growing beef steers fed diets containing sorghum grain flaked at different densities. *J. Anim. Sci.*, 2000,78:1 355-1 363
- Burkholder K M. The Effect of Steam Flaked or Dry Ground Corn and Supplemental Phytic Acid on Nitrogen Partitioning in Lactating Cows and Ammonia Emission from Manure. *J. Dairy Sci.*, 2004, 87:2 546-2 553
- Chen K H. Effect of Steam Flaking Grains on Performance of Corn and Sorghum of Lactating Cows. *J.Dairy Sci.*,1994,77:1 038-1 043
- Poore M H. Response of lactating Holstein cows to diets varying in fiber source and ruminal starch degradability. *J. Dairy Sci.*, 1993b, 76:2 235-2 243
- Knowlton K F, B. P. Glenn, R. A. Erdman. Performance, ruminal fermentation, and site of starch digestion in early lactation cows fed corn grain harvested and processed differently. *J.Dairy Sci.*,1998, 81:1 972-1 984
- Guyton J, M.McKinney,K. F. Knowlton. The Effect of Steam-Flaked or Dry Ground Corn and Supplemental Phytic Acid on Phosphorus Partitioning and Ruminant Phytase Activity in Lactating Cows. *J. Dairy Sci.*, 2003,86:3 972-3 982

(编辑:崔成德, cuicengde@tom.com)

灰色多层次综合评价模型在 饲料企业竞争力评价中的应用

赵丽炯 杨锦秀

摘要 结合国内外学者的研究,以及饲料工业的特点,从影响饲料企业竞争力强弱的三方面因素,即企业内部因素、企业外部因素和企业未来的发展因素出发,设计了七类指标,综合反映饲料企业内外运作能力和未来发展能力。基于灰色关联分析的基本理论和方法,建立了一个饲料企业竞争力灰色多层次综合评价模型。最后运用此评价方法和建立的评价指标体系对六家饲料上市公司的竞争力进行了模拟评价,得到了满意的结果。

关键词 饲料企业;竞争力;灰色多层次综合评价

中图分类号 F22

1 引言

我国饲料工业起步于20世纪70年代末,80年代中期进入了大发展时期,经过20多年的发展,包括饲料原料、添加剂、加工、机械制造和饲料检测等在内的饲料工业体系初步建立。饲料品种结构和产业结构不断得到优化,饲料总产量跃居世界第二,已成为我国工业体系中重要的支柱产业之一,对我国经济的发展起着越来越重要的作用。而饲料企业作为饲料工业中的微观经济主体,其发展和竞争能力直接影响着饲料工业的发展。随着我国市场经济体制的确立和不断完善,以及在加入WTO大背景下,饲料企业之间的竞争日趋激烈。饲料行业企业进入门槛低,投入的成本也相对低,从而使饲料企业数量迅速增多,导致饲料行业普遍存在生产能力相对过剩,技术水平和管理水平较低,以及市场无序竞争的现象,由此造成目前工业饲料产品供需基本饱和,产品同质化、服务无差异化、饲料生产的利润空间越来越小。

在这种竞争激烈的微利时代,饲料企业面临着极大的挑战和机会,饲料企业要想在激烈的竞争中得以生存与发展,必须不断提高企业自身的竞争力。而企业要提高竞争力就必须对现行企业进行客观科学的评价,确定企业的竞争力水平及所处行业竞争水平位置,找到提高企业竞争力的途径,积极培育和大力发展企业竞争力,从而使企业能在激烈的市场竞争中不

断发展壮大。而饲料企业竞争力的发展壮大,有利于促进饲料行业整体水平的提高,从而促进我国国民经济的发展和农户收入水平的提高。此外,科学、客观、全面地评价饲料企业竞争力有助于企业主管部门、管理者、股东、债权人以及其它利益相关者正确认识企业,并据此做出相应的正确决策。目前,理论界关于饲料企业的研究主要集中在饲料产业的发展、市场营销、发展战略等,而针对饲料企业竞争力的研究非常少,而且运用灰色多层次综合评价模型对饲料企业竞争力研究的文献尚未见报道。灰色关联分析对数据要求较低且计算量小,可操作性强,便于推广应用。因此,研究和探讨我国饲料企业的竞争力问题有着较为深远的现实意义。

