

中国期刊方阵双效期刊

北方优秀期刊

辽宁省一级期刊

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

2007年第28卷第24期

(总第309期)

(1980年创刊)

主管单位:

辽宁省经济委员会

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610

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)86391257

投稿邮箱:lg@feedindustry.com.cn

网站:www.feedindustry.com.cn

总编辑:陈广鹏

副总编辑:沈桂宇 祁成德

新任编辑:高 雁

广告全权代理:沈阳兴广告有限责任公司

总经理:林 勇

副总经理:荣立南

地址:(110036)沈阳市长江街126号甲

B幢4单元1610室

电话:(024)86276137 86276627

传真:(024)86276127

邮箱:slg@gd6163.com

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出版

国外代号:M4290

国内统一连续出版物号:CN21-1169/S

国际标准连续出版物号:ISSN1001-991X

邮发代号:8-163

发行范围:国内外发行

广告许可证:辽工商广字01-482号

开户行:中信银行沈阳分行惠安支行

帐号:72214101826000548-49

每期定价:6.00元

如需转载本刊文章及图片,请注明
摘自《饲料工业》杂志,并寄样刊。

饲料

SILIAO GONGYE

(半月刊)

工业

企业标识展示



正育人才工程
(0519)7309867



通国集团
(028)85188888



江苏北方
(0412)3343018
(0214)85030922



江苏北方
(0412)3343018
(0214)85030922



布勒(常州)
(0519)7966666



江苏良友
(0519)8830988



东阳自动化
(0571)8719406



科盛机械
(0519)8790658



迪高维尔
www.dabette-victory.com
(029)87035008



科盛机械
(0519)8790658



立达尔
广州立达尔
(0538)7427566



立达尔
广州立达尔
(0538)7427566



依普
上海依普
(021)57687881



依普
上海依普
(021)57687881



康地恩生物
康地恩生物
(0532)88966607



康地恩生物
康地恩生物
(0532)88966607

饲料添加剂

- 1 氨基酸微量元素复合物的制备方法研究进展

林娜妹 李大光 舒绪刚

- 4 天然抗氧化剂的研究概况

朱将伟

- 8 植物提取物添加剂对畜禽肉风味的影响

杨红军 汪 颢 唐维新

酶制剂

- 11 关于饲用酶制剂活性测定影响因素的分析

汤海鹏 汪 勇 李富伟

- 14 植酸酶对肉鸭生产性能的影响

朱建平 陈 明 孙伟鹏等

- 18 鸡蛋清溶菌酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达研究

权志中 张丞斌 余 荣等

水产养殖

- 23 动植物脂肪源替代鱼油对鱼类影响的研究

赵红霞 曹俊明 陈永春等

- 27 四种微量元素对胡子鲶体表色素含量的影响

唐 精 叶元士

- 31 养殖密度对黄颡鱼生长、饲料利用和能量收支的影响

杨严鸥 姚 峰 舒娜娜等

试验研究

- 34 纳米氧化锌与普通氧化锌抑菌性能差异研究

喻兵权 张宏福 陆 伟等

- 38 沼泽红假单胞菌发酵培养的研究

杜 冰 杨公明 刘长海等

- 40 发酵构树叶中乳酸菌的分离、鉴定

杨 雪 陶兴无 柳志杰

饲养试验

- 43 胎次对长大二元杂交母猪繁殖性能的影响

张冬梅 王昕陟 边连金

- 46 不同铜水平对肉杂鸡817#生产性能的影响

王彩玲 牛子青 梅 红等

营养研究

- 49 抗性淀粉对动物肠道代谢的影响

王 瑶 郭应龙 岳双明

- 52 金属硫蛋白及其诱导、分离纯化研究进展

闫海亮 张 晶 丁洪浩等

检测技术

- 54 饲料级硫酸铜含量测定浅析

马金妙 潘金忠

- 56 免疫亲和色谱高效液相色谱法检测鲟鱼肌肉中常山酮的残留

侯亚莉 郭利敏 丁 平等

资源开发

- 59 添加酒精和玉米粉对花生壳微贮效果的影响

杨加梅 章世元

- 62 用水飞蓟药渣与果寡糖或进猪饲料配方的研究

耿春银 韩美兰 廖世国等

氨基酸微量元素螯合物的制备方法研究进展

林娜妹 李大光 舒绪刚

微量元素和氨基酸都是生物体所必需的重要营养要素,微量元素直接或间接地参与机体几乎所有的生理和生化过程,对生物的生命活动起着极其重要的作用,而氨基酸则是构成蛋白质的基本结构单元。铁、锌、铜等微量元素对人体和动物都具有许多重要的作用。微量元素产品经历了三个发展阶段:第一代产品即无机盐类添加剂,如硫酸亚铁、硫酸铜、硫酸锌等;第二代产品为一些简单的有机化合物,如柠檬酸亚铁、富马酸锌、乳酸镁等,但以上二类产品均存在吸收利用率差的缺陷,微量元素之间存在拮抗作用,因此不能充分满足动物体生长的需求;第三代产品为新型的氨基酸微量元素螯合物,由于它具有良好的生物化学稳定性,易为动物体所吸收,无毒副作用,且生物学效价明显高于无机态矿物盐。

氨基酸微量元素螯合物是以二价阳离子与给电子体的氨基酸形成配位键,同时又与给电子体的羧基中的氧构成离子键形成五元环或六元环,一般 α -氨基酸的螯合物为五元环, β -氨基酸能形成六元环。微量元素与氨基酸之间形成的两种键使该化合物构成五元环或六元环,是化学稳定性和生化稳定性很好的螯合物。螯合物中的二价阳离子,如铁、铜、锰、锌、钴等均属过渡元素,且已确认是动物必需的微量元素,由于过渡金属元素电子结构的物化性质常会与富含电子对的氧、氮或硫原子配对形成同时具有离子键和配位键的螯合物,而在必需氨基酸中的中性氨基酸分子中,又有氧、氮、硫原子为构成螯合物提供电子。微量元素与氨基酸结合的螯合物,这种结构使分子电荷趋于中性,在体内 pH 值环境下微量元素的溶解度提高,吸收率增加,生物利用率提高,并阻止螯合物中的微量元素与其它物质形成不溶或难溶的金属化合物,

从而易于被排出体外。

氨基酸微量元素螯合物可由一种氨基酸与某个金属元素制备单一螯合物,也可由一种可溶性盐与氨基酸可水解蛋白质螯合而成,称为金属蛋白或复合氨基酸螯合物。复合氨基酸螯合物针对性不强,含有禽畜不缺乏、不需添加的组分等。单一氨基酸微量元素螯合物虽然成本较高,但其针对性强,可避免重复添加,且添加量少,有利于氨基酸的平衡。单一氨基酸微量元素螯合物的制备方法较多,传统方法为液相法,该法比较成熟,近几年也出现了微波固相合成法。本文主要介绍液相法、微波固相合成法和室温固相合成法制备氨基酸微量元素螯合物。

1 液相法制备氨基酸螯合物

液相法制备氨基酸螯合物的工艺大致为:氨基酸 $\rightarrow$ 溶解 $\rightarrow$ 加金属盐 $\rightarrow$ 调节 pH 值,加热螯合物 $\rightarrow$ 加有机溶剂沉淀 $\rightarrow$ 分离 $\rightarrow$ 干燥 $\rightarrow$ 产品。

1.1 氨基酸亚铁的合成

在接触空气的水溶液中, Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 的存在状态由氧化还原电位和 pH 值共同决定。在酸性很强的溶液中, Fe^{2+} 不易氧化,而当 pH 值 >2 时,随着 pH 值升高, Fe^{2+} 氧化趋势增加;当 pH 值 ≈ 4 时, Fe^{2+} 氧化趋势因其氧化产物为氢氧化铁而急剧增强。 Fe^{2+} 在水溶液中接触空气时的自氧化速度与 OH^- 浓度平方成正比,碱性越强,氧化越快;在 pH 值 >6 时,天然水中的 Fe^{2+} 迅速氧化成 Fe^{3+} 而沉淀。

赵惠敏等将氨基酸溶解在蒸馏水中,在搅拌状况下缓慢加入一定量的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 固体粉末,溶解后用 0.1 mol/l NaOH 溶液调节 pH 值为 7 左右,在水浴上加热并浓缩,静置,分离出沉淀物,干燥粉碎,最后制得褐色粉末样品。林萍等将甘氨酸溶解后经水浴加热至 50°C 恒温,待甘氨酸完全溶解后加入复合抗氧化剂,同时充氮气使溶液处于无氧状态,加入一定量的氯化亚铁,用 40% 氢氧化钠溶液调 pH 值至 5.5,反应后乙醇洗涤沉淀物数次后干燥得产品。采用有机溶剂沉淀法时氯化亚铁能完全溶于乙醇中,并且该实验研究表明三氯化铁也能溶于乙醇。这样,就可以利用乙醇处理反应液,将游离的 Fe^{2+} 或 Fe^{3+} 溶解在乙醇中,而螯合铁在乙醇中沉淀析出。因此用氯化亚铁做铁源,可以实现有机铁和无机铁的分离,提高产品的

林娜妹,广东工业大学轻工化工学院,510006,广州市番禺区广州大学城外环西路 100 号。

李大光,单位及通讯地址同第一作者。

舒绪刚,广州天科生物科技有限公司。

收稿日期:2007-10-12

★ 广州市科技成果重点推广项目(2007CE3G0091)、广东省自然科学基金团队项目(04205301)

纯度。林萍又尝试了氢氧化钙沉淀法,以硫酸亚铁为铁源,用氢氧化钙中和来制备甘氨酸螯合铁。加入氢氧化钙调节反应 pH 值时,溶液中钙离子与硫酸根结合生成硫酸钙沉淀,可以脱除部分的硫酸根,这是去除产品中硫酸根的好办法。

1.2 氨基酸锌的合成

钟国清将甘氨酸(Gly)溶于水,加入碱式碳酸锌,95℃温度下加热搅拌反应 8 h,趁热过滤,滤液于水浴上缓慢加热浓缩至晶膜出现,冷却,析出大量白色晶体,抽滤,用乙醇洗涤,晶体于 P_2O_5 干燥器中干燥 1 周,得到甘氨酸锌。用元素分析、红外光谱、热重差热分析、X 射线粉末衍射对螯合物进行了表征分析,其组成为 $Zn(NH_2CH_2COO)_2 \cdot H_2O [Zn(Gly)_2 \cdot H_2O]$ 。于桂生采用了两种方法制备了蛋氨酸锌,一种方法是按锌与蛋氨酸物质的量比为 1:2,称取七水硫酸锌和蛋氨酸置于三颈瓶中用蒸馏水溶解,加入氢氧化钠溶液,调节体系的 pH 值在 6~7 之间,三颈瓶的一口装一个盛有氢氧化钠溶液的滴液漏斗,另一口装上球形冷凝管,加热回流。在反应过程中以适当的速度滴加氢氧化钠溶液以保持体系的 pH 值在 6~7 之间,回流 1 h 后,螯合反应完成;停止加热、冷却,使结晶析出,抽滤,母液转入烧杯中,蒸发掉部分溶剂,冷却,滤集析出的晶体。另一种方法是在烧杯中加入水,加热至沸腾,缓缓加入蛋氨酸,并加入盐酸溶液,加热至蛋氨酸全部溶解,溶液呈透明淡黄色。在不断搅拌情况下,加热维持温度在 70~80℃之间,将 $Zn(OH)_2$ 缓慢加到蛋氨酸溶液中,继续搅拌反应 40 min。冷却、过滤,用水洗涤至滤液中无 SO_4^{2-} 时,再用无水乙醇洗涤一次,将产品移至表面皿上,于 114℃烘干,得白色产物蛋氨酸锌。

1.3 其它氨基酸微量元素螯合物的合成

Daver M 等在热的氨基酸水溶液(60~70℃)中加入 5-水杨醛硫酸钠或 3-甲氧基-5-水杨醛硫酸钠,搅拌 30 min 后逐滴加入 $Zn(Ac)_2$ 同时用 0.5 mol/dm³ 的 NaOH 溶液调节 pH 值为 7,在 60~70℃温度下搅拌 1 h 后,在室温下冷凝 1 夜。将白色沉淀物过滤后用乙醇或乙醚洗涤,自然干燥得到氨基酸席夫碱。O. Versiane 等将 3 mmol 的胍基醋酸(GAA)和 3 mmol 的甘氨酸或丝氨酸(Ser)溶解在去离子水中,在 60℃温度下搅拌直到完全溶解,再加入 3 mmol 的硝酸铜。在 60℃温度下搅拌 8 h 后在 4℃冷却 24 h,过滤后用 KOH 调节滤液的 pH 值为 4.3,缓慢蒸发得到蓝色晶体,用乙醇洗涤后在 50℃下干燥 2 h,最后得 $CuGly-mGAA$ 和 $CuSer-mGAA$ 。Dana

Gingas 等将摩尔比为 2:1 的 $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 和 $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ 溶解在水中,然后加入甘氨酸 $[2Fe(NO_3)_3 : 1Cu(NO_3)_2 : mGly, m=8 \text{ 或 } 4.5]$ 。当 $m=8$ 时得 $[Fe(III)_2Cu(II)(NH_2CH_2COO)_4(OH)_3(NO_3) \cdot H_2O]$; 当 $m=4.5$ 时得 $[Fe(III)_2Cu(II)(NH_2CH_2COO)_6(NH_2CH_2COOH)_2(NO_3)_2]$ 。Agristudi 等采用一步法制备了 $[CH_3SCH_2CH_2CH(OH)COO]_2M \cdot nH_2O$ ($M=Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}$)。Giovanni Predieri 等制备了 $[CH_3SCH_2CH_2CH(OH)COO]_2Fe \cdot 2H_2O$ 。A. Stanila 等将 2 mmol 的蛋氨酸(L_1)或丙氨酸(L_2)溶解后加入到蒸馏水中,蛋氨酸需缓慢加热使其溶解,加入 NaOH 溶液调节 pH 值为 8~10,另将 1 mmol $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ 溶解后加入其中,搅拌几分钟后过滤沉淀,水洗后自然干燥 $[Cu-L_1] \cdot H_2O [Cu-L_2] \cdot H_2O$ 。P. Arranz 等按配位比 1:1 和 1:4(金属/配体)合成了 $Zn(L)_2(H_2O)_4 \cdot 6H_2O$ 和 $\{Cd(\mu-L)Cl(H_2O)_2\} \cdot H_2O\}_n$ [$L = N-2(4\text{-amino-1,6-dihydro-1-methyl-5-nitroso-6-oxopyrimidinyl})glycine$]。1:1 比率形成的配合物间的作用力比较弱,实验表明 1:4 配比比较合适。

1.4 液相法制备氨基酸微量元素螯合物的工艺条件

氨基酸配体与金属离子的摩尔比即投料比,是影响螯合反应的重要因素。理论上讲,配位比太小则螯合程度不高,不能形成稳定的螯合物;配位比太大则螯合物稳定性过高,微量元素难以被生物体吸收利用,同时也会造成氨基酸的浪费,经济上不划算。故要求螯合反应既能达到一定程度的最小配位比以保证产品质量,又要能充分利用氨基酸。根据文献可知一般最佳配位比为 2:1。

螯合反应受酸度条件的影响较大,在 pH 值较低的酸性条件下,由于酸效应的影响,氨基酸难以解离,不能同金属离子配位形成稳定的氨基酸微量元素螯合物;而在 pH 值较高的碱性条件下,金属离子则会发生水解,以氢氧化物的形式沉淀析出。一般情况下 pH 值控制在 6~7。

氨基酸与金属离子的螯合反应为吸热反应,反应温度越高对反应越有利,但若反应温度太高,反应时间过长将导致反应不彻底,且温度太高容易破坏氨基酸及其螯合物;若反应温度太低,则螯合反应速度较慢,收率较低。一般温度控制在 70~80℃。

2 微波固相法制备氨基酸微量元素螯合物

利用微波技术加热化学物质进行反应,其速度较传统加热技术快数倍乃至数千倍。正是基于这种原因,微波加速有机化学反应引起了广泛的关注。微波固相法制备氨基酸螯合物的制备工艺大致是将反应

物充分混合后将混合物放进试管,用微量进样器加入引发剂(一般为水、乙醇等),然后进行微波催化合成,反应后进行洗涤干燥。

2.1 各种氨基酸微量元素螯合物的合成

钟国清以甘氨酸和氧化钙为原料,用微波固相化学法合成了甘氨酸钙螯合物,并用化学元素分析、IR、TG-DTA、X-射线粉末衍射对螯合物进行了表征,确认其组成为 $[\text{Ca}(\text{Gly})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ 。李亮等以硫酸亚铁、蛋氨酸(Met)为原料对食品营养强化剂蛋氨酸亚铁螯合物的微波固相合成进行了研究。确定最佳反应条件为:配位摩尔比 2:1、微波辐射时间 180 s、引发剂(水)添加量 14%、反应物粒度 140 目、吸附剂添加量 14%,用乙醇提取纯化螯合物。经化学元素分析、红外光谱分析表征产物,确定蛋氨酸亚铁螯合物的组成为 $\text{FeMet}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 。安徽农业大学饲料科学技术研究所用乙酸锌和蛋氨酸合成了白色的蛋氨酸锌。胡亮等以氯化锌和蛋氨酸为原料,利用微波固相的方式合成了蛋氨酸锌螯合物,确定了最佳反应条件为:配体摩尔比 2:1、微波加热时间 240 s、引发剂(水)添加量 12%、反应物粒度 140 目、碳酸钠添加量 20%,经红外光谱分析和元素分析,确定蛋氨酸锌的组成为 $\text{Zn}(\text{Met})_2$ 。

2.2 微波固相法合成氨基酸微量元素的工艺条件

配体摩尔比对螯合率的影响同液相法相似。在一定的微波输出功率下,微波辐射时间是影响反应螯合率的重要因素。辐射时间太短,则螯合不完全;辐射时间太长,螯合率也会下降,可能是由于微波处理时间过长造成反应体系温度过高,积累的热量无法快速释放,导致产物分解的缘故。一般物质对微波吸收能力主要是由介电常数和介质损耗角正切来决定的。为了更好地吸收微波,引发反应,需要加入微量引发剂来加速反应,且适量的引发剂可以避免产物的焦糊、分解,有利于反应的进行。从理论上讲,反应物的颗粒越小,越能增加不同物质间的接触频率,提高反应的螯合率。但是,太小的颗粒度会增加原料的加工时间和成本。固相反应物的表面接触程度、反应产物表面晶核形成速度、反应产物表面晶核更新速度是决定固相反应速度的三大因素。在反应物中加入的碱是作为脱酸剂,能迅速中和反应过程中产生的副产物——酸,调节反应体系的酸碱度,促进反应向正方向进行。加碱量不是越多越好,而应根据实验的具体情况而确定。

3 室温固相合成氨基酸微量元素螯合物

室温固-固反应的发生起始于两个反应物分子的

充分接触,接着发生键的断裂和重组等化学作用,生成新的产物分子。产物分子分散在原反应物中,当积累到一定大小后,出现产物的晶核,随着晶核的长大,达到一定大小后出现产物的独立晶体,即固相反应经历扩散、反应、成核、生长 4 个阶段。

Dana Gingasu 等将配比为 2 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$:1 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$:4.5 Gly 的原料混合在研钵中研磨直到均匀、粘稠的溶液形成,然后放在 P_2O_5 中干燥,48 h 后得到 $[\text{Fe}(\text{III})_2\text{Cu}(\text{II})(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO})_6(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2](\text{NO}_3)_2$ 和 $[\text{Fe}(\text{III})_2\text{Cu}(\text{II})(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO})_{4.5}](\text{NO}_3)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。P. Arranz 等按配位比 1:1 合成了 $[\text{Zn}(\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ 和 $[\text{Cd}(\mu\text{-L})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]_n$ 。王莉等以醋酸铜和甘氨酸为原料,利用一步室温固相化学反应合成了分布均匀、粒径 20~30 nm 的金属配合物 $\text{trans-}[\text{Cu}(\text{Gly})_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})]$ 球形的纳米粒子,在该反应基础上,通过在体系中添加适当表面活性剂做软模板,成功制备了直径 100~150 nm,长度达几个微米的 $\text{trans-}[\text{Cu}(\text{Gly})_2]$ 纳米棒。朱妙琴将摩尔比为 2:1 的甘氨酸和醋酸铜晶体在室温下混置于研钵中研磨 60 min 后得到了甘氨酸铜。

室温下,充分的研磨不仅使反应的固体颗粒变小以充分接触。室温固相反应主要跟固体的表面积、反应物的组成和结构等因素有关。

4 结论与展望

传统的液相法制备微量元素氨基酸螯合物存在合成时间长、成本高、需要大量的碱液中和螯合产生的氢离子、生成大量盐类等副产物、存在废液污染、纯化工复杂等缺点。微波作为一种电磁波,能高速促使分子极化旋转,增加反应物分子的碰撞频率。微波加热的非传导性加热效应,可以加速化学反应的进行。

采用微波法固相合成螯合物,可提高化学反应速度、减少能耗、简化工艺并降低废液排放和环境污染。但微波辐射存在易焦化副产品的问题,而且实际工业生产时采用微波进行辐射也不方便。

室温固相合成是新兴的合成方法,比起微波辐射可以简化工艺。固相反应不仅不使用溶剂,可以减少对环境的污染,而且反应选择性高,副反应少,所以可以尝试用此方法进行合成。但目前对室温固相合成氨基酸微量元素螯合物的研究比较少。

(参考文献 39 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:王芳,xfang2005@163.com)

天然抗氧化剂的研究概况

朱将伟

按照美国食品药品监督管理局(FDA)定义,所谓抗氧化剂是指作为延滞因氧化所引起的劣变、酸败或变色的物质^[1]。食物的氧化腐败往往引起风味变化、营养价值下降、毒性物质的产生。抗氧化剂可保护食物的色、香、味,避免维生素等营养素的损失,抗氧化剂一般可分为油溶性和水溶性两类,油溶性包括天然的 VE 和人工合成的没食子酸丙酯(PG)、抗坏血酸酯类、丁羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)等;水溶性包括 VC、异 VC 及其盐类、植酸、苯多酚等。目前食品工业主要使用人工合成抗氧化剂 BHA 和 BHT^[2],它们的抗氧化性能良好,但化学合成抗氧化剂的安全性一直是十分敏感的问题,动物试验表明,用 BHT 及其代谢产物 BHT-OOH、BHT-OH、DBQ 和 BHT-SCH₃ 注射到雄性幼鼠腹膜内,会使鼠肺细胞增生、肺组织增重。在日本,BHA 只能用于棕榈油和棕榈仁油抗氧化作用;美国、欧共体等国已禁止使用合成抗氧化剂。许多国家对其添加量已加以严格限制,《FAO/WHO 食品标准法典》明确规定了合成抗氧化剂的添加量^[3]。以具有安全性高、抗氧化能力强、无副作用、防腐保鲜等特点的天然食物抗氧化剂日益受到重视。为了满足食品以及饲料(宠物食品)生产的需要,研究开发广谱、高效、安全的天然抗氧化剂已经成为食品添加剂研究领域中的热点。目前,世界各国开发的大量天然抗氧化剂产品,受到了人们的普遍关注。

1 天然抗氧化剂的来源

1.1 中草药提取物

近年来,国内一些研究报告指出,甘草、阿魏、红参、当归、生地、酸枣仁、银杏等中草药及其成分均有抗脂质过氧化作用,能有效抑制丙二醛(油脂过氧化终产物)的生成。

从甘草中提取的抗氧化成分,是一种既可增甜调味、抗氧化,又具有生理活性(能抑菌、消炎、解毒、除

臭)的功能性食品添加剂。甘草的提取物甘草甜素能抑制肝中单纯疱疹型病毒糖蛋白的合成,甘草皂甙能促进胆固醇排泄。甘草抗氧化物具有较强的清除自由基,尤其是氧自由基的作用,可抑制油脂的酸败,并对生成油脂过氧化终产物丙二醛有明显的抑制作用^[4]。

阿魏、川芎、根荭等植物中所含的阿魏酸具有抗氧化作用,其苯环上的羟基是抗氧化的活性基团,可消除自由基,抑制氧化反应和自由基反应。阿魏酸钠还能抑制 OH 诱导的脂质过氧化反应,保护生物膜的结构和功能。人参茎根、三七根等植物中提取的天然化合物人参皂甙 Rb1 具有显著的抗脂质过氧化作用,它不但可以直接消除自由基,还可通过间接过程消除自由基。

马希汉等的研究表明,银杏叶的石油醚-乙醇提取物具有抗氧化活性,特别是对猪油的抗氧化效果可以与 BHT 媲美。孟洁等对厚朴进行了抗氧化作用研究,结果表明,不同溶剂的厚朴提取物对 DPPH 自由基均有清除作用,其中以乙醇提取物的清除能力最强,厚朴乙醇提取物对亚油酸、猪油的脂质过氧化有良好的阻断作用^[5]。

Kim 等对 180 种中草药的甲醇提取物的抗氧化作用进行筛选,发现乌附子、白屈菜、细辛等 11 味中药具有极强的抗氧化能力,其中淫羊藿、丁香、补骨脂是不同极性的提取物,黄芩、甘草的甲醇提取物抗氧化性能最为突出。补骨脂的甲醇提取物对猪油的抗氧化性良好,HPLC 的分析表明,其中含有大量的 VE^[6]。Su 等人用乙醇提取 195 种中草药的研究表明,其中 22 种强于等重量的 VE 的抗氧化能力,金锦香、石榴皮、马鞭草的甲醇提取物和金锦香、三七草、芡实、钩藤的乙酸乙酯提取物的抗氧化能力均强于 BHA。

1.2 辛香料提取物

香辛料植物是天然植物抗氧化剂的重要来源,这类植物主要有迷迭香、鼠尾草、百里香、牛至草、丁香、薄荷、胡椒、生姜、芝麻、大蒜等。国内外对辛香料植物的抗氧化功能均有大量报道。

Chipult 等(1951)报道,迷迭香和鼠尾草具有较好

朱将伟,上海市南汇农技中心,201300,上海。

收稿日期:2007-11-12

的抗氧化能力。Inatani 等(1982~1984)从迷迭香干叶的正己烷提取物中分离得到 3 种酚系二萜化合物:迷迭香酚、表迷迭香酚和异迷迭香酚,它们对猪油和亚油酸都有很强的抗氧化能力,尤其对猪油的抗氧化能力是 BHA 和 BHT 的 4 倍。唇形科百里香的精油中含有百里香酚和香芹酚等抗氧化成分。Yayoh 等从百里香的丙酮提取物中分离得到 6 种黄酮类物质及 5 种联苯化合物,发现 3 种黄酮类化合物和 2 种联苯化合物的抗氧化能力与 BHT 相当。唇形科牛至草的正己烷或乙醚提取物对猪油的抗氧化能力与 BHA 相当;大蒜中含有多种烯丙基化合物,有一定的抗氧化活性^[7]。Lee 等研究指出,胡椒类黄酮、亲脂酚类和其它非极性化合物具有抗氧化活性,其中毛地黄黄酮(3,4,5,7-四羟基黄酮)抗氧化能力最强,这种强抗氧化活性归因于芳香环上的邻苯羟基。Kikuzaki 等从生姜中分离出 14 种酚类化合物,其中 12 种化合物具有比 VE 强的抗氧化能力。芝麻是使用最早的辛香料之一,芝麻油的稳定性高是因为芝麻酚及 γ -生育酚的作用,后来研究发现芝麻油中尚有多种抗氧化物,如芝麻酚二聚物、丁香酸、阿魏酸与 4 种木聚糖系列化合物。生姜也是人们喜爱的辛香料,姜中的姜油酮、6-姜油醇、6-姜油酚均具有较强的抗氧化活性^[8]。Nakatani 等还从胡椒的三氯甲烷提取物中得到 5 种酚系酰胺,它们均是无色、无味的化合物,抗氧化活性优于 α -生育酚。

1.3 茶叶提取物

茶叶富含一类多羟基的酚类物质,称为茶多酚,是十分优良的抗氧化剂。中国农科院茶叶研究所于 1984 年开始研究茶叶天然抗氧化剂,分离出了一系列茶叶抗氧化成分。在猪油、大豆油、菜油、花生油等食用油脂中添加 0.02%~0.08%的茶叶天然抗氧化剂,证明其具有优异的抗氧化活性,过氧化值和酸价的抑制率在 90%以上,抗氧化的效价比 VE 高 5 倍,与 VC 和 VE 合用时有协同增效作用^[9]。1988 年,卫生部正式公布了茶叶天然抗氧化剂为我国食品添加剂之一。此后,关于茶叶抗氧化的机理及应用研究不断深入,在整个天然植物抗氧化剂的研究中起着先锋作用,其抗氧化的主体成分茶多酚已成为衡量天然植物抗氧化成分功效的参照物^[10]。

1.4 果蔬提取物

众多果蔬类植物亦表现出优异的抗氧化性能。许

申鸿等研究表明,葡萄籽和葡萄皮水提取物对羟基及 DPPH 自由基均有较强的清除作用。国外对葡萄提取物的抗氧化性研究及应用十分活跃,法国等不少国家已将葡萄籽作为原料制备葡萄籽提取物,并将其加入到红葡萄酒中,以提高其抗氧化活性物质含量及葡萄酒的品质。张立新等对 21 种蔬菜抗氧化能力的比较研究中发现,茄子(尤其是茄子皮)、苤菜、菜椒、西红柿对 DPPH 的抑制率较高,具有较高的抗氧化活性^[11]。钱明赛在测试的 11 种水果中发现,草莓的抗氧化性最高,其次是李子、柳橙等。郭长江对坚果类食物清除 $\text{ROO}\cdot$ 作用的研究发现,葵花籽具有较强的清除 $\text{ROO}\cdot$ 作用,花生、核桃次之。程霜等研究表明,绿豆皮中乙酸乙酯萃取物具有较强的抗氧化性能,0.03%的乙酸乙酯萃取物抗氧化性优于相同浓度的 VE,略低于化学合成的抗氧化剂 TBHQ^[12]。

1.5 其它天然抗氧化物质

在食品加工和贮存过程中常常发生非酶催化的褐变反应,它是糖的羰基和蛋白质或氨基酸的氨基之间发生的缩合反应,这种反应称为美拉德反应,其反应产物具有抗氧化性,反应进行程度越深,其产物的抗氧化效果越明显。石轶松曾对永川豆豉中通过美拉德反应得到的类黑精的抗氧化性进行了研究发现,各种添加量的豆豉类黑精均有抗氧化作用,其中 0.5%和 1.0%添加量抗氧化效果较明显,1.0%的添加量与 0.2%的 BHT 作用相当^[13]。翁新楚等对多胺型化合物精胺的抗氧化性质进行了研究发现,在 0.02%~0.08%的范围内有较强的抗氧化作用,并随浓度的升高而急剧升高,酚型抗氧化剂 BHA 和 BHT 也有较强的抗氧化性能,但较多胺型弱^[14]。另外,还有一些生物碱、愈疮酸和某些微生物的代谢产物都具有一定的抗氧化作用。

2 天然抗氧化剂的活性成分及抗氧化机理

具有抗氧化性质天然物质结构类型主要有:黄酮、单宁、维生素类、醌、含氮化合物、植酸、苯丙素、香豆素、萜类、烯酸等。其中较重要的有以下几种:

2.1 酚类

酚类化合物是一族结构中含有酚的化合物,广泛存在于植物食品中。酚类抗氧化剂有从橄榄油中分离出来的羟基酪醇、松脂醇、乙酰松脂醇;从芒果种仁中分离出的鞣花酸、木质素或阿拉伯木聚糖与酚性物质的结合产物;从茶叶中获取的表没食子儿茶素、表没

食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯以及儿茶素;从蔷薇果中获取的羟基肉桂酸、儿茶素^[15]。

酚类是极好的氢或电子供体,由于形成的酚类游离基中间体的共振非定域作用和没有适合分子氧进攻的位置,因而比较稳定,不会引发新的游离基或者由于链反应而被迅速氧化,所以是很好的抗氧化剂^[16]。

2.2 黄酮类

黄酮类化合物是植物光合作用产生的一大类化合物,包括以黄酮(2-苯基色原酮)为母核的一类黄色色素和黄酮同分异构体(异黄酮)及其还原产物(黄烷酮)。迄今认为其作用机制至少包括3种:①通过酚羟基与自由基进行抽氢反应生成稳定的半醌自由基,从而中断链式反应以完成抗氧化作用;②通过抗氧化剂的还原作用直接给出电子而清除自由基^[17];③通过抗氧化剂对金属离子的络合,降低若干需金属离子催化的反应,从而间接实现抗氧化作用。

2.3 维生素

2.3.1 β -胡萝卜素

β -胡萝卜素是维生素A的前体,有很好的抗氧化性能,能通过提供电子来抑制活性氧的生成达到清除自由基的目的,能清除单线态氧,减少光过敏作用,也是单线态氧的淬灭剂。

2.3.2 维生素E

存在于自然界中的 α -生育酚、 β -生育酚、 γ -生育酚和 δ -生育酚及 α -三烯生育酚、 β -三烯生育酚、 γ -三烯生育酚和 δ -三烯生育酚共8种同族异构体,统称为维生素E,均有很强的抗氧化活性,其中 α -生育酚是已知生物活性最大的一种生育酚。维生素E能经过一个自由基中间体氧化成醌,将 $\text{ROO}\cdot$ 转变成化学性质不活泼的 ROOH ,中断脂类过氧化的连锁反应,有效地抑制脂类过氧化作用^[18]。

2.3.3 维生素C

维生素C是一种重要的自由基清除剂,能通过逐级供给电子而转变成半脱氢抗坏血酸和脱氢抗坏血酸以达到清除活性氧自由基的目的。

2.4 含氮化合物

具有抗氧化活性的含氮化合物主要属于生物碱、杂环氨基酸、肽或有机胺类,如茶叶中的咖啡碱和咖啡中的咖啡因,还有马钱子碱、金雀花碱、精胺等。影响生物碱和杂环氨基酸抗氧化活性的结构因素主要

是立体结构和电性因素。杂环中氮原子“裸露”在外有利于充分接近活性氧并与之反应,抗氧化效果就较好;有机胺的抗氧化活性与其离子势有关^[19,20]。

2.5 植酸

也叫环己六醇六磷酸酯,大多以钙、镁、钾的复盐形式存在。植酸有很强的螯合能力,由于金属离子(如铁离子、铜离子)与其形成了螯合物,可减少金属离子所催化的氧化作用。一般螯合剂单独使用效果不佳,但对其它抗氧化剂有协同增效作用。柠檬酸、多聚磷酸作为抗氧化剂与此类似^[21]。

3 抗氧化活性的评价

目前,虽然有多种生物的、化学的鉴别天然抗氧化剂的抗氧化活性强弱的方法,但尚未形成一种标准方法。研究抗氧化剂抗氧化活性的思路一般是:先以化学或物理的方法,在某一研究体系,如水溶液体系、光照体系、酶体系、细胞体系或组织体系中产生氧自由基,并对这一体系造成损害,然后采用氧自由基检测技术,如电子自旋共振(electron spin resonance, ESR)波谱解析技术等,对氧自由基及其氧化产物进行检测,从而对抗氧化剂的抗氧化活性及机理进行研究。这些研究方法在不同程度上都能反映出抗氧化剂的抗氧化活性,但结果极易受实验条件的影响,尤其对于那些以生物实验为基础的方法,由于操作繁琐,加上生物实验不确定性因素相对增加,使得实验结果往往对实验条件有很强的依赖性。有些抗氧化剂在不同的实验模型中表现出来的抗氧化活性相差很大,甚至有时有助于氧化现象发生,从而阻碍了人们对其抗氧化作用的正确评价^[22]。

近年来兴起的以电化学分析技术研究天然抗氧化剂的抗氧化活性的方法有望解决这一难点。电化学分析技术研究天然抗氧化剂抗氧化活性的理论基础是:氧自由基清除剂的抗氧化作用是通过电子转移清除氧自由基,其在电极上的氧化反应与其在体内的抗氧化反应类似。由此,氧自由基清除剂的电化学特性,如氧化电位、电子转移数等,应与其抗氧化活性密切相关,氧化电位值应是其最基本的抗氧化活性指标,氧自由基清除剂的电极反应行为有助于解释和推测其抗氧化机理^[23]。国内外关于利用外电化学分析法研究天然抗氧化剂抗氧化活性的报道,充分表明电化学技术研究抗氧化剂的抗氧化活性具有广阔的前景。

最近也有报道用DFT和AMI结合的量子化学方

法计算抗氧化剂的 O-H 键解离焓和电离势,并以此为理论指标评价其抗氧化活性,也取得了很理想的效果^[24]。

4 存在的问题和研究方向

4.1 我国目前对天然抗氧化剂研究有相当一部分还停留在未纯化或部分纯化的萃取物上,而国外已经将纯化的提取物商品化,如分离纯化葡萄籽中的原花青素的二聚体和三聚体用于化妆品、功能食品等。虽然天然抗氧化剂在实际应用中并不一定要求是单体,但研究中应尽量分离并收集一系列单体化合物,研究其抗氧化机制、化学结构与抗氧化活性及稳定性关系,并为人工合成高效抗氧化剂提供指导。

4.2 单一活性成分抗氧化作用往往弱于混和物,应重视对抗氧化活性成分之间抗氧化协同作用的研究,寻找并合成高效、低毒、复合型抗氧化剂。

4.3 天然抗氧化物进入生物体后本身及其代谢产物的生理功能等方面的研究应受到重视。

4.4 有些天然抗氧化剂具有一定毒性,在使用前需进行相关毒理学实验。

4.5 如何运用现代生物技术或其它技术来实现已知天然抗氧化物的工业化生产而需进一步研究。

5 结束语

以天然食用抗氧化剂取代合成抗氧化剂是今后食品工业的发展趋势,开发实用、高效、成本低廉的天然抗氧化剂仍是天然抗氧化剂的研究重点。尤其在我国的食品添加剂中,抗氧化剂是最薄弱的一环,因此,对于天然食用抗氧化剂的研究开发亟待加强。

参考文献

- 1 李文林,黄凤洪.天然抗氧化剂研究现状[J].粮食与油脂,2003,2(10):10~13
- 2 赵爱云.新型天然抗氧化剂茶多酚的研究进展[J].中国食品添加剂,2005(5):78~80
- 3 杨洋,韦小英.国内外天然食品抗氧化剂的研究进展[J].食品科学,2002,6(10):137~138
- 4 Tian yun, LU xiangyang, He xiaojie. Scavenging Capacities on Oxygen Radicals of Natural Plant Antioxidants [J]. Food Science, 2005, 35(6):123~125
- 5 孟洁,胡迎芬,胡博路.厚朴抗氧化作用研究[J].中国油脂,2000,25(4):30~33
- 6 李文智.我国天然抗氧化剂的研究及应用 [J].西部粮油科技,2003,12(3):39~40
- 7 Qiao fengyun, Chen xin, Yu liuqing. Research on the Antioxidative Factors and Natural Antioxidants [J]. Bulletin of Science and Technology, 2006, 22(3):332~336
- 8 Lin Mao, Kan Jian-quan. Application on antioxidant of ginger [J]. China Food Additives, 2007, 33(1):151~154
- 9 杨怀霞,马庆一,杨林莎.茶叶及诃子等植物提取物的抗氧化作用[J].郑州大学学报(医学版),2003,38(3):413~415
- 10 邹盛勤.茶叶的药用成分、药理作用及应用研究进展[J].中国茶叶加工,2004,12(3):35~37
- 11 赵文恩.类胡萝卜素抗氧化性质的研究[J].郑州大学学报(工学版),2003,24(1):38~46
- 12 程永强,张海涛,石波.功能性食品以及其中的功能性成分的最新发现[J].食品科学,2004,25(S1):197~200
- 13 张余,骆会婷.食品类黑精的研究进展 [J].中国食品添加剂,2005,4(3):11~14
- 14 Xu Zongyun. Detection of Antioxidant Capacity to 37 Plant Samples by DPPH·Method [J]. Journal of Tarim University of Agricultural Reclamation, 2004, 16(2):1~4
- 15 Jin Ying, Sun Aidong. Food Sources and Bioavailability of Polyphenols[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 30(9):101~106
- 16 Baoshan Sun, G. Pedro Belchior. Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds [J]. Journal of Chromatography A, 1999(841):115~121
- 17 陈贵林,李建文,何洪巨.蔬菜类黄酮研究进展[J].中国食物与营养,2007,20(1):57~59
- 18 Li S G, Zhao W H. Study on the Progress of Edible Oil Antioxidants and its Safety[J]. Cereals & Oils, 2006, 13(5):34~37
- 19 郑炜.果蔬抗氧化作用机理及评价方法研究进展[J].浙江林业科技,2004,24(2):59~63
- 20 Zai-un Liu, Lan Ping Ma, Bo Zhou, et al. Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein [J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2000, 751(6):53~63
- 21 吕艳春.天然抗氧化剂在食品工业中的应用[J].邯郸农业高等专科学校学报,2002,17(1):23~24
- 22 Pan J Q. Study and Application of Antioxidant in Polymer Area[J]. Polymer Bulletin, 2002, 7(1):57~66
- 23 何建波,徐红梅,朱燕舞.电化学方法研究天然抗氧化剂[J].化学与生物工程,2004,4(5):10~12
- 24 郑诗超,陈宗道,阙健全.油脂天然抗氧化剂研究进展[J].粮食与油脂,2003,17(6):43~44

(编辑:王芳,xfang2005@163.com)

