

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
《中国学术期刊网》、《中文学术期刊网》(光盘版)
全文收录期刊

2007年第28卷第10期

(总第295期)

(1980年创刊)

主办单位:

辽宁省农牧业机械研究所

编辑出版:饲料工业杂志社

地址:沈阳市金沙江街16号6门

邮编:110036

电话:总编室(024)86391923

编辑一室(024)86391926(传真)

编辑二室(024)86391925(传真)

网络发行部(024)86391237

投稿信箱:tg@feedindustry.com.cn

网站:www.feedindustry.com.cn

总编辑:慕春野

副总编辑:沈桂宇

责任编辑:高雁

广告总代理:沈阳同兴广告有限责任公司

总经理:林勇

副总编辑:刘立南 于晓楠

业务内勤:刘立

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:ggbb@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

广告许可证: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

如蒙赠本刊文章及图片,请注明
摘自《饲料工业》杂志,并寄样刊。

饲料

SILIAO GONGYE

工业

(半月刊)

目次

专家论坛

- 1 我国水产养殖动物病害防治研究的主要成就与当前存在的问题
..... 陈昌福

饲料添加剂

- 4 真菌饲料添加剂对小鼠的增重试验
..... 李耀忠 李爱华 岳思君等
- 6 β -防霉素的研究进展
..... 赵凤立 朱连勤 乔彦良
- 8 加计酸的生理功能及在畜牧业中的应用
..... 赵晓芳 张宏福

酶制剂

- 11 多酶文替降解壳聚糖及其降解产物分子量分布的研究
..... 李专 胡远亮 梁运祥
- 14 稻谷专用酶制剂对肉鸭生长性能和营养物质利用率的影响
..... 丁斌鹰 侯永清 徐宁等
- 17 酶制剂在水产动物饲料中的应用
..... 明建华

水产养殖

- 20 罗非鱼对木薯粉表观消化率的研究
..... 田警 周洪琪 韩斌等
- 23 饲料中添加磷脂油、胆碱-L-肉碱对罗非鱼生长及组织脂肪含量的影响
..... 周萌 曹俊明 马利等
- 26 不同磷源对奥尼罗非鱼幼鱼生长性能的影响
..... 陈冰 潘庆 郑卫川等

试验研究

- 29 不同磷源在高添加水平下对肉仔鸡生长性能和组织钙含量的影响
..... 孟海燕 苏陵鸥 王建勋等
- 31 脱毒油茶粕饲料在罗非鱼养殖中的应用研究
..... 周文艺 周安国 王之盛
- 35 碱式碳酸铜生物效价的研究
..... 周安国 王之盛

营养研究

- 38 酵母对硒元素的高集研究和改良策略
..... 李海彬 曾礼华
- 42 锌的营养作用及鸡对锌需要量的研究
..... 周秀霞
- 45 肤岛素样生长因子-1的生物学功能及在畜牧业中的应用前景
..... 和玉丹

检测技术

- 48 饲料中三种硝基咪唑类药物的超高效液相色谱同步检测方法
..... 魏晋梅 周围 毕阳等
- 51 气相色谱-质谱联用法测定饲料中盐酸克仑特罗的分析
..... 金晓峰 章历勤 古海
- 54 抗坏血酸(VC)胶囊的质量检验及评定
..... 邹大琼 詹志春 詹连生

兽医兽药

- 56 畜禽专用抗生素泰妙菌素的研究进展
..... 杨海峰 王权 于生兰

资源开发

- 58 碱法水解糖蜜酒精废液处理过程中产生的微生物蛋白制备
复合氨基酸粉的研究
..... 赵蕊 朱义年 曾鸿鹤等

专题论述

- 60 微生物制剂降低胆固醇研究进展
..... 王峰 徐子伟 孙建华

问题探讨

- 63 饲料中氟超标及动物氟中毒
..... 宋文学 李小兵 谢光洪等

信息采集

- 16 波兰发现胶原质可保持肉类营养

企业标识展示



正育人才工程
(0519)7309867



通成集团
(028)85188888



江苏教育
(0412)3343018
(024)88080922



江苏教育
(0412)3343018
(024)88080922



东阳自动化
山东东阳
(0315)3719406



FDSO
江苏良友
(0519)8300988



Diabetes Laboratory
杨迪高维尔
(029)87035008



亿昌机械
(0519)7906658



KINS
杭州康德牧
(0571)86433111



KINS
杭州康德牧
(0571)86433111



Leader
广州立达尔
(020)87636309



Leader
广州立达尔
(020)87636309



Applied Nature
上海彼思艾
(021)57687881



Applied Nature
上海彼思艾
(021)57687881



Baidi
广州海大
(020)84661699



Baidi
广州海大
(020)84661699

我国水产养殖动物病害防治研究的主要成就与当前存在的问题

陈昌福

近些年来,我国水产养殖业一直保持持续、稳定的发展态势。在水产养殖业快速发展的同时,水产动物因各种病害造成的损失也处于上升的趋势。2006年对全国水产养殖动物病害检测的结果显示,在人工养殖的80种左右的水产养殖动物中约发生了180种疾病,全国30%以上的水产养殖面积受到各种病害的严重侵扰,由病害造成的直接经济损失达140亿元以上。

本文回顾了我国水产动物疾病学研究的主要成就,分析当前水产养殖业中病害防治方面存在的主要问题,为我国水产养殖动物疾病防治研究提供参考。

1 水产养殖动物病害防治研究的主要成就

1.1 关于水产动物病毒病的研究

我国对水产动物病毒病的研究虽然起步较晚,但取得的成绩却是非常显著的。首先是开展了对鱼类病毒病,主要是草鱼出血病的研究。从20世纪70年代以来,先后在草鱼出血病的病原学、流行病学、病理学、检测方法、病毒的基因组结构、免疫学、细胞培养灭活疫苗、防治方法等研究与应用方面取得了一系列突破性的成果。首先是系统地研究草鱼出血病病毒的组织培养、分类鉴定,并证实了草鱼出血病是由病毒引起的,最终不仅分离、鉴定了草鱼呼肠孤病毒(Reovirus),建立了多株草鱼的细胞系,同时还成功地研制出了组织浆灭活疫苗和细胞灭活疫苗,研制出病毒疫苗的大规模制备技术,从技术上解决了草鱼出血病的防治问题。其次,有关单位对草鱼呼肠孤病毒基因组和多肽结构、病毒RNA的转录酶活性、病毒糖蛋白结构多肽的抗原型、病毒多肽及基因组的体外翻译和病毒基因组的体内转录、疾病与环境的关系等也进行了研究。

早在20世纪60年代后期,珠江水产科学研究所将研制灭活组织浆疫苗注射、接种于草鱼获得成功以来,相关单位还开展了草鱼呼肠孤病毒病原体免疫学特性的研究,研制出了灭活疫苗、弱毒疫苗、亚单位疫苗、基因工程疫苗、DNA疫苗等多种类型的疫苗,并进行了生产性防病试验,获得了一定的成功。除研制开发疫苗外,还对鱼用疫苗的免疫接种途径、免疫刺激剂、营养与免疫的关系、抗病毒干扰素的诱生和检

测等方面开展了研究。目前已能够进行草鱼出血病病毒灭活细胞疫苗和减毒细胞疫苗的工厂化生产,免疫接种草鱼后其成活率可以达到85%以上,免疫能力保持13个月以上,已经产生了一定的经济效益。

此外,对鲤痘疮病、传染性胰脏坏死症、传染性造血器官坏死症、淋巴囊肿病、鳃虹彩病毒病、月鳃病毒病、真鲷病毒病等也进行了研究。对两栖类和爬行类中的牛蛙病毒病、乌龟病毒病、中华鳖病毒病等也有报道。我国水产动物病毒病的研究主要集中在对疾病的描述、病原的分离和初步鉴定、超薄切片电镜观察等方面。

对于甲壳类病毒病的研究是以对虾疾病为主进行的,也是水产无脊椎动物的病害研究中进展最快的。早在20世纪80年代中期研究者就发现了在对虾肝胰腺细小病毒,直到1993年,对虾暴发流行性疾病促使对虾病毒学成为了一个引人注目的研究领域。目前在我国已报道的对虾病毒约5~6种,在对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(或称白斑综合症病毒,WSSV)及肝胰腺细小病毒(HPV)的研究方面处于国际先进水平。几种病毒的基因组得到了部分克隆和测序,有力地促进了疾病诊断和病毒检测技术的发展。与国际上甲壳类病毒研究的特点类似,我国对虾病毒的研究也主要集中在组织病理学、分离纯化、形态学、核酸和多肽特性、病毒的流行病学、感染特性及病症、环境因子对发病的影响等方面,特色研究主要在对虾病毒的传播途径及病毒生态学方面,WSSV的基因组测序的研究进展也较为显著,其诊断和检测技术与国际发展水平同步。在蟹类病毒研究方面,中华绒螯蟹颤抖病病毒(现在有人认为病原是螺原体)的研究初见成效。与鱼类或昆虫类的病毒学研究比较,由于缺乏甲壳类传代细胞株和标准实验动物,其病毒学的研究进展受到很大影响,研究层次和深度也显得相对较低。

在贝类病毒病方面已经发现了两种病毒:三角帆蚌瘟病毒和皱纹盘鲍病毒,但还需更进一步的研究。

免疫学检测技术已初步实现了商品化,已经对草鱼出血病病毒、对虾白斑综合症病毒、肝胰腺细小病毒等进行了单克隆抗体研制,并完善了相应的酶联免疫吸附试验(ELISA)和乳胶凝集试验等快速检测技术。对虾病毒WSSV的核酸探针检测技术及PCR检测技术已经有了商品化的检测试剂盒。

陈昌福,华中农业大学水产学院,教授,430070,武汉。

收稿日期:2007-04-02

1.2 关于水产动物细菌病的研究

对水产动物大多数细菌性疾病都有了不同程度的研究,其中对主要淡水养殖鱼类的细菌性败血症的研究最为系统和深入,已经在病原、致病机理、流行规律、治疗药物、免疫、环境与生态防治等方面取得了一系列的研究成果,发现了嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、产碱假单胞菌、鲁克氏耶尔森氏菌、河弧菌生物变种 III、副溶血弧菌、创伤弧菌等多种革兰氏阴性细菌病原。通过对嗜水气单胞菌分子毒素的结构和致病机理,以及细菌性疾病病原的快速检测方法和防治方法研究,成功地研制出了嗜水气单胞菌的灭活疫苗,建立了鱼类出血性败血症细菌疫苗的生产工艺流程,并进行了大规模的生产和推广应用。建立了疫苗防治技术及综合预防措施,使上述细菌性疾病基本上得到了控制,也对鱼类细菌的个别质粒的提取、分子结构、抗性机理等进行了较为深入的研究。

在细菌耐药性方面从鱼类病原菌各种耐药性的发生、发展到其机理的研究均已逐步深入,分离并深入分析了耐药性的遗传因子(抗性质粒的基因结构、抗性谱等)。此外,细菌的鉴定除快速鉴定系统外,还在 16S rRNA、质粒等方面开展了一系列分子生物学鉴定技术的研究。

目前,利用现代生物学技术检测细菌性病害的研究发展很迅速,主要有荧光抗体技术、免疫酶技术、单克隆抗体技术、核酸杂交技术、聚合酶链反应(PCR)技术等。由于上述检测技术具有灵敏度高、特异性强、实用性好等特点,现在已成为多种水产动物细菌性病害的常规诊断方法。利用鱼类和虾的主要细菌性病原的相应免疫学或分子生物学病原的检测技术,已经部分地开发了商品化的试剂盒。

1.3 关于水产动物寄生虫病的研究

20 世纪 50 年代开始,我国水产动物疾病学的研究内容主要是针对各类寄生虫病展开的。对于水产养殖动物寄生虫病的研究,主要集中在病原的形态描述、分类地位确定、生活史、流行病学以及防治方法等方面。经过多年努力,我国水产动物寄生虫病的研究水平已处于世界前列,部分在世界范围内有影响力的论文和专著相继发表和出版,为我国水产动物寄生虫病学的研究处于世界领先地位奠定了基础。

利用现代分子生物学技术研究水产动物寄生虫病学也正在逐步展开。对小瓜虫的免疫研究、鱼类单吸虫等抗原及基因组的分子生物学研究等均比较深入,确定了抗原蛋白及其定位,构建了部分基因文库,研究了 PCR 和核酸探针检测方法,为检测、免疫、防治提供了一定的理论基础和实际应用技术。

2 存在的问题与不足

由于我国水产养殖业的养殖方式从粗放式向集约化方式转变,导致水产养殖业者和相关科研人员已经掌握的水产养殖和防治养殖动物疾病的技术总是不能满足不断转换的水产养殖方式的需要,科学研究滞后于水产养殖生产的发展。同时,水产养殖动物预防知识的科学普及工作不到位,从事水产养殖的人员缺乏必要的相关知识,因此在实际水产养殖生产中存在很多问题。

2.1 准确诊断病原菌和对症治疗困难

国外对鱼类病毒病的研究历史较早,也非常深入,很多研究内容都达到了分子生物学水平,如在病原结构的分子生物学、分子流行病学、分子毒理学、分子免疫学及基因工程疫苗等的研究中,均已经取得了丰硕的成果。在病毒分子生物学方面,病毒基因组的研究已深入到了各基因片段编码的蛋白鉴定、体内转录、糖蛋白肽以及不同病毒分离株的基因组和蛋白多肽的差异,病毒各基因组片段的克隆、测序和表达,进而进行基因工程疫苗的研究等。在疾病流行病学方面,通过对全国范围内鱼类种群中病毒感染的检测来预测流行规律,从而制定当年的控制对策;运用频率分布来描述鱼类寄生虫在寄主种群中的分布,并从其动态中了解疾病发生的可能。而我国在这些方面的研究刚刚起步,与国外相比还存在明显的差距,对病原的生物学特性了解不够深入,且由于水产动物疾病的病原种类多、发病规律复杂、流行趋势多变,对疾病的诊断不够及时,往往贻误了有效防治疾病的时机。

2.2 高效的适用于水产动物的兽药少

国外对水产用兽药的毒理学、药理学的研究均比较细致深入,其兽药的毒理学涉及各个研究范畴,药理学的深入研究为水产动物专用兽药的科学使用奠定了基础。而我国在水产动物专用兽药的研究方面存在许多问题:水产动物专用兽药药理学等基础理论滞后,导致其兽药的使用徘徊在一个非常低的水平;安全有效的水产动物专用兽药及其剂型贫乏,制剂的工艺水平很低;缺少水产动物专用兽药评价的方法和试验平台;安全、科学用药的知识普及有限,在水产养殖生产中滥用水产动物专用兽药的现象仍然很严重。

目前,我国的水产养殖动物专用药物的种类比较少,针对性差。对水产养殖动物疾病的防治主要依靠使用化学药物,如人药、农药、兽药等,用药效果差。滥用药物的事件在水产养殖生产中时有发生,致使养殖水体中微生态环境破坏严重,耐药菌株大量出现,不仅直接造成了暴发性流行病的不断出现,同时也造成了水产养殖动物的食品安全问题。此外,供水产养殖

动物使用的疫苗非常少。

2.3 养殖技术和养殖模式不相适应

目前,水产养殖技术与集约化、多类型混合高密度养殖模式不相适应,主要表现在以下几个方面:①水产养殖布局不合理,部分地区出现过度、无序的开发,造成资源浪费;②不断增加养殖密度,使养殖密度超过水体运载能力,破坏了水质,使水体富营养化;③迄今为止几乎所有的水产养殖动物还只能属于野生种群,而生长速度快、抗病能力强的优良抗病品种匮乏;④缺乏专用水产动物饲料、且种类不成系列,饲料系数普遍偏高等。

2.4 关于水产养殖动物疾病研究的试验模型数量极少

试验模型对于学科和技术的发展极为重要,医学和陆生动植物已建立了包括动物试验、组织培养和病原保藏中心等在内的数百种标准试验模型,有力地促进了医学和陆生动植物病害研究的发展,而水生生物标准的试验模型(包括组织培养模型、试验动物模型和病原库)相对来说数量极少。国外建立了60余种鱼类细胞系,有近40种病毒采用细胞培养分离成功,多数水生生物的病原细菌也有标准培养物得到保存,已有近交50代以上的纯系鱼。在甲壳类方面,我国甲壳类等没有传代细胞系或标准试验模式动物的建立,而国外某些权威实验室对对虾病毒病原已有较为全面的保存。总之,我国关于鱼类试验模式动物的研究与国外有一定的差距,研究工作刚刚起步。

2.5 养殖管理不够科学、制度不健全

病害的综合防治对于疾病控制极为重要。北欧的鲑、鳟鱼类的养殖历史较早,对水产养殖动物的疾病防治工作进行得较为深入,他们从苗种免疫等角度加强鱼体的抗病力,从养殖环境的改良、水质调控、优质饵料、病原监控等方面开展了综合的健康管理工作。泰国在对虾的病害方面进行的综合防治也颇具特色,形成了一套围绕提高对虾健康状况、减少病原入侵机会、保证养殖环境清洁稳定等的健康管理技术,使泰国的对虾养殖未受到病毒病的干扰,产量跃居世界首位。

我国的水产养殖管理不够科学,制度还不完善,特别是病害预防、控制、治理方面缺乏应急机制与保障措施;在物种引进时没有严格的风险管理制度,对疾病携带的危险估计不够,控制措施不力。此外研究经费不足也是制约水产养殖业发展的一个方面。

总之,我国整体的水产养殖动物病害防治研究力量还相对薄弱,研究者的创新思维受到研究条件局限和经费短缺的约束,低水平或重复性的研究还比较多。此外,开展的研究工作与实际生产上的需要存在比较大的差距,致使一些研究成果在水产养殖生产中

的应用效果不理想,与国外相比,成果的实用化和商品化工作还很不完善。

3 对近期水产养殖动物疾病防控对策的几点建议

3.1 尽快建立我国水生动物防疫体系

建立水产养殖动物疫病风险评估和预警机制,增强水产养殖动物的疫病的控制和预警能力,为有效控制水产养殖动物的疾病构建和整合社会资源平台。

3.2 尽快开展水产养殖动物病原菌耐药性普查

评价和利用现有水产动物专用抗生素类兽药,为开发新一代药物提供依据,并尽快制订安全、科学用药的渔民培训计划,保障水产品质量安全和人类的身体健康,促进水产养殖业可持续发展。

3.3 加快疫苗的研制和产业化进程

在鱼用疫苗方面采取“用好现有的、开发未来的”思路。目前我国已有草鱼出血病疫苗、淡水鱼类嗜气单胞菌疫苗的生产批文,但是,在水产养殖生产中推广使用尚存在“没有用好、没有用足”的问题。对此,政府可以扶持企业或组织生产,弥补市场的空缺。另外,开发目前科研基础较好、较成熟的鱼用疫苗研究项目,对于鱼病病原分离、纯化、培养及免疫研究较好的项目,应在产品开发、设备投入、生产资金、推广使用上给予支持、扶持。

3.4 采取科学、缜密的生物安全措施,严格控制外来病原生物入侵

对进境与境内跨区域活体动物及其加工品在移动中可能携带的疾病、疫病实施监管;对生物污染、危害程度进行评估。建立健全危害程度报告与定期发布制度,有效切断传播途径,对重大疫病、新发现和突发性的病害实施扑灭措施。(编辑:徐世良, fx-xu@163.com)

· 作者简介 ·

陈昌福,1975年毕业于华中农业大学水产学院,1997年获得日本爱媛大学博士学位。现为华中农业大学教授;中国水产学会资深会员;中国水产学会鱼病研究会委员;中国微生物学会养殖分会理事;中国化工学会二氧化氯工作组副组长;全国化工标准物质委员会二氧化氯专业委员会副主任委员;中国兽药典第三、四届委员会委员;中国兽药审评委员;全国水产标准化技术委员会水生动物防疫标准化技术工作组成员。

主持湖北省重点科技攻关项目:草鱼细菌性烂鳃病免疫防治研究并荣获1993年度湖北省科技进步一等奖;主持湖北省重点科技攻关项目——草鱼细菌性烂鳃和肠炎病二联菌苗的研究并荣获1998年度湖北省科技进步二等奖。

先后主持3项国家自然科学基金资助项目:“脂多糖(LPS)对鱼类免疫细胞的免疫学活性研究(批准号:39470558)”、“鱼类种内遗传多态性和免疫应答关系的研究(批准号:39870598)”和“鱼类免疫细胞上脂多糖(LPS)受体的定位与激活机理研究(批准号:30271032)”。

发表专业文章80多篇,编撰专业书籍4本。指导研究生30多名。先后讲授《水产动物疾病学》、《鱼类免疫学》和《鱼类病原生物学》等课程。

真菌饲料添加剂对小鼠的增重试验

李耀忠 李爱华 岳思君 韩楠楠

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌种

黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、白地霉 (*Geotrichum candidum*)、米曲霉 (*Aspergillus ochraceus*) 为宁夏大学饲料工程中心保藏的菌种。

1.1.2 试验动物及日粮组成

将 40 只体重 15.0~16.0 g 健康的 ICR 小公鼠分成 10 组, 每组 4 只, 即对照组和试验 1~9 组, 组间体重差异不显著 ($P>0.05$), 编号、分笼饲养。试验所用试验小鼠和基础日粮均由宁夏医学院试验动物中心提供, 试验所用基础日粮组成见表 1。

表 1 基础日粮组成 (%)

原料	含量
玉米面	30.8
面粉	25.6
麸皮	20.5
豆粕	10.3
鱼粉	5.1
奶粉	2.1
鸡蛋	2.1
骨粉	2.1
复合维生素	0.2
鱼肝油	0.6
食盐	0.5
微量元素组成	0.2

1.1.3 培养基

察氏培养基: 硝酸钠 (NaNO_3) 3 g、磷酸氢二钾 1 g、硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 g、氯化钾 0.5 g、硫酸铁 0.01 g、蔗糖 30 g、琼脂 20 g、水 1 000 ml, pH 值 6.8~7。

麦芽汁培养基: 大麦芽粉 50 g、水 150 ml、鸡蛋 1 个, pH 值 6.8~7。

马铃薯培养基: 马铃薯块 200~300 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、水 1 000 ml, pH 值 5.5~5.7。

1.2 方法

李耀忠, 宁夏大学后勤处, 750021, 宁夏银川。

李爱华(通讯作者)、岳思君、韩楠楠, 单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期: 2007-03-12

★ 国家“863”计划项目(编号 2005AA001330)、国家农业科技成果转化资金项目(编号 2006GB2G300314)、宁夏科技攻关项目(编号 2004-0499)”资助

1.2.1 真菌添加剂的制备

将实验室冰箱保藏的白地霉、黑曲霉、米曲霉接种于相应的斜面培养基上活化后分别制成含 1.0×10^8 、 3.1×10^8 和 2.3×10^8 个/ml 孢子悬液, 以 6.6%、2.1% 和 2.8% 的接种量, 在 28 °C、120 r/min 的摇床上液体培养 72 h, 再以 5% 的接种量接种到由小鼠基础日粮组成的固体培养基中, 28 °C 发酵 72 h, 风干后制成真菌饲料添加剂, 并按 25% 的比例加入小鼠基础日粮中, 制成饲料备用。

1.2.2 试验设计

用不同比例的黑曲霉、白地霉、米曲霉发酵物制成 9 种真菌饲料添加剂, 试验方案见表 2。

表 2 真菌饲料添加剂菌种组成及比例 (%)

试验组	黑曲霉发酵物	米曲霉发酵物	白地霉发酵物
1	20	30	50
2	20	50	30
3	30	50	20
4	30	20	50
5	50	30	20
6	50	20	30
7	-	-	100
8	100	-	-
9	-	100	-

1.2.3 酶活的测定

分别用 DNS 法和 Folin 法测定真菌饲料添加剂中 C_x 酶和酸性蛋白酶的酶活。

C_x 酶酶活单位定义: 在 pH 值 4.6、50 °C 条件下, 1 min 内从羧甲基纤维素钠盐溶液中降解释放 1 mmol 还原糖所需要的酶量为一个酶活单位 (U)。

酸性蛋白酶酶活单位定义: 1 g 固体酶粉在 pH 值 3.0、40 °C 条件下, 1 min 水解酪素产生 1 μg 酪氨酸所需要的酶量为 1 个酶活单位 (U)。

C_x 酶酶活 (U/g) = 葡萄糖含量 / $5 \times E_w$;

酸性蛋白酶酶活 (U/g) = 酪氨酸含量 $\times 4 \times n / 1 \times 10$ 。

式中: 葡萄糖含量——查标准曲线得出 (mmol);

5——酶与底物作用的时间 (min);

E_w ——1 ml 酶液中所含酶量 (g);

酪氨酸含量——查标准曲线得出 (μg);

4——反应试剂体积 (ml);

n——样品稀释倍数 (ml/g);

1——参与反应的酶液量 (ml);

10——反应时间 (min)。

1.2.4 饲喂与称重

试验开始和3周时各组小鼠空腹1 d逐只称重,分别作为初重和末重,每天饲喂2次,各组饲养管理条件一致,同时每周空腹逐只称重1次以观察其生长情况并记录。

2 结果与分析

2.1 真菌饲料添加剂对小鼠增重的影响(见表3)

表3 真菌饲料添加剂对小鼠增重率的影响

组别	初重(g/只)	末重(g/只)	均增重(g/只)	相对增重率(%)
对照	15.4	25.7	10.3	0
1	15.3	26.2	10.9	5.83
2	15.6	28.5	12.9	25.24**
3	15.3	27.9	12.6	22.33*
4	15.5	27.2	11.7	13.59*
5	15.4	26.4	11.0	6.8
6	15.3	25.9	10.6	2.91
7	15.5	28.3	12.8	24.27**
8	15.3	27.2	11.9	15.53*
9	15.6	27.7	12.1	17.48*

注:*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。

从表3可见,9个试验组对小鼠均有增重效果,3周后9个试验组平均增重11.8 g/只,比对照组提高14.89%。不同菌种及配合比例的饲料添加剂对小鼠增重率的效果也各异,其中2组(白地霉:黑曲霉:米曲霉=3:2:5)增重率(25.24%)最好,其次为7组(100%白地霉),增重率(24.27%)较高,均达到极显著的水平($P<0.01$);而6组和1组(白地霉、黑曲霉、米曲霉以3:5:2和5:2:3的比例)增重率较差,分别为2.91%和5.83%。就复合菌种组成的添加剂对小鼠增重率的效果来看,米曲霉比例高的效果好,黑曲霉比例高的效果差一些。单菌种组成的添加剂对小鼠增重率的效果依次是白地霉>米曲霉>黑曲霉。

2.2 酶活的测定(见表4)

表4 试验各组的酶活

组别	C _x 酶酶活(U/g)	酸性蛋白酶酶活(U/g)	C _x 酶酶活/酸性蛋白酶酶活
1	61.86	64.00	0.97:1
2	126.28**	57.68	2.2:1
3	64.41	60.62	1.06:1
4	76.33	70.10	1.09:1
5	93.36	72.82	1.28:1
6	97.33	75.98	1.28:1
7	52.78	67.60	0.78:1
8	157.78**	97.00**	1.63:1
9	13.05	36.00	0.36:1

由表4可见,不同菌种及其配合比例制成的真菌饲料添加剂C_x酶和酸性蛋白酶的酶活各异,其中8组(100%黑曲霉)和2组(白地霉:黑曲霉:米曲霉=3:2:5)的C_x酶酶活最高,分别高达157.78 U/g和126.28 U/g,而9组(100%米曲霉)C_x酶酶活较差,为

13.05 U/g。以8组的酸性蛋白酶酶活最高达97.00 U/g,而以9组酸性蛋白酶酶活最低。

3 小结与讨论

试验结果表明,3周后9个试验组平均增重11.8 g/只,比对照组提高14.89%,其中2组增重效果最好,增重率较对照组提高25.24%,差异极显著($P<0.01$)。

单菌株添加剂增重效果均显著($P<0.01$ 、 $P<0.05$);多菌株饲料添加剂中有2、3和4组的增重效果显著($P<0.01$ 、 $P<0.05$),而1、5和6组的增重效果不显著,可能因为该真菌添加剂作用机理除其含粗酶制剂及菌体蛋白外还含有活菌,不同种属真菌进入动物肠道后因其之间可能存在着相互拮抗或共生现象,表明在研制多种真菌的生态制剂或微生物添加剂时,应注意菌株间的生物拮抗关系。

各真菌饲料添加剂中C_x酶和酸性蛋白酶的酶活不同,其中8组和2组的C_x酶酶活最高,8组的酸性蛋白酶酶活最高,而100%的米曲霉添加剂组酸性蛋白酶酶活最低。真菌饲料添加剂中C_x酶和酸性蛋白酶酶活的高低对小鼠增重率的影响规律性不强,但有C_x酶酶活高、C_x酶酶活和酸性蛋白酶酶活比例差异大可使小鼠增重率提高的趋势,其增重的效果和机理还有待于进一步研究。

近年来随着我国动物生态学研究的崛起,微生物生态制剂的研究及运用正方兴未艾,它不仅能保护和维持畜禽、鱼类等动物肠道的微生态平衡,进而增强它们对疾病的防治能力,而且还可以促进动物生长发育、增重育肥、提高蛋白产量及饲料转化率。

霉菌大量存在于土壤中,不是动物肠道中的正常微生物,但近年来,该类微生物在饲料工业中作为高品质的饲料添加剂被广泛应用,以提高家禽、家畜的生产性能,尤其是反刍动物。用于反刍动物微生物饲料添加剂生产的菌种主要有黑曲霉和米曲霉。这些曲霉菌都能产生纤维素酶,有利于反刍动物对纤维素的消化和吸收利用。曲霉能透过植物表皮角质层屏障,破坏纤维素的结构完整性,降解含木质素的植物细胞壁,使其能被动物更有效的消化,特别是在粗饲料成分较多的情况下,曲霉更显出其重要作用。黑曲霉还能产生淀粉酶、蛋白酶和果胶酶。米曲霉能产生植酸酶,使磷从植酸和植酸盐中释放出来,被动物充分吸收利用,提高钙、镁、锌、铜的吸收。白地霉可作为饲料添加剂,具有很高的营养价值且生长繁殖快,对培养基要求不高。

(编辑:王芳,xfang2005@163.com)

β-防御素的研究进展

赵凤立 朱连勤 乔彦良

β-防御素作为抗菌肽的一种,是一类富含精氨酸的阳离子低分子短肽,广泛分布于动物、植物和昆虫体内。体外抑菌试验表明,防御素能对革兰氏阳性和阴性细菌、真菌、分枝杆菌、螺旋体、披膜病毒等病原微生物产生较强的杀伤作用,甚至对支原体、衣原体、螺旋体以及一些恶性细胞(如肿瘤细胞)和艾滋病病毒也具有杀伤作用。运用基因工程技术表达而大量生产的防御素无毒副作用,也不会使病原微生物菌株变异而产生抗药性,且具有广泛的抗性谱。

自然界中各类生物都具备内在的防御系统。研究发现,许多生物体内存在一类具有抗菌作用的短链多肽,统称为抗菌肽。生物有机体合成的内源性抗菌肽具有广谱、高效的抗微生物活性,是其天然免疫系统的重要组成部分。哺乳动物的抗菌肽主要分为两大类:防御素(defensins)和 cathelicidins。前者含有6个保守的半胱氨酸,形成3个分子内二硫键,而后者含有保守的 cathelin 区域,形成结构各异的抗菌肽。防御素包括由潘氏细胞产生的α-防御素和由肠上皮细胞产生的β-防御素。β-防御素为具有广谱抗微生物活性的阳离子多肽,是上皮细胞和白细胞的产物。

1 β-防御素的分布

防御素主要由中性粒细胞产生,但在其它细胞中也发现有防御素表达,β-防御素主要存在于哺乳动物的有关组织和细胞中,广泛分布于人、鼠、牛、羊、猪的多种器官的上皮细胞内,小鼠的β-防御素主要分布于肺、气管和肾脏;牛的β-防御素最初是从牛的气管粘膜上皮细胞中发现的;猪的β-防御素广泛分布于消化道、呼吸道、淋巴器官、心脏、肝脏、肾脏、脑、皮肤、肌肉、睾丸、脐带及骨髓等器官内以及中性粒细胞和肺泡巨噬细胞内。鸡的防御素是 Hawing 等(1994)

最先从鸡嗜中性粒细胞中分离提取的,属β-防御素。对其进行分离纯化,得到了3种相似的抗菌肽:Gal-1、Gal-1a、Gal-2(Gallinacin 缩写为 Gal)。

2 β-防御素的结构

β-防御素蛋白外形小,每一种β-防御素基因编码是由59~80个氨基酸组成的前蛋白,平均为65个氨基酸,再通过尚不明确的机制裂解成成熟多肽,成熟多肽大多由36~47个氨基酸组成,平均为45个氨基酸。防御素蛋白最大的特点是具有6个半胱氨酸的基本序列,6个半胱氨酸形成3个二硫键。鸡的β-防御素蛋白的3个二硫键连接方式为 Cys1-Cys6、Cys2-Cys4、Cys3-Cys5,构成稳定的反相平行的3股β-片层结构,二硫键可以使小分子防御素紧密联结以防御蛋白酶水解,所以在富含蛋白的吞噬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。

β-防御素基因含有2个外显子和1个内含子,第1外显子编码5'端非翻译序列及信号肽和部分前片段,第2个外显子编码剩余部分前片段、成熟肽和3'端非翻译序列,终止密码子一般在成熟肽序列末端。β-防御素的表达既有组成型的,又有诱导型的。

3 β-防御素的生物活性

内源性抗菌肽,尤其是β-防御素,它是机体抗感染中第一道防线——粘膜的关键因子。可以快速、非特异地杀灭侵入的病原体,如细菌、真菌和披膜病毒,对螺旋体、分枝杆菌、原生动物也有一定的杀灭作用。

3.1 抗菌作用

尽管β-防御素抗菌素谱广,但不同防御素的杀菌能力的强弱和抗菌谱的侧重点仍有所不同,天然分离的 hBD-2 对 *G. Pseudomonas aeruginosa*、*E. coli* (LD₅₀ 10 g/ml) 和 *Candida albicans* (LD₅₀ 25 g/ml) 均有杀伤作用,但对 G⁺菌和 *Staphylococcus* 杀伤力不强。同时过高的盐浓度(150 mmol/l)会导致防御素活性水平急剧下降。Bals 也报道,β-防御素在高盐环境中不能保持抗 G⁺菌的活性。另外,一价离子对防御素活性影响较小,二价离子(如钙、镁离子)则可显著降低防御素的活性。β-防御素为毫摩尔浓度时才具有杀伤细菌的能力,而

赵凤立,山东信得科技,研发工程师,266061,青岛市香港东路268号D338。

朱连勤,莱阳农学院。

乔彦良,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-02-23

纳摩尔浓度时就具有趋化活性。

3.2 抗病毒作用

β-防御素能杀灭一些披膜病毒,如 HIV、疱疹病毒等。Quinoncs-Matcu 等(2003)第一次研究表明了 HIV-1 诱导 β-防御素在口腔上皮细胞中的表达,β-防御素通过调变 CCR4 复合受体阻滞 HIV-1 复制。防御素对病毒的抑制程度依赖于防御素的浓度、分子内二硫键的紧密程度。防御素的抗病毒作用同样受到 pH 值和离子强度的影响,在中性及低离子强度时,防御素具有强的抗病毒功效。

3.3 细胞毒性作用

β-防御素还具有细胞毒性作用,抑制某些肿瘤细胞的生长。在体外试验研究中观察纯化的防御素对数种人类及小鼠的肿瘤细胞的作用情况发现,防御素对白血病细胞系、淋巴瘤细胞系及实体瘤细胞系具有毒性作用,并且这种抗肿瘤功效与其作用时间和剂量呈正相关。需要指出的是,防御素的这种细胞毒活性是非肿瘤细胞特异的,它不仅对肿瘤细胞具有毒性作用,而且对自身细胞也有一定侵害作用,其细胞毒性活力是不依赖氧的机制溶解靶细胞的,作用主要通过抑制氧化酶的活性,并部分依赖于靶细胞膜的脂质成分,与过氧化氢酶有协同作用。Mizukawa 等在口腔鳞状细胞癌病人唾液中发现, hBD-1 与肿瘤组织相比邻的朗氏细胞内也发现了防御素,这些可能与肿瘤有关。韩献萍等(1994)报道,柞蚕抗菌肽 D 对宫颈癌细胞具有杀伤作用。

3.4 连接先天性免疫和获得性免疫

Duit 等研究表明,β-防御素可能是不成熟树突状细胞和记忆 T 细胞的趋化因子。Yang 等(1999)对 β-防御素化学趋化活性进行研究,达到亚微摩尔浓度的这些 β-防御素即可以吸引尚未成熟的树突状细胞和记忆性 T 细胞,这一效应是由 CC 类趋化受体 6 所介导的。hBD-3 在体内可能通过其与 CCR6 的相互作用而招募未成熟 DC 与记忆性 T 淋巴细胞向微生物入侵的皮下或粘膜部位积聚。因此,β-防御素一方面直接杀灭病原体;另一方面趋化树突状细胞、T 细胞至感染组织,提高了机体抵抗微生物感染的获得性免疫水平,成为先天免疫系统和后天免疫系统连接的桥梁。由此可见,β-防御素在机体抗微生物入侵的先天性免疫和获得性免疫中均具有重要作用。

4 β-防御素的作用机理

目前,对防御素的抑菌机理尚无明确的定论,普遍认为由于 β-防御素分子带正电荷,能够与带负电荷、呈阴性的细菌表面结合,结合后其分子中的疏水区可插入到细菌的胞膜;而其带电区(带正点荷)则与细菌胞膜上带负电荷的磷脂头部和水分子相互作用,形成电压依赖的离子渗透性膜通道,使膜具有通透性。在细胞膜上,多个 β-防御素分子聚集形成孔隙或通道,从而扰乱了细胞膜的通透性及细胞能量状态,导致细胞膜去极化,呼吸作用受到抑制以及细胞 ATP 含量下降,细胞必需的代谢物质外泄,防御素和正常情况下不能进入细胞的物质(离子、酶、及某些抗生素)内渗,最终导致不可逆性的菌体死亡。高等动物的细胞则由于细胞膜中负电荷含量较低而免于被攻击。正是由于这种特殊的作用机理,使防御素具备两个特点:①抗菌谱广;②目的微生物难以对防御素产生抗性突变。

防御素的抗病毒作用则是通过与病毒外壳蛋白结合而导致病毒失去生物活性。防御素对没有包膜的病毒缺乏抗病毒活性,这说明膜的相互作用对防御素的抗微生物功能是必要的。

5 β-防御素的表达、基因克隆和蛋白工程

天然获取防御素的量极其有限,合成或从机体中提取的由于其分子含有 3 对二硫键,多肽难以保证正确配对,影响其生物活性,且步骤复杂、产率低、价格昂贵。防御素基因工程研究由于受到人们的广泛关注,发展十分迅速,各种先进的生物学技术也为它的发展提供了条件。迄今为止,关于防御素基因工程的研究已取得很大的成果。Jaynes 等利用基因改造,获得了比天然提取的肽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了比其它任何一个供体抗菌肽都高的抗菌活性。蔡绍晖等(2003)研究了 C 端带 Myc 基因和多聚组氨酸双标记的重组人-防御素-2 在 COS-7 细胞的转染表达。吴映雅等将柞蚕抗菌肽 D 基因连接在牛成纤维细胞生长因子 cDN 的上游,在酵母中成功地得到了表达,表达产物具有抗菌活性和牛成纤维细胞生长因子的抗原性。Zhang 等选择 RepA 蛋白的序列作为抗菌肽的融合表达伴侣,并插入 Histag 等序列作为纯化亲和位点,实现了在 E.coli 中的融合表达。

利用基因工程技术生产防御素由于该分子的抗菌活性,面临防御素引起工程菌“自杀”的难题,给基因

胆汁酸的生理功能及在畜牧业中的应用

赵晓芳 张宏福

胆汁酸是胆汁的主要成分,在脂肪消化过程中起着重要作用。集约化养殖过程中频繁的应激无形中加大了动物肝脏的压力,肝脏分泌胆汁的功能受到抑制,脂肪的消化率随之降低,从而出现营养性腹泻、脂肪肝、肝炎等病症。胆汁酸作为一种饲料添加剂,可有效缓解上述问题,本文详细介绍胆汁酸的结构组成、生理功能以及在畜牧业中的使用效果和存在问题。

1 胆汁酸的组成及合成

1.1 胆汁酸的组成

胆汁酸是胆汁的主要成分,是动物体内胆固醇代谢过程中所产生的一系列固醇类物质。胆汁酸按结构分为游离型胆汁酸和结合型胆汁酸两类,前者包括胆

酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、石胆酸和微量熊脱氧胆酸等;后者是游离胆汁酸与甘氨酸或牛黄酸结合的产物,主要包括甘氨酸胆酸、甘氨酸鹅脱氧胆酸、牛黄胆酸及牛黄鹅脱氧胆酸等。

另外,不同动物的胆汁酸种类和数量都不相同,起作用的成分也有较大差别。如人的胆汁酸是以胆酸、鹅脱氧胆酸为主;奶牛胆汁酸的主要成分为胆酸和脱氧胆酸;鸡体内脱氧胆酸含量很少,鹅脱氧胆酸的含量最高。因此,如果胆汁酸要有效发挥其生理功能,必须根据动物种类的不同选择适宜的胆汁酸产品。

1.2 胆汁酸的合成及代谢

1.2.1 胆汁酸的合成

胆汁酸由胆固醇代谢过程中转变而来,其合成分为3个阶段:①初级胆汁酸的合成。胆固醇在多种酶的作用下,经过羟化、加氢及侧链氧化断裂等多步反应,最终形成初级胆汁酸(胆酸和鹅脱氧胆酸等)。②结合型初级胆汁酸的合成。初级胆汁酸与甘氨酸或牛黄酸结合,形成结合型胆汁酸,分泌入胆道。③次级胆

