

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

2008 年第 29 卷第 8 期  
 (总第 317 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 6 门  
 邮编:110036  
 电话:总编室(024)86391923  
 编辑一室(024)86391926(传真)  
 编辑二室(024)86391925(传真)  
 网络发行部(024)86391237  
 投稿邮箱:tg@feedindustry.com.cn  
 网站:www.feedindustry.com.cn  
 英文网站:www.chinafeedindustry.com  
 总编辑:陈户鹏  
 副总编辑:沈桂宇 崔成德  
 责任编辑:王芳  
 广告全权代理:沈阳同兴广告有限责任公司  
 总经理:林勇  
 副总经理:荣立南  
 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:slgyggb@163.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 日出版  
 国外代号: SM4290  
 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 01-82 号  
 开户行:中信银行沈阳分行皇姑支行  
 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

## 目 次

### 专家论坛

- 1 木质素基因工程在饲料工业中的应用 ..... 薛永常

### 饲料添加剂

- 6 沙棘提取物对断奶仔猪生长和脂肪代谢的影响  
 ..... 刘长伟 李 焱 左金国等
- 9 枯草芽孢杆菌制剂对肉鹅早期生长和养分存留的影响  
 ..... 谭荣炳 师昆景 吴灵英
- 12 谷氨酰胺、壳聚糖及二者复合添加对断奶仔猪生长性能  
 和血液生化指标的影响 ..... 王 周 赵 燕 梁国旗等

### 酶 制 剂

- 15 透析管体外消化法评定 NSP 复合酶作用效果的研究  
 ..... 袁旭鹏 贺建华 范志勇等
- 18 纳豆芽孢杆菌产蛋白酶固态发酵条件研究  
 ..... 帅 明 黄占旺 牛丽亚
- 21 抽提条件对饲料酶制剂中纤维素 Cx 酶活力的影响  
 ..... 高 玲 刘春英 孙晓红等

### 水 产 养 殖

- 23 芽孢杆菌对宝石鲈生长和肠道菌群的影响  
 ..... 宋理平 冒树泉 王爱英等
- 25 欧洲丁鲷三种复合预混料配方对比试验  
 ..... 孙晓雨 黄 权 祖岫杰等
- 28 五种发酵木薯渣在罗非鱼饲料中应用的养殖性能比较  
 ..... 张伟涛 叶元土 尹晓静等

# 水业

(半月刊)

## 企业标识展示



正昌人才工程  
(0519)7309867



通威集团  
(028)85188888



江苏牧羊  
(0514)7848811



辽宁北方  
(0412)3343018  
(024)88080922



江苏良友  
(0519)88309988



裕达机械  
(0519)87906658



唐山金鼎自控  
(0)13603373412



杭州康德权  
(0571)86433111



新泰友邦机械  
(0538)7427566



上海蓝普  
(021)64197116



恒基  
诸城恒基机械  
(0536)6358822



Applied Nature™  
上海彼福艾  
(021)57687881



山东迎春钢板仓  
(0546)8057585



立达尔  
广州立达尔  
(020)87636309



康地恩生物  
(0532)88966607



珠海志美  
(0756)8682261

### 试验研究

- 33 N<sup>+</sup>注入选育产 CLA 乳酸菌及其发酵条件的研究  
..... 蔡玉华 王彩玲 李有超等
- 37 贮存时间和方法对乳猪袋装流质饲料中维生素和微生物含量  
影响研究初报 ..... 何余湧 陆 伟 胡善辉等
- 41 产朊酵母菌利用烤鳗蒲烧废水产单细胞蛋白的研究  
..... 吴立根 郑 虹 陈 盛

### 检测技术

- 46 离子对高效液相色谱法鉴别黄霉素方法的研究  
..... 曾兆国 刘 波 陈永辉等
- 48 气质联用法测定饲料中的三聚氰胺  
..... 蒋晨阳 范 倩 林德清等

### 基因工程

- 51 转基因饲料 DNA 在加工过程中的降解研究进展  
..... 梁克红 李 俊 李军国等
- 54 营养成分对基因表达的调控 ..... 高 雁 徐奇友

### 专题论述

- 58 不同品种猪早期消化酶活性差异的研究 ..... 王 磊 王康宁

### 特别关注

- 62 2008' 海因特鱼虾营养与饲料技术北方研讨会会议侧记

### 信息采撷

- 61 养鱼业微利时代如何节约饲料成本

# 木质素基因工程在饲料工业中的应用

薛永常

面对迅速发展的养殖业,每年需消耗(及冬储)各类饲料上亿吨,解决畜禽生产所需的饲料问题是人们所关心的。目前我国大型饲料厂基本都是使用粮食作为畜禽的日粮,而美国约有73%的肉类是由非粮食转化而来,澳大利亚为90%,而我国仅有6%~8%的食肉由草秆转化而来。因此国家在2010年远景规划中提出:养殖业要主攻食草型和非粮耗型饲料,快速开发非粮植物优质饲料已经提到国家的日程上来。农作物秸秆是我国主要的粗饲料,据估计,每年我国有7亿吨农作物秸秆产生,数量大、分布广、种类多(陈翠微等,2001),但利用率很低,不足总量的15%~20%。同时由于秸秆的木质纤维素是许多动物所不能利用的,尤其是木质素,即使是草食动物也很难消化,木质素与纤维素、半纤维素结合,导致纤维素的消化受阻,饲料的消化性和利用率降低。随着分子生物学的发展,许多专家将目光聚焦到基因工程技术上,利用基因工程手段来提高饲料消化率。本文旨在对影响饲料消化性的因素、木质素降解途径、木质素的基因工程研究现状以及在改善饲料消化性方面的应用进行综述,希望能够对我国的畜牧业生产有所启发。

## 1 影响饲料消化性的因素

植物饲料可粗略分为豆类饲料和草类饲料。草类饲料比豆类饲料纤维含量高,并且草类纤维比豆类纤维易消化。但是反刍动物只能消化所食豆类纤维的40%~50%和草类纤维的60%~70%(Buxton等,1997),牲畜所食的饲料有较大比例不能被消化和吸收,也就是有相当大一部分有效成分白白浪费掉了,甚至有些纤维不管其在胃中贮存多长时间都不能被消化,这就直接影响饲料的消化率和利用率,严重制约了我们国家畜牧业和乳业的快速发展。

饲料细胞壁中所含的木质素是影响饲料消化率的限制因子。在植物细胞形成过程中,木质素和纤维素、半纤维素等交联沉积在细胞的初生壁和次生壁

中,木质素还可与多糖通过阿魏糖桥交联从而影响了纤维多糖的微生物降解,木聚糖彼此交联及与木质素的交联使细胞壁不易降解,只有低于50%的纤维部分可被动物消化吸收(Hatfield等,1999)。因此木质素被认为是作为一种物理屏障降低了饲料的营养价值。因此,降低饲料细胞壁中木质素含量,使木质化细胞易被消化,则能显著提高饲料的可消化性和利用率。

## 2 木质素结构特点

木质素是一类由苯丙烷衍生物组成的复杂酚类多聚体,由松柏醇和芥子醇等结构单元组成木质素的p-羟苯基(H单体)、邻甲氧苯基(G单体)和芥子基(S单体),通过C-C、C-O-C等共价键聚合而成,是维管植物细胞壁的重要组成成分,具有加固细胞壁的机械强度、提高细胞运输能力以及抵御病菌微生物侵害的生物学功能,一般约占干重的15%~36%,是地球上仅次于纤维素而居第二的有机组分。由于木质素在组分、种类不同,涉及的生物酶类也不同,特别是连接键类型的多样性,决定了对其进行生物降解和基因操作的复杂性和特殊性。

由于木质素与半纤维素、纤维素之间相互混杂和交联,使得原可以被瘤胃微生物降解的纤维素及其它可消化营养成分也难以被降解,因此降低木质素含量、破坏其结构单元之间连接的各种共价键,对于提高农作物秸秆的营养价值具有重要意义。

## 3 微生物对木质素的生物降解

在自然界中,能降解木质素并产生相应酶类的微生物很少。木质素的完全降解通常是真菌、细菌及相应微生物群落共同作用。降解木质素的真菌主要有白腐真菌、褐腐真菌和软腐菌。白腐真菌能够分泌胞外氧化酶降解木质素,木质素过氧化物酶(lignin peroxidase,简称LiP)、锰过氧化物酶(manganese peroxidase,简称MnP)、漆酶(laccase,简称Lac)共同构成了白腐真菌的木质素降解酶系,近年来纤维二糖脱氢酶(cellobiose dehydrogenase,CDH)也成为木质素降解酶一员,它与LiP、MnP和Lac有密切的关系,一同参与木质素的生物降解(江凌等,2007)。

降解木质素的细菌种类很多,包括链霉菌、节杆菌、小单孢菌和诺卡氏菌等。属于链霉菌的丝状细菌对木质素降解率最高可达20%,而非丝状细菌对木质

薛永常,大连工业大学生物学院,教授,116034,大连市甘井子区轻工苑1号。

收稿日期:2008-02-21

★ 辽宁省自然科学基金项目(20062146)

素降解率<10%。非丝状细菌只能降解木质素低分子量部分和木质素的降解产物,因此,它们可能在木质素降解的最后阶段起作用(郁红艳等,2005)。

由于白腐真菌培养受许多外部条件的影响,且在自然状态下白腐真菌的定植缓慢,很难形成优势种群,且定植后降解周期十分漫长。每一种白腐真菌产生不止一种木质素降解酶,单一酶,如 Lac 和 MnP 单独存在都不能很好地降解木质素,而两种酶同时存在时,木质素却能得到很好降解,表明两种酶具有协同作用,不同降解酶系成分之间的比例将直接影响木质素降解效果,这对白腐真菌进入产业化有一定影响。细菌降解木质素的作用机制研究局限于木质素类低分子量化合物,关于其对天然木质素降解了解极少。而运用现代分子生物学技术对木质素合成酶或降解酶相关基因结构、表达调控机理等深入研究,通过基因工程调节酶的活性,使饲料中木质素含量降低,将是提高饲料利用率的主要手段。

#### 4 基因工程降低木质素含量

##### 4.1 木质素生物合成途径

木质素的生物合成途径已经多次被综述过,这些年也经过多次修订,合成途径更加完善(薛永常等,2003;赵华燕等,2004)。木质素是在一系列酶催化下使苯丙氨酸或酪氨酸逐步转化为木质素单体,最终聚合成木质素的过程。此途径包括 3 部分:苯丙烷途径、木质素合成特异途径和木质素单体糖基化运输及聚合为木质素。木质素单体的含量、组成及总木质素含量随植物种类不同而不同。所涉及酶的种类、活性及比例的不同决定了不同单体产生和合成的速率及在木质素中不同木质素单体的比例,从而决定了特定木质素的产生。

木质素生物合成途径所涉及的酶主要包括苯丙氨酸氨解酶(Phenylalanine Ammonia-Lyase, PAL)、苯丙烯酸 4-脱氢酶(Cinnamic Acid 4-Hydroxylase, C4H)、对羟基苯丙烯酸 3-脱氢酶(Coumaric Acid 3-Hydroxylase; C3H)、羟基肉桂酰 CoA:莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶(hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase, HCT)、双重咖啡酸/5-羟基阿魏酸 O-甲基转移酶(Bispecific Caffeic Acid/5-Hydroxyferulic Acid O-Methyltransferase, COMT)、咖啡酰 CoA-O-甲基转移酶(Caffeoyl-CoA O-methyltransferase, CCoAOMT)、阿魏酸 5-脱氢酶(Ferulic Acid 5-Hydroxylase, F5H)、4-肉桂酸 CoA 连接酶(4-Coumarate: CoA Ligase, 4CL)、肉桂酰 CoA 还原酶

(Cinnamoyl-CoA Reductase, CCR)、肉桂醇脱氢酶(Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase, CAD)等。对木质素合成酶的单一或综合性基因操作对改善饲料消化性将有帮助。

##### 4.2 木质素的基因调控

植物生长发育中细胞壁的木质化是限制饲料消化性和动物生产性能的主要限制因子。草本植物是反刍动物营养的基础,细胞壁的可消化性是提高草本作物利用率的目标。利用基因工程对木质素合成酶进行操作,通过增加或降低相关酶含量而调节植物体总木质素或木质素单体含量是提高饲料消化性和利用率的有效的手段。

###### 4.2.1 单一木质素合成酶的基因调控

PAL 催化 L-苯丙氨酸脱氨生成苯乙烯酸,是木质素生物合成途径中的第一个限速酶。利用反义 RNA 技术转化烟草, PAL 活性下降 5%~30%时,转基因植株木质部木质素降低,生长发育迟缓、花粉活性降低及花形和色素改变。转基因株基因型分析表明,这些症状是单一的,部分的显性特征遗传且与 PAL 活性及可溶性苯丙烷产物的降低有关(Elkind 等,1999)。PAL 并非特异地参与木质素单体的合成,它只是非木质素酚类物质合成的中间环节,故也能调控该途径的合成,不仅能使木质素生物合成途径的改变,而且可能影响其它产物的合成,因此极有可能导致植物性状的变化。

CCoAOMT 催化咖啡酰 CoA 甲基化为阿魏酰 CoA。Zhong 等(1998)在反义调节 CCoAOMT 表达的转基因烟草中发现 Klason 木质素含量下降 36%~47%, G-木质素有较大幅度的降低,导致其 S/G 比值增加。在抑制 CCoAOMT 表达的转基因杨树中发现,木质素含量降低 12%, S/G 比值增加 11%,且结构疏松利于脱木质素(Meyermans 等,2000)。

F5H 催化阿魏酸在 C5 位羟基化为 5-OH 阿魏酸。F5H 向来被认为是 S-木质素合成的控制点,最初认为是在阿魏酸水平上发挥作用,后来的研究表明, F5H 也在松柏醛和松柏醇水平上起催化作用。Chapple 等(1992)发现, F5H 活性缺失的拟南芥突变体 *fah1* 的木质素中仅有 G-木质素,其是调控 S-木质素合成的关键酶。因此 F5H 对于植物木质素的组分改造很有意义。

4CL 催化羟基香豆酸为羟基肉桂酰 CoA, 4CL 基因通常以基因家族形式存在于植物中,抑制 4CL 表达会使植物木质素含量下降(Lee 等,1997)。Hu 等(1999)发现,在 Pt4CL1 表达受抑制的美洲山杨中木质素最高降低了 45%,而纤维素含量却增加了 15%,叶、根和

茎生长实质上是增加了,但在细胞水平和整株水平上的结构整体性没有变化。但贾彩红等(2004)在抑制4CL基因的转基因毛白杨中木质素下降了41.73%,而纤维素含量无明显变化。这也暗示人们在植物体中木质素和纤维素之间是否存在消长补偿调节关系还有待进一步探讨。

CCR催化羟基肉桂酰CoA硫酯还原为其相应的醛。作为催化木质素特异合成途径的第一步反应的酶,CCR被认为是调节碳素流向木质素潜在的控制点。Piquemal等(1991)利用已知的尤加利树CCR cDNA序列通过RT-PCR方法获得烟草的CCR cDNA序列并反义转入烟草中,试验发现,所有CCR活性下降的植株都呈现相同的特点,即木质部细胞壁有桔褐色沉积物,G含量的降低造成S/G比值的升高等。木质素空间分布分析表明,CCR下降在改善制浆用木材的品质、提高纸浆的得率中起重要作用。但CCR活性严重下降的转基因烟草不仅显示了木质素含量的显著下降,并伴随着不正常生长,如植株矮小,畸形叶片,导管塌陷等。可见,单独抑制CCR活性虽能减少木质素的生物合成,但影响了植株的生长发育。

CAD是催化木质素前体生物合成的最后一步,即肉桂醛还原为肉桂醇。Pilate等(2002)对生长了4年的反义抑制CAD活性的杨树进行了制浆试验,低水平CAD活性的反义植株木质素明显地降低,同时显示出红褐色的木质部组织,在玉米与高粱bmr突变体中也有相似的表型。因此暗示了降低CAD活性是得到易消化牧草的途径。

在对木质素生物合成酶基因的研究中,对C3H、HCT的研究相对较晚,直到2001年才有了C3H的相关报道,而HCT的研究就更晚些。Schoch等(2001)从拟南芥中分离出CYP98A3基因,它在酵母中不能代谢自由的p-苯乙烯酸或它的葡萄糖酯、CoA酯、p-肉桂醛/醇等,但能使反式苯乙烯酸的5-O莽草酸酯和5-O-D-奎宁酸酯转化为相应的咖啡酸结合物,莽草酸酯比奎宁酸酯转化效率高4倍(Schoch,2001)。2002年分离的拟南芥ref8基因,并最终确定其就是C3H基因,并确定了C3H在木质素生物合成途径中的位置,弥补了木质素生物合成途径中从反式苯乙烯酸到咖啡酰CoA之间的断档(Humphreys and Chapple,2002;薛永常,2003)。在这个酰基化过程中,催化C3H底物形成的甲酰转移酶HCT直到2003年才被描述(Hoffmann等,2003),C3H不能以反式苯乙烯酰CoA或自由酸为底物,其以莽草酸或奎宁酸为受体,分别生成

莽草酸酯或奎宁酯。它将5-O-咖啡酰奎宁的咖啡酰基部分转移到CoA形成咖啡酰CoA,咖啡酰CoA最终成为G-木质素和S-木质素的前体。因此HCT也是木质素生物合成关键酶之一,它同时存在于木质素生物合成途径中C3H的上游和下游。C3H插入突变也证明其在木质素合成中的上述作用(Abdulrazzak等,2006)。在对烟草HCT进行的沉默处理导致茎中Klason木质素下降15%,木质素组成发生变化,H-木质素增加,S-木质素下降,HCT在烟草茎微管组织的积累是与其木质化相一致(Hoffmann等,2004)。同样下调调节C3H,苜蓿茎P(H)木质素由1%上升到65%,G,S单体含量减少,秸秆的消化率提高了(Ralph等,2006)。HCT下调调节的辐射松中也得到同样的结果(Ralph等,2006)。因此对C3H及HCT的功能研究具有重要的实践意义。

#### 4.2.2 多基因共整合操作

木质素生物合成本身受多基因控制,因此对单一合成酶基因的操作有一定的局限性。可以通过构建多基因共整合载体,将多个与木质素合成相关的基因整合到一个表达载体上,串联置于同一个启动子下调控,导入植物体中,使它们能够在转基因植物体中共同发挥作用,可能起到更好的加和效应。由于木质素在细胞壁中的沉积是导致细胞纤维素成分被充分利用的主要障碍,因此降低木质素含量或改变其组成,对于反刍动物对植物细胞纤维素的分解也会有促进作用。Zhong等将COMT和CCoAOMT反义基因通过共整合载体的方式导入烟草中,木质素总含量下降,S-木质素减少(Zhong等1998)。S-单体木质素的C-C连接主要以 $\beta$ -O-4连接为主,在造纸中较易用化学方法去除,而G-单体C-C连接主要以 $\beta$ - $\beta$ , $\beta$ -1, $\beta$ -5,5-5连接为主,不易用化学方法去除,所以含S-单体木质素的饲料,其饲料的消化率高(Baucher等,2003)。Li等(2003)在CA1d5H正义调节的植物中S/G单体比值提高3倍,而植物体木质素没有变化。而在反义表达4CL的同时正义表达CA1d5H的植物中,木质素降低52%,S/G提高64%,纤维素提高30%(Li等,2003)。Hu等(1999)在Pt4CL1表达受抑制的杨树中虽然木质素最高降低了45%,但其纤维素含量同时增加了15%。但是如果将反义的木质素合酶基因和正义的纤维素合酶基因共操作,导入饲料植物中,一方面降低植物体中木质素含量,同时增加纤维素含量,对于提高饲料植物的利用率将是一个十分重要的手段。

#### 4.2.3 RNA干涉(RNAi)技术

RNAi 是由双链 RNA 分子介导的、在转录后 mRNA 水平关闭相应基因表达的过程,自 1998 年发现 RNAi 以来已广泛应用于医学和基础生物学研究,得到了较好的效果。因此我们可以利用 RNAi 技术导致的 RNA 沉默使植物体中的木质素相关基因表达抑制或超表达,这为木质素基因工程调控饲料中的木质素含量提供了广阔的应用前景。

#### 4.3 木质素基因合成酶的调控

木质素的存在是影响牧草消化率的主要因素之一,玉米是广泛使用的一年生青贮草本植物,高粱、未成熟小谷物及其秸秆也广泛用于牲畜日粮中,木质素含量与细胞壁可消化性之间的相关性随着遗传背景不同有很大变化。玉米的 *bm3* 突变和高粱的 *bmr12* 突变,其 COMT 活性发生了改变,有效地提高了细胞壁的可消化性(Barrière 等,2003)。但是细胞壁可消化性的提高可能导致农作物产量降低,因此最好是在确定了目的等位基因后,利用标记辅助选择。因此对木质素合成途径进行调控的基因工程是提高草本植物细胞壁可消化性的手段。

Chen 等(2003)从一种广泛生长的单子叶植物牛毛草中克隆一个木质素生物合成酶 CAD 的 cDNA 序列,在 CAD 下调调节的转基因品系中其木质素显著下降,其 S/G、G/H 和 S/H 单体比值发生改变,但是纤维素、半纤维素及中性糖组分没有明显变化,且体内干物质的消化率提高了 7.2%~9.5%。

利用反义技术为调节木质素合成途径使木质素含量下降,为饲料质量和动物生产性能改善提供了一个方法,反义表达高粱 OMT 基因于玉米中,可降低玉米 OMT,结果导致木质素降低。转基因 OMT 的植物,其茎中木质素含量下降 20%,叶片中降低 12%,整株木质素含量平均降低了 17%,最大的降低 31%;其消化性显著提高,叶片提高 2%,而茎提高 7%,整株平均消化率由 72%升至 76%(He 等,2003)。反义 HCT 表达使酶活降低 15%~50%,木质素显著降低,单体组成发生显著变化,中性和酸性降解纤维显著降低,干物质消化率提高了 20%(Shadle 等,2007)。

Srinivasa 在苜蓿中利用反义 RNA 技术抑制 C3H、C4H 和 COMT 的表达可以明显降低木质素的含量,其消化率大大提高(Srinivasa 等,2005);CCR 是催化木质素生物合成的氧化还原反应的第一步,抑制其表达并能非特异性地降低木质素单体的含量,是降低木质素的遗传操作中有效控制点之一。但是 CCR 的水平调控不当,将会影响植物的正常生长,因此在调

控 CCR 时应选用特异性启动子,既能有效地降低木质素的含量又不至于影响植物的正常生长发育(Douglas,1996)。

He 等(2003)以反义技术构建含有高粱 OMT 基因的载体并转入玉米中,达到了减少木质素的目的。与正常植株相比,转基因植株中 OMT 的活性显著降低,一些植株甚至降低了 60%。被调控的转基因植株中茎干木质素含量平均降低了 20%,叶子木质素含量平均降低了 12%;若以整株植物计算,木质素含量平均降低了 17%,最大降幅为 31%。转基因植株的可消化性得到明显改善:叶子增加 2%,茎干增加 7%,也就是说整株植物的可消化性从 72%增加到 76%。

Raddy 等(2005)在对苜蓿的 3 种特异的细胞色素 P450 氧化酶(C3H、C4H、F5H)进行反义调节,获得的转基因苜蓿在木质素含量和组成上均发生变化,反刍动物消化率与木质素含量具有很强的负相关性,而与木质素单体组成无关。美国牛奶和饲料研究中心估测,如果通过基因工程将饲料的消化率提高 10%,美国每年的牛奶产值 3.5 亿美元,每年少施价值 280 万美元的肥料。这对中国的饲料生产将也具有重要影响。

#### 5 问题与对策

木质素生物合成是多基因控制,同时还受外界环境和发育时期影响,因此木质素的合成过程比人们预想的复杂,其中可能还涉及及其它一些未知的酶及基因,有些酶在植物体内的确切功能还不很清楚。因此需要利用现代生物技术方法和不断发展的试验技术,寻找新基因,为植物的综合利用提供依据。在对木质素合成酶基因的下调调节会造成的木质素含量的减少,降低了植物的支持作用,可能造成作物倒伏。一些多年生品种寿命降低与一定遗传背景的木质素代谢有关基因与低木质素作物生长环境之间确实存在相互作用,但是有事实证明在一些品系中木质素含量虽然下降了,对植物整体没有任何损害(Pedersen,2005)。Casler 等(2002)在利用基因工程使木质素含量降低或可消化性增加的鸭茅(*Dactylis glomerata* L.)、无芒雀麦(*Bromus inermis*)、柳枝稷(*Panicum virgatum* L.)和苜蓿(*Medicago sativa* L.)的试验中发现,4 个品种中有 2 个冬季死亡率增加,1 个品种生物量下降。同时试验表明这些表面上的遗传相关性可能是暂时的。将木质素降低基因和大量遗传背景一起考虑,以发现一个最适组合,获得一个农业系统的真实评价值。所以通过基因工程改变木质素含量或组成应在用于牲畜、造纸

或生物能生产前对其生长环境下进行适合度评估。

我国是一个畜牧业大国,每年对饲料的需求量很大,如何充分利用农作物秸秆、提高草料消化性是摆在人们面前的一个主要任务,综合上述内容可以看出,通过基因工程降低植物细胞木质素含量以提高饲料的消化性和利用率,将是一个十分行之有效的方法。希望国家应加大这方面的投入,尽快将有关科研成果转化为生产力,为我国畜牧业的发展提供有力的保障。

#### 参考文献

- [1] 陈翠微,刘长江. 利用白腐真菌提高秸秆利用率[J]. 中国农业科技导报, 2001, 3(3): 53-56.
- [2] 江凌,吴海珍,韦朝海,等. 白腐菌降解木质素酶系的特征及其应用[J]. 化工进展, 2007, 26(2): 198-203.
- [3] 薛永常,李金花,张绮纹,等. 木质素单体生物合成途径及其修订[J]. 林业科学, 2003, 39(6): 146-153.
- [4] 郁红艳,曾光明,牛承岗,等. 细菌降解木质素的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2005, 28(2): 104-109.
- [5] 赵华燕,魏建华,宋艳茹. 木质素生物合成及其基因工程研究进展[J]. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30(4): 361-370.
- [6] Abdulrazzak Nawroz, Pollet Brigitte, Jurgen Ehling, et al. A coumaroyl-ester-3-hydroxylase Insertion Mutant Reveals the Existence of Nonredundant meta-Hydroxylation Pathways and Essential Roles for Phenolic Precursors in Cell Expansion and Plant Growth[J]. Plant Physiology, 2006, 140: 30-48.
- [7] Barrière Yves, Guillet Carine, Goffner Deborah, et al. Genetic variation and breeding strategies for improved cell wall digestibility in annual forage crops[J]. Areview. Anim. Res., 2003, 52: 193-228.
- [8] Boerjan W., Ralph, J. Baucher, M. Lignin Biosynthesis [J]. Ann. Rev. Plant Biol., 2003, 54: 519-546.
- [9] Buxton DR, Redfearn DD. Plant limitations to fiber digestion and utilization[J]. J. Nutr., 1997, 127: 814-818.
- [10] Casler M. D., Buxton D. R., Vogel K. P. Genetic modification of lignin concentration affects fitness of perennial herbaceous plants[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 127-131.
- [11] Chen L, Auh C-K, Dowling P, et al. Improved forage digestibility of tall fescue (*Festuca arundinacea*) by transgenic down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase[J]. Plant Biotechnology Journal, 2003(1): 437-449.
- [12] Douglas C. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees[J]. Trends in Plant Science, 1996(1): 171-178.
- [13] Elkind Y., Edwards R., Mavandad M., et al. Abnormal Plant Development and Down-regulation of Phenylpropanoid Biosynthesis in Transgenic Tobacco Containing a Heterologous Phenylalanine Ammonia-lyase Gene[J]. PNAS, 1999, 87: 9 057-9 061.
- [14] Hatfield RD, Ralph J, Grabber JH. Cell wall structural foundations: molecular basis for improving forage digestibilities [J]. Crop Science, 1999, 39(1): 27-37.
- [15] He Xu, Hall Mary Beth, Gallo-Meagher Maria, et al. Improvement of forage quality by downregulation of maize O-Methyltransferase[J]. Crop Sci., 2003, 43: 2 240-2 251.
- [16] Hoffmann Laurent, Besseau Sebastien, Geoffroy Pierrett, et al. Silencing of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Shikimate/Quinate Hydroxycinnamoyltransferase Affects Phenylpropanoid Biosynthesis[J]. The Plant Cell, 2004, 16: 1 446-1 465.
- [17] Hoffmann Laurent, Maury Stephane, Martz Françoise, et al. Purification, Cloning, and Properties of an Acyltransferase Controlling Shikimate and Quinate Ester Intermediates in Phenylpropanoid Metabolism[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(1): 95-103.
- [18] Jung HG, Vogel KP. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material[J]. J Anim Sci, 1986, 62(6): 1 703-1 712.
- [19] Lee D., Meyer K., Chapple C., et al. Antisense suppression of 4-coumarate:coenzyme A ligase activity in Arabidopsis leads to altered lignin subunit composition[J]. The Plant Cell, 1997, 9: 1 985-1 998.
- [20] Meyermans H., Morreel K., Lapierre C.. Modifications in Lignin and Accumulation of Phenolic Glucosides in Poplar Xylem upon Down-regulation of Caffeoyl-Coenzyme A O-Methyltransferase, an Enzyme Involved in Lignin Biosynthesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275 (47) : 36 899-36 909.
- [21] Pedersen J. F., Vogel K. P., Funnell D. L. Impact of reduced lignin on plant fitness[J]. Crop Sci., 2005, 45: 812-819.
- [22] Pilate G., Guiney E., Holt K., et al. Field and pulping performances of transgenic trees with altered Lignification [J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 607-612.
- [23] Pillionel C., Mulder M.M., Boon J.J., et al. Involvement of cinnamyl-alcohol dehydrogenase in the control of lignin formation in Sorghum bicolor L[J]. Moench. Planta., 1991, 185: 538-544.
- [24] Ralph John, Akiyama Takuya, Kim Hoon, et al. Effects of Coumarate 3-Hydroxylase Down-regulation on Lignin Structure[J]. The Journal of Biological Chemistry., 2006, 281(13): 8 843-8 853.
- [25] Reddy M. S. Srinivasa, Chen Fang, Shadle Gail, et al. Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. PNAS, 2005, 102 (46): 16 573-16 578.
- [26] Rogers LA. Campbell MM. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development [J]. New Phytologist, 2004, 164: 17-30.
- [27] Schoch G, Goepfert S, Morant M, et al. CYP98A3 from Arabidopsis thaliana Is a 3-Hydroxylase of Phenolic Esters, a Missing Link in the Phenylpropanoid Pathway[J]. The Journal of Biological Chemistry., 2001, 276(39): 36 566-36 574.
- [28] Shadle Gail, Chen Fang, Reddy M S Srinivasa, et al. Down-regulation of hydroxycinnamoyl CoA: Shikimate hydroxycinnamoyl transferase in transgenic alfalfa affects lignification, development and forage quality[J]. Phytochemistry., 2007, 68: 1 521-1 529.
- [29] Srinivasa Reddy M S, Chen F, Shadl G, et al. Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa[J]. PANS, 2005, 102(46) : 16 573-16 578.
- [30] Zhong R., Morrison W.H.III, Negrel J., et al. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis[J]. The Plant Cell, 1998, 10(12) : 2 033-2 045.
- [31] Zhong R.Q., Morrison W.H., Himmelsbach D.S., et al. Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants[J]. Plant Physiology, 2000, 124(2): 563-578.