植物提取物添加剂对畜禽肉品风味的影响

杨红军 汪 鲲 唐维新

1 营养成分对风味的影响

风味(flavor)是衡量肉品质的一个重要指标,指食物刺激味觉或嗅觉受体而产生的综合生理反应(郭锋等,2003),即摄入口腔的食物使人产生的味觉、嗅觉、触觉等各种感觉的总和(田刚等,2000)。肉品风味包括滋味(savor)和香味(aroma)两部分,分别与人的味觉和嗅觉有关(Yamaguchi 等,1998a)。

肉的香味由肉受热过程中产生的挥发性物质刺激嗅觉而产生,这些挥发性化合物主要由肌肉中的氨基酸、核苷酸、还原糖类和脂肪酸等基质在受热过程中产生的不饱和醛、酮(Cross 等,1965)、含硫化合物以及一些杂环化合物等组成(钟炜,2004)。关于肉香味的起源有两种学说:①瘦肉起源学说,认为香味来自瘦肉中水溶性香味前体物质在加热时所产生的含 N、S 的芳香类化合物;②脂肪起源学说,认为香味来自脂肪而不是瘦肉。一般认为,瘦肉产生基本肉味,而不同畜禽间的特有肉味则来自脂肪(郭锋等,2003)。

滋味通过味觉产生,是由水溶性物质与味蕾受体相互作用而形成的味道,酸、甜、苦、咸是 4 种基本味道,而鲜味被认为是第 5 种基本味道。鲜味是一种复杂的综合味感,其呈味物主要有两类,一类是氨基酸类,主要是谷氨酸钠盐(MSG,又称味精)、甘氨酸及小肽;另一类是核苷酸类,主要有肌苷酸(5'-IMP)和鸟苷酸(5'-GMP)(陈继兰,2004)。

风味是一项复杂的综合指标,风味物质种类繁多,目前已经发现的风味物质就有近千种(王晓明,2004),其分子结构缺乏普遍规律性(Wasserman,1979),因此,对风味进行量化是比较困难的,其评定主要靠专家的品尝来确定(刘梅等,2003)。肉味前体物质是研究肉风味的前提和开端,它有助于解释肉味的起源。目前的

研究主要源于氨基酸、脂肪及脂肪酸、糖原和肌苷酸与鸟苷酸等几类。

1.1 氨基酸对肉品风味的影响

氨基酸的种类及含量的高低是决定肉品风味优劣的重要因素(聂磊等,2006)。Batzer 等(1962)研究认为,丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、 β -丙氨酸、脯氨酸和苏氨酸等是肉香味的必需前体物,如果这些氨基酸含量的提高,则预示着肉品风味的改善。谷氨酸钠和天冬氨酸钠与咸味有关,甘氨酸、赖氨酸、羟脯氨酸等与甜味有关(何叶如,2003)。肉中的鹅肌酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸等能在口腔中停留,故食后回味无穷(姚勇芳,2001)。氨基酸的呈味与其物理化学结构有关,如果谷氨酸羧基端带有疏水能较小的氨基酸(如天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸)时,就能呈现肉汤鲜味(Arai,1973)。从目前的研究结果来看,对鲜味贡献最大的氨基酸为谷氨酸和甘氨酸,它们是肌肉鲜味的基本成分(曹特等,2005)。

饲料中氨基酸的含量将直接影响畜禽肌肉中的含量,为了提高畜禽肉品的风味,各种有致鲜作用的氨基酸将被重新考虑,如组氨酸的配给量在原 NRC 基础上还需考虑形成肌肽和鹅肌肽以及抗氧化的需要(Kuo 等,1999)。赖氨酸不但能改进滋味还能促进肌肉脂肪合成(Witte 等,2000)。谷氨酸虽属非必需氨基酸,但它是重要致鲜成分,在后期配方中的重要性是不言而喻的,其最佳配比值得进一步研究(张伟力,2003)。

1.2 脂肪及脂肪酸对肉品风味的影响

脂肪加热能产生游离脂肪酸、醛、酮等呈味挥发物,且与肉熟化过程中生成的还原糖、肽类、氨基酸等肉香前体物有很好的亲和力,在加热过程中产生特殊的香味(曹特等,2005)。

肌肉脂肪通常被分为肌间脂肪和肌肉脂肪(Intra muscular fat, IMF)。肌间脂肪是指存在于完整的肌肉块之间的脂肪,而肌肉脂肪则是均匀分布于肌肉组织中的脂肪(杨龙江,2000),它们与肌肉中的膜蛋白质紧密结合在一起。肌肉脂肪是肌肉滋润多汁的物理因

杨红军,北京天福莱生物科技有限公司,100097,北京海淀区。

汪鲲、唐维新,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-11-12

子,也是产生风味化合物的前体物质(李德发,2003),肉质风味随肌肉脂肪增加得到持续改善,而肌间脂肪在肉品风味形成中的作用很小。

肌肉脂肪的主要成分是磷脂(60%~70%) (李凤娜等,2006),而肌间脂肪的主要成分是甘油三酯。英国的肉品风味研究者 Mottram 等(1991)研究证实,磷脂是肉品风味的重要前体物质,磷脂通过 Maillard 反应(Oleagineux 等,1997)而产生香味。与甘油三酯相比,磷脂富含不饱和脂肪酸,如亚麻酸和花生四烯酸等,特别是含 4 个以上不饱和键,具有 22 个碳原子的长链不饱和脂肪酸,极易被氧化,氧化(或降解)产物直接影响风味成分的组成,继而改善肉品风味(侯生珍,2000)。刘秀荣等(1997)研究认为,土杂鸡的气味香、味道好是因为亚麻酸和亚油酸含量高,土杂鸡亚麻酸含量是快大型鸡的 11.78 倍。

肌肉脂肪被认为与肉质及口感呈正相关,影响肉质的嫩度、剪切力、风味等,但是多余的肌肉脂肪却会影响肉的口感(束婧婷等,2006)。通常,新鲜猪肉产品的肌肉脂肪在 2%~3%时较为理想 (Fernandez 等,1999)。

1.3 肌苷酸(IMP)对肉品风味的影响

肌苷酸(inosine monophosphate,IMP)又称次黄嘌呤核苷酸,是一种单核苷酸,属于芳香杂环化合物,其结构具有空间专一性,作为 ATP 代谢的中间产物天然存在于肌肉中(丁耐克,1996)。Kodama 等(1913)研究发现,肌苷酸具有鲜味特征(张海艳等,2004),而且是鲜味最强的物质,其鲜味是味精的 50 多倍(汪以真等,2000;陈国宏等,2000)。畜禽肌肉中的肌苷酸作为一种鲜味物质,已成为衡量肉质是否优良的一项重要指标(蔡海峰等,2004)。

IMP 还是形成肉香味的重要前体物 (Arya 等,1979;Cambero 等,1992)。肌苷酸和肌苷酸降解产生极活泼的核糖和磷酸核糖,在加热过程中与氨基酸发生 Maillard 反应,产生各种挥发性香味物质,肌苷酸不但可增强食品风味,而且能抑制食品中硫磺味、苦味等不良风味(陈继兰,2004)。

有研究表明,IMP 在畜禽肉类、鱼肉中的含量较为丰富,是主要鲜味化合物,如猪肉和鸡肉中 IMP 含量分别是游离谷氨酸的 8.7 倍和 4.5 倍(Ninomiya,1998)。目前,世界上已有不少国家把肉品中 IMP 含量作为影响肉质的重要指标之一(Fujimura,1998)。

Penny(1956)研究指出,腺苷酸(AMP)脱氨主要发生在非正常生理状态,如剧烈运动或尸僵时,而动物活体中 IMP 含量很少(Bendall 等,1957;李建军,2003)。动物宰杀后,供氧停止,短时间内由糖酵解(肌肉僵直)供能合成一定量三磷酸腺苷(ATP)。与此同时,ATP 在 ATP 酶的作用下迅速降解为二磷酸腺苷(ADP),ADP 在肌酸激酶的作用下,分解成 AMP。AMP 在脱氨酶(腺嘌呤核苷酸脱氨酶)作用下,脱氨形成肌苷酸(IMP),肌肉中 IMP 及其降解产物的积累可使肌肉鲜味增加(田刚,2001)。IMP 形成后的降解过程相对缓慢,而且降解速度直接受肌肉保存温度的影响(陈继兰,2004)。

核苷酸类物质与谷氨酸钠共用,有强烈的增鲜作用(南基哲等译,1994)。肌苷酸与谷氨酸钠以 1:5~1:20 的比例混合,谷氨酸钠的鲜味可增至 6 倍(张海燕等,2004);而 Maga(1994)发现,当两者比例为 1:1 时,鲜味强度是等量谷氨酸钠鲜味强度的 30 倍,这表明各呈味物质的协同作用可能是决定肉品风味的重要因素,但是最佳的混合比例还需要进一步的研究。

1.4 硫胺素对肉品风味的影响

硫胺素受热时可产生以含硫化合物为主的多种挥发性香味物质(Buttery 等,1984),已鉴定的 68 种硫胺素分解产物中含硫化合物占 50%以上,这些化合物在肉受热过程中产生浓郁的香味。

2 植物提取物添加剂对风味的影响

2.1 甜菜碱

甜菜碱,化学名为三甲基甘氨酸,是一种无毒、无害,类似于维生素的天然化合物,其味甘甜(张乙山等,2006),广泛分布于动植物体内。甜菜碱具有活性甲基供体,为机体提供甲基,因而可以替代胆碱和蛋氨酸(王友明,2001)。

动物自身是难以合成甲基的,需由食物摄取,甜菜碱是直接有效的甲基供体,它直接参与脂肪代谢、氨基酸的生成等各种生化过程,是合成蛋氨酸、胆碱、肉碱、肌酸、磷脂等若干具有生理作用的物质所必需的(王宏等,1999)。同时,甜菜碱脱掉甲基后可转变成甘氨酸,而甘氨酸是嘌呤核苷酸从头合成途径的一重要底物(Rudolph,1994)。占秀安等(1999)研究认为,甜菜碱可能是通过肝脏合成多量的肉碱和肌酸,促进肌细胞内脂肪酸的 β -氧化反应,加速三羧酸循环,产生的能量主要以磷酸肌酸形式储存,然后转化为 ATP,

最终便能形成较高含量的肌苷酸,从而改善肉的风味(孙德文等,2002)。

汪以真等(2000)报道,日粮中以添加 1 000 mg/kg 水平的甜菜碱能显著提高猪肌肉脂肪和肌苷酸含量,提高肉的鲜味。甜菜碱还能提高猪脂肪酶的活性,促进体脂的氧化分解,降低猪背膘厚(汪以真等,2001)。占秀安等(1999)报道,饲料中添加甜菜碱可显著提高艾维茵肉鸡肌肉中的肌酸、肌苷酸等的含量。Shette(1993)报道,甜菜碱可使肉鸡体脂分布均匀,提高肉的嫩度和适口性。耿家驹(1999)报道,在肉鸡饲料中添加甜菜碱可使鸡肉中肌苷酸的含量增加。有试验表明,随甜菜碱添加量增加,鸡胸肌 IMP 含量呈明显增加趋势,500 mg/kg 和 1 000 mg/kg 组鸡肉 IMP 含量极显著高于对照组和 250 mg/kg 组($P<0.01$)。

张拴峰(2004)试验结果表明,在饲料中添加 1 000 mg/kg 甜菜碱明显地改善了肉质,其中肌酸、肌苷酸和肌红蛋白含量较对照组分别提高 17.28%、26.92%、9.15%。王述柏(2004)试验结果表明,鸡胸肌肌肉脂肪有随甜菜碱添加量增加而升高的趋势,腹脂沉积和皮脂厚有明显减少趋势,说明甜菜碱可促进机体脂肪的分解。

2.2 大蒜素

生化分析表明,大蒜中含有丰富的构成鸡肉香味的主要成分(孙德文等,2002)。鸡肉、鸡蛋中的香味成分主要是 $C_3H_5-S(O)$ 基团,而大蒜中的硫醚化合物含有这一结构,在鸡饲料中添加大蒜素能生产具有鲜美香味的产品(王能友,2004)。同时,大蒜粉能有效地调整刺激动物肌肉产生香味的氨基酸,使肉品风味提高(张拴峰,2004)。在鸡日粮中添加 1%~2% 鲜大蒜或 0.2% 的大蒜粉,鸡肉的鱼腥味便会消失,鸡肉香味变浓(于千桂,2006)。大蒜素能增强鸡肉香味成分,使肉更鲜(张春雷等,2002)。

2.3 茶叶

茶叶中富含多酚类化合物(TP),它是一类活性成分,属纯天然抗氧化剂,其抗氧化作用比维生素 C 和维生素 E 强,长期饲喂添加适量茶叶的饲料,猪肉中的维生素 E 含量可增至一般猪肉的 3 倍,肌苷酸含量也有所提高,使肉味更佳(侯慧丽等,2006)。

2.4 复方中草药

中草药饲料添加剂,是指以中国关于中草药的物性、物味和物间相互关系的传统理论为指导,按照人

类的意图,以提高动物生产和饲料利用率为目标,确保人类健康和生态环境平衡为目的,添加于饲料中的纯天然物质。近年来,中草药在肉质风味改善方面的研究已受到日益重视。研究显示,中草药添加剂能够明显地提高兔(杲仁义,2001)、猪(张先勤等,2002)、鸡(王权等,1996)的肉品风味。中草药饲料添加剂影响肉品风味变化可能与提高氨基酸和肌苷酸含量,改善脂肪酸等多种综合因素有关。

聂磊等(2006)试验表明,添加中草药组猪肉中各种氨基酸的含量均比添加抗生素组高,且谷氨酸、脯氨酸含量有显著提高($P<0.05$)。何叶如(2003)研究也表明,添加 0.15%~0.20% 的中草药(由北京天福莱生物科技有限公司提供),谷氨酸和甘氨酸分别提高了 14.29%、5.26%,能够显著改善肉质风味($P<0.05$);添加 0.35% 和 0.70% 中草药组的肌苷酸含量分别提高了 6.29% 和 9.43%,谷氨酸和甘氨酸含量分别提高了 0.15%、2.89% 和 0.95%、4.14%;0.35% 添加组的亚油酸(C18:2)含量提高了 22.98%(钟炜,2004)。

刘彦慈(2004)试验发现,在基础日粮里添加 1% 的中草药,肉仔鸡肌肉中的肌苷酸提高了 22.40%($P<0.05$);添加 1.5% 的中草药,与风味有关的谷氨酸、胱氨酸含量分别提高了 61.94% ($P<0.01$) 和 22.28% ($P<0.01$);一定程度上改善了肌肉中的脂肪酸组成,其中显著提高了不饱和脂肪酸的比例,尤其是 C18:3 和 C18:2 的比例。品尝试验结果表明,中草药对鸡肉的风味有所改善,这与肌肉中氨基酸、脂肪酸及肌苷酸含量的测定结果一致。

中草药添加剂具有提高肌肉中鲜味和甜味氨基酸含量和肌肉中肌苷酸含量的趋势,能有效改善肉质风味,是有效替代抗生素的绿色环保型饲料添加剂(夏中生等,2006)。

总之,风味是一项复杂的综合指标,风味物质种类繁多,对其量化研究是比较困难的。同时,植物提取物添加剂的功能较多,其对肉质风味的改善是显而易见的,但有些机理还不是很清楚,因此,有必要继续加强该方面的研究,从而更好的改善畜禽肉质风味。

(参考文献 63 篇,刊略,需者可函索)

(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



关于饲用酶制剂活性 测定影响因素的分析

汤海鸥 汪 勇 李富伟

饲用酶制剂是酶制剂工业的一个重要方面,饲用酶制剂的使用已经有 50 多年的历史,但饲用酶制剂的快速发展期却只是在最近的 10~15 年时间。近年来,随着生物技术的发展,酶制剂的发酵活性得到极大提高,生产成本日渐下降,酶制剂得以越来越多的被应用在饲料中,目前已经形成了庞大的饲用酶制剂市场,其中常用的饲料酶制剂主要有植酸酶、淀粉酶、蛋白酶和非淀粉多糖酶等 4 大类。而随着酶制剂生产发展的需要,酶制剂活性的检测在日常工作中显得越来越重要。目前我国饲料工业标准中已经确立了植酸酶、纤维素酶、 β -葡聚糖酶活性的测定方法。另外,许多企事业单位也制定了其它酶制剂活性的测定方法。

但是以化学方法检测酶制剂的活性时存在许多变异因素,这些因素对不同酶制剂的影响不是平行和同步的,需要对酶制剂活性的检测方法和检测过程有一个正确的理解。因此,本文就饲用酶制剂活性测定影响因素进行了总结分析,以便为酶制剂的应用提供参考。

1 影响饲用酶制剂活性测定的四大要素

所谓的酶活性是指在特定的系统和条件下测到的反应速度。为了确保酶制剂测定结果的一致性,饲用酶制剂活性单位定义中对影响酶活大小的主要条件进行了规定,其中包括温度、pH 值、时间和底物,这些都是酶活性测定系统中最重要因素,对酶促反应速度影响很大。

1.1 温度对酶活性测定的影响

酶制剂对温度非常敏感,在检测过程中对温度的控制非常重要。温度对酶活性的影响主要表现在两个方面,一方面是当温度升高时,酶与底物的反应速率

加快;另一方面由于随着温度的升高将使酶的稳定性下降,部分酶蛋白分子逐渐变性而失去活性,引起酶反应速率下降。温度的这两种影响的综合作用而产生酶反应的“最适温度”。对于不同的酶制剂在不同的情况下最适温度有一定的差别。研究木聚糖酶时发现,在 30~40 °C 条件下酶活较稳定,50 °C 后随着温度的升高,酶活性开始下降,90 °C 时基本失活(李卫芬等,1999)。研究纤维素酶最适酶解条件时发现,在 36~58 °C 之间纤维素酶相对酶活性随着温度升高而升高;当温度在 58~62 °C 之间时,相对酶活性没有明显变化,曲线近似呈水平状态;在 40、45、50 °C 条件下,其相对酶活分别为 56%、70%、80%,而当温度大于 58 °C 以上时相对酶活性不再升高(王琳等,1998)。同时,酶在不同条件下适宜温度也可能要受到酶的纯度、底物、激活剂、抑制剂以及酶促反应时间等因素的影响。

1.2 pH 值对酶活性测定的影响

pH 值对酶活性的测定结果影响很大,各种酶制剂在一定条件下都有其特定的最适酶解 pH 值,酶的最适 pH 值会随着底物种类和浓度、缓冲液种类和浓度的不同而改变,因此,最适 pH 值也只有在一定条件下才有意义。pH 值影响酶活性的原因可能有以下几个方面:①过酸或过碱可以使酶的空间结构破坏,引起酶构象的改变,也影响酶活性部位催化基团和结合基团的解离状态,使酶活性丧失;②当 pH 值改变不是很剧烈时,酶虽未变性,但酶活性受到了影响。pH 值影响了底物的解离状态,或者使底物不能和酶结合,或者结合后不能生成产物。pH 值影响酶分子活性部位上有关基团的解离,从而影响与底物的结合或催化,使酶活性降低可能影响到中间络合的解离状态,不利于酶解生成产物;③pH 值影响维持酶分子空间结构的有关基团解离,从而影响了酶活性部位的构象,进而影响酶的活性;④pH 值影响底物的带电状态。这些都直接影响酶和底物的亲和力,影响酶解反应速度(王静,2003;李险峰,2000)。据文献报道,很多酶的最适酶解 pH 值都在 3.0~6.0 之间 (NAKAMURA T,

汤海鸥,北京挑战生物技术有限公司,100081,北京市海淀区中关村南大街 12 号。

汪勇、李富伟,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-11-27

1997)。研究不同 pH 值对嗜热毛壳菌木聚糖酶活性的影响发现,在 pH 值 3.6 以前,随着 pH 值的增大,木聚糖酶的活性逐渐升高;pH 值为 3.6 时,木聚糖酶的活性最高,且在 3.2~4.4 范围内木聚糖酶的活性维持较高浓度,维持嗜热毛壳菌木聚糖酶活性的适宜 pH 值范围应为 3.2~4.4(王爱娜等,2006)。杨会涛等(2006)研究 pH 值对木聚糖酶活性影响的结果表明,该酶的最适反应 pH 值为 6.0。洪枫等(2000)在研究木聚糖酶最适 pH 值时指出,里氏木霉 RutC-30 合成的木聚糖酶的最适 pH 值范围在 4.0~5.0 之间,pH 值对木聚糖酶的酶活性影响很大。

1.3 作用时间对酶活性测定的影响

酶催化反应的动力学表明,酶解是一个有一定时间差的过程,当酶解产物达到一定浓度后会对酶产生反馈抑制作用,因而反应速度随着时间延长会越来越慢,所以酶解并非酶解时间越长越好。测定木聚糖酶酶促反应从开始至 30 min 内的产物生成量,结果表明,13 min 内产物的吸光度随反应时间几乎呈线性增加,其斜率可以代表酶促反应的初速度,此后速度减慢(单位时间内产生的还原糖量呈下降趋势),相对酶活逐渐降低(费笛波等,2004)。用 DNS 法测定纤维素酶活性时,反应 1 min 后,酶作用底物产生的还原糖量随时间延长呈直线上升;5 min 后还原糖量的增加变得比较缓慢;10 min 后,曲线呈现水平状态,还原糖量不再增加,以后随着时间的延长相对酶活性逐渐降低(王琳等,1998)。

1.4 底物对酶活性测定的影响

底物的选择对酶活性的测定影响也很大。米氏方程表达了酶反应速度与底物浓度之间的定量关系,其反应方程式可表示为: $E+S \rightleftharpoons ES \rightarrow P+E$,首先酶(E)和底物(S)作用形成中间产物(ES),然后形成产物(P)并释放出酶(E)。在此平衡反应中,底物的浓度将影响反应速度。当底物浓度较低时,底物浓度与酶活性成正比关系;当底物浓度增加到一定浓度时,酶活将趋于一个极限值,这时酶已被底物所饱和,所以在测定酶活性时,底物浓度应大于这个极限值,这样酶活性直接正比于酶浓度而与底物浓度无关,否则会极大地影响测定结果。研究底物浓度对木聚糖酶活性测定的影响,结果表明:底物浓度对测定结果有较大影响,底物浓度越高,测定结果也越高;底物浓度在 0.006~0.032 g/ml 时,酶活性的升高与底物浓度呈显著正相

关;当底物浓度升高到 0.032 g/ml 以上时,酶活性随底物浓度的升高幅度趋缓(聂国兴等,2002)。研究底物对纤维素酶活性测定影响,结果表明,以 Sigma 公司生产的 C5678 为底物,纤维素酶活性测定值明显高于以上海产的羧甲基纤维素钠为底物的测定值,且 C5678 浓度大于 3% 后,其浓度对纤维素酶活性测定值无明显影响(顾赛红等,2006)。

2 影响饲用酶制剂活性测定的非定义要素

在进行酶制剂检测的过程中,除了以上分析的几点酶活性定义中规定影响饲用酶制剂测定结果的因素外,酶活性测定方法中还存在许多对酶活性测定结果影响很大的非定义因素,这其中包括样品酶的稀释度、标准曲线的制作、显色剂的配置、缓冲液的离子强度等。

2.1 酶液稀释度对酶活性测定的影响

测定酶样时进行稀释可能带来两种效应,一是影响酶的稳定性;二是降低样品中原有抑制因素和辅助因素的浓度。目前测定酶活性的方法通常是先把酶稀释,然后测定稀释酶的活性,所得到的结果乘以稀释倍数即为原酶的活性。但是,事实上许多酶的活性和稀释倍数并不成比例关系。据陆文清等(2002)分析,选择酶样的稀释倍数实质上是选择酶分子与底物分子之间的数量比例,二者的比例只有在适当的范围内酶蛋白的活性才与产物的生成量呈线性正比例关系。酶样稀释倍数过大会影响酶活的稳定性,稀释倍数不同最终获得的酶活性测定值有很大差异(顾赛红等,2006)。费笛波等(2004)为探讨稀释率对木聚糖酶测定结果的影响,将酶样稀释度从 1 000 倍升至 11 000 倍,结果表明,稀释度的改变明显影响酶活性的测定结果,稀释度低,因吸光值太大使结果大大偏低;但稀释度过大因 A 值过小,结果也偏低。因此,测定时应规定合理的吸光值范围(以 0.2~0.5 为宜),以获得相对稳定的测定结果。

2.2 标准曲线对酶活性测定的影响

标准曲线是酶制剂检测过程中能求出检测值的唯一对照依据,曲线方程的大小直接影响换算出来的测定值。为了减少系统误差给测定带来的影响,标准曲线制作时应尽可能和样品在同一条件下反应。标准曲线的制作一般可以采用相对法和绝对法两种形式,相对法是借助已知准确含量的酶标准对照品作标准曲线;绝对法则是用一些酶活性定义中规定的反应产

物来衡量酶解产物作标准曲线。相对于绝对法,相对法测定结果精度高、速度快、费用低。分析来自不同实验室的测定结果表明,两种方法的精确度有近 3 倍的差异(张若寒,2001)。绝对法适用于法定的质量认证及仲裁机构标定植酸酶标准品含量,为一般单位常规测定提供基准物质,相对法适用于一般有日常测定需要的机构或企业。

2.3 显色剂的配置对酶活性测定的影响

在酶制剂检测反应的最后都要对反应产物进行显色,并以不同的方式对比产物的生成量,一般应用分光光度计法较多,也有用滴定法等其它方法。其中,显色剂类型的不同、相同显色剂但其中物质配比的不同、显色剂在反应中添加量的不同以及显色时间的不同,都会产生不同的反应结果,对酶活性检测的值也会产生一定的影响。植酸酶活性测定的机理都是利用酶水解植酸钠底物形成无机磷,然后测定无机磷的释放量,采用 4 种显色方法对比测定植酸酶反应产生的无机磷,分别是:丙酮-磷钼酸铵法、钒-钼酸铵法、维生素 C-钼蓝法、钼蓝法,对比结果表明,丙酮-磷钼酸铵法较其它 3 种方法更具有优势(黄遵锡等,1999)。聂国兴(2002)研究了 DNS 量对木聚糖酶活性测定的影响,结果表明,由于 DNS 用量变化,测定结果也发生了明显变化,DNS 用量在 3 ml 时测得的酶活性最高。王琳等(1998)研究 DNS 法测定纤维素酶活性最适条件,结果表明,DNS 显色 5 min 比较适宜。

2.4 缓冲液的离子强度对酶活性测定的影响

反应体系中缓冲液的离子强度影响酶制剂的蛋白空间结构,从而影响其催化能力。所以,测定酶活性时应尽可能统一反应缓冲液的种类和离子强度。研究植酸酶测定所用缓冲液时发现,使用柠檬酸缓冲液测定商业植酸酶(真菌植酸酶和细菌植酸酶)的酶活性仅相对于使用乙酸缓冲液的 65%~70%(Nelson E. Ward 等,2007)。Dalsgaard 等(2007)研究发现,用柠檬酸缓冲液检测两种大肠杆菌植酸酶的酶活性只相当于用乙酸缓冲液得到的酶活性的三分之一。

3 结语

酶活性的测定在饲用酶制剂产品的质量检验、产品标签和酶活性保证方面是必不可少的。酶活性测定是一种非常细致的工作,以上分析了一些影响酶制剂检测的主要影响因素,但在酶制剂检测的过程中,有些细节问题对酶制剂检测也会产生一定的影

响,如一些操作细节、离心速度、摇匀力度和次数、搅拌时间、移液器的正确使用以及玻璃仪器的清洁度等。这些细节可能不是酶制剂研究工作者非常关注和研究的焦点,但对一些性质不稳定的酶制剂进行检测时,这些细节问题的疏忽也会对结果产生较大的影响。所以,在饲用酶制剂活性检测过程中,不但要注意影响酶制剂活性测定的主要因素,正确把握各影响因素的关键点,对于一些其它的细小影响因素也同样要关注,尽量把酶制剂检测过程中每一个要点和步骤做好。

参考文献

- 1 李卫芬,孙建义,许梓荣,等.木聚糖酶的稳定性研究[J].云南农业大学学报,1999,14(3):250~253
- 2 王琳,刘国生,王林嵩,等.DNS 法测定纤维素酶活力最适条件研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),1998,26(3):66~69
- 3 王静.Aspergillus ficuum 菊粉酶及其酶解菊芋制备低聚果糖的研究[D].博士学位论文,无锡:江南大学,2003
- 4 李险峰.猪肾氨基酰化酶纯化及性质研究[D].硕士学位论文,大连:大连理工大学,2000
- 5 NAKAMURA T, SHITARA A, MATSUDA S, et al. Production, purification and properties of an endo-inulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulinase[J]. J. Ferment. Bioeng., 1997, 84(4): 313~318
- 6 王爱娜,杨在宾,杨维仁,等.温度和 pH 值对嗜热毛壳菌木聚糖酶活性影响的研究[J].家畜生态学报,2006,27(3):35~38
- 7 杨会涛,陈代文,余冰. pH 对木聚糖酶活性的影响[J].饲料博览,2006(7):42~44
- 8 洪枫,陈牧,余世袁.木聚糖酶最适 pH 值的研究[J].纤维素科学与技术,2000,8(2):13~17
- 9 费笛波,冯观泉,袁超.饲用木聚糖酶活性测定方法的研究[J].浙江农业学报,2004,16(2):53~58
- 10 聂国兴,李春喜,张建新,等.底物浓度、DNS 量对木聚糖酶活性测定结果的影响[J].饲料工业,2002,23(11):24~25
- 11 顾赛红,赵志辉,陈海燕,等.底物和酶液稀释对黑曲霉纤维素酶活性测定的影响[J].中国饲料,2006(7):9~13
- 12 陆文清,李德发.影响饲料酶活力测定的因素分析[J].饲料研究,2002(5):15~18
- 13 张若寒.植酸酶含量测定的必要性与两步测定方法的评价[J].饲料工业,2001,22(9):1~5
- 14 黄遵锡,章克昌,徐柔.植酸酶活测定不同方法的比较研究[J].饲料工业,1999,20(12):20~22
- 15 Nelson E. Ward, Donnie R. Campbell. Phytase activity expression requires understanding [J]. FEED AND LIVESTOCK TECHNICAL BULLETIN, 2007(9):10~15

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

植酸酶对肉鸭生产性能的影响

朱建平 陈 明 孙伟鹏 魏 敏 吴广兵 汝应俊

摘 要 选用 2 880 只樱桃谷 M3 肉鸭,分为 6 组(每组 6 个重复,每个重复 80 只肉鸭),对植酸酶在不同的营养浓度下对肉鸭饲料中的潜在营养价值(磷、钙、代谢能和氨基酸)进行生产应用评估。结果表明:①降低日粮中磷、钙、代谢能和氨基酸的量而不添加植酸酶,肉鸭的生长发育明显受阻,料重比升高,并伴有较严重的腿病发生;②降低日粮中磷、钙、代谢能和氨基酸后,添加植酸酶可显著改善料重比、提高体重和成活率、降低腿病率,各个生产指标达到了正对照组的水平,而经济效益高于正对照组。

关键词 植酸酶;养分利用率;料重比;肉鸭

中图分类号 S816.32

1 材料与方法

1.1 试验时间和地点

本试验于 2006 年 4~5 月在山东呱呱鸭食品有限公司进行。

1.2 试验分组

试验选用 2 880 只 1 日龄樱桃谷 M3 肉鸭,分为 6 组,每组 6 个重复,每个重复 80 只肉鸭。试验分 3 个阶段:0~14 d 为前期、12~28 d 为中期、29~42 d 为后期,由于植酸酶不耐制粒温度,而且没有后喷涂设备,

故试验料饲料全部为粉料。

1.3 分组依据

按我国南、北方肉鸭养殖水平不同,试验饲料分成二大类别,一种按北方养鸭模式设计配方;另一种按南方养殖模式设计配方,并在每一大类配方类别中设正对照组、加植酸酶试验组与不加植酸酶负对照组,其中植酸酶添加量为每千克饲料加入 500 FTU,具体分组情况见表 1。

1.4 试验配方设计

表 1 试验设计与分组

营养水平	组别	日粮设计
低营养浓度(南方地区)	试验 1 组(正对照组)	低营养正常日粮
	试验 2 组(植酸酶组)	负对照组+植酸酶
	试验 3 组(负对照组)	低营养日粮(调低钙、磷、代谢能、氨基酸)不加植酸酶
高营养浓度(北方地区)	试验 4 组(正对照组)	高营养正常日粮
	试验 5 组(植酸酶组)	负对照组+植酸酶
	试验 6 组(负对照组)	高营养日粮(调低钙、磷、代谢能、氨基酸)不加植酸酶

按南方养鸭模式与北方养鸭模式,参照南、北方肉鸭配方与原料特点,设计与南方低营养浓度模式和北方高营养浓度模式配方相类似的正对照组日粮配方见表 2。

利用丹尼斯克 Phytcheck®¹ 禽畜潜在营养价值模型,在添加植酸酶后对肉鸭前期、中期、后期配合饲料中各营养指标的潜在提高值为基础(如表 3),在试验正对照组基础上降低相应潜在营养提高量,设计负对照组配方如表 4。植酸酶试验组则在每千克负对照组日粮中添加 500 FTU 植酸酶,加酶后由于潜在营养提高而与相应的正对照组营养水平接近。

表 2 正对照组日粮配方及营养水平

项目	低营养浓度			高营养浓度		
	前期	中期	后期	前期	中期	后期
原料(%)						
玉米	61.55	70.35	76.62	55.27	61.22	67.47
花生粕	2.00	3.00	4.00	1.00	2.00	3.00
豆粕	28.20	16.80	8.20	34.50	26.00	17.40
菜粕	2.00	3.00	4.00	1.00	2.00	3.00
棉粕	2.00	3.00	4.00	1.00	2.00	3.00
磷酸氢钙	1.65	1.45	0.90	1.65	1.40	0.85
石粉	1.30	1.10	0.93	1.28	1.08	0.93
食盐	0.30	0.30	0.35	0.30	0.30	0.35
前期预混料	1.00	-	-	1.00	-	-
中期预混料	-	1.00	-	-	1.00	-
后期预混料	-	-	1.00	-	-	1.00
油脂	-	-	-	3.00	3.00	3.00
合计	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平						
代谢能(MJ/kg)	11.66	12.00	12.25	12.29	12.5	12.75
粗蛋白(%)	20.01	16.99	15.00	20.99	19.02	17.02
钙(%)	1.00	0.85	0.65	1.00	0.85	0.65
总磷(%)	0.67	0.62	0.51	0.67	0.61	0.51
可利用磷(%)	0.45	0.40	0.30	0.45	0.40	0.30
赖氨酸(%)	1.00	0.83	0.68	1.05	0.94	0.77
蛋氨酸+胱氨酸(%)	0.81	0.68	0.57	0.85	0.75	0.65

朱建平,江南大学食品学院,副教授,214122,江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号。

陈明、孙伟鹏、魏敏,单位及通讯地址同第一作者。

吴广兵、汝应俊,丹尼斯克动物营养,广州。

收稿日期:2007-11-05

表 3 不同营养水平日粮中添加植酸酶 500 FTU 可提高的潜在营养值

项目	低营养浓度			高营养浓度		
	前期	中期	后期	前期	中期	后期
可利用磷(%)	0.120 0	0.120 0	0.120 0	0.120 0	0.120 0	0.120 0
钙(%)	0.110 0	0.110 0	0.110 0	0.110 0	0.110 0	0.110 0
代谢能(kJ/kg)	267.058 1	270.175 1	266.298 6	263.281 9	270.175 1	266.298 6
粗蛋白(%)	0.338 0	0.288 0	0.275 5	0.323 9	0.288 0	0.275 5
赖氨酸(%)	0.017 9	0.014 4	0.013 9	0.017 3	0.014 4	0.013 9
蛋氨酸(%)	0.006 1	0.005 3	0.005 2	0.006 0	0.005 3	0.005 2
胱氨酸(%)	0.012 3	0.010 0	0.010 5	0.011 8	0.010 0	0.010 5
蛋氨酸+胱氨酸(%)	0.018 4	0.016 2	0.015 7	0.017 8	0.016 2	0.015 7

表 4 负对照组日粮配方及营养水平

项目	低营养浓度			高营养浓度		
	前期	中期	后期	前期	中期	后期
原料(%)						
玉米	60.00	68.65	74.90	58.94	65.00	71.25
花生粕	2.00	3.00	4.00	1.00	2.00	3.00
豆粕	27.70	16.50	7.90	33.10	24.60	16.00
菜粕	2.00	3.00	4.00	1.00	2.00	3.00
棉粕	2.00	3.00	4.00	1.00	2.00	3.00
磷酸氢钙	0.95	0.70	0.15	0.90	0.65	0.10
石粉	1.45	1.25	1.10	1.46	1.25	1.10
食盐	0.30	0.30	0.35	0.30	0.30	0.35
前期预混料	1.00	-	-	1.00	-	-
中期预混料	-	1.00	-	-	1.00	-
后期预混料	-	-	1.00	-	-	1.00
沸石粉	2.60	2.60	2.60	-	-	-
油脂	-	-	-	1.30	1.20	1.20
合计	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平						
代谢能(MJ/kg)	11.41	11.75	12.00	12.00	12.20	12.46
粗蛋白(%)	19.66	16.72	14.73	20.67	18.71	16.72
钙(%)	0.89	0.74	0.54	0.89	0.74	0.54
总磷(%)	0.54	0.48	0.38	0.54	0.49	0.39
可利用磷(%)	0.33	0.28	0.18	0.33	0.28	0.18
赖氨酸(%)	0.98	0.82	0.66	1.04	0.92	0.76
蛋氨酸+胱氨酸(%)	0.79	0.66	0.55	0.84	0.73	0.63

1.5 饲养管理

肉鸭全程采用网上平养,全天 24 h 光照,1~10 日龄采用育雏棚温室饲养,11 日龄转入大棚,棚内自然通风,室温下养殖,温度基本保证在 20℃左右。每天饲喂 2 次,早晚各 1 次,基本保证肉鸭自由采食,同时保证饮水供应,以不影响采食为准。1~14 日龄饲喂肉鸭前期粉料;15~28 日龄饲喂肉鸭中期粉料;29~42 日龄饲喂肉鸭后期粉料。换料时过渡喂料,按照 3:1、1:1、1:3 过渡饲喂。

试验过程中采用正常的免疫程序进行免疫。每天观察记录鸭的生长情况、耗料量、腿病情况、死亡情况等,及时对死鸭进行处理,保证不影响大群的生长。于 12 日龄时对所有肉鸭绞嘴,防止 30 日龄后啄羽影响肉鸭中后期生长,并于 0、14、28、42 日龄对每重复称总重,同时对各期饲料进行结算。

2 结果与分析

2.1 生产性能

对肉鸭各期饲养试验数据进行处理与分析,添加植酸酶对肉鸭生产性能的影响结果见表 5。

表 5 添加植酸酶对肉鸭生产性能的影响

项目	试验 1 组	试验 2 组	试验 3 组	试验 4 组	试验 5 组	试验 6 组
入试鸭数(只)	80	80	80	80	80	80
雏鸭均重(g/只)	57.2±0.92	56.8±0.6	56.7±0.5	56.7±0.7	56.8±0.6	57.3±0.9
前期(0~14 d)						
均重(g/只)	701.8±10.6 ^b	710.0±14.0 ^b	677.2±8.7 ^c	741.2±10.0 ^a	735.1±5.8 ^a	707.1±12.1 ^b
料重比	1.59±0.07 ^b	1.58±0.03 ^b	1.66±0.08 ^c	1.51±0.02 ^a	1.50±0.02 ^a	1.55±0.04 ^{ab}
成活率(%)	98.8±1.6	98.8±1.1	98.3±1.3	97.7±0.5	97.5±0.8	98.1±1.3
腿病率(%)	0.63±1.05 ^a	0.42±0.65 ^a	3.33±2.04 ^c	0.83±1.02 ^a	0.42±0.65 ^a	3.33±2.04 ^c
中期(15~28 d)						
均重(g/只)	1 770.8±50.4 ^b	1 766.2±37.8 ^b	1 692.8±31.3 ^c	1 870.8±34.1 ^a	1 867.4±48.4 ^a	1 764.5±53.9 ^b
料重比	2.34±0.08 ^b	2.36±0.07 ^b	2.55±0.04 ^c	2.25±0.05 ^a	2.17±0.10 ^a	2.35±0.03 ^b
成活率(%)	99.4±0.7 ^{ab}	99.8±0.5 ^a	99.4±0.7 ^{ab}	99.8±0.5 ^a	100.0±0.0 ^a	98.7±1.1 ^b
腿病率(%)	1.04±0.94 ^a	0.63±0.68 ^a	4.17±1.51 ^b	0.83±0.65 ^a	0.83±0.65 ^a	3.96±1.66 ^b
后期(29~42 d)						
均重(g/只)	2 773.5±72.0 ^b	2 730.5±70.2 ^b	2 576.6±33.5 ^c	3 089.5±36.1 ^a	3 068.4±53.7 ^a	2 807.5±28.8 ^b
料重比	3.58±0.15 ^b	3.59±0.11 ^b	3.87±0.10 ^c	3.01±0.09 ^a	3.04±0.08 ^a	3.56±0.07 ^b
成活率(%)	99.8±0.5	100.0±0.0	100.0±0.0	99.8±0.5	99.8±0.5	100.0±0.0
腿病率(%)	1.67±0.65 ^b	0.83±0.65 ^{ab}	6.04±1.84 ^c	0.83±0.65 ^{ab}	1.25±0.79 ^{ab}	5.21±1.46 ^c
全期(0~42 d)						
均重(g/只)	2 773.5±72.0 ^b	2 730.5±70.2 ^b	2 576.6±33.5 ^c	3 089.5±36.1 ^a	3 068.4±53.7 ^a	2 807.5±28.8 ^b
料重比	2.61±0.03 ^b	2.61±0.04 ^b	2.79±0.05 ^c	2.39±0.02 ^a	2.36±0.05 ^a	2.62±0.04 ^b
成活率(%)	97.9±1.7	98.5±1.5	97.7±1.8	97.3±0.9	97.3±0.9	96.9±1.5