赵晓芳,南宁市广东温氏畜禽有限公司,530200,广西南宁市邕宁区蒲庙镇龙岗村。

张宏福,中国农业科学院畜牧兽医研究所。

收稿日期:2007-04-02

工程表达带来了一定困难。

6 β -防御素的研究应用情况

防御素由于分子小并具有稳定的分子结构等特点,为当今研制多肽类新药提供了理想的分子骨架和模板。防御素的医用价值已引起研究者的关注,其强大的抑菌功能、独特的作用机制,为耐药病原微生物感染的治疗带来了希望。由于防御素之间和防御素与抗菌剂之间的协同作用,故联合应用几种防御素和抗菌剂可以取得更好的效果,或者利用其诱导表达的特性,设计药物来特异地诱导靶器官的防御素表达,从而达到治疗目的。刘温发等(2005)报道,蚕抗菌肽可减轻断奶仔猪的腹泻;蚕抗菌肽酵母制剂可促进仔鸡生长,减少排泄物氮含量。目前,广东省应用抗菌肽基因转化酵母进行高效表达,经发酵条件优化,生产抗菌肽酵母制剂,并将其用作畜禽及水产饲料添加剂,代替抗生素来预防及治疗仔猪白痢及雏鸡白痢有明显效果。从柞蚕蛹中分离抗菌肽能促进肉鸡生产性

能,对提高免疫力、预防肉鸡的疾病有较好效果。陈晓生等(2005)在鸭日粮中添加蚕抗菌肽AD-酵母液体制剂,结果发现抗菌肽可起到抗菌促生长的作用。

7 展望

现在动物疾病越来越趋向于复杂化,新的混合性感染不断出现,不利于畜牧业的发展。而抗生素添加剂的使用严重破坏了动物肠道的微生物平衡,并易在动物体内残留,严重影响了畜产品的品质和人类健康。运用基因工程技术表达而生产的防御素无毒副作用,也不会使病原微生物菌株变异而产生抗药性,且具有广泛的抗性谱,可以减少化学抗菌剂在畜牧业上的应用,降低有毒、有害物质在生物体内的残留,提高畜产品的安全,具有广阔的开发应用前景。

(参考文献 41 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:王芳,xfang2005@163.com)

胆汁酸的合成。结合型初级胆汁酸随胆汁进入小肠参与脂类的消化吸收后,部分结合型初级胆汁酸在空肠、回肠及结肠上段,在细菌酶的催化下,进一步水解、结合及脱羟生成脱氧胆酸、石胆酸、熊脱氧胆酸等次级胆汁酸。

1.2.2 胆汁酸的代谢

动物进食后,胆汁酸进入小肠,乳化脂肪。乳化的脂肪被水解为甘油与脂肪酸后,胆汁酸与脂肪酸形成脂肪酸—胆汁酸复合物,被小肠绒毛膜吸收,然后与脂肪酸分离,经门静脉入肝,由肝细胞摄取,将游离型胆汁酸再合成结合型胆汁酸,并同重吸收的以及新合成的结合型胆汁酸一起排入肠道,这一过程成为胆汁酸的肝肠循环,肝肠循环使有限的胆汁酸能发挥最大限度的乳化作用,以保证脂类食物消化吸收的正常进行。排入肠道的胆汁酸约95%以上被重吸收,其余随粪便排出,所以胆汁酸每循环一次约损失5%。返回到肝的胆汁酸有刺激肝胆汁分泌的作用,但肝脏病变会降低肝细胞摄取胆汁酸盐的能力,导致肝脏分泌胆汁酸的能力下降,影响脂类的消化吸收。

2 胆汁酸的生理功能

2.1 促进脂肪和脂溶性物质的消化吸收

食物中的脂肪通过胆汁酸的作用先被乳化,而后被脂肪消化酶所消化,消化产物包含在胆汁酸的微粒中,被小肠中的绒毛膜吸收。在整个脂类的消化吸收过程中,胆汁酸具有重要的生理功能。当动物采食油脂含量高的食物时,可刺激十二指肠分泌胆囊收缩素,促使胆囊收缩将胆汁排入肠道,帮助脂肪消化。若胆汁酸分泌不足,过量的脂肪会产生腻感,严重抑制动物的采食,从而降低动物的生长性能。胆汁酸促进脂肪消化吸收的机理如下:

① 促进脂肪的乳化

胆汁酸分子内既含有亲水性的羟基及羧基,又含有疏水性烷基,两类性质不同的基团位于环戊烷多氢菲核的两侧,使胆汁酸具有较强的表面活性,能降低油水两相间的表面张力,促进脂类乳化,并形成可以悬浮在水中的脂肪酸乳糜颗粒,扩大脂肪和脂肪酶的接触面,加速脂类的消化。

② 活化脂肪酶,增强脂肪酶的活性

胰腺分泌的脂肪酶原在小肠内转变为有活性的脂肪酶才能发挥作用,它的激活必须有胆汁酸的参与,而且胆汁酸可使脂肪酶结合到甘油三酯的脂滴的表

面上而起到催化作用。脂肪酶的功能发挥的最佳pH值范围为8~9,而在小肠前端pH值为6~7的环境下,脂肪酶基本不起作用,但是当脂肪酶与胆汁酸形成一种复合物时,脂肪酶的性质发生了改变,能在pH值为6~7的小肠中发挥作用。并且在脂肪的吸收过程中,胆汁酸可以被肠上皮细胞识别,从而使脂肪酸—胆汁酸复合物进入小肠绒毛膜内,提高了脂肪的吸收率。

2.2 保持体内胆固醇的动态平衡

胆汁酸由胆固醇转变而来,这也是体内胆固醇排泄的重要途径之一。人类每天大约有500 mg的胆固醇通过转变为胆汁酸得以清除,清除掉多余的胆固醇对于所有动物来说都非常重要,尤其是在胆固醇摄入过多时。近年来研究发现,胆汁酸还作为一种激素,通过改变胆固醇合成过程中的限速酶的转录来参与胆固醇的代谢。

2.3 保肝利胆,维护动物健康

随着抗生素在养殖业中的大量使用,抗生素杀灭细菌后产生大量的内毒素严重影响动物健康,而肝脏在所有营养物质的消化吸收、有毒有害物质的分解、解毒过程中起非常重要的作用,肝脏病变随之引起一系列消化吸收障碍,而胆汁酸可减少动物体内细菌内毒素吸收,如果动物摄入适量的脱氧胆酸,就能有效分解内毒素,维护动物健康。

脱氧胆酸和熊脱氧胆酸还可促进肝细胞分泌大量稀薄的胆汁,使胆道畅通,消除胆汁淤滞,起到利胆作用。很多药物、重金属、霉菌毒素和其它有害物质亦可从胆汁中排出,从而维护动物健康。

2.4 消炎杀菌

胆汁酸还是一种有效的杀菌剂,在动物的大肠中,胆汁酸能够抑制大肠杆菌、链球菌及其它有害细菌的增殖。鸡胆汁酸对体外培养的G⁺菌、金黄色葡萄球菌有明显的抗菌作用。在人类医学上也采用胆汁酸作消炎药,用于治疗百日咳、金黄色葡萄球菌感染等。

哈斯苏荣等(2001)对鸡胆汁的有效成分牛黄酸(Tau)和胆酸(CA)进行了抗炎作用及抗菌作用研究,结果表明,Tau和CA对慢性炎症均有很强的抑制作用,CA还对体外培养的革兰氏阳性菌、金黄色葡萄球菌有明显的抗菌作用。

但有些学者认为胆汁酸没有抗菌基团,其抗菌活性是通过促进脂肪的消化,避免了肠道菌群的失衡而实现的。

2.5 改善动物的胴体质量

胆汁酸能提高甲状腺激素的活性,促使多余的脂肪“燃烧”,可有效防止动物生长后期脂肪的过多沉积,从而改善胴体品质,增加动物的可食比例。

3 胆汁酸的在畜牧业上的应用

3.1 胆汁酸对仔猪生产性能的影响

为保证仔猪摄食饲料中足够的能量,需要在饲料配方中添加脂肪,然而,仔猪肝功能还不健全,胆汁酸分泌不足,对脂肪的消化吸收非常有限,未消化脂肪易引起仔猪腹泻,在其饲料中添加胆汁酸可解决仔猪脂肪消化的问题。美国俄亥俄州立大学 Reinhart 等(1989)在断奶仔猪日粮中添加 0.3%的胆汁酸,显著提高了体增重和采食量,脂肪摄入量 and 脂肪表观吸收量都增加了,氮摄入量和氮贮留量也显著地增加($P < 0.01$)。

3.2 胆汁酸对家禽生产性能的影响

胆汁酸还能有效提高家禽的生产性能。Gomez (1979)报道,饲料中添加胆汁酸,使白洛克鸡脂肪表观消化率提高 2.1%。胆汁酸还能提高肉鸡对脂肪的利用率(Pullen, 1983)。

蛋鸡脂肪肝是产蛋鸡常见的一种营养代谢性疾病,影响肝脏的正常功能,严重的引起肝细胞破裂、肝内出血而死亡。患脂肪肝的鸡群很难出现产蛋高峰,给养殖业带来重大经济损失,饲料中额外添加胆汁酸,可防止脂肪肝带来的一系列问题,利于母鸡健康,延长产蛋高峰的持续时间。

3.3 胆汁酸对水产动物生长的影响

饲料中添加胆汁酸可提高鲷鱼饲料的营养价值,增重率较对照组提高 45.73%~68.6%,饲料利用率提高 10.86%~21.88%(弟子丸修, 1981)。林仕梅等(2003)在饲料中添加 100 mg/kg 的可利康(胆汁酸产品),异育银鲫的生长速度提高了 5.1%,饲料转化率提高了 22.9%,内脏比例降低,鱼的可食比例得到提高。石原秀平(1987)还发现,饲料中添加胆汁酸,能改善真鲷的体色,提高养殖鱼类的商品价值。

3.4 胆汁酸对动物的外观皮毛质量的影响

由于胆汁酸能提高动物对脂肪和脂溶性维生素的吸收率,从而改善动物皮毛的质量。

4 有待于研究的问题

① 胆汁酸能提高甲状腺激素活性,使基础代谢加快,促使多余的脂肪“燃烧”,若提高了动物的基础

代谢,对动物生产不利。胆汁酸作用的发挥是提高了基础代谢还是把脂肪转化为提供沉积肌肉所需要的能量,还有待于研究。

② 胆汁酸品种繁多,必须根据动物种类制备适宜的胆汁酸产品。但是每一种胆汁酸到底适合哪些品种的动物使用还有待于研究。

③ 外源添加胆汁酸是否会抑制动物自身的分泌,胆汁酸在不同日粮中适宜的添加量还有待于研究。E.Baue(2005)等研究表明,低浓度的胆汁酸盐能够提高脂肪酶的活性,但高浓度的胆汁酸盐却抑制脂肪酶的活性,所以,胆汁酸的合适添加量对其功能的发挥非常重要。

④ 胆汁酸提高了能量的利用,同时改变了饲料中的能蛋比,是否会导致配方中各营养素的不平衡,从而导致动物的生长和生产性能下降,这还有待于进一步研究。

⑤ 从动物身上收集的胆囊存在一定的安全隐患,能否知道主要发挥作用的胆汁酸的品种,采用化工合成将更安全、更经济,还需要进一步研究。

总之,胆汁酸作为一种饲料添加剂,可有效缓解由于脂肪及脂溶性维生素消化不良引起的各种问题,但若想在畜牧生产中更有效、更合理地应用胆汁酸,还有一系列问题需要研究和解决。

参考文献

- 1 曾端,李力,王群初,等.胆汁酸在动物营养研究中的应用.广东饲料,2002,11(3):34~35
- 2 关江,曹金山,李培锋,等.鸡胆汁有效成分 Tau 和 CA 的抗炎抗菌作用研究[J].中兽医医药杂志,2001(2):3~6
- 3 林仕梅,叶元土,罗莉.胆汁酸添加剂对异育银鲫生长的影响[J].广东饲料,2003,12(3):14~15
- 4 E. Baue, et al. Asian-aust J Anim. Sci.,2005,18(2):282~295
- 5 周根来,王恬.动物脂肪代谢营养调控[J].饲料工业,2003,24(1):42~44
- 6 王吉峰,李海贤.胆汁酸对蛋鸡脂肪代谢的影响[J].饲料广角,2006(13):16~17
- 7 沈同.生物化学(第二版)[M].高等教育出版社,2002

(编辑:王芳,xfang2005@163.com)

本栏目由北京挑战生物技术有限公司协办



多酶交替降解壳聚糖 及其酶解产物分子量分布的研究

李专 胡远亮 梁运祥

摘要 用纤维素酶和甘露聚糖酶对壳聚糖进行交替降解,对酶的降解产物用 Sephadex G100 凝胶色谱柱进行分离,分析水解产物的相对分子质量分布。研究表明,先用纤维素酶水解 24 h,再用甘露聚糖酶水解 24 h,可将分子量为 100 万左右的壳聚糖部分完全降解,产物相对分子质量主要分布在 10 000 Da 以下。

关键词 壳聚糖;甘露聚糖酶;纤维素酶;凝胶色谱

中图分类号 Q814.4

壳聚糖是甲壳素的脱乙酰化产物,是迄今发现的唯一的天然碱性多糖,能溶于醋酸等有机酸,具有良好的生物相容性,且无毒,可生物降解。壳聚糖分子中有氨基和羟基,容易进行化学改性和修饰,因此在医药、纺织、饲料、食品、化工、生物、农业等众多领域具有重要的应用价值^[1-3]。但是,由甲壳素脱乙酰化制得的壳聚糖分子量大,具有紧密的晶体结构,不溶于普通溶剂,只能在某些酸性介质中溶解,这使其应用受到了极大限制。此外,分子量对壳聚糖性质也有很大影响,不同分子量的壳聚糖性质差异很大,有时甚至表现出截然相反的特性,而壳聚糖的许多独特功能只有在分子量降低到一定程度才表现出来。降解壳聚糖的方法主要有物理、化学和酶降解法。酶降解法通常优于其它方法,这是由于酶法降解可特异性地、选择性地切断壳聚糖的 β -1,4糖苷键,降解过程和降解产物的分子量易于被控制,且条件温和。

目前,国内研究多用单一酶或是用混合酶直接降解壳聚糖,用多酶交替降解却不多见。本试验用甘露聚糖酶和纤维素酶交替降解壳聚糖,再用凝胶渗透色谱直接测定壳聚糖的相对分子质量分布^[4]。

1 材料与试剂

1.1 菌种

里氏木霉(*Trichoderma reesei*)FT04-18 和短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)FB04-25 均由华中农业大学发酵工程研究室保藏。

李专,华中农业大学农业微生物学国家重点实验室,430070,武汉市洪山区。

胡远亮、梁运祥(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-03-05

★ 浙江省重大科技攻关项目(2004C12010)

1.2 仪器

752 紫外光栅分光光度计(由上海精密科学仪器有限公司生产)、HH-4 数显恒温水浴锅(由江苏金坛市荣华仪器制造有限公司生产)、旋转蒸发仪(由上海亚荣生化仪器厂生产)、超声波破碎仪(由宁波海曙金达超声波设备有限公司生产)、乌氏粘度计(由成都科析仪器成套有限公司生产)。

1.3 试剂

粉状壳聚糖;脱乙酰 $\geq 90\%$,由国药集团生产。

壳聚糖胶体溶液:在 3 g 壳聚糖中加入 75 ml 的 1%醋酸溶液,85 °C 水浴中放置 10 h 至完全溶解,再用 1%醋酸定溶至 100 ml,4 °C 冷藏。

葡聚糖分子量标样:Dextran T-10,Mw(分子量)=10 000;Dextran T-40,Mw=40 000;Dextran T-70,Mw=70 000;Dextran T-500,Mw=500 000。分子量标样均由 Pharmacia 公司提供。

1.4 培养基

产纤维素酶固体培养基:稻草 60 g、麸皮 40 g、 KH_2PO_4 0.05 g、 CaCl_2 0.05 g、 MgSO_4 0.25 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.8 g、NaCl 0.1 g、 $V_{\text{水}}:V_{\text{物料}}=1:2.2$ 、吐温-80 1%,pH 值自然。

产甘露聚糖酶一级种子培养基:胰蛋白胨 10 g/l、酵母提取物 5 g/l、NaCl 5 g/l,加入 2%魔芋精粉,灭菌,pH 值 7.4。

产甘露聚糖酶二级种子培养基:胰蛋白胨 10 g/l、酵母提取物 5 g/l、NaCl 5 g/l,加入 8%诱导物(诱导物制备:在 13%魔芋溶液中加入 2%的甘露聚糖粗酶液,46 °C 水解 1 h,用无水乙醇将其沉淀,干燥,pH 值 7.4)。

刚果红-麦芽汁-CMC 培养基:麦芽提取物 30 ml、琼脂粉 15 g、CMC-Na 5 g,用蒸馏水定容至 1 L,121 °C、30 min 灭菌,趁热加入 1 ml 刚果红,pH 值 5.5。

2 试验方法

2.1 粘均分子量测定

壳聚糖分子量的测定方法有粘度法、蒸汽压渗透法、端基分析法和凝胶色谱法等。其中,粘度法是测定高聚分子量的一种常用方法^[9](粘度法测定方法为:将0.1 mol/l CH₃COONa+0.2 mol/l CH₃COOH 缓冲液用乌氏粘度计,于25℃时测定降解之前壳聚糖胶体的分子量,外推作图法计算粘均分子量 M=106万 Da)。

2.2 纤维素酶的发酵

通过用紫外线和 Co⁶⁰- γ 射线对里氏木霉进行复合诱变,用 CMC-刚果红作筛选培养基,筛选出透明圈直径与菌落直径之比大的菌株,接种到产酶培养基中作进一步复筛,选育出纤维素酶酶活较高的菌株,接种于固体培养基中,30℃恒温培养,每24 h测一次纤维素酶酶活。培养4 d时所测得的酶活为993.829 8 U/g,此时酶活最高。纤维素酶酶活的测定方法参照 NY/T912—2004。

2.3 甘露聚糖酶的发酵

将短小芽孢杆菌接入一级种子培养基,37℃、180 r/min 条件下培养48 h,得到甘露聚糖酶的粗酶液。

将短小芽孢杆菌接入二级种子培养基,34℃、180 r/min 条件下,每12 h测一次甘露聚糖酶酶活^[6,7],48 h时所测定甘露聚糖酶活为456 U/ml,此时酶活最高。

2.4 用不同酶制剂降解壳聚糖的比较

分别采取不同的处理方式:①在10 ml的3%胶体壳聚糖溶液中加入1 ml甘露聚糖酶水解48 h(I);②在10 ml的3%胶体壳聚糖溶液中加入1 ml纤维素酶水解48 h(II);③在10 ml的3%胶体壳聚糖溶液中加入0.5 ml甘露聚糖酶+0.5 ml纤维素酶水解48 h(III);④在10 ml的3%胶体壳聚糖溶液中先加入0.5 ml甘露聚糖酶水解24 h,再加入0.5 ml纤维素酶水解24 h(IV);⑤在10 ml的3%胶体壳聚糖溶液中先加入0.5 ml纤维素酶水解24 h,再加入0.5 ml甘露聚糖酶水解24 h(V)。酶解温度为50℃。

将酶解后的产物用超声波处理,作用条件为:振幅39%、脉冲5 s、暂停5 s、作用10 min,6 000 r/min 下离心10 min,取上清液,经Sephadex G100柱分离。

2.5 Sephadex G100 柱对酶解产物的分离

Sephadex G100 柱(1×100 cm)的分离条件:上样量为1 ml;体积流量为75 ml/h、2.5 ml/管;洗脱液为pH值4.6的醋酸-醋酸钠缓冲液;Sephadex G100 柱相对分子量标定采用标准分子量葡聚糖 Dextran-10、Dextran-40、Dextran-70、Dextran-500;糖含量采用苯酚-硫酸法测定^[9]。

3 结果与讨论

3.1 相对分子量标准曲线

由于甘露聚糖酶和纤维素酶对壳聚糖都有降解

作用,试验中在相同条件下加入总量相等的酶液对同一壳聚糖体系进行反应,对水解产物进行凝胶色谱柱分离,洗脱液分步收集,并检测洗脱液中的糖含量,以比较各种条件对壳聚糖的降解程度。试验中选取 Sephadex G100 柱凝胶介质进行分离,该介质的机械强度较好,且可分离5 000~1 000 000 分子量范围的多糖,比较适合壳聚糖的分离要求。

标准分子量葡聚糖在 Sephadex G100 柱上的分离曲线见图1,相对分子量标准曲线见图2,从图2中可以看出相对分子量曲线的线性良好。

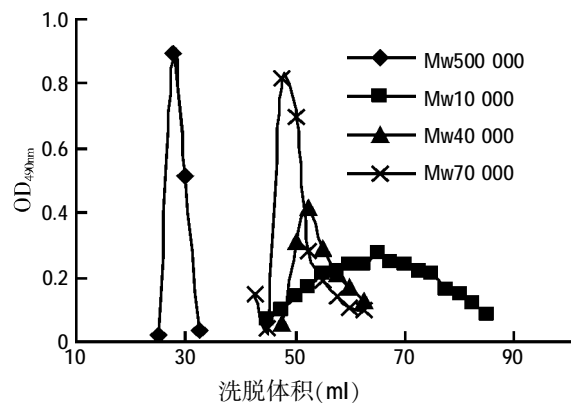


图1 标准分子量葡聚糖洗脱曲线

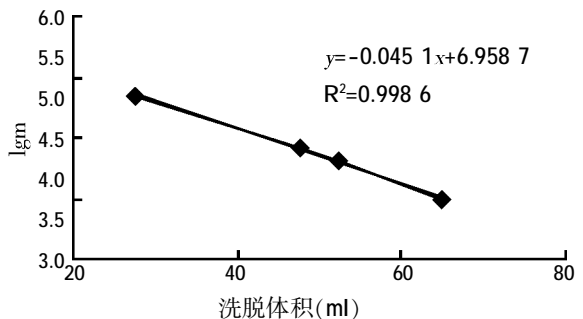


图2 相对分子量标准曲线

3.2 原料壳聚糖在Sephadex G100 柱上的相对分子量分布(见图3)

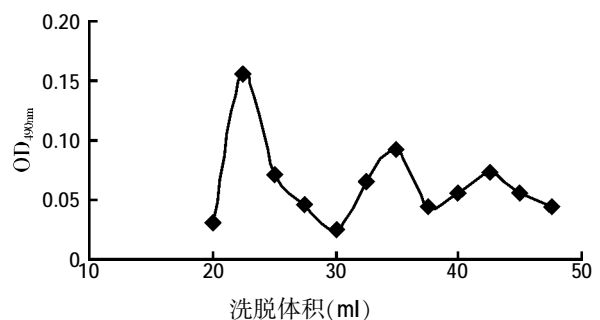


图3 原料壳聚糖相对分子量分布曲线

由图3中原料壳聚糖的相对分子量分布曲线可以看出,原料壳聚糖有3个主要的分子量分布峰,

第一个峰的相对分子量分布大于 8.8×10^5 ; 第二个峰的相对分子量分布在 $4.0 \times 10^5 \sim 1.8 \times 10^5$ 之间; 第三个峰的相对分子量分布在 1.1×10^5 以下。第一个峰的峰面积最大, 主峰位置在洗脱体积 22.5 ml 处。

3.3 酶解后壳聚糖在 Sephadex G100 柱上的相对分子量分布(见图 4、5、6、7、8)

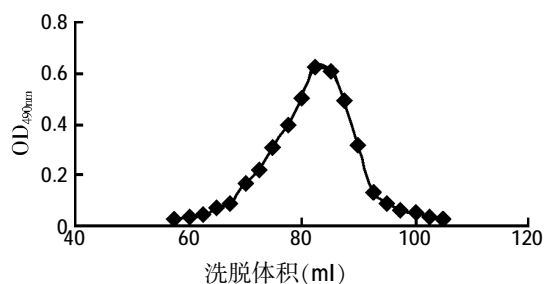


图 4 甘露聚糖酶水解 48 h 的相对分子量分布(I)

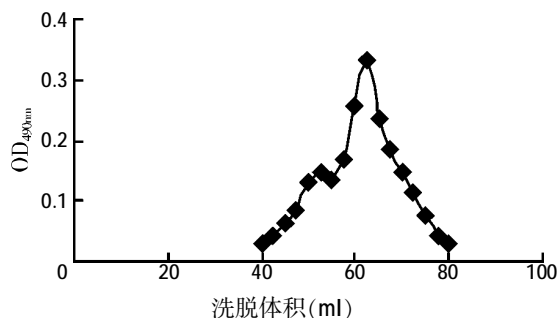


图 5 纤维素酶水解 48 h 的相对分子量分布(II)

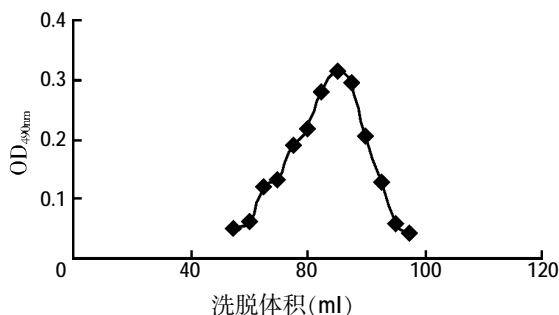


图 6 甘露聚糖酶+纤维素酶水解 48 h 的相对分子量分布(III)

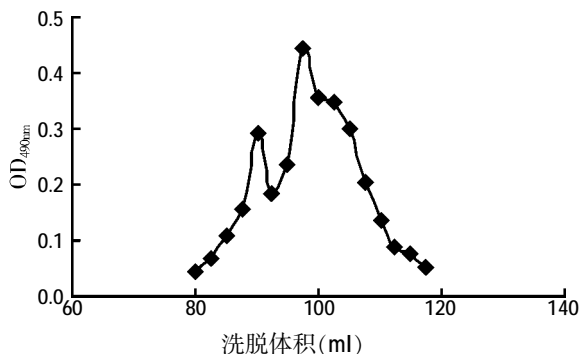


图 7 甘露聚糖酶先水解 24 h 后纤维素酶再水解 24 h 的相对分子量分布(IV)

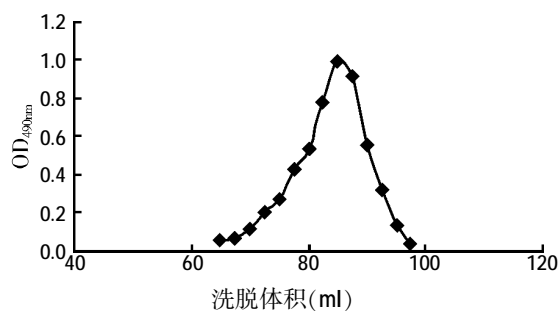


图 8 纤维素酶先水解 24 h 后甘露聚糖酶再水解 24 h 的相对分子量分布(V)

由图 4 可以看出,甘露聚糖酶水解 48 h (I)后,壳聚糖底物的高分子部分基本降解。产物的主峰位置移至到洗脱体积 82.5 ml 处。通过图 2 的标准曲线可计算出相对分子量分布为 1.7×10^3 左右,降解得率为 96%。

由图 5 可以看出,纤维素酶水解 48 h (II)后,壳聚糖底物的高分子部分基本降解。产物的主峰位置移至到洗脱体积 62.5 ml 处。在洗脱体积 52.5 ml 处还出现一杂峰,说明此时壳聚糖分子量组分不纯。相对分子量分布于 1.4×10^4 左右,降解得率为 87%。

由图 6 可以看出,甘露聚糖酶+纤维素酶水解 48 h (III)后,壳聚糖底物的高分子部分基本降解,产物的主峰位置移至到洗脱体积 85 ml 处。相对分子量分布于 1.3×10^3 左右,降解得率为 92.6%。

由图 7 可以看出,甘露聚糖酶先水解 24 h 后,纤维素酶再水解 24 h(IV),壳聚糖底物的高分子部分基本降解,产物的主峰位置移至到洗脱体积 97.5 ml 处。但在洗脱体积为 90 ml 处出现一个杂峰,说明此时的壳聚糖的分子量组分不纯。相对分子量分布于 4.2×10^2 左右,降解得率为 91.9%。

由图 8 可以看出,纤维素酶先水解 24 h 后,甘露聚糖酶再水解 24 h(V),壳聚糖底物的高分子基本降解,产物的主峰位置移至到洗脱体积 85 ml 处,此时的 OD 值最高,说明降解程度最好。相对分子量分布于 1.3×10^3 左右,降解得率为 91.8%。

3.4 分析与讨论

由图 4 至图 8 可以看出,通过降解后分子量和降解得率的比较,可以看出甘露聚糖酶的降解能力比纤维素酶的降解能力要强。而且,先用纤维素酶水解后,再加入甘露聚糖酶水解,降解效果最好。可能是由于纤维素酶是由内切型葡聚糖酶、外切型葡聚糖酶

稻谷专用酶制剂对肉鸭生长性能 和营养物质利用率的影响

丁斌鹰 侯永清 徐 宁 郭希柱 张晓明

摘 要 试验选用 360 只 21 日龄、体重为(1 130.83±2.07) g 的樱桃谷肉鸭,随机分为 4 组,每组 3 个重复(圈),每个重复(圈)30 只鸭。分为正、负对照组,试验 I 组和试验 II 组,分别饲喂玉米—豆粕型日粮、稻谷—玉米—豆粕型日粮、稻谷—玉米—豆粕型日粮+300 g/t 稻谷专用酶制剂和稻谷—玉米—豆粕型日粮+600 g/t 稻谷专用酶制剂,各组日粮营养水平一致。进行了为期 14 d 的饲养试验,在试验后期进行了消化试验。试验结果表明:在稻谷—玉米—豆粕型肉鸭日粮中添加 300 和 600 g/t 稻谷专用酶制剂,与正对照组和负对照组相比,肉鸭平均日增重提高 4.45%、4.30%和 6.01%、4.92%,料肉比降低 8.14%、10.47 和 8.85%、11.15%($P<0.05$);与负对照组相比,粗蛋白的表观利用率分别提高 2.87%和 2.20%,总磷的表观利用率分别提高 23.23%和 13.89%($P<0.05$),植酸磷的利用率分别提高 21.62%和 30.42%($P<0.01$),粗纤维的利用率分别提高 32.30%和 92.68%($P<0.01$)。

关键词 稻谷专用酶制剂;生长性能;营养物质表观利用率;肉鸭

中图分类号 A834*.89

丁斌鹰,武汉工业学院饲料科学系,副教授,430023,湖北武汉汉口常青花园特一号。

侯永清、徐宁、郭希柱、张晓明,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-03-23

稻谷是我国的主要粮食作物,含有丰富的营养物质,但较少用于配合饲料生产,其原因之一是稻谷中存在较多的抗营养因子,降低了稻谷的有效能值,阻碍了其它营养物质的吸收和利用,大大限制了稻谷在饲料

和纤维素二糖酶组成的多酶体系,经过纤维素酶水解后,其内切型葡聚糖酶使壳聚糖内部的甘露聚糖酶的作用位点暴露,使其降解效果更好。

从凝胶柱测得的底物分子量比粘度法测得的粘均分子量小得多,粘度法和凝胶渗透色谱法都是基于聚合物的流体力学体积,与分子量、链的柔韧性及与溶剂的相互作用有关。此外,由于 Sephadex G100 柱的分子量标准曲线采用的是葡聚糖分子,葡聚糖分子结构与壳聚糖的分子结构之间有一定的差异,虽然都是无规律的线性分子,但壳聚糖是 2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖和少量的 N-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键连接的直链多聚糖,葡聚糖是葡萄糖通过 α -1,4 糖苷键连接的直链多糖,两者与 Sephadex G100 柱的吸引力不同。凝胶柱测得的水解产物分子量分布,虽然不能真实地反映相对分子质量大小,但它们之间的相互比较能说明酶水解效果。

本试验是用酶法阶梯降解壳聚糖,与单纯的酶法降解相比有一定的创新,且操作简单,易于控制,在饲料、食品等工业上有良好的应用前景。

参考文献

- 1 刘晓,杜显光,白血芳.壳聚糖诱导小麦种胚细胞抗脱氧化雪腐镰刀菌酶抑制的效应[J].植物学报,2001,43(4):370-374
- 2 严淑兰,陆大年.降解壳聚糖用于棉的抗皱整理[J].染整技术,2001,23(3):13-17
- 3 Chung Y S, Lee K K, Kin J W. Durable Press and Antimicrobial Finishing of Cotton Fabrics with a Citric Acid and Chitosan Treatment[J]. Tex. Res., 1998,68(10):772-775
- 4 姚汝华.微生物工程工艺原理[M].广州:华南理工大学出版社,2003.297-309
- 5 唐振兴,石陆娥,易喻.壳聚糖及其降解分子量的测定[J].化工技术与开发,2004,33(6):38-39
- 6 姚冬生,黄小葵,刘大岭,等. *Armillariella tabescens* EJLY2098 β -甘露聚糖酶的诱导、纯化及酶学性质分析[J].中国生物工程杂志,2006,26(7):57-63
- 7 李剑芳,张静娟,郭敏辰,等.酸性 β -甘露聚糖酶固态发酵工艺与粗酶性质[J].食品科学,2006,27(5):143-147
- 8 张志军,刘建华,李淑芳,等.灵芝多糖含量的苯酚硫酸法检测研究[J].食品工业科技,2006,27(2):193-195

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

中的应用范围。随着酶制剂的研究与应用,为研究稻谷在饲料中作为主要能量来源提供了新的思路。因此,设计试验研究稻谷专用酶制剂对肉鸭生长的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 复合酶制剂

稻谷专用酶制剂由武汉工业学院饲料科学系研制,其中含有纤维素酶、植酸酶、木聚糖酶和 β -葡聚糖酶。

1.1.2 试验动物

由武汉纳百川农业有限公司提供的21日龄、体重为(1 130.83 \pm 2.07) g的樱桃谷肉鸭360只。

1.1.3 试验日粮

试验日粮分4种,均配制成粉料,基础日粮配方及营养水平见表1。

表1 正、负对照组基础日粮配方及营养水平

原料(%)	正对照组	负对照组	营养水平	
玉米	62.49	22.13	代谢能(MJ/kg)	10.78
稻谷	0	40.00	粗蛋白(%)	17.35
大豆粕	19.51	19.51	赖氨酸(%)	0.80
米糠	5.81	5.80	蛋氨酸(%)	0.38
菜籽粕	5.00	5.00	钙(%)	0.80
棉籽粕	3.00	3.00	总磷(%)	0.65
豆油	0.14	0.71		
石粉	1.21	1.30		
磷酸氢钙	1.17	0.92		
盐	0.39	0.39		
蛋氨酸	0.13	0.09		
防霉剂	0.15	0.15		
预混料	1.00	1.00		

注:1.试验I、II组的日粮在负对照组的基础上分别添加稻谷专用酶制剂300 g/t和600 g/t。为保证日粮水平,将酶制剂添加到预混料中;
2.预混料向每千克全价日粮提供:VA 3 000 IU、VD₃ 610 IU、VE 20 IU、VB₂ 5 mg、VB₁₂ 0.021 mg、生物素0.1 mg、泛酸10 mg、烟酸15 mg、Fe 60 mg、Cu 5 mg、Mn 10 mg、Zn 80 mg、I 0.35 mg、Se 0.15 mg;
3.营养水平值为计算值。

1.2 试验方法

1.2.1 饲养试验

选用360只21日龄、体重为(1 130.83 \pm 2.07) g的樱桃谷肉鸭,按圈体重一致的原则随机分为4组,每组3个重复(圈),每个重复(圈)30只鸭。分为正对照组、负对照组、试验I组和试验II组,分别饲喂玉米—豆粕型日粮、稻谷—玉米—豆粕型日粮、稻谷—玉米—豆粕型日粮+300 g/t稻谷专用酶制剂和稻谷—玉米—豆粕型日粮+600 g/t稻谷专用酶制剂。采用圈内网上平养,每重复设一个食槽和一个水槽,湿拌料,自由采食、饮水,每日早上8点清洁水槽一次。预饲期7 d,正试期14 d。按照武汉纳百川农业有限公司肉鸭养殖基地的正常饲养管理和防疫程序进行饲养管理。试验开始后,记录鸭群的健康状况和每日饲喂量;饲养试验结束时,停止喂料12 h,禁水4 h,称重。计算平均日增重和料肉比。

1.2.2 消化试验

在饲养试验结束前7 d,每圈选择体重基本一致的5只肉鸭,以三氧化二铬为外源指示剂进行消化试验。在饲料中均匀地拌入0.3%三氧化二铬,预饲期7 d,收粪期3 d。将粪样用10%盐酸按体积比5:1拌匀,于-4℃下密封保存,运回实验室后于(65 \pm 2)℃烘箱中鼓风干燥,制取风干样品。最后将3 d分别制取的粪样混合均匀。根据试验饲料及粪样中指示剂和营养物质的含量计算养分的表观消化率。

1.3 数据统计与分析

数据采用SAS8.0软件进行方差分析,LSD法(最小显著极差法)对数据进行多重比较,取 $\alpha=0.05$ 。表中数据为平均数 \pm 标准差。

2 结果与分析

2.1 稻谷专用酶制剂对肉鸭生长性能的影响(见表2)

由表2可见,试验I、II组与正对照组相比,肉鸭平均日增重分别提高5.54%和4.45%;平均日采食量分别降低了3.24%和6.31%;料肉比分别降低8.14%和10.47%($P<0.05$)。因此,本试验条件下,在稻谷—玉米—豆粕型日粮(含40%稻谷)中添加复合酶制剂对肉鸭的饲养效果优于玉米—豆粕型日粮。

表2 复合酶制剂对肉鸭生长性能的影响

项目	正对照组	负对照组	试验I组	试验II组
初始体重(g/只)	1 125.56 \pm 3.64	1 132.22 \pm 2.94	1 136.67 \pm 6.31	1 124.44 \pm 7.47
末期体重(g/只)	2 261.1 \pm 20.29	2 262.78 \pm 31.28	2 335 \pm 33.34	2 310.56 \pm 27.22
平均日增重(g/只)	81.11 \pm 1.67 ^a	80.75 \pm 3.08 ^b	85.60 \pm 3.02 ^a	84.72 \pm 1.58 ^a
平均日采食量(g/只)	209.3 \pm 2.53 ^a	210.31 \pm 1.59 ^a	202.51 \pm 2.81 ^{ab}	196.10 \pm 4.10 ^b
料肉比	2.58 \pm 0.02 ^a	2.60 \pm 0.12 ^a	2.37 \pm 0.14 ^b	2.31 \pm 0.09 ^b

注:表中同行数据肩标字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

试验 I、II 组与不添加复合酶制剂的负对照组相比,其平均日增重分别提高 6.01%和 4.92%($P<0.05$);平均日采食量分别降低了 3.71%和 6.76%;料肉比分别降低 8.85%和 11.15%($P<0.05$)。试验结果表明,添加稻谷专用酶制剂可以改善采食稻谷型日粮肉鸭的生长性能,提高生长速度。

试验 I、II 组的试验数据表明,在稻谷—玉米—豆粕型日粮中添加 300 g/t 和 600 g/t 的稻谷专用酶制剂对改善肉鸭的饲养效果相当,在统计学上差异不显著,试验 I 组和试验 II 组都可以获得较好的经济效益。因此,考虑生产成本,本试验条件下的稻谷—玉米—豆粕型日粮只需要添加 300 g/t 的稻谷专用酶制剂就能达到较好的促生长效果。

2.2 稻谷专用酶制剂对饲料营养物质利用率的影响 (见表 3)

表 3 稻谷专用酶制剂对饲料营养物质利用率的影响 (%)

项目	负对照组	试验 I 组	试验 II 组
粗蛋白表观利用率	78.81±1.61	81.07±1.57	80.54±1.69
总磷表观利用率	61.13±0.55 ^c	75.33±0.81 ^a	69.62±0.48 ^b
植酸磷利用率	22.16±0.26 ^{bc}	26.95±0.59 ^{ab}	28.90±0.26 ^{ab}
粗纤维利用率	12.85±3.12 ^c	17.00±2.25 ^{ab}	24.76±1.39 ^{ab}

注:表中同行数据肩标小写字母不同表示差异显著($P<0.05$);大写字母不同表示差异极显著($P<0.01$)。

由表 3 可见,试验 I 组和试验 II 组明显改善了肉鸭对稻谷的利用能力。与负对照组相比,粗蛋白的表观利用率分别提高 2.87%和 2.20%;总磷的表观利用率分别提高 23.23%和 13.89%($P<0.05$);植酸磷的利用率分别提高 21.62%和 30.42%($P<0.01$);粗纤维的利用率分别提高 32.30%和 92.68%($P<0.01$)。

3 讨论

稻谷与玉米相比,具有潜在的营养价值,但其饲用效果较差,究其原因是在稻谷中的抗营养因子含量高,尤其是其中所含的木质素、纤维素、果胶、阿拉伯木聚糖和 β -葡聚糖等的抗营养作用极大地限制了稻谷的饲用价值。Choct(1990)^[1]、李明荃(1996)^[2]、陈旭东(2001)^[3]的报道表明,在家禽日粮中添加单一或复合酶制剂至少通过 3 种途径来改善家禽小肠中营养物质的消化和吸收,达到促进动物生长和提高饲料转化率的目的:①增加非淀粉多糖的降解速度而降低小肠内容物的粘度;②破碎细胞壁、促进由细胞壁包裹着的蛋白质和脂肪的释放,有利于肠道内的消化酶对营养物质的充分接触;③消除可溶性非淀粉多糖对内源性消化酶的抑制作用等。本试验结果再次证实了上述结果,说明在纤维含量较高的日粮中添加复合酶制剂,

有助于提高肉鸭的消化机能,改善其生长性能。

张堂田等(1999)^[4]报道,日粮中添加 0.5%木聚糖酶、0.5%纤维素酶和 0.1% β -葡聚糖酶,能显著提高樱桃谷肉鸭的日增重和饲料转化率($P<0.05$)。高树冬等(2001)^[5]在稻谷日粮中添加复合酶制剂,肉鸭饲料转化率提高 2.26%~4.53%。上述报道与本试验研究结果基本一致。