(编辑:沈桂宇, [guiyush@126.com](mailto:guiyush@126.com))

# 沙棘提取物对断奶仔猪生长和脂肪代谢的影响

刘长伟 李 焱 左金国 金赛勉 石艳丽

**摘要** 试验选用(28±2)日龄东北民猪和“长×大”二元杂交断奶仔猪各24头,分别随机分为两个处理组,每组3个重复,每个重复4头猪(公母各半)。试验组添加1 000 mg/kg沙棘提取物,研究沙棘提取物对断奶仔猪生产性能和脂肪代谢的影响。结果表明:①沙棘提取物对东北民猪和“长×大”猪平均日增重和料重比的影响不显著( $P>0.05$ );②沙棘提取物提高了民猪试验组血清GH水平,降低了民猪试验组的血清TC、LDL、HDL含量和“长×大”猪血清INS水平。

**关键词** 沙棘提取物;断奶仔猪;生产性能;脂肪代谢

中图分类号 S816.7

沙棘(*Hippophae Rhamnoides* L)系胡颓子科植物,果实和叶子中含有维生素、有机酸、单糖、黄酮类、脂肪酸以及蛋白质和微量元素等,其中黄酮为主要的活性成分(中国药典委员会,2000)。试验证明沙棘黄酮是治疗高血脂症(刘海军等,2000)、高血糖(Crundy SM,1986),抑制血小板凝聚(浙江省药品标准,1994)等疾病的纯天然药物。目前国内外对沙棘果实的研究已经趋于成熟,但对沙棘叶的开发利用还较少。我国沙棘资源丰富,提取沙棘叶中的黄酮类物质作为饲料添加剂有很大的开发前景。仔猪断奶时自身的生长发育不健全,加上环境、饲料等改变所引起的断奶应激,猪只常表现为生长迟缓、免疫力低下、腹泻或水肿。本试验研究沙棘提取物对早期断奶仔猪生产性能和脂肪代谢的影响,并对其机理进行探讨。

## 1 材料与试验方法

### 1.1 试验动物与管理

选择(28±2)日龄纯种东北民猪(以下简称民猪)和“长×大”二元杂交猪(以下简称长×大)断奶仔猪各24头,平均断奶体重分别为(7.44±1.09) kg和(6.37±0.76) kg,按体重和性别分别随机分为两个处理组,每组3个重复,每个重复4头猪,公母各半,均为去势猪。

饲养栏舍为半封闭高床、漏缝地板式猪舍,猪只自由采食,自动饮水器供水。正式试验开始前预饲2 d,采用对照组饲料,观察淘汰不吃食猪只。正式试验期为28 d,按照常规饲养操作规程进行免疫和饲养。

刘长伟,东北农业大学动物科学学院,150030,哈尔滨香坊区木材街59号东北农大307号信箱。

李焱(通讯作者)、左金国、金赛勉、石艳丽,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2008-01-14

### 1.2 试验设计与饲粮

沙棘提取物中主要活性物质为沙棘总黄酮(Total Flavones of Sea buckthorn),含量≥92.8%。

4个处理组分别为民猪试验组(添加1 000 mg/kg沙棘提取物),民猪对照组;“长×大”试验组(添加1 000 mg/kg沙棘提取物)、“长×大”对照组。各组饲料均加工为粉料,基础饲粮配方及营养水平见表1。

表1 基础饲粮配方及营养水平

原料	比例(%)	营养水平	
玉米	65.50	消化能(MJ/kg)	13.82
豆粕	28.00	粗蛋白质(%)	20.31
鱼粉	2.00	赖氨酸(%)	1.28
乳清粉	2.00	蛋-胱氨酸(%)	0.65
磷酸氢钙	0.80	苏氨酸(%)	0.73
石粉	0.90	钙(%)	0.75
食盐	0.27	有效磷(%)	0.37
微量元素	0.02		
仔猪多维	0.05		
赖氨酸	0.23		
胆碱	0.05		
合计	100		

注:微量元素和仔猪多维向每千克饲粮中提供VA 1 500 IU、VD<sub>3</sub> 200 IU、VE 10 IU、VK 0.5 mg、VB<sub>12</sub> 0.01 mg、生物素0.15 mg、叶酸0.55 mg、尼克酸30 mg、泛酸10 mg、吡哆醇3.5 mg、核黄素3.6 mg、硫胺素1.8 mg、铜8 mg、碘0.35 mg、铁80 mg、锰60 mg、硒0.15 mg、锌40 mg。

### 1.3 测定指标

#### 1.3.1 生产性能指标

分别于试验开始、第7、14、21、28 d及试验结束时,仔猪空腹16 h后于次日上午个体称重,记录各阶段耗料量,计算各阶段的平均日增重、平均采食量、料重比。

#### 1.3.2 脂肪代谢指标

分别于试验第7、14、21、28 d从每个重复中取2头仔猪前腔静脉采血10 ml,分离制血清;试验结束时每个重复屠宰2头仔猪,取肝脏称重并放入液氮中速

冻,转入-70℃冰箱中保存。采用南京建成生物工程研究所生产试剂盒及方法,分别测定血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)的含量和肝脏中苹果酸脱氢酶(MDH)、肝脂酶(HL)、脂蛋白脂酶(LPL)、碱性磷酸酶(AKP)、乳酸脱氢酶(LDH)的活性。

#### 1.4 统计分析

试验数据采用 SAS6.12 软件中的 (GLM) 过程进行统计分析,用邓肯氏法进行多重比较,试验数据采用平均值±标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 对仔猪生产性能的影响(见表 2)

表 2 沙棘提取物对不同品种断奶仔猪生长性能的影响

品种	组别	平均日采食量(g)	平均日增重(g)	料重比
民猪	对照组	634.76±50.94 <sup>Ab</sup>	246.16±68.59 <sup>A</sup>	2.59±0.19 <sup>A</sup>
	试验组	490.39±33.26 <sup>Ab</sup>	213.55±68.12 <sup>A</sup>	2.28±0.68 <sup>AB</sup>
长×大	对照组	742.58±48.83 <sup>B</sup>	384.44±65.85 <sup>B</sup>	1.92±0.12 <sup>B</sup>
	试验组	665.47±27.11 <sup>B</sup>	365.40±82.53 <sup>B</sup>	1.82±0.04 <sup>B</sup>

注:同列数据肩标小写字母不同表示差异显著(P<0.05),大写字母不同表示差异极显著(P<0.01)。下表同。

由表 2 可见,民猪对照组采食量显著高于试验组(P<0.05),日增重和料重比均无差异(P>0.05);长×大猪对照组采食量、日增重、料重比与试验组相比差异不显著(P>0.05)。

### 2.2 对仔猪肝脏脂肪酶的影响(见表 3)

表 3 沙棘提取物对不同品种断奶仔猪肝脏脂肪酶的影响

品种	组别	肝脂酶(U/mg)	脂蛋白脂酶(U/mg)	碱性磷酸酶(U/g)	乳酸脱氢酶(U/g)	苹果酸脱氢酶(U/mg)
民猪	对照组	0.45±0.17	0.39±0.13	8.41±2.01 <sup>b</sup>	664.88±298.70	0.62±0.05
	试验组	0.61±0.13	0.48±0.11	8.09±2.33 <sup>b</sup>	768.22±190.58	0.64±0.09
长×大	对照组	0.65±0.18	0.50±0.09	5.17±1.81 <sup>a</sup>	887.79±88.28	0.69±0.18
	试验组	0.49±0.14	0.37±0.14	5.73±1.25 <sup>a</sup>	689.61±277.07	0.63±0.11

由表 3 可知,民猪肝脏的脂肪酶试验组与对照组之间无显著差异(P>0.05),长×大猪肝脏的脂肪酶试验组与对照组之间无显著差异(P>0.05);两个猪种间

比较,民猪各组肝脏碱性磷酸酶含量显著高于“长×大”各组(P<0.05),其它指标无显著差异。

### 2.3 对仔猪血清中血脂及激素含量的影响(见表 4)

表 4 沙棘提取物对不同品种仔猪血清中血脂及激素含量的影响

品种	组别	甘油三酯(mmol/l)	总胆固醇(mmol/l)	低密度脂蛋白(mmol/l)	高密度脂蛋白(mmol/l)	生长激素(GH)(ng/ml)	胰岛素(INS)(ng/ml)
民猪(7 d)	对照组	0.47±0.18 <sup>a</sup>	1.70±0.30 <sup>b</sup>	1.09±0.21 <sup>b</sup>	0.87±0.19 <sup>b</sup>	0.58±0.28 <sup>a</sup>	21.15±6.77
	试验组	0.32±0.10 <sup>a</sup>	1.39±0.09 <sup>a</sup>	0.87±0.05 <sup>a</sup>	0.67±0.10 <sup>a</sup>	0.73±0.24 <sup>a</sup>	35.90±21.15
长×大(7 d)	对照组	0.72±0.18 <sup>b</sup>	1.57±0.29 <sup>b</sup>	1.01±0.21 <sup>b</sup>	0.72±0.20 <sup>b</sup>	0.36±0.13 <sup>b</sup>	32.87±13.53 <sup>a</sup>
	试验组	0.70±0.22 <sup>b</sup>	1.75±0.26 <sup>b</sup>	1.14±0.15 <sup>b</sup>	0.90±0.11 <sup>b</sup>	0.63±0.20 <sup>b</sup>	15.94±4.86 <sup>b</sup>
民猪(14 d)	对照组	0.32±0.11 <sup>a</sup>	1.75±0.25	1.20±0.16	0.99±0.13 <sup>b</sup>	0.90±0.30 <sup>a</sup>	16.14±9.38
	试验组	0.35±0.11 <sup>a</sup>	1.60±0.26	1.11±0.20	0.73±0.09 <sup>a</sup>	1.93±0.34 <sup>b</sup>	15.03±4.05
长×大(14 d)	对照组	0.84±0.05 <sup>b</sup>	1.82±0.28	1.30±0.26	0.75±0.14 <sup>a</sup>	0.87±0.32 <sup>a</sup>	12.99±1.99
	试验组	0.98±0.36 <sup>b</sup>	1.77±0.25	1.26±0.18	0.88±0.19 <sup>a</sup>	0.72±0.22 <sup>a</sup>	12.59±7.58
民猪(21 d)	对照组	0.42±0.16 <sup>a</sup>	1.84±0.27	1.27±0.17	0.99±0.29	1.03±0.28 <sup>a</sup>	15.57±8.98
	试验组	0.42±0.15 <sup>a</sup>	1.58±0.24	1.09±0.15	0.76±0.13	1.42±0.52 <sup>a</sup>	17.67±6.05
长×大(21 d)	对照组	1.13±0.50 <sup>b</sup>	2.09±0.24 <sup>b</sup>	1.39±0.18	0.93±0.17	0.23±0.13 <sup>b</sup>	12.00±3.40
	试验组	0.77±0.37 <sup>b</sup>	1.69±0.20 <sup>a</sup>	1.20±0.13	0.90±0.11	0.27±0.12 <sup>b</sup>	11.48±8.03
民猪(28 d)	对照组	0.35±0.09 <sup>a</sup>	1.66±0.12	1.11±0.07	1.06±0.15 <sup>b</sup>	0.21±0.15	14.64±8.86
	试验组	0.38±0.15 <sup>a</sup>	1.62±0.16	1.09±0.12	0.84±0.12 <sup>a</sup>	0.30±0.09	15.39±3.57
长×大(28 d)	对照组	0.73±0.20 <sup>b</sup>	1.67±0.21	1.21±0.24	0.88±0.15	0.26±0.14	17.26±3.04 <sup>a</sup>
	试验组	0.91±0.40 <sup>b</sup>	1.81±0.24	1.18±0.16	0.94±0.15	0.31±0.13	11.87±4.19 <sup>b</sup>

由表 4 可知,与对照组相比,民猪的血清 TG 在各周差异不显著,7 d 时试验组的血清 TC、LDL、HDL 显著低于对照组(P<0.05);14 d 时试验组的血清 HDL 显著低于对照组(P<0.01);28 d 试验组血清 HDL 显著低

于对照组(P<0.05),其它各周差异均不显著(P>0.05)。“长×大”猪试验组与对照组相比,各周血清 TG、LDL、HDL 均无显著差异(P>0.05);21 d 时试验组血清 TC 显著低于对照组(P<0.05)。

血清 GH 水平民猪组每周试验组均大于对照组,在 14 d 时,试验组 GH 显著高于对照组( $P<0.05$ );“长×大”猪各周差异不显著( $P>0.05$ );血清胰岛素(INS)水平“长×大”猪各周试验组均小于对照组,在 7 d 和 28 d 时试验组显著低于对照组( $P<0.05$ ),民猪各周差异不显著( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 沙棘提取物对仔猪生产性能的影响

王建国(1989)研究沙棘叶对断奶仔猪增重的试验表明,在日粮中添加 2%的沙棘叶,试验组猪日增重比对照组提高 36~39 g,增重率提高 15.37%~7.60%;饲料转化率提高 1.83%~7.60%。刘绪川(1989)研究证明,沙棘叶及沙棘制品残渣作为补充饲料,对各种畜禽的生产性能具有不同程度的促进作用。断奶仔猪添加 2%的沙棘叶或 4%的沙棘果核渣,可提高增重 9.38%~21.27%。杜汉君(2005)研究表明,用沙棘嫩枝叶作为饲料饲喂鸡和羊,其中鸡的产蛋率和羊的日增重均显著优于常规饲料。本试验研究发现,沙棘提取物对民猪和“长×大”猪平均日增重、饲料转化率均无显著影响。这与以上报道不一致。

#### 3.2 沙棘提取物对仔猪脂肪代谢的影响

经研究表明,沙棘对动物的脂肪代谢有明显的影响(于云等,2002;贾冬舒,2002;高秀梅等,1997;杨现艳等,2006)。本试验结果表明,添加沙棘提取物提高了民猪试验组血清 GH 的浓度,而 GH 具有调节动物代谢,并将吸收的营养物质朝着有利于肌肉组织增长的方向进行的作用,其对脂肪代谢具有双重效应(杨凤,2000;金邦凤等,2001)。民猪试验组 GH 含量升高,血清 TC、LDL、HDL 的含量降低,从而使脂肪沉积减少,由于葡萄糖转运和脂肪合成明显减少,脂肪分解基本不受影响。沙棘提取物降低了“长×大”猪试验组血清 INS 水平,INS 对促进合成代谢的作用以对脂肪组织的作用最强,主要表现在刺激葡萄糖吸收、脂肪合成和抑制脂解几方面(Yin, D 等,1998)。“长×大”猪试验组血清 INS 水平降低,减少了脂肪的合成和对脂肪分解的抑制。沙棘提取物对两个不同品种仔猪均有不同程度减少脂肪沉积的调节作用。在各组采食量和日增重没有明显差异的情况下,这可排除沙棘提取物降低血脂和脂肪沉积是由于其摄食下降(相对脂肪摄入减少)和体重降低致使体内脂质下降的推论。

沙棘提取物通过激素的作用影响脂肪的合成和分解代谢,有效地调解动物的脂肪代谢,降低了血清 TC、LDL、HDL 的含量。沙棘提取物中的活性物质调节脂肪代谢的具体机制有待进一步研究。

### 4 小结

综上所述,通过在仔猪生长的过程中添加 1 000 mg/kg 沙棘提取物,对两个不同品种仔猪均有不同程度减少脂肪沉积的调节作用,且不影响仔猪生产性能。

#### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:化学工业出版社,2000.
- [2] 刘军海,崔庆新,程霜.牛蒡籽油理化特性及脂肪酸组成的研究[J].中国油脂,2000,25(2):51-52.
- [3] Crundy SM. Comparison of monounsaturated fatty acid and carbohydrates for lowering plasma cholesterol [J].N Engl J Med, 1986,314:745.
- [4] 浙江省卫生厅编.浙江省药品标准[M].杭州:浙江科学技术出版社,1994.
- [5] 王建国.沙棘叶与果核渣对断奶仔猪的增重试验[J],甘肃畜牧兽医,1989(6):14.
- [6] 刘绪川.沙棘叶及沙棘渣毒理学试验和对畜禽生产性能的影响[J].沙棘,1989,2(3):27-29.
- [7] 杜汉君.沙棘配合饲料研制与饲喂效果分析[J].沙棘,2005,18(4):24-28.
- [8] 于云,曲树明,何跃生.沙棘叶提取物的调血脂作用[J].中草药,2002,33(9):824-825.
- [9] 贾冬舒.沙棘米醋对高脂血症动物模型降低血脂的研究[J].吉林农业大学学报,2002,24(6):72-74.
- [10] 高秀梅,张伯礼,徐宗佩,等.沙棘油降脂作用实验研究[J].天津中医,1997,14(4):173-174.
- [11] 杨现艳,瞿伟菁,徐自良,等.沙棘籽渣黄酮对更年期大鼠血脂及体内抗氧化系统的影响[J].中国中药杂志,2006,31(13):1109-1112.
- [12] 杨凤.动物营养学(第二版)[M].北京农业出版社,2000:153-155.
- [13] 金邦荃,陈杰.动物脂肪代谢与控制[J].动物科学与动物医学,2001,18(6):9-11.
- [14] Yin, D., S. D. Clarke, J. L. Peters, et al. Somatotropin-dependent decreases in fatty acid synthase abundance in 3T3-F422A adipocytes is the result of a decrease in both gene transcription and mRNA stability[J]. Biochem., 1998,331(3):815-820.

(编辑:王芳,xfang2005@163.com)

# 枯草芽孢杆菌制剂对肉鹅早期生长和养分存留的影响

谭荣炳 师昆景 吴灵英

**摘要** 试验旨在研究枯草芽孢杆菌制剂(DBSC)替代抗生素对肉鹅早期的促生长作用。选用1日龄杂交商品雏白鹅96只,随机分为4个处理组,每个处理4个重复,分别饲喂基础日粮、黄霉素(5 g/t)日粮、DBSC(250 g/t)日粮和DBSC(500 g/t)日粮。试验期28 d,每隔2周统计其生产性能。在第26~28 d内,连续3 d收集排泄物,用以测定日粮干物质和能量的存留率,结果显示,与空白对照相比,日粮中添加250 g/t DBSC对肉鹅的促生长效果与黄霉素组相当( $P>0.05$ );继续增加DBSC的添加量无促生长效果( $P>0.05$ );DBSC添加效果可能与改善日粮干物质和能量的存留率有关。

**关键词** 枯草芽孢杆菌制剂;生长性能;养分存留率;肉鹅

**中图分类号** S835

在抗生素饲料添加剂替代品的研究中,益生菌制剂显示了强大的优势和开发前景(Fuller,1989;Griggs等,2005;Yu等,2007)<sup>[1-3]</sup>。其中芽孢杆菌制剂在人和动物肠道疾病的防治中均取得了较好疗效,应用的菌株主要为枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌等。芽孢杆菌制剂的菌体主要以芽孢的形式存在,菌剂具有耐热、抗干燥等优点,便于运输和使用<sup>[4]</sup>。

目前,枯草芽孢杆菌制剂在猪、鸡、牛和水产动物上的研究报道较多(潘康成等,2005;戴荣国等,2005;刘波等,2004)<sup>[4-6]</sup>,但在肉鹅的应用上不多见。近年来我国养鹅业飞速发展,大规模集约化养殖将是必然趋势,如何在舍饲条件下保持放牧条件的鹅肉的绿色无公害特性,又能使鹅快速生长,是研究者面临的新课题。

本试验选用我国已批准使用的天然、经济的绿色饲料添加剂产品——枯草芽孢杆菌制剂(Dried Bacillus subtilis Culture, DBSC),探讨其替代抗生素对肉鹅的促生长作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验肉鹅及分组

选用1日龄杂交商品雏白鹅(皖西白鹅×川府白鹅)96只,随机分为空白对照组(基础日粮)、阳性对照

组(添加黄霉素5 g/t)、试验I组(添加枯草芽孢杆菌制剂250 g/t)和试验II组(添加枯草芽孢杆菌制剂500 g/t)4个处理组,每个处理组4个重复,每个重复6只雏鹅。

#### 1.1.2 试验日粮与管理

基础日粮配方及营养水平见表1。试验鹅以每个重复为单位离地单层笼养,分别于5日龄和10日龄进行小鹅瘟高免血清免疫,其它管理照常进行。

表1 基础日粮配方与营养水平

项目	0~14 d	14~28 d
组成(%)		
黄玉米	34	14
稻谷	30	50
大豆粕	28	28
鱼粉	3	3
大豆油	2	2
食盐	0.4	0.4
石灰石粉	1.0	1.0
磷酸氢钙	1.0	1.0
DL-甲硫氨酸(98%)	0.1	0.1
氯化胆碱(50%)	0.1	0.1
矿维预混料(禽用)	0.4	0.4
合计	100	100
营养水平		
代谢能(MJ/kg)	11.71	11.25
粗蛋白(%)	20.65	20.47
粗纤维(%)	4.14	5.46
钙(%)	0.81	0.81
总磷(%)	0.65	0.67

注:矿维预混料向每千克饲料添加Fe 40 mg、Cu 8 mg、Mn 80 mg、Zn 60 mg、I 1 mg、Se 0.3 mg、VA 10 000 IU、VD<sub>3</sub> 1 500 IU、VE 10 mg、VK<sub>3</sub> 3 mg、VB<sub>1</sub> 2 mg、VB<sub>2</sub> 5 mg、VB<sub>6</sub> 3 mg、VB<sub>12</sub> 0.05 mg、烟酸 50 mg、生物素 0.10 mg、叶酸 1 mg、泛酸 15 mg。

#### 1.1.3 枯草芽孢杆菌制剂

枯草芽孢杆菌制剂:市场购买,经测定其活菌含量均为 $2 \times 10^{10}$  CFU/g。

谭荣炳,武汉工业学院饲料科学系,430023,湖北省武汉市常青花园中环西路特一号。

师昆景、吴灵英(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-12-17

★ 湖北省教育厅科研计划项目(2004D013),湖北省科技攻关项目(2006AA201B03)

1.2 方法

1.2.1 生产性能试验

分别于 14 日龄和 28 日龄早晨 8 点称重,称重前 12 h 撤料,不停水。以重复组为单位详细记录每阶段饲料消耗量,计算平均体重(ABW)、平均日增重(ADG)、平均日采食量(ADFI)和料重比(F/G)。

1.2.2 消化性能试验

试验第 26~28 d,除试验 II 组外,以重复为单位连续收集 3 d 排泄物,60~65 °C 烘干,制成风干样,分析排泄物和对应日粮中干物质和能量含量,用 4 N 盐酸不溶灰分内源指示剂法测定日粮干物质和能量的存留率。

1.3 统计分析

试验数据应用 SAS 软件包中的 ANOVA 过程进行方差分析,差异显著时采用 Duncan's 方法进行多重比较。

2 试验结果

2.1 对肉鹅早期生长性能的影响(见表 2)

表 2 枯草芽孢杆菌制剂对肉鹅早期生长性能的影响

项目	对照组	黄霉素组	试验 I 组	试验 II 组
ABW(g)				
14 d	622.4±84.0 <sup>ab</sup>	661.5±55.8 <sup>a</sup>	660.5±52.5 <sup>a</sup>	617.7±77.5 <sup>b</sup>
28 d	1 460.0±155.3 <sup>b</sup>	1 513.0±91.5 <sup>ab</sup>	1 560.0±128.4 <sup>a</sup>	1 429.0±187.9 <sup>b</sup>
ADG(g)				
0~14 d	43.4±2.3	46.3±3.2	46.2±2.0	42.7±2.0
14~28 d	59.8±2.0	60.8±2.2	64.3±4.3	58.0±4.2
0~28 d	52.3±1.6	54.1±1.1	55.9±2.9	50.9±2.6
ADFI(g)				
0~14 d	78.0±2.2	81.9±4.2	76.5±3.1	75.3±2.9
14~28 d	150.0±7.6 <sup>a</sup>	150.2±1.3 <sup>a</sup>	142.8±3.6 <sup>b</sup>	149.4±0.7 <sup>a</sup>
0~28 d	116.8±3.6 <sup>a</sup>	118.7±2.0 <sup>a</sup>	112.2±3.0 <sup>b</sup>	115.2±1.4 <sup>ab</sup>
F/G				
0~14 d	1.80±0.07 <sup>A</sup>	1.77±0.05 <sup>A</sup>	1.66±0.01 <sup>B</sup>	1.76±0.04 <sup>A</sup>
14~28 d	2.51±0.13 <sup>a</sup>	2.47±0.07 <sup>a</sup>	2.23±0.13 <sup>b</sup>	2.59±0.19 <sup>a</sup>
0~28 d	2.24±0.11 <sup>A</sup>	2.19±0.03 <sup>AB</sup>	2.01±0.08 <sup>B</sup>	2.27±0.11 <sup>A</sup>

注:表中同行数据小写字母不同表示差异显著(P<0.05),大写字母不同表示差异极显著(P<0.01)。下同。

表 2 可见,第 14 日龄时,4 个处理组的 ABW 值有不同程度差异,黄霉素组和试验 I 组的 ABW 较大,试验 II 组最小,而对照组处在中间水平,试验 II 组与黄霉素组和试验 I 组差异显著(P<0.05)。到 28 日龄时,4 个处理组的 ABW 值亦有差异,试验 I 组的 ABW 显著高于对照组和试验 II 组(P<0.05),而与黄霉素组无显著差异(P>0.05),试验 I 组比对照组的 ABW 提高 6.8%。

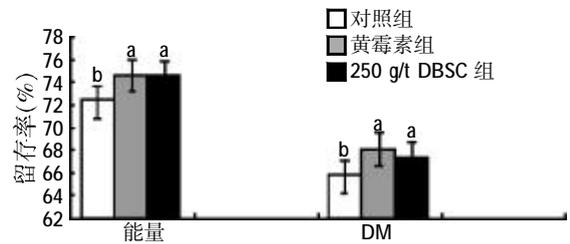
DBSC 的添加对 ADG 没显示显著的影响(P>0.05),

但可以看出各组之间有与 ABW 相似的变化趋势。

在试验的前两周内,各组肉鹅的采食量基本相似(P>0.05),但在 14 至 28 日龄期间,试验 I 组的 ADFI 显著比其它各组低(P<0.05)。整个试验期内(0~28 d),试验 I 组的 ADFI 亦最低,比对照组显著(P<0.05)降低 3.9%。

肉鹅在 0~14 d 期间,试验 I 组的料重比极显著低于其它各组(P<0.01),且在 14~28 d 期间,试验 I 组的 F/G 亦比其它各组低(P<0.05)。整个试验期内,试验 I 组的 F/G 比对照组低 10.27%(P<0.01)。

2.2 对肉鹅养分存留率的影响(见图 1)



注:图中标有相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著。

图 1 枯草芽孢杆菌制剂对肉鹅日粮干物质和能量存留率的影响

黄霉素和 DBSC 对干物质和能量的存留率的影响见图 1。在肉鹅早期基础日粮中添加黄霉素和枯草芽孢杆菌制剂(250 g/t),提高干物质存留率达 3.42% 和 2.42%(P<0.05),显著提高能量存留率 2.97% 和 2.96%(P<0.05)。

3 讨论

3.1 DBSC 对肉鹅生长性能的影响

从本试验结果可以看出,饲料中添加适宜剂量的枯草芽孢杆菌制剂(250 g/t)可以提高肉鹅 14 日龄和 28 日龄的平均体重,降低各阶段料重比,增重效果与抗生素相当,此结果与前人在肉鸡和仔猪上的试验结果基本一致。王洪燕(2005)<sup>[7]</sup>用地衣芽孢杆菌制剂饲喂肉仔鸡,结果表明,在 0~21 日龄阶段可以提高肉仔鸡的平均日增重、平均体重(P<0.01),与抗生素相比,地衣芽孢杆菌活菌含量为 10<sup>9</sup> CFU/kg 时,有提高日增重的趋势,但差异不显著;戴荣国等(2005)<sup>[8]</sup>报道,仔猪基础日粮中添加蜡样芽孢杆菌后,料重比显著降低。

饲料中添加芽孢杆菌降低 0~14、14~28 和 0~28 日龄肉鹅的采食量,与前人研究结果不尽一致。有研究结果指出,饲料中添加益生菌,饲料采食量显著提

高<sup>[9]</sup>。而 Yu 等(2007)<sup>[9]</sup>研究显示,肉鸡 0~6 周龄日粮中添加益生菌(*L. reuteri* Pg4)能显著降低采食量,且饲料效率提高 5%。造成结果不一致的原因可能与日粮组成和营养水平、动物的种类和年龄、饲养环境条件、益生菌的用量等因素有关。

在本试验中,高剂量芽孢杆菌处理组对鹅只生长性能的改善作用并不明显,与 L Xu 等(2006)<sup>[8]</sup>的研究结果吻合。滑静等(2003)<sup>[9]</sup>亦得出类似的研究结果:在肉仔鸡日粮中添加 0.2%和 0.4%的枯草芽孢杆菌,平均日增重显著高于对照组( $P<0.05$ ),但 0.2%的添加量效果较好。可能的原因是过量添加时微生物过多也消耗一些能量和营养,从而影响鹅的生长;同时,微生物过多时,在抑制有害微生物的同时,也使一些有益微生物的正常生长繁殖受到影响,从而影响了微生物平衡,以至于发生肠道紊乱而影响机体生长。这一假设还要通过进一步研究证实。

### 3.2 DBSC 对肉鹅养分存留率的影响

本试验结果中,日粮中添加 DBSC 能改善养分的存留率,效果与黄霉素无显著差异。抗生素促生长的机理在于抑制有害微生物的生长繁殖,提高动物机体的抗病力和免疫功能,使动物机体处在良好的内环境中生长从而达到改善生长性能的目的。而芽孢杆菌在体内能够迅速繁殖,抑制有害微生物的生长繁殖的同时分泌多种消化酶和营养成分,保持动物机体的微生物生态平衡,使其在良好的状态下生长。

有研究表明,芽孢杆菌能产生多种酶类,促进动物对营养物的消化吸收。刘一尘(2001)<sup>[10]</sup>报道,枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌具有较强的蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性,同时还具有降解植物性饲料中复杂碳水化合物化合物的酶,如降解果胶酶、葡聚糖酶、纤维素酶等,其中很多酶是哺乳动物和禽类在体内不能合成的酶。邝哲师等(2005)<sup>[11]</sup>在断奶仔猪基础日粮中添加芽孢杆菌制剂,喂养 1 周后,试验组断奶仔猪消化道内各部位淀粉酶的活性均有所提高,其中以胰淀粉酶活性提高较快,1 周和 2 周后分别较对照组提高 20.86%和 24.05%,肠道中以空肠和回肠部位的淀粉酶活性较高,2 周后分别较对照组提高 18.40%和 20.30%。Mountzouris 等(2007)<sup>[12]</sup>报道,在肉鸡日粮中添加新筛选的益生菌,其促生长效果、饲料转化率、盲肠微生物  $\alpha$ -牛乳糖酶、 $\beta$ -牛乳糖酶活力等比对照组都显著提高( $P<0.01$ )。

本试验中,添加枯草芽孢杆菌对干物质和能量存

留率的改进,也许是采食量下降和饲料利用效率提高的直接原因,真实的结果可通过肠道微生物的分类计数和酶活分析证实。

## 4 结论

在 0~4 周龄肉鹅日粮中添加枯草芽孢杆菌制剂有良好作用,可显著提高增重速度和饲料报酬,达到与黄霉素相似的效果,改善日粮干物质和能量的存留率可能是产生作用效果的直接原因。随枯草芽孢杆菌制剂添加量的提高,效果有下降的趋势。然而,本试验是芽孢杆菌应用于肉鹅饲料的初步探讨,今后应针对芽孢杆菌对肉鹅肠道微生物构成和代谢,以及对肠道组织结构的影响等方面做深入研究。

### 参考文献

- [1] Fuller, R. Probiotics in man and animals [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1989, 66: 365-378.
- [2] Griggs, J. P., Jacob, J. P. Alternatives to Antibiotics for Organic Poultry Production[J]. *The Journal of Applied Poultry Research*, 2005, 14: 750-756.
- [3] Yu, B., Liu, J. R., Chiou, M. Y., et al. The effects of probiotic *Lactobacillus reuteri* Pg4 strain on intestinal characteristics and performance in broilers [J]. *Asian-Australasian Journal Animal Science*, 2007, 20(8): 1 243-1 251.
- [4] 潘康成,杨金龙,王振华,等.枯草芽孢杆菌制剂对肉鸡生长、胴体、鸡肉品质的影响[J].*中国饲料*, 2005(20): 11-14.
- [5] 戴荣国,曹国文,姜永康,等.不同芽孢杆菌组合对仔猪生产性能的影响[J].*营养与饲料*, 2005(8): 53-54.
- [6] 刘波,刘文斌,王恬.芽孢杆菌在水产养殖中的应用[J].*中国饲料*, 2004(21): 22-24.
- [7] 王洪燕.地衣芽孢杆菌在肉仔鸡日粮重的应用效果与作用机制[D].*中国农业大学硕士学位论文*.北京:中国农业大学,2005.
- [8] L Xu, C Ji, Q Ma, et al. Effects of a Dried *Bacillus subtilis* Culture on Egg Quality[J]. *Poultry Science*, 2006, 85: 364-368.
- [9] 滑静,郭玉琴,张淑萍,等.肉仔鸡日粮中添加枯草芽孢杆菌对平均日增重和血液生化指标的影响[J].*黑龙江畜牧兽医*, 2003(2): 4-15.
- [10] 刘一尘. 益生菌剂与益生协同剂的协同作用的研究及应用现状[J].*中国微生态制剂*, 2001, 13(3): 179-180.
- [11] 邝哲师,田兴山,张玲华,等.芽孢杆菌制剂对断奶仔猪体内消化酶活性的影响[J].*中国畜牧兽医*, 2005, 32(6): 17-18.
- [12] Mountzouris, K. C., T Sirtsikos, P., Kalamara, E., et al. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities[J]. *Poultry Science*, 2007, 86(2): 309-317.