注:同行数据肩标相邻字母表示差异显著(P<0.05),相隔字母表示差异极显著(P<0.01)。下表同。

前期均重和料重比试验各组存在差异,高营养浓度饲料的料重比和生长明显优于低营养浓度($P<0.05$),在低营养与高营养浓度条件下,添加植酸酶组与正对照组相比生长与料重比差异不显著,而正对照与试验组的生产性能高于负对照组($P<0.05$)。对 14 日龄腿病率进行统计结果表明,试验各组与负对照组存在极显著差异($P<0.01$)。两营养浓度条件下的正对照组与添加

植酸酶组之间的腿病发病率无差异,而各负对照组腿病率极显著地高于正对照组与添加植酸酶组($P<0.01$)。试验中期、后期及对全期均重、料重比和腿病率结果基本同前期。试验各组的成活率无显著差异($P>0.05$)。

2.2 经济效益分析

试验结束后对试验各组每重复进行经济效益测算,其结果见表 6。

表 6 试验各组每个重复组的经济收益

组别	试验 1 组	试验 2 组	试验 3 组	试验 4 组	试验 5 组	试验 6 组
试鸭(只)	80	80	80	80	80	80
前期耗料(kg)	80.82±3.75	81.42±1.39	81.07±4.14	80.47±2.23	79.35±1.11	79.08±1.40
中期耗料(kg)	195.23±10.32	196.25±10.24	201.77±3.30	197.78±8.83	191.47±3.43	190.63±8.04
后期耗料(kg)	279.43±12.89	272.68±17.80	267.12±18.43	284.78±11.68	282.90±13.45	288.23±22.86
毛鸭重(kg)	217.22±5.04	215.25±6.35	201.42±5.25	240.45±2.17	238.80±2.95	217.60±5.17
前期料价(元/t)	1 916.33	1 890.82	1 877.55	2 121.43	2 031.63	2 018.37
中期料价(元/t)	1 783.67	1 760.20	1 746.94	2 018.37	1 923.47	1 910.20
后期料价(元/t)	1 687.76	1 663.27	1 650.00	1 921.43	1 826.53	1 813.27
毛鸭单价(元)	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
苗鸭单价(元)	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
苗鸭总价(元)	320.00	320.00	320.00	320.00	320.00	320.00
总料价(元)	974.72	952.93	945.42	1117.09	1 046.22	1 046.41
总鸭价格(元)	1 411.91	1 399.13	1 309.21	1 562.93	1 552.20	1 414.42
收益(元)	117.19 ^b	126.20 ^b	43.79 ^c	125.83 ^b	185.98 ^a	48.01 ^c

注:1. 饲料价格:饲料原料成本/0.98(2%损耗计)+200 元(加工、包装、销售等费用),其中已包含植酸酶成本;

2. 鸭苗单价:鸭苗价格+药费+人工+管理等费用。

在高营养浓度条件下,添加植酸酶组经济收益高于正对照组($P<0.05$)和负对照组($P<0.01$)。添加植酸酶在高营养浓度配方中,通过挖掘植酸酶可释放的潜在营养价值(磷、钙、代谢能、蛋白质与氨基酸),经济效益可以比正对照组配方提高 60.15 元。在低营养浓度条件下,添加植酸酶组经济收益与正对照组相似,但显著高于负对照组($P<0.05$)。在低营养浓度配方中添加植酸酶通过挖掘植酸酶可释放的潜在营养价值(磷、钙、代谢能、蛋白质与氨基酸),经济收益可以比正对照组配方提高 9.01 元。因此,充分利用植酸酶可释放的潜在营养价值(磷、钙、代谢能、蛋白质与氨基酸)可以较大幅度的降低饲料成本,这对原料(如玉米和磷酸氢钙)成本不断攀升的市场情况如何帮助饲料生产厂家提高经济效益具有实际意义。

3 讨论

提高肉鸭营养水平能够促进肉鸭生长,降低料重比,在本试验基础上,不论饲料原料价格与毛鸭价格如何变化,均显示出高营养浓度所具有的较好的经济效益。

降低日粮中的钙、磷、代谢能、蛋白质与氨基酸水

平,而不添加植酸酶,会明显影响肉鸭的生长发育,增加料重比,并伴有较严重的腿病发生,出现较严重的缺磷症状。这表明正对照组日粮的营养水平设置接近肉鸭的临界水平,在此基础上,使植酸酶的评价更具实际意义。

在降低日粮中的钙、磷、代谢能、蛋白质与氨基酸的基础上添加植酸酶使料重比、均重、腿病率和成活率均达到了正对照组的水平。这一结果表明,添加植酸酶能够提高磷、钙和矿物质元素的消化和利用率。并且提高的幅度与 Phycheck 软件估测的数值接近。一些研究也证明,添加植酸酶可提高磷、钙和矿物质元素的消化和利用率,从而改善肉鸭生长性能,降低腿病率和死亡率(王润等,2000;陈伟等,2004;花薇等,2006)。袁缨等(2003)的试验数据表明,添加植酸酶能提高肉鸭饲料中的钙、磷、锰和锌的利用率。

尽管对植酸酶在肉鸭上的潜在营养价值还没有确定,但 Jalal 等(1999)、Ravindran 等(2006)和 Cowieson 等(2006a)报道,使用植酸酶在肉鸡饲料中可提高能量、蛋白质与氨基酸的消化率。植酸对氮消化的影响主要是由于植酸和蛋白结合(Selle 等,2006),植酸酶通

过降解植酸,减少植酸和蛋白结合来提高蛋白的利用率。Jalal 等(1999)和 Cowieson 等(2006b)发现,植酸对半胱氨酸的消化率的影响比其它氨基酸更大。本试验的结果表明,通过添加植酸酶可降低大约 267.52 kJ 代谢能,并保持肉鸭正常的生长性能。Ravindran 等(2006)和 Cowieson 等(2006b)的试验结果表明,在肉鸡饲料中使用植酸酶可提高能量的消化。这些研究有力的支持了我们的试验结果。由于全世界范围的玉米价格的上涨,饲料配方中能量的成本不断的攀升,因此添加植酸酶也为降低能量的成本提供了一条途径。

本试验中每千克日粮的植酸酶添加量是 500 FTU。因为不同的植酸酶添加量对营养指标的潜在提高值是不一样的。如果要发挥植酸酶的最佳效果,最好要根据饲料的原料和动物的对植酸酶生长反应模型来决定最佳添加量。但要确定植酸酶在肉鸭不同类型日粮的最佳添加量,还需要做更多的消化代谢和饲养试验。

4 小结

降低钙、磷、代谢能、蛋白质与氨基酸水平而不添加植酸酶,能明显影响肉鸭的生长发育,提高料重比,并伴有较严重的腿病发生,出现较严重的缺磷症状;添加植酸酶降低钙、磷、代谢能、蛋白质与氨基酸的试验组和正对照组在料重比、均重、腿病率和成活率等各个指标上无显著差异;降低日粮钙、磷、代谢能、蛋白质与氨基酸水平后添加植酸酶,不影响肉鸭生长性能,且降低腿病率,并增加经济收益。

参考文献

- 1 陈伟,李浩棠,胡国梁.植酸酶对肉鸭生产性能及钙磷代谢影响研究[J].江西农业大学学报,2004(6):830~833
- 2 花薇,魏时来,孟婕,等.饲料中植酸酶、钙、磷不同水平组合对肉仔鸡生长和屠宰性能的影响[J].饲料工业,2006(10):37~42
- 3 王润,杨茂动.低磷日粮添加植酸酶对肥育期肉鸭营养水平的影响[J].云南农业大学学报,2000(3):216~218
- 4 袁纓,李菊娣,杨桂芹.植酸酶对樱桃谷肉鸭矿物元素利用率的影响[J].中国家禽,2003(7):74~77
- 5 Cheryan M. Phytic acid interactions in food systems[J]. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1980(13):297~335
- 6 Cowieson A J, T. Acamovic, M. R. Bedford. Phytic acid and phytase: implications for protein utilization by poultry [J]. Poultry Science, 2006a(85):878~885
- 7 Cowieson A J, T. Acamovic, M. R. Bedford. Supplementation of corn-soy-based diets with an Escherichia coli-derived phytase: effects on broiler chick performance and the digestibility of amino acids and metabolizability of minerals and energy [J]. Poultry Science, 2006b(85):1 389~1 397
- 8 de Rham O, T. Jost. Phytate-protein interactions in soybean extracts and low-phytate soy protein products [J]. Journal of Food Science, 1979(44):596~600
- 9 Jalal M A, S. E. Scheideler, C. Wyatt. Effects of phytase supplementation on egg production parameters and amino acid digestibilities[J]. Poultry Science, 1999, 78(1):74(Abstr.)
- 10 Lim H S, H. Namkung, I. K. Paik. Effects of phytase supplementation on the performance, egg quality, and phosphorous excretion of laying hens fed different levels of dietary calcium and nonphytate phosphorous[J]. Poultry Science, 2003(82):92~99
- 11 Oberleas D. Phytates. In: Toxicants Occurring Naturally in Foods. National Academy of Sciences, Washington, DC, 1973. 363~371
- 12 Onyango E M, M. R. Bedford, O. Adeola. Efficacy of an evolved Escherichia coli phytase in diets of broiler chicks [J]. Poultry Science, 2005(84):248~255
- 13 Panda A K, S. V. R. Rao, M. V. L. N. Raju, et al. Effect of microbial phytase on production performance of White Leghorn layers fed on a diet low in non-phytate phosphorus [J]. Br. Poultry Science, 2005(46):464~469
- 14 Ravindran V, S. Cabahug, G. Ravindran, et al. Effects of phytase supplementation, individually and in combination with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley[J]. Poultry Science, 1999 (78):1 588~1 595
- 15 Ravindran V, P. C. Morel, G. G. Partridge, et al. Influence of an Escherichia coli-derived phytase on nutrient utilization in broiler starters fed diets containing varying concentrations of phytic acid [J]. Poultry Science, 2006(85):82~89
- 16 Rutherford S M, T. K. Chung, P. C. Morel, et al. Effect of microbial phytase on ileal digestibility of phytate phosphorus, total phosphorus, and amino acids in a low-phosphorus diet for broilers[J]. Poultry Science, 2004(83):61~68
- 17 Selle P H, V. Ravindran, W. L. Bryden, et al. Influence of dietary phytate and exogenous phytase on amino acid digestibility in poultry: A review[J]. Poultry Science, 2006(43):89~103
- 18 Wu G, Z. Liu, M. M. Bryant, et al. Comparison of Natuphos and Phyzyme as phytase sources for commercial layers fed corn-soy diet[J]. Poultry Science, 2006(85):64~69

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

鸡蛋清溶菌酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达研究

权志中 张丞斌 余 荣 刘长江

摘 要 研究从鸡输卵管组织提取细胞总 RNA,根据 Gene Bank 中已发表的鸡溶菌酶基因序列,设计合成特异引物,合成 cDNA 序列,并以此为模版,PCR 扩增鸡溶菌酶基因。用 Xho I 和 Xba I 对 LYZ 基因的 PCR 产物和真核表达载体 pPIC6 α A 进行双酶切后转化到大肠杆菌(DH5 α)中,构建成真核重组表达载体 pPIC6 α A-LYZ。该载体经 PstX I 酶切线性化后,以电击转化方法导入到毕赤酵母宿主菌 X-33 中,经 Blasticidin 抗性筛选,得到鸡溶菌酶基因重组毕赤酵母菌株;甲醇 96 h(发酵罐诱导 100 h)诱导表达,经 Western-blot 检测分析,基因重组工程菌株摇瓶诱导表达溶菌酶的表达量约为 4 mg/l,发酵罐诱导表达的表达量约为 10 mg/l。

关键词 溶菌酶;克隆;表达;毕赤酵母

中图分类号 Q55

溶菌酶(lysozyme)是由英国细菌学家 Fleming 于 1922 年首先在人的眼泪和唾液中发现的,因其具有溶菌作用,被命名为溶菌酶。它广泛存在于动物、植物和微生物中,是一种天然的抗菌剂,能特异性地作用于细胞壁 N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine, NAG)和 N-乙酰胞壁酸(N-acetylmuramic acid, NAM)之间的 β -1,4 糖苷键,破坏肽聚糖支架,使微生物细胞在内部渗透压的作用下涨裂,细胞质外泄,最终导致细胞死亡。溶菌酶对革兰氏阳性菌和部分革兰氏阴性菌有很好的抑菌作用,对人和动物的细胞则不发生溶菌作用,被 WHO 和许多国家认定为无毒、无害、安全的添加剂,被越来越广泛地应用于医药、生物技术、食品以及动物生产中。目前溶菌酶主要从蛋清中提取,由于来源有限,生产工艺复杂,溶菌酶产量十分有限,而且价格居高不下,难以满足越来越大的市场需求。利用分子生物技术构建基因工程菌,通过发酵手段生产溶菌酶,将是提高溶菌酶产量,降低成本的有效手段之一。毕赤酵母表达系统是近年发展迅速的高效真核表达系统,其表达载体上有一个醇氧化酶强启动子 AOX1,可以甲醇作为唯一碳源诱导外源蛋白的高效表达。到目前为止,已经成功地表达了近百种外源蛋白。

pPIC6 α A 真核表达载体中含有的 α -factor,可实现胞外分泌表达,而毕赤酵母自身分泌极少的胞外蛋白,非常有利于表达蛋白的分离纯化。毕赤酵母表达鸡蛋清溶菌酶,在国外虽有报道,但国内还没有这方面的研究。本研究将鸡的溶菌酶基因通过克隆、重组、诱导等手段在毕赤酵母中成功地表达了有活性的鸡蛋清溶菌酶。

1 材料与方法

1.1 试验材料

成年产蛋鸡购自农贸市场;质粒 pPIC6 α A、E.Coli DH5 α 及巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)菌株 X-33 均购自 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司;PCR 引物由上海桑尼生物公司合成;各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司;小量质粒 DNA 抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司;QIAprep spin 质粒 DNA 纯化试剂盒购自上海天根生化科技有限公司;PCR 产物凝胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司;鸡蛋清溶菌酶标准品购自上海生物工程公司。

1.2 试验设备

PTC-100 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司;Eppendorf centrifuge 5415D 和 Eppendorf centrifuge 5417R 低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司;Backman 低温高速离心机购自美国 Backman 公司;电泳仪购自天龙生物技术有限公司;恒温摇床购自美国 New Brunswick Scientific 公司;恒温培养箱购自上海恒科有限公司;凝胶成像仪为 TANON GIS 2010,连接反应仪为 ASTEC Block Incubator BI-515A;脱色摇床购自江苏海门麒麟医用仪器厂;转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司;30 L 发酵罐购自镇江东方生物工程设备技术公

权志中,沈阳农业大学食品学院,博士,110161,沈阳市东陵区东陵路 120 号。

张丞斌,浙江工业大学生物与环境工程学院。

余荣,杭州康德权科技有限公司。

刘长江,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-11-12

司;溶氧探头购自梅特勒公司;pH 探头购自梅特勒公司,10 kDa 和 50 kDa 聚砜树脂膜购自丹麦 DDS 公司。

1.3 溶菌酶基因的克隆与扩增

1.3.1 鸡输卵管组织样品的采集

将用无菌剪刀采集 1 cm³ 左右的新鲜的、健康的鸡输卵管组织,以无菌、pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液冲洗,液氮冷冻,置 -70 °C 低温冰箱保存,参考《分子克隆试验指南》中的方法提取鸡输卵管组织总 RNA,并通过 RT-PCR 反应制备 cDNA。

1.3.2 设计引物

根据 Gene Bank 中报道的鸡输卵管溶菌酶(LYZ) mRNA 序列(序列号:CR390743)设计正、反向 PCR 引物,并在引物两端分别引入 Xho I 酶切位点和 Xba I 酶切位点,其序列分别为:

LYZ-Xho I:5'-GGGCTCGAGAAAAGAAAAGTC
TTTGGACGATGTGAG-3'

LYZ-Xba I:5'-CCCTCTAGATCACAGCCGGCAG
CCTCTGAT-3'

1.3.3 PCR 扩增鸡溶菌酶基因

以 LYZ-Xho I 和 LYZ-Xba I 为引物,以制备的 cDNA 为模版扩增鸡溶菌酶基因。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 5 min 后,然后分为两个阶段,条件分别为 95 °C 变性 1 min,52 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 45 s,10 个循环;95 °C 变性 1 min,62 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 45 s,共 30 个循环。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,参照 PCR 产物凝胶回收试剂盒方法回收目的片段。

1.4 重组表达载体 pPIC6 α A-LYZ 的构建

用 Xho I 和 Xba I 对 LYZ 基因的 PCR 产物和真核表达载体 pPIC6 α A 进行双酶切后,纯化回收目的片段,在 T₄ 噬菌体 DNA 连接酶的作用下进行连接,转化到大肠杆菌(DH5 α)中,涂布含 100 μ g/ml Blasticidin 抗性的 LB 平板上,37 °C 温箱内生长过夜,挑取 20 株克隆作 cloning PCR 检测。PCR 反应体系为:ddH₂O 7.3 μ l,10 $\times$ PCR Buffer(Mg²⁺)1 μ l,25 mmol/l dNTP 0.5 μ l,10 μ mol/l LYZ-Xho I primer 0.5 μ l,10 μ mol/l LYZ-Xba I primer 0.5 μ l,Taq polymerase 0.2 μ l,挑取少量克隆作为模版。PCR 条件为:95 °C 预变性 4 min,然后 95 °C 变性 45 s,58 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,共 30 个循环,最后维持在 4 °C。挑选 5 株 cloning PCR 检测为阳性的克隆菌株分别接种到含有 100 μ g/ml Blasticidin 抗性的 LB 液体培养基中,37 °C、250 r/min 振荡过夜,按照常规方法少量抽提质粒 DNA,经酶切鉴定确定为阳性克隆。

1.5 cDNA 测序与分析

对上述重组质粒进行限制性酶切分析,插入片段大小正确的重组质粒,上海桑尼生物技术公司分别用 5'-AOX1 和 3'-AOX1 引物对 cDNA 作正向和反向测序分析。所获序列用 BioEdit 软件进行分析和拼接,并用 BLAST 程序与 Gene Bank 中已报道的鸡输卵管 LYZ 序列进行比对。

1.6 毕赤酵母基因工程菌株的筛选

将 pPIC6 α A-LYZ 质粒 DNA 经 PstX I 酶切线性化后,以电击转化方法导入到毕赤酵母宿主菌 X-33 中,电击条件为:使用 0.2 cm 电击杯,2.0 kV,5.5 ms。电击后迅速加入 1 ml 冰冷的 1 mol/l 山梨醇,转入 15 ml 离心管,28 °C 温箱内静置孵育 1~2 h,然后分别取 50、100、200 μ l 涂布含有 100 μ g/ml Blasticidin 抗性的 YPAD 平板,28 °C 温箱内培养 2~3 d,每天观察菌落生长情况,筛选生长快速且抗 Blasticidin 的阳性克隆菌株。

1.7 诱导表达鸡蛋清溶菌酶

1.7.1 摇瓶诱导表达重组溶菌酶

挑选 1.5 中的阳性克隆菌落,置于装有 100 ml BMGY 培养基(1%酵母提取物、2%蛋白胨、1.34% YNB、4 $\times$ 10⁻⁵%生物素、1%甘油、100 mmol/l pH 值 6.0 磷酸盐缓冲液)的 500 ml 摇瓶中,28 °C、200 r/min 振荡培养 12~14 h;室温下 1 500~3 000 g 离心 5 min,收集并用 BMMY 重悬菌体,使 OD₆₀₀ 达到 1.0 左右(约 100~200 ml);加入 50 ml 无菌水洗涤菌体沉淀重复收集菌体 1 次;加入 20 ml BMMY 培养基培养收集的菌体,28 °C 振荡培养,200 r/min,诱导表达 96 h;每 24 h 取 0.5 ml 诱导培养液,1 500~3 000 g 离心 5 min,收集上清液,同时向剩余的发酵液中补加 0.5%发酵初始体积的无水甲醇,以添加甲醇诱导作为计时零点,测定每次取样的溶菌酶表达水平,以确定最佳表达时机。

1.7.2 发酵罐诱导表达重组溶菌酶

按 1%的比例将过夜培养于 BMG 培养基中的高效表达溶菌酶酵母菌株接种至已经灭菌的装有上罐发酵基本培养基(每升含:85%磷酸 26.7 ml、硫酸钙 0.93 g、硫酸钾 18.2 g、七水硫酸镁 14.9 g、氢氧化钾 4.13 g、甘油 40.0 g、PTM1 trace salts 4.35 ml)的发酵罐中,在充分消耗发酵培养基中的甘油后,流加补料培养基 1(含 1.2%PTM1 培养基的 50%甘油溶液),流加量为 18 ml/(1·h)持续约 6 h 至湿细胞重约 385 g/l,开始流加补料培养基 2(含 1.2%PTM1 培养基的 100%甲醇溶液)诱导表达,在开始的 3 h 内,流加量控制在 1 ml/(1·h),接下来的 2 h 内流加量控制在 7.2 ml/(1·h),

最后流加量调节至 10 ml/(l·h),直至诱导结束,诱导时间总计 100 h,诱导发酵过程中溶氧度始终控制在 20%以上,流加 25%氨水维持发酵液 pH 值在 5.5 左右。以流加补料培养基 2 诱导表达作为计时零点,每隔 24 h 取样 10 ml,离心取上清液于 -80 ℃ 保存备用。发酵结束,离心分离发酵液用于溶菌酶纯化及酶活性分析。

1.8 表达产物的鉴定

1.8.1 SDS-PAGE 电泳

制备两块 SDS-PAGE 凝胶,取不同时间点采集的溶菌酶表达样品加入 6×Loading Buffer 沸水浴煮沸 5 min,同时上样两块 SDS-PAGE 凝胶,用鸡蛋清溶菌酶作为阳性对照,甲醇诱导前的上清液作为阴性对照。电泳结束后,取其中一块用考马斯亮兰染色 30 min,然后摇床脱色;另一块用于检测溶菌酶的表达量。

1.8.2 Western-blot 检测

样品经 SDS-PAGE 电泳分离后将蛋白经 Bio-Rad 电转移槽转到纤维素膜上。纤维素膜在含 5%脱脂奶粉的 PBST(8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄、0.24 g KH₂PO₄、2 ml Tween-20、ddH₂O 定容至 1 L)内 4 ℃ 放置过夜,加入 1:10 000 稀释的兔抗鸡溶菌酶抗体,室温摇床上反应 1 h;PBST 洗膜 4 次,每次洗涤 15 min;加入二抗(1:10 000 稀释的羊抗兔 IgG 酶标抗体)室温摇床上反应 1 h;PBST 洗膜 4 次,每次洗涤 15 min;加底物显影,暗室内压片、冲洗胶片。

1.8.3 表达量的检测

取表达上清液和已知浓度的溶菌酶阳性对照品分别加入 6×Loading Buffer 煮沸 5 min 后,分别以 1×Loading Buffer 将以上样品以 2、4、8 倍稀释,上样同一块 SDS-PAGE 凝胶,电泳结束后转纤维素膜,然后经 Western-blot 检测,方法同 1.8.2。

1.9 表达产物的浓缩

取 5 L 发酵液,经 5 000 r/min 离心 10 min 后,分离表达上清液,通过 50 kDa 的聚砜树脂膜超滤去除大分子蛋白,过滤液再经过 10 kDa 聚砜滤膜滤除大部分的水和小分子物质,最后用 15 ml pH 值 6.2 的磷酸钠缓冲液反向洗脱,得表达产物浓缩样品。

1.10 溶菌酶活性检测

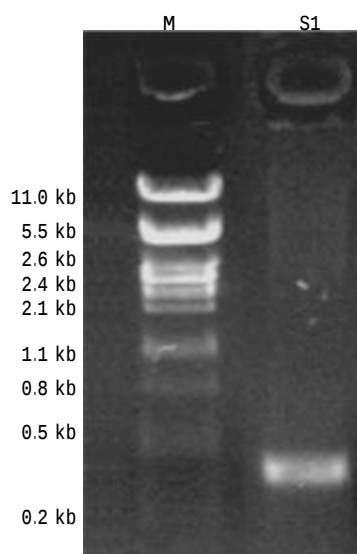
接种溶壁微球菌至 LB 中,37 ℃ 振荡过夜,离心后弃上清液,以去离子水洗涤 2 次,调节 OD₆₀₀ 至 0.01,取 1 ml 涂布 LB 固体培养基平板,自然风干。剪相同直径的圆形滤纸片,平铺在平板上,滤纸片上滴加 15 μl 浓缩样品和不同浓度的鸡蛋清溶菌酶标准品(20 000 U/mg),

37 ℃ 温箱内培养 12 h,测定形成的抑菌圈的直径来估算表达溶菌酶的溶菌活性。

2 结果与分析

2.1 溶菌酶基因的克隆

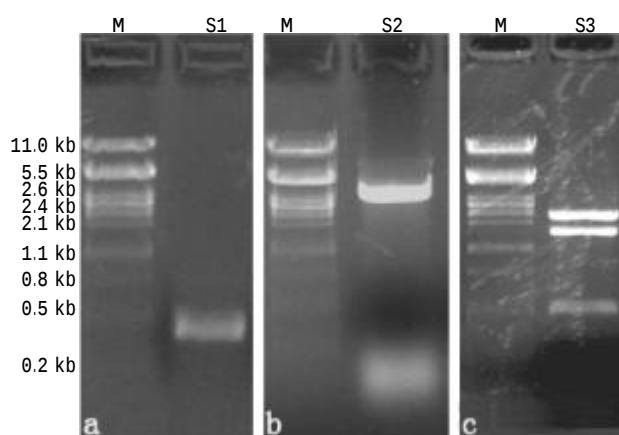
不含编码信号肽序列的溶菌酶基因大小约为 400 bp,本研究从鸡输卵管组织提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA 序列,再经 PCR 扩增后,扩增产物上样 1%琼脂糖凝胶电泳检测与理论基本一致,结果见图 1。



注: M. 分子量标记; S1. 克隆 LYZ。

图 1 克隆溶菌酶基因 PCR 电泳图

2.2 溶菌酶重组表达载体的构建与鉴定(见图 2)



注: M. 分子量标记; S1. 克隆 LYZ; S2. pPIC6αA;

S3. pPIC6αA-LYZ 酶切分析。

图 2 pPIC6αA-LYZ 表达载体的构建与 PCR 鉴定

克隆的溶菌酶 cDNA 以 PCR 扩增后,再经 Xho I 和 Xba I 双酶切,PCR 产物以凝胶纯化试剂盒纯化(图 2a)。表达载体 pPIC6αA 经 Xho I 和 Xba I 双酶切

后形成线性表达载体(图 2b),并回收目的片段。将以上经 Xho I 和 Xba I 双酶切后的溶菌酶基因和 pPIC6 α A 表达载体在 T4 DNA 连接酶的作用下连接构建成为含有溶菌酶基因的重组表达载体,对构建的

表达载体作 Bgl II、BamH I 和 Nco I 三酶切鉴定,结果见图 2c,分别获得 1.9、1.4 和 0.5 kb 的酶切产物,与理论分析完全一致。

2.3 cDNA 测序与分析

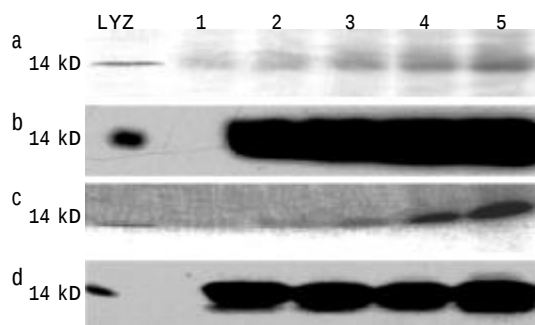
LYSOZYME 1	AAA GTC TTT GGA CGA TGT GAG CTG GCA GCA GCT ATG AAG CGT CAC	45
CR390743 1	AAA GTC TTT GGA CGA TGT GAG CTG GCA GCG GCT ATG AAG CGT CAC	45
LYSOZYME 46	GGA CTT GAT AAC TAT CGG GGA TAC AGC CTG GGA AAC TGG GTG TGT	90
CR390743 46	GGA CTT GAT AAC TAT CGG GGA TAC AGC CTG GGA AAC TGG GTG TGT	90
LYSOZYME 91	GCG GCA AAA TTC GAG AGT AAC TTC AAC ACC CAG GCT ACA AAC CGT	135
CR390743 91	GCT GCA AAA TTC GAG AGT AAC TTC AAC ACC CAG GCT ACA AAC CGT	135
LYSOZYME 136	AAC ACC GAT GGG AGT ACC GAC TAC GGA ATC CTA CAG ATC AAC AGC	180
CR390743 136	AAC ACC GAT GGG AGT ACC GAC TAC GGA ATC CTA CAG ATC AAC AGC	180
LYSOZYME 181	CGC TGG TGG TGC AAC GAT GGC AGG ACC CCA GGC TCC AGG AAC CTG	225
CR390743 181	CGC TGG TGG TGC AAC GAT GGC AGG ACC CCA GGC TCC AGG AAC CTG	225
LYSOZYME 226	TGC ATC ATC CCG TGC TCA GCC CTG CTG AGC TCA GAC ATA ACA GCG	270
CR390743 226	TGC AAC ATC CCG TGC TCA GCC CTG CTG AGC TCA GAC ATA ACA GCG	270
LYSOZYME 271	AGC GTG AAC TGC GCG AAG AAG ATT GTC AGC GAT GGA AAC GGC ATG	315
CR390743 271	AGC GTG AAC TGC GCG AAG AAG ATC GTC AGC GAT GGA AAC GGC ATG	315
LYSOZYME 316	AAC GCG TGG GTC GCC TGG CGC AAC CGC TGC AAG GGC ACC GAC GTC	360
CR390743 316	AAC GCG TGG GTC GCC TGG CGC AAC CGC TGC AAG GGC ACC GAC GTC	360
LYSOZYME 361	CAG GCG TGG ATC AGA GGC TGC CGG CTG TGA	390
CR390743 361	CAG GCG TGG ATC AGA GGC TGC CGG CTG TGA	390
LYSOZYME 1	Lys Val Phe Gly Arg Cys Glu Leu Ala Ala Ala Met Lys Arg His	15
CR390743 1	Lys Val Phe Gly Arg Cys Glu Leu Ala Ala Ala Met Lys Arg His	15
LYSOZYME 16	Gly Leu Asp Asn Tyr Arg Gly Tyr Ser Leu Gly Asn Trp Val Cys	30
CR390743 16	Gly Leu Asp Asn Tyr Arg Gly Tyr Ser Leu Gly Asn Trp Val Cys	30
LYSOZYME 31	Ala Ala Lys Phe Glu Ser Asn Phe Asn Thr Gln Ala Thr Asn Arg	45
CR390743 31	Ala Ala Lys Phe Glu Ser Asn Phe Asn Thr Gln Ala Thr Asn Arg	45
LYSOZYME 46	Asn Thr Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Leu Gln Ile Asn Ser	60
CR390743 46	Asn Thr Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Leu Gln Ile Asn Ser	60
LYSOZYME 61	Arg Trp Trp Cys Asn Asp Gly Arg Thr Pro Gly Ser Arg Asn Leu	75
CR390743 61	Arg Trp Trp Cys Asn Asp Gly Arg Thr Pro Gly Ser Arg Asn Leu	75
LYSOZYME 76	Cys Ile Ile Pro Cys Ser Ala Leu Leu Ser Ser Asp Ile Thr Ala	90
CR390743 76	Cys Asn Ile Pro Cys Ser Ala Leu Leu Ser Ser Asp Ile Thr Ala	90
LYSOZYME 91	Ser Val Asn Cys Ala Lys Lys Ile Val Ser Asp Gly Asn Gly Met	105
CR390743 91	Ser Val Asn Cys Ala Lys Lys Ile Val Ser Asp Gly Asn Gly Met	105
LYSOZYME 106	Asn Ala Trp Val Ala Trp Arg Asn Arg Cys Lys Gly Thr Asp Val	120
CR390743 106	Asn Ala Trp Val Ala Trp Arg Asn Arg Cys Lys Gly Thr Asp Val	120
LYSOZYME 121	Gln Ala Trp Ile Arg Gly Cys Arg Leu End	
CR390743 121	Gln Ala Trp Ile Arg Gly Cys Arg Leu End	

图 3 克隆的鸡蛋清溶菌酶基因及酶氨基酸序列图谱

克隆的鸡溶菌酶基因测序分析后,经 BioEdit 进行比对分析,所克隆的鸡输卵管溶菌酶 cDNA 序列与已发表序列比对发现,共发生了 4 个位点的核苷酸突变,分别为 A30→G、C93→T、T230→A、T294→C。推导的氨基酸序列经 BioEdit 比对分析,与已报道的鸡蛋清溶菌酶相比有一个位点的氨基酸发生了改变(Ile77→Asn)(见图 3)。经蛋白质分析软件 AnthePro 5.0 进行结构预测及功能分析,结果表明,该位点没有位于溶菌酶活性中心,分析可能不会对溶菌酶的功能产生影响,可用于进一步构建溶菌酶基因重组表达载体。

2.4 表达产物的鉴定

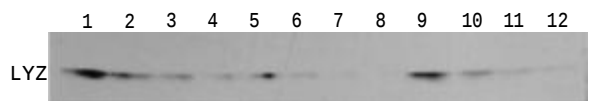
对诱导表达(摇瓶诱导和发酵罐诱导)的样品进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析,结果显示,无论摇瓶诱导还是发酵罐诱导在与溶菌酶阳性对照相同的位置均有一条特异的条带,并且随诱导表达时间的延长,此条带愈显浓重,见图 4(a、b、c、d)。结果表明经过甲醇的诱导,鸡蛋清溶菌酶基因在毕赤酵母菌株成功实现了分泌表达,而且表达量随着诱导时间的延长呈现出递增的趋势,见图 4(b、d)。



注:LYZ 为对照;lane 1、2、3、4、5: 在 0、24、48、72 和 96 h 的采集样品;a 为摇瓶诱导表达的 SDS-PAGE 分析,b 为摇瓶诱导表达的 Western-blot 分析,c 为发酵罐诱导表达 SDS-PAGE 分析,d 为发酵罐诱导表达的 Western-blot 分析。

图 4 溶菌酶诱导表达分析

为了标定诱导表达溶菌酶的表达量,采用与已知的不同浓度溶菌酶标准样品同时上样,经 Western-blot 检测,对检测结果作比对分析,结果表明摇瓶诱导表达的溶菌酶表达量约为 4 mg/l,而发酵诱导表达时溶菌酶的表达量约为 10 mg/l,见图 5。

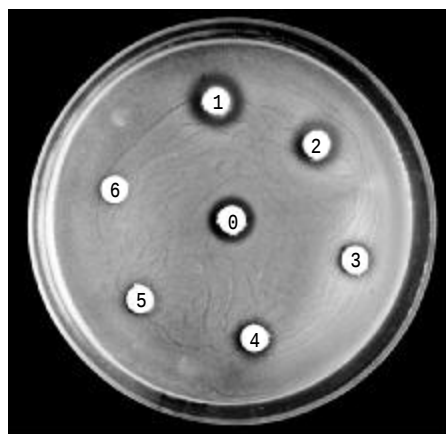


注:Lane 1、2、3、4: 发酵表达的 4、2、1 和 0.5 μl;Lane 5、6、7、8:LYZ 对照 6.64、3.32、1.66、0.83 ng;Lane 9、10、11、12:摇瓶表达的 4、2、1 和 0.5 μl。

图 5 溶菌酶表达量检测

2.5 活性检测

为检测溶菌酶的抑菌特性,取 15 μl 经抽滤浓缩的表达上清液滴加在涂布溶壁微球菌 LB 琼脂平板的滤纸片上,以 LYZ 标准品作为阳性对照,37 °C 放置 12 h。结果见图 6,观察抑菌圈的情况。在滴加表达上清液的滤纸片周围形成一个圆形的抑菌圈,直径约为 12 mm,与 40 μg 溶菌酶阳性对照组形成的抑菌圈相接近,表明重组表达的溶菌酶可有效抑杀溶壁微球菌的生长。



注:0. 发酵上清液;1~6. LYZ 对照 80、40、20、10、5、2.5 μg。

图 6 溶菌酶活性检测

3 讨论

本试验从成年健康母鸡的输卵管中提取鸡总 RNA,通过逆转录的方式,构建毕赤酵母重组表达载体 pPIC6αA-LYZ,并以电穿孔法将之转化到毕赤酵母细胞中,通过甲醇诱导成功实现了鸡溶菌酶基因在摇瓶和发酵罐中的分泌表达。以 SDS-PAGE 和 Western-blot 对诱导表达不同时间的取样进行分析,表明重组菌株诱导表达了溶菌酶,而且在诱导过程中,随诱导时间的增加表达量有递增趋势。经 Western-blot 检测,对检测结果作比对分析,摇瓶诱导表达的溶菌酶表达量约为 4 mg/l,而发酵诱导表达时溶菌酶的表达量约为 10 mg/l。但此结果比 Tetsuya M 等(2005)的 400 mg/l 的表达结果低很多,具体原因还需进一步分析。通过活性检测表明,表达的溶菌酶能够有效抑制溶壁微球菌的生长,证实了原来第 77 位氨基酸改变不影响溶菌酶活性的推断。

如何通过表达载体的合理构建,多克隆菌株的筛选,发酵条件的优化等关键措施的改进,大幅度提高重组毕赤酵母溶菌酶的表达量,将是实现溶菌酶工业化发酵生产的关键。

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

动植物脂肪源替代鱼油对鱼类影响的研究

赵红霞 曹俊明 陈水春 朱 选

由于鱼油的有限供给和过量消耗,以及其中可能积蓄的二噁英和多氯联苯,水产养殖业迫切需要采用其它脂肪源替代饲料中的鱼油。最近几年,为降低水产养殖对鱼油的过度依赖,人们已经开展了有关各种脂肪源替代鱼油的研究。陆生动物脂肪和植物油脂具有成本低、供应量大等优点,是替代鱼油和降低饲料成本的理想产品。倘若能够满足必需脂肪酸(EFA)需要,使用这些脂肪源替代鱼油无疑是可行的,特别是对于淡水鱼类。

不同品种鱼类对于饵料中的必需脂肪酸需要是不同的。研究表明,淡水鱼类如虹鳟、鲤鱼、青鱼、草鱼、鳊鲴等利用18碳合成20碳或22碳脂肪酸的能力明显强于海水鱼类,因此,淡水鱼类的必需脂肪酸主要是亚油酸(18:2n-6)、 α -亚麻酸(18:3n-3)和 γ -亚麻酸(18:3n-6);海水鱼类如真鲷、黑鲷、大菱鲆等不能将 α -亚麻酸(18:3n-3)全部转化为DHA(22:6n-3),它们的必需脂肪酸主要是EPA(20:5n-3)和DHA(22:6n-3)。此外,鱼类的脂肪和脂肪酸需要量与生存环境密切相关,如盐度改变时,鱼类对营养物质的需要量也随之发生改变。Craig等研究报道,当饲料中必需脂肪酸能够满足需要量时,采用其它脂肪源替代鱼油将不会对美国红鱼产生负面影响。动植物脂肪源能够替代一定量的鱼油,但饲料中必须同时添加适量的鱼油以满足鱼类的必需脂肪酸需求,因为鱼油是饲料唯一的n-3HUFA来源。

1 对鱼类生长性能的影响

研究表明,在水产饲料中以动植物脂肪源部分替代鱼油不会对鱼类的生长产生负面影响。尤其是含较高比例动植物脂肪源(替代80%~90%鱼油)的高能饲料。适量的猪油和牛油可作为海水鱼的饲料脂肪源,鸡油也可部分替代鱼油。但是,饲料中多不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸比例必须平衡,才能使鱼类获得最佳

饲料转化效率。

高淳仁等利用牛脂、豆油和精制鱼油等不同脂肪源添加到真鲷幼鱼饵料中,研究发现,真鲷幼鱼肌肉和肝脏组织缺乏n-9、n-6和n-3脂肪酸相互转化的能力,要提高幼鱼的生长增重率和存活率,必须保证饵料中具有足够的PUFA。Turchini等在斑鳉饲料中分别添加103 g/kg鱼油、菜籽油、橄榄油、猪油和鸡油配制含蛋白46%、脂肪19%的5种等氮等能饲料,结果鱼油组增重率最高,猪油组饵料系数最低、蛋白质效率最高。Francis等在半纯化饲料中分别添加鳕鱼肝油、菜籽油、亚麻籽油、菜籽油+鳕鱼肝油(1:1)、亚麻籽油+鳕鱼肝油(1:1)配制含蛋白为47%、脂肪为17%的5种等氮等能饲料,饲养虫纹石斑鱼幼鱼84 d后发现,以亚麻籽油替代50%的鱼油或以菜籽油替代100%鱼油都不会对幼鱼生长和饲料效率产生明显影响。Subhadra等在大口黑鲈饲料中分别添加10%的菜籽油、鸡油、鸡油+鲱鱼油(1:1)、鲱鱼油、鸡油+菜籽油(1:1)配制蛋白40%、脂肪14%的5种等氮等能饲料,饲养12周,结果表明,混合脂肪源可以降低饵料系数和提高鱼体蛋白质效率。刘玮等研究鱼肝油、豆油、菜油、猪油和混合油等不同脂肪源对草鱼稚鱼生长的影响,结果表明,以鱼肝油和混合油作为脂肪源的稚鱼相对增重率、蛋白质效率及蛋白转化率最大,饵料系数最低,稚鱼体蛋白质沉积也较高。王道尊等采用鱼油、牛油、豆油和玉米油为脂肪源的饲料饲喂青鱼发现,鱼油组青鱼的增重、蛋白质效率、肌肉蛋白质沉积最多。饲料中添加玉米油还可以降低腹脂比,以豆油和玉米油替代42.7%鱼油不会影响鲈鱼的特定生长率和蛋白质效率。添加菜籽油或豆油的饲料不会对大西洋鲑、太平洋鲑、虹鳟和鳊鱼的生长、饵料效率和存活率造成负面影响。