目前有较多的文献报道单一酶和 2 种或 3 种酶的组合对家禽采食麦类日粮的效果,而很少见到类似本试验研究的纤维素酶、植酸酶、木聚糖酶和葡聚糖酶 4 种酶的组合对肉鸭采食稻谷型日粮的饲喂效果,因此,关于多酶的复合效应还需要进一步有针对性的研究和探讨。

4 小结

在稻谷—玉米—豆粕型肉鸭日粮(含 40%稻谷)中添加稻谷专用酶制剂,可显著提高肉鸭平均日增重,降低料肉比($P<0.05$);可提高粗蛋白的表观利用率,显著提高总磷表观利用率($P<0.05$)、极显著提高植酸磷和粗纤维的利用率($P<0.01$)。

参考文献

- 1 Choct M annison G. Anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets [J]. Brit. Poultry Sci., 1990(30):811~812
- 2 李明荃译. 肠内容物粘度和肉鸡性能[J]. 国外畜牧学——猪与禽, 1996(4):4~7
- 3 陈旭东. 非淀粉多糖的抗营养作用[J]. 当代畜牧, 2001(6):40
- 4 张堂田,孟秀丽,王时昌. 酶制剂对樱桃谷肉鸭生产性能的影响[J]. 安徽农业科学, 1999,27(4):403~404
- 5 高树冬,马健,尤佩华,等. 酶制剂在肉鸭日粮中的应用[J]. 兽药与饲料添加剂, 2001(6):8~9

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

· 信息采撷 ·

波兰发现胶原质可保持肉类营养

波兰农业大学的研究人员发现,往肉里注射胶原质可保持肉类营养,抑制碘和维生素 B₁ 的流失。

肉制品在储存和烹饪时,可能失去一定量的碘和维生素 B₁。SCI 的农业食品科学杂志报道,通过增加胶原纤维和胶原质水解产物可以使肉里的碘化钾得到饱和,这种方法比使用精制碘盐的方法更加有效。胶原质能使鲜肉保持一定的营养,它也适合冷冻储存的肉类。

在研究中,胶原质被加入到肉球里,充当碘盐的作用。在储存和烹饪这些肉球的时候,对碘和维生素 B₁ 的含量水平进行测量,结果显示,它们都被保存在肉里。

酶制剂在水产动物饲料中的应用

明建华

酶是活细胞产生的具有特殊生物催化功能的生物大分子物质(蛋白质或RNA),它广泛分布于动物、植物和微生物体内,参与机体的各种生化反应。酶制剂是一种以酶为主要功能因子,通过特定生产工艺加工而成的饲料添加剂。目前,酶制剂的研究主要集中在外源酶在畜禽饲料中的应用,大部分是关于酶制剂作用效果的研究。酶制剂在水产饲料中的应用还处在摸索阶段,本文就酶制剂在水产饲料中的合理应用进行了综述。

1 酶制剂在水产饲料中的应用

1.1 直接分解营养底物,提高代谢水平,降低饵料系数

具有生物活性的酶制剂,能有效地将饲料中一些大分子多聚体分解和消化成水产动物容易吸收的营养物质或分解成小片段营养物质,供其它消化酶进一步消化,一些水产动物本身难以分解和吸收的大分子物质,通过添加酶制剂促进饲料中营养物质的分解和消化,提高饲料的利用率。在草鱼饲料中添加0.1%酶制剂,试验组草鱼的生长速度比对照组提高了6.6%,饵料系数降低了0.29;试验组的鱼体粗蛋白质含量比对照组略高,而粗脂肪略低;试验组的每千克鱼饲料成本比对照组降低8.93%。该酶制剂使草鱼对无机盐转化利用率提高,对各种营养物质的吸收均衡有效,表明该酶制剂能促进鱼体内各种生化反应,提高鱼体内蛋白质转化率。

1.2 补充外源消化酶,激活内源消化酶分泌,提高饲料利用率

在畜禽饲料中添加外源酶对动物内源酶活性影响的研究较多。奚刚等(1999)在猪、鸡饲料中添加外源酶的试验结果表明,外源酶能促进内源消化酶分泌,提高饲料利用率。水产动物消化系统不如畜禽完善,内源酶分泌不如畜禽完全。鱼类消化道中不含木聚糖酶和纤维素酶,而淀粉酶的活性也很低。

尽管鱼虾对蛋白质有较高的消化吸收率,但内源蛋白酶还不能完全发挥作用,加入外源性蛋白酶后,

可弥补内源性蛋白酶的不足(特别是幼体),提高蛋白质吸收率10%左右,可起到节约蛋白质的目的。糖类物质是廉价的饲料原料,尽管水产动物对淀粉的消化吸收率很低,但为了保证其安全性和降低成本,在饲料中的添加量仍达到20%~50%。加入淀粉酶和糖化酶后,可以补充水产动物严重缺乏的淀粉酶,将淀粉的消化吸收率从20%~40%提高到80%以上,从而起到增加饲料能量、提高饲料利用率、减少蛋白质作为能量消耗的作用,进而达到降低饲料成本的目的。因此,外源性消化酶对水产动物来说非常重要。外源性消化酶还可刺激水产动物内源性消化酶的更多分泌,并提高食糜中内源性消化酶的活性,加速营养物质的消化和吸收,从而提高饲料的利用率。乔秀亭等(2002)研究了酶制剂对鲤鱼消化酶活性的影响,添加复合酶制剂后,各试验组肠道和肝胰脏的蛋白酶与淀粉酶活性均比对照组有所提高,减少了蛋白质作为能量的消耗,起到间接节约蛋白质的作用。仲军等(1995)关于对虾的试验表明,外源酶系可以通过对动物自身内源酶原的激活,增强内源酶的作用,促进肝胰脏的消化作用,提高饲料的总消化率和蛋白质消化率。

1.3 消除饲料中的抗营养因子,改善消化机能

配合饲料中含有的植物性原料常存在一些非淀粉多糖、果胶、纤维素聚合物,对水产动物的消化吸收存在一定的抗营养作用。它们在肠道中部分溶解,从而使食糜粘度增大,导致养分溶出速度减缓,养分和内源消化酶扩散速度减慢,肠道机械混合食糜的能力减弱,饲料消化率降低。同时,可溶性非淀粉多糖还可使肠粘膜表面不动水层增厚,致使营养物质扩散受阻,影响水产动物对有效营养成分的消化和吸收。此外,粪便排出量因未消化物质的增多而增加,还会导致动物胃肠道中微生物繁殖增多,并对水产品品质造成不良影响。酶制剂中的多种酶,特别是 β -葡聚糖酶、果糖酶和纤维素酶能将这些物质分解为小分子物质,从而降低消化道中物质的粘度,促进动物肠道的蠕动,有效地消除这些抗营养因子的不良影响,改善水产动物的消化机能。如纤维素酶由葡聚糖外切酶、葡聚糖内切酶以及 β -葡聚糖苷酶3种具有高度协同作用的酶共同组成,它能将菜籽饼、棉籽粕、豆粕中的植物纤维分解成葡萄糖,破坏植物细胞壁,释放内容物,从而综合提高饲料利用率。余丰年等(2001)在以豆

明建华,南京农业大学动物科技学院,工程师,210095,江苏省南京卫岗1号。

收稿日期:2007-03-12

饼、菜籽饼为主的饲料中添加 2 400 U/kg 纤维素酶饲喂团头鲂,提高了鱼体对饲料营养物质的利用率。周小秋等(2001)在含豆粕、菜粕、棉仁粕为主的饲料中添加酶制剂,提高了饲料利用率,降低了鲤鱼消化道食糜的粘度,有利于营养物质的吸收利用。

另外,豆粕等饼粕类饲料中含有多种抗营养因子,如胰蛋白酶抑制因子、植物凝集素和 α -半乳糖苷等。胰蛋白酶抑制因子和小肠液中胰蛋白酶结合,生成无活性的复合物,降低胰蛋白酶的活性,导致饲料蛋白质消化率下降。同时,由于和胰蛋白酶结合,动物体内蛋白质内源性消耗,造成体内含硫氨基酸丢失,加剧了由于豆粕中含硫氨基酸短缺引起的动物体内代谢紊乱,导致生长受阻或停滞。杨丽杰等(2000)报道,外源蛋白酶可在常温下使大豆中的抗营养因子失活,提高其利用率。在豆科饲料中添加 α -半乳糖苷酶,可增加豆科饲料中低聚糖的消化,减轻或消除消化紊乱。

1.4 提高免疫抵抗力,增进水产动物健康

在饲料中添加酶制剂可促使机体内多种激素水平升高,从而影响淋巴细胞和巨噬细胞的作用机能。酶制剂还可使饲料中的多糖降解产生寡聚糖及其衍生物。有的寡糖,如甘露寡糖,除具有防止致病菌在肠道上聚集、减轻病原菌对机体的毒害作用外,还参与免疫调节,提高免疫能力。另外,营养物质是动物机体产生免疫的决定因素之一,营养对细胞免疫、体液免疫、补体功能和白细胞吞噬作用都产生极大影响。添加酶制剂可使更多的养分释放出来,从而加强机体免疫力。

刘文斌等(1997)对中华鳖做了添加酶制剂的试验,3个试验组的酶制剂含量分别为0.1%、0.2%和0.3%;结果表明,3个试验组均比对照组成活率高,且随酶制剂添加量的增加而升高,说明酶制剂可增强鳖体质,提高抗病力。分析原因可能是酶制剂中含有酶类和其它活性物质,能分解动物体内的有害物质,催化有害物质变为无害物质,从而增强体质,提高成活率。周嗣泉等(2000)在鳖饲料中添加了酶制剂,结果提高了鳖的成活率,尤其是幼鳖最为明显,说明酶制剂有增强鳖抗病力的作用。

1.5 促进植酸磷的消化吸收,减轻环境污染

在含有豆饼、菜籽粕等植物性原料的水产动物饲料中,植酸盐的含量约占3%左右,其中植酸磷约占饲料总磷量的60%~80%。特别是植酸(phytate)的存在,不仅使植酸磷无法利用,而且还能与钙、镁、氨基酸和淀粉等形成稳定的络合物,难于消化。另外,鱼类的消化道短,食物在其中的停留时间也短,消化不完全。据研

究,无胃鱼对植酸磷的平均消化率为8%,有胃鱼稍高,如虹鳟为19%。因此,有大量的植酸磷被浪费,不仅使吸收的磷不足,而且需补充无机磷,从而造成水环境污染。近年来,许多研究表明,在水产动物饲料中添加植酸酶可大大降低排泄物中磷和其它营养素的浓度,减少对水体的污染,改善饲养环境。

一般认为,添加植酸酶可使磷的利用率提高20%~50%。Riche等(1996)在虹鳟饲料中添加1 000 U/kg的植酸酶,结果可使豆粕中磷的利用率从25%增加到57%,提高了128%。Sugiura S H等(2001)报道:在以大豆粉为基础原料的虹鳟饲料中添加植酸酶,鱼类消耗1 kg饲料,在其粪便中磷的排泄量为0.32 g,比投喂商品鱼饲料磷的排泄量减少了95%~98%。曾虹等(2001)在饼粕质量分数为5.0%的鲤鱼饲料中添加1 000 U/g的中性植酸酶,可以将鲤鱼对饲料的磷利用率提高41%~59.4%,单位增重的磷排泄降低32.0%。在实践中,可以预先用植酸酶处理饲料。余丰年等(2000)先在体外将豆粕用植酸酶进行处理,再加入其余的饲料原料中,充分混合后进行分析,结果表明,在异育银鲫体外,植酸酶就已经在植酸酶的作用下发生了有效的降解,添加植酸酶促进了异育银鲫对饲料中营养物质的吸收,提高了增重率。

2 水产动物饲料中应用酶制剂的研究

2.1 水产动物饲用酶制剂的研制

目前,国内外对植酸酶的研究报道,在畜禽方面较多,也比较深入,生产的植酸酶多为适应畜禽消化道特点的、最适pH值在酸性范围的植酸酶。因此,畜禽饲料中添加的酶制剂应以木聚糖酶、 β -葡聚糖酶、纤维素酶、淀粉酶作为主要酶系,而以酸性蛋白酶、脂肪酶等作为小酶系。水产动物消化系统不如畜禽完善,大部分养殖鱼类无胃,只有消化道,并且消化道相对于畜禽很短,pH值一般呈中性或微碱性,因此,水产动物饲用酶制剂应以中性或碱性蛋白酶、淀粉酶、糖化酶为主,酸性蛋白酶、脂肪酶、木聚糖酶、 β -葡聚糖酶、纤维素酶为辅的复合酶制剂。另外,根据水产动物品种、年龄、食性、生理消化特点和饲料特异性等具体条件研制与之相适应的专用复合酶制剂。不同食性的鱼类其消化道内消化酶的组成也不同,内源性消化酶中淀粉酶的活性由高到低的顺序是草食性、杂食性、肉食性鱼类。不同的生长阶段,对于饲用酶的需求也存在一定的差异,幼体消化系统发育不完善,内源性消化酶分泌不足,在饲料中添加外源性消化酶,可以促进水产动物对食物中蛋白质、脂肪和淀粉的消化,提高生长率。

2.2 水产动物饲用酶制剂的定量研究

相对畜禽饲用酶制剂来说,酶制剂在水产动物中的应用研究不多,且大部分停留在定性方面,即添加酶制剂对水产动物有无促生长作用,能否提高饲料利用率,降低饵料系数,减少磷排出,而对酶制剂的定量研究较少。定量研究很重要,所有酶制剂都有一定适宜添加范围,只有在其适宜添加范围内才能使生长达到最佳状态,过低过高效果都不好。刘文斌等(1997)报道,在幼鳖饲料中分别添加 0.1%、0.2%、0.3%的国产复合酶制剂,观测其生长效果。试验结果表明:添加量为 0.1%,其养殖效果最好,增重率比对照组提高 75%,饵料系数降低 14.5%;其次为添加量为 0.2%,增重率比对照组提高 20%,饵料系数降低 5.9%;添加量 0.3%,其养殖效果还不如对照组。这与刘文斌等(1999)对异育银鲫的试验结果一致,0.75%的酶制剂添加量比 0.5%和 1%的添加效果均好。分析其原因可能是:①外源酶添加量过高,可能会抑制内源酶分泌,内源酶分泌量减少,影响对饲料营养成分的消化吸收率;②外源酶添加量过高,降低食糜的粘度,缩短食糜在肠道中的滞留时间,加快营养成分的流失,减少动物对营养物质的消化吸收,使其生产性能下降。周小秋等(2001)在鲤鱼饵料中添加酶制剂,结果表明,在日粮中添加 500 g/t 的酶制剂可显著提高鲤鱼生长速度和饵料利用率,但添加量超过 700 g/t 时,鲤鱼的生长速度和饵料利用率显著下降。韩庆等(2002)对黄颡鱼的试验表明,在日粮中添加 0.15%酶制剂的效果好于添加 0.1%和 0.25%的。

2.3 水产动物饲用酶制剂稳定性研究

水产动物饲用酶制剂的稳定性主要包括 3 方面,即热稳定性、储存稳定性和水中稳定性。

2.3.1 热稳定性(即耐高温)

酶是一种具有生物活性的蛋白质,和其它蛋白质一样对温度很敏感。一般饲用酶的适宜温度为 35~40℃。在水产动物饲料的制粒过程中,温度在 90℃左右,尤其在膨化饲料中,温度能达到 140℃,同时在高压、高湿的条件下制粒,酶的活性受到很大的损失,甚至有些酶活性已近完全丧失。目前解决此矛盾有两种办法:①用饲用酶制剂对饲料原料进行制粒前预处理;②待饲料颗粒出模后,冷却到安全温度时把液态饲用酶制剂喷洒到颗粒表面。另外,国外一些著名的酶制剂制造公司在 20 世纪 90 年代成功研制出包埋型或基因修饰型饲用酶制剂。目前某些国产酶制剂也可耐受 80~85℃的高温制粒,但这还不适用于水产动物饲料。

2.3.2 储存稳定性

目前国产酶制剂在常温存放中也有失活问题,大

多数精酶产品为胞外酶,储存时间不超过 1 年,1 年后酶活不足 20%。

2.3.3 水中稳定性

酶制剂应能在水中保持较长时间而不溶失。

2.4 注重酶制剂作用机理研究,提高酶活

目前对酶制剂的作用机理还不是特别清楚,应该深入研究酶制剂对水产动物生理和内分泌的影响。饲料中添加酶制剂,与一般酶的应用方法不同。因酶反应与水产动物体内存在的酶系有关,反应极为复杂,添加哪种酶,加入多少,随不同的水产动物、不同的原料种类及其配比而有不同的要求。因此,应重视应用试验,通过试验来决定添加酶的品种和酶活数量。

相对国外酶制剂的活性来说,国产酶制剂的活性还很低。酶制剂活性的提高,关键靠技术进步,要提高发酵工艺,通过基因工程选择合适菌种。酶产品活性的大幅度提高,必将会降低成本,从而促进酶制剂在我国大规模的推广与应用。

2.5 规范酶活定义和统一酶制剂测定标准

酶制剂活性测定是评价酶作用的一个重要指标,但目前大部分酶制剂的检测都没有统一的国家标准。酶活定义混乱,各个生产厂家提出的酶活定义都有差异,有的释放底物以纳克计,有的以微克计,同样效率的酶制剂可能标识相差几百倍,在实际应用中难以辨别酶制剂的优劣。酶制剂活性测定没有统一的标准,不利于学术交流和开展研究,限制了酶制剂的开发与应用。另外,在体外酶活性的测定不能完全反映水产动物体内酶的真实活性,因为影响酶制剂活性因素很多,诸如反应的底物、温度、pH 值等。因此,规范酶活定义和统一酶制剂测定标准对于开发饲用酶制剂是相当重要的。

3 水产动物饲用酶制剂的发展前景

随着水产饲料业的发展,目前以抗生素、化学合成抗菌剂等为主的饲料添加剂,由于极易造成药物在水产动物体内残留,进而危害到人类健康,必将会退出市场。而酶制剂作为无药物残留、无毒副作用、不污染环境的环保型绿色饲料添加剂一定会越来越受到人们的重视,饲用酶制剂目前被认为是使用最安全的一种饲料添加剂。随着技术的进步,国产酶制剂在酶活性和生产工艺及稳定化技术上的提高,生产成本的降低,饲用酶制剂将在解决水产动物饲料资源短缺、提高饲料利用率、减少环境污染、提高经济效益上得到广泛的应用。

(参考文献 18 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

罗非鱼对木薯粉表观消化率的研究

田雪 周洪琪 韩斌 闫大伟 刘兴国 李维娇

摘要 选择健康的尼罗罗非鱼为试验鱼,以 Cr_2O_3 为指示物,以 70% 参照饲料和 30% 的试验饲料原料组成试验饲料,测定尼罗罗非鱼对鱼粉、豆粕、木薯粉和次粉中的干物质、粗蛋白、粗脂肪以及灰分的表观消化率。结果表明:①罗非鱼对木薯粉干物质的表观消化率为 73.14%,与鱼粉、豆粕干物质的表观消化率没有显著差异 ($P>0.05$),较次粉提高 19.71% ($P<0.05$);②罗非鱼对木薯粉蛋白质的表观消化率为 84.58%,与豆粕的表观消化率不存在显著差异 ($P>0.05$),但显著低于鱼粉 ($P<0.05$);③罗非鱼对木薯粉脂肪的表观消化率为 93.35%,与豆粕的表观消化率不存在显著差异 ($P>0.05$),较鱼粉低 5.0% ($P<0.05$);④罗非鱼对木薯粉灰分的表观消化率为 67.74%,与鱼粉、豆粕灰分的表观消化率没有显著差异 ($P>0.05$),显著高于次粉 ($P<0.05$)。

关键词 木薯粉;尼罗罗非鱼;表观消化率

中图分类号 S965.125

罗非鱼在热带和亚热带地区被广泛养殖,是仅次于鲤科和鲢科的第三大养殖品种,具有生长快、食性广、繁殖力强、病害少、肉质好、产量高等优点^[1]。目前罗非鱼养殖已经向规模化和集约化迈进,饲料的应用是罗非鱼养殖的关键环节,如何能够降低饲料成本,提高饲料原料的表观消化率便成了研究的热点。

饲料原料的消化率是评价饲料在水产动物饲料中是否具有应用前景的第一步,也是配置平衡日粮的前提。饲料原料的表观消化率不仅为养殖鱼类提供各饲料原料的可利用营养素信息,而且对限制养殖鱼类废物排放也具有参考价值^[2]。近年来,国外研究将木薯用于畜禽饲料^[3-7],以补充饲料原料的不足,我国用木薯替代玉米饲养畜禽已取得良好效果^[8-11]。但是,木薯作为一种饲料原料在水产饲料中的应用报道并不多^[12],因此,本试验研究比较罗非鱼对木薯和鱼粉、豆粕以及次粉的表观消化率,为木薯作为罗非鱼的一种饲料原料的应用提供参考。

1 材料与方法

田雪,上海水产大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室,200090,上海。

周洪琪(通讯作者)、韩斌、闫大伟,单位及通讯地址同第一作者。

刘兴国,中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所。

李维娇,广西南宁壮德科技有限公司。

收稿日期:2007-04-02

★ 上海市重点水产学科建设项目 Y1101

1.1 材料

试验鱼为雄性的尼罗罗非鱼,试验所用木薯粉由广西南宁某公司提供。

1.2 试验饲料

按照 Cho 和 Slinger 的方法^[13]配制了 4 种试验饲料,试验饲料含有 70% 的参照饲料以及 30% 试验饲料原料,各饲料原料的营养成分见表 1,参照饲料配方见表 2。在参照饲料中加入 0.5% 的 Cr_2O_3 作为指示物。各种饲料原料粉碎后过 40 目筛,微量组分采用逐级扩大法混合,混合均匀后制粒,颗粒饲料粒径 2 mm,风干后置于 -4 °C 冰柜中保存、备用。

表 1 试验饲料原料的营养组成

饲料原料	蛋白质 (%)	脂肪 (%)	灰分 (%)	pH 值
鱼粉	70.65	7.62	17.06	-
豆粕	47.63	1.37	7.42	-
木薯粉	22.04	0.91	4.28	4.68
次粉	15.63	4.53	3.45	-

表 2 参照饲料的组成 (%)

项目	成分
鱼粉	8
大豆粉	42.6
次粉	44.0
氯化胆碱	0.5
维生素预混料	0.2
无机盐预混料	0.3
大豆油	4.0
磷酸二氢钙	0.4
三氧化二铬	0.5
合计	100

1.3 饲养管理

正式试验前,用参照饲料对罗非鱼进行驯养,罗

非鱼摄食正常后开始进行表观消化率试验。挑选体格健壮、规格整齐的试验鱼随机分到 15 个水族箱(90 cm×50 cm×40 cm)中进行试验。每个试验组设置 3 个重复,每个重复放养 5 尾鱼。每天分 2 次(8:00 和 16:00)投喂,投饲率为体重的 5%左右。每天用虹吸法排污并换水 1/5~1/4,保持溶解氧浓度大于 5 mg/l,氨氮浓度小于 0.3 mg/l,各组水质基本保持一致,试验期间水温控制在 25~26 ℃。

1.4 粪便收集

每天在投饲 1 h 后清除残饵,4 h 后开始用虹吸法收集新鲜、成型、饱满的粪便。收集到的粪便样品迅速移入干燥滤纸上,放置于干燥器中 70 ℃烘干,以备分析。

1.5 消化率测定及统计

将饲料和粪便样品在 105 ℃下烘至恒重,测定其水分含量;采用凯氏定氮法(总氮×6.25)测定粗蛋白质含量;采用索氏抽提法(以乙醚为溶剂)测定粗脂肪含量;将样品在马福炉中灼烧(550 ℃),测定灰分含量;饲料和粪便中 Cr₂O₃ 含量采用酸消化法测定。

依据饲料和粪便中各营养成分的含量及 Cr₂O₃ 的含量计算饲料中各营养成分的表观消化率^[15]。

计算试验饲料原料的干物质、粗蛋白、粗脂肪和灰分的表观消化率^[16]。试验饲料原料的表观消化率计算公式如下:

试验饲料原料营养成分表观消化率(%)=(试验饲料某营养成分的表观消化率-0.7×参照饲料某营养成分的表观消化率)/(0.3×试验饲料原料某营养成分)。

试验结果以平均值±标准差表示。用 SPSS 11.0 软件对试验数据进行方差分析,用 Duncan's 法进行多重比较。

2 结果

罗非鱼对各试验原料营养成分的表观消化率见表 3。

表 3 罗非鱼对饲料原料营养成分的表观消化率(%)

项目	干物质	蛋白质	脂肪	灰分
鱼粉	80.41±4.53 ^a	93.22±0.75 ^a	98.02±1.20 ^a	51.09±11.0 ^a
豆粕	75.48±4.17 ^a	88.31±1.41 ^b	95.81±1.01 ^{ab}	45.59±6.58 ^{ab}
木薯粉	73.14±2.16 ^a	84.58±1.25 ^b	93.35±0.51 ^b	67.74±9.67 ^a
次粉	61.10±4.87 ^b	71.03±0.30 ^c	72.90±1.33 ^c	27.37±3.69 ^c

注:表中同列数据肩标字母不同表示差异显著(P<0.05)。

由表 3 可知,罗非鱼对木薯粉的干物质、蛋白质、

脂肪和灰分的表观消化率分别为 73.14%、84.58%、93.35%和 67.74%。

罗非鱼对木薯粉的干物质表观消化率分别比鱼粉、豆粕低 9.04%和 3.10%,但差异不显著(P>0.05)。罗非鱼对次粉的干物质表观消化率最低,显著低于鱼粉、豆粕和木薯粉组(P<0.05)。

罗非鱼对鱼粉、豆粕、木薯粉蛋白质的表观消化率具有较高的水平,均大于 80%。对木薯粉的蛋白质表观消化率为 84.58%,与豆粕的表观消化率(88.31%)接近,两者之间不存在显著差异(P>0.05),但均显著低于鱼粉的表观消化率(P<0.05)。次粉的蛋白质表观消化率为 71.03%,分别比鱼粉、豆粕、木薯粉低 23.80%、19.57%和 16.02%(P<0.05)。

罗非鱼对饲料原料中脂肪的表观消化率同蛋白质表观消化率的变化趋势相似。木薯粉和豆粕的脂肪表观消化率分别为 93.35%和 95.81%,差异不显著(P>0.05);罗非鱼对木薯粉脂肪的表观消化率显著低于鱼粉(P<0.05);次粉的脂肪表观消化率显著低于鱼粉、豆粕和木薯粉(P<0.05)。

罗非鱼对木薯粉灰分的表观消化率最高,为 67.74%,与鱼粉、豆粕组不存在显著差异(P>0.05)。次粉的灰分表观消化率最低,为 27.37%,显著低于鱼粉、豆粕和木薯粉(P<0.05)。

3 讨论

罗非鱼对试验饲料的蛋白质和脂肪表观消化率较高,说明罗非鱼对饲料中蛋白质和脂肪具有较高的利用能力。这一结果同 Koprucu 和 Ozdemir^[17]、Maina 等^[18]以及 Hanley^[19]对罗非鱼的研究结果相同。

本试验中尼罗罗非鱼对鱼粉、豆粕和木薯粉的蛋白质的表观消化率(84.58%~93.22%)基本上与已经报道过的资料相接近。Pompa 报道,罗非鱼对鲱鱼鱼粉的蛋白质消化率为 85%^[20];Hanley 用解剖法测得尼罗罗非鱼对玉米的蛋白质消化率为 83%~84%、对豆粕的蛋白质消化率为 91%~94.4%、对鱼粉的蛋白质消化率 86%。Maina 提出,尼罗罗非鱼对鱼粉的蛋白质消化率为 90%,对小麦麸的蛋白质消化率为 75%。可能由于饲料原料的化学组成成分、来源、加工过程以及粪便收集方法的不同导致蛋白质表观消化率存在一定程度的偏差^[21]。

国内外大量的研究表明,饲料中蛋白质的品质是影响鱼类生长的首要因素,同种养殖动物对不同

饲料原料蛋白质具有不同的消化率,蛋白质的表观消化率是用来衡量鱼类对其利用率的指标,能影响鱼类的生长和饵料系数^[22]。本试验罗非鱼对木薯粉的蛋白质消化率与木薯粉呈酸性有关,可能因木薯粉使饲料的pH值下降,增加胃内的酸度,促进胃蛋白酶原被激活进而发挥对饲料蛋白质的水解作用^[23],提高消化酶的活性和饲料的消化利用率。Cho和Slinger^[24]、Aksnes和Opstvedt^[25]报道,鱼类对脂肪的表观消化率为85%~95%。Sklan等^[26]用鱼粉、肉粉、玉米面筋、大豆粉、油菜籽粉、向日葵籽粉、次粉等饲养罗非鱼,罗非鱼对脂肪的表观消化率为72%~90%。本试验条件下,罗非鱼对次粉、木薯粉、豆粕和鱼粉脂肪的表观消化率为72.90%~98.02%,这与Sklan等、Koprucu和Ozdemir的研究结果基本一致。

通常矿物元素在碱性环境中容易形成不溶性盐而难以吸收。Vielma等^[27]、潘庆等^[23]先后报道,在饲料中添加酸制剂可改善鱼体胃肠道的碱性环境,促进鱼类肠道后部对铁、钙、磷、锰等矿物质元素的吸收。本试验中,罗非鱼对木薯粉的灰分表观消化率高于鱼粉和豆粕,其原因可能是因为木薯粉的酸性所致。

参考文献

- Webster C, Lim C. Nutrient Requirement and Feeding of Finfish for Aquaculture[M]. CAB International, 2002, 273~291
- Lee S M. Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*Sebastes schlegelii*) [J]. Aquaculture, 2002, 207: 79~95
- Ceballos H, Iglesias C A, Pérez J C, et al. Cassava breeding: opportunities and challenges [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 56: 503~516
- Ngo T D, Nguyen T M, Ledin I. Effect of replacing a commercial concentrate with cassava hay (*Manihot esculenta* Crantz) on the performance of growing goats [J]. Animal Feed Science and Technology, 2005, 119: 271~281
- Duong N K, Hans W. Performance of growing heifers fed urea treated fresh rice straw supplemented with fresh, ensiled or pelleted cassava foliage [J]. Livestock Science, 2006(12): 17
- Dung N N X, Manh L H, Uden P. Tropical fibre sources for pigs—digestibility, digesta retention and estimation of fibre digestibility in vitro [J]. Animal Feed Science and Technology, 2002, 102: 109~124
- An L V, Hong T T T, Lindberg J E. Ileal and total tract digestibility in growing pigs fed cassava root meal diets with inclusion of fresh, dry and ensiled sweet potato (*Ipomoea batatas* L. (Lam.)) leaves [J]. Animal Feed Science and Technology, 2004, 114: 127~139
- 杨亮宇, 李清, 刘勇, 等. 饲用木薯粉的营养价值评定 [J]. 云南畜牧兽医, 2002, 1: 1~2
- 李耀南, 黄贤娟, 沈应然. 木薯粉的营养价值评定 [J]. 养猪, 1990(1): 5~7
- 黄世仪, 刘英强. 木薯日粮饲喂蛋鸡的效果观察 [J]. 饲料工业, 1992, 13(10): 7~12
- 梁郁均, 叶荣荣, 冷和平, 等. 用赖氨酸加蛋氨酸代替鱼粉结合木薯代替部分玉米养猪实验 [J]. 广东农业科学, 1990, 5: 41~43
- Omeregbe E, Ufodike EBC, Umaru MS. Growth and feed utilization of *Oreochromis niloticus* fingerlings fed with diets containing cassava peelings and mango seeds [J]. Aquabyte, 1991, 4: 6~7
- Cho C Y, Slinger S J. Apparent digestibility measurement in feedstuff for rainbow trout [J]. Finfish Nutrition and Finfish Technology, 1979, 2: 239~248
- Shiau S Y. Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture [M]. 2002. 230~240
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC, Arlington, VA, 1995
- Cho C Y, Slinger S J, Bayley H S. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity [J]. Comp. Biochem. Physiol., 1982, 73: 25~41
- Koprucu Y, Ozdemir Y. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquaculture 2005, 250: 308~316
- Maina J G, Beames R M, Higgs D, et al. Digestibility and feeding value of some feed ingredients fed to tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Aquaculture Research, 2002, 33: 853~862
- Hanley F. The digestibility of foodstuffs and the effects of feeding selectivity on digestibility determinations in tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Aquaculture, 1987, 66: 167~179
- Pompa T J. Digestibility of selected feedstuffs and naturally occurring algae by tilapia, PHD dissertation, Auburn University, 1982
- Bureau D P, Harris A M, Cho C Y. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 1999, 180: 345~358
- Halver J E, Hardy R W. Fish nutrition [M]. Third edition, 2002. 824
- 潘庆, 谭永刚, 毕英佐, 等. 酸制剂对罗非鱼生长和饲料利用的影响 [J]. 水产学报, 2004(28): 682~688
- Cho C Y, Slinger S J. Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. Proc World Symp on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, 1979, 2: 239~247
- Aksnes A, Opstvedt J. Content of digestible energy in fish feed ingredients determined by the ingredient - substitution method [J]. Aquaculture, 1998, 161: 45~53
- Sklan D, Prag T, Lupatsch I. Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their prediction in diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus* (Teleostei, Cichlidae) [J]. Aquaculture Research, 2004, 35: 358~364
- Vielma J, Lall S P. Dietary Fumaric acid enhances apparent digestibility of minerals in rainbow trout [J]. Aquaculture Nutrition, 1997(4): 265~268

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

饲料中添加磷脂油、胆碱、L-肉碱 对军曹鱼生长及组织脂肪含量的影响

周萌 曹俊明 马利 吴建开

磷脂、胆碱、左旋肉碱等是哺乳动物的抗脂肪肝因子,饲料中补充这些物质有利于肝脏脂肪的转运。在水产动物中,磷脂可参与肝脏中甘油三酯向肝外的转运^[1];胆碱缺乏可导致虹鳟、大鳞大马哈鱼、斑点叉尾鲷、日本鳊、大黄鱼等出现生长不良、肝脂积累增加,甚至出现脂肪肝等营养缺乏症^[2,3];左旋肉碱能降低罗非鱼的肝脂^[4],提高真鲷、鲈鱼^[9,11]等的生长性能,改善机体的营养组成。军曹鱼(*Rachycentron canadum*)是广泛分布于热带亚热带海域的一种大型暖水性的肉食性鱼类,被认为是几种极具发展潜力的网箱养殖鱼类之一,在我国东南部沿海已广泛养殖。但在军曹鱼的养殖过程中,同样出现了脂肪肝问题,尤其是长期投喂人工配合饲料更容易诱发脂肪肝。目前,对军曹鱼的营养研究才刚起步,已有的研究也只初步确定了能量蛋白比、碳水化合物等的需要量,而有关军曹鱼脂肪肝成因及营养调控尚缺乏研究。本文通过在饲料中添加3种抗脂肪肝物质——大豆磷脂油(含磷脂46%)、胆碱(含胆碱99%,分析纯)、肉碱(含L-肉碱10%),初步探讨其对军曹鱼组织脂肪积累的影响及对改善脂肪肝的营养价值。

1 材料和方法

1.1 试验鱼

试验鱼由广东某海水养殖基地提供。试验开始前,在网箱中用基础饲料驯养2周。

1.2 试验饲料

基础饲料以白鱼粉、豆粕为蛋白源,精制鱼油为脂肪源, α -淀粉为糖源配制,配方及营养组成见表1。在基础饲料中分别添加2个水平的3种抗脂肪肝物质,并用纤维素作填充剂;以冰鲜饵料为对照1组,以基础饲料为对照2组,共8个试验组(见表2)。饲料原料均经40目筛粉碎后混合,用SLX-80颗粒机制成

直径4 mm的软颗粒饲料,在45℃烘干后置于-15℃冰箱中保存待用。

表1 基础饲料配方及营养组成(%)

成分	含量
白鱼粉	62.0
豆粕	10.0
α -淀粉	20.0
鱼油	4.3
维生素预混料	0.2
矿物质预混料	0.5
磷酸二氢钙	1.2
纤维素	2.5
营养水平	
粗蛋白	46.5
粗脂肪	10.3
粗灰分	11.3

表2 抗脂肪肝物质添加量(%)

饲料	大豆磷脂油	胆碱	肉碱	纤维素
对照1组	-	-	-	-
对照2组	-	-	-	2.5
试验3组	1.5	-	-	1.0
试验4组	3.0	-	-	0.5
试验5组	-	0.5	-	2.0
试验6组	-	1.0	-	1.5
试验7组	-	-	0.1	2.4
试验8组	-	-	0.2	2.3

1.3 饲养管理

试验鱼驯养2周后随机分箱,每个尼龙网箱(2.0 m×1.0 m×1.5 m)中饲养15尾鱼,每个处理组设3平行。试验鱼平均初重为(22.45±3.85) g。试验期间水温25~31℃,盐度30‰~34‰,溶氧浓度不低于6 mg/l。分别于每天的9:00和16:00投喂试验饲料2次,投喂率为体重的6%,冰鲜饵料换算成干重后按体重的6%投喂(平均干物质含量22%)。每2周清洗一次网箱并测量一次体重,调整投喂量。试验进行了8周。

1.4 样品制备和分析

饲养结束后称重并统计存活率,每组各取5尾鱼断尾取血,以3 000 r/min在冷冻离心机中离心10 min,分离得到血清样品;再每组分别取3尾鱼,取内脏,制备肝胰脏样品,并去皮取两侧背肌样品。以上样品均保存于液氮中待分析。用烘干法、半微量凯氏定氮法、石油醚抽提法和马福炉高温灼烧法分别测定饲料和

周萌,广东省农业科学院畜牧研究所,510640,广东广州。

曹俊明、马利、吴建开,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-03-21

★ 广东省科技攻关项目(2003B21504)资助

全鱼的水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量;用氯仿-甲醇提取法提取肝胰脏和肌肉脂肪。试验结束时,每组随机选取 3 尾鱼的肝胰脏用 Bouine 氏液固定,石蜡包埋,制备切片。切片厚度 7 nm,用 H.E 染色,然后用显微镜观察,并在 200 倍下拍照。

1.5 数据分析与统计

试验数据用 STATISTIC6.0 软件作统计分析,试验结果用平均数±标准误差表示。采用 Duncan's 法进行多重比较。

2 试验结果

2.1 军曹鱼的增重率、饲料系数和蛋白质效率(见表 3)

表 3 军曹鱼的增重率、饲料系数和蛋白质效率

处理组	初始体重(g)	增重率(%)	饲料系数	蛋白质效率(%)
对照 1 组	20.72±3.89	548.86±47.13 ^a	1.51±0.27	1.95±0.33 ^b
对照 2 组	22.45±2.08	519.91±62.08 ^a	1.59±0.31	1.39±0.17 ^a
试验 3 组	21.62±2.62	560.27±79.32 ^{ab}	1.41±0.07	1.44±0.27 ^a
试验 4 组	20.89±0.43	540.00±56.56 ^{ab}	1.40±0.20	1.67±0.15 ^a
试验 5 组	22.79±1.04	599.22±87.29 ^{ab}	1.57±0.36	1.48±0.24 ^a
试验 6 组	22.27±1.18	611.11±21.10 ^{ab}	1.31±0.12	1.53±0.19 ^a
试验 7 组	22.27±1.18	618.62±29.96 ^b	1.49±0.25	1.55±0.08 ^a
试验 8 组	22.24±1.20	669.63±41.97 ^b	1.43±0.16	1.58±0.21 ^a

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

由表 3 可见,饲料中添加 3 种抗脂肪肝物质后,能不同程度的提高军曹鱼的增重率,增重率较对照 2 组升高了 3.86%~29%,但由于某些组的标准误差较大,仅第 7 组和第 8 组与对照 1、2 组差异达到显著性水平(P<0.05)。饲料中随着胆碱或肉碱添加量的增加军曹鱼的增重率也随着提高(5、6 组和 7、8 组),但相互之间没有显著差异(P>0.05)。

试验各组军曹鱼的饲料系数没有显著差异;蛋白质效率以对照 1 组最高,且显著高于其它各组。

2.2 军曹鱼的肝体比、脏体比和肥满度(见表 4)

由表 4 可见,试验 2~8 组间军曹鱼的肝体比、脏体比及肥满度均没有显著差异,但均高于对照 1 组。

表 4 试验军曹鱼的肝体比、脏体比和肥满度

处理组	肝体比(%)	脏体比(%)	肥满度(g/cm ³)
对照 1 组	1.51±0.32 ^a	9.48±0.90 ^b	0.92±0.06 ^a
对照 2 组	2.34±0.25 ^b	10.93±0.19 ^b	1.04±0.06 ^{ab}
试验 3 组	2.39±0.33 ^b	11.11±0.63 ^b	1.05±0.05 ^{ab}
试验 4 组	2.61±0.01 ^b	11.58±0.37 ^b	1.00±0.05 ^{ab}
试验 5 组	2.38±0.21 ^b	10.77±0.50 ^b	1.03±0.01 ^{ab}
试验 6 组	2.58±0.15 ^b	11.25±0.21 ^b	1.07±0.02 ^{ab}
试验 7 组	2.53±0.17 ^b	10.90±0.41 ^b	1.01±0.03 ^{ab}
试验 8 组	2.23±0.15 ^{ab}	10.57±0.28 ^{ab}	1.01±0.04 ^b

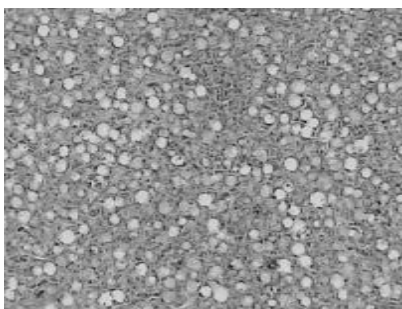
2.3 军曹鱼组织脂肪含量(见表 5)

表 5 试验军曹鱼的肠脂、肝脂和肌肉脂肪含量(%)