(编辑:王 芳,xfang2005@163.com)

# 谷氨酰胺、壳聚糖及二者复合添加 对断奶仔猪生长性能和血液生化指标的影响

王 周 赵 燕 梁国旗 冯 俊 陈安国

**摘 要** 选取 192 头体重相近(平均体重为 5.27 kg)的(21±2)日龄 PIC 断奶仔猪,按胎次、公母分 4 个处理组,每组 3 个重复,每个重复 16 头。试验分两个阶段:21~35 日龄、35~49 日龄,研究谷氨酰胺、壳聚糖单独和复合添加对断奶仔猪生产性能和血液生化指标的影响。结果表明:①日粮中单独添加 1%谷氨酰胺或 0.04%壳聚糖有提高断奶仔猪日增重、降低料重比的趋势。②谷氨酰胺与壳聚糖复合添加使用在一些指标上优于单独添加,体现出一定的协同作用。

**关键词** 谷氨酰胺;壳聚糖;断奶仔猪;生长性能;血液生化指标

**中图分类号** S816.7

Effect of glutamine, chitosan and its compound on growth performance and serum biochemical Index for weaning pigs

Wang Zhou, Zhao Yan, Liang Guoqi, Feng Jun, Chen Anguo

**Abstract** 192 weaning pigs (5.27 kg; 21±2 d; PIC) were blocked by initial weight and allotted to 4 treatments, each group included three replicates of 16 weaning pigs. The study was divided into two phases(21~35 d and 35~49 d) and was conducted to determine the effects of GLN, and CS, separately or in combination, on the growth and blood biochemical indexes. The results showed: ①The adding (1%) GLN or(0.4%) CS in ration can improve ADG, GLN reduced G/F significantly in each trail period. ②The GLN combined with CS adding in ration is better than separately adding on some index.

**Key words** glutamine;chitosan;postweaned pigs;growth performance;blood biochemical indexes

谷氨酰胺是肠道细胞代谢必需的营养物质。动物受到应激或在病理状态下,谷氨酰胺在维持肠道屏障功能、增强肠道免疫功能上起重要作用;壳聚糖作为一种阳离子型食用纤维,具有多种生物活性,如抗菌、抗过敏,具有免疫功能活性以及降脂、抗癌等作用。研究表明,二者均可在不同程度上提高断奶仔猪生产性能及其免疫力,缓解断奶仔猪的应激反应,但多数试验集中在单一物质的效果研究上。因此,本试验旨在研究谷氨酰胺和壳聚糖的复合效应。试验主要考察了谷氨酰胺、壳聚糖分别在单独及复合条件下添加到仔猪日粮中,对断奶仔猪生产性能、血液生化指标的影响,并对其作用机理进行了初步探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验设计

采用双因子试验设计,试验分 2 个阶段,即断奶后 1~14 d 和断奶后 15~28 d(21±2 日龄断奶),共 4 个处理组,试验设计见表 1。

表 1 试验分组及各组谷氨酰胺、壳聚糖含量(%)

项目	谷氨酰胺	壳聚糖
对照组	0.00	0.00
试验 I 组	1.00	0.00
试验 II 组	0.00	0.04
试验 III 组	1.00	0.04

### 1.2 谷氨酰胺、壳聚糖来源

L-谷氨酰胺(L-Glutamine, GLN),购自浙江桐乡市康普达生物科技有限公司,白色,含量为 99.1%;壳聚糖(Chitosan, CS),购自济南海得贝海洋生物工程有限公司,原白色,脱乙酰度 95.6%,分子量 50 000 Da,粘度 30%,水分 7.8%。

### 1.3 试验动物及分组

试验动物选取体重相近(平均体重为 5.27 kg)的(21±2)日龄 PIC 断奶仔猪 192 头,随机分成 4 个处理,

王周,浙江大学动物科学学院陈安国工作室,310029,浙江杭州凯旋路 268 号西大楼 141 室。

赵燕,浙江温州农科院动物所。

梁国旗、冯俊、陈安国(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-12-27

每个处理设 3 个重复,每个重复 16 头猪。

#### 1.4 试验日粮

试验日粮的营养水平参照 NRC(1998)配制,基础日粮的组成及营养水平见表 2。

表 2 基础日粮成分及营养水平

日粮组成	含量(%)	营养水平	
玉米	52.42	消化能(MJ/kg)	14.21
豆粕	13.00	粗蛋白(%)	22.34
膨化大豆	12.00	钙(%)	0.82
乳清粉	15.00	磷(%)	0.68
进口鱼粉	5.00	赖氨酸(%)	1.4
食盐	0.25	苏氨酸(%)	0.86
石粉	0.85	蛋氨酸+胱氨酸(%)	0.76
赖氨酸盐酸盐	0.38		
L-蛋氨酸	0.07		
L-苏氨酸	0.03		
复合预混料	1.00		

注:复合预混料为每千克饲料提供 VA 1.75 万 IU、VD 0.25 万 IU、VE 60 mg、VK 4.5 mg、VB<sub>1</sub> 2.6 mg、VB<sub>2</sub> 8.75 mg、VB<sub>6</sub> 7 mg、VB<sub>12</sub> 0.03 mg、烟酸 35 mg、泛酸钙 13 mg、叶酸 0.85 mg、生物素 0.47 mg、胆碱 0.65 g、Cu 13.5 mg、Zn 100 mg、Fe 155 mg、Mn 100 mg、Se 0.25 mg、I 0.35 mg,参照 NRC(1998)配制。

#### 1.5 饲养管理

试验在浙江省宁波市梅湖牧业有限公司进行。整个试验期间采用常规饲养及免疫,日喂料 2 次,每次

喂料直至料槽内留有少许余料为止,自由饮水。

#### 1.6 测定指标

##### 1.6.1 生长性能指标

分别在断奶当天及断奶后 14、28 d 凌晨对断奶仔猪进行个体空腹称重(BW),并记录每个阶段的耗料量。试验结束后分别计算仔猪平均日增重(ADG)、平均日采食量(ADFI)、料重比(F/G)。

##### 1.6.2 血液生化指标

在断奶当天及断奶后 14、28 d 每个处理组选取 4 头仔猪进行前腔静脉采血,血液分装于 5 ml 离心管中,室温下倾斜自然凝固后,3 000 r/min 离心 15 min,上清液用于血液指标测定。用 CHEM-5 半自动生化分析仪测定血清中总蛋白(TP)、尿素氮(BUN)、总胆固醇(TC)、甘油三酯含量(TG),测定所用试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

#### 1.7 数据统计与处理

试验数据采用 SPSS(15.0)统计软件进行方差分析,用邓肯氏法进行多重比较。试验数据采用平均值±标准误差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 对断奶仔猪生长性能的影响(见表 3)

表 3 谷氨酰胺和壳聚糖及复合使用对断奶仔猪生长的影响

项目	仔猪日龄(d)	对照组	试验 I 组	试验 II 组	试验 III 组
BW(kg)	21	5.20±0.15	5.33±0.12	5.23±0.15	5.34±0.13
	35	8.67±0.41 <sup>a</sup>	9.17±0.31 <sup>ac</sup>	9.74±0.41 <sup>bc</sup>	9.88±0.23 <sup>bc</sup>
	49	13.84±0.57 <sup>a</sup>	15.22±0.59 <sup>ac</sup>	16.07±0.67 <sup>bc</sup>	16.41±0.60 <sup>bc</sup>
ADG(g)	21~35	245.2±18.97 <sup>Aa</sup>	275.11±14.16 <sup>ab</sup>	322.17±11.24 <sup>Bbc</sup>	325.82±14.88 <sup>Bc</sup>
	35~49	341.47±16.07 <sup>A</sup>	427.58±13.00 <sup>Ba</sup>	456.83±14.04 <sup>Ba</sup>	466.74±18.18 <sup>Ba</sup>
	21~49	316.26±15.57 <sup>Aa</sup>	356.37±11.10 <sup>b</sup>	385.76±5.92 <sup>Bbc</sup>	398.40±12.22 <sup>Bc</sup>
ADFI(g)	21~35	397.29±30.63	438.21±30.42	439.45±33.94	394.03±5.17
	35~49	674.47±17.80	718.33±22.42	699.01±23.66	779.61±14.48
	21~49	556.87±29.96	574.31±27.74	544.11±14.75	563.08±38.01
F/G	21~35	1.62±0.02 <sup>Aa</sup>	1.59±0.03 <sup>Aa</sup>	1.36±0.06 <sup>Bb</sup>	1.21±0.04 <sup>Bc</sup>
	35~49	1.98±0.06 <sup>A</sup>	1.68±0.01 <sup>Ba</sup>	1.53±0.02 <sup>Bbc</sup>	1.67±0.04 <sup>Bac</sup>
	21~49	1.76±0.01 <sup>A</sup>	1.61±0.03 <sup>B</sup>	1.41±0.02 <sup>Ca</sup>	1.46±0.03 <sup>Ca</sup>

注:同行均数肩标有相同小写字母表示两者差异不显著(P>0.05);标有不同小写字母表示差异显著(P<0.05),标有不同大写字母的表示差异极显著(P<0.01)。下表同。

由表 3 可见,在不同生长阶段,试验各组 ADG 均高于对照组。与对照组相比,21~35 日龄,壳聚糖组和复合组 ADG 均达极显著水平(P<0.01);35~49 日龄,试验各组均极显著高于对照组(P<0.01);整个生长阶段,与对照组相比,壳聚糖组和复合组达极显著水平(P<0.01),谷氨酰胺组为显著水平(P<0.05)。

21~35 日龄,与对照组相比,壳聚糖组(P<0.01)和复合组 F/G 均达极显著降低效果(P<0.01);35~49 日龄及整个试验期,试验各组均极显著低于对照组(P<0.01)。

从整个生长阶段看,各组间 ADFI 差异不显著(P>0.05)。

### 2.2 对断奶仔猪血液指标的影响(见表 4)

由表 4 可见,35 日龄时,试验各组 TP 均比对照组高,但仅复合组达到极显著水平(P<0.01);49 日龄时,血清 TP 也表现出相同趋势。试验各组 BUN 水平均低于对照组,其中复合组水平最低,35 日龄时达到显著(P<0.05)。

血清 TC 方面,35 日龄时,壳聚糖组、复合组显著

表4 谷氨酰胺和壳聚糖及复合使用对断奶仔猪血清指标的影响

项目	仔猪日龄(d)	对照组	试验Ⅰ组	试验Ⅱ组	试验Ⅲ组
TP(g/l)	35	43.65±1.34 <sup>aa</sup>	47.52±1.39 <sup>ab</sup>	47.53±1.71 <sup>ab</sup>	51.33±0.40 <sup>bb</sup>
	49	40.22±0.72 <sup>aa</sup>	45.00±2.03 <sup>ab</sup>	45.48±2.16 <sup>ab</sup>	54.13±4.73 <sup>bb</sup>
BUN(mg/l)	35	84.95±11.15 <sup>a</sup>	76.00±8.96 <sup>ab</sup>	67.31±3.06 <sup>ab</sup>	59.94±1.46 <sup>b</sup>
	49	137.44±17.81	125.91±5.12	123.57±3.35	108.06±5.67
TC(mmol/l)	35	2.14±0.20 <sup>a</sup>	1.70±0.05 <sup>ab</sup>	1.50±0.18 <sup>b</sup>	1.56±0.15 <sup>b</sup>
	49	1.66±0.57	1.51±0.21	1.32±0.51	1.36±0.24
TG(mmol/l)	35	2.05±1.17	1.75±0.22	1.67±0.19	1.74±0.21
	49	2.28±0.45	2.11±0.63	1.59±0.23	1.75±0.53

低于对照组( $P<0.05$ );49日龄时,各组间差异不显著( $P>0.05$ )。试验各组断奶仔猪血清TG水平均低于对照组,但组间无显著性差异( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 谷氨酰胺的作用

谷氨酰胺可以通过缓解断奶肠道应激促进仔猪生长。本试验中单独添加谷氨酰胺可极显著提高试验后期平均日增重( $P<0.01$ )、降低料重比,这与钱利纯(2005)<sup>[1]</sup>等报道基本一致。关于谷氨酰胺的促生长效果在断奶后哪个阶段表现更明显,报道不一<sup>[2,3]</sup>。这可能与仔猪断奶日龄,断奶后的饲料水平及断奶时仔猪的生理状况有关。

本试验中添加谷氨酰胺对提高血清总蛋白水平有一定作用,但影响不显著,这与周荣艳2006<sup>[4]</sup>报道一致;同时,在一定程度上降低了血清尿素氮浓度,可能是因为谷氨酰胺可以通过脱氨基和转氨基过程合成多种氨基酸,弥补断奶应激造成的蛋白合成能力下降等问题<sup>[5]</sup>。

#### 3.2 壳聚糖的作用

壳聚糖在断奶仔猪上的应用报道较少。赵燕等(2006)<sup>[6]</sup>报道,0.04%壳聚糖能够显著提高仔猪断奶后14~21d平均日增重和饲料转化率。本试验结果表明,0.04%壳聚糖能够缓解断奶应激,显著提高不同阶段断奶仔猪平均日增重( $P<0.01$ ),降低料肉比( $P<0.01$ )。Zhi-Ru Tang等(2005)<sup>[7]</sup>报道,饲料中添加0.025%壳聚糖,断奶后第14d,仔猪血清中的血尿氮、总胆固醇、甘油三酯水平降低( $P<0.05$ ),总蛋白含量升高( $P<0.05$ ),并且仔猪血清中的生长激素和胰岛素样生长因子显著升高。这与本试验结果存在差异,可能与壳聚糖的品质、添加量等有关。

壳聚糖能够通过改善机体能量、蛋白质、脂肪代谢,提高仔猪生产性能。壳聚糖进入机体后可作为双歧因子的前体促进双歧杆菌的生长,大大提高了饲料中乳清的利用效率,从而促进仔猪生长;另外,壳聚糖还具有健胃整肠的功效。

#### 3.3 谷氨酰胺与壳聚糖复合使用

近年来,有关谷氨酰胺、壳聚糖复合使用的研究报道并不多见。本试验研究表明,谷氨酰胺、壳聚糖复合用可显著提高各阶段的日增重、降低料肉比,对提高血清总蛋白含量,降低尿素氮、总胆固醇也有显著的作用。二者复合添加组在一些指标上优于单独添加组,体现出一定的复合作用,如21~35日龄,复合组料肉比分别比对照组、谷氨酰胺组、壳聚糖组低25.31% ( $P<0.01$ )、23.90% ( $P<0.01$ )、11.03% ( $P<0.05$ ),但其作用机理尚不清楚,有待进一步研究。

### 4 结论

① 日粮中单独添加1%谷氨酰胺或0.04%壳聚糖有提高断奶仔猪日增重、降低料重比的趋势。

② 谷氨酰胺与壳聚糖复合添加可显著提高各阶段的日增重、降低料肉比,对提高血清总蛋白含量,降低尿素氮、总胆固醇也有显著的作用。二者复合使用体现出一定的复合优势。

#### 参考文献

- [1] 钱利纯,尹兆正,郑根华,等. 谷氨酰胺对断奶仔猪生长性能的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2005, 31(5):649-653.
- [2] 杨彩梅,陈安国. 谷氨酰胺对早期断奶仔猪生产性能和小肠消化酶活性的影响[J]. 中国畜牧, 2005,41(6):21-22.
- [3] 刘涛,彭健. 在日粮中添加谷氨酰胺和谷氨酸对断奶仔猪生产性能的影响[J]. 华中农业大学学报,1999,18(5): 457-460.
- [4] 周荣艳. 谷氨酰胺对早期断奶仔猪生产性能和血液生化指标的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006(10): 70-71.
- [5] Boza J ulio J, Turini Marco, Moennoz Denis. Effect of glutamine supplementation of the diet on tissue protein synthesis rate of glucocorticoid-treated rats[J]. Nutrition, 2001, 17(1):35-40.
- [6] 赵燕,周杰,陈安国. 壳聚糖对断奶仔猪生产性能和非特异性免疫功能的影响[J]. 中国饲料, 2006(21):28.
- [7] Zhi-Ru Tang, Yu-Long Yin, Charles M. Effect of dietary supplementation of chitosan and galactomannan-oligosaccharide on serum parameters and the insulin-like growth factor-1 mRNA expression in early-weaned piglets [J]. Domestic Animal Endocrinology, 2005(28):430-441.

(编辑:王芳,xfang2005@163.com)

# 透析管体外消化法评定 NSP 复合酶作用效果的研究

袁旭鹏 贺建华 范志勇 吕武兴 金宏

**摘要** 在小麦型日粮中添加不同组成的 NSP 复合酶进行透析管体外消化试验,结果表明,添加 NSP 复合酶可一定程度提高体外小麦—豆粕型日粮干物质、蛋白质和能量消化率,且以复合酶 I 的效果最好,使小麦—豆粕型日粮的干物质、粗蛋白和能量的体外消化率分别提高了 9.37%、7.74% 和 20.28%( $P < 0.05$ )。

**关键词** 透析管;生长猪日粮;NSP 复合酶;体外;消化

**中图分类号** S816.32

小麦替代玉米作为能量饲料,可为养猪业降低生产成本发挥积极的作用。但小麦中纤维素、 $\beta$ -葡聚糖、木聚糖和果胶等非淀粉多糖(NSP)成分含量高,单胃动物采食后直接导致肠道食糜的粘性增加、营养吸收率下降、饲料的代谢能降低(Bedford,1995;Choct 等,1990),因此限制了其在饲料中的应用。随着现代生物技术的发展,特别是酶工程技术的应用,通过使用 NSP 酶制剂提高了小麦在饲料中的用量(刘燕强等,1999;Bedford,1999)。NSP 复合酶作用效果一直以来都是用饲养试验和消化试验来证明,其测定结果直观、可靠,但试验过程十分繁琐,也耗资旷时。为此,寻求一种体外试验方法来测定营养物质的消化率,以此评价 NSP 复合酶的作用效果就显得十分必要。因此,本研究采用透析管体外消化法来评定不同 NSP 复合酶的作用效果,为 NSP 复合酶在养猪生产中的广泛应用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 酶制剂

复合酶 I:主要成分为木聚糖酶(800 000 U/g)、 $\beta$ -葡聚糖酶(200 000 U/g)、纤维素酶(40 000 U/g)由国外 A 公司提供;

复合酶 II:主要成分为木聚糖酶(8 000 U/g)、 $\beta$ -葡聚糖酶(2 000 U/g)、纤维素酶(1 000 U/g)、果胶酶(120 U/g),由国外 B 公司提供;

复合酶 III:主要成分为木聚糖酶(22 000 U/g)、 $\beta$ -

葡聚糖酶(2 000 U/g)、纤维素酶(1 200 U/g)、果胶酶(120 U/g),由国外 C 公司提供;

复合酶 IV:主要成分为木聚糖酶(4 000 U/g)、 $\beta$ -葡聚糖酶(1 000 U/g)、纤维素酶(500 U/g)、果胶酶(100 U/g),由国内某公司提供。

### 1.2 试验日粮

本试验中使用的基础日粮为 20~60 kg 生长猪的全价日粮(见表 1),酶制剂的添加量按添加成本一致的原则。具体分组如下:

- A 组:正对照组,玉米—豆粕型日粮;
- B 组:负对照组,小麦—豆粕型日粮;
- C 组:负对照组+复合酶 I(添加量为 25 g/t);
- D 组:负对照组+复合酶 II(添加量为 313 g/t);
- E 组:负对照组+复合酶 III(添加量为 500 g/t);
- F 组:负对照组+复合酶 IV(添加量为 231 g/t)。

表 1 日粮组成及营养水平(风干基础)

项目	玉米—豆粕型日粮	小麦—豆粕型日粮
组成(%)		
玉米	56.20	-
豆粕	19.50	12.50
小麦	-	51.80
麦麸	6.00	9.50
米糠粕	15.00	23.00
磷酸氢钙	1.03	1.00
石粉	0.59	0.46
赖氨酸	0.22	0.30
蛋氨酸	0.03	-
食盐	0.33	0.34
防霉剂	0.10	0.10
预混料	1.00	1.00
合计	100.00	100.00
营养水平		
猪消化能(MJ/kg)	12.97	12.47
粗蛋白(%)	16.37	16.86
赖氨酸(%)	1.00	1.00
蛋氨酸(%)	0.29	0.29
蛋氨酸+胱氨酸(%)	0.59	0.59
钙(%)	0.82	0.82
有效磷(%)	0.35	0.35

注:预混料可为每千克全价料提供 NRC(1998)所规定的微量元素和维生素的需要量。

袁旭鹏,湖南农业大学动物营养研究所,410128,湖南长沙。

贺建华(通讯作者)、范志勇、金宏,单位及通讯地址同第一作者。

吕武兴,湖南省唐人神集团研发中心。

收稿日期:2008-02-25

★ 国家科技攻关项目“饲用酶制剂应用基础理论的研究”(2004BA514A13-9)的部分内容

### 1.3 仪器和试剂

① 数显水浴恒温振荡器 (国产 SHY-2 型水浴恒温振荡器);

② 电子分析天平(感量,0.000 1 g);

③ 胃蛋白酶(EC3.4.23.1, Sigma, U.S.A): 货号为 P-7000, 比活力为 1:10 000, 用 0.01 N HCl 溶液配制成相应浓度的胃蛋白酶溶液;

④ 胰蛋白酶(EC 3.4.21.4, Sigma, U.S.A): 货号为 T-4799, 比活力为 1:250, 用磷酸缓冲液配制成相应浓度的胰蛋白酶溶液;

⑤ 透析管: 试验用透析管(货号 D-9402)购于 SIGMA 公司, 其扁平宽度 76 mm, 充圆直径 49 mm。按需要剪成 20 cm 小段后在流水下漂洗 3~4 h, 以清除表面甘油保护剂; 再移入 80 °C 的 0.3%(W/V) 硫化钠溶液处理 1 min, 以清除表面重金属离子; 随后用 60 °C 的热水洗涤 2 min; 接着用 0.2%(V/V) 硫酸溶液酸化; 最后用热水将酸洗净, 于 4 °C 下蒸馏水浸泡备用。此透析管的截留分子量为 12 000 Da;

⑥ 磷酸缓冲液(PBS), pH 值为 7.6;

⑦ HCl/NaCl 溶液, pH 值为 2.0;

⑧ NaOH 溶液(2.0 mol/l)。

### 1.4 试验设计

采用单因素试验设计, 以玉米—豆粕型日粮为正对照日粮, 小麦—豆粕型日粮为试验日粮, 分别在小麦日粮中添加不同公司生产的 NSP 复合酶, 共 6 个处理, 每个处理设 3 个重复。

### 1.5 透析管体外消化法

透析管体外消化操作程序采用 Huang (2000) 的

方法。称取 1 g(精确到 0.000 1 g)待测样品于 100 ml 三角烧瓶中, 按添加水平加入各种酶制剂, 加入 10 ml 0.001 g/ml (pH 值为 2.0) 的胃蛋白酶溶液, 用帕拉胶 (Parafilm) 封口, 在试验规定温度 (35 °C) 的摇床(国产 SHY-2 型水浴恒温振荡器)上水解 4 h, 用 NaOH 调至中性。在胰蛋白酶处理时, 先将准备好的透析管一端用尼龙线扎紧至无滴漏, 再将前面经中和的样品全量转移至透析管中(约用 40 ml 磷酸缓冲溶液), 加 10 ml 0.025 g/ml (pH 值为 7.6) 的胰蛋白酶溶液, 另一端亦用尼龙线扎紧至无滴漏, 置于 1 000 ml 的广口锥形瓶中, 加 300 ml 透析液的磷酸缓冲溶液, 用帕拉胶封口, 在摇床上水解至 24 h。然后对透析液和管内残余物作定量分析。每个样品重复 3 次。

### 1.6 体外消化常规养分分析

粗蛋白质、干物质和能量的测定参照贺建华(2005)的方法进行。

### 1.7 计算公式与统计分析

$$\text{渗透法: 消化率}(\%) = \frac{Nd}{Ns} \times 100;$$

$$\text{残余法: 消化率}(\%) = \frac{Ns - Nr}{Ns} \times 100。$$

式中:  $N_s$ ——样品中的养分含量;

$N_r$ ——残余物中养分含量;

$N_d$ ——透析液中养分含量。

所有数据均用 SAS JMP(6.03) 统计软件进行单因子方差分析, 差异显著则进行邓肯氏多重比较。

## 2 结果与分析

NSP 复合酶对生长猪日粮养分体外消化率的影响(见表 2)。

表 2 NSP 复合酶对生长猪日粮能量和营养物质体外消化率的影响(%)

项目	离体干物质消化率	离体粗蛋白消化率	离体能量消化率
A(正对照组)	40.91 <sup>a</sup>	44.35 <sup>a</sup>	34.05 <sup>a</sup>
B(负对照组)	34.99 <sup>c</sup>	38.24 <sup>d</sup>	28.21 <sup>d</sup>
C(复合酶 I)	38.27 <sup>b</sup>	41.20 <sup>bc</sup>	33.93 <sup>a</sup>
D(复合酶 II)	38.51 <sup>b</sup>	40.42 <sup>c</sup>	31.57 <sup>b</sup>
E(复合酶 III)	36.33 <sup>c</sup>	41.55 <sup>b</sup>	33.10 <sup>a</sup>
F(复合酶 IV)	36.23 <sup>c</sup>	40.80 <sup>bc</sup>	30.36 <sup>c</sup>
SEM	0.42	0.25	0.39
P-value	0.000 1	0.000 1	0.000 1

注: 同列肩注不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

由表 2 可见, C 组日粮的干物质、粗蛋白和能量的体外消化率与 B 组相比, 分别提高了 9.37% ( $P < 0.05$ )、7.74% ( $P < 0.05$ ) 和 20.28% ( $P < 0.05$ ), 且与 A 组日粮的离体能量消化率差异不显著 ( $P > 0.05$ ); D 组日粮的干物质、粗蛋白和能量的体外消化率与 B 组相比, 分别提高了 10.06% ( $P < 0.05$ )、5.70% ( $P < 0.05$ ) 和 11.91%

( $P < 0.05$ ), 与 A 组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ); E 组日粮的干物质、粗蛋白和能量的体外消化率与 B 组相比, 分别提高了 3.83% ( $P > 0.05$ )、8.66% ( $P < 0.05$ ) 和 17.33% ( $P < 0.05$ ), E 组日粮的离体能量消化率与 A 组差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 而离体干物质消化率和离体粗蛋白消化率与 A 组有显著差异 ( $P < 0.05$ ); F 组日粮的干物质、

粗蛋白和能量的体外消化率与 B 组相比,分别提高了 3.54%( $P>0.05$ )、6.69%( $P<0.05$ )和 7.62%( $P<0.05$ ),与 A 组相比,差异显著( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

本研究结果表明:添加复合 NSP 酶使小麦—豆粕型日粮中干物质、粗蛋白和能量的体外消化率显著提高( $P<0.05$ )(E 组的干物质消化率除外),添加复合 NSP 酶制剂 I 和 III 可使小麦—豆粕型日粮与玉米—豆粕型日粮的能量消化率无显著差异( $P>0.05$ )。许梓荣(2002)的大麦体外消化试验也得到了相同的结论。小麦中添加 NSP 酶能提高小麦中干物质、粗脂肪、粗蛋白和粗纤维的消化率(崔艳红,2005)。Diebold 等(2004)研究表明,小麦基础日粮中添加木聚糖酶能极显著提高日粮粗蛋白、总能和有机物质的表观回肠消化率。余有贵(2005)也证实,添加复合酶小麦日粮能显著提高生长猪的粗纤维、粗蛋白、干物质和能量的表观消化率。其主要原因可能是 NSP 酶制剂含有木聚糖酶、 $\beta$ -葡聚糖酶和纤维素酶等,这些酶可将小麦细胞壁中的阿拉伯木聚糖、 $\beta$ -葡聚糖和纤维素等 NSP 降解成寡糖,细胞壁被破坏,使细胞内的蛋白质、脂肪、氨基酸、矿物质等养分释放出来,增加了消化酶与这些养分的接触,从而提高了它们的消化率。

于旭华(2005)报道,在小麦型日粮中添加木聚糖酶可一定程度提高小麦型日粮能量的体外消化率,但消化率最高仅为 23.07%;本试验能量的体外消化率基本都达到 30%,明显高于 23.07%,这可能是由于本试验使用了透析袋,透析袋能使消化产物能不断地从透析袋内透析出来进入缓冲液,克服胃蛋白酶-胰酶两步法消化产物积累对酶促反应产生抑制作用,因此提高了饲料养分体外消化率(Mauron 等,1955;Robbins 等,1978)。彭玉麟等(2003)的研究表明:小麦日粮中添加木聚糖酶蛋白质的体外消化率达到 60%。添加 NPS 酶可使早籼稻谷和早籼糙米的干物质和粗蛋白的体外消化率分别为 62.12%、60.57%、68.80%、52.90%(李卫芬等,2004)。以上试验测得的体外消化率显著高于本试验测得的值,这与席鹏彬等(2003)的试验结果也较为吻合。这可能是由于本试验在模拟小肠消化阶段使用的是由单一酶组成的胰蛋白酶,而以上试验使用的是含多种酶活物质的胰酶,从而有利于营养物质体外消化率的提高,所以测得的营养物质的体外消化率高于本试验。

### 4 结论

NSP 复合酶能提高小麦型日粮中干物质、粗蛋白

和能量的体外消化率,但未能达到玉米型日粮的效果;可以用透析管体外消化法来评定不同 NSP 复合酶在生长猪日粮中的作用效果,以复合酶 I 的效果最好。

### 参考文献

- [1] 崔艳红,王士长,付国伟,等.不同菌种来源的 NSP 酶体外作用效果的研究[J].粮食与饲料工业,2005(2):34-35.
- [2] 贺建华.饲料分析与检测[M].北京:中国农业出版社,2005.
- [3] 李卫芬,余颂东,孙建议.添加 NSP 酶对早籼稻谷及其糙米体外消化的影响[J].中国水稻科学,2004,18(1):86-88.
- [4] 刘燕强,冯学琴.非淀粉多糖酶制剂的研究与应用进展[J].动物营养学报,1999,11(2):6-1.
- [5] 彭玉麟,冯于明.木聚糖酶对小麦日粮中戊聚糖和养分的体外消化及相对粘度的影响[C].中国畜牧兽医学会 2003 年学术年会论文集,2003:176-181.
- [6] 席鹏彬,李德发,郑春田.体外透析两步酶解法测定菜粕粗蛋白消化适宜酶促反应条件的建立[J].中国农业大学学报,2003,8(5):88-92.
- [7] 许梓荣,李卫芬,孙建议.NSP 酶对大麦体外消化的影响[J].中国粮油学报,2002,17(2):51-54.
- [8] 于旭华,冯定远.真菌性和细菌性木聚糖酶对小麦型日粮营养物质体外消化率的影响[C].酶制剂在饲料工业中的应用.北京:中国农业科学技术出版社,2005:236-242.
- [9] 余有贵,贺建华.日粮中谷物组成和复合酶添加对生长猪生产性能和养分消化率的影响[J].动物营养学报,2005,17(1):25-29.
- [10] Bedford M R.Mechanism of action and potential environmental benefits form the use of feed enzyme [J]. Anim Feed Sci Technol, 1995,53:145-155.
- [11] Bedford M R. The use of enzymes in poultry diets[J]. World Poult Sci., 1999, 52:61-68.
- [12] Choct M, Annison G. Anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets[J]. Brit Poult Sci., 1990, 30:811-812.
- [13] Diebold G, Mosenthin R, Piepho H P, et al. Effect of supplementation of xylanase and phospholipase to a wheat-based diet for weanling pigs on nutrient digestibility and concentrations of microbial metabolites in ileal digesta and feces[J]. J.Anim.Sci.,2004, 82 (9):2 647-2 656.
- [14] Huang R L, Tan Z L, Xing T X, et al. An in vitro method for the estimation of ileal crude protein and amino acids digestibility using the dialysis tubing for pig feedstuffs[J]. Anim Feed Sci Technol, 2000, 88:19-89.
- [15] Mauron J, F Mottu, E Bjuard, et al. The availability of lysine, methioine and tryptophan in condensed milk and milk powder In vitro digestion studies [J]. Arch Biochem Biophys, 1955, 59:433-451.
- [16] Robbins R.C. Effect of ratio of enzyme to substrate on amino acid patterns release from proteins in vitro[J]. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 1978, 48:44-53.