2 对鱼类消化性能的影响

添加鱼油或植物脂肪源饲料的脂肪酸表观消化率一般高于90%,植物脂肪源和鱼油混合后其脂肪酸表观消化率亦几乎与鱼油相同。但是动物脂肪源中饱和脂肪酸含量较高,很难被鱼类消化,甚至还会降低饲料中其它多不饱和脂肪酸的消化率。多不饱和脂肪酸的表观消化率较高,多不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比率降低将导致饱和脂肪酸和其它脂肪酸表观消

赵红霞,广东省农业科学院畜牧研究所,510640,广东广州。

曹俊明、陈水春、朱选,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-10-30

★ 广东省科技计划资助项目(2002B21504)

化率下降。各种脂肪酸表观消化率下降顺序依次是: $16:0 > 18:1n-9 > 18:2n-6 > 18:3n-3 > 22:6n-3 = 20:5n-3$, 与这些脂肪酸的平均表观消化率值几乎相反: $16:0 < 18:1n-9 < 18:2n-6 < 22:6n-3 < 18:3n-3 < 20:5n-3$ 。脂肪酸的表观消化率与胰脂酶的优先顺序是一致的, 即鱼体内脏中主要的有助于消化的是中性脂肪酶, 鱼类的脂肪酶对多不饱和脂肪酸具有高度特异性。

鱼类胃肠道对饲料中饱和脂肪酸特别是 18 碳脂肪酸的消化和吸收能力低于 14 碳和 16 碳等短链脂肪酸, 在鱼类粪便中可以发现未被有效吸收的较高含量的 $14:0$ 、 $16:0$ 和 $18:0$ 脂肪酸。Caballero 等研究表明, 虹鳟对添加混合脂肪源(10%鱼油、30%橄榄油、60%猪油)的饲料具有较高的摄食量, 饵料转化效率和增重率也高于其它各种脂肪源饵料, 推测较高的摄食量可能与添加混合脂肪源的饵料消化能较低有关, 因为鱼类是根据摄入饵料的能量调整摄食量。肠道细胞对脂肪酸的吸收也具有选择机制, 饲料中的 $n-3$ 与 $n-6$ 比率可能影响脂肪酸在肠道细胞脂肪滴中的选择性沉积。与鱼油相比, 植物脂肪源具有较高含量的 $n-6$ 脂肪酸。大部分植物脂肪源的 $n-3$ 与 $n-6$ 比率是 $0 \sim 0.3:1$, 而鱼油则是在 $5 \sim 6:1$ 之间。与仅仅摄食鱼油的虹鳟相比, 摄食含部分植物脂肪源饲料的虹鳟肠道细胞出现更多的脂肪液滴, 但摄食动物脂肪源饲料的虹鳟肠道细胞却并未出现脂肪滴, 这可能是由于动物脂肪源饲料的脂肪消化率较低。也有些学者认为, 肠道细胞中出现脂肪滴沉积是脂肪合成脂蛋白不充分而形成脂肪的暂时性贮存。北极鲑鱼摄食添加亚麻籽油的饲料后其细胞质内出现脂肪滴沉积, 但摄食添加大豆卵磷脂饲料的鱼体内却未出现, 说明脂肪滴沉积可能是由合成脂蛋白所必需的磷脂合成不够造成的。

3 对鱼类机体营养组成的影响

研究发现, 不同饲料脂肪源对鱼体脂肪组成产生显著影响。即使饲料脂肪含量保持不变, 摄食甘油三酯油酸脂和猪油饲料的鱼, 其全鱼和肌肉脂肪含量亦高于摄食鱼油饲料的。Xun 等以猪油、鸡油、豆油、菜籽油和混合油(牛油 60%、豆油 20%、鱼油 20%)替代 50% 的鱼油配制脂肪含量 10% 的等氮等能饲料饲养鲈鱼, 结果发现, 豆油组的全鱼脂肪含量最高, 肝脂含量最低。Turchini 等以牛油和玉米油(103 g/kg)替代虹鳟饲料中 52% 鱼油发现, 全鱼和肌肉脂肪沉积显著高

于鱼油组, 但肝脏脂肪含量没有显著差异。Bransden 等研究发现, 向日葵籽油 100% 替代鱼油时, 试验鱼的肝脂沉积为 70.6 g/kg, 而摄食鱼油饲料的鱼的肝脂沉积为 44.4 g/kg, 但肝体比未受影响。Thompson 等研究表明, 以向日葵籽油作为饲料主要脂肪源, 大西洋鲑肝脂含量增加, 肝体比升高; 饲料中缺乏必需脂肪酸将造成脂肪沉积失衡, 引起肝脏肥大和肝体比增加。饲料中过量的 $18:2n-6$ 也可能造成脂肪代谢失衡而引起脂肪在肝脏中沉积。肖懿哲等以等量混合的海水鱼油、豆油作为脂肪源, 研究饲料中不同脂肪含量对施氏鲟生长及其肝脏脂质组成的影响, 结果发现, 施氏鲟肝脏脂质含量和中性脂质含量随着饲料脂肪添加量的增加而升高, 但在饲料脂肪适宜含量范围内(5.6%~11.4%), 各组间却无显著差异。高露皎等以猪油、葵花籽油、鱼油、豆油、混合油和氧化鱼油(添加水平均为 6%)配制成 6 种试验饲料, 研究不同脂肪源对幼鱼血清胆固醇、甘油三酯和高密度脂蛋白含量和谷丙转氨酶活性等生化指标的影响, 结果表明, 猪油、葵花籽油和氧化鱼油都不利于鲟鱼的脂肪代谢, 而鱼油能够调节和平衡鱼体内的脂肪代谢, 降低体脂和肝脂的含量, 有利于施氏鲟的健康生长, 这与不同油脂具有不同的脂肪酸种类和比例有关。杜震宇等研究 3 种脂肪源[鱼油、鱼油+玉米油(1.34:1)、鱼油+豆油(1.34:1)]对鲈鱼生长的影响, 结果发现, 鱼油+玉米油组的鲈鱼脂肪酶活性及血清甘油三酯含量显著高于其它各组, 但脂体比却显著低于其它各组, 表明鲈鱼能够很好地利用鱼油和玉米油。

鱼体脂肪组成随着饲料中脂肪源的变化而发生改变, 鱼体的脂肪酸组成反映饲料的脂肪酸组成。Ricardo 等研究猪油、豆油、玉米油和亚麻油等 4 种不同脂肪源对红罗非鱼的影响, 结果表明, 添加猪油组的鱼体饱和脂肪酸含量显著高于其它各组, 玉米油和豆油组的鱼体 $n-6$ 脂肪酸含量最高, 亚麻油组的鱼体 $n-3$ 脂肪酸含量最高。对虹鳟、大西洋鲑、褐鳟和美洲红点鲑等的试验证实, 使用植物脂肪源替代鱼油会降低鱼体 EPA 和 DHA 含量, 提高油酸、亚油酸和亚麻酸含量。Greene 等研究发现, 与摄食鱼油组相比, 摄食菜籽油和猪油、菜籽油、葵花油等动植物脂肪源饲料的虹鳟肌肉 EPA 含量有所降低。Caballero 等研究发现, 当饲料亚油酸占脂肪酸的 25% 时, 虹鳟组织中 DHA 水平明显上升。而 Skonberg 等研究发现, 尽管管

油饲料中 DHA 的浓度是葵花籽油饲料的 2.5 倍,但摄食含葵花籽油和鱼油饲料的银鲑肌肉中 DHA 分别上升 300% 和 150%。这是因为摄食低 DHA 水平饲料的鱼体,其肝脏 24 : 6n-3 含量较高,肝细胞中 24 : 5n-3 通过 Δ -6 去饱和及氧化作用转化为 24 : 6n-3,并最终形成 22 : 6n-3,从而有助于维持体内的 DHA 水平。饲料中葵花籽油占脂肪源 40% 不会造成肌肉 n-3 多不饱和脂肪酸的降低,然而添加向日葵籽油会降低 n-3 与 n-6 比率,这是因为 18 : 2n-6 沉积增加,而肌肉和肝脏中 18 : 1n-9 沉积较少。Bell 等以油菜籽油逐量替代饲料中鱼油时,也得出同样结论。然而,以棕榈油替代鲑鱼饲料中鱼油时,18 : 1n-9 和 18 : 2n-6 比饲料中其它脂肪酸更易在组织中沉积。

油酸(18 : 1n-9)是鱼体肌肉和肝脏中主要的单不饱和脂肪酸,油酸含量较高在某种程度上表明脂肪酸缺乏,因而 18 : 1n-9 与 n-3 比率可作为评估脂肪酸需要的标准。Xun 等试验发现,摄食各种脂肪源饲料的鱼体肝脏 18 : 1n-9 与 n-3 比率没有显著性差异,但摄食陆生动物脂肪源饲料和混合油脂饲料的鱼体肌肉 18 : 1n-9 与 n-3 比率显著增加,鱼体肌肉和肝脏脂肪酸组成与饲料脂肪酸组成具有相关性。Paula 等研究不同水平和种类的脂肪对红罗非鱼氨基酸组成的影响,结果发现,添加量为 12% 的猪油、棉籽油、亚麻油和豆油等不同脂肪源对鱼体的氨基酸沉积没有显著差异。

4 对鱼类免疫功能的影响

4.1 对体液免疫的影响

动植物脂肪源替代鱼油可能造成饲料中脂肪酸的失衡,很多研究报道了饲料脂肪酸不平衡对养殖鱼类免疫机制的影响。植物脂肪源的 n-3 和 n-6 脂肪酸比率改变将影响到二十碳脂肪酸衍生物的合成,继而影响鱼体健康,因而植物脂肪源替代鱼油的比例过高可能导致鱼体的生理状态发生改变。花生四烯酸(20 : 4n-6)(Arachidonic acid, AA)和二十碳五烯酸(20 : 5n-3)(eicosapentaenoic acid, EPA) 是二十碳脂肪酸衍生物、前列腺素、白细胞三烯的前体,具有刺激巨噬细胞和白细胞杀灭细菌的作用。当 n-6 脂肪酸的摄入量增加时,大西洋鲑体内由 AA 产生的二十碳脂肪酸衍生物水平呈现升高趋势。体外试验表明, EPA 丰富介质培养的大菱鲂 astroglial 细胞中 AA 生成的前列腺素产量下降。鲑鱼补体活性与血清中单烯含量呈负相

关,金鲷摄食缺乏 n-3 高不饱和脂肪酸的饲料时,旁路补体活性降低。Montero 等研究显示,饲料中添加植物脂肪源对血清溶菌酶活性没有影响,但添加豆油降低了旁路补体途径活性;摄食鱼油和植物脂肪源(豆油和油菜籽油)混合物与仅仅摄食鱼油的金鲷相比,其血球容积和溶菌酶活性没有改变,然而延长投喂时间引起体液免疫参数下降,可能是由于补体活性和皮质醇含量的降低引起。以等量的鱼油和玉米油混合提高饲料中脂肪含量,点带石斑鱼的旁路补体和溶菌酶活性增强;以牛油或鸡油替代鱼油不影响虹鳟的非特异性免疫参数。

4.2 对细胞免疫的影响

饲料脂肪通过刺激机体产生细胞因子或影响淋巴细胞分化对免疫系统发挥作用。Subhadra 等试验发现,与摄食其它动植物脂肪源饲料相比,摄食含鱼油饲料的大口黑鲈淋巴细胞计数升高,而摄食 7% 以上 n-3 脂肪酸的鱼体淋巴细胞计数高于摄食 5% 或更少脂肪酸的试验鱼。较高的淋巴细胞计数表明,当免疫能力达到一个极限或超过这一极限时,过高的淋巴细胞计数可能引发炎症。目前,对于 n-3 和 n-6 脂肪酸在鱼类免疫反应中是否发挥作用还存在很多争议。饲料中添加油菜籽油或豆油降低了金鲷头肾巨噬细胞噬菌活性,以油菜籽油、亚麻籽油及橄榄油替代欧洲鲈鱼饲料中 60% 鱼油,观察到白细胞计数和呼吸爆发活性下降。以豆油替代鲱鱼油降低了斑点叉尾鲷巨噬细胞的杀菌活性。但也有报道指出,饲料中高水平的 n-3 脂肪酸增强了虹鳟的肾巨噬细胞活力,但饲料中不平衡的 n-3 多不饱和脂肪酸却降低了虹鳟巨噬细胞的体外杀菌能力和抗体滴度。不同的饲料脂肪源对细胞膜磷脂的脂肪酸平衡也可能产生不同作用,进一步影响到膜的物理特性(如通透性和完整性)以及与膜相关的受体,最终对与巨噬细胞相关的体液和细胞免疫发挥作用。

饲料脂肪源的特性决定了动物巨噬细胞的脂肪酸组成,然而某些脂肪酸则进行有选择的合成。在鲑鱼和鲈鱼中, DHA 在巨噬细胞中优先合成和沉积,巨噬细胞 DHA 与饲料中 DNA 的比率大约是 2,表明 DHA 在巨噬细胞中的重要性。DHA 是鱼类生物膜中磷酸甘油酯的主要成分,饲料中必需脂肪酸缺乏时也能观察到 DHA 在膜中优先沉积。无论饲料中添加何种植物脂肪源, DHA 含量保持恒定。一些脂肪酸在红

细胞中也是有选择性的合成,表明 DHA 还具有维持红细胞膜特性(如渗透抗性)的作用,在摄食含豆油或鱼油饲料的大西洋鲑鱼和大西洋鲑中也得出同样结论。花生四烯酸(AA)在巨噬细胞中的合成也很显著,这表明 AA 作为二十碳脂肪酸衍生物前体和细胞信使的重要性及在鱼类免疫调节中发挥的重要作用。有研究显示,不同鱼类的巨噬细胞的 AA 与饲料中 AA 的比例各不相同,金鲷为 3~7,欧洲鲈鱼 4.8~6.8,而鲑鱼头肾细胞与饲料 AA 的比例为 5~14。AA 有选择地合成欧蝶嗜中性粒细胞中的磷脂酰肌醇,表明这些细胞与 AA 具有亲合性。Montero 等研究指出,EPA 有选择地合成头肾巨噬细胞可能也与 AA 的合成有关,但 Farndale 等认为,欧鲈血液白细胞与饲料中 EPA 含量具有直接的联系。AA 能够调节活性氧自由基的产生和嗜中性粒的脱颗粒作用,因而脂肪酸选择性地合成巨噬细胞可能防止这些细胞产生过量的氧自由基。

5 对鱼类抗应激和抗病力的影响

正如哺乳动物一样,饲料脂肪可能通过改变下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的作用和调节血浆中皮质醇浓度,影响鱼类抗应激能力。应激造成皮质脂酮和肾上腺皮质激素水平的提高,这些激素产生的电生理作用抑制腹丘下部细胞神经元的冲动频率,进而抑制这些细胞对 HPA 轴的激活作用。然而,高脂诱导升高的血液脂肪酸对皮质脂酮和肾上腺皮质激素水平产生影响。不同植物脂肪源具有不同的脂肪酸组成,因而可能改变鱼类代谢,影响鱼体抗应激和抗病能力。Tannenbaum 等研究发现,高能饲料(玉米油从 4%增加到 20%)能对长期应激的小鼠产生影响。Montero 等试验显示,以混合植物脂肪源替代 60%鱼油的饲料对金鲷健康没有负面影响;但以亚麻籽油替代 60%鱼油,金鲷受到应激后皮质醇浓度增加,抗应激能力下降。虹鳟血液学指标(血球数和血红蛋白)不受饲料中脂肪含量影响,但摄食鱼油饲料的试验鱼血红细胞数目升高,可能是由于过氧化物酶的 β -氧化增强导致氧需求量增加所造成的。与此假设一致,Grisdale-Helland 等以豆油替代 50%鱼油后,大西洋鲑的耗氧量比摄食全鱼油饲料组有显著下降。

有研究表明,改变饲料中 n-3 PUFA 含量可能对鱼体抗病力产生重要影响。以植物脂肪源或纯化 n-3 脂肪酸调节饲料中 n-3 与 n-6 比率改变鱼类抵抗病原菌的能力。大西洋鲑摄食以向日葵籽油为主要脂肪

源的饲料后抵抗杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)或鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)能力显著低于摄食鱼油的对照组;河鲈摄食 7%亚麻籽油饲料后感染了爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*),其活率和产生抗体能力下降;虹鳟摄食缺乏 n-3 脂肪酸饲料后抵抗 IHN 病毒能力降低。饲料中 n-3 PUFA 含量过高同样会产生负面影响。Erdal 等研究发现,饲料总脂肪酸中 n-3 PUFA(20:5n-3 和 22:6n-3)比例从 13%提高到 24%对大西洋鲑产生免疫抑制,以鲁氏耶尔森菌(*Yersinia ruckeri*)攻毒时死亡率增加,可能是 n-3 PUFA 的增加造成心脏和骨骼肌功能的退化。Fracalossi 等也证明,与摄食玉米油饲料组(总脂肪酸中 n-3 含量为 1.1%)的试验鱼相比,摄食以鱼油为脂肪源饲料(总脂肪酸中 n-3 含量为 34.3%)的斑点叉尾鲷抵抗爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)能力下降。

6 结语

一般来说,以植物脂肪源为主要能源的饲料往往缺乏 EPA 和 DHA,而以鱼油为主要原料的饲料则缺乏亚油酸和亚麻酸,如饲料鱼油的脂肪酸组成中必需脂肪酸含量高达 54.2%~71.5%,亚油酸和亚麻酸的含量分别只有 0.6%~3.1%和 0.4%~1.2%。所以,饲料中应按适宜比例添加鱼油和动植物脂肪源,以满足动物对脂肪酸的需求。此外,HUFA,特别是 DHA,一般不作为代谢能源,而饱和及单不饱和脂肪酸则容易被作为代谢能源。因此,饲料中 HUFA 过量可能会导致代谢能源不足,HUFA 不足可能会导致必需脂肪酸的缺乏。鱼类饲料中添加脂肪原料时,不仅要注意添加量要适宜,还应在保证鱼类获得较高生长性能和存活率以及提供平衡充足的必需脂肪酸的前提下,根据实际情况选择添加适当且易得的饲料油脂,以达到以最低的成本获得最大量、最优质的鱼产品。由于脂肪的来源不同,其饱和脂肪酸、单多不饱和脂肪酸含量也有所不同,在鱼体内的消化吸收也有显著差异,在实际生产中要针对不同的养殖鱼类,慎重选用不同的饲料脂肪源及其混合形式,以期达到理想的养殖效果和节约鱼油的作用。

(参考文献 62 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

四种微量元素对胡子鲶体表色素含量的影响

唐 精 叶元土

摘 要 试验主要探讨 4 种微量元素 Cu、Fe、Mn、Zn 对胡子鲶体表色素含量的影响。对 $L_9(3^4)$ 正交设计养殖的胡子鲶,测定各试验组鱼体皮肤总的类胡萝卜素和叶黄素含量。结果表明:胡子鲶背部皮肤类胡萝卜素含量随 Cu、Fe 补充量的增加而升高,随 Zn、Mn 补充量的增加而降低;胡子鲶背部皮肤叶黄素含量随 Cu、Fe、Mn 补充量的增加而升高,随 Zn 补充量的增加而下降;胡子鲶腹部皮肤类胡萝卜素含量随 Cu、Fe、Mn、Zn 补充量的增加而下降;胡子鲶腹部叶黄素含量随 Cu 补充量的增加而显著升高,Fe、Mn、Zn 的补充量对其影响不大。

关键词 胡子鲶;体表色素;微量元素

中图分类号 S965.128

Effect of four trace elements on contents of body coloring matter for *clarias fuscus*

Tang Jing, Ye Yuantu

Abstract In order to study the influence of the four trace elements on body coloring matter, we process the experiment. Using $L_9(3^4)$ orthogonal design, a 56-days *Clarias fuscus* mesh cage breed aquatics experiment was carried out in pond. Through determining the contents of carotinoid and lutein xanthin in every experiment group, we had results that as contents of Cu and Fe increased, the contents of carotinoid in *clarias fuscus*' back skin increased too. However, the two elements Mn and Zn are opposite. As contents of Cu, Fe and Mn increased, the contents of lutein xanthin in *clarias fuscus*' back skin increased too. However, the Zn is opposite. As contents of Cu, Fe, Mn and Zn increased, the contents of carotinoid in *clarias fuscus*' belly skin decreased. As contents of Cu increased, the contents of lutein xanthin in *clarias fuscus*' belly skin increase too. However, the increases of Zn, Fe and Mn hadn't marketable influence.

Key words *clarias fuscus*; body coloring matter; Zn; trace element

在养殖条件下,鱼体常会出现各种体色问题,包括黄色水水产动物养殖褪色或异常增色,如胡子鲶、黄颡鱼、黄鳝、甲鱼等;黑体色水产动物养殖褪色,如青鱼、斑点叉尾鲶、牙鲆、比目鱼等;白体色水产动物体色变黑,如长吻鮠等。近年来,关于鱼类体色和变色机理的研究大多集中在着色剂的选择、使用和环境因素影响等方面,而关于微量元素对鱼体表色素含量的影响研究较少。本文通过正交试验设计,分析 Cu、Fe、Mn、Zn 不同补充量对胡子鲶体表总类胡萝卜素和叶黄素含量的影响。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

唐精,北京桑普生化(广东)有限公司,528300,广东省佛山市大良凤翔工业园荣业 6 路 1 号正对面。

叶元土,苏州大学生命科技学院。

收稿日期:2007-08-27

胡子鲶来自广东新兴孵化场,常规鱼体消毒。经过 10 d 暂养后,挑选规格一致、体格健壮鱼种,采用随机分组方法分成 9 个试验组,分别养殖于 9 个 $1\text{ m} \times 1\text{ m} \times 1.5\text{ m}$ 的网箱中。每个网箱中放养 80 尾鱼,均重 $(6.81 \pm 0.15)\text{ g}$ 。

1.2 Cu、Fe、Mn、Zn 补充量试验设计

采用 $L_9(3^4)$ 正交设计方案。依据试验中胡子鲶头骨中 4 种元素含量的比例关系,并参照淡水鱼 4 种元素的添加量,设计 Cu、Fe、Mn、Zn 的 3 个水平,共 9 个试验组,Cu、Fe、Mn、Zn 添加水平设计见表 1。

表 1 Cu、Fe、Mn、Zn 添加水平设计(mg/kg)

水平	Cu	Fe	Mn	Zn
1	3.5	80	10	30
2	6.5	160	30	60
3	9.5	240	50	90

1.3 试验饲料配制

基础日粮组成见表 2。将矿物元素与基础日粮混合均匀后,用制粒机制成直径 1 mm 的硬颗粒饲料备用。

表2 基础日粮组成

组成	含量(%)
进口鱼粉	12
豆粕	37.5
菜粕	4
花生麸	5
玉米	6
肉粉	7
次粉	22
豆油	2
磷酸二氢钙	1.5
维生素	0.2
矿物质	0.8
磷脂粉	2

注:每千克饲料中矿物质包括(mg):I 0.7、Se 0.65、Co 0.1、Mg 160、Cu、Fe、Mn、Zn 按照各试验组设计添加。

1.4 养殖管理

养殖试验在同一池塘中养殖,正式试验共 56 d。日投饵 2 次(8:00、16:00),投饵率 3%~4.5%。

为了减少水体微量元素对试验的影响,加大了换水量,隔天刷 1 次网。每周加注新水。采用“水博士”水质测试盒测定水质,每周测水质 1 次。整个养殖试验期间,pH 值 7.0~8.4、溶氧浓度>5.0 mg/ml、氨氮浓度<0.50 mg/ml、亚硝酸盐浓度<0.06 mg/ml、硫化物浓度<0.01 mg/ml。

1.5 类胡萝卜素含量的测定

试验结束后,从每组试验网箱中各取 1~2 条鱼,用解剖刀沿体表侧线划开,撕取侧线以上全部鱼皮(不包括头部和鳍条),刮去肌肉,做一个混样,用电子分析天平称取 0.5 g 左右,放入匀浆器,加入鱼皮重量两倍体积的正己烷、丙酮混合液(6:4),最后加入 40% 的无水硫酸钠,冰冻水浴匀浆,将提取液收集在 1.5 ml 的离心管中,再用正己烷、丙酮混合液将残渣再浸洗 1 次转入离心管,8 000 r/min 离心 15 min,收集上清液定容至 5 ml,避光密闭,冰浴中保存。将上清液放入 0.5 cm 比色皿中,以正己烷、丙酮混合液为空白对照(加盖防止丙酮挥发),在紫外-可见分光光

度计下 300~800 nm 波长范围内进行扫描,找出最大吸收峰所处的波长,在该波长下测定各组提取液的吸光值。

1.6 叶黄素含量的测定

准确称取 1 g 鲜样品于 25 ml 棕色容量瓶中。加入 7.5 ml 浸提液,塞上塞子并旋转振摇 1 min。用移液管加入 40% KOH 甲醇溶液 1 ml 到容量瓶中,旋转振摇 1 min,将容量瓶于 55.5 ℃水浴上加热 20 min,接上空气冷凝装置或冷却容量瓶颈部以防止溶剂损失。冷却样品,让其于暗处放置 1 h。加入 7.5 ml 己烷,旋转振摇 1 min,以 10% 硫酸钠溶液定容,剧烈振摇 1 min。于暗处放置 1 h 后进行色谱分离(将吸附剂装入色层柱,装至 7 cm 即可,再在吸附剂上面装入无水硫酸钠,压紧至 2 cm 即可)。吸取 5 ml(若色素含量低则 10 ml)皂化后的上层液注入色层柱,在色层柱上部的待分析液快要流完之前,慢慢加入胡萝卜素洗脱溶剂(己烷:丙酮=2:1),直至胡萝卜素带全部洗脱并收入抽滤瓶中,胡萝卜素被洗脱后,叶黄素类色素仍保留在色层柱中。

胡萝卜素洗脱后,重新安装好实验装置,并加入叶黄素洗脱溶剂(己烷:丙酮:甲醇=80:10:10),持续洗脱直至收集到全部叶黄素为止。整个操作始终应使液面高于吸附剂表面,将叶黄素溶液置于暗处,当其达到室温后转入 25 ml 棕色容量瓶,用洗脱溶剂稀释至刻度,混合均匀后立即检测其光密度值 A。

2 结果分析

2.1 对类胡萝卜素含量的影响

Cu、Fe、Mn、Zn 不同补充量对胡子鲶体表类胡萝卜素色素含量的影响结果见表 3,由表 3 结果可见,鱼体背部皮肤中类胡萝卜素第 9 组含量最高,为 422.71 mg/kg,第 8 组含量最低,为 218.05 mg/kg;鱼体腹部皮肤类胡萝卜素第 1 组含量最高,为 778.58 mg/kg,第 3 组含量最低,为 307.94 mg/kg。

表3 4种微量元素不同补充量对类胡萝卜素含量的影响(mg/kg)

组别	Cu	Fe	Mn	Zn	背部皮肤类胡萝卜素含量	腹部皮肤类胡萝卜素含量
第1组	3.5	80	10	30	355.62	778.58
第2组	3.5	160	30	60	219.71	710.40
第3组	3.5	240	50	90	339.19	307.94
第4组	6.5	80	30	90	358.47	319.43
第5组	6.5	160	50	30	230.72	600.85
第6组	6.5	240	10	60	325.11	497.87
第7组	9.5	80	50	60	321.72	394.59
第8组	9.5	160	10	90	218.05	651.23
第9组	9.5	240	30	30	422.71	365.37

极差分析可知(见表 4),在本试验水平下,Cu、Fe 补充量的增加对胡子鲶背部皮肤类胡萝卜素的积累

是有利的,而 Zn、Mn 补充量的增加不利于对背部皮肤类胡萝卜素含量的沉积;4 种元素不同补充量对背

部皮肤类胡萝卜色素含量影响为:Fe>Zn>Mn>Cu。胡子鲇腹部皮肤类胡萝卜色素含量随 Cu、Fe、Mn、Zn 补充量的增加而呈下降趋势,4 种元素对胡子鲇腹部皮肤类胡萝卜色素含量的影响为 Fe>Mn>Zn>Cu。

表 4 类胡萝卜色素含量极差分析

项目	背部皮肤类胡萝卜色素	腹部皮肤类胡萝卜色素
Cu	K ₁	304.84
	K ₂	304.77
	K ₃	320.83
	极差	16.06
Fe	K ₁	345.27
	K ₂	222.83
	K ₃	362.34
	极差	139.51
Mn	K ₁	299.59
	K ₂	333.63
	K ₃	297.21
	极差	36.42
Zn	K ₁	336.35
	K ₂	288.85
	K ₃	305.24
	极差	47.50
Fe>Zn>Mn>Cu		Fe>Mn>Zn>Cu

2.2 对叶黄素含量的影响

Cu、Fe、Mn、Zn 不同补充量对胡子鲇皮肤叶黄素

含量的影响结果见表 5,由表 5 结果可见,胡子鲇背部皮肤中叶黄素含量以第 9 组叶黄素含量最高,为 11.58 mg/kg,第 2 组含量最低,为 1.34 mg/kg;胡子鲇腹部皮肤中叶黄素第 8 组含量最高,为 11.02 mg/kg,第 1 组含量最低,为 2.92 mg/kg。

对叶黄素含量的极差分析见表 6,3 个试验水平中,胡子鲇背部皮肤 Cu、Fe、Mn、Zn 不同补充量对叶黄素含量极差分别为 7.19、1.72、2.26、1.56;胡子鲇腹部皮肤 Cu、Fe、Mn、Zn 不同补充量对叶黄素含量极差分别为 6.59、1.75、1.37、1.23。结果表明,在本试验水平下,Cu、Fe、Mn 补充量的增加对胡子鲇背部皮肤叶黄素的积累是有利的,而 Zn 补充量的增加不利于对背部皮肤叶黄素含量的沉积,4 种元素对背部皮肤叶黄素含量影响为 Cu>Mn>Fe>Zn;对胡子鲇腹部皮肤叶黄素含量测定结果表明,胡子鲇腹部皮肤叶黄素含量随 Cu 补充量的增加而显著升高,Fe、Mn、Zn 补充量的增加对胡子鲇腹部皮肤总叶黄素含量无明显影响,4 种元素对腹部皮肤类胡萝卜色素含量的影响为 Cu>Fe>Mn>Zn。

表 5 4 种微量元素不同补充量对叶黄素含量的影响(mg/kg)

组别	Cu	Fe	Mn	Zn	背部皮肤总叶黄素含量	腹部皮肤总叶黄素含量
第 1 组	3.5	80	10	30	4.18	2.92
第 2 组	3.5	160	30	60	1.34	4.81
第 3 组	3.5	240	50	90	5.09	3.67
第 4 组	6.5	80	30	90	5.24	9.01
第 5 组	6.5	160	50	30	9.20	10.62
第 6 组	6.5	240	10	60	8.54	6.65
第 7 组	9.5	80	50	60	10.64	9.27
第 8 组	9.5	160	10	90	9.96	11.02
第 9 组	9.5	240	30	30	11.58	10.88

表 6 叶黄素含量的方差分析

项目	背部皮肤总叶黄素	腹部皮肤总叶黄素
Cu	K ₁	3.54
	K ₂	7.66
	K ₃	10.73
	极差	7.19
Fe	K ₁	6.69
	K ₂	6.83
	K ₃	8.40
	极差	1.72
Mn	K ₁	7.56
	K ₂	6.05
	K ₃	8.31
	极差	2.26
Zn	K ₁	8.32
	K ₂	6.84
	K ₃	6.76
	极差	1.56
Cu > Mn > Fe > Zn		Cu > Fe > Mn > Zn

3 讨论

鱼的真皮中分布着 4 种色素细胞,黑色素细胞(melanophore),含黑色素(melanin);虹彩细胞(iridocyte),含鸟粪素;黄色素细胞(guanin)和红色素细胞(xanthophore),含类胡萝卜色素。通过对胡子鲇皮肤类胡萝卜色素和叶黄素含量的测定可以看出,微量元素不同补给量对胡子鲇体色有一定的影响。

3.1 补充 Cu、Fe、Mn、Zn 对胡子鲇皮肤类胡萝卜色素含量的影响

类胡萝卜色素可使鱼体呈现黄色、橙色和红色等。类胡萝卜色素分为两大类:一类为不含氧的胡萝卜素,其呈色效果较差;另一类为含氧的叶黄素,它是鱼虾体内主要起呈色作用的色素。不同种类鱼虾对类胡萝卜

卜素的代谢能力也不同,可分为3类:第一类为红鲤鱼型,如金鱼、红鲤和锦鲤等,可将黄体素、玉米黄质转变成虾青素后再沉积在组织内;第二类为大虾型,包括几乎所有甲壳类,可将 β -胡萝卜素、黄体素和玉米黄质转变成虾青素;第三类为鲷鱼型,包括鲑鳟鱼和鲷鱼等,不能将上述物质转化形成虾青素,但可直接贮存于体内(皮肤、脂肪组织和卵内)。

本试验通过微量元素Cu、Fe、Mn、Zn的不同补充量,分析对类胡萝卜素含量的影响。试验表明:Cu的补充量从3.5~9.5 mg/kg,胡子鲶背部类胡萝卜素含量有所增加,腹部则呈现下降的趋势;Fe的补充量从80~240 mg/kg,胡子鲶背部类胡萝卜素总体有所上升,腹部则呈下降趋势;Mn的补充量从10~50 mg/kg,胡子鲶背部类胡萝卜素含量基本保持不变,腹部则呈下降趋势;Zn的补充量从30~90 mg/kg,胡子鲶背部和腹部类胡萝卜素含量都呈下降趋势。因此,饲料中Cu、Fe补充量的增高,有助于胡子鲶背部类胡萝卜素的积累,Mn、Zn补充量的增高,对背部类胡萝卜素的积累无显著影响;随着4种微量元素浓度的提高对胡子鲶腹部类胡萝卜素含量均呈下降趋势。

参考通过添加色素对胡子鲶正常着色时,背部类胡萝卜素显著升高,腹部不明显,参照自然条件下,胡子鲶体色为背部暗黄、腹部发白,因此,以背部的变化趋势判定微量元素对着色的影响。试验中Cu、Fe补充量的增加对胡子鲶着色是有利的,Mn、Zn补充量的增加对胡子鲶着色影响不大。

3.2 补充Cu、Fe、Mn、Zn对胡子鲶皮肤叶黄素含量的影响

叶黄素含量的高低更能直观地反映胡子鲶黄色素的沉积状况。本试验中,Cu补充量从3.5~9.5 mg/kg,胡子鲶背部及腹部叶黄素的含量均有显著升高;Fe补充量从80~240 mg/kg,胡子鲶背部叶黄素含量显著上升,腹部叶黄素含量在中浓度时略有升高,高浓度时下降,总体变化不大;Mn补充量从10~50 mg/kg,背部及腹部叶黄素含量均略有升高;Zn补充量从30~90 mg/kg,背部叶黄素含量略呈下降趋势,腹部出现波动,总体变化不大。

因此,结合类胡萝卜素含量测定结果,胡子鲶鱼体皮肤叶黄素的沉积量随Cu、Fe、Mn 3种微量元素补充量的增加而增加,呈正相关性;Zn在补充量增加

时,皮肤叶黄素含量略有下降,总体影响不大。

在养殖条件下,许多鱼体体色会发生变化,如黄颡鱼、胡子鲶、斑点叉尾鲷等。本试验不添加外源色素的条件下,通过微量元素的不同补充量、不同配比对比胡子鲶体表色素含量进行分析,结果表明矿物元素的不同搭配会对鱼体色素含量产生一定影响。因此,在实际生产配方中,应充分考虑微量元素的合理补充,减少饲料养殖条件下鱼体的褪色、变色问题,使养殖鱼体体色更加接近天然种类的颜色。

参考文献

- 1 崔青曼.鱼用着色剂诠释[J].河北渔业,1999(5):11~13
- 2 徐伟,白庆利,曹顶臣,等.彩鲫、银鲫、红鲫体色发育生物学初步观察[J].水产学杂志,1999,12(1):61~63
- 3 邵起生.动物的体色[J].生物学通报,1995,30(10):11~13
- 4 顾琼芬.类胡萝卜素功能性研究进展[J].杭州食品科技,2002(2):10~12
- 5 王吉桥.比目鱼体色异常的机理与对策[J].海洋科学,2002,26(2):27~30
- 6 Vernadakis A J, et al. Localization and partial characterization of melatonin receptors in amphioxus, hagfish, lamprey, and skate[J]. General-and-Comparative-Endocrinology, 1998, 110(1):67~78
- 7 Skarstein F, et al. Sexual dichromatism and the immunocompetence handicap: An observational approach using Arctic charr[J]. Oikos, 1996, 76(2):359~367
- 8 Yanar M, et al. The effect of fish size on pigmentation in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Turkish -Journal -of -Biology, 1999, 23(1):101~105
- 9 汤新慧.浅谈动物的生理性色变 [J].生物学通讯,1997,132(12):13~15
- 10 Olsen R E, Mortensen A. The influence of dietary astaxanthin and temperature on flesh colour in Arctic charr *Salvelinus alpinus* L[J]. Aquaculture Research, 1997,28(1): 51~58
- 11 叶元土,郭建林,萧培珍,等.养殖武昌鱼体色与鳞片黑色素细胞初步观察[J].饲料工业,2006,(22):29~31
- 12 王鑫,郭恩棉,苏振渝,等.鱼类白化现象病因浅谈[J].海洋科学,2003,27(7):18~20

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

养殖密度对黄颡鱼生长、饲料利用和能量收支的影响

杨严鸥 姚 峰 舒娜娜 颜艳艳 潘 宙

摘 要 试验探讨了在 3 种养殖密度下(14、28 和 42 尾/箱,换算成生物量为 1.85、3.71 和 5.56 kg/m³)黄颡鱼的生长、饲料利用和能量收支。结果显示,摄食率、蛋白质摄食率不受养殖密度的显著影响,饲料转化效率和蛋白质储积率随着养殖密度的增加显著下降,导致湿重、干重、蛋白质、脂肪和能量特定生长率和终末湿重显著下降。随着养殖密度的增加,生长能占食物能和同化能的比例显著下降,代谢能占食物能和同化能的比例显著上升,粪能和排泄能占食物能的比例无显著差异。

关键词 黄颡鱼;养殖密度;生长;饲料利用;能量收支

中图分类号 S964.7

在集约化养殖中,密度是影响鱼类生长和饲料利用效率的重要因素^[1],只有在适宜的养殖密度下,才能保证既获得较高的总渔获量,又使鱼体达到一定的规格,同时饲料利用效率也能得到尽可能的提高,从而降低饲料成本。一般认为,较高的养殖密度对鱼类的生长具有抑制作用,随着养殖密度升高,养殖鱼类的生长性能呈下降趋势^[2-4],也有研究显示,较高的养殖密度有利于鱼类生长^[5],不同的研究结果不同。黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco* Richardson)作为一种养殖鱼类,市场需求量较大,养殖前景广阔。

鱼类的生长是一种能量积累的过程,生长可以用能量收支公式表示,即 $G=C-R-F-U$, G 、 C 、 R 、 F 和 U 分别表示生长能、摄食能、代谢能、粪便能和排泄能,生长能可看作是食物能与能量收支其它组分之差。到目前为止,有关养殖密度对鱼类能量收支影响的研究非常缺乏,养殖密度影响黄颡鱼生长的研究很少,因此,本试验对这些问题进行研究,以进一步探讨黄颡鱼生长和饲料利用效率差异的能量学机制和为黄颡鱼的生理生态学研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 饲养条件

试验采用 12 只规格为 70 cm × 55 cm × 37 cm 的水簇箱,水深 20 cm,室内循环水装置,利用空调提高

室温,10 支 300 W 电热棒置于蓄水箱中,使水温保持 (25±1) °C,自然光照。

1.2 试验步骤

试验鱼取自湖北荆州市水产科学研究所,为当年鱼种。实验室暂养 14 d 以上,期间用配合饲料投喂。试验饲料配方及营养水平见表 1。饲料直径 2~3 mm,沉性,60 °C 烘干后置于 4 °C 的冰柜中保存。

表 1 试验饲料配方及营养水平

项目	含量
原料组成(%)	
白鱼粉	55.08
小麦	34.34
植物油	2.48
α-淀粉	2.00
维生素预混料 ¹	0.39
维生素	0.11
矿物质预混料 ²	4.5
氯化胆碱	0.10
三氧化二铬	1.00
营养水平(干物质组成)	
干物质(%)	95.23
粗蛋白(%)	43.53
粗脂肪(%)	8.75
总能量(J/mg)	18.53