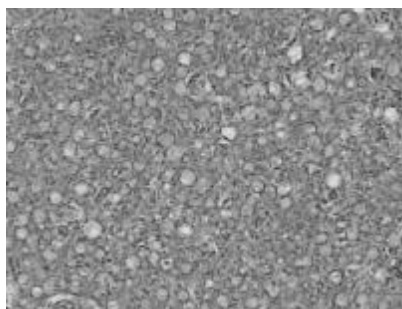
处理组	肠脂	肝脂	肌肉脂肪
对照 1 组	0.05±0.00 ^a	4.23±0.33 ^a	5.76±0.24 ^a
对照 2 组	0.93±0.06 ^c	17.09±1.73 ^d	13.62±0.84 ^b
试验 3 组	0.46±0.03 ^b	16.02±0.51 ^c	12.48±0.82 ^b
试验 4 组	0.48±0.04 ^b	16.28±0.62 ^c	13.56±0.17 ^b
试验 5 组	0.44±0.03 ^b	15.94±0.89 ^c	12.24±0.28 ^b
试验 6 组	0.34±0.01 ^b	14.86±0.71 ^c	12.04±0.07 ^b
试验 7 组	0.51±0.06 ^b	12.30±0.56 ^b	13.08±0.33 ^b
试验 8 组	0.31±0.03 ^b	12.70±0.88 ^b	13.44±0.27 ^b

注:肠脂含量=肠脂重/体重;肝脂含量=肝脂重/体重;肌肉脂肪重=肌肉脂肪重/体重。

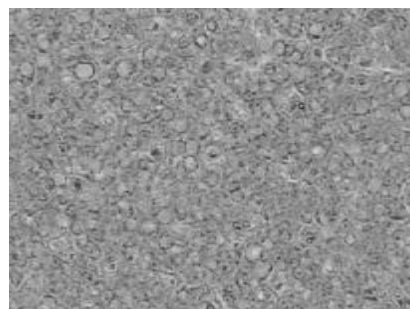
进一步测定了军曹鱼的肠脂、肝脂及肌肉脂肪发现,添加 3 种抗脂肪肝因子的试验组(3~8 组)较对照 2 组可不同程度的降低军曹鱼的肠脂和肝脂含量,降幅分别达 45.16%~66.67%和 4.74%~28.03%(P<0.05),但对肌肉脂肪含量没有显著影响;其中,以试验 8 组(0.2%肉碱)肠脂含量最低,试验 7 组(0.1%肉碱)肝脂含量最低,且试验 7 组和试验 8 组的肝脂含量显著低于试验 3~7 组(P<0.05),其余各试验组没有显著差异。选取对照 1 组、2 组和试验 7 组完整、清晰的肝脏组织各制成切片一张(见图 1)。其中,各图中白色细胞为脂肪细胞。由图 1 可见,未添加抗脂肪肝因子的对照 2 组肝胰脏中出现大量的脂肪细胞;试验 7 组(0.1%肉碱组)脂肪细胞数量明显减少;对照 1 组(冰鲜组)几乎未见脂肪细胞,肝细胞轮廓清晰。



(A)对照 2 组的肝脏组织



(B)试验 7 组的肝脏组织



(C)对照 1 组的肝脏组织

图 1 军曹鱼肝脏组织切片

3 讨论

本试验中,配合饲料代替冰鲜饵料成功地改善了军曹鱼的增重和饲料系数。其中,对照2组军曹鱼的增重率与冰鲜组无显著差异,添加3种抗脂肪肝物质不同程度的提高了军曹鱼的增重率,在0.1%和0.2%肉碱组达到显著性水平。但与冰鲜组相比,添加3种抗脂肪肝物质的试验组军曹鱼肝脂、肠脂、肌肉脂肪均显著提高;而相对于对照2组,各组织的脂肪积累有所改善,说明用配合饲料替代冰鲜饵料饲喂军曹鱼,可能存在着营养素组配失衡的问题,饲料中添加抗脂肪肝因子,只能一定程度的改善军曹鱼的脂肪肝症状。

本研究发现,饲料中添加1.5%和3.0%的大豆磷脂油较对照组能一定程度改善军曹鱼的生长和饲料系数,且显著降低了肠及肝脏的脂肪含量,这在很多鱼类研究中都得到证实^[5-7]。磷脂促生长作用的机理被认为是为机体细胞的形成和更新提供物质基础和能量,有利于不饱和脂肪酸的吸收和利用;同时,磷脂会影响机体的脂类转运,促进甘油三酯由肝脏向血液和肌肉中转移^[1],故磷脂具有一定的抗脂肪肝功效。在本研究中,添加1.5%和3.0%的大豆磷脂油(含磷脂约0.7%和1.4%)对军曹鱼的生长及组织脂肪含量没有显著差异,即军曹鱼幼鱼饲料中磷脂的适宜添加量可能不高于1.4%,低于其他研究者的结果,可能与饲料原料中已含有的一定量磷脂有关。鱼类对磷脂的适宜需求量会因生长阶段、鱼种及磷脂的种类而异。军曹鱼对饲料磷脂的需要量,还需进一步研究。

军曹鱼饲料中添加0.5%或1.0%的胆碱较磷脂能更有效的促进军曹鱼的增重,降低肠脂和肝脂的积累。胆碱对水产动物的生理功能,目前已有较明确的结论,主要表现在:①作为磷脂的组成成分,参与肝脏脂肪代谢,防止脂肪的过度积累;②参与神经传递活动,防止肌肉收缩障碍;③作为甲基供体,参与机体的合成代谢。胆碱的上述功能在本研究及大多数水产动物的研究中得到证实。但不同水产动物对胆碱的需要量存在很大差异,约在400~3 000 mg/kg之间^[8],因种类、发育阶段及评价指标而异。本研究中,添加1.0%胆碱较添加0.5%胆碱的增重率有上升趋势,而且降低肠脂和肝脂的效果更明显。因为饲料原料鱼粉中胆碱含量较高(>3 000 mg/kg,中国饲料原料数据库,2002),这表明军曹鱼饲料中胆碱的含量可能会高于1.0%。军曹鱼对胆碱的适宜需要量有必要作进一步的研究。

肉碱自20世纪80年代后应用于水产动物,已被证实淡水、海水鱼类,虾蟹类及甲鱼、鳊鱼中都有促进动物生长发育,促进脂肪代谢,改善肉品质的作用。肉碱是脂肪酸转运到细胞线粒体内进行 β -氧化的唯一

载体,在动物的新陈代谢中具有其它添加剂所不能替代的作用。本研究也发现,添加肉碱对军曹鱼的促生长及降低肝脂的效果最明显,与对照2组相比差异达到显著性水平。影响肉碱作用效果的因素是多方面的。Chatzifrtis等^[9]认为,饲料中的赖氨酸水平会极大的影响肉碱的作用效果。Twibell等^[10]认为,不同的肉碱添加量会对作用效果产生很大影响。Torreele等^[11]认为,饲料中脂肪含量及组成可对肉碱的作用效果产生影响。本试验中,饲料中添加0.2%肉碱较0.1%的肉碱促生长及降低肠脂作用更明显,可能是由于饲料的脂肪含量较高,增加了军曹鱼对肉碱的需要量。

本研究初步证实了磷脂、胆碱、L-肉碱对军曹鱼幼鱼的促生长及降低组织脂肪积累的作用,今后有必要对三者之间的相互替代关系及饲料中其它营养素(蛋白、脂肪、碳水化合物)与抗脂肪肝物质之间对军曹鱼脂肪肝的形成与调控的影响作进一步的研究。

参考文献

- 1 She ridan M A. Lip id dynamics in fish: aspects of absorption, transportation and mobilization[J]. *Com.Biochem.Pgysiol.*, 1988, 90B: 679-690
- 2 Millikin M R. Qualitative and quantitative nutrient requirement of fish: a review[J]. *Fish. Bull.*,1982, 80:655-686
- 3 Wilson R, Poe W. Choline nutrition of fingerling catfish. *Aquac.*, 1988, 68:65-71
- 4 杜震宇,刘永坚,田丽霞,等. 添加不同构型肉碱对罗非鱼生长和鱼体营养成分组成的影响[J]. *水产学报*,2002,26(3):259-264
- 5 P Coutteau I, Geurden M R, Camara P, et al. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture [J]. *Aquac.*, 1997, 155:149-164
- 6 Kanazawa A, Teshhihma S, Inamori S, et al. Effects of dietary phospholipids on growth, survival rate and incidence of malformation in the larval ayu [C]. *Mem. Fac. Fish, Kagoshima Univ.*, 1981, 30: 301-309
- 7 Loch mann R, Brown R. Soybean -lecithin supplementation od practical diets for juvenile goldfish (*Carassius auratus*)[J]. *Journal of the American Oil chemists' Societv.*, 1997,74(2):149-152
- 8 冷向军,李小勤.水产动物的胆碱营养[J]. *水生动物营养*,2005,2: 44-46
- 9 Chatzifrtis S, Takenchi T, Seikai T. The effect of dietary carnitine supplementation on growth of red sea bream (*Pagrus major*) fingerlings at two levels of dietary lysine[J]. *Aquac.*, 1996, 147:235-248
- 10 Twibell T G, Brown P B. Effects of dietary carnitine on growth rates and body composition of hybrid striped bass (*Morone saxatilis* male×*M. chrysops* female)[J]. *Aquac.*, 2000, 187:153-161
- 11 Torreele B E, Der Sluiszen A V, Verreth J. the effect of dietary L-carnitine on the growth performance in fingerlings of the African catfish (*Clarias gariepinus*) in relation to dietary lipid [J]. *Br. J. Nutr.*, 1993, 69:289-299

(编辑:徐世良, fx-xu@163.com)

不同磷源对奥尼罗非鱼幼鱼生长性能的影响

陈冰 潘庆 郑卫川 毕英佐

磷作为动物必需的一种常量矿物元素,在动物体内发挥着重要的生理作用。磷除与钙结合形成骨、齿、鳞、甲壳外,其余的分布于全身体细胞中。磷是三磷酸腺苷、核酸、磷脂、细胞膜和多种辅酶的重要组成成分,磷与能量转化,细胞膜通透性,遗传密码以及生殖和生长有密切关系。磷还用作缓冲液,以保持体液和细胞内液的正常的pH值^[1]。水中的磷含量较低,鱼虾为了满足其生长所需要的磷主要从外界的食物(饲料)中获取^[2,3]。饲料中磷含量不足时,鱼体在糖酵解过程中的磷酸化作用减弱,脂肪酸氧化受到抑制,葡萄糖异生作用增加,造成鱼营养不良、生长缓慢;磷含量过多时,又会导致血钙浓度降低,诱发甲状旁腺机能亢进,使鱼能量消耗增加,而不得不依靠刺激葡萄糖异生作用弥补其耗损^[4]。饲料原料及各种磷酸盐所含的磷,因化学结构不同及鱼种不同,其利用率各异。Lovell(1978)以美洲河鲈^[5]、Ogino等(1979)以鲤鱼和虹鳟^[6]进行不同饲料原料中磷的利用率试验。一般说来越是溶解性好的盐类其利用率就越高,能分泌胃酸的鱼类能吸收更多的磷。在无机磷酸盐中,一价盐的溶解性能最好、二价盐次之、三价盐最差。如化学纯的磷酸二氢钙在25℃水中溶解率为68%、磷酸氢钙为38%。Eya等(1997)测定了斑点叉尾鲷对无机盐的可利用率随溶解性能下降而递减,但有胃鱼和无胃鱼递减的程度不同^[7]。饲料中无机磷的主要来源是磷酸盐,包括磷酸钙盐(磷酸一钙、磷酸二钙和磷酸三钙)、磷酸钾盐、磷酸钠盐等。目前已做了关于异育银鲫对饲料中磷的利用^[8]、磷酸氢钙在高产鲤鱼养殖中的应用^[9]、磷酸氢钙在长薄鳅养殖生产中的应用、探讨^[10]等相关试验,但由于鱼的种类和试验对象年龄不同,以及磷源选择的种类和添加量的不一致,造成研究结果之间存在较大的差异。本试验以罗非鱼为对象,在饲料中分别添加磷酸二氢钙、磷酸氢钙、磷酸二氢钾、磷酸二氢钠,以观察不同的磷源对罗非鱼的生长性能、消化率和体成分的影响,为磷源在罗非鱼饲料中的合理应用提供参考。

陈冰,华南农业大学动物科学学院水产养殖系,510642,广东广州。

潘庆、郑卫川、毕英佐,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-03-12

1 材料与方法

1.1 试验饲料

试验共设4组饲料,分别是在基础料中添加不同的磷源,第1组(D1)为基础料添加磷酸二氢钙、第2组(D2)添加磷酸氢钙、第3组(D3)添加磷酸二氢钾、第4组(D4)是添加磷酸二氢钠。各组饲料原料全部粉碎过40目筛,均匀混合,挤压制成直径为1.2~1.5mm的颗粒,饲料于-20℃的冰箱中保存,备用。试验饲料配方及营养水平见表1。

表1 试验饲料配方及营养水平

组别	D1	D2	D3	D4
原料组成(%)				
基础饲料	92.33	92.33	92.33	92.33
纤维素	3.85	3.78	3.08	2.77
磷酸二氢钙	2.06	-	-	-
磷酸氢钙	-	2.90	-	-
磷酸二氢钾	-	-	2.08	-
磷酸二氢钠	-	-	-	2.39
碳酸钙	1.76	0.99	2.51	2.51
营养成分				
水分(%)	8.83	8.00	8.94	9.89
灰分(%)	8.26	8.60	9.19	8.81
粗蛋白(%)	30.64	30.91	30.71	30.38
粗脂肪(%)	1.23	0.85	1.27	1.08
钙(%)	1.61	1.26	1.44	1.51
磷(%)	1.64	1.49	1.70	1.51
Ca:P	1:1.02	1:1.18	1:1.18	1:1
总能(MJ/kg)	16.97	17.14	17.33	17.01

注:基础饲料组成为(%):豆粕35、花生粕12、麦麸11、次粉30、酵母粉3、豆油0.5、矿物质预混料0.3、维生素预混料0.5、三氧化二铬0.03。

1.2 试验管理

试验罗非鱼由番禺鱼苗厂提供,平均体长2cm,平均体重0.30g,鱼体健康,在室内流水饲养系统水族箱中驯养,持续充氧。驯养12d后选平均体重约1.05g的360尾罗非鱼随机分成4组,每组3个重复,每个重复30尾鱼。在试验期间,每天喂料4次,喂料时间分别为8:00、11:30、14:30和17:30,日投喂率为罗非鱼体重的6%。试验采用流水系统,保持充氧。水族箱水深约0.6m,pH值保持在7.5左右,水温为19.5~28.0℃,NH₄⁺浓度<0.005mg/l,溶解氧浓度>4.0mg/l。光照为自然光源,光照时间为12h/d。于投喂饲料的第22d开始用虹吸管收集粪,挑选完整包膜的粪条,于105℃烘干15min后采用55℃烘干,保存在-20℃冰箱中,备测,连续收集粪便3周。试验期为8周。

1.3 样品采集

饲养结束时,鱼体空腹 24 h 后,称终末体重。随机从每箱取 4 尾鱼,立即处死,剪碎,105 ℃烘干 15 min 后再经 55 ℃烘干,制备全鱼样品做体常规营养成分分析。每箱另随机取 3 尾鱼,用 MS-222 麻醉后称体重,测体长。每箱随机取 8 尾鱼用微波炉加热至鱼体熟化后,分离脊柱,用乙醇和苯混合液($V_{乙醇}:V_{苯}=2:1$)浸泡 48 h,再 105 ℃烘干,捣碎后去脂制备脱脂干骨。

1.4 样品分析

饲料和全鱼中的水分、灰分、粗蛋白、粗脂肪、钙、总磷和鱼粪中的粗蛋白、钙、磷含量均按国标方法进行测定^[1],能量用半自动氧氮式测热计进行测定。消化率测定采用间接法,用原子吸收光谱法测定饲料和

粪中的铬含量。

特定增长率(%/d)=(ln 终末平均体重-ln 初始平均体重)/饲养天数;

饲料效率(%)=体重总增加量/饲料总投喂量;

表观消化率(%)=1-(粪便中养分含量/粪便中指示剂含量)×(饲料中指示剂含量/饲料中养分含量);

肥满度=体重/体长的三次方。

1.5 数据统计分析

试验结果采用平均数±标准误差(M±SE)表示,经方差分析后有显著差异再做 Duncan's 多重比较进行组间差异显著性比较。

2 结果

2.1 添加不同磷源饲料组罗非鱼的生长性能(见表 2)

表 2 各饲料组罗非鱼的特定增长率及饲料效率(M±SE,n=3)

饲料组	初始平均体重(g/尾)	终末平均体重(g/尾)	耗料量(g)	总增重(g)	特定增长率(%/d)	饲料效率(%)
D1	1.03±0.01	4.79±0.01	172.81±2.38	111.65±1.45 ^a	2.75±0.01 ^a	64.61±1.00 ^a
D2	1.07±0.01	3.42±0.08	137.07±4.07	65.04±3.61 ^b	2.07±0.04 ^b	47.39±1.01 ^b
D3	1.01±0.01	4.56±0.35	160.47±4.90	98.17±10.44 ^a	2.67±0.15 ^a	60.94±4.01 ^a
D4	1.02±0.01	4.78±0.19	164.47±8.03	107.90±8.38 ^a	2.74±0.07 ^a	65.43±2.02 ^a

注:同列数据肩标字母相同的表示差异不显著(P>0.05),不同字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。

由表 2 可见,罗非鱼的总增重、特定增长率和饲料效率均以 D2 组最低,且显著低于 D1 组、D3 组、D4 组(P<0.05),但 D1 组、D3 组、D4 组之间无显著性差异(P>0.05)。

2.2 添加不同磷源饲料组罗非鱼的表现消化率(见表 3)

表 3 各罗非鱼的粗蛋白、钙、磷表现消化率(%) (M±SE,n=3)

饲料组	粗蛋白消化率	钙消化率	磷消化率
D1	90.28±0.86 ^a	66.98±8.54 ^a	60.42±6.47 ^a
D2	79.08±0.98 ^b	57.97±3.56 ^{ab}	26.05±2.58 ^b
D3	81.56±1.56 ^b	48.06±4.06 ^{ab}	33.41±7.42 ^b
D4	81.43±2.29 ^b	46.22±6.50 ^b	34.23±7.76 ^b

D1 组的粗蛋白和磷的表现消化率均显著高于 D2 组、D3 组、D4 组(P<0.05),但 D2 组、D3 组、D4 组之间无显著性差异。钙的表现消化率以 D1 组最高,并且 D1 组显著高于 D4 组(P<0.05)。

2.3 添加不同磷源饲料组全鱼的肥满度和营养成分(见表 4)

表 4 各饲料组罗非鱼全鱼的肥满度和营养成分

组别	D1	D2	D3	D4
肥满度(g/cm ³)	3.25±0.06 ^{ab}	3.47±0.11 ^a	3.12±0.06 ^b	3.57±0.14 ^a
水分(%)	79.19±3.69	78.90±1.62	78.61±5.57	77.42±3.12
灰分(%)	14.60±0.73 ^a	10.14±0.32 ^c	13.24±0.46 ^{ab}	12.33±0.78 ^b
粗蛋白(%)	13.41±0.52	13.01±0.14	13.77±0.42	13.91±0.23
粗脂肪(%)	9.03±0.93 ^a	17.27±0.42 ^b	9.99±0.82 ^a	13.48±1.60 ^c
钙(%)	3.90±0.14 ^a	2.96±0.09 ^b	3.78±0.21 ^a	3.73±0.20 ^a
磷(%)	4.60±0.19 ^a	3.27±0.07 ^c	4.32±0.16 ^{ab}	4.00±0.21 ^b

各饲料组罗非鱼的肥满度以 D4 组最高,且显著高于 D3 组(P<0.05)。体水分和粗蛋白含量各饲料组之间无显著差异(P>0.05)。灰分、磷含量以 D1 组最高,并且 D1 组显著高于 D4 组(P<0.05);同时 D4 组显著高于 D2 组(P<0.05)。体粗脂肪含量以 D2 组最高,并且 D2 组显著高于 D4 组(P<0.05);同时 D4 组显著高于 D1 组、D3 组(P<0.05)。体钙含量以 D2 最低,且显著低于 D1 组、D3 组、D4 组(P<0.05);但 D1 组、D3 组、D4 组之间无显著性差异(P>0.05)。

2.4 添加不同磷源饲料组的罗非鱼的骨骼性状(见表 5)

表 5 各饲料组的罗非鱼脱脂干骨的骨骼性状(%) (M±SE,n=3)

组别	D1	D2	D3	D4
钙	11.53±1.61	8.55±1.10	9.91±0.20	9.09±0.85
磷	10.41±0.29 ^a	8.41±0.31 ^b	10.85±0.18 ^a	9.63±0.82 ^{ab}

由表 5 可见,各饲料组间罗非鱼的脱脂干骨钙含量差异不显著(P>0.05)。脱脂干骨的磷含量以 D2 组最低,且显著低于 D1 组、D3 组(P<0.05),但 D1 组、D3 组之间无显著差异(P>0.05)。

2.5 4 种磷源的相对利用率

以表 2 中特定生长率为评价指标,磷酸二氢钙、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、磷酸氢钙的相对生物学效率分别为 100%、99%、97%、75%。

3 讨论

磷酸一钙, 又称磷酸二氢钙, 含磷 22%左右、钙 15%左右, 利用率比磷酸二钙或磷酸三钙好, 最适合用于水产动物饲料中。磷酸氢钙, 含磷 18%以上、钙 21%以上。磷酸二氢钾含磷 22%以上、钾 28%以上, 水溶性好, 易为动物吸收利用, 可同时提供磷和钾, 适当使用有利于动物体内的电解质平衡, 促进动物生长发育和提高生产性能。磷酸二氢钠含磷约 25%、钠约 19%, 因其不含钙, 在钙要求低的饲料中可充当磷源, 在调整高钙、低磷配方时, 不会改变钙的比例^[2]。

从本试验结果来看, 饲料中添加适当的无机磷可促进罗非鱼的生长和提高饲料的利用率, 这与对其它一些动物选择磷源的研究结果相同^[9,10,13]。宋义晖等(1997)在研究高产鲤鱼养殖中发现, 在饲料中添加磷酸氢钙对保证鲤鱼快速生长发育和维持正常生理活动起着十分重要的作用^[9]。袁万安等(2000)通过磷酸氢钙替代磷酸二氢钙发现, 随着磷酸氢钙比例的增加, 长薄鳅生长率逐渐下降, 饲料利用率明显降低, 而磷酸二氢钙更能促进长薄鳅生长^[10]。尹兆正等(2002)研究了 4 种不同化学形式无机磷源(磷酸一钙、磷酸二钙、磷酸三钙、磷矿石细粒)的生物学效价, 发现以磷酸一钙作为肉雏鸡日粮的无机磷源利用效果最好, 磷酸二钙、磷酸三钙也是雏鸡较好的磷源, 而磷矿石细粒则是不良磷源^[13]。某一无机磷源生物学效价的数值大小受评定指标的影响, 因而不同化学形式无机磷源生物学效价之间的比较必须选用相同的评定指标。在本研究采用生长性能中的特定生长率为指标来评定其生物学效价, 结果表明, 以磷酸二氢钙作为罗非鱼的无机磷源利用效果较好, 磷酸二氢钠、磷酸二氢钾次之, 而磷酸氢钙的利用效果则较差。

无机磷主要在小肠中吸收。影响磷吸收程度的因素很多, 主要有饲料中磷的形式、钙磷的比值、肠道的 pH 值、维生素 D 的促进作用等。当磷摄入量多于排出量而形成正平衡时, 磷在骨中沉积, 促进骨的生成, 通过调节机制维持血清中磷的正常浓度, 对动物的健康和生产起着十分重要的作用^[14]。鱼类和其它高等脊椎动物一样, 存在磷的恒稳机制。鱼类可以通过调整肠道的吸收, 尿磷排放和骨骼的沉积等机制, 来适应低磷和高磷的摄入, 不过对鱼类磷的生理调节机制还没完全弄清楚, 而且现在还不知道为了使鱼类保持健康和良好的生长, 是否必须使鱼的骨骼达到最大矿化程度^[15]。罗非鱼是杂食性鱼类, 有较发达的胃, 其胃腺细胞是典型的泌酸细胞, 能分泌胃酸, 高浓度的胃酸能使胃液的 pH 值小于 2.0, 激活胃蛋白酶, 促进蛋白质的消化。罗非鱼的肠很长, 至少是体长的 6 倍^[16], 增加营养物质在肠道中的停留时间, 能增大消化酶与营养物质

的接触面, 提高养分的消化率。本试验结果表明, 磷酸二氢钙对罗非鱼的蛋白质利用率及钙、磷的消化率都有显著提高, 效果均高于其它 3 组; 磷酸二氢钙组鱼体粗脂肪含量最低, 钙、磷含量最高; 脱脂干骨中钙、磷含量也较高。其原因可能是磷酸二氢钙这种化学形式中的磷易被罗非鱼吸收和利用, 并促进对蛋白质、钙、磷的吸收和利用, 从而提高了鱼体的生产性能。而磷酸氢钙组鱼体灰分含量最低, 脂肪含量最高, 钙、磷的沉积量最低。可见, 对磷酸氢钙这种化学形式的低利用率对鱼的体成分影响是多方面的。

参考文献

- 1 李爱杰. 水产动物营养与饲料学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996. 57-62
- 2 Maguire G B, Hume I D. A study of the nutritional requirements of school prawns *Metapenaeus macleayi* (Haswell) in some Australian brackish water farming ponds[J]. *Aquaculture*, 1982, 29:261-278
- 3 Edwin H, David L. Dietary calcium and phosphorus requirement of *Oreochromis aureus* reared in calcium-free water [J]. *Aquaculture*, 1987, 64:267-276
- 4 徐昌义. 饲料中磷含量对尼罗罗非鱼几项生理指标的影响[J]. 西南农业学报, 1990(1):17
- 5 Lovell R T. Dietary phosphorus requirement of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. *Trans Am. Fish Soc.*, 1978, 107 :617-621
- 6 Ogino C, Takeuchi L, Takeda H, et al. Availability of dietary phosphorus in carp and rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 1979, 45:1 527~1 532
- 7 Eya J C, Lovell R T. Available phosphorus requirements of food-size channel catfish (*Ictalurus Punctatus*) fed practical diets in ponds[J]. *Aquac.*, 1997, 154:285~291
- 8 叶军, 贺锡勤. 异育银鲫对鱼粉等 11 种饲料中磷的利用率. 海洋与湖沼, 1991, 22(3):233-236
- 9 宋义晖, 高世明. 磷酸氢钙在高产鲤鱼养殖中的应用[J]. 河南水产, 1997, 2(12):12
- 10 袁万安. 磷酸氢钙在长薄鳅养殖生产中的应用试验探讨[J]. 饲料工业, 2000, 21(9):23-24
- 11 崔淑文, 陈必芳. 饲料标准汇编[M]. 中国标准出版社, 1991.70~93
- 12 王成章, 王恬. 饲料学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.242~244
- 13 尹兆正, 王忠良, 潘根长. 不同化学形式的无机磷源在肉雏鸡体内生物学效价的研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002, 28(1):74-77
- 14 周顺伍. 动物生物化学(第三版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.296-302
- 15 Bureau D P, Cho C Y. Phosphorus utilization by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): estimation of dissolved phosphorus waste output[J]. *Aquac.*, 1999, 179:128-140
- 16 李家乐, 钱荣华. 罗非鱼类的食物和营养[J]. 浙江海洋学院学报, 2001, 20(3):233-236
- 17 Onishi T, Suzuki M, Takuchi M. Changes in carp hepatopancreatic enzyme activities with dietary phosphorus levels. *Bull. Jpn Soc Sci Fish*, 1981, 47:353-357
- 18 Rodehutsord M. Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growing from 50-200 g to supplements of dibasic sodium phosphate in a purified diet[J]. *Aquac.*, 1996, 126:328-331
- 19 Skonberg D I, Yogev L, Hardy R W, et al. Metabolic response to dietary phosphorus intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 1997, 157:15-24

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

不同铬源在高添加水平下对肉仔鸡生长性能和组织铬含量的影响

孟海燕 苏晓鸥 王建勋 刘世杰 李慧

摘要 在1~21日龄AA肉仔鸡日粮中添加高水平(8 mg/kg)的5种铬源组成试验组日粮,对照组日粮不添加铬,进行饲养试验,研究铬在高添加水平下,不同的铬源对肉仔鸡生长性能的影响。结果表明:①CrY对21日龄肉仔鸡的日增重、日采食量和料重比没有不良影响($P>0.05$),但CrPic、CrNic、CrMet和CrCl₃分别使肉仔鸡的日增重下降8.06%、16.46%、9.06%、41.36% ($P<0.05$);CrMet使肉仔鸡日采食量增加11.33% ($P<0.05$),而CrCl₃使肉仔鸡日采食量降低17.04%;CrPic、CrNic、CrMet和CrCl₃使肉仔鸡的料重比升高12.7%、20%、22%、41.33% ($P<0.05$)。可见,CrMet和CrCl₃对肉仔鸡生长性能影响最大,其次为CrNic和CrPic。②以CrCl₃为铬源,8 mg/kg能显著增加21日龄肉仔鸡的腹脂率63.01% ($P<0.05$),其它4种铬源对21日龄肉仔鸡的腹脂率没有显著影响($P>0.05$),表明高添加水平条件下有机铬对肉仔鸡腹脂蓄积的影响比无机铬小。③在高添加水平下,铬源对0~21日龄肉仔鸡的肝脏铬含量、肾脏铬含量、胫骨铬含量有不同程度的影响。

关键词 铬;肉仔鸡;高添加水平;生长性能;组织

中图分类号 S831.5

1 材料和方法

1.1 动物、饲粮及管理

采用完全随机设计,将360只1日龄商品代AA肉仔鸡随机分成6组,每组设3个重复,每个重复20只鸡,公母各半,饲养于不锈钢肉鸡笼内。饲养管理按照《AA肉仔鸡饲养管理手册》进行。试验期21 d,自由采食和饮水。在试验结束时以1个重复笼作为单位称量鸡的空腹体重和耗料量,并统计鸡死亡率。

采用单因素处理安排。以推荐添加剂量(0.2 mg/kg)的40倍(8 mg/kg)作为日粮中铬的添加量(高水平添加),5种铬源为吡啶甲酸铬(CrPic)、烟酸铬(CrNic)、酵母铬(CrY)、蛋氨酸铬(CrMet)、氯化铬(CrCl₃),共组成5个试验组,对照组不添加铬,饲喂玉米—豆粕型的基础饲粮,基础饲粮组成及营养水平见表1。

1.2 样品的采集与制备

在试验结束时,每个重复笼抽取2只与平均体重相近的试鸡屠宰,公母各1只,立即取出肝脏、肾脏和胫骨,剥离腹部脂肪并称重记录。肝脏、肾脏和胫骨在-20℃条件下冻存。每个重复的2只鸡的组织合并为1个样品进行分析。

孟海燕,北京爱德利都饲料科技开发有限公司,100069,北京市右安门外东滨河路4号A516。

苏晓鸥、王建勋、刘世杰、李慧,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-03-15

表1 基础饲粮组成及营养水平

原料	组成(%)	营养水平	
玉米	55.19	代谢能(MJ/kg)	12.96
豆粕	33.3	粗蛋白(%)	21.1
玉米蛋白粉	4.5	蛋能比(g/MJ)	16.29
油脂	3	亚油酸(%)	1.37
磷酸氢钙	3.26	赖氨酸(%)	1.1
食盐	0.36	蛋氨酸(%)	0.5
石粉	0.4	蛋氨酸+胱氨酸(%)	0.9
赖氨酸	0.02	钙(%)	1
DL蛋氨酸	0.15	非植酸磷(%)	0.45
50%氯化胆碱	0.1	铬(mg/kg)	0.44
抗氧化剂	0.01		
15%金霉素	0.06		
微量元素	0.3		

注:1.微量元素向每千克饲粮提供VA 50 000 000 IU、VD₃ 17 000 000 IU、VE 64 000 IU、VK₃ 8 g、VB₁ 4 g、VB₂ 8 g、VB₁₂ 40 mg、VH₂ 6 300 mg、叶酸 4 g、烟酸 130 g、泛酸钙 4 g、CuSO₄·5H₂O 1.596 g、FeSO₄·H₂O 26.76 g、ZnSO₄·7H₂O 14.69 g、MnSO₄·H₂O 16 g、KI 0.04 g、Na₂SeO₃ 0.06 g、沸石 61.85 g;
2.粗蛋白、铬为实测值。

1.3 样品的分析

组织样品用浓硝酸和过氧化氢通过微波(MPS-2000 CEM Innvators in Microwave Technology)进行湿消解后,采用石墨炉原子吸收仪AAS(Z-8200 Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrometer, premium III, 4133)测定分析其中的铬含量。

1.4 数据统计分析

利用SPSS 11.5系统中的ONE WAY ANOVA程序进行单因素分析,每个重复笼为1个试验单元,采用LSD法比较平均数间的差异显著性。

2 结果与讨论

2.1 高添加水平下不同铬源对肉仔鸡生长性能和腹脂率的影响(见表 2)

表 2 高添加水平下不同铬源对肉仔鸡生长性能的影响

铬源	日增重(g/只)	日采食量(g/只)	料重比	腹脂率(%)
对照组	25.82±0.13 ^a	38.67±0.1 ^b	1.5±0.01 ^b	0.73±0.01 ^b
CrPic 组	23.74±0.28 ^b	40.08±1.47 ^b	1.69±0.08 ^a	0.69±0.03 ^b
CrNic 组	21.57±0.62 ^c	38.7±1.1 ^b	1.8±0.06 ^a	0.87±0.08 ^b
CrY 组	24.9±0.55 ^a	39.78±1.64 ^b	1.6±0.08 ^b	0.75±0.05 ^b
CrMet 组	23.48±0.38 ^b	43.05±0.78 ^a	1.83±0.04 ^a	0.68±0.14 ^b
CrCl ₃ 组	15.14±0.32 ^d	32.08±1.61 ^c	2.12±0.14 ^a	1.19±0.16 ^a

注:同列数据肩标不同者表示差异显著(P<0.05)。下表同。

由表 2 可见,在高添加水平下,CrY 对肉仔鸡的日增重、日采食、料重比和腹脂率均无显著影响(P>0.05),而其它 4 种铬源 CrPic、CrNic、CrMet、CrCl₃ 分别使肉仔鸡的日增重下降 8.06%、16.46%、9.06%、41.36%(P<0.05);CrPic 和 CrNic 对肉仔鸡日采食量无显著影响(P>0.05),而 CrMet 增加肉仔鸡日采食量 11.33%(P<0.05),CrCl₃ 降低肉仔鸡日采食量 17.04%(P<0.05);Cr-Pic、CrNic、CrMet 和 CrCl₃ 分别使肉仔鸡的料重比升高 12.7%、20%、22%、41.33%(P<0.05);由此推测,CrMet 显著增加肉仔鸡日采食量的原因可能是:CrMet 分子中的蛋氨酸发挥了促进采食作用,缓解了部分高含量铬对生长性能的毒性作用;而无机 CrCl₃ 显著降低肉仔鸡日采食量,表明高添加水平下无机 CrCl₃ 抑制肉仔鸡采食机制,进而显著降低肉仔鸡的日增重;无机氯化铬在高添加水平下使肉仔鸡的腹脂率增加 63.01%(P<0.05),而其它 4 种有机铬不影响肉仔鸡的腹脂率,表明有机铬对肉仔鸡腹脂蓄积的危害较无机铬小。

本试验过程中,通过肉眼观察可发现,除了酵母铬组外,其它 4 种铬源组肉仔鸡与对照组肉仔鸡在个体大小上存在显著差异,表现为生长受阻,通过表 2 试验数据的统计学分析,也验证了这一结果。

日粮中添加铬对肉仔鸡产生毒性作用的剂量范围目前尚未确定,相关的报道较少,相关的数据也存在差异。罗绪刚等(1999)给 AA 肉仔鸡日粮分别添加氯化铬和酵母铬,在日粮中添加 10 mg/kg 铬时,添加铬组肉仔鸡的日增重与日采食量均高于对照组(P<0.05);而日粮中添加 20 mg/kg 铬时对肉仔鸡的生长有不良影响。杨建成(2000)试验结果表明,饲料中分别以氯化铬和吡啶甲酸铬形式添加 2.5 mg/kg 铬时均引起肉仔鸡的死亡率升高(P<0.05),造成这种结果差异的原因可能在于基础日粮铬含量的不同,以及不同的铬源形式、不同的试验条件,日粮添加铬对肉仔鸡腹脂率的影响研究的结果也不一致。

微量元素铬曾一度被认为是有毒元素。事实上,根据 Venchiknov 双相曲线,将某一元素划定为有毒元

素在逻辑上是错误的,因为所有元素在一定范围内均有毒性,这主要取决于与生物物质接触的浓度。本试验中,高添加水平下酵母铬组与对照组的日增重、日采食量、料重比、腹脂率无显著差异,这说明高水平铬引起的不良毒性反应除了与添加水平有关以外,还与不同的铬源形式有关。这种不同铬源在相同高添加水平下引起不同的不良影响的差异,是否仅与其化学形式有关,还是与因化学形式不同而造成的在消化道内吸收利用程度不同有关,尚待进一步研究。

在实际饲料生产加工过程中,微量元素因为量少而往往容易在加工过程中过量添加,这样不可避免的造成毒性的增强。根据本试验结果可推测,在较高添加水平下,5 种铬源中酵母铬的相对安全性更高,在饲料生产加工过程中即使不慎过量添加而造成不良影响的可能性也比较小。

2.2 高添加水平下不同铬源对肉仔鸡肝、肾、胫骨铬含量的影响(见表 3)

表 3 高添加水平下不同铬源对肉仔鸡肝、肾、胫骨铬含量的影响(干基计)(mg/kg)

铬源	肝脏铬	肾脏铬	胫骨铬
对照组	0.173±0.002 ^a	0.225±0.009 ^a	0.356±0.010 ^a
CrPic 组	0.342±0.021 ^b	0.335±0.001 ^b	0.631±0.055 ^c
CrNic 组	0.295±0.008 ^c	0.436±0.023 ^b	0.479±0.067 ^a
CrY 组	0.201±0.007 ^a	0.279±0.007 ^c	0.855±0.014 ^b
CrMet 组	0.365±0.025 ^b	0.272±0.016 ^c	0.461±0.023 ^a
CrCl ₃ 组	0.239±0.033 ^c	0.573±0.010 ^b	0.395±0.038 ^a

由表 3 可见,5 种铬源对 1~21 日龄肉仔鸡的肝脏铬含量、肾脏铬含量、胫骨铬含量有不同程度的影响。其中,酵母铬对 21 日龄肉仔鸡肝脏铬含量的影响不显著,而其它 4 种铬源在高水平下使肉仔鸡肝脏铬含量增加 97.69%、70.52%、110.98%、38.15%(P<0.05)。5 种铬源均显著增加肉仔鸡肾脏铬含量,CrPic、CrNic、CrY、CrMet、CrCl₃ 组比对照组分别增加 48.89%、93.78%、24%、20.89%、154.67%。其中,CrPic、CrNic 和 CrCl₃ 组肉仔鸡的肾脏铬含量均显著高于 CrY 和 CrMet 组。CrPic、CrY 组分别增加肉仔鸡胫骨铬含量 77.25%、140.17%(P<0.05),其它 3 种铬源对肉仔鸡胫骨铬含量的沉积没有显著影响。

肉仔鸡日粮中添加铬对其组织含量影响的研究报道较少,而且由于测定条件和手段的不同,组织铬含量的范围跨度也较大。董小惠(2000)报道,在适宜添加水平下肉仔鸡的肝脏铬含量低于肾脏铬含量。Anderson Richard(1989)研究表明,火鸡日粮中分别添加 0.025、0.10、0.20 mg/kg 铬,肝脏铬和肾脏铬含量均随日粮铬含量的增加而呈线性增加,肾脏铬含量高于肝脏铬含量。本试验中酵母铬在高添加水平下对肝脏

脱毒油茶粕饲料在罗非鱼养殖中的应用研究

周江 殷肇君

目前,我国对油茶籽的利用基本上仅限于榨油,对榨油后剩余的茶籽饼粕利用还很不够,大多直接作清塘剂或肥料使用。经检测分析,油茶饼粕中富含茶皂素、蛋白质、脂肪、淀粉和粗纤维等成分,油茶籽粗蛋白含量为12%~18%,蛋白质中含有17种氨基酸成分,其中7种是人体必需的氨基酸。然而,一方面由于油茶饼粕中含有10%~15%的茶皂素(Theasaponin),具有较强的溶血作用,因此在传统水产养殖业中是作为虾蟹保护剂和清塘剂使用的;同时,茶皂素的存在又使饲料味苦且辛辣,因而限制了油茶籽饼粕在饲料工业中的应用,造成巨大的资源浪费。另一方面,油茶粕中的茶皂素具有一定的生物活性,在畜禽日粮中低剂量添加对养殖效果有一定的影响。考虑到茶皂素具有生物活性的特性及采用水浸提法提取油茶粕中茶皂素的不彻底性两方面的情况,因此,研究脱毒后的油茶粕饲用价值和油茶粕中残留的低剂量的茶皂素对养殖对象的影响是本试验的研究

出发点。

本试验利用水浸提工艺将油菜粕中的茶皂素脱去后添加在水产饲料中饲喂罗非鱼,研究其在水产动物中的应用效果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

油茶粕原料由江西省某油脂食品有限公司提供,原料经浸提工艺进行脱脂处理,再经水浸提工艺提取茶皂素(脱毒)后干燥、粉碎备用。罗非鱼[体重为(3.19±0.39)g]由上海南汇养殖场提供。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计

采用单因子浓度梯度法设计,试验分设6组:对照组、5%油茶粕组、10%油茶粕组、15%油茶粕组、20%油茶粕组、30%油茶粕组。每组设3个重复,每个重复15尾鱼。根据罗非鱼的营养需求设计饲料配方,饲料配方及主要营养水平见表1。