(编辑:沈桂宇, [guiyush@126.com](mailto:guiyush@126.com))

# 纳豆芽孢杆菌产蛋白酶固态发酵条件研究

帅明 黄占旺 牛丽亚

蛋白酶是一种重要的工业用酶,其产量约占酶制剂市场的65%以上<sup>[1]</sup>,广泛应用于食品、药物、皮革制造、蛋白水解和纺织工业等<sup>[2-3]</sup>。蛋白酶是从动植物组织和微生物代谢物中提取、精制而来的。由于微生物蛋白酶均为胞外酶,与动植物源蛋白酶相比具有相当大的优势,如下游技术处理相对简单、价格低廉、来源广、菌体易于培养、产量高、高产菌株选育简单且快速;此外,微生物蛋白酶还具有动植物源蛋白酶所具有的全部特性和较大的耐热性及一定的酯酶活力,易于实现工业化生产。因此,微生物蛋白酶成为研究的热点<sup>[4-6]</sup>。目前,微生物蛋白酶产生菌种主要有芽孢杆菌属细菌<sup>[7-8]</sup>和链霉菌(如灰色链霉菌、费氏链霉菌等)以及酵母<sup>[9]</sup>,我国用于工业化生产的蛋白酶菌种主要有地衣芽孢杆菌2709、地衣芽孢杆菌C1213以及短小芽孢杆菌289和209等,经液态深层发酵或固态发酵、分离、纯化等工艺精制得到纯的蛋白酶产品。由于液态深层发酵投资大、成本高、技术要求也很高、产生废液多、污染严重<sup>[10]</sup>,而固态发酵避免了液态发酵的上述不足,又适宜工业化生产,日益受到人们的重视。本文着眼于此,对纳豆芽孢杆菌产蛋白酶固态发酵条件进行了研究,为工业生产蛋白酶提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 发酵培养基

玉米粉:麦麸=3:7、葡萄糖2%、硝酸铵0.5%、水60%。

#### 1.1.2 菌种来源

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)B1为江西农业大学食品微生物实验室分离保存。

#### 1.1.3 菌种培养基<sup>[11]</sup>

牛肉膏蛋白胨固体培养基用于斜面种子活化,牛肉膏蛋白胨液体培养基用于固态发酵种子液培养。

### 1.2 仪器和设备

754紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有

限公司生产)、SPX-150B生化培养箱(上海跃进医疗器械厂生产)、HZQ-F160全温振荡培养箱(哈尔滨东联电子技术公司生产)、101A-4B电热鼓风干燥箱(上海实验仪器总厂生产)、LDZX-40B自动立式电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂生产)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 酪氨酸标准曲线的测定

采用微生物学实验手册的方法(周德庆,2001)<sup>[12]</sup>。

#### 1.3.2 纳豆芽孢杆菌生长曲线的测定

挑取2~3环斜面菌种接种于液体培养基,于37℃、120 r/min恒温振荡培养,每3 h测定一次 $\Delta A_{660\text{nm}}$ ,然后以时间(h)为横坐标、 $\Delta A_{660\text{nm}}$ 为纵坐标绘制生长曲线。

#### 1.3.3 单因素试验

以蛋白酶活力为指标,研究37℃恒温、发酵5 d的条件下种龄、接种量、培养基初始pH值和含水量4个因素对产酶的影响。

#### 1.3.4 正交试验

以蛋白酶活力为指标,根据单因素试验结果,选择种龄、接种量、培养基初始pH值和含水量4个因素中的合适水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计(见表1)。

表1 正交试验

水平	A pH值	B 种龄(h)	C 接种量(%)	D 含水量(%)
1	7.0	13	3	60
2	7.5	15	5	70
3	8.0	17	7	80

#### 1.3.5 干燥条件对蛋白酶活力的影响

以蛋白酶活力为指标,研究了干燥方式和干燥温度对蛋白酶活力的影响。

#### 1.3.6 蛋白酶活力的测定<sup>[13]</sup>

采用福林法测定蛋白酶活力。

## 2 结果与分析

### 2.1 酪氨酸标准曲线的测定

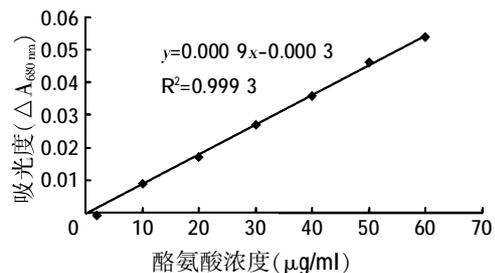


图1 酪氨酸标准曲线

帅明,江西农业大学食品科学与工程学院,330045,江西南昌。

黄占旺(通讯作者)、牛丽亚,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2008-01-07

★ 江西教育厅资助基金项目:赣教科技字[2007]160号

通过测定固态发酵产物稀释液的吸光度数值,根据酪氨酸标准曲线即可计算固态发酵后蛋白酶活力。

### 2.2 纳豆芽孢杆菌生长曲线的测定

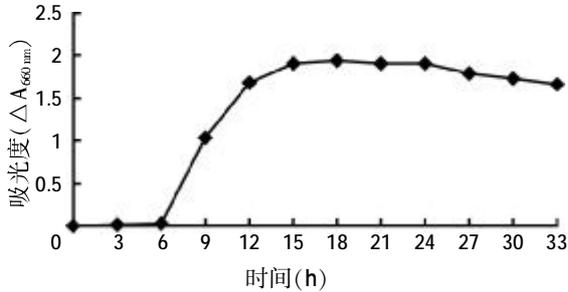


图2 纳豆芽孢杆菌生长曲线

由图2可知,0~6 h为延滞期,在这段时间,菌体很快分散并适应新的环境,总菌数几乎没有变化;6~15 h为菌体的指数生长期,菌体在这段时间以指数的形式大量增殖,指数期末期活菌数达到最大;15~24 h为稳定期,菌体在这段时间内增长和衰亡都比较慢;24 h以后菌体衰亡较快,进入衰亡期;菌体的细胞浓度在约18 h时达到最大。因此,试验所用种子液的种龄约为18 h。

### 2.3 单因素试验

#### 2.3.1 接种量对产酶的影响

保持固态发酵其它条件不变,在固体发酵培养基中分别接入5%、10%、15%和20%的种子液,测定固态发酵后的蛋白酶活力(见表2)。

表2 接种量对产酶的影响

项目	接种量(v/w)(%)			
	5	10	15	20
蛋白酶活力(U/g)	3 734	3 468	2 712	1 023

在发酵工业中,为了尽可能缩短发酵周期,增大接种量是经常采取的、行之有效的方法之一,但接种量只有在一定范围内变化才具有上述功能。由表2可知,在相同的发酵周期和5%~20%接种量范围内,随着接种量的增大,蛋白酶活力逐渐降低,这说明接种量大于5%反而不利于纳豆芽孢杆菌的固态发酵和代谢产物的积累。因此,固态发酵最佳接种量为5%。

#### 2.3.2 种龄对产酶的影响

保持固态发酵其它条件不变,在固体发酵培养基中分别接入种龄为9、12、15和18 h的种子液,测定固态发酵后的蛋白酶活力(见表3)。

表3 种龄对产酶的影响

项目	种龄(h)			
	9	12	15	18
蛋白酶活力(U/g)	2 134	4 401	5 646	3 468

由表3可知,随着种龄增大,蛋白酶活力呈先升高后降低的变化趋势,种龄为15 h时达到峰值。这是由种子液中菌体的数量和活力不同造成的。种龄为9、12和15 h时,菌体分别处于指数生长的早期、中期和晚期,产蛋白酶的能力都较强,但由于菌体数量不够多,蛋白酶产量受到限制,使蛋白酶活力随种龄增大而升高;种龄为18 h时,菌体细胞浓度达到最大,而产蛋白酶的能力不及指数期的菌体细胞,使蛋白酶产量减少、蛋白酶活力降低,因此,固态发酵的种子液最佳种龄为15 h。

#### 2.3.3 培养基pH值对产酶的影响

保持固态发酵其它条件不变,将固态发酵培养基初始pH值分别调为5.0、6.0、7.0、8.0和9.0,测定固态发酵后的蛋白酶活力(见表4)。

表4 pH值对产酶的影响

项目	pH值				
	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
蛋白酶活力(U/g)	1 200	4 446	5 113	7 469	3 912

纳豆芽孢杆菌固态发酵过程中的大多数反应是酶促反应,pH值随代谢产物以及培养基成分的变化而变化,故需要摸索适宜的初始pH值<sup>[4]</sup>。由表4可知,随着培养基pH值的升高,蛋白酶活力呈先升高后降低的变化趋势,在pH值8.0的时候达到峰值。因此,固态发酵培养基的最佳初始pH值为8.0。

#### 2.3.4 培养基初始含水量对产酶的影响

保持固态发酵其它条件不变,在固态发酵培养基中分别加入40%、50%、60%和70%的水,测定固态发酵后的蛋白酶活力(见表5)。

表5 含水量对产酶的影响

项目	含水量(w/w)(%)			
	40	50	60	70
蛋白酶活力(U/g)	756	1 067	2 356	1 867

由表5可知,随着培养基初始含水量的增加,蛋白酶活力呈先升高后降低的变化趋势,在培养基初始含水量为60%的时候达到最大。可能是由于培养基初始含水量小于60%的时候,水分供应不充足,限制了微生物生长繁殖,使蛋白酶的产量和活力都比较小;培养基初始含水量大于60%的时候,培养基的透气性能减弱,微生物得不到充足的氧气供应,同样也限制了微生物生长繁殖,使蛋白酶的产量和活力降低;培养基初始含水量为60%的时候,培养基初始含水量和通气性能对固态发酵的不利影响减少到最低,微生物生长繁殖旺盛,使蛋白酶的产量和活力达到最大值。因此,固态发酵培养基最佳初始含水量为60%。

## 2.4 正交试验

采用 DPS6.55 软件对正交试验结果进行分析。正交试验进行了重复性试验,试验测得两组数值结果见表 6。由极差 R 可知,各因素的主次关系为 B>C>D>A,最佳条件组合为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,即培养基初始 pH 值 8.0、种龄 17 h、接种量 5%、初始含水量 80%。

表 6 正交试验结果

处理号	A	B	C	D	蛋白酶活力(U/g)	
1	1	1	1	1	356	445
2	1	2	2	2	6 046	5 779
3	1	3	3	3	8 269	8 091
4	2	1	2	3	5 068	4 801
5	2	2	3	1	667	711
6	2	3	1	2	12 093	11 515
7	3	1	3	2	1 245	1 378
8	3	2	1	3	6 980	6 802
9	3	3	2	1	11 203	10 758
K <sub>1</sub>	28 986	13 293	38 191	24 140		
K <sub>2</sub>	34 855	26 985	43 655	38 056		
K <sub>3</sub>	38 366	61 929	20 361	40 011		
k <sub>1</sub>	4 831	2 215.5	6 365.17	4 023.33		
k <sub>2</sub>	5 809.16	4 497.5	7 275.83	6 342.67		
k <sub>3</sub>	6 394.33	10 321.5	3 393.5	6 668.50		
R	1 563.33	8 106	3 882.33	2 645.17		

## 2.5 验证试验

由于正交试验得到的最佳条件组合 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>并不在表 6 的试验组合中,因此,以此组合作为发酵条件,进行验证试验。

最佳条件组合的蛋白酶活力达到 12 847 U/g,显著高于固态发酵条件优化前的蛋白酶活力 7 469 U/g(取自单因素试验中蛋白酶活力最大值),也高于正交设计表中各个组合条件下的蛋白酶活力。

## 2.6 干燥条件对蛋白酶活力的影响(见表 7)

表 7 干燥条件对蛋白酶活力的影响

项目	干燥温度(°C)	蛋白酶活力(U/g)
常压干燥	50	3 287
	60	2 385
	70	1 289
真空干燥(真空度 0.095 MPa)	50	7 413
	60	6 123
	70	5 092
CK(常压不干燥)	-	12 847

干燥方法和干燥温度对蛋白酶活力都有较大的影响。由表 7 可知,随着温度升高,常压干燥和真空干燥的蛋白酶活力均随之下降;常压干燥蛋白酶活力仅为对照的 10%~26%、而真空干燥蛋白酶活力约为对照的 40%~58%,真空干燥效果显著优于常压干燥,50 °C、真空度 0.095 MPa 真空干燥效果最好。因此,纳豆芽孢杆菌固态发酵后宜采用真空干燥,真空

度 0.095 MPa、干燥温度 50 °C。

## 3 结论与讨论

通过单因素试验和正交试验确定了纳豆芽孢杆菌产蛋白酶固态发酵最佳条件为:种龄 17 h、接种量 5%、培养基初始 pH 值 8.0、含水量 80%,显著高于固态发酵条件优化前的蛋白酶活力 7 469 U/g,也高于正交设计表中各个组合条件下的蛋白酶活力。

纳豆芽孢杆菌固态发酵后宜采用真空干燥,真空度 0.095 MPa、干燥温度 50 °C,此时蛋白酶活力达到 7 413 U/g。

为了能够适应工业生产和得到活力更大的蛋白酶产品,今后可从以下两个方面努力:第一,采用诱变技术或基因工程技术改造试验菌种,选择产蛋白酶能力更强的菌株作为试验菌种;第二,对试验得到的蛋白酶进行分离纯化,得到更纯、活力更大的蛋白酶产品。

### 参考文献

- [1] Rao M B, Tankasale A M, Ghatge M S, et al. Microbiol Mol. Biol. Rev, 1998, 62: 597-634.
- [2] Johnvesly B, Naik G R. Process Biochemistry, 2001, 37: 139-144.
- [3] Haki G D, Rakshit S K. Bioresource Technology, 2003, 89: 17-34.
- [4] 刘秉智. 液体洗涤剂中酶稳定性的研究[J]. 渭南师范学院学报, 2004 (5): 39-41.
- [5] 杨庆利, 张高勇, 张宝莲. 新型表面活性剂、助剂与碱性蛋白酶的相互作用[J]. 精细化工, 2004(21): 13-16.
- [6] 梅承芳, 江晓路, 牟海津. 碱湖高产碱性蛋白酶菌的选育和产酶条件研究[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35 (4): 613-617.
- [7] Shikha, Adhyayan Sharan, Nandan S. Darmwal. Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic Bacillus pan totheneticus using molasses as a substrate[J]. Bioresource Technology, 2007, 4: 881-885.
- [8] Ravichandra, Potumarthi, Annapurna Jetty. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using Bacillus licheniformis NCIM - 2042: Effect of aeration and agitation regimes[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 5: 56-65.
- [9] Z. Chi, C. Ma, P. Wang, et al. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast Aureobasidium pullulans[J]. Bioresource Technology, 2007, 3: 534-538.
- [10] 俞俊棠等编著. 新编生物工艺学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [11] 郝林. 食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [12] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001.
- [13] 中华人民共和国专业标准. 蛋白酶活力测定法 SB/T 10317-1999.
- [14] 周学永, 金红, 杨志生, 等. 苏云金芽孢杆菌发酵液后处理工艺研究进展[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(1): 4-6.

(编辑: 沈桂宇, guiyush@126.com)

# 抽提条件对饲料酶制剂中纤维素 Cx 酶活力的影响

高玲 刘春英 孙晓红 杨德翠 王清吉

纤维素是高等植物细胞壁的主要成分,它广泛存在于自然界中,是地球上大量的可再生性碳源物质。纤维素酶是一种多组分复合酶,一般认为它包括3种成分:内切 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶,即内切酶,也称Cx酶;外切 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶,也称C<sub>1</sub>酶、外切酶; $\beta$ -1,4-葡萄糖酶即纤维二糖酶。纤维素的降解必须依靠3种组分的协同作用才能完成。

酶发挥作用主要取决于其活力的大小,而多种因素可影响酶的活力,如温度、pH值、激活剂、抑制剂等。另外,酶制剂生产厂家为提高酶制剂的稳定性,常使用一种无活性的载体将酶进行吸附固定,在酶制剂检测过程中,如何合理准确地将酶制剂中的酶释放出来是一个关键步骤。因此,针对此问题进行了一些研究。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

浙江酶,浙江省农科院微生物研究所提供;华芬酶,肇庆华芬酶饲料有限公司提供;Avizyme-1500酶制剂,芬兰饲料国际有限公司提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酶活单位定义

每分钟水解羧甲基纤维素钠产生 $1\mu\text{mol}$ 葡萄糖所需酶量定义为1个酶活单位(U)。

#### 1.2.2 酶液制备

① 精确称取浙江酶、华芬酶、Avizyme-1500酶制剂各2.500g,加入蒸馏水、0.1 mol/l 氯化钠、0.02 mol/l (pH值7.4)的磷酸缓冲液各25ml,置4℃冰箱中浸泡12h,浸泡液用布氏漏斗过滤,得3种待测酶液。

② 精确称取浙江酶、华芬酶、Avizyme-1500酶制剂各2.500g,加入蒸馏水、0.1 mol/l 氯化钠、0.02 mol/l (pH值7.4)的磷酸缓冲液各25ml,于40℃水浴浸泡1.5h,每0.5h搅拌1次,浸泡液用布氏漏斗过滤,得另外3种待测酶液。

高玲,青岛农业大学生命科学院,副教授,266109,青岛市城阳区春阳路。

刘春英、孙晓红、杨德翠、王清吉(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2008-01-14

#### 1.2.3 酶活测定

参照DNS法。

## 2 结果与分析

### 2.1 蒸馏水抽提对纤维素 Cx 酶活力的影响

用不同条件(A条件:4℃,12h;B条件:40℃,1.5h)的蒸馏水对不同的酶制剂进行抽提后,对得到的酶抽提液进行酶活力测定,结果如图1所示。从图1可以看出,同一抽提条件对不同酶制剂中的纤维素Cx酶的抽提效果不同。浙江酶、华芬酶适合用A、B条件提取,Avizyme则适合用B条件提取。

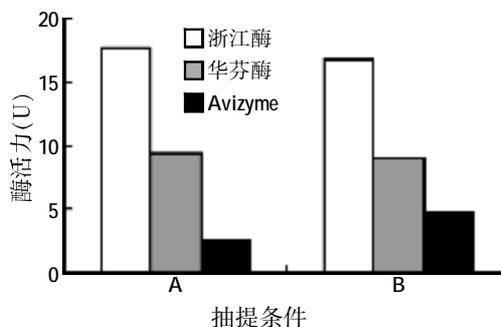


图1 蒸馏水对不同酶制剂中纤维素Cx酶活力的影响

### 2.2 NaCl溶液抽提对纤维素 Cx 酶活力的影响

用不同条件(A条件:4℃,12h;B条件:40℃,1.5h)的NaCl溶液对不同的酶制剂抽提后,对得到的酶抽提液进行酶活力测定,结果如图2所示。从图2结果可以看出,同一抽提条件对不同酶制剂中的纤维素Cx酶的抽提效果不同。浙江酶、Avizyme、华芬酶3种酶均适合用A、B条件提取,因为两种不同的抽提条件对任何一种酶制剂中的纤维素Cx酶活力影响不大。

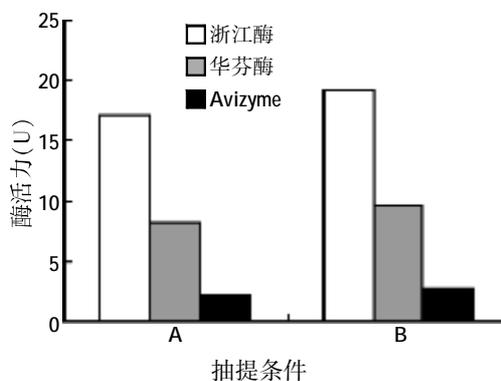


图2 NaCl对不同酶制剂中纤维素Cx酶活力的影响

### 2.3 磷酸缓冲液抽提对纤维素 Cx 酶活力的影响

用不同条件(A 条件:4 ℃,12 h;B 条件:40 ℃,1.5 h)的磷酸缓冲液对不同的酶制剂抽提后,对得到的酶抽提液进行酶活力测定,结果如图 3 所示。结果表明,同一抽提条件对不同酶制剂中的纤维素 Cx 酶的抽提效果不同。浙江酶、Avizyme、华芬酶均适合用 A、B 条件提取。

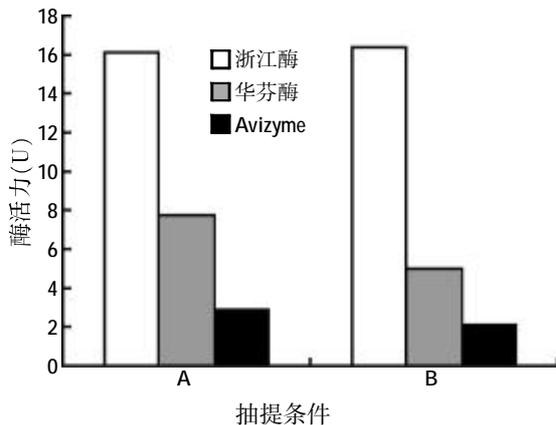


图 3 磷酸缓冲液对不同酶制剂中纤维素 Cx 酶活力的影响

### 2.4 抽提条件对浙江酶中的纤维素 Cx 酶活力的影响

从图 4 中可以看出,不同的抽提条件(A:蒸馏水 4 ℃,12 h;B:氯化钠 4 ℃,12 h;C:磷酸缓冲液 4 ℃,12 h;D:蒸馏水 40 ℃,1.5 h;E:氯化钠 40 ℃,1.5 h;F:磷酸缓冲液 40 ℃,1.5 h)对浙江酶中的纤维素 Cx 酶的提取效果不同,虽然条件 E 的提取效果最好,条件 C 的提取效果最差,但二者之间的酶活力差异仅达 19%。

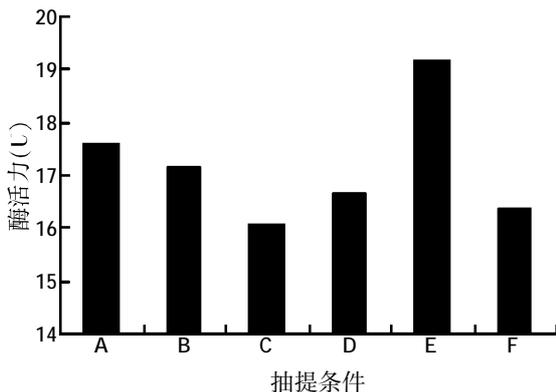


图 4 抽提条件对浙江酶中纤维素 Cx 酶活力的影响

### 2.5 抽提条件对华芬酶中的纤维素 Cx 酶活力的影响

不同的抽提条件(A、B、C、D、E、F 条件同 2.4 节)对华芬酶中的纤维素 Cx 酶的提取效果如图 5 所示。结果表明,条件 E 的提取效果最好,条件 F 的提取效果最差,二者之间的酶活力差异可达 90%以上。

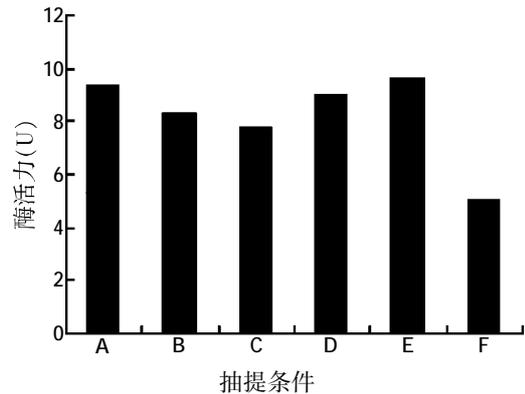


图 5 抽提条件对华芬酶中纤维素 Cx 酶活力的影响

### 2.6 抽提条件对 Avizyme 中的纤维素 Cx 酶活力的影响

不同的抽提条件(A、B、C、D、E、F 条件同 2.4 节)对 Avizyme 中的纤维素 Cx 酶的提取效果如图 6 所示。结果表明,条件 D 的提取效果最好,条件 F 的提取效果最差,二者之间的酶活力差异可达 1 倍以上。

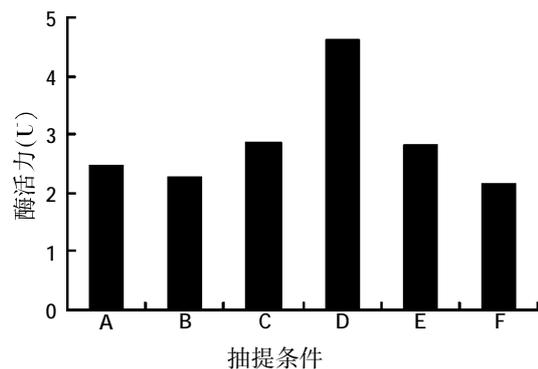


图 6 抽提条件对 Avizyme 中纤维素 Cx 酶活力的影响

## 3 讨论

试验结果表明,不同的抽提溶剂在不同的抽提温度下对浙江酶、华芬酶、Avizyme-1500 酶制剂中的纤维素 Cx 酶的抽提效果都有差异,这与不同酶制剂为了保证酶的稳定性所采用的载体不同有关。

通过试验测定比较发现,华芬酶、浙江酶酶制剂中的纤维素 Cx 酶的抽提以 0.1 mol/l 氯化钠溶液(40 ℃,1.5 h)的抽提效果最佳,酶活力最高;虽然对 Avizyme-1500 而言,是蒸馏水(40 ℃,1.5 h)的抽提效果最好,但 0.1 mol/l 氯化钠溶液(40 ℃,1.5 h)抽提的酶活力可达蒸馏水(40 ℃,1.5 h)抽提的酶活力的 60%以上。因此建议,在同时测定上述 3 种酶制剂中的纤维素 Cx 酶活力时,为了节省时间与经费,可考虑采用 0.1 mol/l 的氯化钠溶液于 40 ℃抽提 1.5 h。

(编辑:沈桂宇,guiyush@126.com)

## 芽孢杆菌对宝石鲈生长和肠道菌群的影响

宋理平 冒树泉 王爱英 陈晓 李伟

## 1 试验材料

## 1.1 试验幼鱼来源及驯养

宝石鲈幼鱼取自山东省淡水水产研究所良种室,初始体重(31.48±1.56) g,初始体长(9.43±0.26) cm。试验幼鱼先在温室内水泥池内驯养14 d,每天投喂饲料3次,分别在8:30、13:30和17:00。

## 1.2 试验饲料

试验饲料为在基础饲料中添加1‰的芽孢杆菌(10<sup>11</sup> CFU/g),每克饲料含1×10<sup>8</sup>个芽孢杆菌,连续投喂40 d。试验饲料和基础饲料加工成粒径2.5 mm的颗粒饲料。每组设置3个重复,基础饲料的营养组成见表1。

表1 饲料组成和营养水平分析(干物质,%)

原料	含量	营养水平	
酪蛋白	30	粗蛋白	36.2
明胶	7	粗脂肪	8.6
鱼油	4.5	粗灰分	2.5
玉米油	4.5	水分	4.5
玉米淀粉	28	钙	0.83
诱食剂	4.5	磷	1.13
矿物质	2		
维生素	2		
VC磷酸酯	0.5		
氯化胆碱	0.5		
纤维素	16.5		

## 1.3 试验管理

试验在山东省淡水水产研究所国家级水产良种场温室内圆柱形水族箱(400 L)中进行,每箱放30尾鱼。试验水源为玉景矿泉水厂700 m深井水(水温25℃),试验期间水温(25±1)℃;每网箱放有1个气头,24 h充气;NH<sub>3</sub>-N浓度<0.4 mg/l。每天投喂3次,投料量为5%左右。每3 d清理1次水族箱的残饵和粪便,并换1次水,换水量为总量的1/2,饲养时间为2007年10月3日~11月13日,共40 d。

宋理平,山东省淡水水产研究所,250117,济南市槐荫区段店镇位里庄3号。

冒树泉,上海水产大学。

王爱英,单位及通讯地址同第一作者。

陈晓,济南市淡水养殖科学研究所。

李伟,山东莱阳市海洋与渔业局。

收稿日期:2008-01-14

## 1.4 测定

## 1.4.1 试验饲料营养成分

饲料在105℃烘干至恒重,求得干物质含量;采用凯氏定氮法测定其粗蛋白的含量;采用索氏抽提法(乙醚为溶剂)测定粗脂肪含量;灰分是在马福炉中焚烧(550℃)测得;钙用乙二胺四乙酸二钠法测定;用分光光度法求得磷含量。

## 1.4.2 生长性能

试验开始时随机选取20尾幼鱼,进行初始体长和体重的测定,试验结束时对各个网箱所有试验幼鱼测定终末体长和体重,计算成活率、日增重、相对增重率和饲料系数。

成活率(%)=终末尾数/初始尾数×100;

日增重(g)=(终末体重-初始体重)/40;

相对增重率(%)=(终末体重-初始体重)/初始体重×100;

饲料系数=饲料总消耗量/总增重。

## 1.4.3 宝石鲈肠道菌群的检测

试验结束后,停食24 h,确保宝石鲈幼鱼肠道处于空肠状态。用MS-222麻醉剂麻醉,宝石鲈体表用75%酒精棉球消毒后,剖开腹部取出肠道,用无菌生理盐水冲洗数次后称重,加入装有10 ml灭菌0.85%生理盐水的匀浆器中匀浆,制成原液,每组取3尾鱼。将原液进行10倍系列梯度稀释到10<sup>-5</sup>后,每个梯度取0.02 ml在3个淡水鱼类琼脂培养基(FWA)平板上进行涂布培养,28℃培养48~72 h后对细菌群落进行计数,然后折算出每克肠道所含细菌的数量。在各肠道细菌的分离平板中,选取菌落清晰,分散良好,菌落数在50~300个之间的平板,随机挑选30个单一菌落,接种于FWA斜面纯培养后保存备用。细菌鉴定参照《伯杰氏鉴定细菌学手册》进行。细菌鉴定的依据有:菌落颜色、革兰氏染色、细菌形状、运动性、葡萄糖氧化发酵、过氧化氢酶、氧化酶、生长需钠以及O/129;细菌种类只鉴定到属。

## 1.5 数据统计

两组间差异显著性检验采用t检验法(P<0.05)。

## 2 结果

## 2.1 芽孢杆菌对宝石鲈生长的影响(见表2)

由表2可见,饲料中添加枯草芽孢杆菌后,宝石鲈

幼鱼的终体重、日增重、相对增重率显著高于对照组( $P<0.05$ );试验组的饲料系数显著低于对照组( $P<0.05$ )。

表2 芽孢杆菌对宝石鲈生长性能的影响

项目	对照组	试验组
初体重(g)	31.48±1.56	31.48±1.56
终体重(g)	58.96±1.61 <sup>b</sup>	67.08±0.55 <sup>a</sup>
成活率(%)	100.00±0.00	100.00±0.00
日增重(g)	0.686 7±0.041 6 <sup>b</sup>	0.894 8±0.013 3 <sup>a</sup>
相对增重率(%)	87.29±5.13 <sup>b</sup>	113.09±1.7 5 <sup>a</sup>
饲料系数	1.29±0.04 <sup>a</sup>	1.12±0.03 <sup>b</sup>

注:表中同行数据肩标小写字母不同表示差异显著( $P<0.05$ ),下表同。

## 2.2 芽孢杆菌对宝石鲈肠道菌群组成的影响(见表3)

表3 芽孢杆菌对宝石鲈肠道菌群的影响(%)

项目	Aer.	Ent.	Vib	Alc.	Bac.	Cor	Pse.	Fla.	Aci.	Sta.	Oth.
对照组	43.65 <sup>a</sup>	25.18 <sup>a</sup>	7.92	1.38 <sup>b</sup>	1.11 <sup>b</sup>	3.56	5.46	1.84 <sup>a</sup>	5.61	3.28	1.02
试验组	37.25 <sup>b</sup>	21.53 <sup>b</sup>	6.13	3.42 <sup>a</sup>	7.39 <sup>a</sup>	5.41	6.53	0.86 <sup>b</sup>	5.88	4.22	1.39