注:1.每 100 g 维生素预混料含:维生素 A 550 IU、维生素 D₃ 100 IU、维生素 E 5 IU、维生素 K 1 g、胆碱 55 g、尼克酸 10 g、核黄素 2 g、吡哆醇 2 g、硫胺素 2 g、泛酸钙 5 g、生物素 0.01 g、叶酸 0.5 g、维生素 B₁₂ 2 g、抗坏血酸 10 g、肌醇 10 g。

2.每 100 g 矿物质预混料含:氯化钠 1 g、硫酸镁 15 g、磷酸二氢钠 25 g、磷酸二氢钾 32 g、磷酸二氢钙 20 g、柠檬酸铁 2.5 g、乳酸钙 3.5 g、硫酸锌 0.353 g、硫酸锰 0.162 g、硫酸铜 0.031 g、氯化钴 0.001 g、碘酸钾 0.003 g。

试验开始前,将鱼饥饿 24 h,然后随机取样称重,每箱分别按 14、28、42 尾鱼的密度放养,每种养殖密度含 4 个平行箱,各养殖密度下单尾试验鱼平均体重为 10.2 g 左右,3 种处理的鱼体生物量分别换算为

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

姚峰、舒娜娜、颜艳艳、潘宙,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-10-22

1.85、3.71 和 5.56 kg/m³。同时取 4 组样品(每组 9 尾),称重后 70 ℃ 烘干至恒重,用以分析初始鱼体生化组成。生长试验共 30 d,每天上午 9:00、下午 13:00 各投饲 1 次,1 h 后回收残饵。残饵量用饲料溶失率校正,测定溶失率时随机在 4 个无鱼的缸中各放入 1 份已称重的饲料,1 h 后回收,70 ℃ 烘干至恒重并称重。每天 16:45 收集粪便,70 ℃ 烘干。

试验结束时,将鱼饥饿 24 h 后称量每箱鱼的总重,再从每箱鱼中随机取样 5~10 尾,70 ℃ 烘干至恒重,用以分析终末躯体生化组成。

1.3 生化分析

测定鱼样和饵料样品的干物质(%)、氮(%)和能量(J/mg)含量,粪便样品的氮(%)和能量(kJ/g)含量,饲料和粪便样品的 Cr₂O₃ 含量。测定干物质时在 70 ℃ 下干燥样品至恒重;用凯氏定氮法测定含氮量;用微量能量计测定能值;用索氏乙醚抽提法测定脂肪含量;用 Bolin 等^[7]的方法测定 Cr₂O₃ 含量。

1.4 结果计算

湿重特定增长率(SGR_w)(%/d)=(Ln W_t-Ln W₀)/t;

干重特定增长率(SGR_d)(%/d)=(Ln W_{dt}-Ln W_{do})/t;

蛋白质特定增长率(SGR_p)(%/d)=(Ln W_{pt}-Ln W_{po})/t;

脂肪特定增长率(SGR_f)(%/d)=(Ln W_{ft}-Ln W_{fo})/t;

能量特定增长率(SGR_e)(%/d)=(Ln E_t-Ln E₀)/t;

摄食率(RL)(%/d)=200 I_{tr}/[t×(W_t+W₀)];

饲料转化率(FCE)(%)=(W_t-W₀)/I_{tr};

蛋白质摄食率(I_p)(%/d)=200 I_{tp}/[t×(W_t+W₀)];

蛋白质储积率(R_p)(%)=(W_{pt}-W_{po})/I_{tp}。

式中 W_t——鱼体终末湿重;

W₀——鱼体初始湿重;

W_{dt}——鱼体终末干重;

W_{do}——鱼体初始干重;

W_{pt}——鱼体终末体蛋白重量;

W_{po}——鱼体初始体蛋白重量;

W_{ft}——鱼体终末体脂肪重量;

W_{fo}——鱼体初始体脂肪重量;

t——试验周期(30 d);

I_{tr}——试验期间的总饲料消耗(干重);

I_{tp}——试验期间的总蛋白质消耗。

能量收支式表示为 C=G+R+F+U,以同化能形式表示为 A=G+R,式中 A 为同化能,C 为食物能[J/(g·d)],等于摄食量(g)与饲料能值(J/g)的乘积;G 为生长能,为终末鱼体能量与初始鱼体能值之差;F 为粪能,F=C(1-De),其中 De 为能量表观消化率,De=100-100C₁N₂/(N₁×C₂),

式中 C₁ 为饲料中 Cr₂O₃ 的百分含量,C₂ 为鱼粪中 Cr₂O₃ 的百分含量,N₁ 为饲料中的能量含量,N₂ 为鱼粪中的能量含量;U 为排泄能,通过氮收支差值法计算,U=24.83(C_N-F_N-G_N);C_N 为摄食氮[mg/(g·d)],G_N 为生长氮[mg/(g·d)];F_N 为粪氮[mg/(g·d)];R 为代谢能,通过差值法算得,R=C-G-F-U。

所有试验数据平均数用双因子方差分析后进行组间差异的多重比较(Duncan's procedure)。统计软件为 Statistica Version 5.0。

2 结果与分析

2.1 养殖密度对黄颡鱼生长的影响(见表 2)

表 2 养殖密度对黄颡鱼生长的影响(平均值±标准差)(n=4)

项目	D ₁₄	D ₂₈	D ₄₂
平均初始湿重(g)	10.21±0.08	10.20±0.08	10.30±0.07
平均终末湿重(g)	16.30±1.08 ^a	14.03±0.37 ^b	12.72±0.74 ^c
湿重特定增长率(%/d)	1.13±0.24 ^a	0.78±0.05 ^b	0.52±0.04 ^c
干重特定增长率(%/d)	1.16±0.12 ^a	0.82±0.09 ^b	0.68±0.15 ^b
蛋白质特定增长率(%/d)	1.07±0.04 ^a	0.83±0.10 ^b	0.52±0.06 ^c
脂肪特定增长率(%/d)	0.77±0.16 ^a	0.44±0.07 ^b	0.39±0.07 ^b
能量特定增长率(%/d)	1.04±0.25 ^a	0.72±0.08 ^b	0.55±0.02 ^c

注:同行数据肩标字母代表 Duncan's 检验的结果,字母不同表示有差异显著(P<0.05)。下表同。

由表 2 可知,随着养殖密度加大,平均终末湿重显著下降,各组间差异显著;湿重特定增长率、干重特定增长率、蛋白质特定增长率、脂肪特定增长率和能量特定增长率也随养殖密度的增大呈显著下降趋势,但干重特定增长率和脂肪特定增长率在 D₂₈ 和 D₄₂ 组间差异不显著。

2.2 养殖密度对黄颡鱼饲料利用的影响(见表 3)

表 3 养殖密度对黄颡鱼饲料利用的影响(平均值±标准差)(n=4)

项目	D ₁₄	D ₂₈	D ₄₂
摄食率(%/d)	2.90±0.20	3.08±0.36	2.79±0.25
饲料转化率(%)	39.21±5.23 ^a	25.50±2.02 ^b	19.04±2.08 ^c
蛋白质摄食率(%/d)	1.22±0.08	1.28±0.15	1.18±0.10
蛋白质储积率(%)	13.70±2.24 ^a	10.09±1.17 ^b	7.28±1.02 ^c

由表 3 可知,摄食率、蛋白质摄食率随着养殖密度的增加无显著变化,饲料转化效率和蛋白质储积率随养殖密度增加显著下降。

2.3 养殖密度对黄颡鱼能量收支的影响(见表 4)

由表 4 可知,随着养殖密度的增加,生长能占食物能和同化能的比例显著下降,代谢能占食物能和同化能的比例显著上升,粪能和排泄能占食物能的比例略有上升,但差异不显著。

表4 养殖密度对黄颡鱼能量收支的影响(平均值±标准差)(n=4)

项目	D ₃₄	D ₂₈	D ₄₂
食物能 C[J/(g·d)]	1 456±232 ^a	1 835±177 ^b	2 901±245 ^c
生长能/食物能 G/C(%)	13.06±2.70 ^a	9.20±1.02 ^b	8.37±1.50 ^b
代谢能/食物能 R/C(%)	74.69±2.71 ^a	78.19±1.40 ^b	80.22±2.63 ^b
粪能/食物能 F/C(%)	5.43±0.52	5.44±0.39	5.75±.14
排泄能/食物能 U/C(%)	6.82±0.64	7.17±0.48	7.36±2.30
生长能/同化能 G/A(%)	14.88±3.08 ^a	10.53±1.21 ^b	7.80±1.23 ^c
代谢能/同化能 R/A(%)	85.12±3.08 ^a	89.47±1.21 ^b	92.20±1.23 ^c

3 小结与讨论

本试验中,随着养殖密度的增加,黄颡鱼的湿重、干重、蛋白质、脂肪和能量特定生长率和终末湿重显著下降。对北极鲑^[8]、奥尼罗非鱼^[9]、花鲈^[10]、鲈^[11]等的研究发现,在高密度环境下,这些鱼类的特定生长率也明显低于低密度水平。从饲料利用的角度看,高密度下的低生长率主要与摄食量和饲料转化效率的下降有关^[3]。在自然水体中,养殖密度的增加有时会导致饵料不足,从而引起摄食不足,本研究采用过量投喂方式,该问题可不予考虑,生长率的下降主要与饲料转化效率的下降有关,对北极鲑^[8]、罗非鱼^[9]、花鲈^[10]、鲈^[11]等的研究也显示了类似的结果。

饲料转化效率下降有多种原因,一方面,高密度养殖常会导致水质恶化,引起鱼类生理的变化,对鱼的生长产生有害^[12];另一方面,应该与鱼类的社会性作用有关,养殖密度增大导致鱼类活动增加^[13,14],即活动耗能增加,使整个代谢能增加。本试验中,随着养殖密度的增加,代谢能占食物能和同化能的比例显著上升,生长能占食物能和同化能的比例显著下降,证明了这种观点。

本试验中,随着养殖密度增大,蛋白质储积率显著下降,这表明,生产同样重量的鱼体蛋白质,高密度组要比低密度组消耗更多的饲料蛋白质,对虹鳟影响的研究得出类似的结果^[15]。有研究表明,奥尼罗非鱼在高密度养殖时蛋白质效率显著下降^[9],这部分多消耗的蛋白质可能被分解代谢,用于能量消耗。

参考文献

- Allen K O. Effects of stocking density and water exchange rate on growth and survival of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), in circular tanks[J]. Aquaculture, 1974, 4: 29-39
- Shelbourn J E, Brett J R, Shirahata S. Effect of temperature and feeding regimes on the specific growth rate of sockeye salmon fry (*oncorhynchus nerka*) with a consideration of size effect [J]. J.Fish. Board Can., 1973, 30: 1 191-1 194

- He Xiqin, Jia Lizhu, Li Zhongjie, et al. Nutrient requirements of juvenile allogynogenetic crucian carp, *Carassius auratus gibelio*// Fish Physiology, Fish Toxicology and Fisheries Management (Ryans RC, eds), Proceedings of an International Symposium, Guangzhou, 1988. 73-87
- Irwin S, Halloran J O, FilzGerald, R D. Stocking density, growth and growth variation in Juvenile turbot, *cophthalmus maxims* [J]. Aquacult, 1999, 178: 77-78
- Nicholas J K, Hunting W H. Effects of Larval Stocking Density on Laboratory -Scale and Commercial -Scale Production of Summer Flounder *Paralichthys dentatus* [J]. Journal of the world aquaculture society, 2000, 31(3): 436-445
- 欧阳敏,魏宏民,张明,等.池塘主养黄颡鱼不同放养密度的对比试验[J]. 水产科学, 2003(3): 31-32
- Bolin D W, King R P, Klosterman E W. A simplified method for the determination of chromic oxide (Cr_2O_3) when used as an index substance[J]. Science, 1952, 116: 634-635
- J Jergen S C, Yngvar S S, Malcolm J. The combined effects of stocking density and sustained exercise on the behaviour, food intake, and growth of juvenile Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) [J]. Can. J. Zool., 1992, 70: 115-122
- 杨严鸥,姚峰,罗平.密度对奥尼罗非鱼生长和饲料利用效率的影响[J]. 湖北农学院学报, 2004(3): 193-195
- 张雅芝,戴立欣.饲养密度和饵料密度对花鲈稚鱼生长及存活的影响[J]. 集美大学学报, 2003(3): 1-7
- Omar E A. Optimum dietary protein level and stocking density for catfish (*Clarias lazera*) fingerlings in concrete ponds [J]. Anim. Physiol. Anim. Nutr. Z. Tierphysiol. Tierernaehr. Futtermittelkd, 1996, 76: 122-131
- Femderman O C, Carpenter M R. Effects of crowding on the behavior of juvenile hatchery and wild landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Animal Behav, 1971, 19: 439-447
- Marchand F, Boisclair D. Influence of fish density on the energy allocation pattern of juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*) [J]. Can. J. Fish. Aquat. Sci. J. Can. Sci. Halieut. Aquat., 1998, 55 (4): 796-805
- Metcalfe N B. Intraspecific variation in competitive ability and food intake in salmonids: consequences for energy budgets and growth rates[J]. J. Fish Biol., 1986, 28: 525-531
- Trzebiatow S R, Filiplak J, Jakubowski R. Effect of stocking density on growth and survival of rainbow trout (*salmo gairdneri*) [J]. Aquaculture, 1981, 22: 289-295

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

纳米氧化锌与普通氧化锌抑菌性能差异研究

喻兵权 张宏福 陆 伟 唐湘芳 邢方军

摘 要 试验研究纳米氧化锌与普通氧化锌对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌作用。试验结果表明,当纳米氧化锌质量分数为 3%时,纳米氧化锌的抑菌效果出现了一个陡然的上升;当纳米氧化锌质量分数为 4%时,对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌产生了明显抑菌效应,紫外线光照时抑菌率分别达到了 97.1%和 98.3%;当纳米氧化锌质量分数为 5%时,无论是紫外线光照还是日光灯照射时抑菌率几乎达到了 100%。在日光灯照射条件下,无论是对大肠杆菌还是金黄色葡萄球菌,纳米氧化锌均比普通氧化锌有更好的抑菌作用。当纳米氧化锌和普通氧化锌质量分数均为 5%条件下,对大肠杆菌的抑菌率分别达到 97.9%和 52.9%;对金黄色葡萄球菌的抑菌率分别达到 98.8%和 68.3%。由此可知,纳米氧化锌在紫外线光照下的抑菌作用高于日光灯照射;纳米氧化锌对金黄色葡萄球菌的抑制作用高于对大肠杆菌的抑菌作用;纳米氧化锌的抑菌性能强于普通氧化锌。

关键词 纳米氧化锌;普通氧化锌;抑菌率

中图分类号 S816.7

Research on the difference of bactericide perform mance between Nano-ZnO and ZnO

Yu Bingquan, Zhang Hongfu, Lu Wei, Tang Xiangfang, Xing Fangjun

Abstract The experiment studies the bactericide effects of Nano-ZnO and ZnO on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. The results indicated that: bactericide impacts of Nano-ZnO appeared a zoom when its concentration was 3%. Nano-ZnO engendered a obvious bactericide effects on Escherichia coli and Staphylococcus aureus when its concentration was 4%, which bactericide rate was 97.1% and 98.3% respectively at ultraviolet. Bactericide rate was almost reached 100% whether ultraviolet or illumination when its concentration was 5%. Nano-ZnO had much more bactericide effects on whether Escherichia coli or Staphylococcus than ZnO at illumination. When the concentration of Nano-ZnO and ZnO was 5%, their bactericide effects on Escherichia coli was 97.9% and 52.9% respectively, and bactericide effects on Staphylococcus was 98.8% and 68.3%. Thus it can be seen that Nano-ZnO had much more bactericide effects at ultraviolet than illumination, Nano-ZnO had much more bactericide effects on Staphylococcus than Escherichia coli, Nano-ZnO had much more bactericide effects than ZnO.

Key words Nano-ZnO; ZnO; bactericide rate

1 材料和方法

1.1 试验材料

大肠杆菌 (Escherichia Coli)、金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus), 由北京农林科学院畜禽生物

制品中心提供。纳米氧化锌, 由陕西中科纳米材料股份有限公司提供, 饲料级, 纯度>95%, 粒径 30~50 nm, 通过均匀沉淀法制备, 通过 X-射线衍射仪、透射电镜、静态氮气吸附法进行纳米表征测定, 经原子吸收测定 Zn 含量为 76.3%; 饲料级氧化锌, 由北京益农饲料中心提供, 纯度>99%, 含 Zn 量 72%。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的配制

LB 液体培养基: 酵母提取物 5 g、氯化钠 10 g、胰蛋白胨 10 g, 加水定容至 1 000 ml, 调 pH 值至 7.0~7.2。121 ℃高压灭菌 20 min。

LB 固体培养基: 按 15 g/l 比例加琼脂粉于 LB 液体培养基中, 121 ℃高压灭菌 20 min。

普通培养基(液体): 将牛肉膏 5 g、蛋白胨 10 g、氯

喻兵权, 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物营养国家重点实验室, 100094, 北京。

张宏福(通讯作者)、唐湘芳, 单位及通讯地址同第一作者。

陆伟, 江西农业大学动物科学技术学院。

邢方军, 天津世纪兴种养业股份有限公司。

收稿日期: 2007-08-20

★ 由国家公益性研究项目 2004DIB4J152, 国家支撑计划项目 2006BAD14B03 资助

化钠 5 g,加入杯内,加水约 500~800 ml 搅拌使其溶解完全。用 5 mol/l NaOH 调 pH 值至 7.4,加水定容至 1 000 ml。121 ℃高压灭菌 20 min。

普通培养基(固体):按 15 g/l 比例加琼脂粉于普通培养基(液体)中,121 ℃高压灭菌 20 min。

1.2.2 细菌活菌计数

将保存的大肠杆菌菌种接种(挑单个菌落)于 LB 液体培养基中,于 37 ℃培养 16~18 h,然后将菌悬液按 10 倍顺序依次稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} ,即 9 ml 无菌生理盐水加 1 ml 菌悬液为 10^{-1} ,依次类推。选取 0.1 ml 菌液放于 LB 平板培养基上,轻轻推开菌液,不要接触平板边缘,以免影响计数。作 3 只皿,注意吸水,避免细菌繁殖成一片,置 37 ℃培养 18~20 h,计算菌落数目。挑选生长 30~300 个菌落的平板计数,共数两个平板求其平均数。根据稀释浓度求其活菌平均数。根据稀释浓度(一般细菌适宜浓度为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7})算出每毫升大肠杆菌菌液的活菌数为 6×10^8 cfu/ml。

金黄色葡萄球菌计数同上,算出每毫升金黄色葡萄球菌菌液的活菌数为 6×10^7 cfu/ml。

1.2.3 备用菌液的配制

用无菌生理盐水将菌液稀释至 6×10^5 cfu/ml,即将大肠杆菌菌液、金黄色葡萄球菌菌液分别稀释 10^3 、 10^2 倍,备用。

1.2.4 不同质量分数(1%、2%、3%、4%、5%)纳米氧化锌及普通氧化锌溶液的配制

0.2 ml 纳米氧化锌溶液(10%)+1.8 ml 无菌生理盐水配制成 1%纳米氧化锌溶液;0.4 ml 纳米氧化锌溶液(10%)+1.6 ml 无菌生理盐水即 2%纳米氧化锌溶液;0.6 ml 纳米氧化锌溶液(10%)+1.4 ml 无菌生理盐水即 3%纳米氧化锌溶液;0.8 ml 纳米氧化锌溶液(10%)+1.2 ml 无菌生理盐水即 4%纳米氧化锌溶液;1.0 ml 纳米氧化锌溶液(10%)+1.0 ml 无菌生理盐水即 5%纳米氧化锌溶液。

1%、2%、3%、4%、5%普通 ZnO 溶液的配制同上。

1.2.5 抑菌试验

取 0.1 ml 备用菌液分别加入装有 2 ml 质量分数分别为 1%、2%、3%、4%、5%的纳米氧化锌溶液和装有生理盐水的对照组无菌试管中。试验分为 2 个重复组,1 组试管置于紫外线灯下垂直照射 6 h,同时另一组试管置于日光灯下垂直照射 6 h 作为对照。6 h 后,每支试管中吸取 0.1 ml 放入固体培养基中,用涂布棒涂均匀,放入 37 ℃恒温培养箱中培养 24 h,记录菌落数。

普通氧化锌抑菌试验同上,但无紫外线光照试验组。

1.2.6 抑菌率计算

抑菌率(%)=(对照组菌落数-试验组菌落数)/对照组菌落数。

2 结果与讨论

2.1 纳米氧化锌对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌的抑菌结果(见图1、图2)

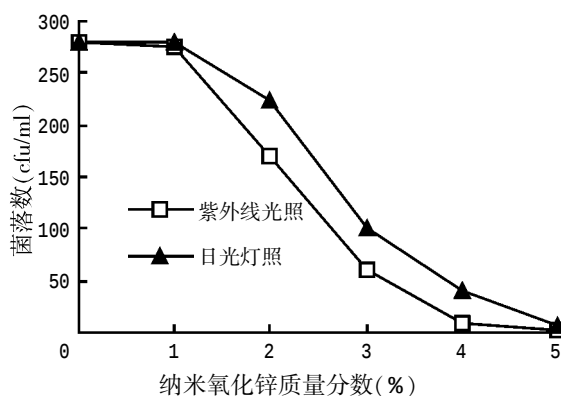


图1 纳米氧化锌对大肠杆菌生长抑制作用

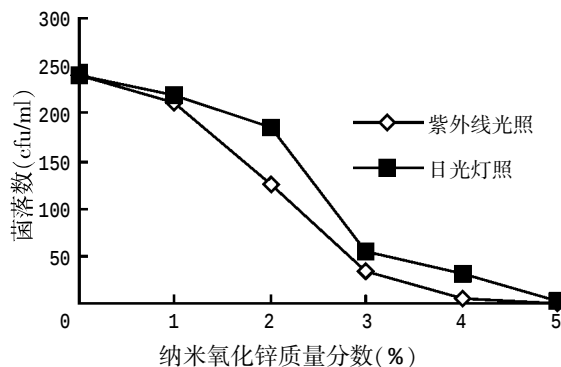


图2 纳米氧化锌对金黄色葡萄球菌生长抑制作用

从图1和图2中可以看出,随着纳米氧化锌质量分数的提高,菌落数都呈下降的趋势,与马正先(2004)、宋志慧(2004)报道一致。显然,纳米氧化锌的存在可以抑制大肠杆菌(G^-)和金黄色葡萄球菌(G^+)的生长。由此可知,纳米氧化锌对细菌的抑菌作用没有明显的革兰氏阳性菌(G^+)和阴性菌(G^-)的区别,该结果与高艳玲(2005)报道结论一致。

纳米氧化锌对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌抑菌率的影响见表1、表2。从表1和表2中可以看出,当纳米氧化锌质量分数为3%时,纳米氧化锌的抑菌效果出现了一个陡然上升的趋势。当纳米氧化锌质量分数为4%时,对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌产生了明显抑菌效应,紫外线光照时生长抑菌率分别达到了97.1%和98.3%;当纳米氧化锌质量分数为5%时,无

论是紫外线光照还是日光灯照时,生长抑菌率几乎达到了100%。随着纳米氧化锌质量分数的升高,抑菌率增大趋势逐渐变缓,说明抑菌率和纳米氧化锌的质量分数不呈线性关系。

从两个表中紫外线光照组与日光灯照组的对比可以看出,同一质量分数下,紫外线光照较日光灯照组纳米氧化锌的抑菌效果更好。纳米氧化锌具有极强的化学活性,能与多种有机物发生氧化反应(包括细菌内的有机物),从而把大部分细菌、病菌杀死。

表1 纳米氧化锌对大肠杆菌抑菌率的影响(%)

纳米氧化锌质量分数	抑菌率	
	紫外线光照	日光灯照
0	0	0
1	1.79	0
2	39.3	12.9
3	78.6	64.3
4	97.1	85.7
5	99.3	97.9

表2 纳米氧化锌对金黄色葡萄球菌抑菌率的影响(%)

纳米氧化锌质量分数	抑菌率	
	紫外线光照	日光灯照
0	0	0
1	11.7	8.3
2	48.3	23.3
3	85.9	77.5
4	98.3	86.9
5	99.6	98.8

对于纳米氧化锌的抑菌机制还存在一种说法,即 Zn^{2+} 接触反应,造成微生物共有成分被破坏或者产生功能障碍。当微量 Zn^{2+} 接触微生物细胞膜时,因后者带负电,依靠库仑引力,使二者牢固结合,使蛋白质凝固,破坏细胞合成酶的活性,细胞丧失分裂增殖的能力而使其死亡。其抗菌机制还有另外一种说法(即催化假说),用它来解释以上结果更为合理。

纳米氧化锌在阳光,特别是在紫外光照射下,在水和空气中能自行分解出自由移动的带负电的电子,同时留下带正电的空穴。空穴可以激活氧和氢氧根,使吸附于其上的水和空气变成活性的氧和氢氧根,它们具有很强的氧化还原作用,使细胞膜损伤而导致细菌的死亡。

当纳米氧化锌的质量分数逐渐增高时,抑菌作用不断增强,其原因可能是由于纳米氧化锌质量分数较低时,有效光子不能完全转化为化学能;适当增加纳米氧化锌的质量分数,能产生更多的电子-空穴对,提高抑菌能力;但质量分数过高时,造成光的散射,降低了产生的电子-空穴对数目,从而导致抑菌能力下降。

从表1、表2可以看出,日光灯照射组也出现氧化锌抑制细菌生长的现象,这可能是由于有效光子数不足,产生的 $\cdot OH$ 数目相对较少,从而导致该条件下抑菌效果低于紫外线光照组。

2.2 纳米氧化锌与普通氧化锌抑菌作用差异(见图3、图4)

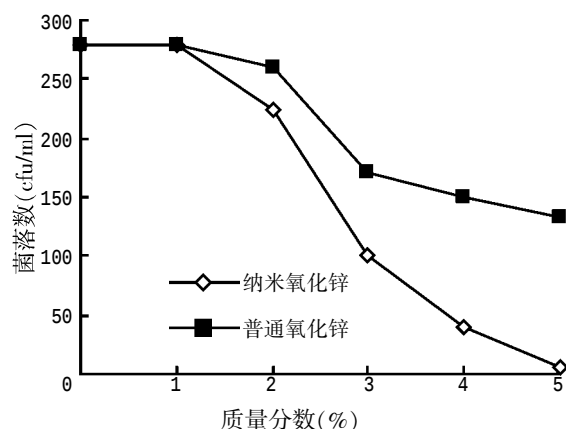


图3 纳米氧化锌与普通氧化锌对大肠杆菌生长抑制作用

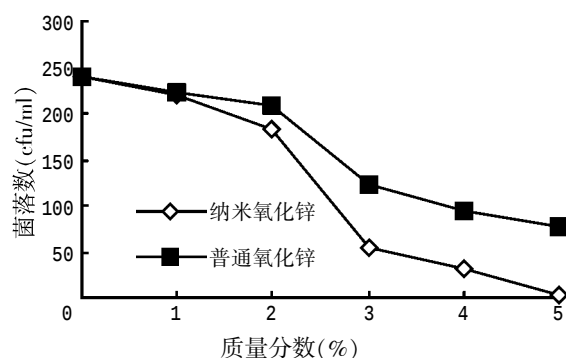


图4 纳米氧化锌与普通氧化锌对金黄色葡萄球菌生长抑制作用

从图3和图4可以看出,在日光灯照条件下,无论是对大肠杆菌还是金黄色葡萄球菌,纳米氧化锌均比普通氧化锌有更好的抑菌作用。当纳米氧化锌和普通氧化锌质量分数均为5%条件下,对大肠杆菌的抑菌率分别达到97.9%和52.9%;对金黄色葡萄球菌的抑菌率分别达到98.8%和68.3%。有研究表明,在5 min内,纳米氧化锌对金黄色葡萄球菌的杀菌率为98.86%,大肠杆菌为99.93%,显著高于普通氧化锌。曲敏利等(2004)的研究结果表明,纳米氧化锌的抑菌半径是普通氧化锌的2倍以上,同时在有光的条件下,纳米氧化锌的抑菌效果更佳。其它一些该方面的报道在国内外很少见。

由于纳米氧化锌具有极强的表面效应,表面原子数与总原子数之比随着纳米粒子尺寸的减小而大幅

度的增加,粒子的表面能及表面张力也随着增加,从而引起纳米粒子性质的变化;同时纳米氧化锌的表面原子所处的晶体场环境及结合能与内部原子有所不同,存在许多悬空键,并具有不饱和性质,因而极易与其它原子相结合而趋于稳定,所以具有很高的化学活性;另外,由于纳米氧化锌的比表面积较大,表面的键态与颗粒内部的不同,表面原子配位不全,这就导致表面活性位置增多,形成凸凹不平的原子台阶,加大了反应接触面。因此纳米氧化锌比普通氧化锌具有更高的催化活性及光催化活性。 O^{2-} 空位在光催化反应中起重要作用,在催化反应中,氧缺位越多,催化活性越高。这些决定纳米氧化锌比普通氧化锌有更强的氧化性,能氧化多种有机物(包括细菌内部的有机质),也可将大部分细菌和病毒杀死,故纳米氧化锌比普通氧化锌对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌有更好的抑菌作用。

2.3 纳米氧化锌对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌生长抑制作用差异(见图5)

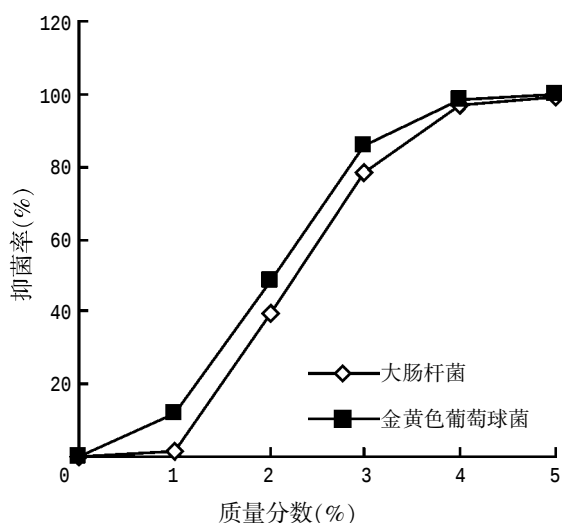


图5 纳米氧化锌对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌生长抑制作用

一般认为影响氧化锌抗菌活性因素有:①粉体产生的阳离子;②粉体产生的活性氧;③pH值;④细菌膜壁的机械破损。

从试验结果可以看出,纳米氧化锌对金黄色葡萄球菌的抑菌效果要好于大肠杆菌,这与马正先等(2004)报道的结果一致。然而,Osamu Yamamoto(2001)利用 $0.1\sim 0.8\mu m$ 的氧化锌粒子,研究了其对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌能力,试验发现,氧化锌杀灭大肠杆菌的能力强于杀灭金黄色葡萄球菌的能力,

另外,随着粒径的减小,杀菌能力提高;其中粉体表面产生的 H_2O_2 成为抑制细菌生长的主要因素,另一因素是酸碱度。

可见,对于纳米氧化锌究竟对于哪种菌有更强的抑菌性能未能达成一致的见解,有待进一步研究。

3 结论

3.1 纳米氧化锌在紫外线光照射下的抑菌作用高于日光灯照射。

3.2 纳米氧化锌的抑菌性能强于普通氧化锌,这也是低剂量的纳米氧化锌替代高剂量的普通氧化锌成为促生长剂原因之一,但是否能够在动物生产实践中得到预期的效果,有待进一步进行动物试验研究。

3.3 纳米氧化锌对金黄色葡萄球菌的抑制作用高于对大肠杆菌的抑菌作用。这一方面说明纳米氧化锌具有抑制细菌生长的作用;另一方面也说明不同的细菌对纳米氧化锌的敏感性是有区别的。纳米氧化锌抑菌作用的广谱性有待进一步研究。

参考文献

- 1 祖庸,王训,吴金龙,等.新型无机抗菌剂-超微氧化锌[J].化工时刊,1999,13(1):7~9
- 2 曲敏利,姜万超.纳米氧化锌抗菌机理探讨[J].印染助剂,2004,21(6):45~46
- 3 马正先,韩跃新,马云东,等.纳米氧化锌的杀菌性能[J].矿冶,2004,13(4):57~59
- 4 宋志慧,商勇,张学萍.纳米ZnO对细菌的抑制作用[J].青岛科技大学学报[J],2004,25(3):232~234
- 5 高艳玲,刘熙,王宗贤,等.纳米金属氧化物对食品污染菌的杀抑能力研究[J].食品科学,2005,26(4):45~48
- 6 吴兴惠.无机抗菌材料及应用[J].云南大学学报(自然科学版),2002,24(1A):1~10
- 7 许莹.无机抗菌剂和抗菌功能材料的现状和发展[J].河北理工学院学报,2001,23(4):77~82
- 8 张雪娜,郑岳华.材料防霉抗菌功能及检测方法[J].陶瓷学报,2001,22(3):200~203
- 9 罗建中,齐水冰,操洲杏,等.光催化氧化法处理垃圾填埋场渗滤液的研究[J].环境污染与防治,2001,23(2):63~65
- 10 贺飞,唐怀军,赵文宽,等.纳米 TiO_2 光催化负载技术研究[J].环境污染治理技术与设备,2001,2(2):47~48
- 11 刘平,林华香,付贤智,等.掺杂 TiO_2 光催化膜材料的制备及其灭菌[J].催化学报,1999,20(3):325~328
- 12 张青山,宋志慧,张志妮.纳米二氧化钛光催化作用及其在环境领域中的应用[J].青岛化工学院学报(自然科学版),2002,23(4):13~16
- 13 Osamu Yamamoto. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide [J]. Inorganic Materials,2001(3):643~646
- 14 许宗祥,张健,林敬东,等.纳米ZnO粉体的制备及其影响因素[J].厦门大学学报(自然科学版),2002,41(4):472~474

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

沼泽红假单胞菌发酵培养的研究

杜冰 杨公明 刘长海 张延涛 张忠武

摘要 沼泽红假单胞菌是目前光合细菌中应用和研究得较为广泛的光合细菌之一。通过对沼泽红假单胞菌的生长条件进行研究,发现 pH 值、温度、接种量等影响沼泽红假单胞菌的生长,并且它们之间又相互影响。经过单因素试验得出:在酵母膏浓度为 0.25%、光照强度为 5 625 Lx、pH 值为 6、接种量为 10%、培养温度为 25~30 ℃的条件下,沼泽红假单胞菌的生长态势最好。

关键词 沼泽红假单胞菌;生长条件;发酵;培养

中图分类号 Q939.11+2

光合细菌(Photosynthetic Bacteria)是自然界最广泛存在的比较古老的细菌类群,具有原始光能合成体系,能在厌氧条件下进行不放氧的光合作用^[1,2],它包括有红螺菌科(Phodospirillaceae)、着色菌科(Chromatiaceae)、绿杆菌科(Chlorobiaceae)、绿色丝状菌科(Chloroflexaceae)4 科^[3-5]。光合细菌具有多重代谢方式,尤其在对高浓度有机废水的净化处理中,表现出负荷低、效率高及投资少的优点;在禽畜养殖方面,光合细菌可作为一种饲料蛋白补充,还可以起到益生菌的作用。在水产养殖方面,有改善水质,预防鱼病的作用,对产量和成活率均有显著的提高^[6-8]。在光合细菌中沼泽红假单胞菌的应用最为广泛,是我国农业部颁布的 12 种允许在饲料中直接添加的活体微生物之一。本文研究沼泽红假单胞菌培养过程中各因素的影响,得出最佳培养条件,为光合细菌的研究和开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌

沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*) D1 由广州广牧丰生物技术有限公司提供。

1.2 培养基的制备

磷酸氢二钾 0.78 g、磷酸二氢钾 0.5 g、硫酸镁 0.2 g、酵母膏 0.1 g、氯化钠 0.5 g、氯化钙 0.05 g、硫酸铵 0.05 g、醋酸钠 1.65 g、硼酸钠 0.38 g、钼酸铵 0.22 g、水 1 000 ml, pH 值 6.7。

1.3 计数(光密度法)

杜冰,华南农业大学食品学院,副教授,博士后,510642,广东省广州市。

杨公明,单位及通讯地址同第一作者。

刘长海,仲恺农业技术学院食品科学系。

张延涛、张忠武,广州广牧丰生物技术有限公司。

收稿日期:2007-08-20

每隔 12 h 取样,在 375 nm 下测定发酵液的吸光度值^[9]。

2 结果

2.1 D1 菌的生长曲线

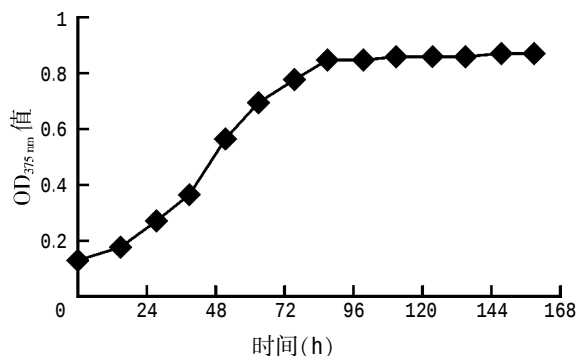


图 1 D1 菌在普通营养培养基中的生长曲线

由图 1 的生长曲线可看出,0~20 h 为沼泽红假单胞菌的生长延滞期,处于此阶段的菌体细胞体积增长较快,对环境的敏感性较强。在 24~75 h,进入对数生长期,75 h 之后,进入稳定期,生长曲线趋于平衡。

2.2 D1 菌在不同初始 pH 值下的生长情况比较(见图 2)

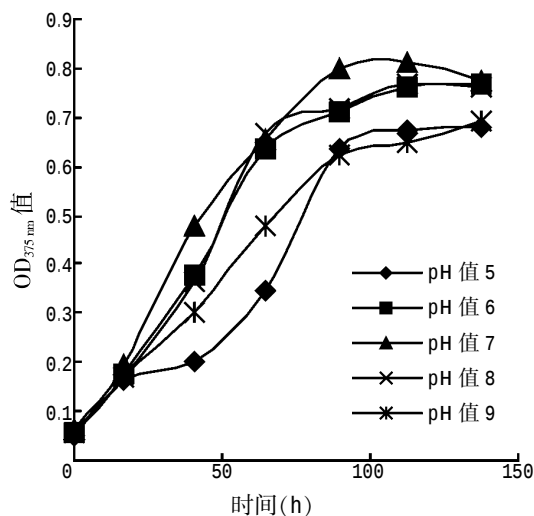


图 2 不同 pH 值条件下 D1 菌的生长曲线

从图 2 中可以看出,沼泽红假单胞菌在不同 pH 值的培养基中其生长速率不同;沼泽红假单胞菌生长的适宜 pH 值范围为 6.0~8.0。

2.3 D1 菌在不同温度条件下生长情况的比较(见表 1)

表 1 不同温度条件下 D1 菌的生长情况	
温度(℃)	OD _{375 nm} 值
15	0.254
20	0.631
25	0.867
30	0.895
35	0.673
40	0.262

从表 1 可以看出,温度对 D1 菌的生长有很大的影响,其生长浓度随着温度的升高而增加,且在 25~30 ℃范围内达到最高生长浓度,但随着温度的继续上升,其生长浓度反而下降,并在 40 ℃时降到最低值。D1 菌的最适生长温度为 25~30 ℃。

2.4 不同接种量对 D1 菌生长的情况比较(见图 3)

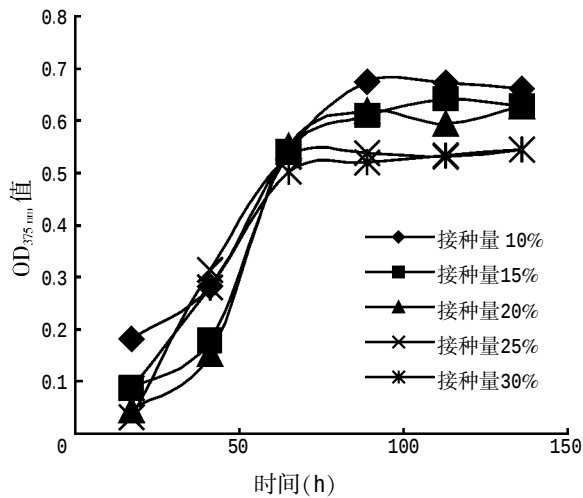


图 3 不同接种量下 D1 菌生长的曲线

从图 3 可以看出,接种量为 10%的菌体增殖浓度最高,接种量为 25%、30%的菌体增殖浓度最低;从生长周期来看,接种量为 15%、20%、25%、30%的菌体在培养 3 d 后就已经进入稳定期了,接种量为 10%的菌体在培养 3 d 后进入稳定期,其增殖最多。

2.5 不同酵母膏浓度对 D1 菌生长情况的比较(见图 4)

由图 4 可知,酵母膏对菌体生长有明显的促进作用,且无论是沼泽红假单胞菌生长速率还是其生长浓度都随着酵母膏浓度的增加,其生长浓度也随着升高。酵母膏浓度为 0.2%和 0.25%时生长较好。