表1 饲料配方及营养水平

项目	对照组	5%油茶粕组	10%油茶粕组	15%油茶粕组	20%油茶粕组	30%油茶粕组
原料组成(%)						
玉米	5.00	4.91	4.87	4.81	4.47	4.15
小麦麸	30.00	24.88	19.76	14.64	9.88	0.20
大豆粕	45.00	45.26	45.51	45.77	45.92	46.08
大豆油	3.00	2.90	2.85	2.77	2.63	2.56
鱼粉	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
脱毒茶粕	0.00	5.00	10.00	15.00	20.00	30.00
多维	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
多矿	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
营养水平						
DE(MJ/kg)	12.43	12.37	12.35	12.29	12.27	12.23
粗蛋白(%)	34.55	34.55	34.55	34.55	34.55	34.55
粗脂肪(%)	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
粗纤维(%)	5.39	5.88	6.34	6.75	7.76	9.27

周江,中国水产科学院上海渔业机械研究所,200092,上海市赤峰路63号三号楼304室。

殷肇君,上海水产大学。

收稿日期:2007-03-28

铬含量无显著影响,可能与肝脏自身的生理调节机能有关,表明酵母铬对毒性排除的反应性最好,但是对肾脏铬和胫骨铬含量有显著影响。

3 小结

在高添加水平(8 mg/kg)的条件下,除CrY外,CrPic、CrNic、CrMet和CrCl₃对肉仔鸡的生长性能均有不同程度的不良影响,CrMet和CrCl₃影响最大,其

1.2.2 饲养管理

试验水箱采用自制玻璃缸,规格为(80×40×50)cm³。养殖用水为自来水,经曝气后使用。每天排污并换水1/5~1/3,日投饵量约为鱼体重的4%,每天8:00、12:00、

次为CrNic和CrPic。根据本试验结果可以推测,在实际饲料生产中,CrY的安全性好;在高添加水平(8 mg/kg)条件下,有机铬对肉鸡腹脂蓄积的危害较无机铬小;CrY在高添加水平下对肝脏铬含量无显著影响,表明酵母铬对毒性排除的反应性最好。

(参考文献29篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

16:00、22:00分4次投饵,根据天气、水温、摄食情况等作适量调整;驯养2周,投喂基础饵料,鱼无异常情况后开始正式试验。试验期间水温25~30℃,全天充气增氧。各项水质理化指标:pH值5.3~7.8、溶氧浓度≥5.0 mg/l、NH₃-N浓度<0.5 mg/l。饲养期为60 d。

1.3 酶液的制备

饲养试验结束后,用75%的酒精擦拭鱼体,用剪刀沿鱼腹中线剪开,剔除肠壁上的脂肪,漂洗消化道内容物。分别取肝胰腺、肠道组织块0.2~1.0 g,用生理盐水漂洗,除去血液,用滤纸拭干、称重后放入5 ml或10 ml的小烧杯内,移取0.86%冷生理盐水(生理盐水的总体积为组织块的9倍,用移液管或移液器移取总量的2/3)至烧杯中。用小剪刀快速剪碎组织块,将剪碎的组织倒入玻璃匀浆管中,再将剩余的1/3冷生理盐水冲洗残留在烧杯中的碎组织块,一起倒入匀浆管中匀浆(在冰水浴中进行)6~8 min,再将制备好的10%匀浆用冷冻离心机3 000 r/min离心10~15 min,留取上清液待测肠道、肝胰腺消化酶活性。

1.4 指标检测

1.4.1 生长性能指标的测定及计算

相对增重率(%)=(试验末鱼体重-试验初鱼体重)/试验初鱼体重;

饲料系数=(投饵量-残饵量)/(试验末鱼总体重+试验中死亡鱼体重-试验初鱼总体重)。

1.4.2 肉中粗蛋白、粗脂肪、灰分、水分及氨基酸的检测

肌肉中粗蛋白、粗脂肪、灰分、水分及氨基酸含量的检测按常规方法(中华人民共和国国标)进行检测分析。

1.4.3 消化酶活性的测定

蛋白酶活性的测定参照Folin酚试剂法,蛋白酶活性单位:1 ml酶液在pH值为7.0、40℃下保温10 min,每分钟产生1 μg酪氨酸所需的酶量为1个酶活单位(U);淀粉酶活性的测定参照碘-淀粉比色法,淀粉酶活性单位:100 ml血清(浆)中的淀粉酶在37℃下与底物作用30 min水解10 mg淀粉所需的酶量为1个酶活单位(U);脂肪酶活性的测定参照南京建成生物研究所提供的分析方法;蛋白质的测定参照考马斯亮蓝法。

1.4.4 数据处理

试验数据采用SPSS 10.0统计软件进行多重比较分析。

2 试验结果

2.1 脱毒油茶粕饲料对罗非鱼生长性能的影响

不同配比的脱毒油茶粕饲料经过60 d的喂养试验,罗非鱼的各项生产性能指标(包括增重、增重率、成活率、饲料系数)见表2。

表2 油茶粕饲料对罗非鱼生长性能的影响

项目	成活率(%)	增重(g)	增重率(%)	饲料系数
对照组	100±0.00	12.01±0.71 ^{Ba}	376.27±70.48 ^{Ba}	2.58±0.42
5%油茶粕组	97.8±3.87	15.78±0.98 ^{Ac}	515.53±98.64 ^{Aa}	2.54±0.56
10%油茶粕组	100±0.00	16.51±0.43 ^{Ab}	523.96±64.67 ^{Ab}	2.21±0.53
15%油茶粕组	100±0.00	18.71±1.18 ^{Aa}	596.62±118.06 ^{Aa}	2.18±0.26
20%油茶粕组	93.3±6.70	7.03±0.70 ^{Bb}	224.26±7.26 ^{Cc}	2.63±0.44
30%油茶粕组	97.8±3.87	4.98±0.77 ^{Bc}	150.13±18.41 ^{Cb}	2.87±0.27

注:同列数据肩标小写字母不同者表示差异显著(P<0.05);大写字母不同者表示差异极显著(P<0.01);字母相同者表示差异不显著(P>0.05)。下表同。

2.2 脱毒油茶粕饲料对罗非鱼肉质的影响

试验结束后,对各组罗非鱼进行抽样检测其鱼体肌肉中粗蛋白、粗脂肪、灰分和水分含量,分析油茶粕饲料对罗非鱼肌肉生化组成的影响(见表3)。

表3 脱毒油茶粕饲料对罗非鱼肌肉粗蛋白、粗脂肪、粗灰分和水分的影响(%)

项目	粗蛋白	粗脂肪	灰分	水分
对照组	47.16±0.67 ^{Bc}	28.46±0.52 ^{Bb}	13.52±1.23 ^{Ab}	70.11±0.72 ^{Ac}
5%油茶粕组	47.5±0.51 ^{Bb}	28.42±0.31 ^{Bb}	13.48±3.23 ^{Ac}	68.97±0.18 ^{Bb}
10%油茶粕组	48.53±0.43 ^{Ab}	29.66±0.32 ^{Ab}	12.58±2.62 ^{Bb}	69.32±0.14 ^{Ba}
15%油茶粕组	49.83±0.71 ^{Aa}	30.26±0.28 ^{Aa}	13.86±2.52 ^{Aa}	70.69±0.45 ^A
20%油茶粕组	47.73±0.35 ^{Ba}	28.72±0.15 ^{Ba}	12.85±1.51 ^{Ba}	71.34±0.23 ^{Ab}
30%油茶粕组	44.26±0.42 ^C	27.74±0.21 ^{Bc}	11.84±1.87 ^{Bc}	71.7±0.27 ^{Aa}

2.3 油茶粕饲料对罗非鱼肠道、肝胰腺蛋白酶活性的影响(见表4、5、6)

表4 油茶粕饲料对罗非鱼肠道、肝胰腺蛋白酶活性的影响(U/ml)

项目	肠道	肝胰腺
对照组	13.767±3.158 ^{Ba}	9.686±1.662 ^{Ba}
5%油茶粕组	13.459±2.846 ^{Bb}	8.119±1.425 ^{Bba}
10%油茶粕组	16.564±1.102 ^{Aa}	10.235±2.492 ^{Ab}
15%油茶粕组	15.071±3.774 ^{Ab}	12.038±1.614 ^{Aa}
20%油茶粕组	10.675±1.256 ^{Bba}	6.713±2.235 ^{Bc}
30%油茶粕组	8.032±4.551 ^{Bbc}	8.183±1.351 ^{Bbb}

表5 油茶粕饲料对罗非鱼肠道、肝胰腺脂肪酶活性的影响(U/gpr)

项目	肠道	肝胰腺
对照组	965.382±37.763 ^{Baa}	834.132±57.119 ^{Bab}
5%油茶粕组	813.326±23.576 ^{Bba}	852.105±34.002 ^{Baa}
10%油茶粕组	1 102.52±12.476 ^{Aa}	1 151.283±24.419 ^{Aa}
15%油茶粕组	1 083.227±19.604 ^{Ab}	1 168.569±42.226 ^{Ab}
20%油茶粕组	902.311±14.330 ^{Bab}	725.121±88.931 ^{Bb}
30%油茶粕组	714.649±25.775 ^{Bbc}	635.011±66.107 ^{Bc}

表6 油茶粕饲料对罗非鱼肠道、肝胰腺淀粉酶活性的影响(U/100 ml)

项目	肠道	肝胰脏
对照组	317.053±10.352 ^{Bb}	236.933±28.305 ^{Ca}
5%油茶粕组	355.699±39.566 ^B	490.964±16.428 ^{Ab}
10%油茶粕组	417.626±33.528 ^{Ac}	408.594±27.003 ^{Ba}
15%油茶粕组	498.807±14.995 ^{Aa}	532.775±12.201 ^{Aa}
20%油茶粕组	466.079±48.253 ^{Ab}	153.372±37.256 ^{Cb}
30%油茶粕组	317.276±26.200 ^{Ba}	332.294±23.223 ^{Bb}

整体上看,本试验的结果显示:罗非鱼的肠道蛋白酶活性明显高于肝胰脏的蛋白酶活性;罗非鱼的肝胰脏的脂肪酶活性高于肠道脂肪酶活性;罗非鱼的肝胰脏的淀粉酶活性总体来说随茶粕添加量的增加而上升,但并不表现出明显的线性关系。

3 分析与讨论

3.1 油茶粕饲料对罗非鱼生长性能的影响

试验结果表明,各组罗非鱼的成活率均在90%以上,各组之间的差异并不明显,表明了油茶粕在合理的去除抗营养因子和粗纤维之后,是完全可以作为水产养殖动物的饲料。从试验的结果来看,在合适的添加比例范围内,饲料中添加油茶粕比例对罗非鱼的成活率并无明显影响。

从养殖的效果来看,5%油茶粕组比对照组增重率提高了37.01%($P<0.01$),10%油茶粕组增重率提高了39.25%($P<0.01$),15%油茶粕组增重率提高了58.56%($P<0.01$),与对照组相比差异极显著。从饲料系数上看,由于是在试验室条件下养殖,饲料系数比室外养殖偏高,但就整体而言,各组之间的差异并不明显,因此具有一定的实践意义。茶皂素是从山茶科植物中提取出来的以多糖和三萜皂甙为主的绿色天然产品,具有增强机体免疫功能,抗应激、抗氧化、改善畜禽产品品质、提高畜禽生产性能的作用。国内外有学者研究表明,低剂量的茶皂素对提高鱼类的生长有促进作用,同时还可以增强鱼类的抗病能力。Francis等(2001)在饲料中分别添加0、150、300 mg/kg的三萜皂甙,研究三萜皂甙对罗非鱼生长、代谢、产卵率及肌肉中胆固醇含量的影响,结果发现,14周后300 mg/kg的试验组增重率明显高于对照组($P<0.05$);而添加量150 mg/kg的试验组,在前3周内,其增重率高于其它2组。Francis等(2002)在鲤鱼饲料中添加0、150、300 mg/kg的三萜皂甙研究其对鲤鱼生长性能和代谢效率的影响,结果表明,在8周后,皂甙

添加量为150 mg/kg的试验组增重率(372%)与其它2组(327%和325%)相比,鱼体增重明显,差异显著($P<0.05$)。赵红霞(2003)研究表明,茶皂素饲料添加剂能够提高罗氏沼虾的增重率,而且随着未脱毒油茶粕量的增加,罗氏沼虾的增重率呈现出上升的趋势;茶皂素添加量为2 000 mg/kg时,罗氏沼虾的增重率显著高于抗生素组($P<0.01$)。本试验结果与上述结论基本一致,20%油茶粕组、30%油茶粕组均低于对照组增重,但差异不显著。油茶粕发挥其效应的原因可能有以下几点:①由于经过水浸提以后,油茶粕中仍残留有微量的茶皂素和微量的黄酮类化合物以及多糖类化合物,低剂量的茶皂素可以刺激鱼类免疫系统,提高鱼类的消化酶的活性,促进肠道的通透性,加速营养物质的吸收,促进机体营养物质代谢,对生长有促进作用,但其添加量不能超出一定的范围;而黄酮类化合物中抗菌成分较多,具有较广的抗菌谱,是一种良好的植物免疫促进剂,同时还可以影响胃肠道微生物的主要消化酶活性,改善消化功能,提高生产性能。②低剂量的茶皂素和黄酮类化合物的存在可以增强鱼类的免疫能力,使鱼类的非特异性免疫能力得到强化,抑制鱼体内的有害菌,增强鱼的活力,增强其主动摄食能力,提高饲料的利用率,这些在增重明显的试验组表现尤为明显。在增重明显的试验组,试验鱼表现出大小均匀,活力较强,主动摄食旺盛,抗病力强等特点。③在油茶粕添加量较大的20%油茶粕组和30%油茶粕组中,其增重率低于对照组,可能是因为随着油茶粕添加量的增大,同时提高了饲料中的粗纤维含量,导致鱼类肠道受到刺激,蠕动加速,致使饲料中的营养物质来不及吸收,降低了饲料的利用率,而且大量添加会降低饲料的适口性,所以增重效果较差。因此,油茶粕在罗非鱼鱼苗、鱼种期的适宜添加量为10%~15%,不宜过高。在鱼类成鱼期、虾蟹或畜禽养殖上可适当加大其用量。

3.2 油茶粕饲料对罗非鱼肉质的影响

饲养试验结束后,对各组鱼进行解剖比较,各试验组与对照组鱼的肌肉和内脏在外观上没有差别。经检测分析,与对照组相比,5%油茶粕组、10%油茶粕组、15%油茶粕组肌肉中的蛋白质含量也表现出了上升趋势,3个试验组中鱼体肌肉中粗蛋白含量分别提高了0.34、1.37和2.67个百分点,其中10%油茶粕组和15%油茶粕组与对照组相比,差异极显著;10%油

茶粕组、15%油茶粕组与对照组相比,肌肉中粗脂肪含量也出现了一定程度的上升,分别上升了1.2、1.8个百分点,5%油茶粕组与对照组相比较,差异不明显。由此我们可清楚地看到,随饲料中油茶粕添加量的增大(5%~15%),鱼体肌肉粗蛋白含量有小幅增加,同时也使鱼体脂肪含量有小幅上升,原因可能是在一定的范围内,随着油茶粕添加量的增加,鱼体内的脂肪酶活性也随之有所上升。

3.3 油茶粕饲料对罗非鱼消化酶活性的影响

试验结果表明,罗非鱼肠道蛋白酶酶活与对照组相比,5%油茶粕组无显著差异,10%油茶粕组和15%油茶粕组蛋白酶酶活均极显著高于对照组,其中以10%油茶粕组肠道蛋白酶酶活最高。这可能是导致10%油茶粕组、15%油茶粕组罗非鱼肌肉中蛋白质含量较高的主要原因,而相应的5%油茶粕组则无此种变化。在肠道脂肪酶酶活测定中,10%油茶粕组、15%油茶粕组的脂肪酶酶活极显著高于对照组,因而这两个试验组鱼体肌肉中脂肪含量明显高于对照组。同样,罗非鱼肝胰脏蛋白酶酶活和脂肪酶酶活在10%油茶粕组和15%油茶粕组中均表现出显著高于对照组。由此我们可以看出,油茶粕饲料在一定范围内的添加量确实提高了罗非鱼肠道和肝胰脏的蛋白酶、脂肪酶酶活。在对罗非鱼肠道、肝胰脏淀粉酶酶活的测定中发现,添加油茶粕饲料组罗非鱼肠道、肝胰脏淀粉酶酶活与对照组相比,虽然总体上是呈上升趋势,但没有表现出线性关系,具体原因及机理有待进一步研究探讨。

3.4 油茶粕饲料对罗非鱼消化酶活性作用的机理

鱼体消化酶活性的高低直接影响到饲料的消化利用率,要促进鱼类的快速生长,首先要保证鱼类对饲料的消化吸收,消化酶活性的提高能够加速鱼类对饲料营养物质的消化吸收。上述有关消化酶的结论与本试验油茶粕饲料对罗非鱼肉质影响的数据可以看出,消化酶活性的提高可能与添加的油茶粕饲料有关,在油茶粕中残留的低剂量的茶皂素对鱼体肠道消化酶有一定的激活作用。因为茶皂素是由有机酸、配体和多糖构成,茶皂素水解后能生成茶皂草精醇、葡萄糖醛酸、阿拉伯糖、木糖、当归酸和醋酸等物质,同时,水解过程中还会产生中间体,如茶原皂草精醇A和B等。茶皂素的多糖为亲水性基团,通过酯键与另一端疏水基团相连接,疏水基团是由酯键形式

连接貳元(即配基)和有机酸,因而具有表面活性作用,属非离子型的表面活性剂。作为表面活性剂,在饲料中势必能起到乳化剂的作用,能使饲料中的脂溶性物质在吸水后分散而形成比较稳定的乳浊液,有利于肠胃的吸收。同时,油茶粕中的茶皂素在动物肠道内有可能发挥选择性的抑菌或杀菌作用,阻碍微生物对养分的吸收,提高了养分的利用率。此外,茶皂素作为一种异物生物大分子(分子量为1 191.28),饲料中的茶皂素对动物机体的免疫系统是一种刺激,这种刺激将使动物的各种生理活动加强,提高动物的免疫机能,从而起到促生长的效果(张建东,2002)。而且,茶皂素可能对增加肠粘膜的通透性起到了一定的作用,加速营养物质的吸收,促进了机体营养物质代谢,提高了饲料的利用率,从而促进了动物的生长(Francis等,2002)。

此外,国内外的一些研究也表明,将茶皂素用作饲料添加剂能提高动物机体免疫功能、清除自由基、促进蛋白质合成和提高动物消化酶活性,从而提高畜禽成活率、生长速度和饲料转化率。它与抗生素作用的机理完全不同,因而不会诱导耐药细菌的产生,在养殖业中完全可以替代抗生素类饲料添加剂。同时,茶皂素具有抗氧化、改善肉质的作用。

综合考虑油茶粕饲料对罗非鱼生长性能和消化酶活性的影响,采用水浸提的工艺及方法提取茶皂素后的油茶粕在淡水鱼类饲料中的适宜添加量为10%~15%。

参考文献

- 1 国家统计局.中国统计摘要.北京:中国统计出版社,1992.62
- 2 殷肇君,李红权,李群芳,等.油茶粕中茶皂素的提取及纯化研究[J].饲料工业,2004,25(12):11~13
- 3 夏春华.茶籽综合利用的研究[J].茶叶科学研究简报,1982,10:214~232
- 4 李红权,殷肇君,李群芳,等.油茶粕饲料在异育银鲫养殖中的应用研究[J].饲料工业,2005,26(10):23~25
- 5 青山新次郎.日本药学杂志.1931,51(5):367
- 6 柳荣祥,朱全芬,夏春华,等.茶皂素(Theasapanin)研究现状[J].茶叶,1995,21(3):2~5

碱式碳酸铜生物效价的研究

周文艺 周安国 王之盛

摘要 试验研究了碱式碳酸铜对于仔猪的生物效价。试验选取20头4周龄平均体重7.5 kg左右DLY(杜×长×大)断奶仔猪,随机分为2个处理组,分别为硫酸铜(对照组)和碱式碳酸铜组,试验进行4周。试验结果表明,碱式碳酸铜有提高ADG、ADFI的趋势($P>0.05$);降低了仔猪腹泻率($P<0.05$)。碱式碳酸铜的绝对生物效价为30%,高于对照组6个百分点;以CuZn-SOD活性作为判断指标时,碱式碳酸铜的相对生物效价达到了120%;而以血清铜浓度和铜兰蛋白活性作为判断指标时,碱式碳酸铜的相对生物效价为102%和104%。碱式碳酸铜的生物效价优于硫酸铜。

关键词 碱式碳酸铜;生物效价;断奶仔猪;腹泻率

中图分类号 S816.7

传统的饲料工业生产中使用的微量元素硫酸盐在动物生产上存在很多问题,如硫酸分离不彻底,造成动物胃肠道溃疡;金属离子使维生素效价降低,并使饲料中脂肪氧化酸败,降低饲料营养价值。采用其它形式的微量元素来替代传统的硫酸盐势在必行,本文对碱式碳酸铜在动物生产中的营养作用作了探讨,并对其生物效价作了评定。

1 材料和方法

1.1 试验设计

试验选取20头4周龄平均体重为7.5 kg左右DLY断奶仔猪,预饲3 d后把动物随机分为2个处理组,日粮中分别添加125 mg/kg的硫酸铜(对照组)和125 mg/kg碱式碳酸铜组(处理组,铜含量53.58%),每个处理组5个重复,每个重复2头猪,试验期为4周。

1.2 试验日粮

日粮参照NRC(1998)5~10 kg体重猪的营养需要配制(见表1)。

1.3 饲养管理

试验在四川农业大学动物营养研究所试验场环控室进行。试验前清扫、冲洗圈舍,用4% NaOH溶液清洗圈舍和地面,对圈舍密闭门窗熏蒸(每立方米用25 ml甲醛和25 g高锰酸钾加水12.5 ml)24 h以上,熏蒸完后打开门窗通风换气48 h,用清水清洗地面和圈舍,冲掉地面的碱液。

周文艺,福建省新闻科生物科技开发有限公司,350008,福州市仓山区福湾工业园盘屿路852号。

周安国、王之盛,四川农业大学动物营养研究所。

收稿日期:2007-02-27

表1 试验日粮配方及营养水平

原料	含量(%)	营养水平	
玉米	60	DE(MJ/kg)	14.24
豆粕	21	CP(%)	18
膨化大豆	2.5	Lys(%)	1.19
麦麸	2.23	Met(%)	0.32
鱼粉	4	Trp(%)	0.23
乳清粉	6	Ca(%)	0.8
菜籽油	1.6	有效P(%)	0.4
CaCO ₃	0.87		
CaHPO ₄	0.5		
多维	0.05		
氯化胆碱	0.1		
食盐	0.25		
矿物添加剂	0.4		
抗生素	0.04		
HCl-Lys	0.41		
Met	0.05		

注:每千克基础日粮中含Fe 150 mg、Mn 4 mg、Se 0.3 mg、I 0.14 mg、VA 10 000 IU、VD₃ 1 500 IU、VE 60 mg、VK₃ 0.5 mg、VB₁ 5 mg、VB₂ 20 mg、VB₆ 3 mg、VB₁₂ 0.02 mg、烟酸 20 mg、泛酸 20 mg、叶酸 1.5 mg。

试验仔猪自由采食和饮水,第1周饮水为烧开冷却的自来水,每天饲喂5次(8:00、11:00、14:00、17:00、20:00),每次喂料量以吃饱后略有剩余为度。每天早晨清洗料槽和水槽,并换清洁饮水。猪舍温度保持在25℃左右,保持猪舍内清洁卫生和空气流通,每周消毒1次。试验期间,每天观察记录仔猪的采食情况、精神状况及腹泻情况,如发现腹泻立即治疗。收集余料,风干并称量。

1.4 代谢试验

在第24 d早上开始4 d的代谢试验,代谢试验开始之前12 h让仔猪禁食,第24 d早上空腹称重后开始代谢试验并收集全部粪便。粪样收集后按100 g鲜重加10%硫酸5 ml,滴加2~3滴甲苯,置于4℃冰箱保存。

1.5 测定指标

1.5.1 生产性能

平均日增重(ADG):仔猪于试验开始每周的第一天早上 7:00 空腹单个称重,计算各阶段 ADG。

平均日采食量(ADFI):以圈为单位每天结算采食量,计算各阶段 ADFI。

料肉比(F/G):根据日增重和日采食量计算料肉比。

腹泻率=腹泻仔猪头数/参试猪头数。

腹泻严重程度:以 1~5 分评选(腹泻指数 5 分法),1 分为硬粪;2 分为正常粪便(不腹泻);3 分为软粪(轻度腹泻);4 分为浆糊状粪便(中度腹泻);5 分为水状粪便(严重腹泻)。

1.5.2 血液生化指标

① 在试验结束时对试验猪进行前腔静脉采血,测定血清铜浓度、CuZn-SOD 以及铜兰蛋白活性。

② 计算沉积氮、氮表观消化率、氮表观利用率和氮表观生物效价。

沉积氮(g/d)=摄入氮-粪氮-尿氮;

氮表观消化率(%)=(摄入氮-粪氮)/摄入氮;

氮表观利用率(%)=沉积氮/摄入氮;

氮表观生物效价(%ABV)=沉积氮/(摄入氮-粪氮);

③ 测定粪中铜浓度,计算碱式碳酸铜的生物效价。

碱式碳酸铜绝对生物效价(%)=(食入铜-粪铜)/食入铜;

碱式碳酸铜的相对生物效价(%)=碱式碳酸铜的生物效价/硫酸铜的生物效价。

1.6 数据分析

试验结果用平均数±标准差表示,用 Excel 进行预处理,SPSS11.0 软件进行 t 检验。

2 试验结果和分析

2.1 碱式碳酸铜对仔猪生产性能的影响(见表 2)

表 2 碱式碳酸铜对仔猪生产性能的影响

阶段	指标	硫酸铜	碱式碳酸铜
1~2 周	ADG(g)	208.57±10.59	255.36±27.59
	ADFI(g)	322.84±21.53	356.79±9.78
	F/G	1.55±0.14	1.41±0.15
3~4 周	ADG(g)	472.85±27.39	507.14±60.61
	ADFI(g)	763.18±36.12	781.17±64.71
	F/G	1.62±0.10	1.55±0.78
1~4 周	ADG(g)	340.71±13.50	381.25±31.99
	ADFI(g)	543.01±23.75	568.98±32.72
	F/G	1.59±0.04	1.49±0.42
1~4 周	腹泻率(%)	12.32±1.36	10.11±0.89*

注:*表示差异显著(P<0.05)。

与对照组相比,1~2、3~4 周时,碱式碳酸铜提高了仔猪的 ADG、ADFI,降低了料肉比,差异不显著(P>

0.05)。从全期来看,试验组料肉比为 1.49,比对照组降低了 6.29%;在 ADG、ADFI 方面,碱式碳酸铜有提高 ADG、ADFI 的趋势;碱式碳酸铜显著降低了仔猪的腹泻率,与对照组相比,腹泻率降低了 2.2 个百分点,差异显著(P<0.05),因此,与硫酸铜相比,碱式碳酸铜可以防止仔猪腹泻。

2.2 碱式碳酸铜对氮平衡的影响(见表 3)

表 3 氮平衡试验结果

处理	硫酸铜	碱式碳酸铜
摄入氮(g/d)	198.06±1.06	200.71±1.60
粪氮(g/d)	47.87±13.05	35.41±4.51
尿氮(g/d)	39.40±1.19	36.71±3.10
沉积氮(g/d)	110.79±14.27	128.59±4.88
氮的表观消化率(%)	75.82±6.63	82.37±2.13
氮的表观利用率(%)	55.93±7.14	64.08±2.77
氮的 ABV(%)	73.56±2.94	77.78±2.02

由表 3 可以看出,在两个处理组摄入氮相近的情况下,碱式碳酸铜有降低粪氮、尿氮和提高沉积氮的趋势,但差异不显著(P>0.05),氮的表观消化率和表观利用率分别比对照组高出 6.6 个百分点和 8.2 个百分点,氮的 ABV 提高了 4.2 个百分点。

2.3 碱式碳酸铜对仔猪血液生化指标的影响(见表 4)

表 4 碱式碳酸铜对血清铜浓度、CuZn-SOD 及铜兰蛋白活性的影响

指标	硫酸铜	碱式碳酸铜
CuZn-SOD(U/ml)	153.29±12.88	184.40±7.66
血清铜浓度(mg/kg)	1.059±0.19	1.080±0.20
铜兰蛋白活性(U/l)	92.10±8.20	96.19±0.81

由表 4 可见,碱式碳酸铜组 CuZn-SOD 活性比对照组提高了 31.1 U/ml(P>0.05),在血清铜浓度和铜兰蛋白活性上两组差异不显著(P>0.05)。

2.4 碱式碳酸铜的生物效价(见表 5、表 6)

表 5 碱式碳酸铜的绝对生物效价

指标	硫酸铜	碱式碳酸铜
食入铜(mg/kg)	990.44±6.96	950.10±7.56
粪铜(mg/kg)	749.78±27.32	669.35±7.27
表观吸收铜(mg/kg)	240.66±29.32	280.75±10.63
绝对生物效价(%)	24	30

表 6 碱式碳酸铜的相对生物效价

判据指标	铜源	相对生物效价(%)
CuZn-SOD 活性	硫酸铜	100
	碱式碳酸铜	120
血清铜浓度	硫酸铜	100
	碱式碳酸铜	102
铜兰蛋白活性	硫酸铜	100
	碱式碳酸铜	104

由表 5 可见,碱式碳酸铜组在食入铜和粪铜上均少于对照组($P>0.05$),而表观吸收铜高于对照组($P>0.05$),碱式碳酸铜的绝对生物效价为 30%,高出对照组 6 个百分点。

由表 6 可见,以 CuZn-SOD 活性作为判断指标时,碱式碳酸铜的相对生物效价达到了 120%,而以血清铜浓度和铜兰蛋白活性作为判断指标时,碱式碳酸铜的相对生物效价为 102%和 104%。

3 讨论

3.1 碱式碳酸铜对仔猪生产性能的影响

在本试验条件下,碱式碳酸铜组仔猪平均日增重高于对照组($P>0.05$)。Ward(1996)也发现碱式碳酸铜有提高小母牛日增重和降低料肉比的趋势($P>0.05$),这与碱式碳酸铜和硫酸铜的物理性质有关。

铜是氧化作用的有效催化剂,可氧化饲料中不稳定物质(如维生素和脂肪),而降低饲料适口性和营养价值。硫酸铜是一种酸性盐,在水中溶解度较大,水溶性呈弱酸性,铜离子可扩散于饲料水分中,硫酸铜每一结晶表面都是氧化反应的活性部位,其氧化作用较强。目前,硫酸铜在生产应用中存在一些问题:在硫酸铜的生产过程中,金属铜和硫酸反应不完全,副产物硫酸或废铜屑的使用妨碍硫酸铜产品的适宜结晶;不适宜的干燥方法可导致化合物中游离硫酸的存在;硫酸铜研磨不适宜以及过度干燥会使动物小肠粘膜受到刺激;同时, SO_4^{2-} 还是一种致溃疡因子(周安国,2003)。这些因素都导致了目前硫酸铜在动物生产应用中效果不是很理想。本试验发现,硫酸铜组动物腹泻率较试验组高,也有部分上述原因。

与硫酸铜相比,碱式碳酸铜在水中的溶解度为 0.000 8%,几乎不溶于水,而易溶于酸,并且氧化作用较弱,对饲料中脂类物质和维生素破坏作用较小。碱式碳酸铜化学式为 $CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2$,分子中含两个 OH^- ,水溶液呈弱碱性,碱性水带负电,聚合度只有 4~6 个水分子,比一般水低 3~5 倍。周安国(2005)认为,对于动物来说,水聚合度越低,越容易通过细胞膜,转运营养物质的速度更快,动物的生产性能更好。

3.2 碱式碳酸铜对仔猪氮平衡的影响

碱式碳酸铜组粪氮排泄低于对照组,氮的表观消化率、表观利用率和 ABV 均略高于硫酸铜组。碱式碳酸铜组氮平衡状况也要略优于对照组,这可能是对照组脂类氧化产物破坏了赖氨酸和其它含硫氨基酸,并且蛋白质与脂类氧化次级产物发生交联反应,降低了动物对蛋白质的吸收。

3.3 碱式碳酸铜对血液生化指标的影响

机体在代谢过程中会产生大量超氧阴离子自由基(O_2^-),其具有很强的氧化性,极易破坏细胞核内 mRNA,并使细胞膜等结构发生脂质过氧化反应,从而对机体造成损伤。SOD 具有削弱超氧阴离子自由基破坏细胞内还原性活性成分的作用,保护细胞免受损伤(Smith, 1997; Prohaska, 1991)。本试验发现,碱式碳酸铜可提高 CuZn-SOD 活性($P>0.05$),这可能与碱式碳酸铜相对于硫酸铜有较高生物利用率有关。碱式碳酸铜组和对照组的血清铜水平没有太大差异,这与 Ward(1996)试验结果一致。在铜兰蛋白活性上,饲喂碱式碳酸铜的小母牛的血清铜水平高于对照组 ($P<0.01$)(Ward, 1996)。

3.4 碱式碳酸铜的生物效价评定

本试验发现,碱式碳酸铜对于仔猪的绝对生物效价略高于硫酸铜。Chapman(1963)也证实,肉牛对碱式碳酸铜的吸收率高于硫酸铜。在相对生物效价方面,以 CuZn-SOD 活性作为判据指标时,碱式碳酸铜的相对生物效价高于硫酸铜;以血清铜浓度和铜兰蛋白活性作为判据指标时,其相对生物效价也略高于硫酸铜,这表明对于仔猪来说,碱式碳酸铜相对于硫酸铜有较高的生物利用率。

参考文献

- 1 周安国. 现代养猪与饲料营养之间的关系[J]. 山东饲料, 2003(9): 41~42
- 2 周安国. 灰色营养饲养恩威, 四川农业大学动物营养研究所, 2005 年科技成果交流大会, 2005
- 3 Chapman HR Jr, Bell MC. Relative absorption and excretion by beef cattle of copper from various sources[J]. J. Anim. Sci., 1963, 22: 82~5
- 4 Ledoux D R, P. R. Henry, C. B. Ammerman, et al. Estimation of the relative bioavailability of inorganic copper sources for chicks using tissue uptake of copper[J]. Anim. Sci., 1991(69): 215~222
- 5 Nelson J D. Benefits of dietary copper in poultry. Proceedings of the 24th Annual Carolina Poultry Nutrition Conference, 1997
- 6 Prohaska J R. Changes in copper, Zinc-superoxide dismutase cytochrome C oxidase, glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in copper-deficient mice and rats[J]. J. Nutr., 1991, 121: 335~363
- 7 Smith J W, Tokach M D, Goodband R D, et al. Effects of the Inter-relationship Between Zinc Oxide and Copper Sulfate on Growth Performance of Early-Weaned Pigs[J]. J. Anim. Sci., 1997, 75: 1 861~1 866
- 8 Ward J D, Spears J W, Kegley E B. Bioavailability of Copper Protein and Copper Carbonate Relative to Copper Sulfate in Cattle [J]. J. Dairy Sci., 1996(79): 127~132
- 9 Zanetti M A, P R Henry, C B Ammerman, et al. Estimation of the relative bioavailability of copper sources in chicks fed on conventional dietary amounts[J]. Br. Poult. Sci., 1991, 32: 583~588

(编辑:王 芳, xfang2005@163.com)

酵母对硒元素的富集研究和改良策略

李海彬 曾礼华

硒在自然界中以无机硒和有机硒两种形式存在。与无机硒相比,有机硒具有吸收率高、生物活性强、毒性低、环境污染小等特点。有机硒可由人工合成,也可通过生物转化和生物富集等不同方式生产。目前较为广泛采用的是酵母菌富集法,即利用酵母菌对无机硒进行富集和生物有机化,生产富硒酵母。

1 富硒酵母菌种的选育

1.1 酵母菌种

目前,国际上多采用酿酒酵母、葡萄汁酵母、鲁氏酵母、阿舒接合酵母、汉逊酵母、球拟酵母、孢圆酵母、假丝酵母等中的某些酵母菌种以及米曲霉和某些担子菌作为富集硒元素的酵母载体。

1.2 选育方法

除了传统的选育方法外,出现了选育进程更快的新方法,如抗性驯化筛选、代谢调控、基因工程、原生质体诱变育种、单倍体分离和原生质体融合等选育技术。

李明春等(2000)、吴宝强等(2005)用抗性驯化筛选法选育出高生物量、高有机硒转化率和高硒含量的富硒酵母菌株。范秀英等首创将原生质体融合育种技术与亚硝基胍诱变结合,选育出细胞硒总含量分别为原始亲株的2.8倍和2.0倍的菌株。高玉荣等则运用原生质体融合和紫外线诱变结合的技术,从13株啤酒酵母中筛选出1株含硒量高的菌株。

近年来不少学者利用新型物理诱变的育种方法对酵母菌进行育种。蒋海波等采用氮离子注入法诱变选育出高产麦角醇酵母菌。李红民等(2001)和由媛等(2006)采用He-Ne激光诱变面包酵母菌(啤酒酵母),分别筛选到遗传性能稳定和发酵特性稳定的高活力

菌株。胡卫红等(2000)和蒋耀庭等(2005)分别采用CO₂激光辐照和高压静电场辅以激光进行诱变育种,获得高产乙醇酵母菌。李寅等采用代谢育种技术选育到能够很好地利用无机氮源(如氯化铵)的高产丙酮酸光滑球拟酵母菌株。在富硒酵母的选育工作上,可从上述各种方法中得到启示。

2 酵母菌对硒的富集机制

酵母富集硒元素的作用机制相当复杂,其过程一般分为胞外结合与沉积、胞内吸收与转化几个步骤。具体的富集途径有物理吸附、生物吸附、表面沉积、主动运输和被动扩散等,其中生物吸附和主动运输为富集的主要途径。

2.1 生物吸附

生物吸附是指生物体从溶液中吸附金属离子、非金属化合物或固体颗粒的过程,是一个吸附-解吸的可逆过程,被吸附的离子可被其它离子、螯合剂或酸解吸下来。其机理主要为络合与离子交换。被吸附的金属离子可与生物配位体中带负电的官能团结合而形成络合物,如氨基酸中带负电的残基可与一些金属离子产生络合物。除羧基具有较强的络合能力外,硫酸根、氨基、羟基与金属离子也存在络合现象。酵母在吸附金属离子的同时经常会伴随其它离子,如Ca²⁺、Mg²⁺、H⁺等的释放,而且释放出的离子总电荷数大致等于被吸附的电荷数。因而吸附的过程可以被看作是一个离子交换过程,随着交换的进行,使得硒离子在酵母细胞内得到富集。

2.2 主动运输

主动运输是微生物主动吸收胞外物质的一种方式,需要细胞提供能量和载体的参与,能有效地使胞外物质在低浓度下逆浓度梯度进入细胞内,从而得到富集。主动运输是一个极为复杂的过程,与酵母中的糖、脂、蛋白质、无机盐的代谢密切相关,并形成微量元素与糖、脂、蛋白质等的结合体,因此以主动运输途径富集的硒元素具有较高的生物活性。

2.3 转运系统

李海彬,四川师范大学生命科学学院,610068,四川成都市锦江区静安路5号。

曾礼华,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-03-04

通过吸收、积累的硒依靠体内的转动系统而进入菌体内部,进而转化为有机硒。Gharieb 等在对富硒酿酒酵母的动力学研究中发现,酵母菌对硒的吸收存在着两个转运系统:高亲和力转运系统和低亲和力转运系统。当硒在低浓度(0.025~0.1 mM)时,启动高亲和力转运系统对吸收的硒进行转运;当硒在高浓度(0.1~1.0 mM)时,则启动低亲和力转运系统。亚硫酸盐对上述转运系统的转运速率起促进作用,且最佳浓度为 0.5 mM。该报道还认为细胞质小液泡与酵母对硒的吸收有直接关系,是对硒解毒的作用场所。

3 硒在酵母菌体中的分布及存在形式

酵母菌吸收的微量元素有 51%与细胞壁的大分子组分紧密结合,45%左右与细胞液中的肽、氨基酸结合,少部分与可溶性蛋白质结合而转化为有机状态。硒在机体内的存在与硫元素有极大的相似性,并一般取代化合物中的硫原子,使硫化物转化为相应的硒化物,如蛋氨酸中的硫被硒取代变成硒代蛋氨酸。酵母中的硒以有机结合硒为主,主要包括含硒酶、含硒蛋白质及含硒多糖类等。

铁梅等(2006)、杨林生等(1995)研究发现,酵母中的硒大部分通过共价键结合的方式以硒多糖、硒蛋白和硒代蛋氨酸等生物有机分子形式存在,很少以游离态存在。Zhil'tsova 等研究发现,在假丝酵母中富集的硒主要存在于细胞壁(16%~20%)、膜结构(约 32%)、胞质氨基酸片段和可溶性蛋白(共约 50%);分别约有 1%和 70%的硒以有机硒的形式存在于脂质和蛋白质(或氨基酸)之中,有 27%的硒以无机硒形式存在。Yoshida 等测得富硒酵母中的硒有 74.8%以硒代蛋氨酸、9.9%以硒代半胱氨酸、5.1%以亚硒酸盐的形式存在,但有 10.2%的硒以未知形式存在。Schrauzer(2006)、Rayman 等(2004)、Reyes 等(2006)、Dumont 等(2004)研究都发现,酵母富集的硒主要以硒代蛋氨酸形式存在。Chassaigne H 等(2002)测得富硒酵母中的小分子硒是以硒代半胱氨酸、硒代蛋氨酸、硒酸盐和亚硒酸盐的形式存在。Połatajko 等(2004)研究发现,在细胞壁上硒的存在形式主要为硒代蛋氨酸。