2 饲料企业竞争力评价指标体系的设计

为了客观科学地评价饲料企业的竞争力,观察企业在市场竞争中所处的位置,需要设计一套科学、完整及能够从全方位、多角度反映饲料企业竞争力的指标体系。根据科学性、目的性、系统性、可行性和真实性原则,结合国内外学者的研究以及饲料工业的特点,本文从影响饲料企业竞争力强弱的三方面因素,即企业内部因素、企业外部因素和企业未来的发展因素出发,设计了七类指标,综合反映饲料企业内外运作能力和未来发展能力(见表1)。

3 灰色多层次综合评价模型

灰色关联分析提供了一种定量分析两因素之间相互关联程度的方法。它的基本原理由国际著名学者邓聚龙教授(1990)给出:

① 确定参数数列 X_0 和比较数列 X_i 。

$$X_0 = (X_{01}, X_{02}, \dots, X_{0n})$$

$$X_i = (X_{i1}, X_{i2}, \dots, X_{in}) \quad (i=1, 2, \dots, m)$$

赵丽炯,中州大学经济贸易学院,450044,河南省郑州市大学城北区英才街6号。

杨锦秀,四川农业大学。

收稿日期:2006-12-19

表 1 饲料企业竞争力评价指标及权重

目标层	准则层	准则层	指标层	
饲料企业竞争力 A	企业内部因素 B ₁ 0.58	规模实力 C ₁ 0.57	资产总额 C ₁₁ 0.56	
			主营业务收入 C ₁₂ 0.13	
			利润总额 C ₁₃ 0.31	
		技术素质 C ₂ 0.30	技术人员比例 C ₂₁ 0.72	
			设备新度 C ₂₂ 0.28	
			大专及以上学历员工比例 C ₃₁ 0.26	
	企业外部因素 B ₂ 0.30	员工素质 C ₃ 0.13	全员劳动生产率 C ₃₂ 0.74	
			偿债能力 C ₄ 0.15	资产负债率 C ₄₁ 0.72
				速动比率 C ₄₂ 0.28
		营运能力 C ₅ 0.58		存货周转率 C ₅₁ 0.44
			总资产周转率 C ₅₂ 0.25	
			应收账款周转率 C ₅₃ 0.18	
	企业未来发展因素 B ₃ 0.12	收益能力 C ₆ 0.27	流动资产周转率 C ₅₄ 0.13	
			总资产报酬率 C ₆₁ 0.60	
销售净利率 C ₆₂ 0.28				
发展能力 C ₇ 1.0		净资产收益率 C ₆₃ 0.12		
		净资产增长率 C ₇₁ 0.77		
		净利润增长率 C ₇₂ 0.23		

② 计算关联系数 ξ_{ik} 。

$$\xi_{ik} = \frac{\min_i \min_k |X_{0k} - X_{ik}| + \rho \max_i \max_k |X_{0k} - X_{ik}|}{|X_{0k} - X_{ik}| + \rho \max_i \max_k |X_{0k} - X_{ik}|}$$

($i=1, 2, \dots, m; k=1, 2, \dots, n$)

③ 计算关联度 r_i 。

$$r_i = \frac{1}{n} \sum_k \xi_{ik}$$

④ 依关联度 r_i 排序。本研究采用灰色关联分析来评价企业竞争力的基本思路是:以饲料行业内最有竞争力(理想企业)的各指标值作为参考数列 X_0 的各实体 X_{0k} , 被评价企业的各指标作为比较数列 X_i 的各实体 X_{ik} , 求关联度 r_i 。关联度越大,说明比较企业与竞争力最强的企业越相似,其竞争力越强;反之则竞争力越弱。因此,关联度的大小顺序,就是企业竞争力强弱的次序。灰色关联分析能够准确地得出与理想值(期望值)的关联度,也可以说是距离,准确地反映竞争力的相对性。该方法特别适用于多个企业间的比较,而且操作简单,对数据要求低、计算量小,便于广泛应用。其评价步骤如下。