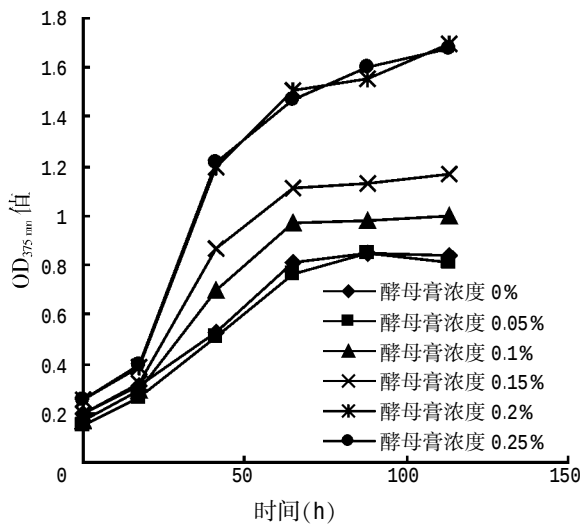


图 4 不同酵母膏浓度对 D1 菌生长的影响

2.6 不同光照强度下对 D1 菌生长情况的比较(见图 5)

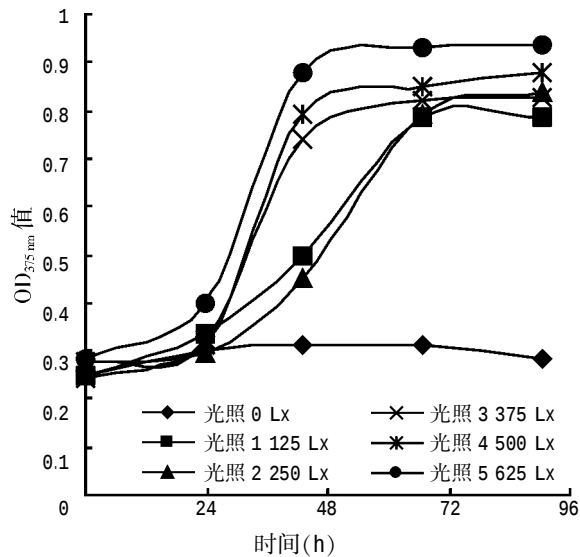


图 5 不同光照强度下 D1 菌的生长曲线

由图 5 可知,D1 菌在光照强度为 3 375、4 500、5 625 Lx 下生长速率较快,并在培养 2 d 后达到生长稳定期,且最终生长浓度都比较高,在光照强度为 5 625 Lx 时,其最终生长浓度达到最大值;在光照强度为 1 125、2 250 Lx 下生长速率比较慢,且要在培养 3 d 后才达到生长稳定期,因此,图 5 的结果说明,3 375~5 625 Lx 范围内的光照强度对沼泽红假单胞菌的生长较为有利。

2.7 最佳培养条件的优化(见表 2、表 3)

由试验结果分析各因子不同水平,其中因子 C (浓度)作用最大,最优组合为 A₃B₁C₃,即光照强度为 5 625 Lx、pH 值为 6、酵母膏浓度为 0.25%。

发酵构树叶中乳酸菌的分离、鉴定

杨 雪 陶兴无 柳志杰

摘 要 试验是从不同时期的发酵构树叶中分离乳酸菌,并筛选出 4 株生长良好的菌株,菌株编号分别为 A1、A2、A3、A4。从菌落特征、形态特征及生理生化特性对其进行鉴定,判定结果分属于乳酸杆菌和球菌,为乳酸饲料添加剂的制备提供前提条件。

关键词 乳酸菌;发酵构树叶;分离鉴定

中图分类号 Q939.11⁺7

乳酸菌是健康畜禽肠道中的有益菌群,其主要作用是抑制病原微生物的生长,产生有利于宿主代谢的酶和维生素,改善宿主的免疫反应、提高抗体水平、增强巨噬细胞的活性等。由于乳酸菌对畜禽的多种有益作用而受到各国科学家的重视。其在饲料中的应用是

近年来发展起来的一个新兴科学领域。在美国、加拿大、德国、英国等发达国家,都在广泛研究和各种细菌制剂。在我国,市售的接种剂多为均一发酵型乳酸菌,细菌接种剂采用人工加入乳酸菌菌种的方法,有利于乳酸菌尽快达到足够的数量,加快发酵过程,迅速产生大量的乳酸。因此,筛选并培养最适合需要的乳酸菌菌株作为菌类添加剂是十分必要的。陶兴无等已通过试验证实,青贮构树叶经过合理发酵后,其品质和饲喂效果有明显改善。

本试验从品质优良的发酵构树叶中分离提纯乳酸菌,并进行了鉴定。为构树叶青贮饲料菌类添加剂

杨雪,武汉工业学院生物与制药工程系,430023,武汉市汉口常青花园中环西路特 1 号。

陶兴无、柳志杰,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-08-20

表 2 正交试验设计

水平	因素		
	光照强度(Lx)A	pH 值 B	酵母膏浓度(%)C
1	3 375	6	0.15
2	4 500	7	0.2
3	5 625	8	0.25

表 3 正交试验分析结果

水平	因素			吸光度
	光照强度 A	pH 值 B	酵母膏浓度 C	
1	1	1	1	0.803
2	1	2	2	0.954
3	1	3	3	1.047
4	2	1	3	1.198
5	2	2	1	0.843
6	2	3	2	0.938
7	3	1	2	1.088
8	3	2	3	1.227
9	3	3	1	0.870
T ₁	2.804	3.089	2.516	
T ₂	2.979	3.024	2.980	
T ₃	3.185	2.855	3.472	
X ₁	0.935	1.030	0.839	
X ₂	0.993	1.008	0.993	
X ₃	1.062	0.952	1.157	
R(极差)	0.127	0.078	0.318	

3 结论与展望

通过单因素试验对沼泽红假单胞菌培养的研究,得出其较佳培养条件为 pH 值为 6、培养温度为 25~30 ℃、接种量为 10%、酵母膏浓度为 0.25%、光照强度

为 5 625 Lx。

光合细菌在畜禽和水产养殖方面,可提供单细胞蛋白及多种生理活性物质,并有改善水质、预防鱼病的作用,对产量和成活率均有显著的提高;在对高浓度有机废水的净化处理中,表现出负荷低、效率高及投资少等优点,其发展前景广阔,通过对其生物学特性及培养特性的进一步研究,光合细菌将会进一步得到推广和应用。

参考文献

- 1 吴向华,杨启银,刘五星,等.光合细菌的研究进展及其应用[J].中国农业科技导报,2004,6(2):35~38
- 2 李东虎,宋金山.生物饵料培养技术[M].北京:中国农业出版社,1999. 2~3
- 3 孙颖民,石玉,郝彦周.水产生物饵料培养实用手册[M].北京:中国农业出版社,2000. 8~6
- 4 王桂文,周兴,刘晖,等.光合细菌的应用现状与前景[J].广西科学院学报,1995,11(2):16~20
- 5 张道南,孙其煊,陈乃松,等.红螺菌科光合细菌的分离、培养及其作为鱼虾类饵料添加剂的初步研究[J].水产学报,1988,12(4):367~369
- 6 徐向阳,孙琦.光合细菌在有机废水处理中的应用现状与前景[J].环境污染与防治,1990,12(5):32~37
- 7 刘如林,刁虎欣.光合细菌及其应用[M].北京:中国农业科技出版社,1991. 169~180
- 8 陈声明,贾小明,叶旭红.光合细菌的生态意义及应用价值[J].环境污染与防治,1994,4(2):29~30
- 9 李阜棣,喻子牛.农业微生物实验技术[M].北京:中国农业出版社,1996. 38

(编辑:王 芳,xfang2005@163.com)

的制备提供前提条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 发酵构树叶样品

将新采集的构树叶剔除烂叶和败叶,用清水洗净后控水、晾干,再切成约 2 cm 的细条,装入泡菜坛中,分层压实后盖上外盖,盐封,在室温条件下青贮发酵。

1.1.2 培养基

① MRS 培养基(g/l):蛋白胨 10.00 g、肉膏 10.00 g、酵母提取物 5.00 g、 K_2HPO_4 2.00 g、柠檬酸二铵 2.00 g、乙酸钠 5.00 g、葡萄糖 20.00 g、吐温-80 1 ml、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58 g、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25 g, pH 值 6.2~6.4。

② 硝酸盐还原培养基(g/l):蛋白胨 10.00 g、NaCl 5.00 g、 KNO_3 (分析纯)1.50 g, pH 值 7.4。

③ 蛋白胨水培养基:1%胰蛋白胨水溶液, pH 值 7.2~7.6。

④ 明胶基础培养基(g/l):蛋白胨 1.00 g、酵母提取物 1.00 g、葡萄糖 0.10 g、盐溶液 4.0 ml(无水 $CaCl_2$ 0.20 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.48 g、 K_2HPO_4 1.00 g、 KH_2PO_4 1.00 g、 $NaHCO_3$ 10.00 g、NaCl 2.00 g、蒸馏水 1 000 ml)、蒸馏水 100 ml, pH 值 7.0。

⑤ H_2S 产生实验培养基(g/l):胰胨 Tryptone(Oxoid)10.00 g、肉浸膏 3.00 g、酵母提取物(Oxoid)5.00 g、NaCl 5.00 g、半胱氨酸 0.40 g、葡萄糖 2.00 g, pH 值 7.2~7.4。

⑥ PY 基础培养基(g/l):蛋白胨 0.50 g、胰酶解酪朊 0.50 g、酵母提取物 1.00 g、盐溶液 4.00 ml(成分和明胶基础培养基中盐溶液一样)、蒸馏水 100 ml。

⑦ PYG 培养基:在 PY 基础培养液内加入 1.00 葡萄糖即成为 PYG 培养基。

1.1.3 仪器设备

双目生物显微镜, Leica(德国生产);pHS-3C 精密酸度计(杭州东星仪器设备厂生产);电热恒温培养箱(上海福玛实验设备有限公司生产);手体式压力蒸汽灭菌器(上海医用核子仪器厂生产);超净工作台(苏州净化设备有限公司生产);扫描电子显微镜(SEM, Hitachi S-3000N)。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的分离与纯化

在无菌条件下称取发酵构树叶 5 g,置于装有 10 ml 灭菌生理盐水的大试管中浸泡 2 h,然后用生理盐水适当稀释,选 3 个稀释度,每个稀释度取 100 μ l 涂布 MRS 平板,在 32 $^{\circ}C$ 下培养 24~48 h。挑取可产生溶钙圈并能使培养基中溴甲酚紫变红或变黄的典型菌落

进行划线分离纯化,获得纯种单菌落。

1.2.2 分离菌种的 SEM 观察

将分离的纯菌种接种在 MRS 液体培养基中,30 $^{\circ}C$ 培养 48 h。摇匀培养物,无菌条件下吸取 100 μ l 培养液均匀涂布在盖玻片上,自然风干。离子溅射仪(Eiko IB-5)镀金膜后,SEM 观察拍照,加速电压 15 kV。

1.2.3 石蕊牛奶试验

称取 10 g 脱脂奶粉溶于 100 ml 水中,向其中加入 4 ml 浓度为 25 g/l 的石蕊试液。分装试管,牛奶高度为 4~5 cm。113 $^{\circ}C$ 高压蒸汽灭菌 15~20 min。冷却至适温后,接入 PY 基础培养基上的乳酸菌株,在 32 $^{\circ}C$ 培养 3 d 后观察试验结果。

1.2.4 其它生理生化鉴定

将分离得到的纯菌落进行以下生理生化鉴定:

① 接触酶反应:按乳酸菌分类鉴定及试验方法(凌代文,1999)进行,使用 PYG 琼脂培养基。

② H_2S 产生试验:按乳酸菌分类鉴定及试验方法(凌代文,1999)进行,使用 H_2S 产生试验培养基。

③ 明胶液化试验:按乳酸菌分类鉴定及试验方法(凌代文,1999)进行,使用明胶基础培养基。

④ 吲哚试验:按微生物学试验(赵斌,2002)介绍的方法进行,使用蛋白胨水培养基。

⑤ pH 值 4.5 生长试验:将菌株接种到 pH 值为 4.5 的 MRS 液体培养基中,测定 $OD_{600\text{ nm}}$ 值后置 32 $^{\circ}C$ 下培养,每 6 h 取样测定其 $OD_{600\text{ nm}}$ 值,比较培养前后的菌数,判断其生长情况。

1.2.5 碳水化合物发酵产酸试验

按陶兴无(2006)介绍的方法进行,使用 PY 基础培养基。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离纯化结果

从发酵构树叶中不断地分离、纯化,获得菌落光滑,溶钙圈明显,能使溴甲酚紫变红(变黄)的典型菌落 4 种。分别编号为 A1、A2、A3、A4。保存,并做进一步鉴定。

2.2 分离菌种的 SEM 观察结果

上述 4 种菌革兰氏染色均为阳性,SEM 观察见图 1。

2.3 石蕊牛奶试验的结果(见表 1)

表 1 石蕊牛奶试验结果

现象	A1	A2	A3	A4
变红	+	+	+	+
凝固	-	+	-	+
胨化	-	-	-	-

注:“+”表示可见,“-”表示不见。下表同。

牛奶中主要含有乳糖和酪蛋白,加入石蕊是作为

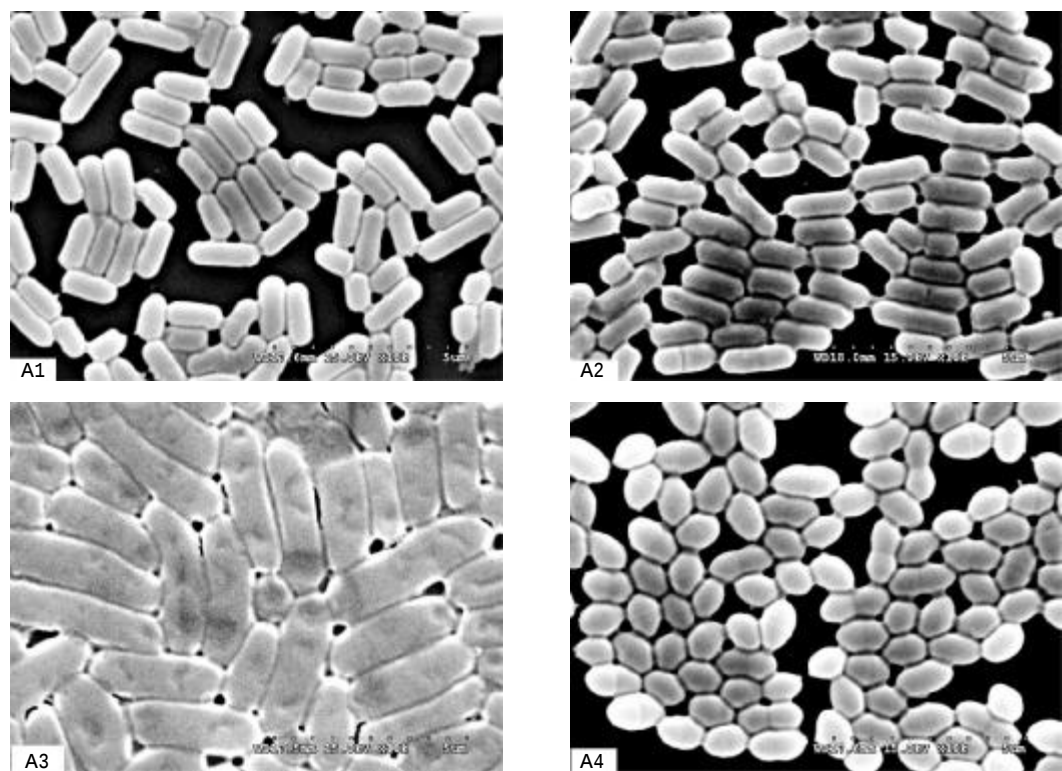


图1 从发酵构树叶中分离的乳酸菌 SEM 图

酸碱指示剂和氧化还原指示剂。乳酸细菌发酵乳糖产酸,石蕊变红,当酸度很高时,可使牛奶凝固。本试验未见胨化结果,这与杨洁彬(1996)、凌代文(1999)报道的结果相符。

2.4 接触酶反应和 H₂S 产生等试验结果

接触酶能将过氧化氢分解成水和氧,这项测定对于乳酸菌的鉴定是一个重要特性,绝大多数乳酸细菌的接触酶反应是阴性的,H₂S 产生试验、明胶液化试验、吲哚试验及 pH 值 4.5 生长试验是乳酸菌属鉴定的重要试验。4 株菌株的接触酶反应、H₂S 产生等试验结果见表 2。

表 2 生化试验结果

试验项目	A1	A2	A3	A4
接触酶反应	-	-	+	+
明胶液化	-	-	-	-
产 H ₂ S 反应	-	-	-	-
pH 值 4.5 生长试验	+	+	+	+
吲哚反应	-	-	-	-

2.5 碳水化合物的发酵产酸试验

进一步试验鉴定 4 株菌株对不同碳水化合物的利用情况,结果见表 3。

根据以上鉴定结果,对照《伯杰氏鉴定细菌学手册》可以判断:A1、A2 为植物乳杆菌(*L.plantarum*),A3 为棒

状杆菌棒状亚种 (*L.coryniformis* subsp.*coryniformis*),A4 为乳酸乳球菌乳酸亚种(*L.lactis* subsp.*lactis*)。

表 3 碳水化合物发酵产酸试验结果

项目	A1	A2	A3	A4
苦杏仁苷	+	+	-	-
阿拉伯糖	-	-	-	-
纤维二糖	+	+	-	+
果糖	+	+	+	-
半乳糖	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+
葡萄糖盐	+	+	+	+
乳糖	+	+	-	+
麦芽糖	+	+	+	+
甘露醇	+	+	+	-
甘露糖	+	+	+	-
松三糖	-	-	-	-
核糖	-	-	-	+
蔗糖	+	+	+	-
木糖	+	+	-	-

3 小结

本试验从发酵构树叶中分离出了 4 株生长良好的菌株,经镜检、革兰氏染色、生理生化特性检测,鉴定 4 株菌株分别为乳杆菌和乳球菌。产酸性能良好,可用来制作构树叶饲料细菌添加剂,为制备品质优良的环保型绿色饲料提供参考。

(编辑:王 芳,xfang2005@163.com)

胎次对长大二元杂交母猪繁殖性能的影响

张冬梅 王昕陟 边连全

1 材料与方法

1.1 饲养管理

母猪均饲养在双列式猪舍内,妊娠期群养,产房内设有限位栏,防止母猪踩压仔猪,并设有保温箱,采用红外线灯取暖。

人工辅助自然交配,母猪每个发情期配种 2 次,间隔 12 h。母猪饲喂全价粉料,其营养成分均达到或超过 NRC (1998)妊娠母猪及泌乳母猪营养需要量。妊娠期限饲,日喂 2 次,每次喂量约 1~1.5 kg,产前 1 周转入产房单栏饲养。哺乳期自由采食,每日添料 3 次,每次约 1.5~2 kg。仔猪出生后立即断脐,在 12 h 内剪獠牙、打耳号、称初生重。仔猪 3 日龄补铁 150 mg(右旋糖酐铁制剂);20 日龄猪瘟免疫;30 日龄仔猪副伤寒、口蹄疫免疫;60 日龄猪瘟、猪丹毒、猪肺疫免疫。仔猪 35 d 断奶后进入保育舍群养,同时母猪转入妊娠舍。

1.2 数据统计

利用沈阳农业大学科研猪场 2002~2005 年共 595 窝次的长大二元杂交母猪产仔记录,从中统计出每窝次的总产仔数、产活仔数、初生窝重、断奶窝重和断奶存活率 5 个指标。

1.3 试验设计

试验采用单因子设计,以胎次为处理因子,分为 8 个水平,各处理重复数见表 1。使用 SAS 软件 GLM 过程进行统计分析。

表 1 试验各处理重复数

胎次	1	2	3	4	5	6	7	8
窝数	148	127	108	62	49	30	41	30

1.4 统计分析

用 SAS 9.13for windows 中的 Univariate 过程中的数据进行正态性检验。发现所有数据都符合正态分布($W=0.966\ 716$ 、 $0.936\ 044$ 、 $0.805\ 24$ 、 $0.667\ 81$ 和 $0.969\ 834$),

且方差齐性较佳($P>0.05$)。因此上述数据应用参数性检验。

用 SAS9.13for windows 中的 GLM 的线性过程以窝次为重复进行差异显著性检验。应用的数据模型为:

$$x=\mu+t+e$$

式中: x ——观察值;

μ ——群体平均值;

t ——胎次效应;

e ——随机误差。

若观察值在处理间差异显著,则用 Duncan's 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 胎次对母猪总产仔数的影响

不同胎次的平均窝总产仔数情况见表 2。从表 2 可见,总产仔数最多的是第 4 胎,为 10.92 头,其后依次是第 6、3、7、5、2 胎,最少的是第 1 胎和第 8 胎,分别是 9.12 和 9.30 头,从同胎次不同窝间的总产仔数变异度来看,标准误最大的是第 8 胎,达 0.51 头,其后依次是第 6、7、4、5、3、2 胎,最小的是第 1 胎,为 0.18 头,这些反映了不同胎次总产仔数的情况。

表 2 不同胎次母猪的总产仔数情况

胎次	窝数	平均窝总产仔数(头)
1	148	9.12±0.18 ^a
2	127	10.31±0.20 ^b
3	108	10.83±0.22 ^b
4	62	10.92±0.32 ^b
5	49	10.37±0.31 ^b
6	30	10.90±0.43 ^b
7	41	10.76±0.33 ^b
8	30	9.30±0.51 ^a

注:肩标标有不同字母者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

对不同胎次的总产仔数进行方差分析,结果表明:不同胎次平均窝总产仔数存在极显著差异($P<0.000\ 1$),从多重比较结果来看,第 1 胎和第 8 胎与第 2、3、4、5、6、7 胎在总产仔数上差异显著,其它差异均不显著,说明胎次对窝总产仔数有较大影响。

2.2 胎次对母猪产活仔数的影响(见表 3)

从产活仔数来看,最多的是第 4 胎,为 9.92 头,其后依次是第 3、6、2、7、5、8 胎,最小的是第 1 胎,为 8.46 头。从同胎次不同窝间的变异度来看,标准误最大的是第 8 胎,为 0.44 头,其后依次是第 6、5、4、7、3、2 胎,

张冬梅,沈阳农业大学,110161,辽宁省沈阳市东陵区东陵路 120 号 68# 信箱。

王昕陟、边连全,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-09-10

最小的是第1胎,为0.18头。这些反映了不同胎次产活仔数的情况。

表3 母猪不同胎次的窝产活仔数情况

胎次	窝数	平均窝产活仔数(头)
1	148	8.46±0.18 ^c
2	127	9.62±0.20 ^a
3	108	9.85±0.24 ^a
4	62	9.92±0.30 ^a
5	49	9.47±0.31 ^{ab}
6	30	9.77±0.33 ^a
7	41	9.61±0.27 ^a
8	30	8.63±0.44 ^{bc}

对不同胎次母猪平均窝产活仔数进行方差分析,分析结果表明,不同胎次母猪产仔数存在极显著差异($P<0.0001$),说明胎次对产仔数的影响较大。从多重比较结果来看:第5胎与第1胎,第8胎与第2、3、4、6、7胎间产活仔数差异显著,其它胎次差异均不显著。

2.3 胎次对母猪所产仔猪初生窝重的影响(见表4)

表4 母猪不同胎次产仔猪的初生窝重情况

胎次	窝数	平均初生窝重(kg)
1	148	12.98±0.52
2	127	15.52±0.33 ^a
3	108	15.56±0.39 ^a
4	62	15.73±0.55 ^a
5	49	15.68±0.58 ^a
6	30	15.41±0.53 ^a
7	41	15.26±0.40 ^a
8	30	13.35±0.58 ^b

从初生窝重来看,最大的是第4胎,为15.73 kg,其后依次是5、3、2、6、7、8胎,最小平均初生窝重是第1胎,为12.98 kg。从同胎次不同窝间的初生窝重变异度来看,标准差最大的是第5、8胎,均为0.58 kg,其后依次是4、6、1、7、3胎,最小的是第2胎,为0.33 kg,这些反映了不同胎次仔猪出生重的分布情况。

对母猪不同胎次的仔猪平均初生窝重进行方差分析,分析结果表明,不同胎次间仔猪的初生窝重存在极显著差异($P<0.0001$)。可见,胎次不同,初生窝重的差异较大,说明胎次对初生窝重有较大的影响。从多重比较的结果来看,第1、8胎与第2、3、4、5、6、7胎间在仔猪初生窝重上差异显著,其它胎次差异不显著。

2.4 胎次对母猪所产仔猪断奶窝重的影响(见表5)

从表5可见,仔猪断奶窝重最大的是第5胎,为69.53 kg,其后依次是4、6、2、3、7、8胎,最小的是第1胎为47.27 kg。从同胎次不同窝间的断奶重变异度来看,标准误最大的是第4胎,为4.17 kg,其后依次是第8、6、7、3、5、2胎,最小的为第1胎,是1.96 kg。这反映

了不同胎次断奶窝重的分布情况。

表5 母猪不同胎次的仔猪断奶窝重情况

胎次	窝数	平均断奶窝重(kg)
1	148	47.27±1.96 ^c
2	127	65.33±2.45 ^a
3	108	61.67±3.35 ^{ab}
4	62	68.63±4.17 ^a
5	49	69.53±2.95 ^a
6	30	66.69±4.07 ^a
7	41	61.14±3.42 ^{ab}
8	30	58.83±4.10 ^{bc}

对不同胎次的母猪平均断奶窝重进行方差分析,结果表明,不同胎次间的断奶窝重存在极显著差异($P<0.0001$),说明胎次对断奶窝重的影响较大。从多重比较结果来看,第1胎与第2、3、4、5、6、7胎间差异显著,其它胎次间差异均不显著。

2.5 胎次对母猪所产仔猪断奶存活率的影响(见表6)

表6 母猪不同胎次的仔猪断奶存活率情况

胎次	窝数	平均窝断奶存活率(%)
1	148	78.88±2.48 ^b
2	127	85.60±2.41 ^{ab}
3	108	78.48±3.32 ^b
4	62	83.32±3.56 ^{ab}
5	49	93.95±2.27 ^a
6	30	87.61±3.80 ^{ab}
7	41	85.70±3.53 ^{ab}
8	30	84.94±4.82 ^{ab}

从表6可见,断奶存活率最大的是第5胎,为93.95%,其后依次是第6、7、2、8、4、1胎,最小的是第3胎,为78.48%。从同胎次不同窝间的断奶存活率变异度来看,标准误最大的是第8胎,为4.82%,其后依次是第6、4、7、3、1、2胎,最小的是第5胎,为2.27%,这些反映了不同胎次间断奶存活率的分布情况。

对不同胎次母猪的断奶存活率进行方差分析,结果表明:胎次对断奶仔猪存活率的影响差异显著($P=0.0298$)。从多重比较的结果来看,第1、3胎与第5胎在断奶仔猪存活率上差异达显著水平,其它胎次差异均不显著。

3 讨论

3.1 胎次对产仔数的影响

由表2可知,胎次对平均窝总产仔数的影响差异极显著。第1胎最少,仅为9.12头,以后依次上升至第4胎达高峰,第5胎略下降,到第6胎回升至第二高峰,第7胎开始下降。

由表3可知,胎次对母猪产活仔数的影响差异极显著。第1胎最低,从第2胎上升至第4胎最高,第5胎略下降,第6胎回升,第7、8胎下降,但第8胎优于

第1胎。

母猪的产仔数属于低遗传力的性状,受环境因素的影响较大,其中机体内环境中的排卵数是一个重要的影响因素。一般来讲,初产猪与经产猪的排卵子数不相同,2~6胎期间的排卵数有逐渐增加的趋势。张牧认为排卵数与胎次呈高度的正相关,他的试验结果显示,繁殖母猪第1胎排卵数最少,以后随胎次增加而上升,至第8胎最高。据研究,排卵数的增加也会影响胚胎死亡率的增加,这可能与子宫容积和每个胚胎血液供应减少有关。子宫容积在妊娠早期不是一个显著影响因素,可是在妊娠晚期子宫拥挤对胚胎存活率可能是一个影响因素,这可能就是导致第7、8胎排卵数虽多,但产仔数却减少的原因。

3.2 胎次对仔猪初生窝重的影响

由表4可知,胎次对初生窝重的影响差异极显著。第1胎最低,为12.98 kg,从第2胎开始随胎次增加逐渐上升,至第4胎最高(15.73 kg),两者相差2.75 kg,第5胎之后下降。

仔猪的胚胎重和初生重相关,且经产猪的相关性高于初产猪,从生理角度来讲,这与子宫内环境和各种生殖激素的分泌有关。子宫粘膜的内层是一个高度的腺体结构,其厚度和血管的分布是随激素水平的变化而变化。由黄体产生的孕激素,在妊娠期间维持子宫粘膜及其内容物的增长,子宫在妊娠期虽继续增长,但不及内容物增长的快,到妊娠后期胎儿的重量居于绝对优势。初产猪尚未达到完全的体成熟,孕激素分泌未达到成年时的正常水平,可能是子宫内容物的增重较小,导致初产猪所产仔的初生窝重较小。除内分泌外,胎儿和胎盘对子宫的接触作用亦使子宫生长,与胎儿的数目和总重量有关。这与本文研究结果(第4胎产仔数与初生窝重均最高)相一致。另外,对于初产母猪来讲,子宫复旧也是一个影响因素。因为子宫每经历一次妊娠-分娩的循环都会受到不同程度的损害,不可能恢复到原有状态,所以子宫复旧的时间也随年龄和胎次的增加呈现出逐渐延迟的趋势,子宫复旧程度也就最低,这可能是7、8胎过后仔猪初生重下降的又一原因。

3.3 胎次对仔猪断奶重的影响

由表5可知,胎次对断奶窝重的影响为极显著。第1胎最低,以后逐渐上升,到第5胎达高峰,6~8胎又下降。

影响仔猪断奶窝重的重要原因是哺乳母猪的泌乳量。母猪的泌乳量越大,窝重也就越大。一般情况,初产母猪的泌乳量低于经产母猪。初产母猪乳腺发育不全,并缺乏哺育仔猪的经验,对于仔猪的刺激经常处于兴奋或紧张的状态,从而影响泌乳量。有资料显示,母猪从第2胎开始泌乳量上升,并保持一定水平,至6~7胎下降。这与本文的研究结果相符。另外,哺乳母猪哺育一窝仔猪头数与泌乳量也有密切关系,一般带仔头数越多的母猪泌乳量越高,则断奶窝重越大,这可能与仔猪固定乳头,拱乳头的刺激有关。

3.4 胎次对仔猪断奶存活率的影响

由表6可知,胎次对断奶存活率的影响显著。第3胎断奶存活率最低,仅为78.48%,第5胎最高,为93.95%,第6胎之后又开始下降,且下降较为缓慢。

吴华东等研究结果表明,长大母猪第1胎和第8胎之后的弱畸仔数增加,仔猪哺乳期的死亡率也以第1胎和第8胎之后较高。这说明仔猪的断奶存活率可能与母猪所产弱仔、畸形仔数有关,第1胎母猪未达到体成熟,子宫容积比较小,阴道比较窄,分娩时收缩力度不够,对原本发育就不是很好的胎儿给予某些机械性的损伤,产出弱仔。8胎之后,可能由于多次生产,患有子宫炎症或某些生殖疾病,产出畸形仔。弱仔、畸形仔由于体弱抢不到乳头,加之身体状况差,抵抗力不强,往往在哺乳期容易死亡,使得第1胎和第8胎之后哺乳期仔猪死亡率升高,断奶存活率下降。

4 结论

综上所述,胎次对母猪的总产仔数、产活仔数、初生窝重、断奶窝重和断奶存活率5个指标的影响均达到显著水平,说明胎次对母猪繁殖性能的影响较大。本试验的长大母猪最佳繁殖成绩在4~6胎,8胎之后生产成绩不如初产,应及时淘汰。对于青年母猪,适时配种以免影响其利用年限,还可采取短期优饲等措施来促进母猪正常发情和提高排卵数。对于处在4~6胎繁殖高峰期的母猪加强饲养管理,如采用“低妊娠,高哺乳”的饲喂方式,妊娠期减少应激以防化胎、流产,哺乳期提高母猪的泌乳量来保证仔猪断奶存活率等措施让其繁殖优势发挥到最大,对于产次过多母猪,及时做好淘汰工作。

(参考文献12篇,刊略,需者可函索)

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

不同铜水平对肉杂鸡 817# 生产性能的影响

王彩玲 牛子青 梅 红 韩新茹

摘 要 选择 1 日龄肉杂鸡 817# 960 只,随机分为 4 个处理组,每组 3 个重复,每个重复 80 只。过渡期(1~6 日龄)饲喂肉鸡前期配合饲料,试验分前期(7~21 日龄)和后期(22~42 日龄),分别饲喂肉仔鸡全价粉料。试验 1、2、3、4 组分别添加铜 10、60、120、180 mg/kg,铜源采用碱式氯化铜。试验于 1、21 和 42 日龄分别称重并记录各阶段各组的采食量,统计各阶段增重并计算料重比。结果显示,试验前期 3 组,也就是碱铜 120 mg/kg 采食量最大,增重最多,料重比最低,但各组之间差异不显著。全程来看,3 组日增重最高,料重比最低;采食量以 2 组也就是碱铜添加 60 mg/kg 最高,但各组之间差异不显著;经济效益以 3 组经济效益最好。

关键词 肉鸡;铜;日增重;料重比

中图分类号 S816.32

1 材料与方法

1.1 试验设计

1.1.1 试验动物及分组

选取 1 日龄肉杂鸡 817# 960 只,按公母各半、体重相近的原则,随机分为 4 个处理组,每个处理组 3 个重复,每个重复 80 只。试验分组情况见表 1。

表 1 分组设计

组别	铜添加水平 (mg/kg)	铜来源
试验 1 组	10	碱式氯化铜
试验 2 组	60	碱式氯化铜
试验 3 组	120	碱式氯化铜
试验 4 组	180	碱式氯化铜

1.1.2 试验日粮

按玉米—豆粕型设计日粮,过渡期(1~6 日龄)饲喂肉鸡前期配合饲料 510#,正式试验分前期(7~21 日龄)、后期(22~42 日龄),分别饲喂肉仔鸡全价粉料。试验处理组在相同的阶段或时期均采用同一日粮,仅铜的添加水平不一致。基础日粮及营养水平见表 2。

1.2 铜源

碱式氯化铜(饲料级), $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl} \geq 98\%$, $\text{Cu} \geq 58\%$,由长沙兴嘉生物工程有限公司提供。

1.3 试验地点与时间

王彩玲,郑州牧业工程高等专科学校,450002,河南郑州。

牛子青、梅红、韩新茹,河南宏展农牧集团。

收稿日期:2007-08-27

表 2 基础日粮配方及营养水平

项目	7~21 日龄	22~42 日龄
原料(%)		
玉米	61.80	61.50
豆粕(46%)	30.00	26.60
棉粕(42%)	3.00	3.50
磷酸氢钙	1.60	1.60
石粉	1.22	1.20
豆油	1.10	4.30
1%预混料	10.00	1.00
食盐	0.28	0.30
合计	100.00	100.00
营养水平		
粗蛋白(%)	20.20	19.0
代谢能(MJ/kg)	12.13	12.96
钙(%)	0.85	0.85
总磷(%)	0.65	0.62
赖氨酸(%)	1.10	1.00

注:1.粗蛋白质、钙、总磷为实测值,其它指标为根据《中国饲料数据库-中国饲料成分及营养价值》(2006 年修订版)的计算值。

2.预混料为每千克全价饲料提供 Fe 80 mg/kg、Zn 80 mg/kg、Mn 60 mg/kg、I 0.15 mg/kg、Se 0.35 mg/kg、VA 15 000 IU、VD₃ 4 000 IU、VE 60 mg、VK₃ 4 mg、VB₁ 3 mg、VB₂ 8 mg、VB₆ 6 mg、VB₁₂ 0.03 mg、VC 80 mg、烟酸 60 mg、D-泛酸 12 mg、叶酸 1.5 mg、生物素 0.15 mg。

试验地点:河南宏展农牧集团实验厂;试验时间:2007 年 6 月 9 日~2007 年 7 月 21 日。

1.4 饲养管理与防疫用药

饲养管理:1~3 日龄鸡舍用煤火炉、红外线灯泡进行保暖育雏,葡萄糖、多维凉开水饮水。7 日龄新支二联(H120)滴鼻、点眼,12 日龄法氏囊饮水免疫。4~6 日龄环丙沙星饮水防肠道病。9~10 日龄防球虫。15~20 日龄、28~30 日龄防呼吸道、肠道病。10 日龄内,锯

末做垫料进行室内地面平养;12 日龄后转入半开放式圈舍饲养。常规饲养管理方式,自由采食、自由饮水。

1.5 鸡群的日常观察

每日观察鸡只采食、饮水、粪便、精神状态及时采取相应措施。

1.6 测定指标及方法

1.6.1 体重测定

于试验第 1、21 和 42 d 分别称量每个重复组鸡总重量,计算平均体重和平均日增重。

1.6.2 采食量记录

从试验开始记录每个重复在各阶段或每天的采食量。

1.6.3 日常记录

每天观察并记录鸡群的精神状态、腹泻情况、发病数、死亡数和淘汰数,并记录死亡或淘汰鸡体重。

1.7 统计分析

试验数据以“平均值±标准差”形式表示,采用 spss12.0 统计软件中的 one-way 过程对试验数据进行统计分析,采用 Duncan's 法进行多重比较。

2 试验结果

2.1 日增重(见表 3)

表 3 试验各组日增重情况(g/只)

组别	1 日龄体重	21 日龄体重	1~21 日龄平均日增重	42 日龄体重	1~42 日龄平均日增重
1 组	38.02±0.07	419.56±3.05	18.18±0.15	1 278.45±74.57	29.71±1.66
2 组	37.94±0.12	421.72±4.51	18.29±0.22	1 314.59±50.20	30.48±1.14
3 组	38.09±0.18	430.86±26.4	18.74±1.26	1 315.02±55.19	30.57±1.42
4 组	38.23±0.31	403.22±8.02	17.37±0.37	1 258.77±49.64	29.21±1.12

注:同行肩标字母不同者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

试验各组鸡各阶段的日增重差异不显著($P>0.05$)平均日增重以 3 组最高(1~21 日龄和 1~42 日龄),碱铜的添加量为 120 mg/kg,4 组(碱铜 180 mg/kg)鸡日增重均有不同程度下降,但差异不显著。

2.2 采食量(见表 4)

表 4 各组采食量分析(g)

组别	1~21 日龄平均采食量	1~42 日龄平均采食量
1 组	33.18±0.39	67.53±3.06
2 组	33.74±0.81	69.43±1.66
3 组	34.04±1.78	69.24±3.76
4 组	32.24±0.38	66.5±0.34

试验鸡各阶段采食量差异不显著($P>0.05$),采食量 1~21 日龄以 3 组最高,而全期则以 2 组(碱铜 60 mg/kg)最高,但各组差异不显著。

2.3 料重比(见表 5)

表 5 各组料重比分析

组别	1~21 日龄料重比	1~42 日龄料重比
1 组	1.825	2.273
2 组	1.845	2.278
3 组	1.817	2.265
4 组	1.856	2.277

试验各阶段料重比差异不显著($P>0.05$)。料重比以 3 组(碱式氯化铜 120 mg/kg)为最好,但差异不显著($P>0.05$)。

2.4 经济效益分析(见表 6)

由表 6 可知,添加碱铜 120 mg/kg 可获得较高的效益,每只鸡可多获得 0.14 元;而添加碱铜 180 mg/kg,则每只鸡少获得 0.11 元。

表 6 各组经济效益比较

组别	42 日龄体重(g)	饲料成本(元/t)	采食量(g)	药费(元/只)	毛利(元/只)	比较(元/只)
1 组	1 278.45	1 971.35	2 836.50	0.5	3.19	0.0
2 组	1 314.59	1 975.66	2 916.20	0.5	3.32	+0.13
3 组	1 315.02	1 979.76	2 908.20	0.5	3.33	+0.14
4 组	1 258.77	1 984.06	2 793.10	0.5	3.08	-0.11

注:碱式氯化铜以 42 元/kg;817# 鸡苗价格 1.2 元/只,毛鸡价格以 8.2 元/kg 计算,其它原料以当时市场价格计算。

3 结果与讨论

3.1 不同铜水平对日增重的影响

从本试验结果看,不同铜水平对日增重的影响差

异不显著($P>0.05$)。但从日增重的数值上看,817# 肉鸡在碱式氯化铜添加水平为 120 mg/kg(3 组)时日增重最高,而碱式氯化铜添加水平为 180 mg/kg(4 组)时日

增重最低。随着铜添加量的增加鸡的日增重有上升的趋势,但铜的添加量过高,则影响日增重。本试验结果与申爱华等研究结果不尽相同,其认为随着日粮铜水平的上升,日增重有下降的趋势,与本试验结果不一致,当日粮铜水平在 170 mg/kg 时,已开始严重影响肉鸡的日增重,这与本结果类似。Fisher 等(1973)总结了 46 个试验的结果,认为添加 225 mg/kg 铜对肉鸡生长性能的影响结果不稳定,但是添加 225~250 mg/kg 铜具有明显的促进生长作用的结果与本试验不一致。本试验与 Leach 等(1990)研究表明,高于 250 mg/kg 的铜添加水平导致肉鸡生长抑制。部分试验研究(Matron 等,2001)结果显示,日粮高剂量铜导致肉鸡生长的抑制相类似。

3.2 不同铜水平对采食量的影响

从本试验结果可以看出,不同铜水平对采食量的影响差异不显著($P>0.05$)。但从采食量的数值上看,试验前期(1~21 日龄)817# 肉鸡在碱式氯化铜的铜添加水平为 120 mg/kg 时采食量最高,全期来看,肉杂鸡 817# 在碱铜添加为 60 mg/kg 时采食量最高。随着铜添加量的增加,肉杂鸡 817# 的采食量有先上升后下降的趋势。本试验结果与申爱华等研究结果不尽相同,申爱华认为随着日粮铜水平的上升,采食量有下降的趋势,而当日粮铜水平在 170 mg/kg 时,已开始严重影响肉鸡的采食量的结果则与本试验结果类似。