本文鉴定出兼性好氧以及好氧菌归属于10个属(见表3)。它们分别是气单胞菌属(Aer.)、肠杆菌科(Ent.)、弧菌属(Vib.)、产碱菌属(Alc.)、芽孢杆菌属(Bac.)、棒杆菌属(Cor.)、假单胞菌属(Pse.)、黄杆菌属(Fla.)、不动杆菌属(Aci.)和葡萄球菌属(Sta.)，另外还有部分未鉴定出的种类(Oth.)。从表3可看出，饲料中添加芽孢杆菌对宝石鲈肠道菌群的种类组成没有影响，但肠道菌群的数量组成却发生了变化。试验组的气单胞菌属、肠杆菌科、黄杆菌属细菌数量显著低于对照组( $P<0.05$ )，而产碱菌属和芽孢杆菌属细菌数量却显著高于对照组( $P<0.05$ )。芽孢杆菌的添加对肠道中弧菌属、棒杆菌属、假单胞杆菌属、不动杆菌属和葡萄球菌属细菌的数量没有显著影响( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

本试验发现，饲料中添加芽孢杆菌可以促进宝石鲈幼鱼的生长、提高增重率、降低饲料系数，与Wang Yanbo等(2006)和沈锦玉等(2004)的研究结果一致。益生菌在饲料中添加能够改善养殖动物的肠道微生态平衡，进而促进饲料的有效利用，提高消化酶活性和使肠道内有害微生物减少。现有研究表明，芽孢杆菌能产生多种酶类，如蛋白酶、淀粉酶和果胶酶等，而且许多酶是动物体本身不具有的酶，在饲料中添加芽孢杆菌可提高异育银鲫肠道、肝胰脏的蛋白酶活和淀粉酶活性。芽孢杆菌在动物体内还能产生有效的酶促活性因子，这些活性因子提高了宿主的消化酶活性，促进了饲料的有效利用，提高生长性能。饲料中添加芽孢杆菌降低了肠道有害菌如气单胞菌属、肠杆菌科等的含量，促进了芽孢杆菌等有益菌数量的增加，改善了肠道的微生态

平衡。Goren等(1984)研究发现，添加芽孢杆菌微生物促进了肠道中有益菌群如乳杆菌和双歧杆菌的增加，乳杆菌和双歧杆菌是肠道中的重要生理菌群，能合成大量动物所需的维生素及营养物，拮抗多种肠道病原微生物，抗感染，增强机体免疫力，调节肠道菌群平衡。

## 参考文献

- [1] 王子彦,康玉辉,何明清.鱼微生物饲料添加剂喂鲤鱼后对消化酶活性影响的研究[J].四川农业大学学报,1994,12(增刊):662-663.
- [2] 潘康成,何明清,刘克琳.饲料添加剂对鲤鱼生长和消化酶活性的影响研究[J].饲料工业,1997,18(10):41-42.
- [3] 沈锦玉,沈智华,尹文林,等.饲喂枯草芽孢杆菌对银鲫等水生动物肠道菌群及消化酶活性的影响[J].水产学报,2004,28(增刊):146-150.
- [4] Holt, J. G., Krieg, N.R., Sneath, P. H. A., et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]. 9th edition. Williams & Wilkins, Baltimore 1993.
- [5] Wang Yanbo, Xu Zirong. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities [J]. Animal Feed Science and Technology, 2006, 127: 283-292.
- [6] Parker R. B. Probiotics the other half of the antibiotics story[J]. Anim. Nutr. Health, 1974, 29:4-8.
- [7] Fuller, R.. Probiotic in man and animals[J]. J.Appl.Bacteriol.,1989, 66:365-378.
- [8] Tovar-Ram' rez, D., Zambonino I.J., Cahu C., et al. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development[J]. Aquaculture, 2004,234:415-427.
- [9] Lloyd, A.B., Comming, R.B., Kent, R.D..Prevention of Salmonella typhimurium infection in poultry by pretreatment of chickens and poultry with intestinal extracts[J]. Aust. Vet. J., 1977, 53:82-87.
- [10] Pivnick, H., Blanchfield, B., D'Anst, J.Y.. Prevention of Salmonella infection in chicks by treatment with fecal cultures from mature chickens Nurmicultures[J]. J. Food Protect., 1981, 44:909-916.
- [11] Cole, C.B., Fuller, R.. A note on the effect of host specific fermented milk on the coliform population of the neonatal rat gut[J]. J. Appl. Bacteriol., 1984, 56:495-498.
- [12] Goren, E., De Jong, W.A., Doornenbal, P., et al. Protection of chicks against Salmonella infection induced by spray application of intestinal microflora in the hatchery[J]. Vet. Quart., 1984,6:73-79.
- [13] 刘波,刘文斌,王恬.地衣芽孢杆菌对异育银鲫消化机能和生长的影响[J].南京农业大学学报,2005,28(4):80-84.
- [14] 刘小刚,周洪琪,华雪铭.微生态制剂对异育银鲫消化酶活性的影响[J].水产学报,2002,26(5):448-452.
- [15] Koushik Ghosh, Sen S K.Characterization of bacilli isolated from the gut of rohu, Labeo rohha, fingerlings and its significance in digestion[J]. Journal of Applied Aquaculture, 2002,12:3.
- [16] 袁杰利,赵恕.微生态的应用及展望[J].沈阳药学院学报,1993, 10(4):297-300.
- [17] 周德庆,郭杰炎.我国微生态制剂的现状与发展设想[J].工业微生物,1999,29(1):34-43.

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

# 欧洲丁鲟三种复合预混料配方对比试验

孙晓雨 黄 权 祖岫杰 王伟杰 于 晨

丁鲟(*Tinca tinca* L.)隶属于鲤科,雅罗鱼亚科,丁鲟属。其原产于欧洲,有皇家宠鱼之称,广泛分布于欧洲平原的河流和湖泊中,我国仅分布于新疆额尔齐斯河和乌伦古河流域,该鱼是属于偏动物食性,生存温度为0~37℃,是一种底栖的温水性鱼类。丁鲟具有对环境适应范围广,对疾病抵抗力强,生长较快,集中抢食,养殖技术简单等特点,适合于中国大部分地区养殖,是替代鲤鱼、鲫鱼较为理想的品种。目前,正在被全国水产研究部门和生产单位所关注。

丁鲟营养丰富,肉质细嫩,蛋白质丰富,尤其是不饱和脂肪酸含量比其它淡水鱼高出3~4倍,被誉为绿色保健食品,畅销欧洲。欧洲丁鲟是一个新开发的养殖品种,由于对该鱼基础研究的资料积累与养殖生产需求之间尚有一定距离,尚需在现有的基础上对丁鲟各阶段的营养需求及使用饲料做进一步的研究,特别是复合预混料的研究尚属空白。本文针对此研究设计了3种复合预混料进行对比筛选,为制定饲养标准和合理配制饲料配方提供参考。

## 1 材料与试验方法

### 1.1 试验设计

本试验共设计了3种复合预混料,每种设4个重复。试验在玻璃水族箱(60 cm×31 cm×28 cm)中进行。随机挑选体质健壮,规格一致的欧洲丁鲟在12个水族箱中饲养,并与3种复合预混料相对应分成3组:试验1组(1号料)、试验2组(2号料)、试验3组(3号料),每组4箱,每箱12尾鱼,各箱间随机排列。养殖试验于2006年6月11日至2006年7月16日(5周)在吉林省水产科学研究院进行,每周结束后采样称重,在吉林农业大学动物科技学院进行各项指标的测定,并对试验数据进行统计和分析。

### 1.2 试验材料

孙晓雨,吉林省水产技术推广总站,130118,长春市红旗街1821号。

黄权(通讯作者)、王伟杰、于晨,吉林农业大学动物科技学院。

祖岫杰,吉林省水产科学研究院。

收稿日期:2008-01-07

★ 吉林省科技厅资助项目

### 1.2.1 试验用鱼

试验用欧洲丁鲟的鱼种由查干湖渔场引入,试验鱼体重(24.5±5.5)g,体长(10.7±1.0)cm,健康活泼。首先在水族箱暂养1周(共计200尾)后开始试验。

### 1.2.2 试验饲料

根据我国鲤科鱼类营养需要研究成果和养殖生产实际需要及鱼类营养与畜禽营养需要的差别设计配方,按鱼虾营养试验的研究方法进行可控环境的营养试验研究。饲料用颗粒机组加工成直径为3mm,料径比为1.5~2.0:1的颗粒。复合预混料的配方及饲料基本组成和饲料主要营养水平见表1、表2。

表1 欧洲丁鲟试验复合预混料配方(g/t)

成分	试验1组	试验2组	试验3组
鱼用多维	1 000	1 000	1 000
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	12	16	22
FeSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	500	333	867
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	46	65	50
NaSeO <sub>3</sub> (1%)	93	114	51
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.5	4.0	4.5
KI	0.5	1.0	1.2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3 090	4 123	463
诱食促长剂	1 250	1 250	1 250
山道哇	50	50	50
石粉	3 928	3 024	6 731.3
合计	10 000	10 000	10 000

表2 欧洲丁鲟试验饲料的基本组成及营养水平(%)

组成	含量(%)	营养水平	
鱼粉	15.0	粗蛋白(%)	36.0(36.4)
豆粕	45.0	粗脂肪(%)	2.0~5.0(3.9)
麦麸	27.6	粗纤维(%)	5.0(4.7)
棉籽粕	8.0	粗灰分(%)	7.0(6.5)
石粉	1.0	钙(%)	1.00~1.50(1.22)
磷酸二氢钙	1.0	总磷(%)	0.60~1.20(1.12)
食盐	0.15	赖氨酸(%)	1.50(1.48)
豆油	1.0	可消化能(kJ/g)	14.55
复合预混料	1.25		

注:括号内的数值为各成分的实际测定值。

### 1.3 试验管理

在室内可控环境的水族箱内进行饲养试验,饲养条件相同,温度(23.2±2.0)℃,试验采用循环水养殖系统,充氧泵充氧,并用虹吸法适时吸出残饵和粪便,在早晨(投饵前)和晚上(20:00)各吸污1次。每周换水3次,每次换水为总量的1/3,每天换洗滤布1次,保证水源充足,水质清洁。每天投喂饲料3次,分别在8:00、

12:00、16:00。投饲率为总体重的 3%~5%，每周称重 1 次，并根据试验所剩试验料的数量调整投饲量。

#### 1.4 试验测定指标与方法

##### 1.4.1 生物学指标

饲养过程中，每周结束进行 1 次试验用鱼生物学指标的测定。每次随机选取 3 个不同试验组的 5 尾鱼，精确测量其体重、头长、体长、全长、体高（重复试验 1 次），并计算出增重率、特定生长率和饵料系数。

增重率  $SWGR(\%) = (W_2 - W_1) / W_1 \times 100$ ;

特定生长率  $SGR(\%/d) = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1) \times 100$ 。

式中： $W_1$ ——鱼体初重(g)；

$W_2$ ——鱼体末重(g)；

$t_1$ ——试验初始时间(d)；

$t_2$ ——试验结束时间(d)；

饵料系数=投饲量/(试验结束时鱼体重-试验开始时鱼体重)。

##### 1.4.2 血液生化指标

于投喂饲料结束 2 h 后从各组中随机捞取试验鱼，由尾椎静脉采血。静止 30 min 后，以肝素抗凝，4 000 r/min 离心 10 min。收集上层血清，保存在 4 ℃ 冰箱中，用于测定其生化指标：血糖 (GLU)、胆固醇 (CHOL)、甘油三酯 (TG)、白蛋白 (ALB)、球蛋白 (GLB)、总蛋白 (TP)。各指标均采用 MD100 型半自动生化分析仪测定分析。

##### 1.4.3 血液免疫指标

选择了 2 种对鱼体免疫机能影响较大的酸性磷

酸酶 (ACP) 和超氧化物歧化酶 (SOD)，进行免疫指标的测定。测定所需血清的制备方法同本文 1.4.2。酸性磷酸酶 (ACP) 的活性和超氧化物歧化酶 (SOD) 的活力均使用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

其中，每毫升血清中超氧化物歧化酶 (SOD) 抑制率达 50% 所对应的超氧化物歧化酶量为一个超氧化物歧化酶 (SOD) 活力单位 (U)；每 100 ml 血清在 37 ℃ 与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为酸性磷酸酶 (ACP) 的一个活力单位 (U)。

##### 1.5 数据的统计分析

试验数据采用 SPSS 11.5 程序包进行单因素方差分析，用 Duncan's 多重比较分析组间差异显著性程度。

## 2 试验结果与分析

### 2.1 生长指标 (见表 3)

从表 3 的试验结果可知，投喂 3 种不同复合预混料，欧洲丁鲷的增重率、特定生长率和饵料系数均有差异，其中，试验 1 组和试验 3 组的增重率和特定生长率差异不显著 ( $P > 0.05$ )，但均显著高于试验 2 组 ( $P < 0.05$ )；试验 1 组和试验 3 组的饵料系数差异不显著 ( $P > 0.05$ )，但显著低于试验 2 组 ( $P < 0.05$ )。饵料系数常被用来衡量配合饲料的质量以及鱼、虾对配合饲料的利用程度，其值大小除与饲料质量有关外，还与鱼虾的消化、吸收和代谢有关。由本试验的结果可以看出，3 种复合预混料的饵料系数均较低，而试验 1 组和试验 3 组欧洲丁鲷的生长效果明显好于投喂试验 2 组的欧洲丁鲷。

表 3 摄食 3 种不同复合预混料对欧洲丁鲷生长效果的影响

试验组	初始体重(g)	末体重(g)	增重率(%)	特定生长率(%/d)	饵料系数
试验 1 组	24.62±0.36	25.83±0.42	4.68±0.52 <sup>a</sup>	0.13±0.12 <sup>a</sup>	1.07±0.79 <sup>a</sup>
试验 2 组	25.85±0.56	26.26±0.48	1.56±1.13 <sup>b</sup>	0.04±1.42 <sup>b</sup>	1.86±1.81 <sup>b</sup>
试验 3 组	25.52±0.46	26.95±0.67	5.31±0.69 <sup>a</sup>	0.15±0.59 <sup>a</sup>	0.94±0.86 <sup>a</sup>

注：表中同列数据肩标有相同字母代表差异不显著 ( $P > 0.05$ )，不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 血液生化指标 (见表 4)

表 4 摄食 3 种不同复合预混料对欧洲丁鲷的生化指标的影响

项目	试验 1 组	试验 2 组	试验 3 组
血糖 (mmol/l)	6.54±0.127 <sup>a</sup>	4.84±0.076 <sup>b</sup>	5.23±0.189 <sup>b</sup>
胆固醇 (mmol/l)	3.75±0.138 <sup>a</sup>	3.14±0.067 <sup>b</sup>	2.91±0.055 <sup>b</sup>
甘油三酯 (mmol/l)	3.62±0.145 <sup>a</sup>	3.71±0.113 <sup>a</sup>	2.78±0.070 <sup>b</sup>
白蛋白 (g/l)	19.0±0.166 <sup>a</sup>	18.5±2.817 <sup>b</sup>	16.49±0.247 <sup>b</sup>
球蛋白 (g/l)	17.54±0.016 <sup>a</sup>	32.0±3.997 <sup>b</sup>	19.27±0.133 <sup>c</sup>
总蛋白 (g/l)	36.55±0.078 <sup>a</sup>	51.17±1.238 <sup>b</sup>	35.77±0.353 <sup>c</sup>
白蛋白/球蛋白	1.08±0.091 <sup>a</sup>	0.58±0.089 <sup>b</sup>	0.86±0.190 <sup>b</sup>

注：表中同行数据肩标有相同字母代表差异不显著 ( $P > 0.05$ )，不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。下表同。

动物血液的生化参数是动物机体健康状况的主要指标，也是其疾病诊断和测定的依据之一，鱼类血液生化指标虽然受诸多因素的影响，但仍能够反映该鱼类的健康状况和生理状况。由表 4 可见，试验中试验 1 组欧洲丁鲷的血糖浓度、胆固醇和白蛋白的含量均显著高于试验 2 组和试验 3 组的试验鱼 ( $P < 0.05$ )，试验 2 组和试验 3 组差异不显著 ( $P > 0.05$ )；试验 1 组和试验 2 组甘油三酯的含量显著高于试验 3 组 ( $P < 0.05$ )，试验 1 组和试验 2 组差异不显著 ( $P > 0.05$ )；投喂 3 种饲料，欧洲丁鲷的球蛋白和总蛋白含量差异均显著 ( $P < 0.05$ )，试

验 2 组最高,其次是试验 1 组,试验 3 组最低;白蛋白/球蛋白试验 1 组显著高于试验 2 组和试验 3 组 ( $P<0.05$ )。

在无其它因素干扰的条件下,血糖含量可作为衡量机体营养状况的指标,血糖含量较高时表现为鱼类积极摄食,健康状态良好。在本试验过程中,试验环境的各项指标良好,试验 1 组的血糖浓度显著高于另外两组。甘油三酯(TG)和胆固醇(CHOL)是鱼类脂类代谢的主要物质,甘油三酯和胆固醇的量分别代表了机体能够摄取或合成甘油三酯和胆固醇的多少,相对而言本试验中试验 1 组胆固醇、甘油三酯的含量比较高。

### 2.3 免疫学指标(见表 5)

表 5 摄食 3 种不同复合预混料对欧洲丁鲟的免疫指标的影响

项目	试验 1 组	试验 2 组	试验 3 组
超氧化物歧化酶活力(U/ml)	67.69±1.02 <sup>a</sup>	65.31±0.65 <sup>b</sup>	69.50±0.45 <sup>c</sup>
酸性磷酸酶活力(U/100 ml)	3.88±0.15 <sup>a</sup>	3.98±0.43 <sup>b</sup>	3.31±0.36 <sup>b</sup>

由表 5 可见,试验各组超氧化物歧化酶(SOD)的活力差异均显著( $P<0.05$ ),试验 3 组(69.50±0.45)最高,其次为试验 1 组(67.69±1.02),试验 2 组最低(65.31±0.65),试验 3 组欧洲丁鲟的酸性磷酸酶(ACP)活力显著低于试验 1 组和试验 2 组( $P<0.05$ ),试验 1 组和试验 2 组差异不显著( $P>0.05$ )。综合各项指标来看,本试验中,试验 1 组和试验 2 组欧洲丁鲟的免疫力较强,试验 1 组和试验 2 组对提高欧洲丁鲟免疫机能方面作用较突出。

### 3 结论

欧洲丁鲟是偏动物食性杂食性鱼类,本试验根据鲤科鱼类的营养需要并结合了之前对欧洲丁鲟摄食和生长等方面的研究结果设计了本试验所用的 3 种预混料配方。从养殖效果来看,试验 1 组和试验 3 组的饵料系数较低,并且对试验鱼的生长有较显著的促进作用,而在对投喂 3 种复合预混料欧洲丁鲟的生长指标、血液生化指标、免疫指标等方面进行均衡比较后,得出试验 1 组的实用价值最高,其次是试验 3 组,试验 2 组最差。

#### 参考文献

- [1] 伍献文.中国鲤科鱼类志(上卷)(第一版)[M].上海:上海科学技术出版社,1964:20-30.
- [2] 肖斌,陈量,李正友.丁鲟鱼种池塘培育试验[J].科学养鱼,2004(2):8-10.
- [3] 吕小江.丁鲟池塘主养成鱼试验[J].水利渔业,2005,25(2):34.
- [4] 郑元强,刘美艳,彭福,等.丁鲟人工繁育及健康养殖技术[J].齐鲁渔

业,2005,22(10):39-41.

- [5] 冯晓宇,李忠全.丁鲟的引种驯养和人工繁育的初步研究[J].水产科技情报,2002,29(6):248-251.
- [6] 凌去非,乔德亮,姚化章,等.丁鲟人工繁殖技术[J].科学养鱼,2002(8):12.
- [7] 李爱杰.水产动物营养与饲料学[M].北京:中国农业出版社,1996.
- [8] 王红权,赵玉蓉.鱼饲料中各营养素的功能及其对健康的影响[J].内陆水产,2006(5):35-37.
- [9] YANG Jian.Aquaculture and environment: impacts and strategies[J]. J Fish Sci .China,2003,10(7):143-149.
- [10] 宋学宏,凌去非,蔡春芳,等.丁鲟的营养素需要量及饲料最适能量蛋白比[J].饲料工业,2004,25(9):53-56.
- [11] 黄峰,苏德学,田永胜,等.丁鲟的含肉率及其营养价值的分析[J].动物学杂志,2004,39(1):76-79.
- [12] 全国饲料工业标准化技术委员会.饲料工业标准汇编[M].北京:中国标准出版社,2002.
- [13] 王镜岩,朱圣庚,徐长法主编.生物化学(第三版)[M].北京:高等教育出版社,2002.
- [14] 尾崎久雄.鱼类血液与循环生理[M].上海:上海科学技术出版社,1982:151-154.
- [15] Krajnovic'2 Ozretic'M, Krajnovic'2 Ozretic'B. Detection and evaluation of hepatic intoxication in fish [M]. In : Gabrielides G. P.(ed.).1992.

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

## 《饲料工业》(英文版) 征稿启事

为了满足行业发展的需要和行业内国际间交流的进一步加深,将中国的饲料企业更好、更快地推向国际市场,与国际接轨。2008年,《饲料工业》推出了英文版,目的是让外国的读者更多地了解中国的一些行业资讯、发展动态、政策对行业发展的影响,增进企业间的国际合作,推动中国乃至全球饲料行业的发展。

为此,《饲料工业》向业内征集优秀的英文稿件,内容涉及人物专访、名企展示、行业年度报告、工厂管理、企业介绍、产品质量展示、学术专栏、政策分析以及企业国际合作等栏目,同时设置版块部分,介绍国内外的行业信息、资讯和新产品的展示。真诚希望您踊跃投稿,积极参与。

《饲料工业》(英文版)通过英文媒体平台把国内最全面的技术信息和研究成果展示给读者,使中国的饲料工业逐步走向世界,使外国的读者更多地了解中国的行业发展,促进国内外饲料行业、企业间的交流与合作,让《饲料工业》(英文版)与您一同成长。

投稿邮箱:eslgy@126.com

联系电话:13700047990

# 五种发酵木薯渣在罗非鱼饲料中应用的养殖性能比较

张伟涛 叶元土 尹晓静 邱燕 高艳玲 张俊 张宝彤

随着水产业的蓬勃发展,水产饲料产量逐年成倍增长,随之而来的是饲料原料的短缺,除蛋白饲料不足外,能量饲料不足的问题也越来越显示出来。近年来,各地都在开发廉价的饲料资源替代部分玉米等能量原料。

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)是世界3大薯类作物之一,有“地下粮仓”、“淀粉之王”和“特用作物”之誉称。木薯的单位面积食物的能量超过水稻、小麦、高粱和玉米,是人类主要的食物资源之一<sup>[1]</sup>。许多国家研究木薯做畜禽饲料,以补充粮食的不足<sup>[2-5]</sup>;我国畜牧科技人员用木薯代替玉米饲养猪禽取得良好效果<sup>[6,7]</sup>;广东、广西等省用木薯粉替代玉米等能量饲料应用在畜禽饲料中,并取得较好养殖效果<sup>[8]</sup>。

罗非鱼具有生长快、产量高、食性杂、适应力强、疾病少,而且肉嫩味美等优点,深受养殖户和消费者的欢迎。本研究旨在开发新型高能水产饲料原料——木薯渣,并通过一系列物理、化学、生物等方法处理,以提高木薯的营养效价,从而减少玉米等原料在水产配合饲料中的大量使用,以达到节省粮食、降低成本的目的,为实际生产创造更大的价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

在罗非鱼饲料中,分别添加5种发酵木薯渣原料,共5个试验组,5组试验饲料以A、B、C、D、E表示,每组3个平行处理,每个处理放平均体重(44.49±0.31)g的罗非鱼9尾,养殖周期60d。

### 1.2 试验鱼

选择自然健康的罗非鱼作为养殖试验鱼,为当年的池塘养殖鱼种。经1周暂养、驯化后,选择体格健壮、规格整齐的鱼种进行随机分组。

### 1.3 饲料配方与常规营养水平

基础日粮组成见表1,各试验组饲料常规营养成分实测值见表2。

表1 基础日粮组成

原料	含量(%)
进口鱼粉	3
豆粕	8
菜粕	20
棉粕	20
次粉	10
木薯渣	20
肉骨粉	2
米糠	9
菜油	1
豆油	1
膨润土	2
Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2
沸石粉	1
预混料	1
合计	100

表2 饲料常规营养成分实测值(%)

组别	粗水分	粗蛋白	粗脂肪	粗灰分	钙	磷
A	8.55	27.77	7.91	13.74	2.45	1.52
B	7.64	26.78	8.66	13.91	2.41	1.51
C	9.71	28.21	9.48	13.97	2.46	1.59
D	8.32	27.69	8.43	13.64	2.38	1.49
E	7.91	27.81	7.96	14.12	2.03	1.50

5种发酵木薯渣样品为广西建邦经贸有限公司提供,利用提取木薯淀粉后的残渣采用不同发酵处理方法得到的产品。5种木薯渣样品的蛋白含量、样品干物质消化率、样品蛋白消化率见表3。

表3 5种木薯渣样品蛋白含量、样品干物质消化率、蛋白消化率(%)

样品	样品粗蛋白	样品干物质消化率	样品蛋白消化率
1	20.75±0.21 <sup>a</sup>	22.64±3.68	65.60±0.37 <sup>a</sup>
2	20.05±0.12 <sup>b</sup>	19.30±6.05	59.89±0.08 <sup>a</sup>
3	18.54±0.17 <sup>c</sup>	17.98±3.51	51.15±4.38 <sup>b</sup>
4	19.88±0.12 <sup>b</sup>	21.38±2.67	61.27±4.06 <sup>a</sup>
5	17.84±0.18 <sup>d</sup>	21.47±0.13	65.15±0.70 <sup>a</sup>

注:同列数据肩标小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。下表同。

张伟涛,北京桑普生物化学技术有限公司,528300,广东省佛山市顺德区凤翔工业园荣业六路1号正对面。

叶元土、尹晓静、邱燕、高艳玲、张俊,苏州大学生命科学学院。

张宝彤,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2008-02-21

将木薯渣原料样品粉碎,过60目筛后,与其它原料均匀混合,用小型饲料制粒机制成直径2mm的硬颗粒饲料,饲料制成后自然冷却,装袋,放于冰箱冷藏保存、待用。

### 1.4 饲养管理

养殖试验在室内同一循环养殖系统进行,使用直

径 70 cm、高 85 cm 的养殖桶。养殖用水为经过曝气的自来水,每天换水量为总水量的 1/3,以减少残余饲料和粪便对水体的影响。养殖水体经过滤、沉淀后流回蓄水池,经过增氧、控温后由水泵抽回各养殖桶。日投饵 3 次(8:00、12:30、17:00),投饲率为体重的 3%~4%。

## 1.5 检测指标

### 1.5.1 生长性能指标及形体指标

饲养试验结束时,使鱼空腹 24 h 后称重。每个养殖桶取鱼 6 尾,击打头部致死,称取鱼体重、测量鱼体长,解剖取鱼背部肌肉,取内脏团并分离,记录内脏团重和肝脏重。各指标计算公式如下:

增重率(%)=(末重-初重)(g)/初重(g)×100;

体重特定增长率(%/d)=(ln 末重-ln 初重)/天数×100;

体长特定增长率(%/d)=(ln 末体长-ln 初体长)/天数×100;

存活率(%)=试验末鱼尾数/试验初鱼尾数×100;

饵料系数=总投饲量(g)/(末重-初重)(g);

肝体比(%)=肝脏重量(g)/体重(g)×100;

脏体比(%)=内脏总重(g)/体重(g)×100。

### 1.5.2 生理指标

免疫防御力:以血清及体表粘液中溶菌酶(LSZ),血清、体表粘液和肝脏中的总超氧化物歧化酶(T-SOD)表示。

肝胰脏功能:以血清和肝脏中的谷草转氨酶(GOT)活力来反映肝胰脏功能。

造血功能:以全血血红蛋白含量来评价。

#### 1.5.2.1 酶液的制备

血清:尾静脉抽血,以 3 000 r/min,冰冻离心 15 min,取上清液作为酶液。

体表粘液:用滤纸轻轻吸去鱼体表水分,用解剖刀刮取体表不同部位粘液(不能含有鳞片),3~5 尾鱼样品合在一起,称重。采用 0.02 mol/l、pH 值 7.4 磷酸盐缓冲液 5 倍稀释,匀浆器匀浆,6 000 r/min 冷冻离心,取上清液作为酶液,-20 °C 冰箱保存备用。

肝胰脏酶液:取肝胰脏称重,加入 10 倍体积的 pH 值 7.4、0.2 mol/l 的磷酸缓冲液。用匀浆器匀浆,6 000 r/min 离心,取上清液备用。

#### 1.5.2.2 测定方法

溶菌酶活力测定:采用 Hultmark 法<sup>[9]</sup>的改进方法,用 0.1 mol/l、pH 值 6.4 的磷酸盐缓冲液将溶壁微球菌(干菌粉)配成一定浓度的反应底物,底物浓度确定为 570 nm、OD 值 0.303。取 0.1 ml 待测样品加 3 ml 菌悬液,测 A<sub>0</sub> 值,在 37 °C 温浴 30 min 后立即置冰浴 10 min 终止反应,测 A 值。LSZ 活力=(A<sub>0</sub>-A)/A。

总超氧化物歧化酶活力测定:采用南京建成生物工程研究所试剂盒进行测定。

谷草转氨酶活力测定:采用南京建成生物工程研究所试剂盒进行测定。

血红蛋白测定:采用南京建成生物工程研究所氰化高铁血红蛋白试剂盒测定。

### 1.5.3 鱼体常规营养成分测定

水分测定用 105 °C 烘干恒重方法,粗蛋白测定采用凯氏定氮法(总氮×6.25),脂肪测定采用索氏抽提法,粗灰分测定采用高温炉灰化法(550 °C),钙含量采用乙二胺四乙酸二钠滴定法(GB/T6436—1992)测定,总磷含量按 GB/T6437—1992 测定。

### 1.5.4 离体消化率的测定

参照叶元土(2004)提出的水产饲料离体消化率测定方法<sup>[10]</sup>,测定 5 种木薯渣样品的离体消化率、蛋白消化率。

## 1.6 数据处理

试验数据用“平均数±标准差”表示,结果采用 Excel 和 SPSS11.5 版统计软件中 One-Way ANOVA 过程进行方差分析,并进行 Duncan's 多重比较,显著水平为 0.05。

## 2 结果

2.1 添加不同木薯渣样品对罗非鱼生长的影响(见表 4)

表 4 饲料中添加不同木薯渣样品对罗非鱼生长的影响

组别	成活率(%)	增重率(%)	体重特定增长率(%/d)	体长特定增长率(%/d)	饵料系数
A	100±0.00	217.23±3.73	1.92±0.02	0.54±0.06	1.47±0.03 <sup>a</sup>
B	96.3±6.41	204.71±10.12	1.85±0.06	0.53±0.04	1.53±0.03 <sup>ab</sup>
C	96.3±6.41	205.18±4.99	1.86±0.03	0.53±0.03	1.51±0.04 <sup>ab</sup>
D	100±0.00	208.65±1.70	1.88±0.01	0.54±0.05	1.53±0.01 <sup>ab</sup>
E	96.3±6.41	202.54±14.48	1.84±0.08	0.53±0.05	1.54±0.05 <sup>b</sup>

从表 4 结果可知,各试验组成活率均较高,为 96.3%以上。增重率、体重特定增长率、体长特定生长

率,均以 A 组最高,最低的为 E 组;饵料系数,以 A 组最低,最高的为 E 组,A、E 两组有显著性差异(P<0.05)。

## 2.2 添加不同木薯渣样品对罗非鱼形体的影响

本试验以体重/体长、肥满度、脏体比、肝体比等指标来反映饲料中添加不同木薯渣样品对罗非鱼形体的影响,结果见表 5。结果显示,各试验组鱼体的体重/体长、肥满度、脏体比、肝体比均无显著性差异( $P>0.05$ )。

表 5 饲料中添加不同木薯渣样品对罗非鱼形体的影响

组别	体重/体长(g/cm)	肥满度(%)	脏体比(%)	肝体比(%)
A	8.70±1.20	3.43±0.24	7.77±0.85	1.12±0.37
B	8.60±1.45	3.43±0.22	7.47±0.71	1.13±0.45
C	8.69±1.19	3.41±0.21	7.43±1.38	1.18±0.37
D	8.60±1.29	3.41±0.24	7.78±0.71	0.93±0.29
E	8.52±1.66	3.38±0.29	7.74±0.85	1.05±0.24