3.1 选择参考数列

设 i 为第 i 个评价单元(饲料企业)的序号, $i=1, 2, \dots, m; k$ 为第 k 个评价指标的序号, $k=1, 2, \dots, n; V_{ik}$ 为第 i 个评价单元的第 k 个指标的评价值。取每个指标的最佳值 V_{0k} 为参考数列 V_0 的实体,于是有:

$$V_0 = (V_{01}, V_{02}, \dots, V_{0n})$$

式中: $V_{0k} = \text{Optimum}(V_{ik}); i=1, 2, \dots, m; k=1, 2, \dots, n$ 。

3.2 指标值的无量纲化处理

关联系数的值,主要取决于比较数列和参考数列(理想序列)的差值,而各个数列的数据单位是不同的,为使数据具备可比性,必须对原始数据进行无量纲化处理,也就是规范化处理。规范化处理的方法有均值法和初值法两种,其计算公式为:

$$X_{ij} = \frac{V_{ik}}{\frac{1}{n} \sum_{k=1}^n V_{ik}}$$

$$X_{ij} = \frac{V_{ik}}{V_{0k}} \quad (i=1, 2, \dots, m; k=1, 2, \dots, n) \quad (1)$$

3.3 计算关联系数

把无量纲化后的数列 $X_0 = (X_{01}, X_{02}, \dots, X_{0n})$ 作为参考数列,而 $X_i = (X_{i1}, X_{i2}, \dots, X_{in}) (i=1, 2, \dots, m)$ 作为比较数列,关联系数 ξ_{ik} 的计算公式由邓聚龙(1990)给出:

$$\xi_{ik} = \frac{\min_i \min_k |X_{0k} - X_{ik}| + \rho \max_i \max_k |X_{0k} - X_{ik}|}{|X_{0k} - X_{ik}| + \rho \max_i \max_k |X_{0k} - X_{ik}|} \quad (2)$$

其中分辨系数 ρ 在 $(0, 1)$ 内取值,一般取 0.1 至 0.5, ρ 值越小越能提高关联系数间差异。利用公式(2)计算关联系数 ξ_{ik} , 得下列关联系数矩阵:

$$E = (\xi_{ik})_{m \times n} = \begin{pmatrix} \xi_{11} & \xi_{12} & \xi_{1n} \\ \xi_{21} & \xi_{22} & \xi_{2n} \\ \dots & \dots & \dots \\ \xi_{m1} & \xi_{m2} & \xi_{mn} \end{pmatrix} \quad (3)$$

3.4 计算单层次的关联度

考虑到各指标的重要程度不一样,所以关联度计算方法采取权重乘以关联系数。根据层次分析法得到某一层的各指标的权重为:

$$W=(W_1, W_2, \dots, W_t) \quad (4)$$

式中: $\sum_{k=1}^t W_k=1$, t 表示该层中指标个数。

则关联度的计算公式是:

$$R=(r_1)_{1 \times n}=(r_1, r_2, \dots, r_n)=WE^T \quad (5)$$

3.5 计算多层评价系统的最终关联度

本文建立的是一个四阶结构的评价系统。设 W_{AB} 为 B 层各指标的权重所组成的向量, W_{B_1C} 为 C 层各指标的权重所组成的向量, W_{C_1D} 为 D 层各指标的权重所组成的向量,计算多阶结构评价系统的最终权重步骤如下:

① 计算 C 层各指标的关联度。

$$R_{C_l}=W_{C_lK} \cdot E_{C_lD}^T (l=1, 2, \dots, A, B) \quad (6)$$

② 计算 B 层各指标的关联度。

$$R_{BC}=W_{BC}[R_{C_1}, R_{C_2}, \dots, R_{C_p}]^T \quad (7)$$

③ 计算 A 层(最高层)指标的关联度。

$$R_{AB}=W_{AB}[R_{B_1}, R_{B_2}, \dots, R_{B_m}]^T \quad (8)$$

3.6 饲料企业竞争力大小排序

依据关联度 $r_i(i=1, 2, \dots, m)$ 大小进行排序,关联度的大小顺序即为饲料企业竞争力强弱的次序。

4 实证分析

4.1 样本的选择

考虑到指标数据的可获得性,本文选择六家饲料上市公司作为实证研究的对象,来进行灰色综合评价。

4.2 计算单层关联度

六家饲料上市公司各评价指标原始数据及各指标的理想值见表 2 所示。

表 2 企业各指标值及理想值

评价指标	A 公司	B 公司	C 公司	D 公司	E 公司	F 公司	理想序列
资产总额(万元)	134 795.04	113 862.47	374 556.52	114 633.38	114 531.17	153 205.59	375 000
主营收入(万元)	184 166.45	97 581.800	264 352.27	108 057.85	262 861.25	139 481.48	265 000
利润总额(万元)	-24 426.23	15 053.80	21 658.31	-23 419.91	9 251.56	7 405.30	22 000
技术人员比例(%)	11.325	6.692	1.340	21.884	7.048	6.352	22
设备新度(%)	83.717	64.010	73.309	41.61	76.009	72.425	84
大专以上比例(%)	36.901	20.268	20.199	31.003	42.553	36.014	37
全员劳动生产率(万元/人)	114.603	93.290	30.547	328.443	87.387	81.283	115
资产负债率(%)	57.527	91.488	8.848	62.005	42.400	38.171	8
速动比率(%)	70.812	14.082	72.710	43.103	217.514	68.978	218
存货周转率(次)	6.904	2.801	7.230	3.408	9.946	4.990	10
总资产周转率(次)	1.309	0.776	0.757	0.810	2.567	0.981	2.6
应收账款周转率(次)	35.114	14.122	234.794	12.717	199.541	6.035	235
流动资产周转率(次)	2.425	3.010	2.129	1.593	4.125	2.261	4.2
总资产报酬率(%)	-18.794	0.584	4.002	-16.191	6.812	4.363	7
销售净利率(%)	-14.361	0.752	5.285	-19.997	2.654	4.446	5.4
净资产收益率(%)	-40.370	1.474	9.432	-44.320	15.357	7.358	15.5
总资产增长率(%)	4.216	-9.068	62.249	-28.046	89.708	14.291	90
净利润增长率(%)	-1145.747	-26.309	16.657	-8.911	30.823	231.504	232

注:数据由中国上市公司资讯网(<http://www.cnlist.com>)上市公司 2004 年年度报告数据整理所得;各饲料公司真实名头以“A 公司”、“B 公司”等代替。

利用初值法对表 2 中的各指标的值经规范化处理后,再利用公式(2)求得各指标与参考序列中各最理想值的关联系数 $\xi_{ik}(i=1, 2, \dots, 18; k=1, 2, \dots, 7)$, 结果列于表 3。

4.3 计算多层次评价系统的最终关联度

为了确定各指标的权重,本文设计了层次分析法权重问卷,采取专家问卷调查的方法,向有关熟悉此方面的专家学者、企业管理部门共发出问卷 50 份,回收有效问卷 40 份,回收率约为 80%,将问卷评判产生的若干组指标权重进行整理(几何平均值法),建立判