3.3 不同铜水平对料重比的影响

从本试验结果看,不同铜水平对料重比的影响差异不显著($P>0.05$)。但从料重比的数值上看,本试验表明,肉杂鸡 817# 在碱铜添加为 120 mg/kg 时料重比最低,但更高剂量的铜对料重比没有有效帮助。

3.4 不同铜水平经济效益分析

本试验表明,肉杂鸡 817# 在碱式氯化铜铜添加水平为 120 mg/kg 时经济效益最好,随着铜添加量的增加鸡的经济效益有上升的趋势,但更高剂量的铜(碱式氯化铜)不具有成本优势。

4 结论

在本试验条件下,添加 120 mg/kg 铜水平的碱式氯化铜能获得较好的生产性能和经济效益,这一添加水平远远大于 NRC(1994)和我国对肉鸡铜的推荐量(8 mg/kg)。在本试验中,更高剂量铜(180 mg/kg 铜水平的碱式氯化铜)对肉鸡无促生长作用,反而有一定的负作用。试验结果表明,在肉鸡日粮中不能添加太高剂

量的铜。

参考文献

- 1 Barber R S, Braude R, Mitchell K G, et al. High copper mineral mixture for fattening pigs[J]. In Chemistry and Industry, 1955, 21: 601~603
- 2 Braude, R. Copper as a stimulant in pig feeding (Cuprum pro pecunia) [J]. World Rev. Anim. Prod., 1967, 3(11): 69~82
- 3 Smith M S. Responses of chicks to dietary supplements of copper sulphate[J]. Bri. Poult. Sci., 1969, 10: 97~108
- 4 Fisher C, Laurson-jones A P, Hill D J, et al. The effect of copper sulphate on the performance and the structure of the gizzard in broilers [J]. Bri. Poult. Sci., 1973, 14: 55~68
- 5 Marron L, Bedford M R, MacCracken K J. The effects of adding xylanase, vitamin C and copper sulphate to wheat-based diets on broiler performance[J]. Bri. Poult. Sci., 2001, 42: 493~500
- 6 Cromwell, G. L., M. D. Lindemann, H. J. Monegue, et al. Tribasic copper chloride and copper sulfate as copper sources for weanling pigs[J]. J. Anim. Sci., 1998, 76: 118~123
- 7 Luo, X. G., F. Ji, Y. X. Lin, F. A. Steward, et al. Effects of dietary supplementation with copper sulfate or tribasic copper chloride on broiler performance, relative copper bioavailability, and oxidation stability of vitamin E in feed[J]. Poult. Sci., 2005, 84: 888~893
- 8 黄得纯, 吕敏芝, 杨承忠, 等. 高铜在肉鸡日粮中的应用[J]. 饲料研究, 2003, (12): 37~38
- 9 滑静, 王晓霞, 何欣, 等. 两种铜盐与添加水平对蛋鸡血液某些生理生化指标的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2003(5): 26~27
- 10 申爱华, 朱泽远, 包承玉. 肉鸡后期日粮中添加不同水平铜的饲养效应[J]. 江苏农业科学, 2000(1): 70~71
- 11 宋志刚, 刘惠芳. 铜对单胃动物的促生长作用及其代谢研究进展[J]. 中国饲料, 2001(20): 12~13
- 12 郭宝林, 贾志海, 张玉枝. 畜禽铜营养研究进展[J]. 饲料工业, 2005(10): 48~52
- 13 伍喜林, 刘文佑, 周纪湘, 等. 高剂量铜在不同日粮营养条件下对肉鸡生长性能的影响[J]. 西南农业学报, 2003(3): 94~97
- 14 刘玉兰, 李德发, 冀利敏, 等. 日粮铜水平对肉仔鸡生产性能和免疫器官发育的影响[J]. 饲料工业, 2003(8): 16~18
- 15 高林青, 张春善. 肉仔鸡铜需要量研究进展[J]. 饲料工业, 2005(15): 23~25
- 16 伍喜林, 李珂, 程玉彬, 等. 日粮不同微量元素模式对断奶仔猪生长性能影响的研究[J]. 饲料工业, 2002, 23(11): 35~38

(编辑: 高 雁, snowyan78@tom.com)

抗性淀粉对动物肠道代谢的影响

王 瑶 邬应龙 岳双明

淀粉是膳食中主要的碳水化合物,按不同的分类标准可分为不同的类别。Englyst 等依据淀粉的生物可利用性将淀粉分为 3 类:快速消化淀粉(ready digestible starch, RDS)、缓慢消化淀粉(slowly digestible starch, SDS)和抗性淀粉(resistant starch, RS)。其中 RS 与前两种不同,它不能被小肠中的淀粉酶水解,本身或其降解产物能原封不动地到达结肠并被此处的微生物菌群发酵,从而发挥有益的生理作用,此现象引起了营养学家、生理学家和医学工作者的广泛兴趣。1993 年,欧洲抗性淀粉协会(EURESTA)将 RS 定义为:不被健康人体小肠吸收的淀粉及其降解产物的总和。由于 RS 能预防 II 型糖尿病、结(直)肠癌和一些饮食相关的慢性病,且可有效克服传统膳食纤维(DF)食品呈现的不良气味、结构粗糙、口感干、缺乏吸引力等弊端,所以它是国际上新兴的食品研究领域,也是最近十几年来碳水化合物与健康关系研究中最重要的一项成果。

1 RS 的主要生理功能

大量研究表明,RS 具有类似于 DF 的作用,主要表现为以下几个方面:可以调控餐后血糖、防止糖尿病,降低血清胆固醇和甘油三酯、改善脂质结构、预防脂肪肝。RS 在结肠中发酵,其代谢产物能较好地维持肠道酸性环境,加快食物在肠道内的转运速度,促进动物排便、增大粪便体积,使粪便水分含量增加、软化粪便。杨月欣等通过研究发现,饲喂 RS 饮食的大鼠比对照组大鼠盲肠体积增大,盲肠总质量、盲肠壁质量与体质量比以及盲肠内容物质量均呈增加趋势,并且,饲喂 RS 的大鼠的粪便以及盲肠内容物中氨和酚的浓度都比对照组低,起到稀释肠道内致癌有毒代谢产物的作用。另外,RS 还能改善肠道微生物菌群,降低特定细菌酶(如 β -葡萄糖苷酸酶)的活性,促进有益微生物生长,从而合成更多的微生物蛋白,减少

胺类致癌物的产生。此外,RS 可以增加大肠中短链脂肪酸(SCFA)含量、降低粪便 pH 值、促进许多有益矿物元素的吸收。这些功效有助于降低结(直)肠癌、动脉粥样硬化症、糖尿病、肥胖症等的发病率,能更有效地预防慢性疾病。然而,RS 自身直接产生的作用较少,这些功效主要通过结肠内发酵产生的次生产物,以及影响其它物质的代谢作用从而得到发挥。与 DF 相比,RS 在大肠中的生理效应具有更明显的优点(见表 1)。

表 1 RS 与 DF 在大肠中生理效应的比较

营养特性	RS	水溶性膳食纤维	水不溶性膳食纤维
水溶性	-	+	-
发酵度	+++	+++	-
短链脂肪酸产生量	+++	+++	-
丁酸产生量	+++	++	-
降低回肠 pH 值	+++	+++	-
增加粪便含水量	++	++	+
增加粪便重量(干重)	++	+	+++
缩短排空时间	++	-	+++

注:“+”表示程度,“-”表示没有相关特性。

2 RS 在大肠的发酵作用

人类或动物进食后,许多营养素,如脂肪、蛋白质、单糖等在小肠酶的作用下消化并被吸收。而一些食物组分和内生分泌物在经过回盲瓣时不会被吸收,而是产生发酵作用。

RS 在大肠中被结肠微生物(厌氧菌)发酵或部分发酵后,产生挥发性 SCFA、二氧化碳、甲烷和乙烷。厌氧菌包括拟杆菌、双歧杆菌、真细菌、链球菌和乳酸菌,有时可发现肠细菌。SCFA 主要为乙酸、丙酸、丁酸等(含量大小顺序为乙酸>丙酸>丁酸),这些营养成分在生物代谢中发挥了重要作用。

2.1 短链脂肪酸的代谢作用

SCFA 是大肠细菌代谢的主要终产物,为碳链 1~6 的有机脂肪酸,主要由食物中没有被消化的碳水化合物在结肠腔内经厌氧菌酵解生成。和中、长链脂肪酸不同,SCFA 直到近些年才受到很大的关注,并且,RS 所产生的多种生理功能主要是通过 SCFA 来调节的。

SCFA 能促进结肠细胞和小肠细胞的代谢、生长、分化,维护肠道上皮细胞的完整性和杯状细胞的分

王瑶,四川农业大学食品科学系,625014,四川雅安。

邬应龙,单位及通讯地址同第一作者。

岳双明,四川农业大学动物营养所。

收稿日期:2007-09-18

泌。由于 SCFA 在肝脏代谢可致酮体(乙酰乙酸、 β -羟丁酸)及氨基酸(谷氨酰胺、谷氨酸)生成增加,而酮体及谷氨酰胺是小肠的主要供能底物,对肠道粘膜有较强的促生长作用,能为肠粘膜上皮细胞及肌肉、肾、心、脑提供能量;它还能减少促炎因子的生成,有利于粘膜炎症的修复,抑制某些肿瘤细胞增殖,并诱导肿瘤细胞分化和凋亡;能调节结肠的基因表达、细胞周期和脱噬作用;刺激结肠血流、增加肠道供血,降低病原体过度增殖,增强流体和电解质的吸收;此外,还能刺激胃肠激素生成,对结肠上皮组织产生营养效应,并降低大肠末端结肠癌或过敏性肠综合症的发病率。同时,SCFA 的存在也抑制了微绒毛边缘层的胆固醇和胆汁酸的扩散,阻止它们被吸收。它能降低腔内 pH 值和细菌 7- α -脱羟基酶的活性,因此减少胆汁酸转化为结肠肿瘤的促进因子——次级胆酸。

2.1.1 乙酸的代谢

乙酸是肠道的主要 SCFA,被上皮细胞吸收后,进入门静脉,经肝至外周组织,最后在肌肉中代谢。对动物的研究表明,当门静脉血中乙酸降至一定水平(如饥饿时),肝脏会分泌游离乙酸,许多组织可吸收并利用,并且成为机体从没有被小肠消化的糖中获取能量的主要方式。膳食中补充乙酸可以降低餐后血糖和胰岛素应答,这种作用可能由上消化道机制(如阻碍胃排空或抑制消化酶活性等)所介导。乙酸是膳食纤维发酵的主要代谢物,同时也是胆固醇合成的最主要的底物,Hara 等通过动物试验表明,乙酸能抑制大鼠肝和肠中的胆固醇合成并分解其脂肪;对人类来说,它能减少游离脂肪酸的有效性(高浓度的游离脂肪酸对人类健康有害)。瘤胃动物中,乙酸是代谢必需的能量来源,因为所有进入瘤胃的葡萄糖都被瘤胃微生物发酵。乙酸只有几分钟的半衰期,能迅速从血中清除,也可被骨骼肌、心肌和脑代谢。

2.1.2 丙酸的代谢

SCFA 混合物可以刺激盲肠膳食纤维的发酵,从而影响血液胆固醇水平,尤其是丙酸,经结肠吸收以后被肝脏代谢用作能源,并可以抑制肝脏胆固醇的合成。有文献报道,日粮中添加丙酸钠会使猪血清中胆固醇以及肝脏中 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA)的活性显著降低。体外试验还表明,丙酸是脂肪酸和胆固醇合成有效的抑制剂,它能提高高密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯、降低血糖和胰岛素水平,肝中的丙酸还可以调节碳水化合物和脂肪的代谢。对于反刍动物类来说,丙酸是合成葡萄糖的主要

前体,而对于人类,丙酸是在后肠发酵的,目前尚未证明丙酸对人体的碳水化合物代谢有何显著影响。研究者对瘤胃动物的丙酸代谢进行了较深入的研究发现,丙酸是主要的葡萄糖前体,长期给予丙酸盐可降低其空腹血糖浓度,这可能与抑制肝脏释放葡萄糖有关。Chen HH 和 Lai MH 观察到血清和肝脏胆固醇的减少,与丙酸的增加有关。然而,丙酸并不能起全部作用,因为在无菌大鼠(如缺乏产生丙酸所必须的微生物群体)中发现,RS 也能减少血胆固醇含量。最新研究还发现,丙酸能抑制高糖浓度诱导的胰岛素分泌作用,它能减少[U-14C]葡萄糖脱羧,促使葡萄糖转变成乳酸。另外,门静脉血液中也发现丙酸的存在,它可能具有类似于丁酸的某些功能,但不如丁酸那样重要。

2.1.3 丁酸的代谢

许多研究证明,丁酸在 RS 所产生的大多数效应中起到重要作用,它是大肠上皮细胞尤其是末段结肠粘膜的主要能量底物、结肠菌的最好能源,在主要的 3 种 SCFA 中,以丁酸对结肠细胞的营养作用最强。Roediger 发现,在体外培养的结肠上皮细胞,70 % 的耗氧量用于丁酸代谢,即使在葡萄糖存在的情况下,丁酸仍是主要的能量来源。丁酸还能抑制癌变的结肠粘膜细胞增殖、诱导化学预防酶和谷胱甘肽转化酶的合成、抑制诱变物(如亚硝胺、氢-过氧化物等)的潜在毒性,并且能安全、有效地长期治疗溃疡性结肠炎。多项体外试验结果表明丁酸诱导的细胞凋亡与 Bcl-2 蛋白表达呈负相关,同时正相调节 bax 基因表达,还可通过显著抑制肿瘤细胞内 c-myc 和 h-ras 基因表达而发挥其抑瘤作用。丁酸对细胞核酸代谢有非常重要的调节作用。有研究表明丁酸可以诱导肿瘤细胞分化产生与正常细胞相似的表型,改变某些致癌基因或其产物的表达、诱导细胞周期停滞甚至引起编程性细胞死亡,这表明丁酸能防止发生在结(直)肠癌早期的异常细胞的增殖,维持消化道壁的整体性,从而发挥抗癌作用。最近有研究显示,丁酸能抑制细胞核中组蛋白降解酶,促使组蛋白发生超甲基化,打开 DNA 结构,有利 DNA 修复酶发挥作用。还有报道丁酸能通过降低转录因子 β -(NF- κ B)的活性来直接抑制炎症,而 β -(NF- κ B)是许多炎症和免疫反应的中心操纵子。因此,RS 就可以通过增加丁酸产量来调节结肠功能。新近研究表明,丁酸能抑制上皮细胞的诱导性血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)和细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的表达,尤其是以 VCAM-1 介导的白细胞粘附明

显减少,从而起到抗炎作用,并且能减弱肿瘤坏死因子 α (TNF α),从而成为类风湿性关节炎病人的治疗性药物。目前,SCFA 已经开始应用于肠道炎症性疾病的治疗,一般采用口服和灌肠两种给药方式。应用 SCFA 溶液进行灌肠,对于远端结肠的炎症已经观察到满意的效果,SCFA 灌肠剂一般含有 80 mM 乙酸、30 mM 丙酸以及 40 mM 丁酸,并且似乎丁酸的含量越多效果越好。

2.2 对结肠细菌代谢的影响

结肠内存在一个非常复杂的微生态系统,含有 400 多种不同的细菌种类,肠内菌群微生态的平衡稳定对人体健康有着非常重要的作用。RS 能够改变结肠微生物群落,促进肠道有益微生物(如双歧杆菌、乳酸杆菌)繁殖,降低肠道 pH 值、减少腐败物和致癌物的产生、生成 B 族维生素、促进肠道蠕动、提高人体免疫力等。有研究发现,摄食 RS 能使结肠中的双歧杆菌和乳酸杆菌增加 10~100 倍,而梭杆菌、拟杆菌数量则下降。Brown 等通过试验研究了结肠内碳水化合物发酵对细菌的影响发现,饲喂高直链玉米淀粉(HAM)组(RS 含量较高)和普通淀粉组的小猪,在停止给予双歧杆菌制剂后,前者粪便中双歧杆菌数量下降的速率比后者慢,说明 RS 在结肠发酵产生的环境有利于双歧杆菌生长。Wang 等(1999)研究也发现,RS 在体外可以作为双歧杆菌的基质,当这些细菌通过上消化道时,它能提供保护作用。Gerhard 等通过动物试验也证实,RS 能促进肠道有益菌丛的生长、繁殖,是一种双歧杆菌增殖因子,试验结果中大肠杆菌和类杆菌的数量试验组低于对照组,而乳酸杆菌的数量却明显高于对照组。

除增加有益菌之外,减少有害菌的数量也很重要,RS 对微生物群落的选择性使有害物质氮和有害酶(葡萄糖苷酶等)下降。Mallett 等的研究发现,高 RS 饲料可影响大鼠盲肠内微生物代谢酶活性,与低 RS 组相比, β -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酸酶、硝酸盐还原酶、硝基还原酶活性均下降。研究表明,这种酶活性的改变可以影响肠内细菌的代谢产物,尤其是那些需经过肠肝循环表达其毒性的产物。尽管从微生物在体外酶的活性来评价体内微生物的情况还有困难,但大多数研究认为细菌代谢酶活性的增加与对宿主的毒性有关。细菌对 β -葡萄糖苷和 β -葡萄糖苷酸的水解与肠道内次级胆汁酸的生成有关,次级胆汁酸对肠壁细胞有毒性,最终导致细胞增殖增强,促使细胞癌变。有研究表明,酶活性的改变可能是由于碳水化合物发酵产生的酸性环境的影响,或因含不同代谢酶的细菌数量发

生了改变。

2.3 RS 对肠道其它代谢的影响

除此之外,还有许多关于 RS 对肠道其它影响的研究。在饮食中添加抗性淀粉颗粒(RS2)除了增加小部分铁的排泄外,不会影响小肠对营养素和总醇的吸收,并且,RS 还能增强肠道对许多矿物质的吸收、增加其生物有效性。Lopez 等报道了饲喂富含 RS 的饮食可以增强小鼠对钙、镁、锌、铁和铜的吸收,而 Kishida 的研究则无此效应。饲喂大鼠 RS2 其盲肠和粪便的发酵作用显著增强,pH 值进一步降低。另外,把中等含量的 RS 与双歧杆菌混合饲养大鼠对结肠远端产生的急性期凋亡反应(AARGC)要比 RS 单独作用显著,而且 AARGC 随 RS 增加而增强。Muir 发现麸皮和 RS 混合作用要比单独食入麸皮对肠道的益处大。最近研究还发现,给猪饲喂热处理的 HAM 比未处理过的对结肠远侧区域产生更显著的作用。另外,由于蛋白质类物质在结肠内腐败生成氨、胺、酚、吲哚等有害物质,已有许多试验证实,增加膳食中不消化性碳水化合物的摄入量,能够增加粪便中总氮量并减少氨氮的含量,而且这一变化与膳食蛋白质的摄入量无关。Richard 的研究指出,单独饲喂抗消化马铃薯蛋白质(PP)会增加小肠赘生物包括腺癌的产生,而添加 RS 后,肠内赘生物和结(直)肠腺癌就会减少了,因此,RS 不仅能防止肠内致肿瘤性,还降低了饲喂 PP 后导致的肿瘤增强作用。因此,不消化的碳水化合物为肠内细菌提供了合适的底物和丰富的能量来源,细菌利用碳水化合物酵解产生的能量迅速增殖,并将氨氮用于菌体蛋白质合成,从而增加了粪便中的菌体蛋白氮的含量,减少肠道内氨的吸收。此外,RS 还能调节免疫功能,特别是影响大量炎症细胞因子的产生和许多 T 和 B-淋巴细胞和巨噬细胞受体的表达。

3 小结

RS 是一种新型的膳食纤维资源,其各方面的特性几乎都优于非淀粉多糖类的膳食纤维,除了在促进肠道健康方面有着重要的生理功能外,与其它生理代谢也有着密切的联系。但是由于国内对其研究尚处于初级阶段,因此需要我们进一步认识,进行更细致、更系统的研究。由于结肠疾病尤其是结肠癌更多见于末端结肠,因此 RS 对末端结肠 pH 值的影响显得更具有重要意义。关于 RS 预防和治疗肠道疾患、维持肠道健康作用的机制,以及 RS 与蛋白质、脂肪和其它碳水化合物之间的交互作用尚需进一步研究。

(参考文献 34 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

金属硫蛋白及其诱导、分离纯化研究进展

闫海亮 张 晶 丁洪浩 周 虚 沈景林 赵 云

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一种广泛存在于生物界的低分子量、高金属含量,且能被金属或其它因素诱导生成的金属结合蛋白的一种天然生物活性物质,具有广泛的生理学和生物学功能,其主要作用是平衡体内微量元素分布和驱除重金属毒物、清除自由基等。目前对 MT 的研究和开发利用涉及农业、医药、保健、生物工程、环境保护等各个领域。

1 金属硫蛋白的理化性质

MT 的相对分子质量较小(通常小于 10 000 Da),金属含量一般为 4~12 个金属离子或分子,半胱氨酸含量高而芳香族氨基酸和组氨酸残基含量极少。Cys-X-Cys(X 为除 Cys 以外的其它氨基酸)序列是所有金属硫蛋白的特征序列。哺乳动物 MT 分子中一般含 61~62 个氨基酸残基,其中半胱氨酸残基较多,约为 20 个,分子量为 6 000~7 000 Da。MT 结构中的金属可脱去,去金属的硫蛋白在低 pH 值时较稳定。使各种金属硫蛋白 50%的金属离子发生解离的 pH 值分别为:Zn-MT 为 3.5~4.5;Cd-MT 为 2.5~3.5;Cu-MT 小于 1。因此,MT 的存在形式及稳定性与它所结合金属的种类、是否结合了金属及环境的 pH 值密切相关。同样,MT 的光吸收特征除了与氨基酸组成有关外,也与其所结合的金属种类密切相关。因为蛋白分子中不含芳香族氨基酸,所以它没有 280 nm 处的吸收峰,不过在 190 nm 处有一明显的肽键吸收峰。

研究发现,MT 有 4 种异构体:MT-I 和 MT-II 异构体存在于大多数哺乳动物的器官中,具有重要的生物学功能;MT-III 和 MT-IV 异构体分别存在于大脑和扁平上皮中。MT mRNA 和蛋白在体内不同器官中和体外的细胞培养都具有高度的可诱导性,可被多种因素诱导合成,如重金属、激素(糖皮质激素、胰高血糖素和肾上腺素等)、应激和其它因素(cAMP、干扰素和白细胞介素-1 等)。

闫海亮,吉林大学畜牧兽医学院,130062,吉林长春。

张晶(通讯作者)、丁洪浩、周虚、沈景林、赵云,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-10-22

★ 中国博士后科学基金(编号 20060390909)

2 金属硫蛋白的功能

2.1 参与微量元素代谢和解毒作用

MT 和金属离子在体内有很强的螯合力,这种作用在体内起着缓冲系统的功能。Schmidt 等研究表明,MT 在锌的代谢过程中有重要作用,它直接参与锌的储存、运输及其生物利用。消除 MT 基因的小鼠对锌的吸收能力降低,表明 MT 基因消除后破坏了体内锌的平衡。MT 能调节小肠对 Cu 和 Zn 等金属的吸收,小肠中 MT 的水平与 Zn 和 Cu 的吸收量呈明显的反比关系。而小肠细胞与其它细胞之间 Zn 的交换是比较快的,MT 对 Zn 和 Cu 代谢起着细胞间和细胞内的控制作用,可能是因为 Zn-MT 和 Cu-MT 对许多辅酶有激活作用。Zn 在转移过程中会受到各种因素的影响,包括各种酶类、氧化还原状态、能量供应等。不过有人证实,有些细胞虽然完全不能合成 MT,但仍可以生存,还能以正常的速度分裂和发育,原因是正常细胞分裂中有许多 Zn 和 Cu 的酶参与,说明 MT 与这些金属酶的激活没有必然的联系。

MT 对重金属解毒作用的研究较多,特别是对镉的解毒作用。经研究表明,小剂量的 Zn、Cu、Hg 和 Cd 诱导 MT 合成后,可降低高剂量镉中毒导致的死亡率。Park 等通过研究敲除 MT 基因的小鼠发现,MT 对一些金属解毒能力的顺序为 Cd>Zn>Cu>Ag,而对铅和铁几乎无作用。MT 的解毒机理可能为:减少进入细胞内的金属量,螯合进入细胞内的金属形成无活性的 M-MT 复合物和增加金属输出细胞。

2.2 清除自由基,参与应激反应

正常情况下体内自由基除了参与细胞内重要的化学反应过程外,还可损伤生物活性分子,如蛋白质和 DNA 等,从而导致癌症、肝脏损伤、自身免疫性疾病以及衰老等症状。体内除了具有自身抗氧化酶系外,在一定程度上需要外源物质或其刺激机体产生抗氧化剂,进而清除自由基。Zangger 等研究报道,小鼠 Cd₇-MT 与 NO 暴露后导致其 N 端 β-结构域中 3 个金属原子选择性释放,而 α-结构域中的 4 个金属原子则原封不动,而且随后 β-结构域中即形成二硫键。MT 中富含半胱氨酸的巯基,清除羟基自由基能力是 GSH-Px 酶的 100 倍,是 SOD 酶的 1 000 倍。MT 的抗氧化作用除表现为能直接清除 OH·外,还能显著提高

SOD、GSH-Px 的活性。Cu、Zn、Mn、Fe、Se 等微量元素, 又是机体内 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶系的组成成分, MT 参与微量元素的储存、运输及代谢, 能及时提供 SOD 等抗氧化酶系所需的金属微量元素, 从而增强了这些抗氧化酶的活性。

2.3 参与调节机体生长发育

关于 MT 的调节作用, 主要体现在发育过程中的 MT 定位以及 MT 含量的变化上。MT 在细胞核与细胞质之间的转运还受到细胞周期的控制, 在乳腺癌和结肠癌细胞中, 都只能在 S 期而不是 G1 期细胞核中检测到 MT 的存在。MT 分子上并不存在定位信号, 近年来研究表明, MT 向核转移受细胞能量驱动, 但具体的机制仍不明确。

3 金属硫蛋白的诱导

用于诱导 MT 试验的动物很广泛。小鼠因其来源广、价廉常被用来做诱导 MT 试验。此外, 田晓光等利用舍蝇幼虫提取了金属硫蛋白, 发现每克舍蝇幼虫中约含金属硫蛋白 0.8 mg, 此结果显示, 舍蝇可以用于提取金属硫蛋白。郭祥学等用锌诱导蓝藻也成功分离出了类金属硫蛋白。而兔子因具有来源广、价廉、易饲养、MT 产率高等优点而常用于 MT 制备的诱导, 其中尤以青紫兰家兔因其耐受性强而广泛应用。目前, 诱导金属硫蛋白有如下几种方法: 金属诱导、激素与应激诱导、在疾病状态下诱导等。

3.1 金属诱导 MT

许多金属如 Cu、Ag、Au、Zn、Hg、Cd、Co、Ni、Al 等均能诱导 MT 的合成。大量研究表明, 动物注射金属诱导后, 其肝、肾、脾、肠等器官内 MT 的含量增加。Cd、Hg 诱导金属硫蛋白的能力较强, 而 Zn 稍弱。余美祥等给家兔注射 CdCl_2 , 在肝脏中提取 MT 得到了良好的结果。但 Cd 对生物体有害, 而去掉 Cd 的方法复杂, 故此元素的应用受到一定的限制。目前的医药试验是通过直接注射 ZnSO_4 诱导 MT 合成, 所得 MT 完全是 Zn-MT。郝守进等发现外源性的 Zn 诱导兔肝金属硫蛋白含量显著提高。

3.2 激素与应激对 MT 的诱导

肝脏是 MT 表达的主要场所。给兔注射激素, 如糖皮质激素、胰高血糖素、肾上腺素等均能增加兔肝 MT mRNA 水平, 从而使肝脏中 MT 合成增加。此外, 各种生理、病理或心理应激状态, 以及炎症因子、机体的应激状态也能增加兔肝 MT mRNA 的转录, 同时伴有血浆中 Zn^{2+} 浓度的下降。

目前, 已有试验发现, 应激能激活下丘脑-垂体肾

上腺轴, 引起糖皮质激素和儿茶酚胺的增加。这些物质能调节组织中(包含它们的感受器)不同目标基因的表达。而肾上腺轴被激活后, 对提高 MT-I 和 MT-II 基因表达至关重要。同时有些数据分析表明, 面对抑制性心理应激, 组织通过增加 MT-I 和 MT-II 基因的表达, 能有效抵抗应激的有害影响。

3.3 疾病状态下诱导 MT

通过由增殖性因素刺激皮肤, 对正常皮肤增生的表皮组织及增生的病损皮肤区域染色, 发现 MT mRNA 表达增加, 这表明 MT 在表皮角质细胞的增生过程中发挥作用。另有试验发现, 在皮肤伤处于早期急性阶段的细胞中 MT mRNA 表达增加。兔的外科手术中发现, 随着局部使用氧化锌、氯化镉、硝酸银后, 会出现局部 Zn 浓度的积聚和伤口边缘基质细胞 MT 的释放; 使用氧化锌、硝酸银的兔子和对照组相比伤口愈合较快, 这一点也给临床药物开发提供了潜在的治疗价值。肿瘤组织、癌组织和患有心血管系统疾病及中枢神经系统(CNS)疾病的动物组织中 MT 的含量普遍提高, 目前在国外已有试验试图通过疾病提取诱导 MT, 但试验方法有待于进一步优化, 这将为以后人们对硫蛋白的提取提供新的思路。

3.4 转基因诱导表达 MT

有人把结合重金属离子能力很强的小鼠 MT-I 基因(mMT-I cDNA)与蓝藻类金属硫蛋白基因启动子(smtO-P)构成金属调控单元, 导入聚胞藻 PCC6803 中, 进行金属诱导表达和纯化 mMT-I。在做小批量锌诱导表达和纯化了外源蛋白后, 检测了转基因对于提高蓝藻金属离子耐受能力的作用, 这为基因工程制药进行了有益的研究与探索。张晓钰等用另一个 α 结构域取代金属硫蛋白的 β 结构域, 得到金属硫蛋白突变体 $\alpha\alpha$ 后, 再使这个突变体 $\alpha\alpha$ -cDNA 在烟草中表达, 发现 $\alpha\alpha$ -cDNA 在烟草根部的表达强于叶部, 同时, 转基因烟草对 Cd^{2+} 抗性提高。而人们应用此方法对于兔肝中金属硫蛋白的提取尚在探索之中。

4 金属硫蛋白的分离纯化

凝胶过滤层析和离子交换层析技术相结合的是最常用的兔肝金属硫蛋白的分离纯化方法。分离纯化的一般流程为: 粗分、拆分和脱盐。不同种属、不同组织 MT 的分离纯化存在一定的差别, 兔肝中常用两次离子交换层析。张保林等则利用了 MT 高热稳定性这一特点, 预先对萃取液进行热处理, 以除去大部分杂蛋白, 从而经一次凝胶分离, 一次离子交换拆分得到了高纯度的 MT-I 和 MT-II, 不仅简化了试验过程,

饲料级硫酸铜含量测定浅析

马金妙 潘金忠

硫酸铜作为畜禽养殖中必不可少的微量元素饲料添加剂,特别是在促进畜禽生长、改善饲料利用率、提高养殖经济效益等方面具有非常重要的意义。然而生产硫酸铜的原材料紧缺。市场价格不断上涨,其原因是由于生产硫酸铜的主要原料是铜矿粉,在铜资源紧缺的情况下,许多生产厂家为了弥补原料紧缺和降低生产成本,而采用报废电器线路板中焊铜作为原料来进行生产。电器线路板成分复杂,主要含铜、锌、镍、锡等,一般生产工艺是很难加以分离的,这就导致硫酸铜中的多种金属元素的混入。

在饲料级硫酸铜含量的实际测定与生产过程中曾多次碰到这样的问题,即硫酸铜原料参照行业标准 HG2932-1999 进行测定,铜含量明显偏高;而生产预混料后,产品中铜含量则明显偏低。所以本文介绍测定饲料级硫酸铜含量的两种方法即化学法和原子吸收光谱法,并对两方法进行比较。

1 化学法

1.1 方法原理

马金妙,浙江东立绿源科技股份有限公司,313216,浙江省德清县乾元镇三里塘。

潘金忠,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-11-05

也避免了多一次离子交换层析造成的样品损失,提高了回收率。

在对兔肝金属硫蛋白的分离中,微量分离常采用 HPLC 与阴离子交换的 HPLC-AAS 法,大量制备 MT 则增大层析面积即可。另外,也有采用 DEAE-Sephrose Fast Flow 凝胶来分离金属硫蛋白,由于该凝胶具有流速快、容量大,而且溶胀体积不受缓冲液离子强度变化影响等优点,所以每次用完后,不需重新装柱。将二价铜离子螯合在 Chelating Sepharose Fast Flow 凝胶上制成亲和层析柱的方法,锌诱导兔肝和镉诱导小鼠肝经匀浆、乙醇处理后上柱,用 pH 值 4.0 的醋酸盐缓冲液平衡,再用 pH 值 5.2、不同浓度的醋酸盐缓冲液洗脱,可得 MT-I 和 MT-II 两个洗脱峰,此法比传统的凝胶过滤-离子交换法简单、省时、

试样用水溶解,在微酸性条件下,加适量的碘化钾与二价铜反应,析出等当量碘。用硫代硫酸钠标准滴定溶液滴定析出的碘,以淀粉为指示剂,利用消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积,计算试样中硫酸铜含量。

1.2 试剂和材料

碘化钾、冰乙酸、淀粉指示剂 5g/l、0.1 mol/l 硫代硫酸钠标准滴定溶液。

1.3 分析步骤

称取约 1 g 试样(精确至 0.000 2 g),置于 250 ml 碘量瓶中,加入 100 ml 水溶解,加入 4 ml 冰乙酸,加 2 g 碘化钾,摇匀后,于暗处放置 10 min。用 0.1 mol/l 硫代硫酸钠标准溶液滴定,直至溶液呈淡黄色,加 3 ml 淀粉指示液,继续滴定至蓝色消失,即为终点。

1.4 计算

$$X_f = C \times V \times 0.2497 \times 100 / M$$

式中: X_f ——试样的百分含量(%);

C ——硫代硫酸钠标准滴定溶液的实际浓度(mol/l);

V ——滴定时消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积(ml);

M ——试样的质量(g);

0.2497——与 1.00 ml 硫代硫酸钠标准滴定溶液 [$C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=1.000 \text{ mol/l}$] 相当的以克表示的五水硫酸铜的质量。

适于实验室规模分离纯化。

5 结语

经过近半个世纪的研究,人们对 MT 的结构和生物学功能等方面都取得了许多成就,尤其是关于 MT 和一些疾病方面的成果显得更为突出,但是对 MT 研究还存在许多问题,如 MT 的检测方法、MT 在机体的各组织中的浓度变化、MT 的基因结构和调控等,而且关于金属硫蛋白的一些基础研究,包括抗氧化、抗应激和增强机体免疫力等及作用机制还不是很清楚,对 MT 的诱导、分离和纯化,虽然试验都显示良好的结果,但是更加简易和经济试验方法还有待于进一步发现。

(参考文献 15 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

每个试样取两个平行样进行测定,以其算术平均值为结果。

2 原子吸收光谱法

2.1 方法原理

用酸溶解含铜样品,稀释定容制成试样溶液;将试样溶液导入原子吸收分光光度计的空氣-乙炔火焰中,测定铜的吸光度。

2.2 试剂和溶液

2.2.1 试剂

盐酸,优级纯($\rho 1.18\text{g/ml}$);硝酸,优级纯($\rho 1.42\text{g/ml}$);硫酸,优级纯($\rho 1.84\text{g/ml}$)。

2.2.2 铜标准溶液

① 铜标准贮备液

准确称取 1.0000 g 光谱纯铜,加硝酸 5 ml ,在水浴上加热蒸干后加 $1:1$ 盐酸溶液溶解至 1000 ml 的容量瓶中,并用水稀释至刻度,摇匀。此贮备液浓度为 1 mg/ml 。

② 铜标准工作液

精密吸取铜标准贮备液 2.00 ml 于 100 ml 容量瓶中,用 $1+100$ 盐酸溶液稀释定容至刻度,摇匀。此工作液浓度为 $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。然后精密吸取工作溶液 0.00 、 2.00 、 5.00 、 7.00 、 10.00 ml 分别置于 100 ml 容量瓶中,用 $1+100$ 盐酸溶液稀释定容,配制成 0.00 、 0.40 、 1.00 、 1.40 、 $2.00\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的标准系列。

2.3 仪器和设备

实验室常用仪器、原子吸收分光光度计(波长范围 $190\sim 900\text{ nm}$)、磁力搅拌器、漏斗、定性滤纸、烧杯 100 ml 、具塞锥形瓶 250 ml 。

2.4 分析步骤

2.4.1 样品处理

准确称取含铜试样适量(相当于硫酸铜 1 g),于 250 ml 具塞锥形瓶中,加入 100.0 ml 盐酸溶液($1+10$),置于磁力搅拌器上,搅拌 30 min ,过滤,吸取滤液 1.0 ml 置 100 ml 容量瓶中,加 $1+100$ 盐酸溶液稀释定容至刻度。摇匀。吸取 1.0 ml 置 25 ml 容量瓶中,加 $1+100$ 盐酸溶液稀释定容至刻度,摇匀,待测定。同时制备试样空白溶液。

2.4.2 标准曲线的绘制

按原子吸收分光光度计操作规程,打开原子吸收分光光度计,预热。将浓度为铜标准工作液导入原子吸收分光光度计,按仪器工作条件测定标准工作液的吸光度,绘制标准曲线。

2.4.3 试样测定

将 4.1 待测样品液导入原子吸收分光光度计中,同时测定空白溶液的吸光度,并由工作曲线求出测定溶

液中铜的浓度。继而算出硫酸铜的含量。

2.5 计算

$$X_2 = (C - C_0) \times 250000 \times 249.68 \times 100 / M \times 10^6 \times 63.55$$

式中: X_2 ——试样的百分含量(%);

C ——由工作曲线求得的试样测定溶液中铜的浓度($\mu\text{g/ml}$);

C_0 ——由工作曲线求得的试样空白溶液中铜的浓度($\mu\text{g/ml}$);

250000 ——测定液稀释倍数;

249.68 ——硫酸铜分子量;

M ——硫酸铜试样的质量(g);

10^6 ——克转化为微克的倍数;

63.55 ——铜的原子量。

每个试样取两个平行样进行测定,其两个平行样结果的差值应不大于 5% 。

3 化学法和原子吸收光谱法比较

笔者利用二个厂家不同原料生产的硫酸铜进行了化学法测硫酸铜含量的对比试验,验证了采用电器线路板作为铜源生产的硫酸铜,铜含量测定结果明显偏高。因为电器线路板上除了铜以外,锡、镍、锌等也能在微酸性条件下,与适量的碘化钾作用,析出等当量碘,所以导致检测结果的偏高。同时我们结合国家标准(GB/T13885—2003)动物饲料中钙、铜、铁、镁、锰、钾、钠和锌含量的测定(原子吸收光谱法),利用原子吸收光谱法测定硫酸铜与相对应生产的预混料中铜含量,采用电器线路板生产的硫酸铜与预混料的铜含量相比明显偏低,结果见表1。

表1 二个厂家硫酸铜及所生产的预混料中硫酸铜含量结果(%)

项目	测定方法	A 厂家(铜矿粉生产)	B 厂家(废线路板生产)
原料	化学法	98.7	99.2
	原子吸收法	98.6	85.2
预混料	原子吸收法	97.2	78.6

用化学法测定硫酸铜的含量,操作简单,准确率高,但对于金属杂质多的原料,会造成判定失误,继而影响所生产产品的质量。而用原子吸收分光光度法测定硫酸铜的含量,虽然能去除原料中的金属杂质干扰,但此方法操作繁琐,方法误差较大。因此,笔者认为在目前铜资源紧缺,大量使用废旧线路板,而没有较先进生产工艺将锌、镍、锡等金属杂质分离的情况下,使用饲料级硫酸铜的厂家,在测定硫酸铜含量时,在用化学法的同时,再用原子吸收分光光度法进行验证,对确保产品质量的稳定具有非常重要的意义。

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

免疫亲和色谱高效液相色谱法 检测鲟鱼肌肉中常山酮的残留

侯亚莉 郭利敏 丁平 苏亮

摘要 试验建立了由免疫亲和色谱-高效液相色谱方法检测鲟鱼肌肉中常山酮的残留。样品经胰蛋白酶酶解,乙酸乙酯提取,再用 0.125 mol/l 的醋酸铵缓冲液分离,经免疫亲和色谱柱净化,以乙腈-乙酸铵缓冲液-水为流动相(含 0.1% 三乙胺),反相液相色谱-紫外检测法检测,检测波长 243 nm。在 20~200 $\mu\text{g/kg}$ 添加浓度的范围内,样品回收率分别为 75.4%~82.0%,变异系数分别为 0.7%~8.6%。方法检测限为 10 $\mu\text{g/kg}$ 。结果显示:本方法灵敏度高,干扰少,重复性好。

关键词 免疫亲和柱;高效液相色谱;常山酮;鲟鱼;残留

中图分类号 S963.16+2

Determination of halofuginone in sturgeon muscle using immunoaffinity column and HPLC

Hou Yali, Guo Limin, Ding Ping, Su Liang

Abstract A high performance liquid chromatography (HPLC) method had been developed to determine halofuginone in sturgeon muscle. Halofuginone was extracted from trypsin digested tissues as a free base into ethyl acetate and partitioned into ammonium acetate buffer, purified by immunoaffinity chromatography column(IAC). The halofuginones are separated by HPLC and measured by ultraviolet detector at 243 nm with acetonitrile ammonium acetic buffer-water (containing 0.1% triethylamine) as the mobile phase. Recoveries of Halofuginone from samples fortified at 20~200 $\mu\text{g/kg}$ levels ranged 74.6%~81.1%, with coefficients of variation of 0.7%~8.6%. The limit of detection was 10 $\mu\text{g/kg}$. The procedure provides a rapid, reliable and sensitive method for determination of halofuginone in sturgeon muscle.