## 2.3 添加不同木薯渣样品对罗非鱼生理指标的影响

### 2.3.1 溶菌酶(LSZ)活力(见表 6)

表 6 饲料中添加不同木薯渣样品对罗非鱼溶菌酶(LSZ)活力的影响

组别	血清	粘液
A	0.68±0.06 <sup>ab</sup>	0.10±0.02 <sup>a</sup>
B	0.75±0.06 <sup>bc</sup>	0.09±0.02 <sup>ab</sup>
C	0.78±0.09 <sup>c</sup>	0.07±0.02 <sup>bc</sup>
D	0.65±0.06 <sup>a</sup>	0.08±0.02 <sup>abc</sup>
E	0.62±0.08 <sup>a</sup>	0.06±0.02 <sup>c</sup>

从表 6 可以看出,血清溶菌酶活力最高的为 C 组,显著高于 A、D、E 组( $P<0.05$ );粘液溶菌酶活力以 A 组为最高,活力最低组为 E 组,A、E 组差异显著( $P<0.05$ ),其余 3 组间差异不显著( $P>0.05$ )。

### 2.3.2 超氧化物歧化酶(SOD)活力

5 个试验组鱼体粘液、肝脏和血清超氧化物歧化酶(SOD)活力结果见表 7。从表 7 可以看出,粘液 SOD 酶活力最高组为 C 组,最低组为 E 组,各试验组之间差异不显著( $P>0.05$ );肝脏 SOD 酶活力最高为 E 组,最低组为 B 组,各试验组之间差异不显著( $P>0.05$ );血清 SOD 酶活力最高组为 B 组,最低组为 E 组,各试验组之间差异不显著( $P>0.05$ )。

表 7 饲料中添加不同木薯渣样品对罗非鱼超氧化物歧化酶(SOD)活力的影响(U/ml)

组别	粘液	肝脏	血清
A	192.88±31.53	557.41±6.54	93.64±30.85
B	195.31±39.65	556.65±24.21	102.59±12.06
C	203.66±18.66	557.28±19.60	87.93±13.93
D	195.01±18.96	558.94±26.36	100.00±19.75
E	189.38±13.44	571.52±23.58	85.15±19.13

### 2.3.3 谷草转氨酶(GOT)活力

鱼体肝脏和血清 GOT 活力值见表 8。从表 8 中可以看出,肝脏 GOT 活力最大组为 E 组,最小组为

A 组,各试验组间差异不显著( $P>0.05$ );血清 GOT 活力最大组为 A 组,最小组为 B 组,A 组显著高于其它各组( $P<0.05$ )。

表 8 饲料中添加不同木薯渣样品对罗非鱼谷草转氨酶(GOT)活力的影响(U/100 ml)

组别	肝脏	血清
A	234.90±9.80	63.82±5.95 <sup>a</sup>
B	253.43±17.72	21.91±8.14 <sup>b</sup>
C	248.73±32.26	27.79±2.11 <sup>b</sup>
D	249.18±29.44	30.59±10.96 <sup>b</sup>
E	257.94±8.27	25.29±4.16 <sup>b</sup>

### 2.3.4 血红蛋白(Hb)

测定 5 个试验组鱼体全血血红蛋白含量,结果见表 9。试验组血红蛋白含量最高组为 E 组,显著高于 B、D 组( $P<0.05$ ),但与其它组间差异不显著( $P>0.05$ );含量最低的为 B 组,与其它各组差异显著( $P<0.05$ )。结果表明,不同的木薯渣样品对罗非鱼体血红蛋白含量存在一定的影响。

表 9 饲料中添加不同木薯渣样品对罗非鱼血红蛋白(Hb)活力的影响(g/l)

组别	血红蛋白含量
A	74.72±9.28 <sup>ab</sup>
B	60.30±6.29 <sup>c</sup>
C	74.48±11.17 <sup>ab</sup>
D	72.64±8.34 <sup>a</sup>
E	81.63±4.09 <sup>b</sup>

## 2.4 饲料中添加不同木薯渣样品对罗非鱼鱼体成分影响

各试验组鱼体全鱼、肌肉和肝脏组成成分见表 10。从表 10 可以看出,各试验组全鱼水分含量差异不显著( $P>0.05$ );全鱼粗蛋白以 C 组含量最高,为 60.44%±2.55%,显著高于 A、D 组( $P<0.05$ );粗脂肪含量以 D 组最高,为 23.69%±1.59%,各试验组无显著性差异( $P>0.05$ )。

各试验组鱼体肌肉水分含量以 C 组含量最高,但各试验组间差异不显著( $P>0.05$ );各试验组鱼体肌肉粗蛋白含量以 C 组含量最高,B 组含量最低,两组间差异显著( $P<0.05$ );各试验组粗脂肪含量差异不显著( $P>0.05$ )。

各试验组鱼体肝脏水分含量以 A 组最高,但各试验组间差异不显著( $P>0.05$ );各试验组鱼体肝脏粗蛋白含量以 E 组含量最高,B 组含量最低,两组间存在显著性差异( $P<0.05$ ),E 组与 A、C 组差异显著( $P<0.05$ ),B 组与 A、C、D 差异显著( $P<0.05$ );各试验组粗脂肪含量以 D 组含量最高,C 组含量最低,两组之间差异显

表 10 饲料中添加不同木薯渣样品对罗非鱼鱼体成分的影响(%)

组别	全鱼			肌肉			肝脏		
	水分	粗蛋白	粗脂肪	水分	粗蛋白	粗脂肪	水分	粗蛋白	粗脂肪
A	73.89±0.19	58.33±1.32 <sup>ab</sup>	22.91±1.27	78.87±0.73	89.43±1.17 <sup>ab</sup>	8.61±0.61	78.45±5.13	50.42±2.79 <sup>a</sup>	28.29±1.96 <sup>ab</sup>
B	73.54±1.23	59.58±2.55 <sup>bc</sup>	23.59±1.45	78.78±0.62	88.39±1.40 <sup>a</sup>	9.25±0.88	75.33±0.73	44.15±1.65 <sup>c</sup>	28.72±1.89 <sup>ab</sup>
C	74.84±1.80	60.44±2.55 <sup>c</sup>	22.78±1.04	78.98±0.38	89.69±0.82 <sup>b</sup>	8.64±0.69	78.25±3.93	49.93±2.48 <sup>a</sup>	27.49±1.50 <sup>a</sup>
D	73.25±0.81	57.24±1.41 <sup>a</sup>	23.69±1.59	78.62±0.11	88.69±1.39 <sup>ab</sup>	8.70±0.94	75.29±0.68	52.12±5.13 <sup>ab</sup>	30.29±2.65 <sup>b</sup>
E	73.67±1.23	58.84±1.28 <sup>abc</sup>	23.18±1.74	78.49±0.65	89.45±1.28 <sup>ab</sup>	9.07±0.52	77.62±2.59	54.56±4.80 <sup>b</sup>	28.77±2.14 <sup>ab</sup>

著( $P<0.05$ ),其余各组间差异不显著( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 罗非鱼的生长以及对5种发酵木薯渣样品饲料的利用

本试验5种发酵木薯渣样品饲料,对试验罗非鱼养殖均显示了较好的效果。成活率、增重率值较高,表明5种发酵木薯渣样品添加到饲料中,对鱼体没有产生不良影响,相反,在保证鱼体成活的同时,促进了鱼体的增重;从饲料利用效率上看,饵料系数均为1.5左右,表明5个试验组罗非鱼对饲料的利用率都比较高,摄食情况良好。从生长试验结果上看,A组养殖效果最优,成活率、增重率、特定生长率均最高,饵料系数低,木薯渣样品通过此种处理模式添加到配合饲料中,不仅满足了罗非鱼正常的生长需求,也大大降低了养殖成本,效果较好。

#### 3.2 罗非鱼形体生长效果

鱼体形体指标的评判,主要包括体重/体长关系、肥满度、脏体比、肝体比。体重/体长比反映鱼体单位体长的重量,值越大表明鱼体较肥;脏体比是鱼体内脏重量占体重的百分比,反映鱼体肌肉生长情况;肝体比反映了肝胰脏重占内脏重的百分比;肥满度是反映鱼体横向骨骼的生长情况<sup>[1]</sup>。本试验条件下,5个试验组鱼体的体重/体长、肥满度、脏体比和肝体比均无显著性差异,说明5种发酵木薯渣样品饲料对鱼体形体指标的影响上差异不显著( $P>0.05$ )。

#### 3.3 饲料中添加不同木薯渣样品对罗非鱼生理指标的影响

##### 3.3.1 非特异免疫力

鱼类属较低等的变温脊椎动物,其特异性免疫应答能力相对低下,因此,非特异性免疫在其免疫防御中具有重要意义,而溶菌酶和超氧化物歧化酶是鱼类行使其非特异性免疫反应的重要工具,它们对于保护鱼体,杀灭细菌发挥了重要的作用<sup>[2]</sup>。

水产动物体内的溶菌酶是一种重要的非特异性免疫防御因子,特别是鱼的生理防御水平的一个重要标志,也可体现病原菌及其它环境对鱼体健康的影

响。溶菌酶存在于鱼类的粘液、血清、吞噬细胞和单核细胞的胞浆内。溶菌酶通过酶解病原体细胞壁的粘多糖将其杀死,溶菌酶活力高,可以说明鱼体对外来异物的抵抗能力较强,因此,鱼体内溶菌酶的水平 and 活性,直接关系到鱼类的免疫功能和健康<sup>[3,4]</sup>。本试验中,各试验组罗非鱼血清、粘液溶菌酶活力存在一定的差异性,此结果反映出不同的木薯粉样品饲料,对于罗非鱼非特异性免疫力影响差异较大。

SOD作为一种特异性消除超氧自由基的循环酶,主要负责过氧化和噬菌作用造成的组织损伤的防御保护作用。SOD活性越高,说明其清除自由基的能力越强<sup>[5]</sup>。王雷等(1994)<sup>[6]</sup>的研究表明了SOD的活性与水生动物的免疫水平密切相关,对于增强吞噬细胞防御能力和整个机体的免疫功能具有重要作用,可作为水产动物机体的免疫性指标,与鱼类机体的健康有着密切的联系。通过试验可以发现,各试验组罗非鱼SOD酶活力差异不显著;并且通过整个养殖过程来看,鱼体健康状况良好,进而说明鱼体免疫系统功能正常,具有良好的抵抗、防御病害能力。

##### 3.3.2 肝脏生理机能

转氨酶是催化氨基酸氧化分解时氨基转移到 $\alpha$ -酮酸的酶,正常情况下主要存在于肝细胞内,在血清中的含量也很低。当组织中毒发生病变,或者受损伤的组织范围较大,引起生物膜通透性增加时,可导致细胞内转氨酶释放到血液中的量异常增加,从而引起血清中该酶浓度上升或活性突然持续性增强<sup>[7]</sup>。因此,在人体医学上以血清转氨酶活力大小作为肝功能是否正常的重要指标之一。本试验测定了5个组罗非鱼血清和肝胰脏的谷草转氨酶(GOT)活力,结果显示,试验罗非鱼肝脏转氨酶活力远高于血清转氨酶活力,各试验组鱼体肝脏未受到损害,肝功能正常;同时,试验结束取样解剖观察,发现鱼体肝脏颜色为紫红色,且柔韧有弹性,进而证实了上述观点。

##### 3.3.3 造血功能

血红蛋白是红细胞的主要成分,是对机体组织运输氧的关键成分。血红蛋白含量的多少直接影响到

鱼体整个生命活动能否正常运行的关键。血红蛋白含量和红细胞数量是反映鱼体是否贫血的重要指标,临床试验中常用血红蛋白含量来检测动物的造血机能<sup>[18,19]</sup>。本试验通过测定血红蛋白含量,来依此评价鱼体造血功能。结果显示,各试验组血红蛋白含量存在一定差异,个别组含量相对较低,从而影响了鱼体的造血功能。因此,对于木薯粉样品,不同的处理方式,在鱼体造血功能上表现出一定的差异性。

#### 3.4 罗非鱼常规营养成分分析

各试验组罗非鱼的全鱼、肌肉和肝脏水分含量差异不显著( $P>0.05$ ),而粗蛋白含量存在一定的差异性,此试验结果结合5种发酵木薯渣试验饲料基础配方营养成分组成来评价分析,由于基础饲料配方中B组样品饲料蛋白含量显著低于其它几个试验组,而从试验结果来看,B组的蛋白沉积量在肌肉和肝脏中也是最低的;粗脂肪含量在全鱼、肌肉中含量差异不显著( $P>0.05$ ),而在肝脏中粗脂肪含量存在差异性,表明不同的木薯粉样品饲料饲喂罗非鱼,鱼体肝脏对饲料脂肪的吸收、运转、代谢存在一定的差异性,具体影响原因,还有待进一步研究探讨。

#### 4 结论

木薯渣样品,经过一系列加工处理,不仅提高了木薯渣样品营养成分含量,同时添加到配合饲料中可被鱼体吸收利用,满足其正常的营养需求。综合评价,本试验5种发酵木薯渣样品,尤以A样品添加到饲料中养殖效果最佳,当然,本试验研究结果还有待进一步的验证。同时,应开展后续针对不同添加量的梯度试验等研究,从而指导实际生产,进而创造更大的价值。本项目重点在于开发新的饲料原料替代品——木薯渣,因此在木薯的应用和科技研究方面,它依然是一个待开发的作物资源;本项目的研究成果,也为后续的研究做一参考。

#### 参考文献

- [1] 李耀南. 国外木薯作饲料的利用与研究 [J]. 广东畜牧兽医科技, 1986(2):20-27.
- [2] 孙竹琬, 黄友鹰译. 用木薯作畜禽饲料 [J]. 国外畜牧科技, 1985(3):40-43.
- [3] 唐学成译. 国外木薯饲料的应用研究 [J]. 饲料研究, 1983(5):46-47.
- [4] Ademosun A A, Eshiett N O. Feeding cassava root meal to starter grower and laying chickens [J]. Trop Agr, 1980, 57(3):277-284.
- [5] Ngo T D, Nguyen T M, Ledin I. Effect of replacing a commercial concentrate with cassava hay (*Manihot esculenta* Crantz) on the performance of growing goats [J]. Animal Feed Science and Technology, 2005, 119:271-281.

- [6] 南京农业大学编. 饲料生产学 [M]. 北京:北京出版社, 1986:169-172.
- [7] 黎民伟, 唐明诗, 吴日辉. 用木薯代替玉米饲喂育肥猪试验 [J]. 饲料研究, 1990(7):18-20.
- [8] 唐靖. 甘薯及木薯粉能量饲料 [J]. 饲料研究, 1988(3):21-23.
- [9] Hulmmrk D. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyatophom cecropia* [J]. Eur Biochem, 1980, 10(6):7-16.
- [10] 叶元土. 水产动物的营养与饲料研究评价指标体系 [J]. 饲料广角, 2004(8):25-27.
- [11] 叶元土. 水产动物的营养与饲料研究评价指标体系 [J]. 饲料广角, 2004(20):19-21.
- [12] Christopher J Bayne, Lena Gerwick. The acute phase response and innate immunity of fish [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2001, (25):725-743.
- [13] 高晓莉, 岳淑芹, 王丽敏, 等. 重金属对鲢鱼肝组织 SOD 和 CAT 活性影响研究简报 [J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(4):56-59.
- [14] 徐延震, 王震龙, 宋憬愚. 鱼类的免疫机制 [J]. 中国兽药杂志, 1995, 29(4):57-60.
- [15] MUNOZ M, CEDENO R. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp *penaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 2000, 191:89-107.
- [16] 王雷, 李光友, 毛远兴. 口服免疫药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究 [J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(5):486-488.
- [17] 郑永华, 蒲富永. 汞对鲤鲫鱼组织转氨酶活性的影响 [J]. 西南农业大学学报, 1997, 19(1):41-45.
- [18] 黄国钧, 宋浩亮, 罗华菲, 等. 升白片对小鼠骨髓造血机能损伤的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2002(6):44-45.
- [19] 朱壮春, 史相国, 张淑杰, 等. 中药复方 II 对鲤鱼耐缺氧能力 RBC 及 HB 的影响 [J]. 淡水渔业, 2006(5):8-10.

#### 征订启事

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

#### 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,公开发行人,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

投稿信箱:tg@feedindustry.com.cn

Http://www.feedindustry.com.cn

# N<sup>+</sup>注入选育产 CLA 乳酸菌及其发酵条件的研究

蔡玉华 王彩玲 李有超 程曙光 高翔 陈佳 程茂基

共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)是一种在双键位置和几何构型上存在差异的亚油酸异构体混合物。许多研究表明,CLA 的特定异构体具有促进健康的潜在功能,如抗动脉粥样硬化(Nicolos,1997)、增强免疫功能(Hayek,1999)、减肥(Park,1979)等,同时,CLA 还被认为是皮肤刺瘤、乳腺癌、结肠畸变、前列腺瘤和试验动物体内、人体乳腺癌细胞组织扩散的潜在抑制剂(Visonnean,1997)。由于 CLA 特有的生理作用,因此对 CLA 产品、富含 CLA 的发酵食品有潜在的市场需求。

目前,CLA 的合成主要采用化学法,特别是亚油酸的碱法异构化,在工业上被广泛采用。但是,化学法得到的产物为一系列具有位置和几何异构体的共轭亚油酸混合物,除主要成分 9,11-及 10,12-异构体外,还有环化等副产物存在(Guo Zheng,2003);而生物法生成的异构体单一,反应条件温和,已逐步引起人们的重视。Lin(2003)等报道,乳酸菌可将游离亚油酸转化为共轭亚油酸,其机理主要为亚油酸在亚油酸异构酶作用下转化为共轭亚油酸。

近年来,离子注入应用于生物诱变技术已非常广泛,原因在于离子注入和其它常规的辐射诱变及化学诱变过程有着明显的差异,其它辐射诱变仅仅是利用能量交换,化学诱变考虑的也只是分子基团的交换,而离子注入生物体时同时存在能量沉积、质量沉积及电荷交换效应。由于注入的离子有不同电荷数、质量数、能量、剂量的组合,可以提供众多的诱变条件,使离子注入诱变具有突变范围广、突变程度高的特点,从而可以筛选到符合生产要求,产量提高的突变体。

本试验在利用 N<sup>+</sup>注入的方法,对本实验室从青贮中筛选得到的一株产 CLA 的植物乳杆菌 ANCLA01,并添加一定量的亚油酸进行诱变选育,以期得到一株

产共轭亚油酸较高的菌株 ANLP。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

植物乳杆菌(Lactobacillus plantarum),由本实验室在青贮中分离筛选所得,呈革兰氏阳性,短杆状,能在中性和偏酸的环境中生长,在亚油酸诱导下合成亚油酸异构酶。

### 1.2 培养基

发酵培养基(MRS 液体培养基):蛋白胨 10.0 g、Tween-80 1.0 ml、牛肉提取物 10.0 g、柠檬酸氢二铵 2.0 g、葡萄糖 5.0 g、乙酸钠 5.0 g、酵母提取物 5.0 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g、MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.05 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g,配成 1 L 的溶液,初始 pH 值为 6.8,121 °C,灭菌 20 min。

计数培养基(MRS 固体培养基):在 1L 的 MRS 液体培养基中添加琼脂 20 g。

### 1.3 种子液培养方法

挑取平板中的单个菌落(原始菌株)接入 250 ml 的三角烧瓶装 100 ml 的 MRS 液体培养基,在 37 °C,120 r/min 下恒温振荡培养 24 h。然后以 4%的接种量将活化的种子液接种于 250 ml 的三角烧瓶装 100 ml 的 MRS 液体培养基中(加 0.1%的亚油酸,诱导亚油酸异构酶的生成)进一步活化。

### 1.4 共轭亚油酸的提取

发酵液中 CLA 的提取:1 ml 发酵液添加 2 ml 异丙醇和 1.5 ml 正己烷提取 3 min,经 5 000 r/min、10 min 离心,吸取上面的正己烷层。蒸馏水洗涤正己烷层,再经无水硫酸钠干燥后,用氮气将正己烷吹干,得脂肪酸提取物。

将上述脂肪酸提取物用 5 ml 正己烷溶解,在 233 nm 下测定吸光度。测定时用正己烷做空白。

### 1.5 共轭亚油酸的检测

共轭亚油酸的检测采用紫外分光光度法。其原理为:因为 CLA 在 233 nm 处有最大吸收峰,而 LA 没有,所以可用 TU-1901 双光束紫外分光光度计按浓度由低到高的顺序分别测定 233 nm 处的吸光度(ABS),每次测定必须用正己烷调零,再根据标准曲线即可求得 CLA 的含量。

### 1.6 标准曲线及回归公式的建立

以正己烷为溶剂,将 CLA 标样配成 4、8、12、15.5、19.5、23、27、31 μg/ml 等不同浓度的溶液,以正己烷为

蔡玉华,安徽农业大学动物科技学院,230036,安徽农业大学动物科技学院 107 室。

王彩玲,郑州牧业工程高等专科学校。

李有超、程曙光、高翔、陈佳、程茂基(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2008-01-21

★ 2006 年国家自然科学基金资助项目(30671526)“青贮中 CLA 高产菌株的选育及其分子机理的研究”

参比,在 233 nm 处测定其吸收值,以 CLA 浓度( $\mu\text{g/ml}$ )为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。

线性回归方程: $y=0.0833x-0.0915$ , $R^2=0.9942$ ;  
线性范围:0~35  $\mu\text{g/ml}$ 。

式中: $y$ ——吸光度;

$x$ ——CLA 浓度( $\mu\text{g/ml}$ )。

### 1.7 离子注入方法与参数选择

离子注入前须用紫外灯对离子注入仪真空小靶室持续消毒 30 min,再将平皿置于小靶室内,按照所设置的 N<sup>+</sup>注入剂量和能量进行。

注入离子为 N<sup>+</sup>,能量为 5~25 keV,注入靶室的真空度为  $10^{-3}$  Pa,试验组采用间歇式脉冲,脉冲剂量为  $10^{13}$  N<sup>+</sup>/cm<sup>2</sup>,每次连续注入 5 s,间隔 55 s,再进行下一次注入;总剂量为 0(对照)~ $120 \times 2.6 \times 10^{13}$  N<sup>+</sup>/cm<sup>2</sup>。

将制备好的乳酸菌细胞菌悬液取 0.1ml 均匀涂布在直径为 9 cm 的无菌空白平皿中央,置于超净台下由无菌风吹干。经不同剂量注入离子后用 1 ml 无菌水洗下,适当稀释后,吸取 0.1 ml 涂布平板培养基的平皿。恒温 37  $^{\circ}\text{C}$ ,倒置培养 72 h 后计数,真空对照组经同样处理,不经离子注入。

### 1.8 诱变筛选工艺

将经过离子注入处理并由平板上长出的菌落挑取并接入种子培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 24 h 后,以 4%的接种量接到发酵培养基(添加一定量的亚油酸诱导共轭亚油酸的生成)中,筛选出产量较高的菌株再进行下次 N<sup>+</sup>注入并作稳定性试验。

### 1.9 乳酸菌突变率的测定

乳酸菌经过离子注入并培养后,随机挑选 20 株菌落,转接斜面恒温 30  $^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h 后,按  $10^7$  个/瓶细菌接种基础发酵培养基,30  $^{\circ}\text{C}$ 培养 50 h,测定 CLA 含量。诱变菌株产酸量的增幅(%)=(诱变菌株的产酸量-对照菌株产酸量)/对照菌株产酸量 $\times 100$ 。如增幅为+10%~-10%,为无义突变;低于-10%,为负突变;高于+10%,为正突变。

## 2 结果与分析

### 2.1 离子注入参数的确定

#### 2.1.1 离子注入能量对乳酸菌存活率及正突变率的影响(见图 1)

细胞存活率(%)=单位体积注入处理细菌存活数/单位体积真空对照细菌存活数 $\times 100$ 。

如图 1 所示,不同能量下菌株的正突变率随能量增加有缓慢升高的趋势,由于存活率太高时,正突变率低,所以不易筛选,存活率太低时虽然正突变率高

但可选菌株不多,综合考虑,选 10 keV 为能量参数。

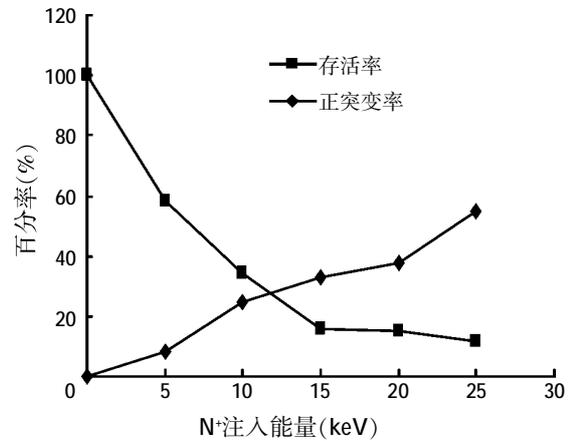


图 1 N<sup>+</sup>注入能量对乳酸菌存活率及正突变率的影响

#### 2.1.2 离子注入剂量对乳酸菌存活率及突变率的影响(见图 2、图 3)

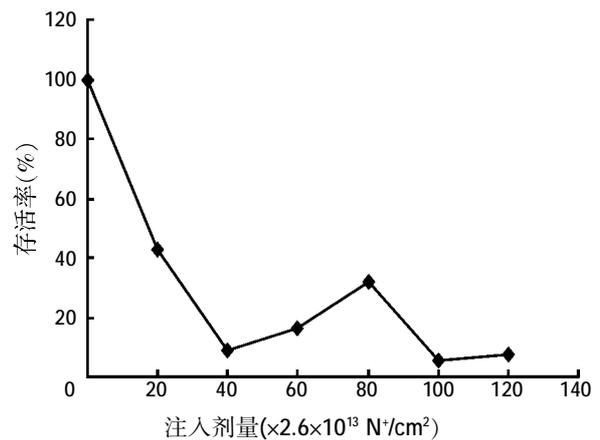


图 2 N<sup>+</sup>注入剂量对乳酸菌存活率的影响

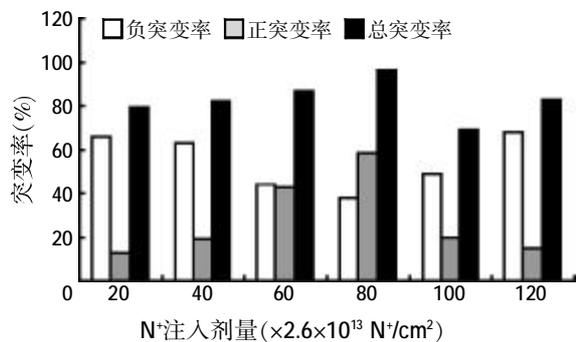


图 3 N<sup>+</sup>注入剂量对乳酸菌突变率的影响

从图 2 可见,注入剂量在(0~40 $\times 2.6 \times 10^{13}$ )N<sup>+</sup>/cm<sup>2</sup>之间时,随着注入剂量的增大被注入的乳酸菌存活率急剧下降,当注入剂量为 40 $\times 2.6 \times 10^{13}$  N<sup>+</sup>/cm<sup>2</sup>时,存活率下降到 8.79%; 然后随注入剂量的加大又有所回

升,到  $80 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+/\text{cm}^2$  时,存活率达 31.86%;随之存活率又下降渐趋稳定,整个存活率也为典型的“马鞍型”曲线,与蔡守平等报道相一致,其利用 N<sup>+</sup>注入球孢白僵菌,得出存活率呈典型的“马鞍型”剂量-效应曲线。另外,曹小红等研究也发现了类似的现象。

现代育种理论认为,当被诱变的微生物存活率在 25%~30%时,目标性状的正向突变率往往较高,而更低的存活率下,虽然突变率可能提高,但负突变率往往也很高,而正突变率却很低。从图 2 可看出,在 10 keV 下,注入剂量在  $80 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+/\text{cm}^2$  时存活率为 30% 左右,因此,选用 10 keV、 $80 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+/\text{cm}^2$  为乳酸菌低能 N<sup>+</sup>注入的适宜参数。

从图 3 中可以看出,正突变率为先上升后下降,而负突变率为先下降后上升,我们应选择正突变率和总突变率都较高而负突变率相对较低的剂量进行下次注入。因此,选剂量为  $80 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+/\text{cm}^2$  是合理的。  
**2.2 出发菌株 ANCLA01 和诱变菌株 ANCLA 的形态比较**



图 4 诱变前后菌体细胞形态变化

离子束诱变可以引起菌株发生多方面的变化,最直观的表现就是,菌体形态变异和菌种生长发育过程的改变。试验表明,诱变菌株菌体形态的变异要高于

自然分离的情况,并会产生多种形态的变异。

采用革兰氏染色法对出发菌株和诱变菌株的形态进行观察,镜检结果表明,此菌株为革兰氏阳性菌,无芽孢,不运动,呈单体、队列或短链状。

**2.3 诱变菌株产 CLA 培养条件的优化**

**2.3.1 亚油酸添加量对 CLA 生成量的影响**

分别在 250 ml 三角瓶中,装入 100ml MRS 培养基,LA 添加量分别为 0.04%、0.06%、0.08%、0.1%、0.12%和 0.14%。接种后,30 ℃下培养 28 h,检测发酵液中 CLA 产量。结果如图 5。

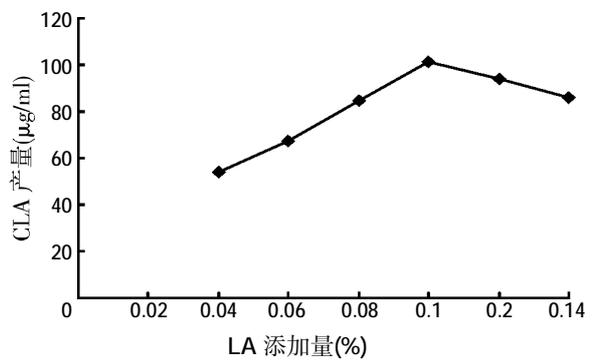


图 5 LA 添加量对 CLA 产量的影响

从图 5 中可以看出,最佳 LA 添加量为 0.1%,CLA 产量达到 101.24 μg/ml。但当亚油酸浓度超过 0.1% 时,ANLP 生长开始受到抑制,可能是因为亚油酸浓度已超出 ANLP 的解毒能力;当 LA 浓度低于 0.1% 时,CLA 生成量随 LA 浓度增高而逐渐增大,由于同时 LA 对菌体的毒性越来越大,当 LA 浓度超过 0.1% 时,CLA 产量又逐渐下降。

**2.3.2 接种量对 CLA 生成量的影响(见图 6)**

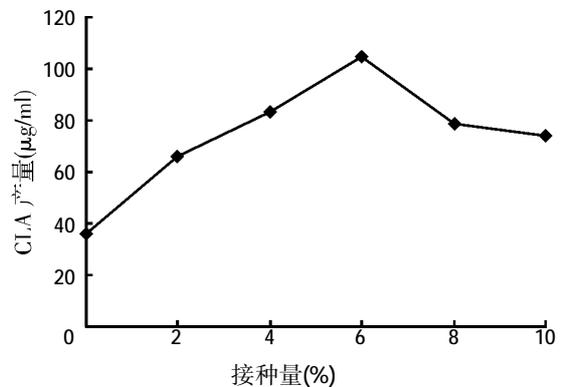


图 6 接种量对 CLA 产量的影响

由图 6 可以看出,接种量为 6% 时,CLA 产量最高为 104.87 μg/ml。但接种量在 4%~8% 之间对 CLA 产量影响并不明显。因此,在以后的试验中可按照 6% 的

接种量进行。

### 2.3.3 最佳培养温度的确定

分别在 250 ml 三角瓶中, 装入 100 ml MRS 培养基, 各加入 0.1 ml 亚油酸, 调整温度在 12~48 °C 之间, 分别在不同温度下培养 28 h, 测定 CLA 产量。根据 CLA 产量, 确定最佳培养温度。结果见图 7。