Infante 等(2004)、Block 等(2004)报道了硒在富硒酵母中还以一种称为硒-甲基硒代半胱氨酸的新形式存在。García-Reyes 等研究也发现,硒还以含硒腺嘌呤的新形式存在于富硒酵母菌体中。Lindemann 等则发现,硒还以硒谷胱甘肽和硒半胱氨酰甘氨酸的形式存在于富硒酵母中。

4 影响酵母富集硒的因素

4.1 硒浓度

培养基中硒的浓度对微生物的生长及其对硒的转化率有极大的影响。低硒浓度下菌体中的硒含量随培养基中硒浓度的增加而增加;但当硒含量达到一定浓度时,菌体的生物量和对硒的转化率则随着硒浓度的增加而降低。因此,通常将硒源分批添加至培养基中,不但可避免在发酵初期高浓度的硒对菌体分裂繁殖的影响,而且还有利于菌体对硒的富集。

李爱芬等在啤酒酵母发酵开始后第 2~11 h 内采用流加的方法逐渐加入亚硒酸钠,所得酵母细胞中硒浓度可达到 1 900 $\mu\text{g/g}$ 以上。陈敏等通过上罐发酵研究发现,在培养 30 h 后进行定时加入 Se^{4+} ,得到的干酵母总硒含量较摇瓶发酵所得的要高, Se^{4+} 转化率达 84.71%。Demirci 等在糖蜜啤酒酵母富硒中,对一次性和分阶段添加硒酸钠及添加量进行对比试验发现,在两种方式中,低添加量(31.6 g/l)的产物生物量和含硒量都比高添加量(63.2 g/l)的高。

发酵初期为微生物的增殖阶段,而中后期主要是产物的积累阶段。酵母细胞在对数期吸收硒的能力显著高于其它生长阶段,并随着细胞的增殖富硒能力增强,以后随稳定期的接近而逐渐减弱,故硒的添加方式采用分期添加为好。

陈福生等研究发现,在发酵过程中过早或过迟地添加硒源都不能得到理想的富硒酵母,而在第 5、8、11 h 分别添加 10 mg/l 的亚硒酸钠,生物量和富硒效果都比较好;硒的每次添加量高于 20 mg/l 发酵液时,对酵母菌的生长有明显的抑制作用;但当低于 20 mg/l 发酵液并在发酵的中后期逐步增加硒的添加量时,所得产品中硒的含量较高。陆建安等在酵母发酵初期使硒浓度保持在较低水平(约 7 $\mu\text{g/ml}$),当对数生长期来临时,再提高硒浓度至 25 $\mu\text{g/ml}$,结果成品酵母中有机硒含量达 90%以上,且生物量提高 15.2%。Suhajda 等在啤酒酵母的对数期添加 30 mg/ml 的亚硒酸钠,可得到含硒量 1 200~1 400 $\mu\text{g/g}$ 的干酵母。Poncede 等在啤酒酵母生产 L-硒代甲硫氨酸时指出,最佳方式是在生长期添加低浓度(10~20 mg/kg)的亚硒酸钠。

4.2 培养基

天然培养基与合成培养基相比,除了同样为酵母菌提供营养之外,还含有一些促生长因子之类的物质,并且成本低。麦芽汁培养基为较好的天然培养基。王凤琴通过试验比较发现,麦芽汁培养基比合成培养基效果好,酵母产量与硒富集量都高,故可选择麦芽汁培养基作为种子和发酵培养基。江澜等综合比较 3 种培

培养基,发现选择麦芽汁培养基较为适宜。

4.3 发酵培养时间

培养时间太短会导致菌体数量过低,产物生成量不足;太长则会导致菌体的死亡,同时对产物的生成产生抑制作用,而且还会增加成本。李明春等分别对培养 48、60、72 和 84 h 的酿酒酵母培养物进行了比较发现,随着培养时间的延长,菌体含硒量随之下降,但是当延长培养至 84 h 时,硒含量有一个迅速的回升,而且超过 48 h 时硒含量的一倍。但考虑到最后的菌体浓度和成本,认为培养时间选择在 48 h 终止发酵较为合理。柴丽红研究发现,培养 25 h 时啤酒酵母有机硒含量及硒总含量最高。范秀英等(2003)在糖蜜培养基中对菌株 ZFF-28 培养 25 h,硒总含量最高。

4.4 接种量

接种量的多少影响着菌体的生长繁殖速度。接种量多使菌种移到发酵瓶后容易适应,而且种子液中还含有大量体外的水解酶类,有利于对原料的利用,但是过多的接种量使菌体生长过快,造成基质缺乏或溶解氧不足而不利于菌体的繁殖;而过少则可能导致发酵周期延长,菌体生长较慢。陆建安等(2004)、柴丽红等(2006)综合接种量对啤酒酵母的生物量及硒含量的影响发现,接种量选取 10% 为佳。吴宝强等在蔗糖培养基中对啤酒酵母进行摇瓶培养中也发现最适接种量为 10%。

4.5 温度和培养基 pH 值

酵母菌的生长随着温度和 pH 值的不同而出现不同的适应性。在较低温度时生长相对比较缓慢,在较高温度时生长几乎停止,而在 28 ℃ 左右较适合酵母的生长;在较低 pH 值条件下酵母菌生长相对比较差,在较高 pH 值条件下菌体几乎停止生长,而 pH 值在中性偏酸时较适合酵母的生长。朱蕴兰等(2006)研究发现,在温度为 28 ℃、pH 值为 5 时液体活性酵母的有机硒转化率最高,为 80.6%。吴宝强等在对啤酒酵母进行摇瓶培养中得到最适温度 30 ℃、初始 pH 值为 4.0。范秀英等(2003)研究发现,在糖蜜培养基中温度为 28 ℃、pH 值 6.0~6.5 对菌株 ZFF-28 富硒最适合。

4.6 氧含量

酵母菌是兼性厌氧菌,其生长以有氧生长为主,培养基中氧的溶解度影响其产量和富硒效果。Suhajda 报道,培养基的氧含量是影响啤酒酵母富集硒的重要因素。培养基中氧的含量可通过改变搅拌速度、通气量、装液量和摇瓶的转速来调节。李明春等研究发现,在 500 ml 三角瓶中培养 NK2 菌株时,通气量越大,菌

体含硒量越高。吴宝强等研究报道,在啤酒酵母富硒摇瓶培养中,一定范围内随着转速的增加,溶氧量也在增大,但转速超出该范围后,溶氧量反而会降低,并确定最适转速为 200 r/min。范秀英等(2003)研究发现,在糖蜜摇瓶培养中,当 250 ml 三角瓶装液量为 50 ml 时细胞硒总含量达到最高。柴丽红等在对啤酒酵母富硒培养中发现,在 200 r/min 的转速下,当 250 ml 三角瓶装液量为 60 ml 时,硒总含量达到最高值。李爱芬等在 5 L 发酵罐中所做的啤酒酵母富硒试验采用分阶段调节通气量、搅拌速度的培养方法,在延迟期搅拌速度为 250 r/min,通气量为 253.34 kPa;进入对数生长期后分别提高到 500 r/min 和 354.6 kPa,得到高硒质量分数的富硒酵母。

4.7 硒源

酵母菌对不同的硒源具有不同的吸收同化能力,亚硒酸钙是较理想的硒源。黎星术等研究发现,亚硒酸钠、亚硒酸钙、亚硒酸钴均可作为硒源生产饲料硒酵母。啤酒酵母对亚硒酸钙有较好的同化吸收作用,亚硒酸钙性质稳定、毒性低,使用和管理都较亚硒酸钠方便。邝光荣等发现,酵母菌对亚硒酸钙、亚硒酸钠、二氧化硒等多种硒源的有机转化率不同,其中亚硒酸钙作为硒源具有毒性小、可转化率高的优点。

各种因素对酵母产品的生物量及硒含量的影响是不同的,且不同研究者得出不同结果,这与研究者所采用的研究方法、菌种、原材料和培养条件等因素的不同有关。柴丽红等(2006)、陆建安等(2002)发现,对啤酒酵母富硒性能影响最大的因素是硒添加量。Suhajda 等报道,培养基的 pH 值是影响啤酒酵母富集硒的最重要因素。

5 酵母富集硒的研究现状

国外从 20 世纪 70 年代就开始进行富硒酵母的研究,现在许多国家和地区均有富硒酵母作为食品添加剂和药物出售。Demirci 等在含有微量硫和蛋氨酸的培养基中进行连续发酵培养富硒啤酒酵母,当以 0.2 g/h 的稀释速率和 0.28 g/l 的浓度添加硒酸钠时,可得干菌体生物量为 0.76 g/l 和干菌体硒含量为 687 μg/g。Suhajda 等利用啤酒酵母进行富硒研究,得到含硒量 1 200~1 400 μg/g 的干菌体,其体内的无机硒含量下降了 5%~6%。Demirci 等在比较一次性和分阶段不同方式添加硒源中,分别获得生物量 37 g/l、含硒量 2 846 μg/g 干菌体和生物量 45 g/l、含硒量 2 495 μg/g 干菌体的富硒啤酒酵母。

我国在这方面的研究虽然起步较晚,但却取得了

一定的成绩。王岁楼对活性干酵母进行摇瓶发酵生产,获得酵母体干重、有机硒含量和硒转化率分别可达 15.8 g/l、790.0 $\mu\text{g/g}$ 和 83.2% 的富硒酵母。高玉荣等筛选出富硒量为 821 mg/kg,酵母干菌体收获量为每 100 ml 的啤酒酵母菌 0.88 g。陈福生等采用不同添加时间和添加量分多次添加硒的培养方式,可得到干菌体中硒含量达 1 895 $\mu\text{g/g}$ 的富硒酵母。李爱芬等采用 5 L 发酵罐啤酒酵母富硒试验中,所得酵母的硒含量为 1 900 $\mu\text{g/g}$ 以上,酵母细胞对硒离子的利用效率是 50% 以上。柴丽红等获得硒含量达 920.3 $\mu\text{g/g}$ 、硒总含量达 4 038.7 $\mu\text{g/l}$ 的啤酒酵母,富硒效果较好。陈敏等研究了啤酒酵母的上罐发酵培养,所得到的干酵母总硒含量较摇瓶发酵所得有所提高,达 3 158.53 $\mu\text{g/g}$, Se^{4+} 转化率达 84.71%。吴宝强等选育出的富硒啤酒酵母生物量达到 10 g/l、硒含量超过 1 500 $\mu\text{g/g}$ 、硒总含量超过 15 000 $\mu\text{g/l}$,其中有机硒含量超过 90%。范秀英等运用全新育种技术——原生质体融合育种技术,选育出生物量可达 8.2 g/l、硒含量达 2 050 $\mu\text{g/g}$ 、硒总含量达到 16 810 $\mu\text{g/l}$ 、有机硒含量占细胞硒含量的 91% 以上的富硒酵母。

6 存在问题与改良策略

6.1 富硒酵母的生产

目前关于酵母菌体富集硒元素的研究主要集中在制造方法、应用技术方面,对于富集机理方面也有报道,还存在着许多不足和空白,该方面的相关研究亟需加强;富硒酵母的产品中,还含有一定量的无机硒,应通过条件优化,进一步降低其含量,提高有机硒的含量,以更好地指导生产。由于生物机体的复杂性,体内的硒含量和化学形态的稳定性能难以达到较理想的状态。因此,在富硒酵母生产研究中,对其相关的应用理论和机理研究应加强投入。

6.2 菌种的选育

从国内外的研究看,自然筛选所得的菌种在生产中普遍存在着菌体生物量和硒含量的矛盾,即菌体硒含量高的,其生物量不高;而生物量高的,其硒含量却较低。而通过原生质体融合技术等新育种技术选育出的菌体在生物量和硒含量上都能同时得到显著提高,分子生物学的发展和应用,加快了育种的工作进程。如果能鉴定并克隆与富硒能力相关的基因,那么可通过基因工程培育具有稳定遗传性的高富硒能力酵母菌株。Eide 等最近研究发现,基因 YDR065W 与酵母

菌对微量元素(包括硒)的吸收功能有关。因此,应着力开发研究新的、高效的育种技术,以筛选硒富集量高、生产周期短、产量高的菌株。

对菌种的选育目前大多是在常用的菌种范围内进行筛选,这样就在一定程度上限制了菌种类别的多元化和育种工作的进展及成果的提高程度。因此,以后的育种工作应扩大菌种的来源,促使其多元化,在菌种源头上提高酵母对无机硒的富集转化能力,在育种上提高有机硒的产量。

在对微量元素的富集研究中,绝大多数都是富集单一元素,同时富集不同元素的报道极少,这就使得所产富集酵母的元素营养价值比较单一,因此,下一步的育种工作应向选育出能同时高效富集多种元素的菌种方向发展,以提高酵母的元素富集价值和元素营养价值。

现代工农业生产中产生的废弃物往往含有大量的无机元素,直接排放既浪费又对环境造成污染。育种工作可从这个角度出发,选育能在各种相应的工业废弃物中生长并富集其中无机元素的适宜菌种,可达到利用资源又环保的作用。自然界中某些无机元素大量地存在于某些极端环境中,菌种的选育工作也可从这一方面出发,选育能在极端环境中生长并对无机元素进行富集作用的适合菌种,以满足生产的需要。

(参考文献 43 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

征订启事

欢迎订阅 2007 年《饲料工业》

本刊为半月刊,大 16 开本,每期正文 64 页,公开发售,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

锌的营养作用及鸡对锌需要量的研究

周秀霞

锌是动物机体所必需的微量元素之一,是迄今为止发现的动物必需微量元素中功能最多的一种。近年来,锌的重要性进一步被认识,并以饲料添加剂的形式在畜牧生产中得到了广泛的应用。饲料中锌盈缺及其平衡状况,不仅会影响畜禽生产效率及饲料利用率,而且会影响畜禽产品中锌元素的含量,从而影响人的健康。随着营养学研究的深入和检测技术的改进,有关锌的营养作用和功能研究越来越深入,其在生产中的应用将会有更广阔的前景。

1 锌在动物体内的分布及在饲料中的含量

锌广泛分布于动物体内的所有组织中,在前列腺、精液、眼睛中的含量最高,其次是骨骼、肝脏和皮毛,其它组织的含量较少。各种动物组织器官中的锌含量差异不大,但随着动物年龄、性别和所采食的饲料锌浓度的变化而有所不同。哺乳动物和禽类体内含锌量在 10~100 mg/kg,平均 30 mg/kg,其中骨骼肌中的锌约占体内总锌量的 50%~60%,骨骼中的锌约占总锌量的 30%,其它组织器官中含锌较少,皮、毛中的锌随动物种类不同而变化较大。成年动物血液中锌分布为:红细胞中约占 75%,血浆中 22%,血清锌可作为动物体内锌营养状况的标识;肌肉中锌含量因其色泽及功能活性不同而异。蛋中锌含量也受饲料锌水平的影响。

植物性饲料中广泛存在锌元素,但其锌含量受土壤条件、作物品种、饲料调制期、施肥状况等影响,一般含锌量随植物成熟而降低,幼、嫩植物的含量较高。按干物质计算,每千克青饲料平均含锌量约 30 mg/kg,小麦、燕麦和大麦中含 30~40 mg/kg,玉米秸秆中含 6.52 mg/kg。蛋白类饲料如大豆饼、芝麻饼、棉籽饼和花生饼含锌量比禾谷类籽实高,一般在 50~70 mg/kg。动物性饲料含锌量比植物性的高,其中鱼粉的含锌量最高。通常配合饲料中的原料能提供给动物体所需要的锌,但由于锌的吸收率很低,必须超量添补才能满足其生理需要。

2 锌在动物体内的代谢及影响因素

周秀霞,山西农业大学,030801,山西农业大学 333 信箱。
收稿日期:2007-03-21

2.1 锌的吸收

锌的吸收部位因畜种不同而有所不同,在单胃动物中,锌主要在小肠远端吸收;在反刍动物中,约有 1/3 的锌在真胃吸收;其余大部分动物,锌主要在小肠吸收。鸡对锌的吸收始于腺胃,而以小肠吸收量较大,其中尤以十二指肠吸收最强。被机体吸收的锌与血液转运蛋白结合,通过血液循环运送到肝脏和其它组织。机体对锌的稳恒态控制主要通过调节吸收来完成。当机体吸收时,胰腺分泌一种锌结合蛋白,这种蛋白在肠道内与锌结合形成复合物,然后通过肠道绒毛膜到达上皮细胞,当机体内缺锌时,金属复合物释放出锌,并进入血液循环中到达各组织发挥作用。当机体内的锌过量时,锌则与金属复合物结合储存于肝脏中,在需要时被释放出来供机体利用。

2.2 锌的排泄

在正常情况下,锌主要经粪排泄,粪中锌大部分是未被吸收的外源锌,还有一小部分是由消化道分泌的内源锌,这些锌随着胰液和肠液通过肠道排出,随尿排出的锌很少。另外,通过汗液、乳汁、脱落的头发也排出一部分。蛋鸡还可经蛋排出部分锌。

2.3 影响锌利用的因素

许多因素影响锌的利用,如各种生理应激、疾病、环境变化和饲料组成等均会影响锌的代谢。据报道,高钙饲料(尤其是单胃动物、家禽和鱼类饲料)常导致锌缺乏症,钙不仅影响锌的吸收,而且还影响锌在体内的分配。当饲料中糠麸比例过大,引起植酸盐增多时,锌与植酸结合,并与钙形成难溶的钙-锌-植酸复合物,阻碍了锌的吸收。其它元素如磷、铜、铁等与锌存在着颉颃关系,锌与这些元素的竞争会降低其生物利用率。高蛋白能增强机体对锌的吸收、贮存和代谢。维生素 A、D、E 和 B 也能促进锌的利用。

3 锌在动物生产中的作用

3.1 锌与动物生长

锌是 40 种金属酶的组成成分,200 多种酶的激活因子,它参与碳酸酐酶、DNA 聚合酶、碱性磷酸酶、胰腺羧基肽酶、乳酸脱氢酶等重要酶的合成,并与核酸及蛋白质的合成密切相关,因此它能影响细胞分裂、生长和再生。锌促进幼年动物的生长发育除了通过组成各种含锌酶以外,还能参与激素的合成及作用,锌

还是胰岛素的组成成分。动物缺锌时表现出生长发育受阻的症状,这主要是由于胸腺激酶活性降低,削弱了DNA合成与细胞分裂的能力。

3.2 锌与骨骼和皮肤

锌与骨骼的发育有密切关系。缺锌可引起胃和血液中碱性磷酸酶活性降低,改变骨的钙化作用,致使骨密度下降,生长减弱。Ott(1965)报道,饲喂缺锌日粮的犊牛和羔羊呈拱背站立,四肢集拢,后肢呈内弧弯曲状态。生长家禽缺锌时发生一种特有的“骨短粗症”,缺锌雏鸡长骨的成骨细胞活性降低,同时软骨形成变慢,软骨基质增多。缺锌可能直接或间接地抑制原始软骨细胞的分裂,影响软骨细胞的成熟和分化,进而影响骨的矿化及成骨潜能的激活。钟永安等对雏鸡进行试验发现,缺锌组鸡股骨髓软骨的原发层极显著地薄于对照组,近乎消失;而肥大区却显著地厚于对照组;钙化区与对照组无显著差异。动物缺锌时被毛粗乱并伴有不同程度的脱毛,严重时被毛成片脱落,直至脱光;口鼻四周皮肤发生损害,尤其后肢膝部以下更为明显;雏鸡、小火鸡生长不良,并常发生皮炎。

3.3 锌与味觉和食欲

补锌可以改善机体消化机能和食欲,其作用机制可能是锌与唾液蛋白形成味觉素,通过味觉影响口腔粘膜上皮细胞的结构和功能。缺锌时,口腔粘膜增生,角质化不全,造成食物与味蕾接触受阻;同时,核酸、蛋白质的分解和消化酶的活性降低,味蕾的结构和功能发挥受到影响,这可能是食欲下降的原因之一。

3.4 锌与遗传

由于锌是许多酶的组成成分,缺锌可能会影响某些氨基酸和蛋白质的合成。研究表明,大鼠缺锌时肝中DNA的合成受到破坏,睾丸的总蛋白质和RNA含量减少;严重缺锌时大鼠睾丸中锌、RNA和DNA含量比对照组的低,而非蛋白氮水平和核酸活性较高。Rubin(1973)在培养鸡胚细胞和哺乳动物细胞时,证实DNA合成过程中需要不断地提供锌。由此可见,锌对蛋白质的生物合成和遗传信息的传递具有间接的影响。

3.5 锌与内分泌

锌对内分泌的结构和功能、激素代谢以及靶细胞的生理活动有影响。迄今为止,已知与锌有关的激素有胰岛素、胰高血糖素、生长激素、性激素和促肾上腺皮质激素等。锌还是肾上腺皮质激素的固有成分,富集于垂体、性腺,参与垂体-肾上腺、垂体-甲状腺及垂

体-性腺系统的调节。张春善等(2000)研究表明,饲喂高锌日粮使肉仔鸡体内胰岛素的浓度明显升高。

3.6 锌与脑行为

锌在脑中的分布是不均一的,以边缘系统、皮质部、扣带回、齿状回和海马结构中含量较高,尤以海马结构和大脑皮层含量最高,而这两者与行为功能密切相关,因此锌在脑中的分布反映其在调节行为功能方面的重要作用。谢良民等报道,缺锌鼠小脑、纹状体、下丘脑一氧化氮复合酶活性显著降低。锌对脑中的一些功能蛋白有积极的调节作用,如脑中的金属硫蛋白(Metlothionein,MT)浓度明显受脑中锌含量的影响。

3.7 锌与免疫

据报道,动物缺锌引起免疫器官如胸腺、淋巴结、脾脏等发生萎缩,外周淋巴细胞减少、T淋巴细胞功能减弱,从而导致机体免疫能力降低,而补充锌则使其机能得以恢复正常。Beisel认为,动物受感染时,体内锌的重分布和调整有助于机体抗御感染,肝对锌的摄取量的增加,能使其机能更好;血液含锌量减少,更有利于机体吞噬细胞的抗菌作用。吕广宙等试验发现,给犊牛、绵羊补锌可提高血清淋巴细胞 α -醋酸萘酯酶阳性率和外周血淋巴细胞转化率。细胞内锌浓度对巨噬细胞活力和嗜中性白细胞的杀菌能力起决定性作用;锌还能诱导B细胞分泌免疫球蛋白而起抑菌作用。在胎后期或幼年期缺锌对淋巴器官生长的抑制程度远大于对其它器官生长的影响。在怀孕期由于缺锌导致的免疫缺陷可持续3代。张日俊等报道,锌对家禽的免疫系统发育及功能具有重要的调节作用,在配合饲料中添加锌,可以维持正常的免疫功能和抗病力。

3.8 锌与繁殖

锌通过影响性腺活动和性激素的分泌而对动物的性器官正常发育、性机能的正常发挥等表现出重要的生理意义。锌缺乏时,会影响生殖器官的生长发育及第二性征的形成,致使性成熟延迟,性机能障碍。产蛋鸡缺锌会造成卵巢、输卵管发育不全,产蛋量和蛋壳品质下降。王金法(1995)等通过试验发现,饲料中铜、锌、锰、硒对提高肉鸡繁殖性能和血液中生殖激素浓度有影响,当4种元素混合后,均可促进睾酮、雌二醇和孕酮的分泌,提高其在血浆中的浓度。

3.9 锌与禽类生产

锌对家禽的生长发育及维持健康状况有显著效果。补锌可促进仔鸡的生长发育。在肉用仔鸡饲料中

添加锌,血清和肝脏中的乳酸脱氢酶和碱性磷酸酶活性均随饲料中锌水平的提高而升高,鸡正常生长发育所需要的锌量高于家畜。生长鸡缺锌会出现生长缓慢、腿骨粗短、皮炎等症状,严重缺锌时约有 50% 的胚胎发生缺损;在蛋鸡饲料中添加蛋氨酸锌能提高产蛋量,并有利于减轻蛋鸡遭受到的饲料性应激,同时还能维持蛋壳质量,但饲料中锌水平过高也会对鸡体产生危害。

锌参与糖类、脂类、蛋白质和核酸等物质代谢过程,对家禽的生长发育和生产性能有重要作用。张桂芝(2001)应用不同水平锌对蛋雏鸡进行试验,结果表明,饲料中锌的添加量为 120 mg/kg 时能促进雏鸡的生长和发育;在试验锌添加水平范围内,耗料量、羽长和胫骨长有随锌添加量的提高而增加的趋势。李魁等(1995)报道,在仔鸡饲料中添加 20、40、60 和 100 mg/kg 的乳酸锌,仔鸡增重提高了 3.0%、4.67%、5.6%、6.9%。

Roberson(1960)、Stahl(1989)和 Stevensox (1987)等研究表明,蛋鸡饲料中添加锌量为 1 000~2 000 mg/kg 时不会出现中毒症状,4 000~6 000 mg/kg 时生产性能下降。曹盛丰等试验表明,饲料锌与血浆锌、蛋黄锌及肝锌、血浆锌与蛋黄锌及肝锌,饲料铁与血浆铁、肝铁及蛋黄铁,血浆铁与肝铁、蛋黄铁均呈强正相关,提示通过饲喂高锌、高铁饲料可以大幅度提高蛋中锌、铁含量,产蛋母鸡是饲料中锌铁向蛋中转运的良好载体。

研究家禽锌的需要量时,应考虑不同的饲料组成、不同的品系、依据的标准和评定指标以及不同锌源和利用率所造成的影响。以传统方法评定,得出蛋鸡锌的需要量为 30 mg/kg,而根据产蛋成绩测出采食高钙谷类饲料的 27~75 周龄产蛋鸡的锌需要量为 60 mg/kg。但是,为了避免亚临床锌缺乏的发生,微量元素营养需要的研究日趋需要更为敏感的生理生化、基因表达方面的指标,所得结果往往高于传统方法评定的结果。一般基础饲料中含锌量较低,不能满足鸡的营养需要,而添加适量的锌能提高鸡的生产性能。

参考文献

- 1 单安山. 微量元素的生物学功能和鸡对锌的营养需要量 [J]. 东北农学院学报, 1987, 18(3):265-271
- 2 刘学剑. 微量元素锌的生物学功能及其应用进展 [J]. 饲料工业, 1995, 16(8):29-31
- 3 张革. 生命元素锌与动物营养[J]. 粮食与饲料工业, 1994(2):19-23

- 4 瞿明仁主编. 饲料添加剂应用手册[M]. 江西科学出版社, 2000
- 5 何玉琴. 鸡蛋增锌研究[J]. 甘肃农业大学学报, 1997, 32(3):247-25
- 6 杨建英,张勇法,王月影,等. 微量元素在动物生产中的应用研究[J]. 河南畜牧兽医, 2002, 23(5):10-11
- 7 赵国芬,郑家茂. 在猪饲料中添加锌的研究进展 [J]. 中国饲料, 1998(23):19-20
- 8 韩新燕,郭勇. 微量元素锌与动物营养[J]. 饲料博览, 2000(10):14-15
- 9 刘雨田,郭小权. 微量元素锌的营养学研究进展 [J]. 饲料博览, 2000(5):14-15
- 10 杨凤主编. 动物营养学(第二版). 中国农业出版社, 1993
- 11 甲梁轩,刘福柱,沈伟. 锌的生物学作用及其在畜牧业中的应用 [J]. 内蒙古畜牧科学, 2000, 21(4):23-25
- 12 韩海军. 锌与动物营养[J]. 河南畜牧兽医, 2000, 12(2):11-13
- 13 余冰,陈代文,张克英. 猪的锌营养[J]. 饲料博览, 2000(12):23-25
- 14 王余丁,赵国先,卢艳敏,等. 微量元素锌与畜禽营养研究进展[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(1):110-114
- 15 韩新燕. 锌营养作用的研究[J]. 中国饲料, 2001(14):19-20
- 16 彭西,崔恒敏. 禽类缺锌症的研究进展[J]. 山东家禽, 2002, 8:45-47
- 17 仲飞,李秀锦,马建军,等. 猪和鸡不同部位肌组织铜锌铁含量分析[J]. 营养学报, 1996(2):228-230
- 18 何正芳,吴浩然. 有机和无机微量元素金属络合物对猪禽生产的作用[J]. 猪与禽. 1993(1):12-14
- 19 马云雪. 饲料锌水平对肉用仔鸡营养和代谢的某些影响[J]. 中国畜牧杂志, 1997(4):30-32
- 20 吕广宙. 生命元素——锌营养研究进展[J]. 山东畜牧兽医, 1994, 7(1):33-35
- 21 蒋与刚. 微量元素对金属硫蛋白基因表达的调控[J]. 国外医学地理分册, 2001, 22(4):145-147
- 22 吕广宙,陆治年,丁小明. 低锌日粮补锌对断奶前后犊牛免疫机能的影响[J]. 畜牧兽医学报, 1995, 26(3):207-213
- 23 张日俊,周毓平,黄燕,等. 锌对肉用仔鸡免疫器官生长发育及免疫功能调节作用的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1999, 30(6):504-512
- 24 张桂芝,黄保华,石天红,等. 锌在蛋雏鸡上的应用效果研究[J]. 山东农业科学, 2001, 5:36-37
- 25 武秀云,朱玉琴. 肉仔鸡微量元素锌需要量的研究[J]. 饲料博览, 1995(5):7-9
- 26 曹家银,罗绪刚, S. R. Davis, 等. 以组织锌、金属硫蛋白及其基因表达指标评价肉仔鸡对锌源的相对生物学利用率 [J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(3):227-231
- 27 家禽营养需要(第八版), 农业出版社, 1984
- 28 苏琪,段玉琴,刘金旭,等. 我国畜禽饲料中微量元素锌含量的调查研究[J]. 中国农业科学, 1994, 27(2):83-88

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

胰岛素样生长因子-I的生物学功能 及在畜牧业中的应用前景

和玉丹

下丘脑-GH-IGF-I轴是一个重要的体内分泌代谢轴,对生长发育的调控贯穿动物的整个生命过程。自 Sallmon 和 Daughaday 首次发现并报道这一与生长激素密切相关的因子以来,人们对胰岛素样生长因子-I (IGF-I) 的研究方兴未艾,不仅对胰岛素生长因子(IGFS),而且对 IGF 受体(IGFR)、IGF 结合蛋白(IGFBP)以及 IGFBP 酶也越来越关注。而大量研究表明,出生后生长激素(GH)对动物生长的调节作用是由 IGF-I 介导的,体内外试验也证明,IGF-I 具有促进组织生长和参与组织代谢活动的作用。而重组 IGF-I 生物制品的出现,又为其在疾病诊断和治疗方面的研究开辟更为广阔的空间。

1 IGF-I 分子生物学结构

1.1 IGF-I 的结构特点

IGF-I 是由 70 个氨基酸组成的单一肽链,分子量为 7 650 kD,IGF-I 的一级结构首先是由 Rinderknecht 等(1978)阐明的,IGF-I 与胰岛素原高度同源,IGF-I 含有 A、B、C、D 4 个区域,其中包括 3 个链内二硫键。IGF-I 基因位于第 5 号染色体上。目前,多数哺乳动物的 IGF-I 蛋白序列和 cDNA 序列都已经确定,牛和猪的 IGF-I 和人的相同,绵羊的 IGF-I 和人的有一个氨基酸不同,大鼠和小鼠的有 3~4 个氨基酸不同。说明 IGF-I 具有高度的同源性和保守性,这就证明了 IGF-I 对机体生长发育的重要性。

1.2 IGF 受体

IGF 受体根据其其与 IGF-I 和 IGF-II 亲和力的大小以及是否能识别胰岛素而分为 IGF-I 型受体和 IGF-II 型受体。I 型受体是寡聚蛋白,由 2 个 α 亚基和 2 个 β 亚基组成,各亚基间以二硫键连接,其主要与 IGF-I 结合,化学结构和胰岛素受体相似,与胰岛素有交叉反应,可以发挥类胰岛素的作用。I 型受体在细胞内与酪氨酸激酶相连,当 IGF-I 与之结合后可以激活酪氨酸激酶,使酪蛋白磷酸化,从而促进细胞的增殖分化,在许多组织和细胞中均发现有 IGF 的 I 型受体,这

说明 IGF-I 的作用非常广泛。而 IGF-II 受体和 I 型受体结构完全不同,它是一条直链的单体蛋白,分子中无二硫键,与胰岛素无交叉反应。胰岛素与 II 型受体结合,通过 G 蛋白的信号传导通道发挥其生物学效应。

1.3 胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)

目前已发现 IGFBPs 家族有 6 位成员,即 IGFBP (1~6),它们基因结构相似。但血液中 75%IGF-I 都是与 IGFBP3 及酸不稳定亚单位(ALS)结合形成 150 kD 复合物,构成 IGF-I 的储备库,参与血液循环;IGF-I 和其余的 IGFBP 结合成 50 kD 的小复合物,穿越小血管和毛细血管,进入组织。IGF-I 与 IGFBP 结合后可延长其半衰期,对 IGF-I 在机体内的稳定起重要作用,并且可阻止其与受体结合,抑制 IGF-I 发挥生物学作用。因此,IGFBP 不仅可以调节 IGF 与其受体结合,还可以协助 IGF 在血管内的跨管壁运输,将 IGF 运送到特定的靶细胞;其浓度可以直接改变 IGF-I 的转运,改变其在组织和血液中的分配。

2 IGF-I 的分泌特点

IGF-I 主要存在于血液中,它以内分泌为主,也可进行自分泌和旁分泌。许多组织都可以表达 IGF-I mRNA,但血液中大部分的 IGF-I 来自肝脏,约占总量的 90%。一般认为 IGF-I 是作为 GH 发挥促生长效应的一种介质,它主要依赖于 GH,GH 与肝脏上 GH 受体结合后经过一系列生化反应诱导肝脏产生 IGF-I。有人认为 IGF-I 在出生后才作为促生长的介质促进动物的生长发育。但 Julie Baker 等研究却发现,IGF-I 在胚胎期也有促生长的作用,但这种作用不是来自于 GH。经放射免疫分析法可在 45 d 猪胎儿的血液检测到 IGF-I,而且胚胎期 IGF-I 分泌有脉冲式释放的倾向,出生后是连续分泌,这说明胎儿和母体的 IGF-I 分泌是相互独立的。

有研究表明,不同品种和不同性别猪发育过程中血液的 IGF-I 水平变化趋势基本一致,即胚胎期低,出生后高。胚胎期随胎龄的增加,IGF-I 水平升高,出生后随年龄、体重的增加,IGF-I 水平也上升,但不同性别和品种猪血液中 IGF-I 水平还是有很大差别的。胎儿期,瘦肉型猪肝脏中 IGF-I 水平高于脂肪型猪。Buonomo 等研究发现,出生第 1 d 血液中 IGF-I 水平瘦肉型猪高于脂肪型猪,其在 3~5 月龄的 IGF-I 上升

和玉丹,浙江大学饲料科学研究所,310029,浙江省杭州市秋涛北路 164 号。

收稿日期:2007-03-28

幅度也高于脂肪型猪。对性别差异的研究发现,在妊娠 94~98 d 雄性的胎儿 IGF-I 水平高于雌性,出生后差异仍然存在,在 3~18 月龄雄性猪血液中 IGF-I 水平要比雌性升高的快。对大白猪的研究也发现,45 日龄后大白母猪的 IGF-I 水平比大白公猪低。以上研究都与其促生长作用相一致。

3 IGF-I 的生物学功能

IGF-I 作为一类多功能的生长因子,不仅可以促进细胞对氨基酸和葡萄糖的摄取,增加蛋白质、脂肪和糖原的合成,刺激 DNA 复制和细胞增殖分化而促进生长,而且还可以刺激性腺分泌性激素,促进泌乳及新生动物小肠的发育。

3.1 IGF-I 的促生长作用

IGF-I 的促生长作用最早是由 Schoenle 等(1982)发现的。IGF-I 的促生长作用可分为两个方面,即 GH 样促生长作用和胰岛素样代谢作用。应用原代细胞培养等方法进行研究表明,IGF-I 刺激 DNA 合成以促进细胞增殖,可以促进卵子有丝分裂。Hizuka 证明,给生长期大鼠每天注射 IGF-I 120 μg /只,连续注射 7 d,体重增加 12%。

用定点基因敲除技术把大鼠肝脏中 IGF-I 基因敲除后,肝脏中无 IGF-I 表达,其它组织 IGF-I 不受影响,血液中 IGF-I 水平下降 75%,而 GH 水平上升 3 倍;血液中 IGF-BP3 下降 75%,血液中的游离 IGF-I 无变化,动物生长未受影响(Derek Le Roith 等,2001)。这说明可能血液中的游离 IGF-I 与动物生长有关,或者是在肝脏中 IGF-I 不表达时,GH 的直接促生长作用加强;也有可能是其它激素(如胰岛素)与 IGF-I 受体结合促进生长。另外许多研究发现,机体的许多细胞和器官可以经旁分泌产生 IGF-I 来促进该细胞或器官的生长。

对猪的试验结果表明,血浆中 IGF-I 水平与体重及增重呈正相关(Dabis,1988;McGuire 等,1992)。Casas Carrillo 等(1997)也证明 IGF-I 与猪的日增重有较大的相关。大量试验证明,IGF-I 可以对靶细胞产生合成代谢性作用,可以刺激软骨细胞和人成纤维细胞的氨基酸摄取和蛋白质合成,在胰岛素作用的靶器官,特别是脂肪组织和肌肉,IGF-I 表现出强烈的胰岛素样活性,促进葡萄糖的转运和代谢。

IGF-I 的促生长作用是毋庸置疑的,但是其在血液中保持高浓度的作用机理还需要做更进一步的研究。

3.2 IGF-I 对新生动物小肠发育的影响

由初乳转为常乳后,乳中 IGF-I 浓度显著下降,初乳中的 IGF-I 对新生动物的消化道和其它器官的发育

和细胞分化具有重要的作用,新生仔猪在吸收初乳的条件下,小肠的重量、长度、蛋白质合成等增加很快。王恬等(2005)报道,新生仔猪肠道的迅速发育与粘膜 IGF-I 受体和 IGF-I 基因的上调有关。Hammon 等报道,喂 3 d 初乳的犊牛小肠 IGF-I 受体数量高于喂 1 次初乳和始终喂代乳品的犊牛,其胰岛素受体和 IGF-I 受体的数目也较高。王恬等还报道 3 日龄的仔猪粘膜的 IGF-I 表达水平较初生时高。这都证明了 IGF-I 基因表达水平是动物肠道迅速发育的重要因素。

Balteskard 等用 IGF-I 处理新生仔猪发现,IGF-I 可以提高肠道对谷氨酰胺的吸收,同时促进肝脏谷氨酰胺的释放,而谷氨酰胺具有抗疲劳、提高免疫力和保护胃肠道的作用,这对仔猪胃肠道的发育具有重要意义。

3.3 IGF-I 对泌乳的影响

McBride 等通过乳腺动脉给泌乳山羊注射 IGF-I,使产奶量增加 15%;体外试验表明,IGF-I 能刺激乳腺上皮细胞合成 DNA 和乳汁。而且乳腺组织中存在 IGF-I 受体及 IGF-I mRNA,因此可以证明 IGF-I 对乳腺组织有直接和间接的作用。其促进泌乳的作用机理有以下几个方面:①IGF-I 与乳腺组织中的受体结合,刺激乳腺上皮细胞合成 DNA、蛋白质和乳汁;②IGF-I 可以通过调节动物体内营养物质的分配,激活体内脂肪的分解,使更多的营养物质进入乳腺组织;③IGF-I 可以提高血流量,增加腺体中乳汁的前体物质,改变分泌细胞的合成能力,减缓乳腺的衰减率,从而增加泌乳;④IGF-I 可以发挥类胰岛素的功能,促进蛋白质的合成。

3.4 IGF-I 对生殖系统的影响

IGF-I 也是一种促性腺活性物质,在离体试验中,IGF-I 可增加孕烯醇酮、孕酮和雌二醇的生物合成,且与卵泡的有丝分裂有关。Weller 等(1993)研究发现,在卵巢中,IGF-I 的表达和卵泡的生长及雌二醇的浓度呈正相关。目前研究认为,卵巢中 IGF-I 的受体主要存在于颗粒细胞中,IGF-I 可以通过颗粒细胞上的自身受体调节颗粒细胞的各种功能。IGF-I 可明显增加颗粒细胞对低密度脂蛋白(LDL)的反应,在加入 LDL 的同时,加入 IGF-I,孕酮生成可提高 100 倍。颗粒细胞经 E2 和 FSH 处理可加强 IGF-I 的促孕酮分泌作用,并且 E2 和 IGF-I 有协同和相互促进的作用,增加孕酮的生成量。IGF-I 可以促进 FSH 刺激过的大卵泡颗粒细胞分泌孕酮,但对小卵泡的未成熟颗粒细胞无作用,因此认为 IGF-I 与 FSH 协同调节颗粒细胞的分化。IGF-I 可以刺激颗粒细胞的基因表达,并刺激

颗粒细胞分泌催产素和孕酮,这些都与卵细胞的生长及分化密切相关。

4 IGF-I 在畜牧业中的应用前景

目前,IGF-I的生物制剂已经在人类治疗糖尿病、充血性心力衰竭、骨质疏松等疾病以及延缓衰老上得到临床应用。而在诸多研究中都发现,很多营养因子都可以通过增加血液中IGF-I浓度、增强IGF-IR敏感性或IGF-I基因表达等对猪的生长、胴体组成以及奶牛泌乳量产生影响。但专门针对IGF-I在动物上的应用研究还很少,因此对IGF-I在畜牧业中的应用应做更进一步的研究,使其发挥更大的作用。而随着分子生物学技术的快速发展,IGF-I生物制剂价格的降低,乃至IGF-I功能类似物的开发都为其研究和应用提供了更为广阔的前景。