断矩阵,通过矩阵运算和一致性检验,得到每个层次各指标的权数。结果如表 1 所示(由于篇幅有限,具体计算步骤略)。

利用公式(6)、(7)可以得到 B 层各指标的关联度:

$$R_{B_1}=W_{BC} [R_{C_1}, R_{C_2}, R_{C_3}]^T=(0.766, 0.768, 0.893, 0.736, 0.814, 0.800)^T$$

$$R_{B_2}=W_{BC} [R_{C_1}, R_{C_2}, R_{C_3}]^T=(0.635, 0.673, 0.869, 0.588, 0.903, 0.754)^T$$

$$R_{B_3}=W_{BC} [R_{C_1}]^T=(0.587, 0.654, 0.829, 0.627, 0.930, 0.780)^T$$

表3 关联系数 ξ_{ik}

项目	A公司	B公司	C公司	D公司	E公司	F公司
1	0.77	0.75	1.00	0.75	0.75	0.78
2	0.87	0.77	1.00	0.78	1.00	0.82
3	0.42	0.69	1.00	0.45	0.81	0.79
4	0.81	0.75	0.69	1.00	0.75	0.75
5	1.00	0.90	0.94	0.81	0.96	0.94
6	0.81	0.74	0.74	0.78	0.83	0.80
7	1.00	0.92	0.74	0.53	0.90	0.88
8	0.25	0.17	0.95	0.24	0.33	0.36
9	0.76	0.69	0.76	0.72	1.00	0.75
10	0.87	0.74	0.88	0.76	1.00	0.81
11	0.81	0.75	0.75	0.75	0.99	0.77
12	0.71	0.69	1.00	0.69	0.93	0.68
13	0.83	0.88	0.81	0.77	0.99	0.82
14	0.36	0.69	0.83	0.39	0.99	0.85
15	0.36	0.71	0.99	0.31	0.80	0.92
16	0.37	0.70	0.84	0.35	1.00	0.80
17	0.69	0.65	0.87	0.61	1.00	0.71
18	0.26	0.65	0.69	0.67	0.71	1.00

再利用公式(8)求得目标层 A 的关联度。

$$R_A=(r_1, r_2, r_3, r_4, r_5, r_6) (0.708, 0.727, 0.859, 0.681, 0.856, 0.787)$$

4.4 饲料企业竞争力的排序及评价

根据 R_A 中关联度的大小可知,六家饲料上市公司竞争力的优劣次序为:C公司、E公司、F公司、B公司、A公司、D公司。C公司与我们所构造的最优样本的关联度最大,为 0.859,说明其在六家饲料企业中竞争力最强,特别其资产总额、主营业务收入、利润总额和应收账款周转率与最理想样本的关联系数也都达到最大 1,说明该公司规模实力、收益能力和潜在的增长能力很大,一定程度上说明该公司股票具有较高的投资价值;E公司和 F公司两个公司各指标与最优样本的关联度分别为 0.856 和 0.787,分别排在第二位和第三位;排在最后的 D公司与最优样本的关联度只有 0.681,其全员劳动生产率与最优样本的关联系数只有 0.53,表明该公司在技术素质方面较差。

5 结束语

① 从计算的结果来看,各饲料企业竞争力的排序是符合实际的,是令人满意的。所以运用灰色多层次综合评价模型对饲料企业竞争力进行评价是行之有效的一种方法,其结果更科学、可靠。

② 该评价方法为管理者们对企业进行管理指明了方向,管理者们通过对数据分析,找到企业发展中的弱点,这样企业管理人员在企业未来发展中,可以致力于改善企业与最优样本关联系数较小的指标。提高企业与最优样本的关联度,进而提高企业的竞争力。

③ 运用灰色多层次综合评价模型对饲料企业竞争力进行评价,能够在信息不完备、不确切的条件下,扩大信息源,提高评价分析的可信度。因此,本文运用该方法评价饲料企业竞争力具有较强的实用性和可行性。

参考文献

- 1 邓聚龙.灰色系统理论教程[M].武汉:华中理工大学出版社,1990
- 2 胡大立.企业竞争力论[M].北京:经济管理出版社,2001
- 3 胡永宏.综合评价方法[M].北京:科学出版社,2000
- 4 乔富强,马文胜,等.浅谈中国饲料业的发展[J].饲料博览,2003(7):
- 5 胡大立.应用灰色系统理论评价企业竞争力[J].科技进步与对策,2003,20(1):
- 6 中国上市公司资讯网站(<http://www.cnlist.com>)

(编辑:崔成德, cucengde@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