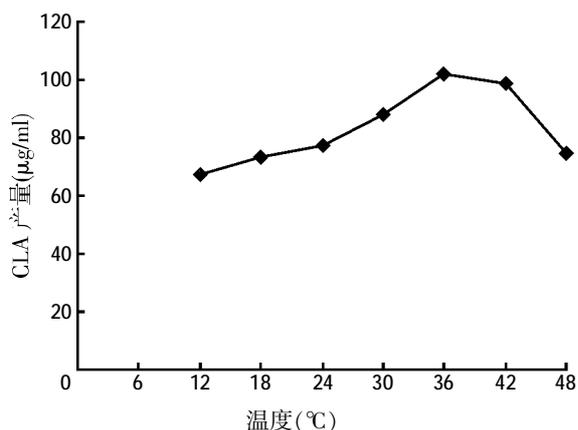


图 7 温度对 CLA 产量的影响

从图 7 中可以看出, 温度在 30~42 °C 之间, 有利于 CLA 的生成。最佳培养温度为 36 °C。

### 2.3.4 最佳培养时间的确定

分别在 250 ml 三角瓶中, 装入 100 ml MRS 培养基, 各加入 0.1 ml 亚油酸, 在 36 °C 下培养不同时间之后, 测定 CLA 产量。根据 CLA 产量, 确定最佳培养时间。结果见图 8。

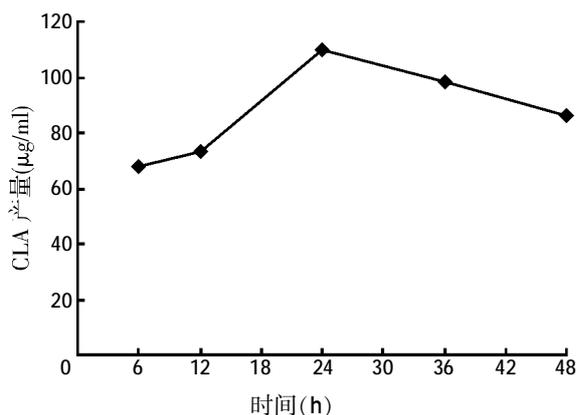


图 8 时间对 CLA 产量的影响

从图 8 中可以看出, 最佳培养时间为 24 h, 但 18~36 h 之间对 CLA 的生成量影响不大。

### 2.3.5 最佳培养 pH 值的确定

分别在 250 ml 三角瓶中, 装入 100 ml MRS 培养基, 各加入 0.1 ml 亚油酸, 调整 pH 值在 4.5~10.5 之

间, 于 36 °C 下培养 24 h 之后, 测定 CLA 产量。根据 CLA 产量, 确定最佳初始 pH 值。结果见图 9。

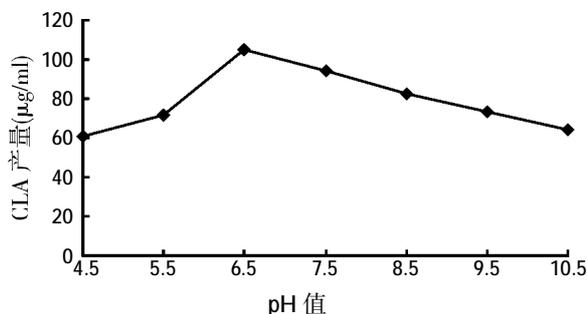


图 9 pH 值对 CLA 产量的影响

从图 9 可以看出, 最佳初始 pH 值为 6.5 左右, 而此培养基初始 pH 值在 6.8 左右, 所以在以后的试验中不需要调 pH 值, 以培养基最初的 pH 值为最佳培养 pH 值。

### 2.4 突变菌株产 CLA 稳定性研究(见表 1)

表 1 突变菌株 ANLP 产 CLA 性能遗传稳定性试验

项目	出发株	突变株					均值
		F1	F2	F3	F4	F5	
CLA 产量(µg/ml)	44	103.26	98.37	87.83	93.43	94.95	95.57

从表 1 可知, 突变株 ANLP 产 CLA 由出发株 ANCLA01 的 44 µg/ml 提高到 95.57 µg/ml, 提高了 117%, 经产酸稳定性传代试验, 突变株 ANLP 表现为产酸性能稳定。

## 3 结论

3.1 通过 N<sup>+</sup>注入产共轭亚油酸的植物乳酸菌, 得乳酸菌存活率曲线为典型的“马鞍型”曲线。并确定 N<sup>+</sup>最佳注入参数为: 能量为 10 keV, 剂量为 80×2.6×10<sup>13</sup> N<sup>+</sup>/cm<sup>2</sup>, 经过多次诱变得得到 1 株 CLA 产量为 95.57 µg/ml 的高产菌株 ANLP。经稳定性试验表明, 其产 CLA 性能较稳定。因此, 通过 N<sup>+</sup>注入植物乳酸菌选育产 CLA 的高产菌株是有效的。

3.2 通过革兰氏染色后显微镜下观察发现诱变后的菌体较出发菌株粗壮, 生长速度也加快, 与平板试验相吻合。

3.3 对高产菌株 ANLP 产 CLA 的发酵条件进行优化后, 高产菌株产 CLA 量有了进一步提高。优化的条件为: 250 ml 三角瓶中, 装入 100 ml MRS 培养基, 亚油酸添加量为 0.1 ml, 接种量为 6%, 培养温度 36 °C, 培养时间 24 h, pH 值 6.8。

(参考文献 11 篇, 刊略, 需者可函索)

(编辑: 王 芳, xfang2005@163.com)

# 贮存时间和方法对乳猪袋装流质饲料中 维生素和微生物含量影响研究初报

何余湧 陆伟 胡善辉 谢国强 王仁华 刘晓兰

**摘要** 为开发袋装流质饲料,将自来水和哺乳乳猪全价配合粉料按 4:1 比例装入蒸煮袋内后用封口机封口,浸泡 40 min 后立即将蒸煮袋放入温度为 90 ℃的蒸饭箱内在常压下用蒸汽蒸煮 40 min,并分别测定第 1、15 和 30 d 哺乳乳猪袋装流质饲料中的维生素和微生物含量;另外,将哺乳乳猪袋装流质饲料开袋后分别放在猪场内和冰箱内(6 ℃),测定第 24 h 后袋内哺乳乳猪流质饲料微生物含量。结果表明:蒸煮和延长贮存时间会降低袋装流质饲料中维生素的含量,同时蒸煮可有效杀灭饲料中的微生物,但随着贮存时间的延长,有些微生物的活性增强。

**关键词** 贮存时间和方法;乳猪袋装流质饲料;维生素

中图分类号 S828

Studies on the effect of storage time and method on content of vitamins and tract elements in porket liquid feed in bag

He Yuyong, Lu Wei, Hu Shanhu, Xie Guoqiang, Wang Renhua, Liu Xiaolan

**Abstract** In order to develop a plastic-bagged liquid feed, water and complete feed of suckling piglet were put into plastic bag at a ratio of 4:1, sealed the bag and soaked for 40 min, put the bag into a steamer and cooked with steam at 90 ℃ under normal pressure for 40 min in order to measure the content of vitamins and microbes of liquid feed respectively at 1st,15th and 30th after cooked; in the meaning time we stored the liquid feed after the bag opened 24 h later in different ways (in piggery condition vs 6 ℃ refrigerator)to measure the microbes content.Results indicated that:cooking and a prolonged storage decreased the content of vitamins of the liquid feed, cooking with steam can effectively reduced the numbers of micobes but some kinds of microbes still growed during the storage period.

**Key words** storage time and methods;porket liquid in bag;vitamins

哺乳乳猪的早期补料已得到了广泛的应用,这对于提高哺乳乳猪的生长性能和减少乳猪的早期断奶应激有十分重要的意义,为此,许多科研工作者进行了哺乳乳猪开食料和过渡料方面的研究,其中包括如何减少加工对乳猪料中维生素的破坏和降低饲料中病原微生物的含量。

目前关于调质、膨化和制粒对饲料中维生素和病原微生物影响的研究很多,但未见有关于加工对哺乳乳猪袋装流质饲料中维生素和病原微生物影响方面的报道。

在生产哺乳乳猪袋装流质饲料时,袋内饲料中的

病原微生物得到了一定的杀灭,更重要的是因为这种袋装流质饲料在蒸煮前已被封口,蒸煮后它在贮存和运输过程中不会有再次被病原微生物污染的机会。但这种加工工艺对袋装流质饲料中的维生素的破坏有多大;对病原微生物的杀灭效果如何;不同贮存时间对袋装流质饲料中维生素和微生物的影响怎样,这些问题都需要得到解决,只有解决了这些问题,哺乳乳猪袋装流质饲料的生产才能得到广泛的推广应用。

哺乳乳猪袋装流质饲料的配制需解决以下几个关键技术:一是流质饲料中的有效维生素含量问题。饲料制粒时为防止对维生素的破坏可以采用后喷涂技术,而生产流质饲料时维生素在水的介质中受到热、矿物质和微量元素的作用其效价会降低或丧失,因此要弄清加工工艺和保存时间对流质饲料中维生素的影响程度。二是微生物在袋装流质饲料贮存过程中的繁殖情况。由于流质饲料中水的大量存在,饲料中又有丰富的营养物质,这给微生物的繁殖提供了有

何余湧,江西农业大学动物科学技术学院,副研究所,330045,南昌。

陆伟(通讯作者)、胡善辉、谢国强、王仁华、刘晓兰,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-12-27

利条件。90℃常压条件下蒸煮40 min能否有效杀灭流质饲料中的微生物,贮存过程中微生物的繁殖情况又是如何,是否会对流质饲料的保存期产生影响。

本试验主要是通过研究90℃常压条件下蒸汽蒸煮对封口蒸煮袋内流质饲料中维生素和微生物含量的影响以及不同保存时间、方法对流质饲料中维生素和微生物的影响,得到哺乳乳猪袋装流质饲料的加工贮存技术,为哺乳乳猪袋装流质饲料的实际生产进一步提供参考。

## 1 试验方法

### 1.1 哺乳乳猪全价粉料的配制与处理

#### 1.1.1 哺乳乳猪全价粉料配方(见表1)

表1 哺乳乳猪全价粉料配方(%)

项目	大米	次粉	大豆	鱼粉	乳糖	预混料
含量	50	10	31	3	2	4

#### 1.1.2 哺乳乳猪全价粉料的配制

将大米和豆分别用1.0 mm的筛片进行粉碎,然后按表1配方将各种原料计量后混在一起并搅拌均匀。

#### 1.1.3 哺乳乳猪袋装流质饲料的加工

##### 1.1.3.1 蒸煮前的准备

往煮饭箱内输入蒸汽,调节输入蒸汽用量使煮饭箱内温度恒定在90℃。

##### 1.1.3.2 哺乳乳猪袋装流质饲料的配制与蒸煮

往蒸煮袋内装入哺乳乳猪全价配合粉料50 g,按1:4的比例往袋内加入自来水,然后用封口机封口,浸泡40 min后立即将蒸煮袋放入煮饭箱内在常压下蒸煮40 min。

### 1.2 不同处理对哺乳乳猪袋装流质饲料中维生素含量的影响

#### 1.2.1 蒸煮前后饲料中维生素含量的变化

按1.1.2节配制好粉料后取150 g样品用样品袋装好并封口,用于测定粉料中VA、VD、VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub>和VB<sub>6</sub>的

含量;从1.1.3.2节中取1袋用于测定在本试验条件下蒸煮对饲料中VA、VD、VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub>和VB<sub>6</sub>含量的影响。

#### 1.2.2 不同保存时间对哺乳乳猪袋装流质饲料中维生素含量的影响

从1.1.3.2节中取3袋流质饲料用于测定不同保存时间对哺乳乳猪袋装流质饲料中维生素含量的影响,保存时间分为1、15和30 d,分别取样测定各保存时间点样品中VA、VD、VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub>和VB<sub>6</sub>的含量。

### 1.3 不同处理对哺乳乳猪袋装流质饲料中微生物含量的影响

#### 1.3.1 蒸煮对哺乳乳猪袋装流质饲料中微生物含量的影响

按1.1.2节配制好粉料后取150 g样品用样品袋装好并封口,用于测定粉料中酵母菌、金黄色葡萄球菌、霉菌和细菌总数;从1.1.3.2节中取1袋用于测定在本试验条件下蒸煮对饲料中酵母菌、金黄色葡萄球菌、霉菌和细菌总数含量的影响。

#### 1.3.2 不同保存时间对哺乳乳猪袋装流质饲料中微生物含量的影响

从1.1.3.2节中取3袋流质饲料用于测定不同保存时间对哺乳乳猪袋装流质饲料中微生物含量的影响,保存时间分为1、15和30 d,分别取样测定各保存时间点样品中酵母菌、金黄色葡萄球菌、霉菌和细菌总数。

#### 1.3.3 开袋状态下不同贮存方法对哺乳乳猪袋装流质饲料中微生物含量的影响

假设哺乳乳猪袋装流质饲料开袋后不能用完,需过夜放置。在猪场环境条件下设置2种不同的保存方法:一种是开袋后在自然状态下放置;一种是放入6℃的冰箱内冷藏,研究这两种贮存方法对未用完的哺乳乳猪袋装流质饲料中微生物含量的影响。

#### 1.4 记录样品贮存期间室内温度变化

每天早上8:00、中午1:00和晚上19:00各记录1次温度,取3次温度的平均值作为日平均温度,结果见图1。

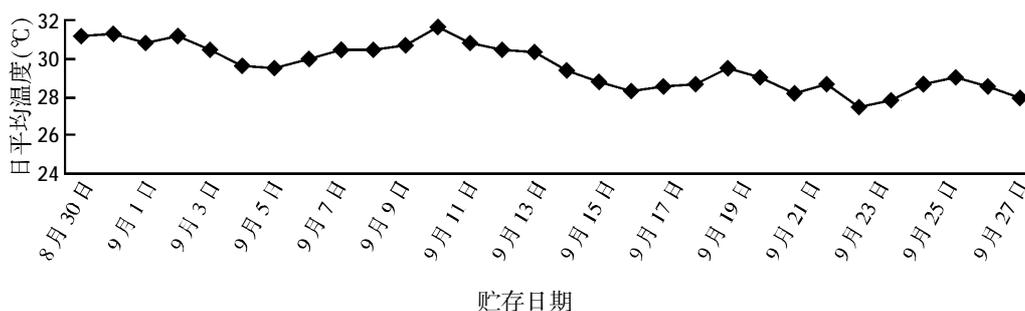


图1 室内日平均温度变化曲线

### 1.5 样品中维生素和微生物含量的分析

样品中维生素的含量送江西省分析测试中心进行检测,样品中微生物的含量送江西省南昌市卫生防疫站进行检测。指标检测是以全价配合料为基础。

## 2 结果

### 2.1 蒸煮对哺乳乳猪袋装流质饲料中维生素含量的影响(见表 2)

表2 蒸煮对哺乳乳猪袋装流质饲料中维生素含量的影响( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )

项目	VA	VD	VB <sub>1</sub>	VB <sub>2</sub>	VB <sub>6</sub>
蒸煮前	273	未检出	未检出	942	未检出
蒸煮后	75.5	16.4	未检出	198	未检出

### 2.2 不同贮存时间对哺乳乳猪袋装流质饲料中维生素含量的影响(见表 3)

表3 不同贮存时间对哺乳乳猪袋装流质饲料中维生素含量的影响( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )

项目	VA	VD	VB <sub>1</sub>	VB <sub>2</sub>	VB <sub>6</sub>
第 1 d	75.5	16.4	未检出	198	未检出
第 15 d	64.0	未检出	未检出	未检出	未检出

表 3 数据表明:随着贮存时间的延长,袋装流质饲料中 VA、VD 和 VB<sub>2</sub> 的含量降低,至第 15 d 时已未能检测出流质饲料中 VD 和 VB<sub>2</sub> 的含量。因第 15 d 时,只检出 VA 含量而其它维生素未能检出,故未对第 30 d 的样品进行维生素含量测定。

### 2.3 蒸煮对哺乳乳猪袋装流质饲料中微生物含量的影响(见表 4)

表4 蒸煮对哺乳乳猪袋装流质饲料中微生物含量的影响(cfu/g)

项目	酵母菌	金黄色葡萄球菌	霉菌	菌落总数
蒸煮前	<10	未检出	20	27 000
蒸煮后	<10	未检出	<10	1 400

从表 4 结果可以看出,蒸煮可有效杀灭饲料中的霉菌并使饲料中总的菌落数减少。

### 2.4 不同贮存时间对哺乳乳猪袋装流质饲料中微生物含量的影响(见表 5)

表5 不同贮存时间对哺乳乳猪袋装流质饲料中微生物含量的影响(cfu/g)

项目	酵母菌	金黄色葡萄球菌	霉菌	菌落总数
第 1 d	<10	未检出	<10	1 400
第 15 d	<10	未检出	<10	140 000
第 30 d	<10	未检出	10	1 200 000

表 5 数据表明,随着贮存时间的延长,袋内流质饲料中的酵母菌数量均小于 10 cfu/g,霉菌的数量在

第 15 d 后呈增加的趋势,总的菌落数呈线性增加。

### 2.5 开袋状态下贮存方法对袋装流质饲料中微生物含量和气味的影响(见表 6)

表6 开袋状态下贮存方法对袋装流质饲料中微生物含量的影响(cfu/g)

项目	酵母菌	金黄色葡萄球菌	霉菌	菌落
室内放置	<10	未检出	40	610
冷藏(6℃)	<10	未检出	<10	70

开袋状态下室内放置时袋装流质饲料有馊味,而其在冷藏情况下无馊味。

### 2.6 不同保存期袋装流质饲料的形态、颜色、气味和味道变化(见表 7)

表7 流质饲料的形态、颜色、气味和味道变化

项目	形态	颜色	气味	味道	pH 值
第 1 d	稠状	黄白	清香,无异味	微甜,适口性好	5.43
第 15 d	稀	淡黄	异味较淡,无馊味	适口性一般	5.48
第 30 d	很稀	较黄	异味较浓,无馊味	适口性较差	5.39

## 3 讨论

### 3.1 蒸汽蒸煮和贮存对袋装流质饲料中有效维生素含量的影响

饲料中的维生素由于受水、热、微量元素、摩擦和压力等的作用,会遭到不同程度的破坏,特别是热敏感性维生素,如 VA、VD、VB<sub>1</sub>、VB<sub>6</sub> 和 VC 等是最容易受到破坏。随着制粒温度的上升和制粒时间的延长,各种维生素的存留量随之下降,其中维生素 E、抗坏血酸、亚硫酸氢钠甲萘醌复合物(MSBC)、亚硫酸二甲嘧啶甲萘醌(MPB)、盐酸硫胺下降较为显著;加工工艺条件的不同,各种维生素的损失率差异也较大,但总的看来,VC、VK、VB<sub>1</sub>、VB<sub>6</sub>、VA、VE 和 VD 较为敏感,其中 VC 和 VK<sub>3</sub> 损失率可达 75%~80%。为了减少制粒及膨化对这些维生素的破坏,人们对这些维生素进行包被处理或采用后喷涂技术添加维生素以保证动物能从饲料中获得足够的维生素。

本试验是在 90℃常压条件下对袋装流质饲料加热 40 min,以降低饲料原料中特别是生大豆中抗营养因子的破坏作用并提高饲料中营养物质的消化吸收率。由于袋内水和微量元素的存在,在蒸汽热的作用下,热敏感性维生素受到了不同程度的破坏,同时,试验结果表明延长贮存时间会降低袋内热敏感性维生素的有效含量。热敏感性维生素含量的降低是否会对哺乳乳猪和断奶后保育期仔猪的健康和生产性能产生影响,另外,不同贮存温度对袋内饲料中维生素效价影响的差异,这些问题还有待于在今后的饲养试验和其它试

验中进行研究。

### 3.2 蒸汽蒸煮和贮存对袋装流质饲料中微生物含量的影响

饲料通过调质、膨化和制粒处理后能在一定程度上杀灭饲料中的病原微生物,然而,无论温度如何,颗粒饲料在接受了热处理后都必须被冷却以排除过量的热和水分,颗粒料在制成后的任何阶段接触到病原菌都很容易被再次污染,如在冷却至包装阶段,因管道中的残留饲料长期得不到清除,很容易滋生病原菌;另外,现有的颗粒饲料包装时袋口不是封口而是缝口,袋口留有较多缝隙,在运输和贮存阶段也很容易受到病原菌的污染,因此降低了调质、膨化和制粒过程中热处理的优势。

生产袋装流质饲料时是把饲料和水装入袋内进行封口处理,然后再用蒸汽在一定温度下蒸煮一定时间,这种处理可有效防止冷却、运输和贮存过程中病原菌的再次污染,同时试验数据表明 90℃常压蒸煮 40 min 可以较好地杀灭袋内流质饲料中的一些微生物。随着贮存时间的延长,霉菌群落数和菌落总数均呈增加趋势,但到第 30 d 为止,这两种微生物的含量仍均小于国家《饲料卫生标准》中的规定量。

在实际生产中,会出现开袋后的流质饲料当天不能全部用完的情况,要过夜放置。本试验设置了 2 种保存方法,研究它们对袋内微生物的含量的影响。结果表明,自然状态下室内放置时流质饲料中的霉菌和菌落总数均比冷藏时要高且有馊味,而冷藏的流质饲料则没有馊味。

### 3.3 贮存时间对袋装流质饲料形态、气味和适口性的影响

因袋装流质饲料中含有大量的水和脂肪,用本试验加工参数生产的袋装流质饲料其保质期长短,主要受以下 3 个因素影响:一是 90℃常压蒸煮 40 min 能否全部杀灭饲料中的微生物,如果不能,则在贮存期间这些微生物就会利用袋内的水和营养物质进行繁殖,达到一定程度时引起饲料变质;二是这种加工工艺的灭酶效果如何,如果不能对饲料中的酶进行有效灭活,则在水的介质中酶就可氧化分解饲料中的营养物质,产生不良气味,使适口性变差;三是因饲料中含有较大比例的豆油,豆油发生氧化酸败的程度如何?还有就是刚蒸煮出来的流质饲料呈稠状,放置一定时间后,流质饲料的液化程度有多大?

通过袋装流质饲料在贮存期间的形态、颜色、气味、味道和 pH 值发生的一些变化表明:随着贮存期的

延长,流质饲料的形态由稠状逐渐变稀,颜色由黄白色变为黄色,这主要是由大豆内油脂和水的大量渗出引起的;流质饲料的气味也由清香逐渐变成异味,但没有馊味味道,适口性也变差,异味和适口性差可能是由于油脂氧化酸败、酶分解及某些细菌作用所产生的一些物质所引起的。

## 4 小结

4.1 本试验加工条件和配方不能较长时间地保存袋装流质饲料,需进一步从添加剂方面考虑如何延长袋装流质饲料的保质期。

4.2 应进一步研究如何阻止流质饲料中油脂和水分的渗出,以避免流质饲料的形态发生大的改变而影响其保质期和饲喂效果。

4.3 在高温季节,如有开袋而未及时用完的流质饲料要过夜保存,建议用小冰柜冷藏保存。

## 参考文献

- [1] 邓春来,邓斌,张曦.热敏性营养素在饲料加工中的损失及其后添加方法[J].饲料博览,2004(4):39-40.
- [2] 高星.饲料加工及组成对维生素稳定性的影响[J].国外畜牧科技,1997,24(2):24-25.
- [3] 刘勇.饲料霉变的预防、控制及处理[J].饲料研究,2005(5):32-33.
- [4] 李朕杰,戴志明,陈金生.液体饲料腐败变质的因素与对策[J].饲料与畜牧,2005(4):15-17.
- [5] 刘虹,谢春伏,李庆锁.饲料霉菌污染的综合防制[J].贵州畜牧兽医,2005,29(5):34-35.
- [6] 刘梅英,熊先安,宗力.饲料加工对营养的影响及研究方向[J].饲料研究,2000(1):26-29.
- [7] 栾玉静,杨在宾.颗粒饲料的优缺点及应用注意事项[J].中国饲料,2004(3):42.
- [8] 史清河.加工工艺对饲料营养价值与畜禽生产性能的影响[J].中国饲料,2000(2):27-29.
- [9] 王红英,翟洪玲.加工工艺对饲料中维生素影响的研究进展[J].粮食与饲料工业,2003(11):14-16.
- [10] 王红英,翟洪玲,徐英英.维生素营养成分在配合饲料加工过程中的变化规律研究[J].粮食与饲料工业,2004(12):31-33.
- [11] 杨红军,时建忠,顾宪红.制粒和膨化对饲料营养成分的影响[J].中国饲料,2006(17):32-35.
- [12] Marchetti M, Tossani N, Marchetti S, et al. Stability of Crystalline and Coated Vitamins During Manufacture and Storage of Fish Feeds[J]. Aquaculture Nutrition, 1999(5):115-120.
- [13] 李朕杰,戴志明,白杰.超早期断奶仔猪液态饲料的加工技术研究初报[J].饲料工业,2006,27(1):42-46.
- [14] Michael Coelho. Problems from processing: How to ensure vitamin stability[J]. Feed Management, 2001(52):17-18.
- [15] 张贤群.控制饲料中的有毒物质[J].国外畜牧-猪与禽,2006,26(3):12-18.

(编辑:沈桂宇, [guiyush@126.com](mailto:guiyush@126.com))

# 产朊酵母菌利用烤鳊蒲烧废水产单细胞蛋白的研究

吴立根 郑虹 陈盛

**摘要** 以产朊酵母菌(*Candida utilis*)为出发菌,利用烤鳊蒲烧废水生产单细胞蛋白(SCP)。试验考察了有关接种量、发酵时间、温度、酸碱度、氮源、磷源及无机盐金属离子等影响因素。结果表明:接种量15%、发酵时间为48 h、pH值5.0、温度25℃、5.04 g/l 硝酸钾、40 ml的装液量、0.1 g/l 磷酸氢二钠、0.1 g/l 硫酸锌为其最佳条件。

**关键词** 单细胞蛋白;产朊酵母菌;烤鳊蒲烧废水

**中图分类号** S816.3

单细胞蛋白又称生物菌体蛋白或微生物蛋白,是指酵母菌、真菌、霉菌、非致病性细菌等单细胞微生物体内所产生的菌体蛋白质。微生物生产单细胞蛋白不仅来源广泛,如废水(酒精废水、造纸废液、啤酒废水等)、废弃的有机固体(玉米淀粉、马铃薯渣等),而且还具有成本低、生产周期短等优点。

烤鳊工艺可分为剖杀、白烧、蒲烧段3个工艺,它们分别可产生剖杀废水、白烧废水、蒲烧废水,这些废水对环境具有一定的污染。经过初步试验筛选,本试验利用烧鳊工艺中产生的蒲烧废水作为产单细胞蛋白的研究对象,以期为废物资源化做一些基础工作。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株来源

产朊酵母菌由福建师范大学生命科学学院提供。

#### 1.1.2 废水

烤鳊蒲烧废水取自福清齐翔烤鳊厂。

#### 1.1.3 培养基

斜面培养基(马铃薯琼脂培养基):马铃薯 20.0 g、蔗糖 2.0 g、琼脂 20.0 g、自来水 1 000 L,pH值自然。121℃高温灭菌 30 min。

种子培养基(马铃薯液体培养基):马铃薯 20.0 g、蔗糖 2.0 g、自来水 1 000 L,pH值自然。121℃高温灭菌 30 min。

发酵基础培养基:取 50 ml 蒲烧废水于 250 ml 锥形瓶,然后 121℃高温灭菌 30 min。

### 1.2 仪器

721 分光光度计(上海第三分析仪器厂)、恒温摇床(中国科学院武汉科学仪器厂)、GZX-9023MBE 数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、pHS-3C 型精密酸度计(上海精密科学仪器有限公司)、TG328B 分析天平(上海天平仪器厂)、DZ-5 不锈钢电热蒸馏水器(上海申航五金电器厂丹阳分厂)、TDGC-2000VA 接触调压器(浙江德力西集团电源有限公司)、双层铁皮电炉(上海申航五金电器厂丹阳分厂)、800 型离心沉淀器(上海手术器械厂)、CRDX-280 型不锈钢电热手提式灭菌锅(上海申安医疗器械厂)、SHB-222 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

## 2 试验方法

### 2.1 废水前处理

从烤鳊厂取水回来,用抽滤机通过滤膜过滤废水。

### 2.2 培养方法

斜面活化:取一环种子接种到马铃薯液体培养基,摇床 30℃、160 r/min 活化 25 h。

发酵培养:将活化后的种子培养基移 5 ml 到发酵培养基(按发酵培养基 10%计)。摇床 30℃、160 r/min 发酵培养 48 h。

### 2.3 离心收获单细胞蛋白(SCP)

将发酵培养基在 4 000 r/min 离心机中离心 10 min,然后将收获的 SCP 放到烘箱 100℃烘至干重恒定,称取菌体干重。

### 2.4 COD 的测定

根据杨迎春等(2006)提出的改进重铬酸钾法快

吴立根,福建师范大学化学与材料学院,350007,福建师范大学化学与材料学院 2005 级环境科学硕士研究生(旧校区)。

郑虹、陈盛(通讯作者),福建师范大学福清分校。

收稿日期:2007-12-10

速测定水样 COD<sub>Cr</sub>, 这种方法比传统的测定的方法快速。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 产朊酵母菌生长曲线

从马铃薯斜面培养基挑一环接种到装有 50 ml 马铃薯液体培养基的 250 ml 的锥形瓶, 于 30 ℃、160 r/min 的摇床振荡培养, 在培养时间分别为 0、3、5、7、9、11、13、15、17、21、25、29 h 时, 取样测 OD<sub>600</sub>。以酵母菌悬液的 OD<sub>600</sub> 为纵坐标、培养时间为横坐标, 绘出产朊假丝酵母菌株的生长曲线。结果见图 1。

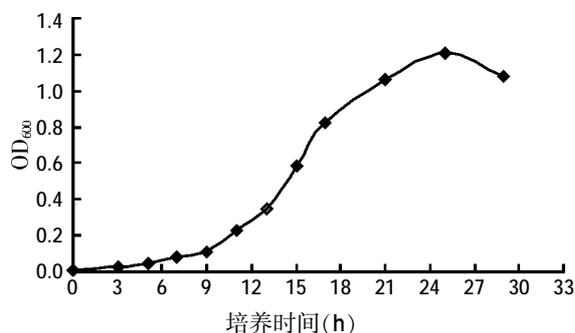


图 1 产朊酵母菌生长曲线

从图 1 可以看出, 产朊酵母菌在 9 h 前生长较缓慢, 9 h 后产朊酵母菌开始快速增长, 并在 25 h 左右达到对数期。因此试验选取最佳的接种时间为 25 h。

#### 3.2 不同接种量对产 SCP 的影响

将接种培养 25 h 的菌液分别按 5%、10%、15%、20%、25% 及 30% 的接种量接种到装有 50 ml 发酵培养基的锥形瓶中, 于 30 ℃、160 r/min 的摇床中振荡培养 48 h 后离心, 离心后的菌液用烘箱 100 ℃ 烘至干重恒定测定 SCP 的产量。以接种量为横坐标, SCP 的产量为纵坐标作出不同接种量对 SCP 产量的影响曲线。结果见图 2。

此次废水 COD<sub>Cr</sub> 的初始值为 45 209 mg/l。

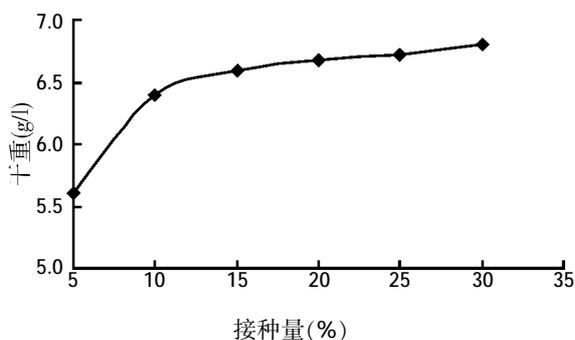


图 2 不同接种量对产 SCP 的影响

从图 2 可以看出, 随着接种量增加 SCP 也在增加, 接种量为 5% 时产量比较低, 从 5%~10% SCP 增加幅度最大, 接着 10%~15% 有一小段增幅, 但此后随着接种量增加 SCP 产量增幅不大。接种量大, 微生物发酵废水的能力比较强, 所以其产物也比较多, 但是由于废水中可利用的物质有限, 所以随着接种量再进一步增大而 SCP 的产量并没有明显的提高, 所以试验选取 15% 的接种量。

#### 3.3 不同发酵时间对产 SCP 的影响

将对数期的菌液按 15% 的接种量接到装液量为 50 ml 蒲烧废水的 250 ml 摇瓶, 于 30 ℃、160 r/min 的摇床振荡培养, 平行 6 个试验, 每隔 12 h 测其产 SCP 的量。以时间为横坐标, SCP 的产量为纵坐标做出不同发酵时间对产 SCP 的影响曲线。结果见图 3。