参考文献

- Laron Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. Clin. Pathol. Mol. Pathol., 2001,4:311~316
- Model for the complex between the insulin-like growth factor-1 and its receptor: towards designing antagonists for the IGF-1 receptor. Protein Eng Des Sel, 2006,19(8):377~84
- Daughaday, WH, Rotwein, P: Insulin-like growth factor 1 and II peptide, messenger ribonucleic acid and gene structure, serum, and tissue concentrations. Endocr Rev 1989,10: 68~91
- Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin like growth factor I and its structural homology, with proinsulin. J Biol Chem 1978,253:2 769~76
- Adams TE, Epa VC, Garrett TPJ, et al. Structure of the type I insulin-like growth factor receptor. Cell Mol Life Sci,2000,57:1 050~93
- Massague J, Czech MP. The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. J Biol Chem,1982,257:5 038~45
- IRubin JB, Shia MA, Pilch PF. Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation in vitro by insulin-like growth factor. Nature, 1983, 305:438~40
- Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, et al. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. Cell,1985,40:747~58
- De Vos AM, Ullrich M, Kossiakoff A. Crystals of the complex between human growth hormone and the extracellular domain of its receptor. Science, 1992,255:306~12
- McDonald N Q, Murray-Rust J, Blundell T L. The first structure of a receptor tyrosine kinase domain: a further step in understanding the molecular basis of insulin action. Structure 1995,3:1~6
- Hubbard S R, Wei L, Elis L, et al. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. Nature 1994,372: 746~54
- Luo RZT, Beniac D R, Fernandes A, et al. Quaternary structure of the insulin-insulin receptor complex. Science 1999;285:1077~80
- Mynarcik DC, Williams PF, Schaffer L, et al. Identification of common ligand binding determinants of the insulin and insulin-like growth factor receptors-insights into mechanisms of ligand binding. J Biol Chem 1997,272:18 650~5
- Tannenbaum GS, Ling N. The interrelationship of growth hormone-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. Endocrinology 1984,115:1952~7
- Laron Z. Growth hormone secretagogues: clinical experience and therapeutic potential. Drugs, 1995,50:595~601
- Ghigo E, Boghen M, Casanueva FF, et al, eds. Growth hormone secretagogues . basic findings and clinical implications, Amsterdam: Elsevier,1994
- Laron Z. The somatostatin-GHRH-GH-IGF-I axis. In:Merimee T, Laron Z, eds. Growth hormone, IGF-I and growth: new views of old concepts. Modern endocrinology and diabetes, Vol. 4. London-Tel Aviv: Freund Publishing House Ltd, 1996:5~10
- Salmon WD, Jr, Daughaday W. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. J Lab Clin Med 1957,49:825~36
- Hammon H M, Blum J W. Feeding different amounts of colostrums or only milk replacer modify receptors of intestinal insulin-like growth factors and insulin in neonatal calves [J]. Domestic Animal Endocrinology,2002,22(3):155~168
- Rinderknecht E, Humbel RE. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. Proc Natl Acad Sci U S A 1976,73:2 365~2 369
- Laron Z. Somatomedin-1 (recombinant insulin-like growth factor-I). Clinical pharmacology and potential treatment of endocrine and metabolic disorders. Biodrugs 1999,11:55~70
- Blundell TL, Humbel RE. Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. Nature 1980,287:781~787
- Foyt, HL, Roberts. CT Jr: The IGF-1 gene: structure, expression, and gene products. In: LeRoith D (ed.). Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects CRC Press, Boca Raton, FL, 1991. 1~16
- Brissenden JE, Ullrich A, Francke U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. Nature 1984,310:781~784
- Mullis PE, Patel MS, Brickell PM, et al. Growth characteristics and response to growth hormone therapy in patients with hypochondroplasia: genetic linkage of the insulin-like growth factor I gene at chromosome 12q23 to the disease in a subgroup of these patients. Clin Endocrinol 1991,34:265~274
- Rotwein P. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. Growth Factors 1991,5:3~18
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) superfamily. Endocr Rev 1999,20:761~787
- Lewitt MS, Saunders H, Phuyal JL, et al. Complex formation by human insulin-like growth factor-binding protein-3 and human acid-labile subunit in growth hormone-deficient rats. Endocrinology 1994,134:2 402~409
- Derek Le Roith, Luis Scavo, Andrew Butle. What is role of circulating IGF-1. Trends in Endocrinology & Metabolism 2001,12(2): 48~52
- Balteskard L, Unneberg K, Mjaaland M, et al. Growth hormone and insulin like growth factor 1 promote intestinal uptake and hepatic release of glutamine in sepsis. Ann Surg. 1998,228(1):131~139
- 李键, 王建辰. IGFs 对卵泡生长发育的影响. 中国兽医学报, 1996,16(3):198~201
- 霍永久, 王恬, 许若军. 新生仔猪小肠生长发育及肠黏膜部分基因的表达. 南京农业大学学报, 2005,28(3):129~132

(编辑:徐世良, fx-xu@163.com)

饲料中三种硝基呋喃类药物的 超高效液相色谱同步检测方法

魏晋梅 周围 毕阳 刘彩云

摘要 利用超高效液相色谱仪(UPLC)同步检测饲料中3种硝基呋喃类药物。采用微波萃取方法提取样品中的呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮,提取溶剂为乙腈,提取条件为80℃下微波萃取10 min;用Oasis™ MCX小柱净化,流动相为3%冰醋酸溶液:乙腈(体积比)=90:10,流速为0.4 ml/min,进样量为5 μl。在上述试验条件下,呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮的保留时间分别为1.69、1.99和2.40 min,检出限分别为0.01、0.015、0.01 μg/ml,平均回收率分别为84.6%~92.3%、80.0%~92.3%、83.8%~92.3%,在0.05~10 μg/ml范围内有良好的线性关系。该方法简便、省时、灵敏度高,可同时测定饲料中呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮的含量。

关键词 呋喃西林;呋喃妥因;呋喃唑酮;超高效液相色谱仪

中图分类号 R978.2*5

硝基呋喃类药物是人工合成的具有5-硝基呋喃基本结构的广谱抗菌药物,主要有呋喃唑酮、呋喃西林和呋喃妥因,最早被应用于家禽、家畜、水产养殖动物传染病的预防和治疗^[1]。本类药物曾经被用作饲料药物添加剂,但由于其药物残留容易引起“三致”,目前已被全面禁止用作饲料添加剂,但作为治疗药物还在被使用。因此,对饲料中硝基呋喃类药物的检测有助于从源头上保证动物性食品的安全。

目前检测硝基呋喃类药物的方法主要有液-液萃取-高效液相色谱法(HPLC)、高效液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)和固相萃取-高效液相色谱法(SPE-HPLC)等。上述方法有的测定成分单一,有的检测灵敏度不高,有的重现性差。因此,我们提出了微波萃取、Oasis™ MCX小柱净化、超高效液相色谱定性定量的简便、快速、准确的测定方法。微波萃取法(MAE)作为一种新兴发展起来的萃取技术,由于其萃取效率高、低溶剂消耗、污染小、设备简单、节省能源等特点,受到不同领域研究人员的重视。

1 试验材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters Acquity™ UPLC超高效液相色谱仪(配有高压泵)、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器

(PDA)(美国Waters公司生产)、Heidolph旋转蒸发仪(德国海道尔夫公司生产)、WX-4000微波快速消解系统(上海屹尧分析仪器有限公司生产)。

呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮标准品均由DIKMA公司提供(纯度>99.9%);乙腈、甲醇均为色谱纯;水为二次重蒸水,自制;Oasis™ MCX(1cc)固相萃取小柱由Waters公司提供,使用之前用2 ml甲醇、2 ml水活化;其它试剂均为分析纯。

1.2 标准样品配制

称取3种药品各10 mg,用乙腈溶解并定容至50 ml,制成200 μg/ml混合标准贮备液,使用时逐级稀释成浓度为0.01~10 μg/ml的混合标准工作液。

1.3 样品

市售鸡饲料、猪饲料、牛饲料等31份。

1.4 UPLC分析条件

流动相A(乙腈):B(3%冰醋酸)(体积比)=10:90、流速0.4 ml/min、色谱柱为ACQUITY UPLC™ C₁₈ 2.1×50 mm(i.d. 1.7 μm颗粒)、柱温为25℃、检测波长为365 nm、进样量为5 μl、运行时间为3 min。

1.5 样品处理

称取饲料样品5.0 g,加入30 ml乙腈,在80℃下微波萃取10 min,设定压力为202.65 kPa。取上清液5 ml旋转蒸发浓缩至近干,用2%甲酸2 ml溶解并酸化残渣,酸化后过经活化的Oasis™ MCX固相萃取小柱,再用2%甲酸2 ml固定药物。用甲醇:水(体积比)=10:90的淋洗液2 ml淋洗后,用甲醇:水(体积比)=70:30的洗脱液2 ml洗脱,收集洗脱液,旋转蒸发浓缩至近干,氮气吹干,用流动相定容至1 ml,经0.2 μm滤膜过滤,进UPLC分析仪分析。

魏晋梅,甘肃农业大学食品科学与工程学院,工程师,730070,甘肃兰州。

周围(通讯作者),甘肃出入境检验检疫局中心实验室。

毕阳、刘彩云,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-03-12

2 试验结果

2.1 药品保留时间的测定

分别配制 3 种硝基呋喃类药物的混合标准液(浓度为 0.3 μg/ml),进 UPLC 检测,在液相色谱(UPLC)条件下的色谱图见图 1。图 1 表明,呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮的保留时间分别为 1.69、1.99 和 2.40 min。

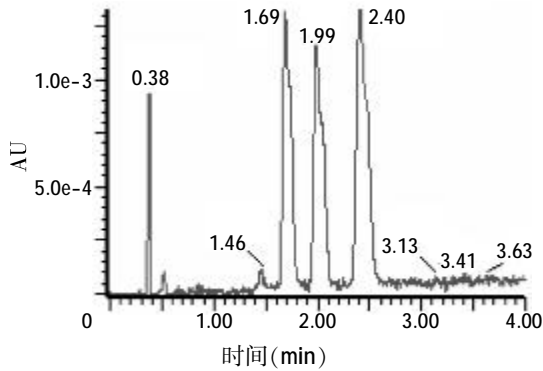


图 1 混合标准液的液相色谱图

2.2 工作曲线的制备

按照试验条件和方法,在系列样品中进行系列浓度的加标回收,以硝基呋喃类药物的峰面积 Y 为纵坐标,硝基呋喃类药物的质量浓度 X(μg/ml)为横坐标进行线性回归,见图 2。呋喃西林的回归方程为 $Y=11\ 348X+2\ 299.2$,相关系数 $r=0.990$;呋喃妥因的回归方程为 $Y=12\ 101X+192.9$,相关系数 $r=0.995$;呋喃唑酮的回归方

程为 $Y=11\ 280X+51.066$,相关系数 $r=0.994$ 。硝基呋喃类药物浓度在 0.05~10 μg/ml 时有良好的线性关系。

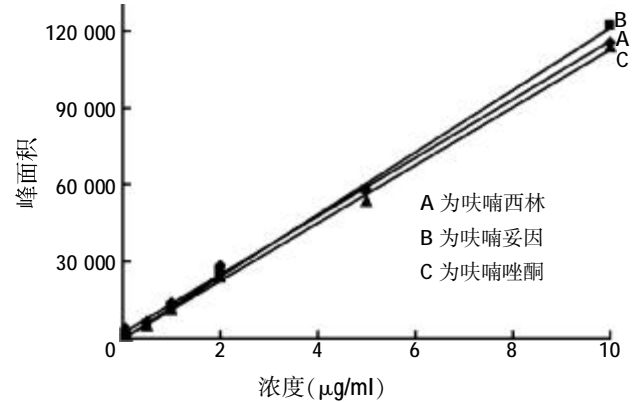


图 2 硝基呋喃类药物的工作曲线

2.3 方法准确度和精密度

方法准确度是用加入回收量来衡量的。在鸡饲料中准确加入一定量的呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮,按同样的操作过程进行提取、净化、测定,计算回收率。试验选用了 3 个水平的加标回收控制以检验方法的准确度,结果见表 1。鸡饲料空白样品与添加 0.6 μg/g 的样品的回收率液相色谱图见图 3。本试验在 9 个空白的饲料样品中添加相同浓度的 3 种硝基呋喃类药物的混合标准液,检测回收率,以检验方法的精确度,结果见表 2。

表 1 样品的加标回收率及精密度试验(n=3)

添加量 (μg/g)	呋喃西林			呋喃妥因			呋喃唑酮		
	初始浓度 (μg/g)	回收浓度 (μg/g)	回收率 (%)	初始浓度 (μg/g)	回收浓度 (μg/g)	回收率 (%)	初始浓度 (μg/g)	回收浓度 (μg/g)	回收率 (%)
0.6	0.00	0.51~0.52	85.0~86.7	0.00	0.52~0.53	86.7~88.3	0.00	0.52~0.54	86.7~90.0
1.3	0.00	1.1~1.2	84.6~92.3	0.00	1.04~1.2	80.0~92.3	0.00	1.09~1.2	83.8~92.3
2.6	0.00	2.3~2.4	84.6~92.3	0.00	2.2~2.4	84.6~92.3	0.00	2.3~2.38	88.5~91.5

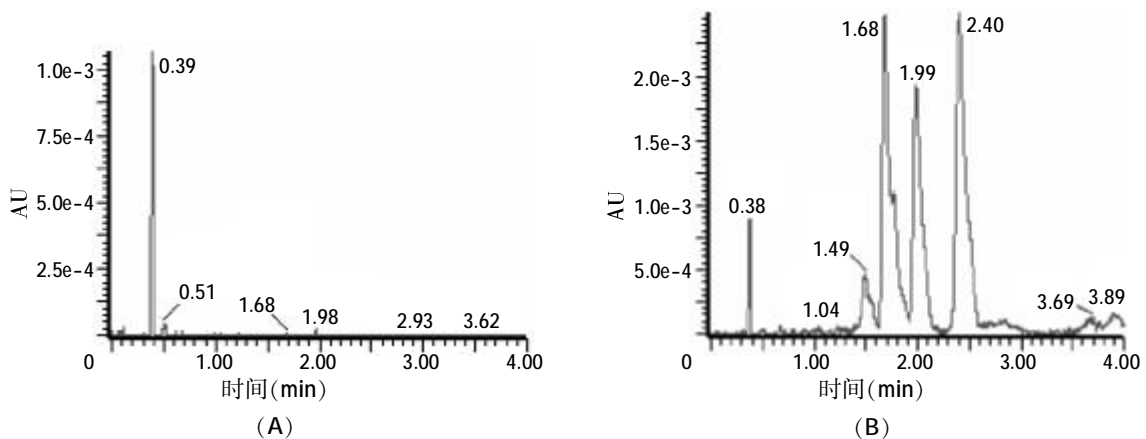


图 3 空白样品液相色谱图(A)与添加 0.6 μg/g 的样品的回收率液相色谱图(B)

表2 样品的精密度试验(n=9)

添加量 ($\mu\text{g/g}$)	呋喃西林			呋喃妥因			呋喃唑酮		
	回收浓度 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)	精密度 (%)	回收浓度 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)	精密度 (%)	回收浓度 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)	精密度 (%)
1.3	1.10	84.6	7.45	1.03	79.2	7.58	1.09	83.8	4.72
	1.12	86.2		1.15	88.5		1.25	96.2	
	1.03	79.2		1.20	92.3		1.2	92.3	
	1.20	92.3		1.13	86.9		1.12	86.2	
	1.25	96.2		1.09	83.8		1.1	84.6	
	1.03	79.2		1.20	92.3		1.15	88.5	
	1.20	92.3		1.25	96.2		1.20	92.3	
	1.05	80.8		1.00	76.9		1.20	92.3	
	1.20	92.3		1.06	81.5		1.20	92.3	

以信噪比为3时为最低定性检出限;以信噪比为8时为最低定量检出限。经测定,呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮的最低检出限分别为0.01、0.015、0.01 $\mu\text{g/ml}$ 。

3 结论与讨论

3.1 超高效液相色谱仪(UPLC)的柱效高,因而灵敏度高,检测速度快,大大节省了检测时间,本试验的检测时间是3 min。但是该设备比较昂贵,对所使用的溶剂要求也较高。

3.2 微波萃取与加速溶剂(ASE)萃取试验比较,微波萃取回收率高,且省时,加速溶剂萃取的回收率在60%左右。

3.3 本试验所检测的31份饲料样品中未检出呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮等3种硝基呋喃类药物,其结果与农业部公布的2006年兽药检测结果相符,说明我国禁止使用硝基呋喃类药物的效果良好。

3.4 硝基呋喃类药物对光敏感,在高温、光线直射和暴露在空气中条件下,会部分降解损失,故在试验

过程中尽可能避光。

参考文献

- 葛宝坤,王云凤,常春艳,等.测定鸡肉、水产品中4种硝基呋喃类药物残留量的固相萃取-液相色谱法[J].分析测试学报,2003,22(5):91-93
- Robert J, McCracken D, Glenn Kennedy. Determination of furazolidone in animal feeds using liquid chromatography with UV and thermospray mass spectrometric detection[J]. Journal of Chromatography A, 1997, 771:349-354
- 张心会,冯玉明,蔡根法.HPLC法测定动物源性食品中呋喃唑酮残留的研究[J].中国卫生检验杂志,2004,14(3):310-311
- A. Conneely, A. Nugent, M. O'Keefe, et al. Isolation of bound residues of nitrofurans from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection[J]. Analytica Chimica Acta,2003(483):91-98
- 郭德华,汪国权,王东辉,等.高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中的硝基呋喃类代谢产物残留量[J].化学计量分析,2005,14(4):16-18

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

· 书 讯 ·

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

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

气相色谱—质谱联用法测定饲料中盐酸克仑特罗的分析

金晓峰 章厉劼 古海

盐酸克仑特罗易溶于水,由于饲料中成分复杂,若直接用水溶液提取,则提取液中含大量杂质。利用克仑特罗易溶于乙酸乙酯和水的特性,采用二次提取方法来溶出和纯化样品,即将饲料中的盐酸克仑特罗通过化学反应生成克仑特罗,用乙酸乙酯提取出来,再用稀盐酸通过涡旋使乙酸乙酯中的克仑特罗反应生成盐酸克仑特罗进入水相,经阳离子固相萃取柱富集净化后得到理想的提取物。克仑特罗属难挥发性化合物,如果用气相色谱—质谱(GC/MS)联用法测定,必须将其衍生生成易挥发性化合物,这里采用BSTFA(N,O-双三甲基甲硅烷三氟乙酰胺)衍生剂进行衍生,这是因为BSTFA能够产生容易辨别的碎片离子,其本身是良好的溶剂,可省去吹干后再溶解的步骤,过量的衍生剂还能除去体系中少量的水分,保护衍生物。

本文对GC/MS定性定量测定方法进行考察和试验,即线性关系考察、精密度试验、重复性试验、稳定性试验、标准添加试验等,以进一步探讨一种准确、可靠、稳定的定性定量检测方法。

1 材料与方法

1.1 试剂

乙酸铵缓冲溶液(20 mmol/l, pH值5.2):将1.45 g乙酸铵溶解于700 ml水中,用乙酸调pH值为5.2并稀释至1 L。

30 mmol/l 盐酸:将1 mol/l 盐酸30 ml稀释至1 L。

4%氨化甲醇:用甲醇稀释4 ml氨溶液(比重0.88)至100 ml。

甲醇:色谱纯。

甲苯:色谱纯。

乙酸乙酯:分析纯。

10%碳酸钠溶液:溶解10 g碳酸钠于100 ml水中。

衍生剂BSTFA:N,O-双三甲基甲硅烷三氟乙酰胺。

SCX小柱:supelclean,LC-SCX Sep Pak小柱500 mg,

3 ml。

1.2 标准溶液

盐酸克仑特罗储备液:精密称取适量的盐酸克仑特罗标准品,用甲醇配成浓度约1 mg/ml的标准储备液。

盐酸克仑特罗标准溶液:将储备液用甲醇稀释为0.05~2.00 μg/ml,存放在冰箱中备用。

1.3 仪器及设备

Agilent5973i气相色谱与质谱联用仪、SIGMA高速冷冻离心机、GZX-9146 MBE电热恒温鼓风干燥箱、METTLER AB104-S电子天平、Reacti-Therm III氮吹仪。

2 盐酸克仑特罗的分析过程

2.1 动物饲料中盐酸克仑特罗的提取

称取5 g左右经粉碎的动物饲料于250 ml具塞锥形瓶内,加入50 ml乙酸乙酯、10 ml碳酸钠溶液,10%超声提取30 min,每隔10 min拿出用手振荡10 s。取上清液于10 000 r/min下离心10 min,移取全部上清液,加入5 ml 0.5 mol/l 盐酸,2 000 r/min涡旋1 min,10 000 r/min下离心5 min,弃去上层乙酸乙酯,用2.5 mol/l氢氧化钠溶液调pH值至5.2,加入1 ml乙酸铵缓冲溶液,得到样品提取液。

2.2 提取液中盐酸克仑特罗的净化

用5 ml甲醇、5 ml水、5 ml盐酸(30 mmol/l)依次淋洗SCX小柱,将上述所得样品提取液过柱,依次用5 ml水、5 ml甲醇淋洗,抽干,用5 ml氨化甲醇(4%)洗脱,用具塞的玻璃试管收集洗脱液,挤干,所得洗脱液在80℃下用氮气吹干。

2.3 盐酸克仑特罗的衍生

向上述用氮气吹干的具塞玻璃试管中加入200 μl甲苯和200 μl的BSTFA,加盖密闭涡旋混匀,80℃烘箱中衍生1 h,冷却后加入600 μl甲苯,涡旋混匀;取适量的盐酸克仑特罗标准工作液,同时衍生化。

3 盐酸克仑特罗的测定

3.1 色谱条件

色谱柱:HP-5MS 5%苯基甲基聚硅氧烷,内径30 m×0.25 mm,膜厚0.25 μm。

进样口温度:220℃。

进样方式:不分流。

进样体积:2 μl。

金晓峰,贵州省饲料监察所,550003,贵州省贵阳市贵惠路62号。

章厉劼、古海,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-03-18

柱温:70℃(保持0.6 min),以25℃/min升温至200℃,保持6 min;以25℃/min升温至280℃,保持5 min。

载气:氦气,流速为0.9 ml/min(恒流);

GC/MS传输线温度:280℃。

溶剂延迟:8 min。

EM电压:高于调谐电压200 V。

检测器温度:230℃。

四级杆温度:106℃。

选择检测离子(M/Z):86、243、262、277。

3.2 定性定量方法

3.2.1 定性方法

SIM下,样品与标准品的保留时间相差不超过0.5%,样品特征离子基峰百分数与标准品相差不超过20%。

SCAN下,样品与标准品的保留时间相差不超过0.5%,样品峰扣除其前1 s处的背景后的质谱图与标准质谱图基本一致。

3.2.2 定量方法

SIM法计算峰高,根据样品液中盐酸克仑特罗的含量情况,选择峰面积相近的标准工作液。标准工作液和样品液中盐酸克仑特罗的响应值均应在仪器检测线性范围内。对标准工作液和样品液等体积参插进样测定。

4 结果

4.1 线性关系

标准品工作液选择离子流图及离子丰度图见图1,以定量离子(M/Z86)峰面积 y 对浓度 x ($\mu\text{g/ml}$)进行回归计算,回归方程为: $y = -326.4 + 21\,684.2x$,在线性范围为0.05~2.00 $\mu\text{g/ml}$ 下相关系数 $r = 0.998$ 。

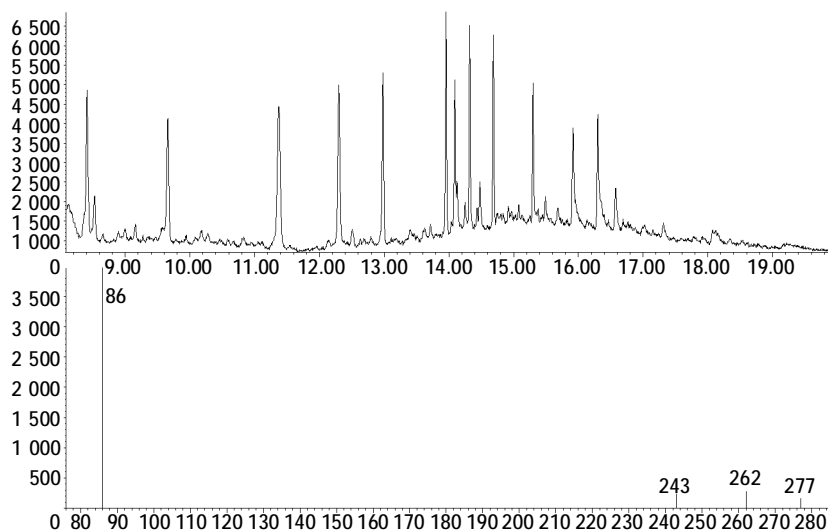


图1 标准品工作液选择离子流图及离子丰度图

4.2 试样色谱图和质谱图

含盐酸克仑特罗0.01 $\mu\text{g/g}$ 的饲料试样在SIM下的离子流图见图2,离子丰度质谱图见图3。

0.01 $\mu\text{g/g}$ 的饲料试样在该提取方法下能成功检

测出盐酸克仑特罗。

含盐酸克仑特罗0.20 $\mu\text{g/g}$ 的饲料试样在SCAN下的质谱图见图4,利用全扫描能正确对盐酸克仑特罗进行定性判断。

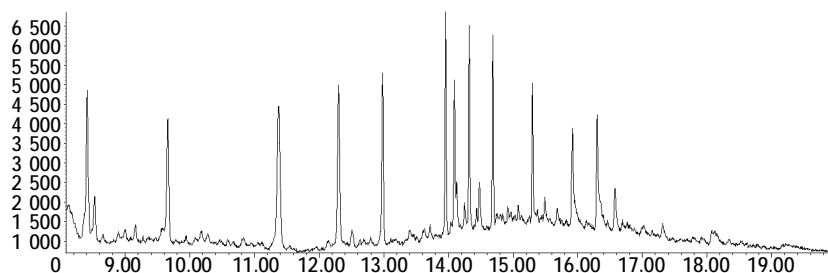


图2 试样选择离子扫描离子流图

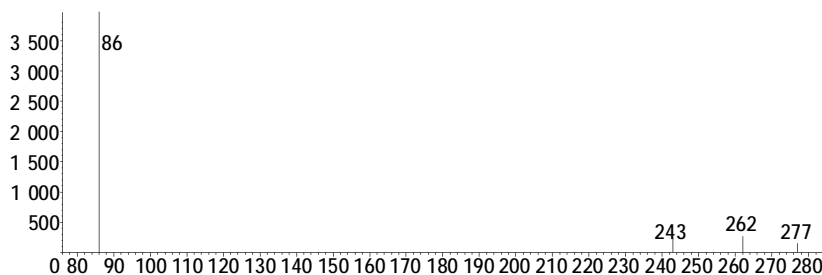


图3 试样选择离子扫描离子丰度图

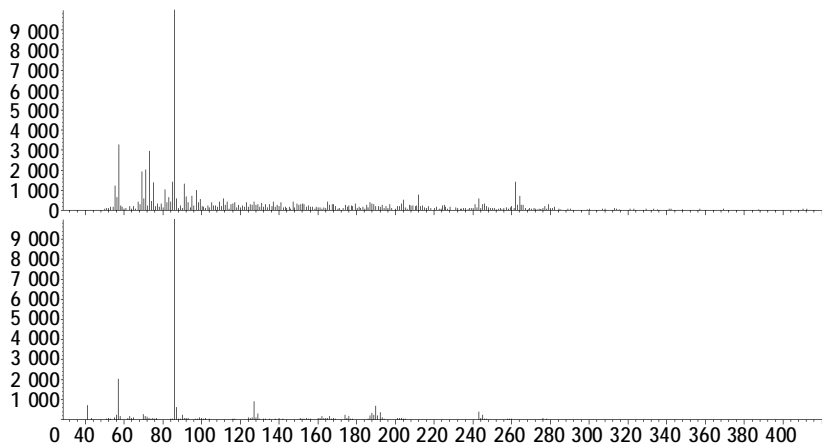


图4 试样全扫描质谱图(上)与标准品质谱图的对比

4.3 试验精密度

在空白饲料中添加盐酸克仑特罗含量分别为0.01、0.05、0.10、0.20、0.40 μg/g 组成样品饲料,并进行精密度试验,每组设6个平行样,进行阳性添加试验,

结果见表1。

由表1可知,利用气相色谱-质谱联用法测定饲料中的盐酸克仑特罗,平均变异系数为2.9%,准确性高。

表1 饲料中添加盐酸克仑特罗的精密度试验

添加水平(ng/g)	6个平行测定值(ng/g)						平均测定值(ng/g)	RSD(%)	平均RSD(%)
10	6.08	5.59	6.22	6.03	5.86	5.89	5.94	3.7	
50	42.12	44.00	38.17	38.25	38.87	40.20	40.27	5.9	
100	80.01	81.53	82.76	80.69	83.57	80.08	81.44	1.8	2.9
200	171.59	175.42	171.66	170.69	177.06	172.35	173.13	1.5	
400	331.55	327.68	330.87	337.56	342.42	328.06	333.02	1.7	

5 讨论与结论

盐酸克仑特罗是中等极性的疏水性化合物,宜采用极性溶剂提取,因此甲醇、乙腈、不同比例混合的醇、酯等常被作为提取液。然而,当提取液的极性增强时,萃取出来的杂质也越多。农业部行业标准 NY/T438—2001 中采用偏磷酸溶液为提取液,但是偏磷酸不易溶于水,并且是剧毒物质,对环境及实验人员的危害较大。本文采用先在碱性条件下经乙酸乙酯提取,再用酸溶液反提的办法,有效的去除了饲料中的杂质,试验结果中样品与标准品的保留时间相差不超过0.5%,SIM 下特征离子基峰百分数与标准品相差不超过20%,完全符合农业部行业标准 NY/T438—2001。

参考文献

- 1 王选年,夏晓迪,潘耀谦,等. 盐酸克仑特罗的残留及检测[J]. 动物医学进展,2002,23(3):41-46
- 2 朱永林,邵德佳. 气相色谱-质谱法同时测定猪肝中盐酸克仑特罗、莱克多巴胺残留[J]. 中国兽药杂志,2006,40(11):5-8
- 3 黄传峰,李晓华,吴宜群. 克仑特罗检测方法进展[J]. 中国卫生检验杂志,2002,12(5):634-636
- 4 吴平谷. 生物材料中克仑特罗的气相色谱-质谱法测定[J]. 分析测试学报,2002,21(1):19-21
- 5 李俊锁,邱月明,王超. 兽药残留分析[M]. 上海科学技术出版社,2002. 648-649
- 6 贺利民. 气相色谱-质谱法测定动物组织及饲料中的克仑特罗[J]. 质谱学报,2005,26(3):168-171
- 7 M.Tuomola, et al. Production and characterization of mono CL onal antibodies against a very small hapten 3-methylindole[J]. Journal of Immunological Methods, 2000, 240:111-124

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

抗坏血酸(VC)微囊的质量检验及评定

邹大琼 詹志春 詹连生

摘要 文中提出了显微镜检验、突释率、释放度等几种鉴别、检验 VC 微囊的方法和包被质量的判定指标;验证了 VC 微囊质量的优劣,并测定其在高温、高湿条件下及在微量元素预混料、配合饲料中在贮存过程中的稳定性。

关键词 VC 微囊;质量指标;检测方法;稳定性

中图分类号 S816.17

抗坏血酸(VC)是动物生命代谢中必不可少的,能参与动物体内细胞间质中胶原合成、细胞内电子转移及氧化还原反应;增强动物机体免疫力,缓解应激反应;参与活性物质合成代谢、脂肪代谢;维持正常血脂以及在动物体内各重要器官中具有解毒功能。但是 VC 很不稳定,结晶 VC 易受光、热、氧和重金属离子等的影响而遭到破坏,饲料加工贮藏不当也易导致 VC 生物学效价降低。

VC 微囊是对 VC 晶体进行包被微囊化处理的制剂。包被良好的 VC 微囊在各种环境下具有良好的稳定性,具有耐高温、高湿,抗紫外线,抗氧化等特点,在溶液中有一定的缓释作用。由于避免了与环境不良因子的接触,从而提高了 VC 的稳定性和利用率。而包被不好的 VC 微囊保护 VC 的效果却很差,甚至起不到保护作用。

鉴别 VC 微囊包被的质量是非常重要的。据美国 FDA 要求:在 30~40℃,相对湿度 75%~80%条件下保存 3 个月,VC 的稳定性存留率为 93.18%~93.53%,符合要求。此外,也有人 VC 进行不同温度、不同相对湿度的条件下,在不同载体中的稳定性试验,但都需要较长时间才能得到结果,不能满足对流通商品产品质量鉴别的需要。

文中首次提出了利用显微镜镜检、VC 的突释率及释放度的检验方法,鉴别 VC 微囊的包被质量,并把鉴定结果与不同条件下在不同物料中的稳定性试

验结果相对照,发现二者有高度的相关性。试验结果表明,包被质量较好的 VC 微囊,其稳定性存留率高。由此证明,用文中提出的检验及评定标准来鉴别 VC 微囊质量是行之有效的方法。

1 主要仪器

体视显微镜;网篮(见图 1)由 0.05 mm 孔径的筛网做成;电动搅拌器、搅拌桨由玻璃或不锈钢做成。

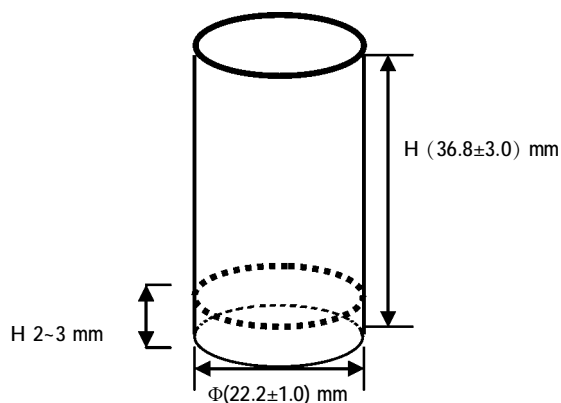


图 1 网篮

2 主要试剂和溶液

碘标准溶液(0.1 mol/l)、1%淀粉溶液、6%乙酸溶液(V/V)。

3 检验方法及判定指标

3.1 显微镜检验

3.1.1 检验方法

将 VC 微囊置于载玻片或培养皿中心位置,然后将载玻片或培养皿放到体视显微镜载物台上,选择适当放大倍数,使物象清晰。随后向微囊滴加 2 滴水,观察微囊变化。

3.1.2 试验结果

显微镜下观察到的 VC 晶体为具有油脂光泽、白

邹大琼,国家饲料质量检测中心(武汉),高级工程师,430070,武汉市洪山区卓刀泉路。

詹志春、詹连生(通讯作者),武汉新华扬集团。

收稿日期:2007-04-23

色或类白色、透明或半透明的颗粒,流动性好;投入水中后,VC 微囊漂浮在水面,水缓慢浸入膜内,将 VC 晶核溶解。

包被完好:镜下可见水沿微囊四周缓缓浸入膜内,VC 晶核逐渐被水溶解,随后出现尚未溶完的晶核和包住晶核的透明囊袋。当晶核被完全溶解时,水面上显现出透明、光滑、完整、保持原晶形的囊,并较长时间保持其形态。

包被不好:镜下可见 VC 微囊内晶核被水溶解,或不见包膜存在,或包膜不完整,膜呈网状、絮状;囊袋破裂或有白色胶团存在等现象。

如每颗 VC 微囊均有一个完整囊袋,则包封率为 100%。

3.2 突释率试验

3.2.1 试验方法

VC 晶体极易溶于水,VC 微囊表面吸附的 VC 和未包封的 VC 在水中会很快被释放溶解。用碘量法测定在一定时间(1 min)内释放在水中的 VC 含量。

将网篮置于 100 ml 烧杯的正中,加入 30 ml 水(排出篮底的气泡)。将短颈小漏斗(管径 $\Phi 5$ mm)置于烧杯上,使漏斗口正对网篮中心,漏斗口高于水面 5 mm。称取 0.1 g VC 微囊(精确至 0.000 1 g)经漏斗倒入网篮中,开始计时,1 min 后提出网篮。用碘量法测出水中 VC 的含量(每个样品做 6 次平行测定),并同时测出 VC 微囊中的 VC 总含量,从而计算出 VC 微囊释放在水中的突释率。

3.2.2 试验结果及判断(见表 1)

表 1 纯 VC 晶体及不同 VC 微囊的突释率(酸性水、25 ℃)

项目	纯 VC 晶体	VC 微囊 1#	VC 微囊 2#	VC 微囊 3#
浸溶时间(min)	1.0	1.0	1.0	1.0
突释率(%)	86~90	6~10	40~50	70~75

表 1 中所列结果说明,没有包被的纯 VC 晶体突释率最高。包被质量越好的 VC 微囊突释率越低,包被不好的 VC 微囊突释率接近纯 VC 晶体。依据中国药典对微囊突释率的要求,在规定的时间内突释率应低于 40%。笔者认为,这一指标可以作为 VC 微囊的质量指标。

3.3 VC 微囊释放度的测定

3.3.1 测定方法

移取醋酸溶液 200 ml 加入 250 ml 高型烧杯中,

水浴加热至(37±0.5) ℃,将搅拌桨置于烧杯中心,桨叶底部离烧杯底部的距离为(15±1) mm。开动搅拌器并调节桨叶转速为 50 r/min,加入淀粉溶液 1 ml,立即用碘标准溶液滴定至蓝色(30 s 不褪色)。投入 0.1 g 的 VC 微囊,开始计时,每当蓝色消失后,再用碘液滴定至蓝色,并记录碘液消耗量和时间。以该时间内碘液的累计用量对 0.1 g VC 微囊消耗碘液总量,计算该时间内 VC 微囊的释放度。

同时按 VC 微囊中 VC 含量的测定方法测定 0.1 g VC 微囊碘量消耗量,以其量确定为 100%释放。以时间为横坐标,累计释放度为纵坐标绘制释放度曲线(见图 3)。

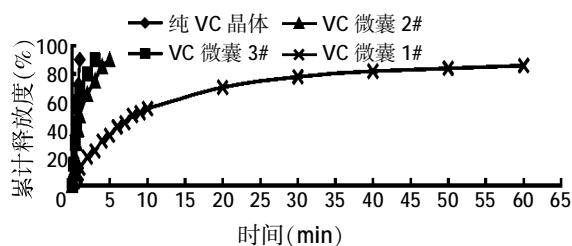


图 3 VC 微囊释放度曲线

3.3.2 释放度测定曲线说明

包被质量好的 VC 微囊,应具有缓释特性,应符合一级速率方程,按其规律释放,即按时间变化先多后少的规律释放 VC。质量不好的 VC 微囊,其释放特性与纯 VC 相近,不具有缓释或低缓释性。质量好的 VC 微囊不仅有较好的缓释性,且释放度很适宜水生动物的需要。

4 检测结果与稳定性试验结果的相关性

将 VC 晶体和不同品牌的 VC 微囊在温度 22~39 ℃、相对湿度 75%~95%和温度 34~39 ℃、相对湿度 75%~95%的空气中暴露 3~6 个月,然后与配合饲料混合、制粒(温度 85 ℃、相对湿度 95%、水分含量 17%~18%),与高含量微量元素预混料(Cu 145 mg/g、Fe 75 mg/g、Zn 75 mg/g、Mn 28 mg/g)混合,塑料袋贮存,做稳定性试验(见表 2)。

表 2 中所列结果说明,检验结果与稳定性试验结果有较好的相关性,即检测 VC 微囊结果为:包膜完整,在水中有完整的保持原晶形的囊袋,且经久不破;突释率不大于 30%,具有明显的缓释性,符合一级释放速率的 VC 微囊,在各种条件下的稳定性也是很高的。

畜禽专用抗生素泰妙菌素的研究进展

杨海峰 王 权 于生兰

泰妙菌素(Tiamulin)又名泰妙灵和支原净,是由高等真菌担子菌侧耳属 *Pleurotus mutilus* 和 *Pleurotus passeckerianus* 菌种的深层培养液提取的截短侧耳素(Pleuromutilin)的氢化延胡索酸盐,是双萜烯类化合物半合成的抗生素。1951年澳大利亚 Kavanagh 首次报道了这类物质,20世纪60年代开始对其进行广泛研究。泰妙菌素在动物体内吸收迅速,血药浓度高,体内分布广泛,且残留较低,对猪、禽类的支原体病、猪密螺旋体性痢疾、鸡的葡萄球菌滑膜炎有良好疗效,又有促生长作用,因此作为兽药和饲料添加剂而被广泛应用。本文就国内外对泰妙菌素的药效、药动力学、毒理学等方面的研究情况予以综述,为其在兽医临床的合理使用提供参考依据。

1 理化性质

泰妙菌素的分子式为 $C_{28}H_{47}NO_4S$,分子量 493.75,实际使用多为泰妙菌素的延胡索酸盐,其分子式为 $C_{28}H_{47}NO_4S \cdot C_4H_4O_4$,分子量为 609.8。延胡索酸泰妙菌

素为白色或类白色结晶性粉末,无臭、无味,在乙醇中易溶,在水中溶解,在丙酮中略溶,在己烷中几乎不溶,熔点为 143~149℃。干燥品稳定,对光、热较不稳定。

2 抗菌机理及活性

泰妙菌素对几种细菌的抗菌活性见表 1。

表 1 泰妙菌素和磷酸泰乐菌素对不同菌株的最小抑菌浓度($\mu\text{g/ml}$)

菌株	泰妙菌素	磷酸泰乐菌素
鸡毒支原体标准株	0.015	0.5
猪毒支原体标准株	0.015	1
大肠杆菌 ATCC ₂₅₉₂₂	16	>32
大肠杆菌 C ₄₄₁₀₃	32	>128
金黄色葡萄球菌 ATCC ₂₅₉₂₃	0.5	2
金黄色葡萄球菌分离株	1	16
大肠杆菌 O ₂	64	128
禽巴氏杆菌分离株	64	128
鸭大肠杆菌分离株 1	64	64
鸭大肠杆菌分离株 2	128	>128
猪大肠杆菌分离株	128	256
猪链球菌分离株	0.125	64