Key words IAC; HPLC; halofuginone; sturgeon muscle; residue

常山酮是一种广谱抗寄生虫药(McDougald, 1990; Kennedy, 1996),对鸡的柔嫩、毒害、堆型、变位、巨型、布氏艾美耳球虫均有效,对球虫的子孢子第一代和第二代裂殖体均有明显的抑杀作用;对大多数革兰氏阳性菌也有效,且无交叉耐药性。常山酮氢溴酸盐作为一种饲料添加剂广泛用于防治家禽的球虫病。在我国,氢溴酸常山酮被允许以 3 mg/kg 的浓度添加在饲料里,其休药期为 4 d(Sundlof, 1992)。由于常山酮大量被用来预防食用动物的寄生虫,就可能进入食物链给人类带来潜在的危害。许多国家建立了常山酮的残留检测方法并对其残留限量作了规定。中国、美国和欧盟规定常山酮在牛肌肉、皮/脂肪、肝、肾组织中的最高残留限量见表 1。

表 1 常山酮的最高残留限量($\mu\text{g/kg}$)

国家	种类	肌肉	皮/脂肪	肝	肾
中国	牛	10	25	30	30
	鸡	100	200	130	-
	火鸡	100	200	130	-
美国	牛	100	200	160	-
	火鸡	100	200	130	-
欧盟	牛	10	25	30	30

常山酮经家禽消化后,在肠道被大量吸收,广泛代谢,并由粪便和胆汁排泄(USDA, 1991; Yamamoto, 2001)。根据鸡的肠道消化特点,鸡粪中含有大量未被消化的饲料。在我国广西、贵州等地区,常把鸡粪作为鱼饲料,致使鱼大面积中毒事件时有发生。人如果误食因常山酮中毒而死亡的鱼,会出现身体不适等中毒症状。为此,需要有一种既灵敏又精确的方法测定鱼组织中常山酮的残留量,以确保鱼产品的质量。

目前检测禽饲料、蛋、血清、肌肉和肝组织中常山酮残留量的方法主要有高效液相色谱法(HPLC-UV)(USDA, 1991; Yamamoto, 2001)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS-MS)(Parise, 2004)和 ELISA 法(Beier, 1998)

侯亚莉,重庆市饲料兽药监察所,401147,重庆市渝北区黄泥磅黄龙路 78 号。

郭利敏、丁平、苏亮,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-10-29

等。常山酮在组织中的含量往往较低,由于大多数组织基质非常复杂,为了去除干扰,提取常山酮常采用液-液分配和固相提取。然而,这些方法通常包含了复杂的步骤和大量有机溶剂。由于抗原和抗体反应制备的免疫亲和柱具有高选择性和简单的操作,越来越多的人用免疫亲和柱来纯化目标分析物(Lawrence, 2003)。Mortier(2004)等人使用了 IAC 柱纯化和提取了鸡蛋中的常山酮。

本试验将使用 IAC 柱纯化鲟鱼组织中的常山酮的方法。样品洗脱液经 HPLC 测定,试验表明该前处理方法简单、实际、可靠。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

Waters 600E 型高效液相色谱仪,2487 型紫外检测器,美国 Waters 公司。氢溴酸常山酮对照品,含量 99.7%,由法国 Intervet 公司、美国农业部农业研究中心 RossBeier 博士惠赠。IAC 柱由国家兽药安全评价中心(北京)提供。乙腈和甲醇均为色谱纯,其它试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.2 色谱条件

色谱柱为 NovaPak C18(300 mm×3.9 mm,5 μm);流动相为乙腈-乙酸铵(0.125 mol/l)-水(5:3:12,V/V/V),含 0.1%三乙胺;检测波长 243 nm;柱温为室温;流速 1 ml/min;进样体积 50 μl。

1.3 标准贮备液的配制

精密称取 10.0 mg 氢溴酸常山酮对照品于 10 ml 棕色容量瓶中,用 0.125 mol/l 乙酸铵溶解,稀释至刻度,摇匀,其浓度为 1 mg/ml,置 4℃冰箱避光保存。

1.4 标准曲线的绘制

分别准确吸取一定量的标准贮备液,用流动相稀释成 20、50、100、200、500、1 000、2 000 μg/l 的标准工作液,分别进样 50 μl,得峰面积。以氢溴酸常山酮质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,采用外标法对样品进行定量。

1.5 样品处理与 IAC 柱洗脱

称取鲟鱼肌肉组织匀浆样品(2±0.01)g 于 50 ml 聚丙烯离心管中,加 5 ml 胰蛋白酶水溶液(5 mg/ml),用 10%的 Na₂CO₃溶液调 pH 值在 7~8 之间,40℃水浴下酶解 3 h。取出后冷却至室温,加 10% Na₂CO₃溶液 2 ml,混匀,加 10 ml 乙酸乙酯,涡动 40 s,在冰水混合物中静置 3 min,立即以 2 000 r/min 离心 2 min,将上清液转入另一个洁净的离心管中;再向组织酶解液中加入 10 ml 乙酸乙酯,重复提取 1 次,合并乙酸

乙酯相。乙酸乙酯提取液中加 0.125 mol/l 乙酸铵缓冲液 5 ml,涡动 1 min,在冰水混合物静置 3 min,立即以 2 000 r/min 离心 2 min,收集水相;再用 0.125 mol/l 乙酸铵溶液 5 ml 重复提取 1 次,合并水相。水提取液中加 5 ml 正己烷,轻微振摇 20 s,除去多余的乙酸乙酯,弃去正己烷层。

取出冰箱中的 IAC 柱,恢复至室温。用 10ml 的 PBS 溶液平衡。准备好的提取液过 IAC 柱,加 3 ml PBS 洗涤,自然重力下流干,3 ml 甲醇洗脱,在 40℃N₂流下吹干甲醇,加 1 ml 流动相溶解,涡动,过 0.25 μm 微孔滤膜,进行 HPLC 分析。

1.6 回收率测定

称取空白组织匀浆 2.0 g,置于 50 ml 聚丙烯离心管中,加入适量的氢溴酸常山酮标准液,使组织中药物浓度分别为 20、50、100 和 200 μg/kg,混匀后静置 20 min,按照 1.5 节的方法进行处理和测定,根据测得量与添加量计算回收率。

2 结果

2.1 标准曲线

在 20~2 000 μg/l 范围内,色谱峰面积与药物的质量浓度呈线性关系,其线性回归方程为 $y=281.35x-434.57$,相关系数 $R^2=0.9999$,其线性响应范围满足兽药残留检测要求,证实了该方法定量测定的可靠性。

2.2 回收率

氢溴酸常山酮标准溶液、空白鲟鱼肌肉组织提取液和添加样品提取液的色谱图见图 1。添加回收率及变异系数见表 2。用该方法测定鲟鱼肌肉组织中氢溴酸常山酮残留的检测限为 10 μg/kg。

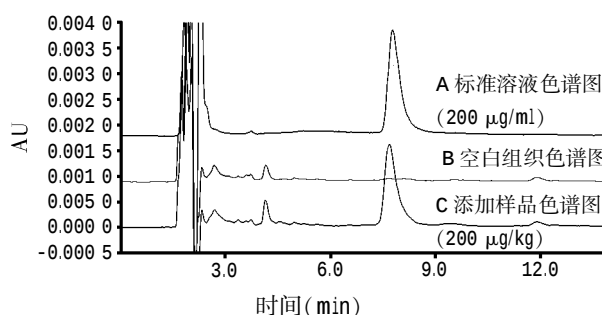


图1 鲟鱼组织中常山酮的高效液相色谱图

表2 鲟鱼肌肉组织中氢溴酸常山酮添加回收率(n=5)

添加浓度(μg/kg)	实测浓度(μg/kg)	回收率(%)	变异系数(%)
20	16.4	82.0	8.6
50	37.7	75.4	7.5
100	75.9	75.9	3.3
200	156.4	78.2	0.7

3 讨论

目前国外采用反相高效液相色谱法检测动物组织中常山酮残留使用较多的流动相是乙腈-乙酸铵(0.125 mol/l)-水(5:3:12,V/V/V),用冰醋酸调 pH 值为 4.3(USDA,1991)。笔者使用该流动相时,常山酮的保留时间长且峰很宽,对称性不佳。改用不调 pH 值,1 000 ml 流动相加 1 ml 三乙胺时,峰形改善,得到保留时间适宜的对称峰,分离效果良好。最终确定流动相为乙腈-乙酸铵(0.125 mol/l)-水(5:3:12,V/V/V),含 0.1% 的三乙胺。

常山酮与组织的结合力较强,通常与组织中的蛋白质等形成螯合物,需要先通过酶解使药物释放出来,常用的酶有葡萄糖醛酶、胰蛋白酶(Anderson,1981;曹莹,2004)。本试验采用胰蛋白酶酶解组织,使常山酮完全游离出来。由于常山酮属于喹唑啉类生物碱化合物,在强碱或高温条件下容易降解(Anderson,1979),同时要考虑胰蛋白酶的最适 pH 值,在酶解时 pH 值需要严格控制在 7~8 之间,温度 40℃,防止常山酮的降解。

常山酮呈弱碱性,在提取的过程中,组织溶液被酶解后,加入 10% 的 Na_2CO_3 溶液 2 ml 使常山酮以分子状态存在。由于常山酮易溶于有机溶剂,因此,常山酮能够完全被乙酸乙酯提取。但常山酮在碱性条件下易降解,为防止发生降解,用乙酸乙酯两次提取的时间不易过长。试验发现两次提取时间间隔在 15 min 之内不会影响分析结果。为了防止乙酸乙酯对分析方法的干扰,文献一般采用旋转蒸发的方法除去乙酸乙酯(Parise,2004;Beier,1998),本试验采用正己烷除去乙酸乙酯,简化了试验操作过程。

根据 IAC 净化技术研究的结果,3 ml 甲醇作为 IAC 柱洗脱液,能将常山酮完全从 IAC 柱上洗脱出来。从色谱图可以看出,用 IAC 进行样品净化,不干扰药物色谱峰,能将常山酮完全分离,说明制备的 IAC 非特异性吸附极小,特异性高。

从回收率试验可知,常山酮在整个提取过程中有一部分损失。而常山酮标准品的 PBS 溶液过 IAC 柱的平均回收率为 99.8%,几乎没有损失,所以影响回收率的因素可能是液-液提取步骤和器皿对常山酮的吸附,而不是 IAC 柱对常山酮造成的损失。Beier 等(1998)用此法所得回收率在 72.5%~79.0% 之间;Yakkundi 等(2003)回收率在 76.0%~78.9% 之间。本试验的回收率与上述回收率差不多,且变异系数在 0.7%~8.6% 之间,小于 10%,表明该方法稳定可靠,满足残留分析的需要。

参考文献

- 曹莹,黄士新,沈富林,等. 高效液相色谱法测定鸡肝组织中的氢溴酸常山酮残留[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38 (4):11~13
- 中华人民共和国农业部公告第 235 号. 动物性食品中兽药最高残留限量[S]. 2002
- Anderson A, Goodall E, Bliss GW. Analysis of the Anticoccidial Drug, Halofuginone, in Chicken Tissue and Chicken Feed Using High Performance Liquid Chromatography [J]. J Chromatogr, 1981, 212: 347~355
- Anderson A, Chritophers DH, Woodhouse RN. Analysis of the Anticoccidial Drug, Halofuginone, in Chicken Feed Using Gas-liquid Chromatography [J]. J Chromatogr, 1979, 168: 471~480
- Beier RC, Dutko TJ, Buckley SA, et al. Detection of Halofuginone Residues in Chicken Liver Tissues by HPLC and a Monoclonal Immunoassay[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 1 049~1 054
- 21CRT 56.308
- EMA/MRL/741/00-final. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines and Information Technology, 2000
- Kennedy M. In: Coccidiosis in chickens, Alberta Agriculture and Rural Development, Edmonton, Alberta, 1996
- Lawrence J F, Menard, C. Determination of clenbuterol in beef liver and muscle tissue using immunoaffinity chromatographic cleanup and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection[J]. J Chromatogr B, 1997, 696: 291~297
- McDougald R. "Control of Coccidiosis: Chemotherapy" in Coccidiosis of Man and Domestic Animals [M]. CRC Press, Boca Ration, 1990. 307~320
- Mortier L, Daeseleire E, Huet A C, et al. Determination of halofuginone in eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after cleanup with immunoaffinity chromatography. Rapid Commun, Mass Spectrom, 2004, 18: 1 817~1 820
- Parise RA, Sparrow BR, Merrill JW, et al. Liquid Chromatography electrospray Tandem Mass Spectrometric Assay Suitable for Quantitation of Halofuginone in Plasma [J]. J Chromatogr B, 2004, 810: 35~40
- Sundlof SF, Rivieie JE & Craigmill AL. Food Animal Residue Avoidance Databank Trade Name File [Z] // A Comprehensive Compendium of Food Animal Drugs, 8th Ed. University of Florida: Gainesville, FL, 1992
- Theodoridis, G., Haasnoot, W., Cazemier, G., Schilt, R., Jaziri, M., Diallo, B., Papadoyannis, I.N., & De Jong, G.J. Immunoaffinity chromatography the sample pretreatment of taxua plant and cell extracts prior to the HPLC analysis of Taxanes[J]. J. Chromatogr. A. 2002, 948: 177~185
- USDA FSIS. Science and Technology, Analytical Chemistry Laboratory Guide Book; Residue Chemistry. Washington, 1991
- Yamamoto Y, Kondo F. Determination of Halofuginone and Ampolium in Chicken Muscle and Egg by Liquid Chromatography [J]. J AOAC Int, 2001, 84: 43
- Yakkundi S, Cannavan A, Elliot C T, et al. Development and validation of a method for the confirmation of halofuginone in chicken liver and eggs using electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 2003, 788: 29~36

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

添加酒糟和玉米粉对花生壳微贮效果的影响

杨加梅 章世元

摘 要 通过测定单独的花生壳原样及花生壳中添加 10% 的酒糟或玉米粉经过微贮后其有机物(粗蛋白、粗纤维、粗脂肪、无氮浸出物)及营养价值的变化情况,研究花生壳的微贮效果。试验结果表明:花生壳经过微贮后营养价值有所提高,原料花生壳中 CP 含量为 9.85%,而微贮后纯花生壳中 CP 含量为 10.99%,添加酒糟和玉米粉微贮后的花生壳中 CP 含量分别为 12.13%、13.25%,微贮后单独的花生壳、添加酒糟和玉米粉的花生壳中 CP 含量和原料花生壳相比分别上升了 11.57%、23.15%、34.52%,添加酒糟和玉米粉的花生壳中 CP 与原样 CP 含量相比差异显著;原料花生壳中 CF 含量为 70.82%,而微贮后纯花生壳中 CF 含量为 69.44%,添加酒糟和玉米粉微贮后的花生壳中 CF 含量分别为 68.56%、67.41%,微贮后纯花生壳、添加酒糟和玉米粉的花生壳中 CF 含量和原料花生壳相比分别下降了 1.95%、3.19%、4.82%,添加酒糟和玉米粉的花生壳 CF 与原样 CF 含量相比差异显著;在花生壳中添加玉米粉效果比添加酒糟效果好。

关键词 花生壳;微生物处理;微贮效果

中图分类号 S816.5⁺3

我国是花生生产大国,中原地区是花生的主要生产区,从以往情况看,加工的主要对象是花生仁,大量的花生壳大多被用作肥料或燃料,甚至弃而不用成为废物,十分浪费和可惜。据科学分析,花生壳中含有相当丰富的纤维素、木质素和磷、钾、钙等物质。如果能进行加工利用,将是一笔巨大的财富^[1]。花生壳可以进行微贮,以扩大动物饲料的来源。表 1 列举出的一些饲料营养成分,可以看出:花生壳中粗蛋白含量偏低,而粗纤维含量偏高,钙磷含量不平衡,这在一定程度上说明对花生壳更有必要进行加工调制。为了充分利用粗饲料资源,降低饲料成本^[2],本试验研究了在花生壳中添加适量酒糟、玉米粉,探讨其对花生壳微贮效果的影响。

表 1 花生壳、粗饲料及肉牛日粮的营养成分(风干基础)^[3](%)

饲料	粗蛋白	粗纤维	钙	磷
花生壳	7.94	61.59	0.50	0.09
麦秸	6.44	36.96	0.38	0.07
日粮	15.49	34.11	0.46	0.29

1 材料与方法

杨加梅,南京农业大学动物科技学院,210095,南京农大动科院颜培实实验室。

章世元,扬州大学动物科学与技术学院。

收稿日期:2007-10-29

1.1 试验方法

1.1.1 原料

花生壳、玉米粉由江苏明珠生物科技有限公司提供;酒糟由安徽滁洲酒业有限公司提供;菌种由江苏明珠生物科技有限公司提供(菌液配置过程:将 1 g 菌粉称好倒入 0.2 t 水中拌匀备用)。

试验时间为持续发酵 1 个月。

1.1.2 试验设计

表 2 试验方案(n=4)(%)

组别	花生壳粉	酒糟	玉米粉	菌液
纯花生壳微贮组	100	0	0	80
添加酒糟的花生壳微贮组	90	10	0	80
添加玉米粉的花生壳微贮组	90	0	10	80

试验过程:将花生壳、玉米粉、酒糟、菌液按上述表 2 数据比例称好,置于洗好烘干的具塞三角瓶中以便进行微生物处理试验;定期进行试验观察,并记录现象便于试验结果的分析。

1.2 进行菌液微贮后的检测指标

经过一个月的微生物处理后,将具塞三角瓶中饲料样品进行烘干,进行营养成分分析,具体测定指标如下:

干物质含量采用 105 ℃烘 3 h 重量测定法;有机物质含量采用差量法测定;粗纤维含量采用强纤维酸碱分次水解法测定;粗脂肪含量采用乙醚浸提测定法;粗蛋白含量采用半微量凯氏定氮法测定;无氮浸出物含量采用差量法测定。

1.3 数据处理

用 Excel 对试验中得到的数据资料进行处理,用

SPSS 软件进行单因子方差分析,并进行多重比较。

2 结果与分析(见表 3)

表 3 饲料常规营养成分(绝干基础)(%)

项目	有机物	粗蛋白	粗纤维	粗脂肪	无氮浸出物
对照组	96.01±0.026 ^a	9.85±0.047 ^c	70.82±0.30 ^{ab}	2.77±0.012 ^a	12.57±0.35 ^a
纯花生壳微贮组	94.4±0.64 ^b	10.99±0.84 ^{bc}	69.44±0.98 ^a	1.77±0.088 ^d	12.22±0.82 ^{ac}
添加酒糟的花生壳微贮组	92.13±0.11 ^c	12.13±1.21 ^{ab}	68.56±1.31 ^{ab}	2.20±0.029 ^c	9.24±1.07 ^{bc}
添加玉米粉的花生壳微贮组	94.39±0.49 ^b	13.25±1.04 ^a	67.41±0.94 ^b	2.33±0.082 ^b	11.39±0.43 ^b

注:1. 对照为原样花生壳;2. 同列数据肩注相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.1 有机物含量的变化

从表 3 中可以看出,花生壳经过微生物处理后,有机物含量均显著下降。经过统计分析微贮后饲料中有机物含量均与原样花生壳粉中有机物含量呈显著差异($P<0.05$);除添加玉米粉的花生壳和纯花生壳进行微贮后差异不显著($P>0.05$)外,其余两两之间均差异显著($P<0.05$)。

2.2 粗蛋白含量的变化

从表 3 中可以看出,经过微生物处理后,粗蛋白含量均上升。经过统计分析添加酒糟和玉米粉进行微贮后与原样花生壳组相比呈显著差异($P<0.05$),另添加玉米粉的花生壳和纯花生壳经过微贮后相比呈显著差异($P<0.05$),其余两两之间粗蛋白含量差异均不显著($P>0.05$)。

2.3 粗纤维含量的变化

从表 3 中可以看出,经过微生物处理后,粗纤维比例有所下降。经过统计分析,纯花生壳经过微贮后与添加玉米粉的花生壳微贮组相比差异显著($P<0.05$);与添加酒糟的花生壳微贮组及不经过微贮的花生壳组相比差异不显著;但纯花生壳组和添加酒糟的花生壳组经过微贮后粗纤维含量分别与原样花生壳相比下降了 1.95% 和 3.19%;添加酒糟及玉米粉两组之间不显著($P>0.05$)。

2.4 粗脂肪含量的变化

从表 3 可以看出,经过微生物处理后,粗脂肪含量与花生壳原料相比均呈下降趋势,经过统计分析后每两组之间均存在显著差异($P<0.05$),而纯花生壳微贮后可利用的粗脂肪含量最多。

2.5 无氮浸出物含量的变化

从表 3 可以看出,经过微生物处理后,无氮浸出物含量均有所下降。经过统计分析得知,不加任何物质的花生壳经过微贮后与添加玉米粉的花生壳相比

呈显著差异($P<0.05$),添加酒糟和玉米粉的花生壳经过微贮后与原料花生壳的无氮浸出物相比均呈显著差异($P<0.05$),其余每两组之间差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 有机物含量的变化

花生壳中添加菌液,通过微生物处理,微生物利用其中的营养成分(如利用粗脂肪等生成挥发性的气体和无机物)迅速繁殖,导致了有机物的下降^[4]。结果表明:在花生壳中添加酒糟比纯花生壳进行微贮后,有机物的含量下降了 2.4%,说明不同的饲料组的微生物利用的程度不同,添加酒糟的花生壳经过发酵后利用的有机物最多。

3.2 粗蛋白含量变化

在本试验条件下,饲料经过微生物处理后,粗蛋白有增加的现象。试验结果表明:纯花生壳经过微贮后粗蛋白比原料花生壳提高了 1.14 个百分点,添加酒糟的花生壳比纯花生壳经过微贮后粗蛋白上升了 1.14 个百分点,造成这种原因是饲料中的无氮浸出物生成二氧化碳和水,使物料的损失增多,干物质质量减小,造成粗蛋白的表观百分含量增大。即使是微贮饲料中存在固氮菌,由于是密封的厌氧微贮,饲料间存在的氮气的量很少,所以对粗蛋白含量的增加没多大贡献。宋金昌等报道以物理、化学的方法对秸秆类粗饲料进行预处理后,接种适宜的微生物可提高粗蛋白含量^[6,7]。

3.3 粗纤维含量的变化

花生壳中具有坚硬的细胞壁结构,其纤维素与木质素紧密结合,通常适口性差,消化率较低,直接饲喂动物时常效果不佳,对花生壳可进行适当处理。将花生壳粉微贮,由于活干菌的厌氧发酵作用,半纤维素、木聚糖链和木质素聚合物的脂键酶解,从而使粗纤维等多糖类物质被降解为单糖并转化为挥发性脂肪酸、二氧化碳等^[8]。试验结果表明:添加玉米粉效果比酒糟

好,添加玉米粉的花生壳经过微贮后比添加酒糟微贮后粗纤维含量下降了 1.68%。院江等利用微生物发酵棉籽壳试验结果也表明,粗纤维含量下降,使饲料营养价值有所提高^[9]。

3.4 粗脂肪含量的变化

粗脂肪的利用,一部分作为能量提供给微生物繁殖,一部分作为能量损失掉,变成二氧化碳、甲烷等,还有一部分转化成了其它有价值的有机物,使动物充分利用,提高饲料消化率和营养价值。结果表明:不添加任何物质的花生壳经过微贮后粗脂肪利用最多,和原样相比相差 1.00 个百分点。在微贮过程中,添加酒糟和玉米粉,可以为微生物提供一定的营养物质,从而减少了粗脂肪的利用。

3.5 无氮浸出物含量的变化

无氮浸出物含量的变化是由于微生物利用可溶性的碳水化合物,一方面变成了二氧化碳;另一方面转化成了其它的有机物质,提高了饲料的营养价值。添加酒糟的花生壳与添加玉米的花生壳相比下降的更多。因为酒糟是浸提部分碳水化合物的副产品,而玉米含碳水化合物量较多,微生物充分利用碳水化合物而使各种类型的饲料中无氮浸出物含量均呈下降状态。结果表明,添加酒糟的花生壳经过微贮后无氮浸出物利用的最多,添加玉米的花生壳经过微贮后浸出物利用次之。

3.6 加入酒糟的评价

酒糟是酿酒工业的副产品、属工业“三渣”之一。全国各酒厂每年生产大量的酒糟,如果这些都用于养殖业,不仅对于畜牧业的发展有很大的促进作用,而且还可以节约粮食和防止环境污染,其价值十分重大。从以上结果可以看出在花生壳中添加酒糟有一定的效果。然而,由于啤酒生产具有明显的季节性,全年停产时间长达 4~5 个月,啤酒糟供应的不均衡问题十分突出^[10]。

另外鲜啤酒糟含水量大,不宜放置过久,极易腐败变质,产生大量有机酸、多种杂醇及毒素等,使其失去饲喂价值。所以新鲜的啤酒糟要尽快进行微贮,存放时间过长同样会影响啤酒糟微贮的质量。由于刚生产出来的啤酒糟自身的温度高达 65℃,在微贮过程中如不及时降温,会使秸秆发酵活干菌失去作用,将酒糟应用于饲料生产时需注意这一问题。

3.7 加入玉米粉的评价

玉米属于碳水化合物类物质,加入微贮过程中,

主要为微生物的繁殖提供了有利条件。微贮过程中粗料里适当添加点精料,可以使微生物更好的繁殖利用,并促进分解粗纤维,从而可降低粗纤维含量,提高饲料的消化率和营养价值。但因玉米是易霉变饲料,在储存、利用过程中需注意所在环境,不使霉菌有滋生的余地。本实验过程中,发现添加玉米粉的花生壳样品中有霉变现象,究其原因有两点:①试验时,玉米粉可能已发生霉变;②菌液的配置有点问题,没有给予足够时间的激活,在微贮过程中,不能很快形成优势菌群,从而出现了霉变现象。但一段时间后,微生物利用了营养物质,迅速繁殖,并形成一定的优势菌群,可抑制有害菌的繁殖。

4 结论

在本次试验各组花生壳粉微贮过程中,有益菌大量快速繁殖,使花生壳粉中的蛋白含量增加,提高了花生壳中粗蛋白的含量。同时花生壳中木质素、纤维素在部分被降解的过程中产生低聚糖、乳酸、挥发性脂肪酸等,降低了粗纤维含量,相应提高了饲料在动物中的消化率。无氮浸出物含量也会减少而转化为其它有机物,这些都是能被家畜利用的营养物质。综合考虑,在花生壳中添加玉米粉比添加酒糟效果好。

参考文献

- 1 陈洪章,陈建新,李佐虎.直接利用秸秆发酵蛋白饲料可行性研究[J].饲料研究,1996(9):37~38
- 2 岳寿松,王翠萍,尤升波.利用微生物提高作物秸秆饲用价值的研究[J].山东科学,2006,19(6):52~56
- 3 高腾云,齐胜利.花生壳-麦秸型日粮的营养特点及饲喂肉牛的效果[J].河南农业学报,1999,33(4):381~383
- 4 张敏,薛晓珍.微生物活干菌发酵玉米秸秆有效成分分析[J].仪器仪表与分析检测,2003(3):24~26
- 5 李明,张玉.秸秆微贮能提高粗蛋白含量吗[J].饲料博览,2004(7):22~23
- 6 范莉,宋金昌.利用微生物提高秸秆粗蛋白质的试验[J].动物科学与动物医学,2002,19(1):46~49
- 7 GaoTengyun,WangYanling.Nutritive Value and Chemical Treatment to Peanut Shell and Wheat Straw for Feeding Beef Cattle[J].Transactions of the CSAE,2001(1):114~118
- 8 宋正明,邵庆,华赵伟.啤酒糟饲喂奶牛的效果[J].上海奶牛,1999(3):28~29
- 9 院江,孙新文,丁宁.微生物发酵对棉籽壳营养成分及游离棉酚的影响[J].石河子大学学报(自然科学版),2006,24(3):299~301
- 10 刘杰.浅谈啤酒糟在畜牧业生产中的应用[J].黑河科技,1999(4):37~38

(编辑:高雁,snowyan78@tom.com)

用水飞蓟药渣与果寡糖改进猪饲料配方的研究

耿春银 韩美兰 廖世国 张敏

摘要 为开发新的饲料资源及降低饲料成本,用水飞蓟药渣及果寡糖等对某猪场的饲料配方进行了改进,并以原配方为对照,设计猪的生长试验。试验结果表明,经水飞蓟药渣及果寡糖改进的饲料配方对猪的增重、养分消化率均较对照组有一定的提高($P>0.05$),且氮、磷的排泄率显著的低于对照组($P<0.05$)。用水飞蓟药渣及果寡糖等改进的饲料配方与原配方相比,不仅降低了饲料成本,增加了经济效益,而且减轻了其对环境的污染。

关键词 水飞蓟;果寡糖;生长育肥猪;经济效益

中图分类号 S816.35

Study of improving swine feed formulation by the holy thistle and the FOS

Geng Chunyin, Han Meilan, Liao Shiguo, Zhang Min

Abstract We add the holy thistle and FOS into the feed as one of the basis of the feedstuff in order to exploit resource of feeds and reduce cost price. The result indicated that digestibility of feeds of new prescription group was higher than old prescription group ($P>0.05$), and Nitrogen Phosphorus excretion rate was significantly lower than old prescription group ($P<0.05$), and the economic efficiency is obvious.

Key words holy thistle; fos; growth pig; economic profit

中草药水飞蓟含有的活性成分水飞蓟素对肝病有良好的治疗效果,因此多被制成一些治疗肝病的药物^[1],而制药的药渣多被用作肥料或被丢弃,这不仅是对资源的一种浪费,还会对环境造成污染。水飞蓟药渣不仅含有一定的药物活性成分,而且蛋白含量高达22.10%,可为动物提供蛋白来源,其用作饲料对提高饲料中营养物质的消化率有一定作用^[2],对改善猪肉品质也有影响。天然植物活性成分药效的发挥必须依靠肠道菌群的作用^[3],果寡糖不仅可增加有益菌的增殖,还对有害菌有一定的抑制作用^[4],因此可增强动物肠道对营养物质的消化吸收,进而提高动物的生产性能。为降低饲料成本,变废为宝,本研究在营养水平一致的前提下,用水飞蓟药渣及果寡糖改进了某猪场原有的饲料配方,并进行了猪的生长试验,旨在探讨一下用水飞蓟药渣及果寡糖改进后的配方对育肥猪的增重及经济效益的影响,为开发新的饲料资源提供参考数据。

1 材料与方法

耿春银,延边大学农学院动科系,133400,吉林龙井。

韩美兰、张敏,单位及通讯地址同第一作者。

廖世国,延边二中。

收稿日期:2007-09-10

1.1 试验设计

选择遗传基础相似、性别一致、健康状况良好、平均体重为25 kg的30头仔猪(杜×长×大)进行试验。将试验猪随机分成试验组和对照组(经检验组间差异不显著),每组设3个重复,每个重复5头猪。试验分两个阶段,第一阶段为生长期(25~60 kg),试验期为32 d;第二阶段为肥育期(60~95 kg),试验期为41 d。每个阶段饲喂不同配方的日粮。

1.2 试验日粮

对照组饲喂某猪场的以玉米—豆粕为基础的日粮,其中添加了部分热处理过的米糠及土霉素;试验组饲喂改进后的日粮,其中用水飞蓟替代了部分米糠,并添加了少量的果寡糖及酶制剂等添加剂。日粮各阶段的组成及营养水平见表1。

1.3 饲养管理

试验所用育肥猪,按照正常免疫程序进行免疫。猪舍光照充足、干燥、通风,每天清粪2次,早晚各1次,猪舍温度23~25℃,适宜的饲养密度。试验预饲期为7 d,在试验实施中,除了试验设计所规定的处理间差异外,其它的饲养管理条件和技术措施质量一致。前期采用自由采食;后期采用限制饲喂的办法,即在30 min内吃净为标准,全期采用自动装置进行饮水。

1.4 测定指标

表 1 日粮配方设计

项目	对照组		试验组	
	25~60 kg	60~95 kg	25~60 kg	60~95 kg
日粮组成(%)				
玉米	58.2	67.1	58.2	68.3
大豆粕	6.5	7.0	6.5	7.0
麦麸	5.0	5.0	5.0	5.0
米糠	27.3	18.0	3.0	3.0
水飞蓟	0	0	24.32	15.02
食盐	0.5	0.5	0.5	0.5
骨粉	1.3	1.2	1.3	1.2
矿物质	0.5	0.5	0.5	0.5
维生素	0.5	0.5	0.5	0.5
营养水平				
消化能(MJ/kg)	12.56	13.70	12.60	13.45
粗蛋白质(%)	15.4	14.20	15.12	13.94
粗脂肪(%)	8.4	7.2	8.8	7.14
粗纤维(%)	5.2	5.6	15.3	9.8
钙(%)	0.63	0.61	0.65	0.62
磷(%)	0.48	0.47	0.44	0.42

注:对照组中添加了 0.002% 的抗生素(土霉素);试验组中在生长阶段(25~60 kg)以 0.002% 的果寡糖、0.2% 的复合酶取代抗生素,在肥育阶段(60~90 kg)以 0.003% 的果寡糖、0.2% 的复合酶取代抗生素。

1.4.1 增重

分别于正试期开始、试验结束时进行称重,每次于早晨定点(6:00)空腹称重,然后计算试验全期及各生长期的日增重情况。

1.4.2 平均饲料采食总量、平均日饲料采食量

以栏为单位,记录各组在试验开始后各阶段总的耗料量,统计各试验组在两个阶段的平均日采食量以及全程的平均日采食量。

1.4.3 饲料料重比(F/G)

根据各阶段的采食量及增重情况,计算各阶段及全程的料重比。

1.4.4 饲料中各种养分消化率

试验开始后,连续 7 d 采集料样及粪样,并对样品中的粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、粗灰分、钙、磷的含量进行了测定,并计算猪对饲料养分的表观消化率。

1.4.5 N、P 的排泄率

根据粪中及饲料中 N、P 的含量计算出 N、P 的排泄率。

1.4.6 经济效益

试验结束后,根据增重和耗料情况,分析各试验组的经济收益情况。

1.5 统计分析方法

试验数据用 Excel 软件处理,采用 t 检验,数值表示为平均值±标准差(X±SD)。

2 结果与分析

2.1 增重效果

生长期各组的增重情况及肥育期各组的增重效果见表 2。由表 2 可见,在生长阶段,试验组日增重和对照组相比没有明显差异。在采食量方面,试验组比对照组提高了 3.29%(P>0.05),料重比两组无明显差异;在育肥阶段,试验组的日增重和平均采食量分别比对照组提高了 7%和 2.55%(P>0.05),料重比两组无明显差异。

表 2 不同育肥猪增重效果

项目	试验组	对照组
生长期(25~60 kg)		
平均始重(kg)	25.29±0.34	25.59±0.46
平均末重(kg)	53.55±3.97	52.69±1.92
平均日增重(kg)	0.88±0.13	0.85±0.08
平均日采食量(kg)	2.20±0.13	2.13±0.08
料重比	2.49±0.17	2.52±0.20
肥育期(60~95 kg)		
平均始重(kg)	53.55±3.97	52.69±1.92
平均末重(kg)	97.60±2.26	93.73±2.15
平均日增重(kg)	1.07±0.10	1.00±0.09
平均日采食量(kg)	2.82±0.45	2.75±0.44
料重比	2.64±0.60	2.75±0.62

注:同一行中肩标字母,大写字母不同表示差异极显著(P<0.01),小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。下表同。

2.2 消化试验

根据消化试验,测定试验各组各养分的表观消化率结果见表 3。由表 3 可以看出,在生长阶段试验组在粗蛋白、粗纤维、钙、磷的消化率上分别高于对照组 8.78%、24.77%、8.72%、5.50%(P<0.05),而粗脂肪消化率与对照组无明显差异;在育肥阶段,试验组在粗蛋白、粗纤维、钙、磷的消化率上分别高于对照组 4.87%、16.62%、7.97%、14.96%(P<0.05),粗脂肪消化率比对照组高 3.01%(P>0.05)。

表 3 日粮中各种养分的消化率(%)

项目	粗蛋白	粗脂肪	粗纤维	钙	磷
生长期					
试验组	73.19±1.52 ^a	62.47±1.22	44.12±3.94 ^a	49.02±1.93 ^a	57.39±1.80 ^a
对照组	67.28±2.02 ^b	60.85±2.00	35.36±2.26 ^b	45.09±1.30 ^b	54.40±2.08 ^b
育肥期					
试验组	79.27±1.78 ^a	67.74±1.66	36.52±1.18 ^a	51.09±1.14 ^a	52.32±3.03 ^a
对照组	75.59±0.95 ^b	65.76±1.48	30.53±2.29 ^b	47.32±1.78 ^b	45.51±2.64 ^b

2.3 N、P的排泄率

对各组各阶段测定的 N、P 排泄率的结果见表 4。由表 4 可以看出, N 的排泄率, 生长阶段试验组比对照组降低了 18.00% ($P<0.05$), 育肥阶段试验组比对照组降低了 15.08% ($P<0.05$); P 的排泄率, 生长阶段试验组比对照组降低了 6.56% ($P<0.05$); 育肥阶段试验组比对照组降低了 12.50% ($P<0.05$)。

表 4 N、P 的排泄率(%)

组项目	N 的排泄率	P 的排泄率
生长期		
试验组	26.81±1.17 ^b	42.61±1.45 ^b
对照组	32.72±1.86 ^a	45.60±2.60 ^a
育肥期		
试验组	20.73±1.78 ^b	47.68±3.03 ^b
对照组	24.41±1.36 ^a	54.49±2.64 ^a

2.4 经济效益

根据增重和耗料情况, 对试验各组全期的经济收益分析结果见表 5。由表 5 可以看出, 试验组每头猪的饲料费用比对照组降低了 34.68 元, 试验组每千克增重消耗比抗生素组低 0.85 元, 在不考虑肉质和其它投入, 只考虑饲料消耗的情况下, 试验组每头猪的纯收入比抗生素组增加了 63.87 元, 经济效益提高了 144.90%。

表 5 经济效益分析

项目	对照组	试验组
平均增重(kg)	68.14±2.45	72.31±3.16
毛猪价格(元/kg)	7.0	7.0
增重收入(元)	476.98	506.17
平均采食总量(kg)	193.26	197.14
饲料价格(元/kg)	2.24	2.02
饲料消耗(元)	432.9	398.22
经济效益(元)	44.08	107.95

3 讨论与小结

通过对试验数据分析表明, 试验组对猪的增重有一定的效果, 但是与对照组相比差异并不显著($P>0.05$), 而以往的试验表明, 中草药添加剂将应用于育肥猪, 各阶段增重效果都很明显^[5-6], 原因很可能是中草药对动物的生长作用源于多种药性成分的复杂反应, 而单一的中药对动物的生长效果可能并不明显。通过对养分消化率的测定, 改进配方的试验组日粮各养分的表观消化率(除粗脂肪外)都有一定的提高, 而氮、磷的排泄率却显著的降低($P<0.05$), 原因可能是水飞蓟含有的活性物质能改善猪肠道内环境, 提高营养物质的

消化和吸收, 加上果寡糖可选择性地增殖肠道有益菌、抑制有害菌、提高肠道消化酶活性, 从而提高了各养分消化率。

饲料资源紧缺是目前我国畜牧业面临的主要问题之一, 本研究的结果表明, 通过科学合理的利用水飞蓟药渣, 不仅可作为良好的饲料资源, 而且有相当的成本优势, 这对于充分利用、开发新的饲料资源, 发挥地域资源优势, 发展绿色畜牧业提供了新的思路。

参考文献

- 肖莉, 靳淑敏. 水飞蓟素制剂及其应用进展[J]. 中国药物与临床, 2005(3): 205~205
- 王英伟, 张敏, 白金刚. 水飞蓟复合饲料对猪生长性能及日粮养分消化率的影响[J]. 饲料工业, 2006(1): 30~32
- 孙永欣, 徐永平, 汪婷婷. 天然植物活性成分与仔猪肠道菌群的互作[J]. 中国饲料, 2006(17): 11~14
- 盛东峰, 王志跃. 果寡糖在动物营养中的研究与应用[J]. 动物营养学报, 2005(1): 7~11
- 范福贤. 中草药松针粉添加剂对养猪业的效果观察[J]. 中兽医学杂志, 2005(4): 12~13

(编辑: 刘敏跃, lm-y@tom.com)

征订启事

欢迎订阅 2008 年《饲料工业》

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

地址: 沈阳市金沙江街 16 号 6 门

邮编: 110036

发行部电话: 024-86391237

传真: 024-86391925

投稿邮箱: tg@feedindustry.com.cn

[Http://www.feedindustry.com.cn](http://www.feedindustry.com.cn)