泰妙菌素为动物专用的抗生素,其作用机理为抑制细菌蛋白质的合成,即能与敏感菌核糖体 50S 亚基结合,通过对转肽作用或 mRNA 位移的阻断来抑制肽链的合成和延长,影响细菌蛋白质的合成。泰妙菌素为

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

王权、于生兰,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-02-12

表 2 检测结果与稳定性试验结果的相关性

项目	纯 VC 晶体	VC 微囊 3#	VC 微囊 2#	VC 微囊 1#
镜检	晶体在水中很快溶解,水中很快溶解,无囊袋	晶体在水中很快溶解,无完整囊袋,包膜呈絮状散开,或未成膜的白色粒状囊材	晶体在膜内被水溶解,有囊袋,但很快破裂成碎片	水从囊袋外慢慢浸入,逐渐溶解 VC 晶体,保持原晶形囊袋,经久不破
突释率(%)	86-90	70-75	40-50	6-10
释放度	无缓释性	无缓释性	稍有缓释性	有缓释特性,符合一级速率
温度 34-39℃,相对湿度 75%-95%,在空气中暴露 90 d	70	75	80	98.6
温度 22-39℃,相对湿度 75%-95%,在空气中暴露 180 d	60	70	75	96.5
温度 85℃,相对湿度 95%,与配合饲料混合 5 min	50	60	70	96.0
温度 20-39℃,相对湿度 60%-95%,与微量元素预混料混合贮存 60 d	28	28	40	85.0

5 结语

试验结果说明:本文提出的检验 VC 微囊的方法和所列指标,能比较好地反映 VC 微囊稳定性的优

劣,为鉴别 VC 微囊质量的好坏提供了简便易行的方法,有利于商品 VC 微囊的正常使用和鉴别。

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

抑菌性抗生素,在高浓度下对敏感菌也有杀菌作用。泰妙菌素为窄谱抗生素,抗菌谱与大环内酯类相似,对革兰氏阳性菌(如金黄色葡萄球菌、链球菌)、支原体(猪肺炎支原体、鸡败血支原体)、猪胸膜肺炎放线杆菌及猪密螺旋体等有较强的抗菌活性,对支原体和螺旋体尤为敏感,对革兰氏阴性菌抗菌活性较弱。

3 药代动力学特征

泰妙菌素的药代动力学特征为:①单胃动物内服吸收好,血药浓度达峰时间为 2~4 h,生物利用度(F)在 85%以上;②反刍动物内服可被肠道菌群灭活;③吸收后在体内分布广泛,组织中和乳中的药物浓度高出血清浓度几倍,肺中浓度最高;④泰妙菌素在体内被代谢成 20 多种代谢物,有的具有抗菌活性,代谢物主要经胆汁从粪便排泄,约 30%从尿中排泄。

Gatne 等以 8 mg/kg 的剂量分别给小牛(80~100 kg)和绵羊(15~32 kg)肌注泰妙菌素,血峰浓度(C_{max})分别为 3.52、0.995 $\mu\text{g/ml}$,表观分布容积(V_d)分别为 1.31、8.82 L/kg,消除半衰期($T_{1/2\beta}$)分别为 3、4.65 h,血浆清除率(CL)分别为每分钟 11.97、21.89 ml/kg。猪内服泰妙菌素易于吸收,单剂量投服可吸收 85%,2~4 h 出现血药峰浓度,在 50 mg/kg 的剂量下,平均血药浓度达 4.5 mg/ml,药物在体内分布极其广泛,以肺中浓度最高,有效血药浓度维持时间达 24 h。

Laber G 等研究表明,以 50 mg/kg 的剂量给鸡和火鸡口服泰妙菌素,2~4 h 后达到峰浓度,平均血药浓度分别为 3.5、2.9 $\mu\text{g/ml}$,有效血药浓度维持时间为 12~24 h。Laber G 给普通犬分别皮下和肌肉注射 10 mg/kg 泰妙菌素, C_{max} 分别为 (1.55±0.11)、(0.60±0.08) $\mu\text{g/ml}$,肌注药动参数达峰时间(T_{max})分别为 8、6 h,吸收半衰期($T_{1/2ka}$)分别为 (2.76±0.13)、(2.23±0.76) h, $T_{1/2\beta}$ 分别为 (4.28±0.18)、(4.7±1.43) h,CL 分别为每分钟 0.33、1.36 ml/kg。

4 毒性与不良反应

王丽平等进行了泰妙菌素的一般毒性研究,口服泰妙菌素的小鼠、鸡的 LD_{50} 分别为 1 158 和 2 119 g/kg,按国际急性毒性分级标准可判断为实际无毒,蓄积系数 $K>5$,为弱蓄积性,小鼠对其不具有耐受性。

泰妙菌素的不良反应主要有:①本品与莫能菌素、盐霉素等聚醚类抗生素联合应用时,可导致中毒,使鸡生长迟缓、运动失调、麻痹瘫痪,甚至死亡。其产生机制认为是泰妙菌素可以影响肝细胞色素 P450 混

合功能氧化酶系的活性,从而干扰聚醚类抗生素的体内代谢过程。②泰妙菌素在马上应用可能带来大肠杆菌菌群失调和结肠炎的危险,故应禁用。③猪应用过量时,可引起短暂流涎、呕吐和中枢神经抑制。

5 临床应用

临床上泰妙菌素主要用于防治鸡的慢性呼吸道病,猪支原体肺炎、放线菌性胸膜肺炎和密螺旋体痢疾等,与金霉素、土霉素等四环素类抗生素配伍可产生增效作用。低剂量还可用于促进畜禽生长、提高饲料利用率和生产性能。泰妙菌素禁与能结合细菌核糖体 50S 亚基的抗生素合用,有拮抗作用。

徐国众等以支原净 100 mg/kg+金霉素 150 mg/kg 给断奶仔猪混饲,结果显示,仔猪腹泻率显著下降,日增重明显提高,为解决仔猪早期断奶的生长受阻与腹泻难题提供了有效方法。梁国煦等以 100 mg/kg 支原净+300 mg/kg 土霉素给生产母猪拌饲,在母猪产前和产后各连续饲喂 5 d,仔猪断奶后母猪继续以相同浓度连续饲喂 5 d;28 日龄断奶仔猪以 100 mg/kg 支原净+150 mg/kg 土霉素连续混饲 4 周,结果表明,母猪与仔猪的气喘病都得到有效控制,仔猪各个阶段生长均匀,育成率显著提高。瑞士诺华动物保健品有限公司研制了泰妙菌素注射液,用于治疗猪支原体肺炎、传染性胸膜肺炎和猪密螺旋体引起的痢疾,肌肉注射 10~15 mg/kg,每日 1 次,连用 3 日。

梁小军等用泰妙菌素分别以饮水(1.2 mg/kg)、拌料(1.1 mg/kg)和肌肉注射(1.0 mg/kg)的给药方法,治疗绵羊肺炎霉形体病,每日给药 1 次,连用 3~5 d 后,临床症状消失,成功治疗了万余例患羊,效果显著,且副作用小。

藏素敏等研究了在饲料中添加泰妙菌素(20 mg/kg)对 20 周龄的海兰灰商品蛋鸡生产性能的影响,结果表明,鸡群达到产蛋高峰的时间提前 7 d($P<0.05$),产蛋率提高 3.18%($P<0.01$),饲料报酬提高 7.96%($P<0.01$),体重增加 7.5%,蛋黄、蛋壳颜色有所改善,但差异不显著($P>0.05$)。

(参考文献 12 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:王芳,xfang2005@163.com)

碱法水解糖蜜酒精废液处理过程中产生的 微生物蛋白制备复合氨基酸粉的研究

赵 芯 朱义年 曾鸿鹄 张学洪

摘 要 以微生物蛋白为原料,采用氢氧化钠水解法制备复合氨基酸粉,通过正交试验确定最佳工艺参数为水解温度 90 ℃、反应时间 2 h、氢氧化钠溶液浓度 40%和液固比 50:1。并对氨基酸液的粗制品采用盐酸中和,有机试剂乙醇沉淀,常压干燥等方法进行精制。经本工艺生产的氨基酸产品色泽为乳白色,香气正常,游离氨基酸含量为 0.313%,氨基酸含量为 0.475%。试验结果可为废水处理过程中产生的微生物蛋白资源化利用提供试验依据。

关键词 碱法水解;微生物蛋白;复合氨基酸
中图分类号 S816.35

在糖蜜酒精废液处理过程中会产生大量微生物蛋白,其粗蛋白含量在 54%左右。如果直接丢弃,不仅产生了二次污染,还浪费了大量的蛋白质资源。将其水解并提取氨基酸,不仅为废弃物资源化利用提供了新的途径,制取的氨基酸还可作为饲料添加剂,以满足饲料行业对饲用氨基酸日益增长的需要。蛋白质水解通常有酸法^[1-3]、碱法^[4-5]及酶法^[6-8],本试验采用氢氧化钠水解法,在单因素试验基础上选择影响较大的几个因素条件,通过正交试验确定工艺参数,同时对氨基酸液的粗制品采用盐酸中和、常压浓缩的方法进行精制,通过试验为中试和推广打下一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

微生物蛋白(糖蜜酒精废液处理过程中产生)、NaOH(广州华大试剂厂生产,分析纯)。

1.2 主要仪器与设备

数显快速恒温水箱(HH-60,常州国华电器有限公司生产)、紫外分光光度计(Lambda 25,美国 PE 公司生产)、电热鼓风干燥箱(DHR-100SB 型,广东医疗器械厂生产)。

1.3 试验步骤

1.3.1 预处理

由于在培养中,糖蜜酒精废液中焦糖及一些代谢

产物吸附在微生物菌体上,使菌体泥呈浅咖啡色,微生物菌体本身也有一定臭味,对各种制成品品质有不良影响,必须通过预处理将其去除。本试验采用酸碱洗涤法对菌体蛋白泥进行预处理^[9],方法为:在菌体蛋白泥中加入 2 倍体积的 0.3%氢氧化钠,离心分离得到碱性菌体蛋白泥;在碱性菌体蛋白泥中加入 2 倍体积的 0.4%酒石酸,离心分离得弱碱性菌体蛋白泥;在弱碱性菌体蛋白泥中加入 2 倍体积纯水,离心分离得到干净菌体蛋白泥,按上述步骤往复 2~3 次再经过脱色、脱苦处理后的菌体蛋白泥呈灰白色,无臭味。

1.3.2 微生物蛋白水解方法

1.3.2.1 氢氧化钠水解方法

将预处理后的菌体在 80 ℃下干燥,制成粉末。在具塞聚乙烯管中,精确称取 0.1 g 粉末状菌体,然后加入不同浓度的 NaOH,在恒温水浴箱中进行水解反应一定时间后取出,测定氨基酸含量。

1.3.2.2 精制复合氨基酸的方法

精制包括中和、脱色、干燥等工艺。原料水解完后,在水解液中加入盐酸进行中和,将中和后的水解液 pH 值调节为 5,每 50 ml 加入活性炭 1.5 g,在 55 ℃脱色 1 h,趁热过滤。再利用有机试剂沉淀法分离氨基酸,pH 值为 5,温度为 -7 ℃,V_{无水乙醇}:V_{水解液}=9:1,沉淀时间 30 min,4 000 r/min 离心 10 min,沉淀,在恒温干燥箱中 60 ℃恒温干燥 10 h。

1.4 分析方法

水分测定:在 105 ℃下烘干 2 h 后称重 (GB 6435—86)。

氨基酸含量测定:采用茚三酮法^[10]。

氨基酸组成分析:利用氨基酸自动分析仪 (GB/T 18246—2000)测定。

2 结果与讨论

赵芯,桂林医学院资源与环境工程系,541004,广西桂林市建干路 12 号。

朱义年(通讯作者)、曾鸿鹄、张学洪,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-03-06

★ 广西科学研究与技术开发计划(桂科攻 0428003,0592003-3)和广西自然科学基金(桂科自 03420048,桂科青 0542009)项目

2.1 正交试验方案设计

选择氢氧化钠浓度、液固比、水解时间、水解温度等不同因素进行正交试验,希望在较短的水解时间内完成制备复合氨基酸的目的,试验因素设计见表1。

表1 碱水解试验因素水平

水平	A 氢氧化钠浓度(%)	B 液固比	C 水解时间(h)	D 水解温度(°C)
1	20	30 : 1	1	50
2	30	50 : 1	2	70
3	40	70 : 1	3	90

2.2 正交试验结果(见表2)

表2 正交试验结果分析

实验号	A	B	C	D	氨基酸产生量(mg/g 干菌体)
1	1	1	1	1	11.041
2	1	2	2	2	30.011
3	1	3	3	3	40.295
4	2	1	2	3	33.506
5	2	2	3	1	19.938
6	2	3	1	2	26.126
7	3	1	3	2	29.740
8	3	2	2	3	37.727
9	3	3	1	1	16.778
K ₁	81.347	74.287	53.945	47.757	
K ₂	79.570	87.676	101.244	85.877	
K ₃	84.245	83.199	89.973	111.528	
k ₁	27.116	24.762	17.982	15.919	
k ₂	26.523	29.225	33.748	28.626	
k ₃	28.082	27.733	29.991	37.176	
R	1.559	4.463	15.766	21.257	

由表2可知,最佳的试验条件为A₃B₂C₂D₃,对氨基酸的影响因素顺序是水解温度>水解时间>液固比>氢氧化钠浓度,即水解温度对氨基酸水解影响最大,

水解时间和液固比对氨基酸水解有一定的影响,氢氧化钠浓度对氨基酸水解产生的影响相对较小。通过级差分析确定采用氢氧化钠水解法制备微生物蛋白复合氨基酸粉的最佳工艺参数为:氢氧化钠浓度为40%,液固比为50:1,水解时间为2h,水解温度为90℃。

2.3 产品氨基酸含量分析

通过最佳试验条件得到粗制氨基酸水解液,将氨基酸水解液用盐酸中和过滤,活性炭脱色,有机试剂乙醇沉淀提取复合氨基酸,常压干燥后得到复合氨基酸成品,产品色泽为白色,香气正常,无异味。

将制得的复合氨基酸成品送至广西分析测试研究中心进行检测,测定成品中氨基酸组成及含量,结果见表3。

由测定结果可以看出,采用氢氧化钠水解微生物蛋白,并用盐酸进行中和、乙醇沉淀制出的复合氨基酸成品中,未检出游离脯氨酸、脯氨酸、游离缬氨酸、游离异亮氨酸、异亮氨酸、游离亮氨酸、游离组氨酸、游离精氨酸和精氨酸。游离氨基酸在成品氨基酸中的含量为0.313%,氨基酸在成品氨基酸中的含量为0.475%,游离氨基酸占氨基酸总量的65.89%,说明产品中游离氨基酸含量相对较多,肽的含量为34.11%。复合氨基酸成品中含量较高的氨基酸有谷氨酸和天门冬氨酸,氨基酸成品中以游离态存在的氨基酸主要有天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸和丙氨酸,其余检测出的氨基酸在成品中主要以肽的形式存在。

表3 成品氨基酸组成及含量

氨基酸种类	缩略式	游离氨基酸含量(%)	氨基酸含量(%)	游离氨基酸占氨基酸总量(%)
天门冬氨酸	Asp	0.113 3	0.12	94.42
苏氨酸	Thr	0.001	0.001	100.00
丝氨酸	Ser	0.009 57	0.01	95.70
谷氨酸	Glu	0.134 3	0.14	95.93
脯氨酸	Pro	未检出	未检出	-
甘氨酸	Gly	0.019 44	0.02	97.20
丙氨酸	Ala	0.006 57	0.006 57	100.00
胱氨酸	Cys	0.001 8	0.01	18.00
缬氨酸	Val	未检出	0.01	0.00
蛋氨酸	Met	0.018 16	0.02	90.80
异亮氨酸	Ile	未检出	未检出	-
亮氨酸	Leu	未检出	0.05	0.00
酪氨酸	Tyr	0.003 24	0.06	5.40
苯丙氨酸	Phe	0.002 81	0.01	28.10
赖氨酸	Lys	0.002 69	0.01	26.90
氨	NH ₃	0.009 96	0.04	24.90
组胺酸	His	未检出	0.01	0.00
精氨酸	Arg	未检出	未检出	-
合计		0.313	0.475	65.89

微生物制剂降低胆固醇研究进展

王峰 徐子伟 孙建华

胆固醇是人类生存所必需的,具有重要的生理功能,但体内过量时会造成危害。与胆固醇过量有关的动脉粥样硬化、冠心病、脑中风等心脑血管疾病已严重威胁着人类健康。随着人们生活水平的提高和膳食营养的增加,人们往往因不合理膳食,过多摄入高脂肪、高胆固醇食品,导致血液胆固醇含量超标。因此,研究如何降低动物体内胆固醇水平对生产优良的动物产品具有重要意义。近年来,人们发现多种微生物有降低动物体内胆固醇的作用,一些化学益生菌(如寡糖)也能通过调节肠道内菌群活性,起到降低胆固醇或甘油三酯的作用。本文对几类微生物制剂降低胆固醇的作用机理作一综述,对微生物制剂在饲料产业中的应用提出了展望。

1 微生物降低胆固醇的机理

1.1 通过胆固醇氧化酶途径降低胆固醇

研究表明,多种微生物具有通过氧化作用降解胆固醇的能力,如节细菌(*Arthrobacter*)、短杆菌(*Brevibac-*

terium)、棒状杆菌(*Corynebacterium*)、诺卡氏菌(*Nocardia*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、红球菌(*Rhodococcus*)、裂褶菌(*Schizophyllum*)、沙雷氏菌(*Serratia*)和链霉菌(*Streptomyces*)等。这些微生物含胆固醇氧化酶(*Cholesterol Oxidase, EC, 1.1.3.6, COX*),能氧化降解胆固醇及其同系物。胆固醇氧化酶可氧化产生的胆甾-4-烯-3-酮是胆固醇(27C)完全分解成 CO_2 和 H_2O 的一系列过程中的关键前期中间产物,而产生的 22C 羧酸又可能是侧链降解的关键步骤,但目前物降解胆固醇的具体途径还不十分清楚。

1.2 通过胆固醇还原酶途径降低胆固醇

一些厌氧菌和真细菌产生的胆固醇还原酶可使胆固醇转化为难以被人体胃肠道所吸收的粪甾醇,是益生菌降低胆固醇的另一条途径。而粪甾醇和粪甾酮等类固醇物质被认为是无毒、不易重新吸收和代谢的饱和甾醇。

1991年,美国爱荷华州立大学的 Freier 分离出了产粪甾醇真细菌 (*Eubacterium Coprostanoligenes, EC*),并将它定性为一种个体微小、革兰氏阳性、无芽孢结构、具有胆固醇还原性质的厌氧性球杆菌(*Coccobacillus*)。曾有人利用放射性标记[4- 3H , 4- ^{14}C]胆固醇来培养 EC, 5 d 内 90% 的胆固醇转化成了粪甾醇;该反应中,EC 还原了胆固醇的 4,5 反式双键,并使一个氢从 4C 转移到了 5C 上。对新西兰白兔直接饲喂富含胆固醇

王峰,浙江省农业科学院畜牧兽医研究所,310021,浙江省杭州市石桥路 198 号。

徐子伟,单位及通讯地址同第一作者。

孙建华,浙江大学动物科学学院。

收稿日期:2007-02-26

3 小结

采用氢氧化钠水解法分解糖蜜酒精废液中蛋白,其最佳工艺参数为:氢氧化钠浓度为 40%,液固比为 50:1,水解时间为 2 h,水解温度为 90℃。经本工艺生产的氨基酸产品色泽为乳白色,香气正常。采用氢氧化钠水解微生物蛋白获得的复合氨基酸产品中游离谷氨酸和游离天门冬氨酸含量较其它种类游离氨基酸高,游离氨基酸的总量为 0.313%;天门冬氨酸和谷氨酸含量较其它氨基酸高,氨基酸的总量为 0.475%。

参考文献

- 张寒俊,刘大川.快速水解法制备菜籽复合氨基酸粉的工艺探讨[J].粮食与饲料工业,2005(8):20-21
- 赵希贤,杨抒宁,彭澍.珍珠母水解提取氨基酸工艺的初步研究[J].北京中医药大学学报,2005,28(5):54-56

- 路亮,张学俊,熊静.酸法水解制革下脚料提取混合氨基酸的工艺探讨[J].中国皮革,2000,29(23):29-31
- 尹国强,崔英德,黎新明,等.碱法水解羽毛蛋白的工艺条件研究[J].食品科学,2005,26(9):347-349
- 张国治.碱法水解大豆蛋白的研究[J].食品工业,1998(5):12-13
- 汪何雅,杨瑞金,王璋.牡蛎的营养成分及蛋白质的酶法水解[J].水产学报,2003,27(2):163-168
- 谭斌,丁霄霖.牛肉蛋白水解物的酶解制备[J].无锡轻工大学学报,2005,24(1):59-64
- 章叶江,范宗泽,杨萍,等.双酶法水解鲤鱼头的工艺条件探讨[J].食品科技,2005(1):40-42
- 冯霖.啤酒废酵母菌体变温法自溶的研究[J].资源节约和综合利用,1995(4):31-35
- 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,2002.133-142

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

醇的饲料及 EC, 试验表明, EC 确有在体内降低血胆固醇的功能, 而且喂饲了该活体菌的白兔消化道内的粪甾醇与胆固醇的比要明显高于喂饲经煮沸菌的白兔的。

1.3 红曲霉及其代谢产物的降胆固醇作用机理

红曲霉是一类腐生真菌, 属于真菌门红曲科(Monascaceae)红曲霉属(Monascus), 因其能发酵产生大量天然红色素而著称。20 世纪 70 年代末, Akira Endo 等从收集的泰国食物样品中分离出红曲霉(Monascus rubber No.1005), 并培养提取出代谢产物莫纳可林(Monacolin) K 之后, 国内外科学家才开始重视对红曲霉药用生理功能的探讨。80 年代中期, Akira Endo 等又从红曲霉中分离到了与莫纳可林 K 结构相类似的其它活性物质——莫纳可林 J、L、M、X 等。大量研究已证明, 莫纳可林类物质对于降低机体中血清胆固醇浓度具有显著的效果。

人体内的总胆固醇约有 44% 和 23% 分别在肝脏和肠内合成。肝脏内的胆固醇生物合成经历了以下主要阶段: 醋酸(或醋酸盐、醋酸酯)→3-羟基-3-甲基戊二酸单酰 CoA(HMG-CoA)-甲羟戊酸(MVA)→3-异戊烯焦磷酸酯→鲨烯→胆固醇, 包括近 30 步复杂反应。其中的 HMG-CoA 还原酶(EC, 1.1.1.34)是该合成系统的限速酶, 其活性高低决定着胆固醇合成速率的快慢。莫纳可林类物质能特异性对抗抑制 HMG-CoA 还原酶的活性, 并通过增高载脂蛋白 (apoB.E) 受体活性, 而降低含有 LDL(低密度脂蛋白)、IDL(中密度脂蛋白)及 VLDL(极低密度脂蛋白)的血浆脂蛋白浓度, 代偿性地增加 LDL 受体的活性, 促进血浆中 LDL 的清除, 从而达到降低血胆固醇浓度的目的。研究表明, 莫纳可林类物质在血液中浓度只要达到 0.001~0.005 g/ml, 就能使胆固醇合成受阻。

1.4 乳酸菌的降胆固醇作用机理

许多研究表明, 乳酸菌在体内和体外对胆固醇均有降低作用。为此, 人们对乳酸菌降低胆固醇的机理进行了广泛研究。Gilliland 等(1985)研究证明, 在体外厌氧条件下, 乳酸菌在含胆盐的高胆固醇培养基中生长时, 菌体细胞可吸收同化介质中的胆固醇, 从而导致介质中胆固醇含量下降。Rasic(1992)试验证实了纯培养条件下部分乳酸菌和双歧杆菌(Bifidobacterium bifidum)对胆固醇的吸收同化作用。但是, Klaver 和 Valtder(1993)认为, 乳酸菌和双歧杆菌对胆固醇没有同化作用, 而是在 pH 值低于 6.0 时, 由于乳酸菌和双歧杆菌的胆盐共轭活性增加, 使胆固醇与胆盐形成了

沉淀, 从而降低了培养基中的胆固醇含量。Tarato(1997)等通过对罗伊士乳杆菌(Lactobacillus reuteri)降胆固醇作用的体外研究表明, 胆盐水解酶活性是胆固醇降低的关键所在。目前, 乳酸菌降低胆固醇的机理至今尚没有定论。然而, 一些研究者认为实际上小肠内的 pH 值略高于中性值, 共沉淀很难发生, 因此乳酸菌在体内所表现出的降血脂功能是由于对胆固醇的吸收同化作用或菌体细胞表面对胆固醇的吸附作用。

尽管真正的机理尚无定论, 但人们已越来越倾向于活体乳酸菌和双歧杆菌通过吸收和共沉淀联合作用来降低胆固醇的观点, 而且不同的生长环境影响着细菌主要采取某一种作用机制的取向。Grill(2000)等对食淀粉乳杆菌(Lactobacillus amylovorus, La)和短双歧杆菌(Bifidobacterium breve, Bb)在厌氧条件、不同胆盐影响下的降胆固醇效果及机理作了研究, 发现在含牛黄胆酸的高胆固醇培养基中, 二者均表现出以细胞吸收同化为主(约 50%)的吸收共沉淀联合作用能力; 而在含同浓度牛胆盐的高胆固醇培养基中, 检测结果与含牛黄胆酸时一致, 但 Bb 却倾向于专性的共沉淀作用(68%), 而几乎无吸收作用。根据试验结果推测, 前人对乳酸菌降胆固醇作用机制所持的不同观点可能仅仅是基于不同的反应条件所得, 而并非本质对立。但这仅是纯培养条件下的试验结果, 尚未经动物试验研究, 因而完全用它来解释乳酸菌降低人体血清胆固醇的机理是不充分的。

另一方面, 有人对乳酸菌在食品基质中的降胆固醇作用作了研究发现, 在既没有额外加入游离胆固醇也没有添加胆盐等物质的奶油中, 大部分菌种也能达到 40% 以上的胆固醇吸收率, 尤以几种嗜酸乳杆菌的吸收同化能力最强; 相比较而言, 乳酸菌在食品基质中与胆固醇的共沉淀作用不明显。因此, 可推测活体乳酸菌对胆固醇的降低可能有其它作用机理。

另外, 双歧杆菌有形成烟酸的作用, 烟酸可通过抑制与脂肪合成有关的激素, 从而降低脂肪蓄积量。脂肪代谢受神经内分泌的调节。研究表明, 甲状腺激素、皮质酮等都参与生长中禽类体脂蓄积。因此, 双歧杆菌可能通过调节一些与脂肪代谢有关的激素(如甲状腺激素等)的浓度来控制动物的脂肪沉积。

2 寡糖降低胆固醇的机理

低聚果糖(Fructooligosaccharide, 简称为 FOS)是在蔗糖分子上以 β -1,2 糖苷键结合 D-果糖所形成的寡聚糖。低聚果糖降血脂的机理不是很明确, 可能与肠道吸收的改变、肠道或胰腺的激素分泌、脂蛋白代

谢、胆汁酸代谢有关。低聚果糖可被结肠微生物发酵为短链脂肪酸,如乙酸、丙酸、丁酸,这些短链脂肪酸基本上被完全吸收,在大肠发酵产生的丁酸大部分被肠壁利用,它在猪肝脏中的主要代谢形式是丙酸。Levrat等(1994) 研究报道,果寡糖在肝脏中的主要代谢形式是丙酸。有研究表明,丙酸盐能抑制大鼠肝细胞中胆固醇的合成。因此推测,低聚果糖降胆固醇的可能作用机理和其发酵产物丙酸抑制肝脏胆固醇合成有关。

另一方面,低聚果糖为一种水溶性膳食纤维,其自身有一定吸附脂类的能力,它也可以吸附肠道中的胆汁酸。胆汁酸既有亲水的羟基,又有疏水的烃核,能降低油、水两相之间的表面张力,有利于胰脂酶及胆固醇酯酶的作用。胆固醇酯经胆汁酸盐乳化与酶解后生成游离胆固醇,它与胆汁酸盐、磷脂及脂肪的水解产物甘油一酯、脂酸等结合成混合微团,被小肠粘膜吸收。吸收的游离胆固醇 80%~90%在肠粘膜内又与长链脂肪酸,主要是油酸结合成胆固醇酯,后者大部分渗入乳糜微粒,少量参与组成极低密度脂蛋白,经淋巴进入循环。未被吸收的胆固醇在小肠下段及结肠被细菌还原为粪固醇随粪便排出。因此,低聚果糖通过与胆汁酸盐结合而促进胆汁酸盐从粪便排出,间接减少了胆固醇与脂肪的吸收。

王国杰研究发现,低聚果糖能促使肠道双歧杆菌增殖,而双歧杆菌有形成烟酸的作用,烟酸可通过抑制与脂肪合成有关的激素,从而降低脂肪蓄积量。另外,果糖能使鹌鹑血液中 T_3 浓度升高,因此认为,寡果糖可能通过调节一些与脂肪代谢有关的激素(如甲状腺激素等) 的浓度来控制家禽的脂肪沉积。

3 展望

利用微生物相关方法降低食品和动物体内的胆固醇是近 20 多年来随着人们对营养与健康的要求逐渐提高才发展起来的一项新研究课题。并且由于微生物法相对于其它脱胆固醇的方法具有优势,其应用价值也正被越来越多的研究者和企业关注。目前,主要研究还在食品工业方面,在饲料工业上的很多方面的应用都还处于起步阶段。今后的研究可能集中于以下几个方面:①进一步探明利用胆固醇氧化酶、胆固醇还原酶、红曲霉、乳酸菌和低聚糖降胆固醇过程中的作用机制,以更好地发挥它们在降解胆固醇中的作用;②寻找、开发利用具有降胆固醇功能的其它微生物及其酶或活性物质。如寻求能通过活化胆汁酸合成

限速酶 7-羟化酶等促进胆固醇在肝脏向胆汁酸转化的微生物;③结合分子生物学技术构建高效降解胆固醇的转基因菌株和原生质体融合菌株;④深入研究降低胆固醇微生物的高效发酵技术,为其在饲料工业中的应用提供基础。

参考文献

- 1 卜永士,郭本恒. 乳酸菌对胆固醇降低作用的研究[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(4):371~374
- 2 洪智勇,毛宁. 红曲霉降胆固醇有效成分的研究[J]. 中国调味品, 2002(6):6~8
- 3 屠友金,胡彩虹. 低聚果糖和丙酸钠对肥育猪胆固醇代谢的影响[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(1):65~68
- 4 徐进,严卫星,耿桂英,等. 低聚果糖降血脂作用的动物研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2001, 13(4):7~8
- 5 张德超,王素英,王翠英. 转化胆固醇的微生物在食品中的应用研究[J]. 食品科技, 2004(3):1~4
- 6 张佳程, 骆承焯. 乳酸菌对食品中胆固醇脱除作用的研究——乳酸菌菌种(株)的筛选[J]. 食品科学, 1998, 19(3):20~22
- 7 Freier T A. Isolation and characterization of unique cholesterol reducing anaerobe, Ph. D dissertation [A]. Iowa State University Library, Ames, IA., 1991
- 8 Gilliland S E, Nelson C R, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by lactobacillus acidophilus[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985(49): 377~381
- 9 Grill J P, Cayuela C, Antoine J M, et al. Effects of Lactobacillus amylovorus S and Bifidobacterium brave on cholesterol. Letters in Applied Microbiology, 2000(31): 154~156
- 10 Klaver F A M, van der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile salt -deconjugating activity. Applied and Environmental Microbiology, 1993(59):1 120~1 124
- 11 MacLachlan J, Wotherspoon A T L, Ansell R Q, et al. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications[J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2000(72): 169~195
- 12 Owen T W, Mason A N, Bilton R F. The degradation of cholesterol by pseudomonas species. NCIB 10590 under aerobic conditions [J]. Journal of Lipid Research, 1983(24):1 500~1 511
- 13 Rasic J L, Vujicic L F, Skringer M, et al. Assimilation of cholesterol by some culture of lactic acid bacteria and bifidobacteria. Biotechnology Letters, 1992(14):39~44
- 14 Taranto M P, Sesma F. Bile salthydrolase plays a key role on cholesterol removal by Lactobacillus reuteri. Biotechnology Letters, 1997(19):845~847

(编辑:王 芳,xfang2005@163.com)

饲料中氟超标及动物氟中毒

宋文学 李小兵 谢光洪 张志刚 王哲

1 氟的过量及中毒

氟对动物有一定的营养生理功能,但动物对氟的需要量很低,生产中很少会出现缺乏或不足,而容易出现氟中毒问题。一般情况下,我们称氟为有毒、有害元素,这是因为在动物的饲料中氟含量超过一定限度时会导致动物中毒。氟中毒的主要病变在骨骼和牙齿,并由此而引起其它继发病。生产中以未脱氟或脱氟不完全的磷酸氢钙作为饲料原料,常会导致配合饲料中氟含量过高而引起氟中毒。

有研究表明,动物对氟的耐受量受动物的种类、年龄,摄入氟化物的形态、期限、持续性以及所进食物性质、数量和基础日粮等因素的影响。一般小牛、奶牛、种羊、猪、肉鸡和蛋鸡氟的耐受量分别为40、50、60、150、300和400 mg/kg,超过此限度则可能产生氟中毒。

1.1 急性氟中毒

当大量的氟化物一次性被动物摄食后,则会引起急性氟中毒。氟化物进入动物体内,和胃酸反应产生氟氢酸,强烈刺激胃肠而引起急性胃肠炎。氟化物属于一种原生质毒物,很容易透过各种组织细胞壁,与原生质结合从而破坏原生质。大量的氟被吸收后迅速与血浆中的钙离子结合形成氟化钙,从而出现低血钙症抽搐和过敏,血凝障碍而导致出血和死亡。在生产中急性氟中毒出现的机率并不高,因为骨有积累大量氟的能力,只有摄入的氟超过动物的沉积能力时,氟才会进入软组织,引起生理代谢紊乱或功能异常。

猪正常骨中氟含量可达3~4 mg/kg,猪对氟的最大耐受量为150 mg/kg,若超过这一剂量可导致猪的氟中毒。急性氟中毒的猪主要表现为胃肠炎,呕吐、腹痛腹泻、粪便带血、食欲下降、肌肉震颤、呼吸困难、瞳孔扩大、感觉过敏、易惊恐,随后可能出现虚脱和死亡。

1.2 慢性氟中毒

氟的慢性中毒主要是因长期摄入过量的氟而引起

起的,主要造成骨和牙齿的损害。高浓度的氟被吸收入血液后,氟就会与血液中的钙、镁离子结合,形成不溶性氟化物而使血液中的钙和镁浓度降低。为补充血液中的钙,骨中的钙就会不断的释放出来,破坏了骨钙和血钙之间的成骨和破骨平衡,钙磷代谢受影响从而导致骨骼钙化不足。低血钙又刺激甲状旁腺机能亢进,促使甲状旁腺素分泌增多,从而使骨溶解速度加快,导致骨质疏松。氟还能抑制骨磷酸化酶的活性,使骨中钙的吸收与蓄积减慢,从而引起骨脱钙。由于氟可取代骨骼中羟磷灰石的羟基,变成氟磷灰石,使骨密度增加而发生硬化。

高浓度的氟除对骨造成损害外,对非骨质也有一定的损害。现已证明,与Ca、Mg、Mn、Fe、Cu、Zn等金属有关的酶都容易受氟的影响,这是由于氟与这些金属离子结合而影响了酶的生成和活性,这些酶活性的降低可直接导致糖代谢紊乱及脂肪的利用率下降,由此使机体产生一系列病理过程。日粮中某几种矿物元素不足也可在一定程度上影响氟中毒进程,加重氟中毒程度或出现一些与某种矿物质元素有关的特殊病变。氟可以抑制胆碱酯酶的活性而引起肌肉紧张;抑制乌头酸酶的活性而阻碍三羧酸循环,使氧化磷酸化过程受阻。氟中毒可抑制吞噬细胞和中性白细胞的活性,导致血清中溶菌酶和抗体生成减少,接种后免疫强度降低。氟中毒还会引起甲状腺肿大,影响肝脏代谢从而降低肝脏的解毒功能。有研究证明,氟与钙有特殊的亲和力,易形成氟化钙沉淀而成为尿结石的核心,所以说,氟中毒与尿结石也有一定的关系。

2 氟中毒的防治

导致氟中毒的原因一般为饲料中氟含量超标,饲料中含氟较丰富的原料有磷酸盐、鱼粉、石粉、骨粉。而磷酸氢钙是目前饲料中氟的主要来源,我国规定添加剂磷酸氢钙的含氟量不应超过0.18%。如果生产中由于磷酸氢钙脱氟不够或并未经过脱氟而导致的动物饲料含氟量过高造成氟中毒,则应立即停喂该饲料,并更换氟含量符合国家标准的饲料。增加饲料中蛋白质供给量,避免动物处于频繁的应激状态,也是预防发生本病的较为有效的措施。平时应加强饲养管理,防止病区散养,加强饲料日粮及饮水的保管,防止氟的污染。氟经消化道、呼吸道和皮肤进入体内,在小

宋文学,吉林大学畜牧兽医学院,130062,长春市西安大路5333号。

李小兵、谢光洪、张志刚、王哲,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-04-02

肠前段吸收,而钙盐和铝剂可拮抗小肠对氟的吸收。目前,铝复合物已用于减轻反刍动物氟中毒。磷酸铝、亚硒酸铝、硫酸铝及氧化铝加碳酸钙已被成功地用于减轻反刍动物氟中毒。在饲料中添加氧化铝可增加粪中排氟量,减少骨组织中氟的贮存。其它的如钙盐复合物也被用于减轻氟中毒,增加动物对氟的耐受性。试验表明,在饲料中添加乳酸钙、硫酸钙及葡萄糖酸钙,再配以适量的维生素 A、维生素 B、维生素 C 及维生素 D 等可减轻氟中毒的症状。

3 氟在生产中的应用及检测

氟是动物生长发育所必需的微量元素,但在生产上,氟不需要单独作为一种添加剂在饲料中添加,一般饲料中添加的骨粉、石粉、磷酸盐等原料所含的氟可以满足动物的营养需要。生产上由于饲料中氟的含量过高而导致动物中毒的事件层出不穷。国标规定常用饲料中氟含量为:石粉 $\leq 2\ 000\ \text{mg/kg}$ 、鱼粉 $\leq 500\ \text{mg/kg}$ 、磷酸盐 $\leq 2\ 000\ \text{mg/kg}$ 、骨粉 $\leq 1\ 800\ \text{mg/kg}$ 。

需要特别指出的是,工业化生产的磷酸氢钙含氟

量很高,用作动物饲料时要先把磷酸氢钙进行脱氟,未脱氟或脱氟不完全的磷酸氢钙,常引起氟中毒。

目前国内外主要用湿法磷酸法来生产磷酸氢钙,由于湿法磷酸中氟主要呈氟硅酸形式存在,因此可以利用氟硅酸的特性,采用挥发法及沉淀法使氟呈气态和沉淀态从磷酸中分离出来达到脱氟目的。氟作为动物体中一种必需的微量元素,在饲料生产上有重要的作用,但若氟过量,则会造成严重的中毒事件,造成不必要的经济损失。所以,如何测定饲料中氟的含量显得格外重要。

生产中用氟离子选择电极测定氟含量,其原理是利用氟离子选择电极的氟化镧单晶膜对氟离子产生选择性的对数影响,氟电极和饱和甘汞电极在被测溶液中电位差可随溶液中氟离子活度的变化而改变,电位变化规律符合能斯特方程式的原理来测定饲料中氟的含量。

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

· 光盘推荐 ·

品名	定价(元)	品名	定价(元)	品名	定价(元)
中国牧业企事业单位名录	100	肉鸡饲养管理与屠宰	25	海狸鼠养殖技术	25
畜牧业经济与规模化养殖场经营管理	125	养鸡生产	125	麝鼠 果子狸养殖技术	25
高致病性禽流感预防与控制	25	鸡的饲养	50	兰狐养殖	25
家畜生理学	325	雏鸡和蛋鸡的饲养与管理	25	养鹿	25
兽医微生物学	250	农村养鸡	25	中国对虾的养殖	25
兽医药理学	200	良种肉鸭大棚饲养技术	25	罗氏沼虾 大口鲈鱼的养殖	25
兽医学	375	鸭鹅养殖技术	25	海参人工养殖秘诀	25
瘦肉型猪的繁殖与饲养	25	鸭病防治	25	珍珠的养殖	25
猪的养殖	75	养鹅 蛋鸭的放牧饲养管理	25	河蟹的养殖	50
猪病防治	50	四季鹅的养殖技术	25	实用养鳖新技术	25
养牛技术	75	獭兔	50	塑料大棚控温快速养鳖	25
人工培育天然牛黄	25	兔病防治	25	甲鱼	25
高产奶牛饲养技术	25	家兔的饲养与管理	25	海产养殖致富经	25
肉牛养殖技术	50	家兔繁殖与兔病防治	25	稻田养鱼 河蚌育珠	25
奶牛繁育技术南方梅花鹿养殖	25	养蝎技术	75	黄鳝鳊鱼福寿螺养殖技术	25
养牛养羊学	125	养蛇技术	50	鲍鱼人工养殖秘诀	25
奶牛的饲养管理	50	毒蛇饲养技术	25	流水养鳟	25
牛羊育肥技术	25	鹌鹑及蜗牛的养殖	25	药用虫养殖技术	25
波杂羊繁育饲养技术中华土元养殖技术	25	蜗牛的室内养殖	25	观赏昆虫	25
绵羊山羊养殖技术	50	蜗牛 蚯蚓饲养	25	怎样办好一个养鸽场	25
高腿小尾寒羊饲养秘传	25	肉鸽的饲养	25	怎样办好一个养牛场	25
高效养羊技术	25	肉用犬养殖新技术	25	怎样办好一个养羊场	25

邮局汇款地址:110036沈阳市金沙江街 16 号 6 门(本社发行部收)

联系电话:(024)86391237

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