此次废水 COD<sub>Cr</sub> 的初始值为 41 420 mg/l。

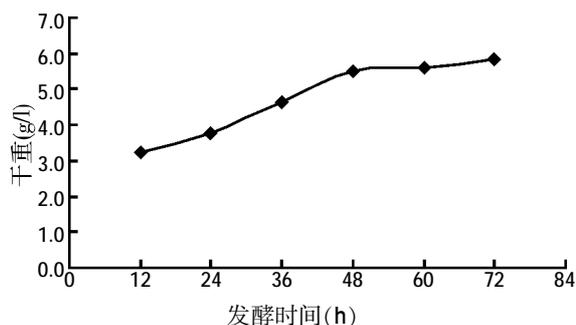


图 3 不同发酵时间对产 SCP 的影响

从图 3 可以看出, 随着时间的增加产 SCP 的量也在增加, 尤其是在 12~48 h 之内增加的幅度较大, 但过了 48 h 以后增加幅度趋于平稳。由于接入的是对数期的菌体, 使菌体在停滞期的时间减少, 可以直接大量繁殖, 而 48 h 后由于菌体可利用的营养物质减少了, 使得菌体的生长速度受到影响, 因此增加幅度有所降低。因此选取 48 h 作为发酵的最佳时间。

#### 3.4 不同氮源对产 SCP 的影响

将接种培养 25 h 的菌液按 15% 的接种量接种到装液量为 50 ml 蒲烧废水的 250 ml 摇瓶, 于 30 ℃、160 r/min 的摇床振荡培养 48 h。测定不同氮源对 SCP 的产量的影响。结果见图 4。

此次废水 COD<sub>Cr</sub> 的初始值为 4 320 mg/l。

5 种氮源均按尿素(尿素为 1.0 g/l)的含氮量来换算, 硝酸钾 3.36 g/l、硝酸铵 1.33 g/l、氯化铵 1.78 g/l、硫酸铵 2.2 g/l。

从图 4 可以看出, 氮源加入对产 SCP 都有帮助,

其中硝酸钾的加入对产量的影响最大,以硝酸钾为氮源所产 SCP 的量为 1.474 g/l,是对照的 2.1 倍,因此选择硝酸钾作为最佳氮源。

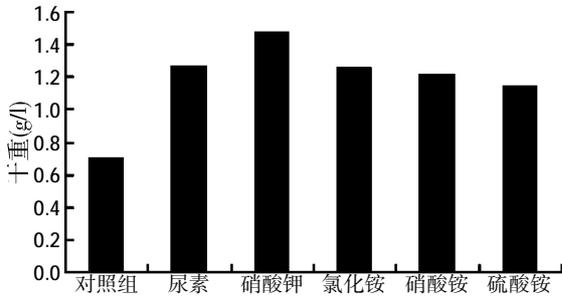


图 4 不同氮源对产 SCP 的影响

### 3.5 不同浓度硝酸钾对产 SCP 的影响

将浓度为 3.36 g/l 硝酸钾,按其浓度的 0.5、1、1.5、2、2.5 倍和空白(即分别为 1.68、3.36、5.04、6.72、8.4 和 0 g/l)进行试验,考察不同浓度硝酸钾对产 SCP 的影响。

将接种培养 25 h 的菌液按 15%的接种量接种到装液量为 50 ml 蒲烧废水的 250 ml 摇瓶,于 30 ℃、160 r/min 的摇床振荡培养 48 h,分别测定不同浓度硝酸钾对产 SCP 的影响。以硝酸钾浓度为横坐标,SCP 的产量为纵坐标做图。结果见图 5。

此次废水 COD<sub>Cr</sub> 的初始值为 3 881 mg/l。

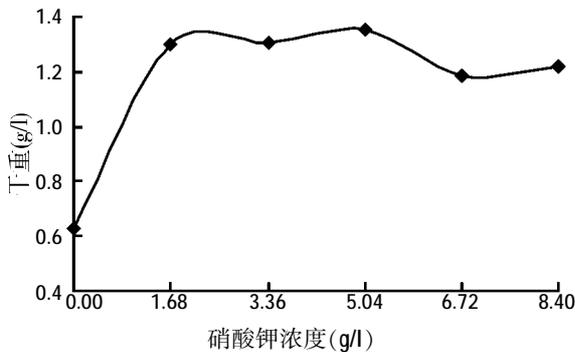


图 5 不同浓度硝酸钾对产 SCP 的影响

从图 5 可以看出,0.5 倍(1.68 g/l)和 1 倍(3.36 g/l)的时候 SCP 量相差不大,SCP 分别 1.30 g/l 和 1.31 g/l,1.5 倍(5.04 g/l)时产量最大(1.36 g/l)。但再高时产生负面影响,SCP 的产量下降,过高氮源浓度对菌体生长和产物合成都可能产生负面影响。因此取硝酸钾浓度为 1.5 倍(5.04 g/l)作为最佳的氮源添加量。

### 3.6 不同装液量对产 SCP 的影响

分别将 30、40、50、60、70 ml(均加入 5.04 g/l 的硝酸钾)发酵培养基于 250 ml 的摇瓶中,灭菌冷却,将培

养 25 h 的产朊酵母菌(接种量均为 15%)分别接到上述的发酵培养基中,30 ℃、160 r/min 的摇床培养 48 h,测定发酵培养基中的 SCP 的产量。以装液量为横坐标,SCP 的产量为纵坐标作出不同装液量对产 SCP 的影响曲线图,结果见图 6。

从图 6 可以看出,SCP 的产量与摇瓶装液量的关系是最初随装液量的增加而增加,当装液量为 40 ml 时,SCP 的产量达到最高(1.34 g/l),而当装液量高于 40 ml 后 SCP 的产量反而随装液量的增加而减少。装液量如果过少可能会造成供给酵母菌的营养不足,无法为酵母菌的生长提供足够的养分;相反装液量过多的时候,可能会由于液体量过大而造成对酵母菌的氧气供给不足不利于酵母菌的生长。所以选取以 40 ml 为最佳的装液量。

此次废水 COD<sub>Cr</sub> 的初始值为 2 726 mg/l。

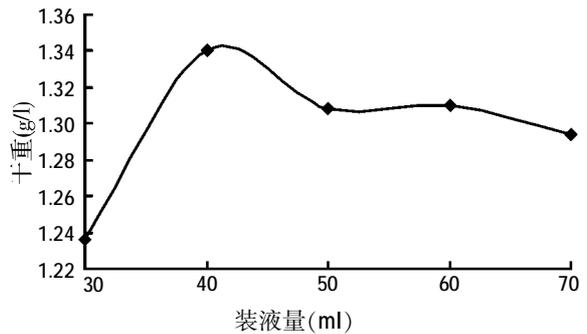


图 6 不同装液量对产 SCP 的影响

### 3.7 不同形式磷酸盐对产 SCP 的影响

将接种培养 25 h 的菌液按接种量为 15%接种于装有 40 ml 蒲烧废水(加入 5.04 g/l 的硝酸钾)的 250 ml 摇瓶中,废水中分别添加两种磷酸盐(磷酸二氢钠、磷酸氢二钠),其浓度均为 0.2 g/l。在温度 30 ℃、160 r/min 振荡培养 48 h。培养结束后,分别测定不同形式的磷酸盐对产 SCP 的影响。结果见图 7。

此次废水 COD<sub>Cr</sub> 的初始值为 4 508 mg/l。

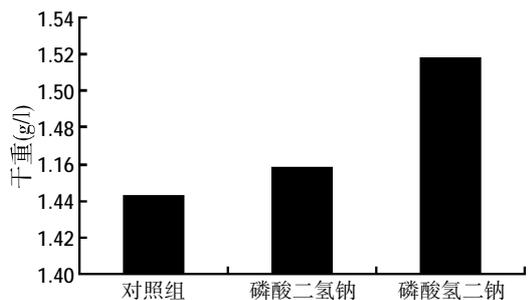


图 7 不同形式磷酸盐对产 SCP 的影响

从图 7 可以看出,磷酸盐对产 SCP 有促进作用。尤其是投入磷酸氢二钠的 SCP 增加量较多。加磷酸氢二钠的 SCP 产量为 1.517 5 g/l,对照组为 1.442 5 g/l,比对照组高出 5.2%。

### 3.8 不同浓度磷酸氢二钠对产 SCP 的影响

将接种培养 25 h 的菌液按接种量为 15%接种于装有 40 ml 蒲烧废水(加入 5.04 g/l 的硝酸钾)的 250 ml 摇瓶中,按浓度为 0.2 g/l 磷酸氢二钠的 0.5、1、1.5、2、2.5 倍和空白(分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 和 0 g/l)分别添加在废水中。在温度 30 ℃,160 r/min 振荡培养 48 h。测定不同浓度磷酸氢二钠对产 SCP 的影响。以不同浓度磷酸氢二钠为横坐标,SCP 的产量为纵坐标作图。结果见图 8。

此次废水 COD<sub>Cr</sub> 的初始值为 3 097 mg/l。

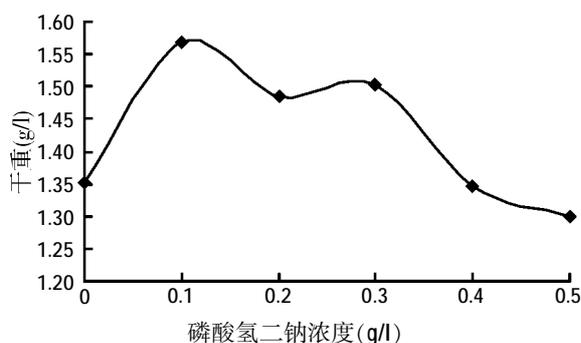


图 8 不同浓度磷酸氢二钠对产 SCP 的影响

从图 8 可以看出,添加浓度为 0.1、0.2、0.3 g/l 的磷酸氢二钠的 SCP 产量都比对照组高,其 SCP 的产量分别为 1.568、1.485、1.503 g/l,比对照但分别提高 15.9%、9.8%、11.1%。而添加量为 0.4 g/l 时 SCP 的产量反而下降,比对照组降低 0.3%。这可能由于磷源是微生物必需的元素,但是过多的磷源对微生物的生长又起抑制作用。通过以上试验比较 0.1 g/l 的磷酸氢二钠产 SCP 的量最大。

### 3.9 不同无机盐对产 SCP 的影响

将接种培养 25 h 的菌液按接种量为 15%接种于装有 40 ml 蒲烧废水(加入 5.04 g/l 的硝酸钾、0.1 g/l 磷酸氢二钠)的 250 ml 摇瓶中。温度 30 ℃、160 r/min 振荡培养 48 h。其中废水中分别添加 5 种不同无机盐 ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、 $CuSO_4$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ),取量都为 0.2 g/l。测定不同无机金属盐对产 SCP 的影响,结果见图 9。

此次废水 COD<sub>Cr</sub> 的初始值为 2 381 mg/l。

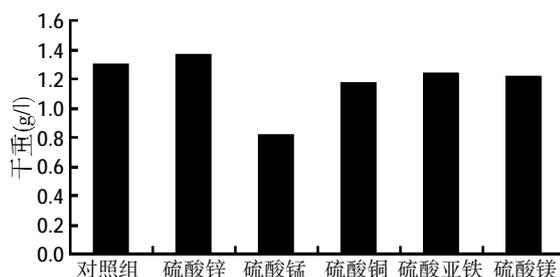


图 9 不同无机盐对产 SCP 的影响

从图 9 可以看出,只有加  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  的摇瓶其 SCP 的产量比对照高,其它都比对照低,尤其是添加  $MnSO_4 \cdot H_2O$  最低。可能是由于  $Zn^{2+}$  起到了促进酵母菌生长的辅酶因子作用,而  $Mn^{2+}$  可能对酵母菌的生长却有一种抑制作用。其它无机盐虽然都比对照低,但是其 SCP 产量基本和对照组相差不多,影响不大。

### 3.10 不同浓度硫酸锌对产 SCP 的影响

将接种培养 25 h 的菌液按接种量为 15%接种于装有 40 ml 蒲烧废水(加入 5.04 g/l 的硝酸钾、0.1 g/l 磷酸氢二钠)的 250 ml 摇瓶中,将硫酸锌按其浓度 (0.2 g/l) 的 0.5、1、1.5、2 倍和空白(分别为 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0 g/l)分别添加在废水中,温度 30 ℃、160 r/min 振荡培养 48 h。以不同浓度  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  为横坐标,SCP 的产量为纵坐标作出不同浓度硫酸锌对产 SCP 的影响曲线。结果见图 10。

此次废水 COD<sub>Cr</sub> 的初始值为 1 934 mg/l。

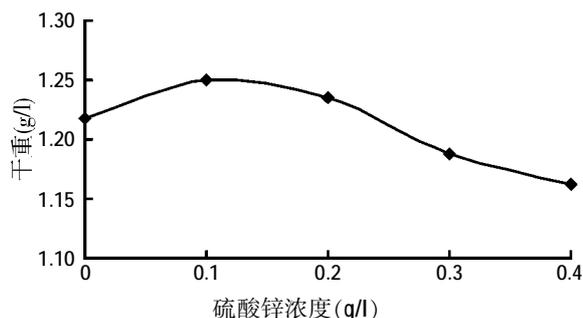


图 10 不同浓度硫酸锌对产 SCP 的影响

从图 10 可以看出,添加  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  浓度为 0.1 和 0.2 g/l 其 SCP 产量比对照高,尤其是 0.1 g/l 最高。而 0.3 和 0.4 g/l 产量都比对照减少,可能是由于硫酸锌的浓度太高了,对酵母菌产 SCP 起了抑制作用了。

### 3.11 不同温度对产 SCP 的影响

250 ml 摇瓶装液 40 ml 蒲烧废水(加入 5.04 g/l 的硝酸钾、0.1 g/l 磷酸氢二钠、0.1 g/l 硫酸锌),接种量为 15%、培养 25 h 的菌液,摇床转速 160 r/min,分别将

摇瓶放入不同温度中培养培养 48 h。以不同温度为横坐标,SCP 的产量为纵坐标作图。结果见图 11。

此次废水 CODcr 的初始值为 2 584 mg/l。

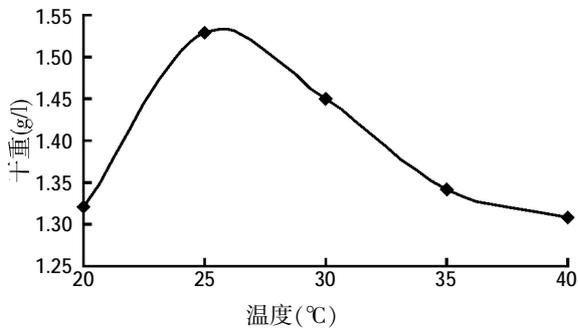


图 11 不同温度对产 SCP 的影响

由图 11 可知,产 SCP 的适宜温度为 25~30 °C,此时的 SCP 的产量都在 1.45 g/l 以上,可见酵母菌具有良好的温度范围。当温度为 25 °C 时,SCP 的产量达到最大(1.530 g/l);当温度为 40 °C 时 SCP 的产量最小(1.308 g/l);在 20~25 °C 范围内有个明显的上升过程,而 25~40 °C SCP 产量下降的趋势很明显。较高的温度可能抑制了微生物的代谢活动,微生物进行各种生命活动都需要酶的催化完成,所有的酶只有在最适温度内它的活性才最强。温度过低了也会造成酵母菌发酵能力的下降。因此 25 °C 作为产朊酵母菌的最佳产单细胞蛋白的温度。Hang 证实利用废盐水的过程中,产朊假丝酵母的最佳生长温度也为 25 °C,高于或低于这个温度,细胞物质的产率和生化需氧量的去除率将明显下降。蒲烧废水是含有调味品的废水,其中含有一定盐分,所以有可能 25 °C 有利于产朊酵母菌利用废水产单细胞蛋白。

### 3.12 不同初始 pH 值废水对产 SCP 的影响

250 ml 摇瓶装液 40 ml 蒲烧废水(加入 5.04 g/l 的硝酸钾、0.1 g/l 磷酸氢二钠、0.1 g/l 硫酸锌),接种量为 15%、培养 25 h 的菌液,培养温度 25 °C,制成不同的 pH 值反应体系,摇床转速 160 r/min,培养 48 h。以 pH 值为横坐标,SCP 的产量为纵坐标作图。结果见图 12。

此次废水 CODcr 的初始值为 1 840 mg/l。

图 12 可以看出,pH 值为 5.0 时产朊酵母产 SCP 的量是最大的,达到 1.313 g/l。pH 值 4.0~5.0 之间产量有个上升的过程,pH 值大于 5.0 后 SCP 产量开始下降,故比较适宜的 pH 值的范围为 4~6 之间。在 pH 值 4~6 之间酵母菌产单细胞蛋白的量在 1.255 g/l 以上。这个范围也符合酵母菌生长的最适 pH 值范围

为 3.8~6.0。

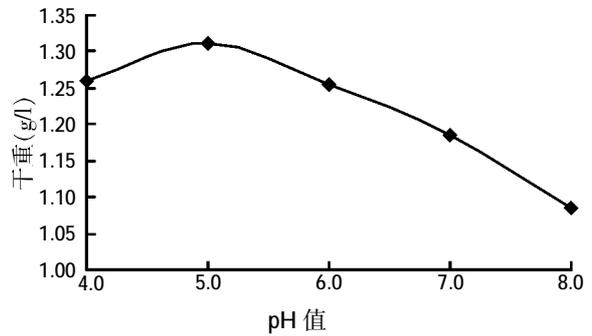


图 12 不同初始 pH 值对产 SCP 的影响

## 4 小结

产朊酵母菌利用烤鳊加工中蒲烧废水发酵生产 SCP 作为饲料蛋白,变废为宝。通过试验表明,对于烤鳊加工的蒲烧废水,产朊酵母菌接种量为 15%,同时发酵体系内添加 0.1 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.1 g/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5.04 g/l  $\text{KNO}_3$ 、控制 pH 值 5.0,再经 25 °C 培养发酵 48 h,可取得最佳产 SCP 的结果:若废水初始 CODcr 在 40 000~45 000 mg/l 之间发酵后可产 SCP 6.0~6.5 g/l;若 CODcr 在 2 000~4 000 mg/l 范围内发酵后可产 SCP 1.4~1.5 g/l。

## 参考文献

- [1] 蔡春松.关于福建鳊业发展与鳊业协会建设的思考[J].福建水产,2005(3):91.
- [2] 张继,武光朋,王文强.单细胞蛋白饲料研究进展[J].饲料工业,2006,27(19):50.
- [3] 赵军,刘月华,魏群.利用酒精废水生产饲料酵母[J].酿酒,2004,31(6):51-52.
- [4] 张莉,赵辛,孙静,等.造纸废液生产单细胞蛋白[J].环境导报,1998(5):13-14.
- [5] 负健民,张维广,张健,等.啤酒废水 SCP 发酵菌种的筛选及其发酵条件初探[J].广州食品工业科技,2002,18(2):26-28.
- [6] 邹莉,朱万强,陈立明,等.利用玉米淀粉工业废弃物生产单细胞蛋白饲料优良菌种的选育[J].东北林业大学学报,2005,33(4):52-53.
- [7] 杨全福,王首宇.马铃薯渣半固态发酵生产单细胞蛋白饲料研究[J].中国畜牧兽医,2006,33(1):22-23.
- [8] 杨迎春,张丽,叶晓东.改进重铬酸钾法快速测定水样 CODcr[J].成都信息工程学院学报,2006,21(2):273-276.
- [9] 叶勤.发酵过程原理[M].化学工业出版社,2005:90.
- [10] 刘红霞.酵母菌处理啤酒发酵废水同时生产单细胞蛋白的研究[D].哈尔滨工业大学硕士学位论文,2005.
- [11] 曹军卫,马辉文,张甲耀.微生物工程[M].科学出版社,2002:98.

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

# 离子对高效液相色谱法鉴别黄霉素方法的研究

曾兆国 刘波 陈永辉 刘勇

**摘要** 在流动相中加入庚烷基磺酸钠离子对试剂,利用离子对色谱分析,在分离鉴别黄霉素时,与国家颁发的“进口兽药质量标准”2006年版鉴别黄霉素的方法进行比较。试验采用 Agilent C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm,5.0 μm)色谱柱;以乙腈-3%庚烷基磺酸钠水溶液(35:65)为流动相,流速 1.0 ml/min,柱温 25℃,检测波长 256 nm。本方法能够使黄霉素各组分之间得到很好的分离,并且有合适的保留值,分离效果更好。

**关键词** 黄霉素;鉴别;离子对色谱

**中图分类号** S816.17

黄霉素是一种弱酸性的多组分的物质,分子量 1 582 Da,分子式为 C<sub>69</sub>H<sub>107</sub>N<sub>4</sub>O<sub>35</sub>P,结构比较复杂。它是由 5 个组分组成,即黄霉素 A、组分 1、组分 2、组分 3、组分 4 组成的一种含糖脂类物质。庚烷基磺酸钠是一种离子对试剂,它在水中可电解成庚烷基磺酸钠负离子,与胺类电离成的铵正离子结合而改变其保留性质。

本文采用庚烷基磺酸钠的性质,通过实验方法建立了一种新的更有效的鉴别黄霉素的方法。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

高效液相色谱仪(Agilent1200),美国;AS-3120B 超声波清洗器,中国;Sartorius 电子分析天平(CP225D),德国。

### 1.2 试剂

黄霉素标准品,含量 894 U/mg,中国兽医药品监察所提供;无水甲醇,分析纯,国药集团化学试剂有限公司生产;庚烷基磺酸钠,分析纯,日本进口;磷酸,分析纯,国药集团化学试剂有限公司生产;乙腈,色谱纯,FISHER,Chemicals 公司生产;甲醇、色谱纯、FISHER,Chemicals 公司生产。

## 2 试验方法

### 2.1 溶液的配制

#### 2.1.1 缓冲液的配制

分别准确称取 3.0 g 庚烷基磺酸钠、15.5 g 磷酸氢二钾、1.0 g 磷酸二氢钾,置于 1 000 ml 容量瓶中,

加入约 400 ml 纯化水,于超声波中至完全溶解,取出放至室温,用纯化水稀释定容至刻度,摇匀。用磷酸调节 pH 值至 7.0±0.1。

#### 2.1.2 0.2%甲酸铵溶液的配制

准确称取 0.2 g 分析纯甲酸铵置于 100 ml 容量瓶中,加入约 80 ml 纯化水,于超声波中至完全溶解,取出放至室温,用纯化水稀释定容至刻度,摇匀。用 10%磷酸调节 pH 值至 4.9。

#### 2.1.3 流动相

乙腈:缓冲液(35:65,V/V);乙腈:0.2%甲酸铵溶液(45:55,V/V) (“进口兽药质量标准”2006年版黄霉素鉴别方法)。

#### 2.1.4 标准溶液的配制

精密称取黄霉素标准品 0.028 g,置于 25 ml 容量瓶中,加入 20 ml 甲醇与水混合液(1:1,V/V),置于超声波中至完全溶解,取出放至室温,用无水甲醇定容至刻度,摇匀。制成浓度约为 1 000 U/ml 的溶液,于 2~8℃冰箱保存。

## 2.2 色谱条件

### 2.2.1 检测器

Agilent1200 紫外检测器,检测波长 256 nm;分析柱:Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm,填料粒度 5 μm);柱温为 25℃;流动相为乙腈:缓冲液(35:65,V/V);流速:1.0 ml/min;进样量 25 μl。

### 2.2.2 检测器

Agilent1200 紫外检测器,检测波长 258 nm;分析柱:Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm,填料粒度 5 μm);柱温为 25℃;流动相为乙腈:0.2%甲酸铵溶液(45:55,V/V);流速:0.5 ml/min;进样量 10 μl。参考“进口兽药质量标准”2006年版黄霉素鉴别方法。

## 3 分析步骤

曾兆国,山东胜利生物工程有限公司,272073,山东济宁高新技术开发区同济路。

刘波、陈永辉、刘勇,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2008-02-21

### 3.1 离子对色谱分析法

打开高效液相色谱仪,用 2.2.1 色谱条件、乙腈:缓冲液(35:65)流动相平衡色谱柱,待基线稳定后,准备进样连续进样 3 次,图谱如图 1 所示。

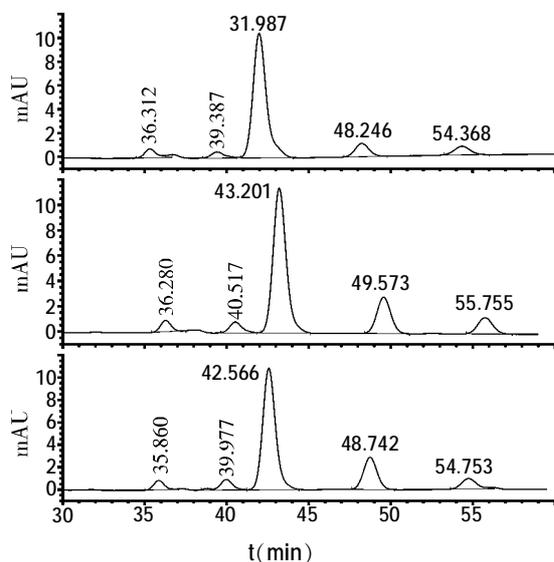


图 1 离子对色谱分析法检测图谱

### 3.2 国家标准方法

用 2.2.2 色谱条件、乙腈:0.2%甲酸胺溶液(45:55)流动相平衡色谱柱,待基线稳定后,准备进样(“进口兽药质量标准”2006 年版黄霉素鉴别方法)。连续进样 3 次,图谱如图 2 所示。

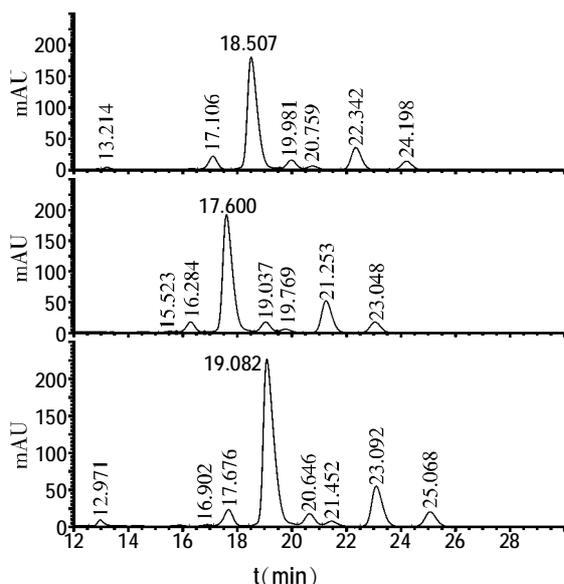


图 2 “进口兽药质量标准”2006 年版检测图谱

## 4 结果与讨论

### 4.1 庚烷基磺酸钠是一种离子对试剂,它在水中可

电解成庚烷基磺酸钠负离子,与胺类电离成的铵正离子结合而改变其保留性质。本试验中根据黄霉素分子结构式中含有胺基,与庚烷基磺酸钠形成离子对,采用反相离子对色谱法,使黄霉素各组分有合适的保留值,使其各组分间得到很好地分离。

4.2 离子对色谱分析的前提是以分析对象在溶液及流动相中完全电离为条件的,这样才能保证待测样品离子与离子对试剂完全形成离子对。黄霉素在流动相中完全电离受 pH 值及离子对试剂浓度影响较大。在试验过程中对流动相的 pH 值、离子对试剂浓度、流速以及配比均进行了反复试验和优化,最后得出本方法的最佳条件。

4.3 本试验所研究的方法(即“离子对高效液相色谱法鉴别黄霉素方法的研究”):图谱中从左到右依次为:组分 1、组分 2、黄霉素 A(有效成分)、组分 3、组分 4。“进口兽药质量标准”2006 年版方法:图谱中从左到右依次为:杂质(干扰)峰、组分 1、黄霉素 A(有效成分)、组分 2、杂质(干扰)峰、组分 3、组分 4。两种方法图谱区别:离子对高效液相色谱法鉴别黄霉素方法中无其它干扰峰,黄霉素有效成分(即黄霉素 A)出峰在组分 1、组分 2 与组分 3、组分 4 的中间;“进口兽药质量标准”2006 年版方法中有两个干扰峰,黄霉素有效成分(即黄霉素 A)出峰在组分 1 与组分 2 的中间。

4.4 本试验所研究的方法,理论塔板数按黄霉素 A 峰计算均能达到 6 000 以上,黄霉素 A 峰与相邻组分峰的分度度可达到要求。黄霉素组分 1 峰、组分 2 峰、组分 3 峰和组分 4 峰对黄霉素 A 峰的相对保留时间分别约为 0.8、0.9、1.1、1.3;相邻两组分峰的分度度分别为 3.11、1.83、4.17、3.66。“进口兽药质量标准”中 2006 年版黄霉素鉴别方法中黄霉素组分 1 峰、组分 2 峰、组分 3 峰和组分 4 峰对黄霉素 A 峰的相对保留时间分别约为 0.9、1.1、1.2、1.3;相邻两组分峰的分度度分别为 2.61、1.88、1.83、2.63。

通过以上试验过程可以看出,本试验所研究的黄霉素的鉴别方法与国家“进口兽药质量标准”2006 年版黄霉素鉴别方法相比有不同的地方:一是所用流动相不同、检测波长不同;二是黄霉素 5 种主要组分出峰顺序不同。它同国家标准的方法相比具有较大的优点,黄霉素 5 种主要组分完全分离,而且分离效果较好,无其它杂峰干扰,能够更好地进行黄霉素的分离、鉴别工作。

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

# 气质联用法测定饲料中的三聚氰胺

蒋晨阳 范倩 林德清 李海宁

按农业部标准对 323 批动物源性饲料、配合饲料、浓缩饲料、植物性蛋白饲料、宠物饲料、饲料原料进行三聚氰胺检测,结果检测出阳性率为 2.48%。测定饲料中三聚氰胺含量,通常使用高效液相色谱法(HPLC)和气相色谱质谱联用法(GC-MS),高效液相色谱法检测(各实验室高效液相色谱仪普遍)具备存在较高的假阳性率,因此检出的阳性需用 GC-MS 法确证。本试验是利用气质联用法测定饲料中的三聚氰胺,方法简单、可行。

## 1 试验原理

试样中的三聚氰胺用三氯乙酸溶液提取,经混合型阳离子交换固相萃取柱净化,用 N,O—双三甲基硅基三氟乙酰胺(BSTFA)和 1%三甲基氯硅烷(TMCS)衍生化,气相色谱-质谱联用仪进行定性和定量,GC-MS 法最低定量限为 0.05 mg/kg。

## 2 试剂与材料

甲醇、乙腈,色谱纯;氨水,浓度 25%~28%;混合型阳离子交换固相萃取柱,60 mg、3 ml;三氯乙酸溶液 10 g/l(称取 10 g 三氯乙酸加水至 1 000 ml);氨水甲醇溶液(取 5 ml 氨水溶解于 100 ml 甲醇中);乙酸铅溶液 22 g/l(取 22 g 乙酸铅用约 300 ml 水溶解后定容至 1 L);滤膜,0.45 μm、有机相;吡啶,优级纯;衍生化试剂[BSTFA+1%三甲基氯硅烷(TMCS)];三聚氰胺标准品(纯度 > 99%);三聚氰胺标准溶液;甲醇溶液(200 ml 色谱纯甲醇+800 ml 一级水混合)。

三聚氰胺标准储备液:称取 100 mg(精确到 0.1 mg)的三聚氰胺标准品,用甲醇溶液溶解并定容于 100 ml 容量瓶中,该溶液浓度为 1 mg/ml,于 4 °C 冰箱内贮存,有效期 3 个月。

标准工作液:用移液管分别吸取三聚氰胺标准储备液,用甲醇配制三聚氰胺浓度为 0.05、0.1、0.2、0.5、

1.0 μg/ml 标准工作液。

试样制备按照 GB/T 20195 的规定制备试样。

气相色谱-质谱联用仪、离心机(10 000 r/min)、涡旋混合器、超声波清洗器、氮吹仪(可控温至 60 °C)、固相萃取装置、高速匀质器、索式提取器、震荡摇床。

## 3 测定步骤

### 3.1 提取

3.1.1 配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料、植物性蛋白饲料和宠物饲料(干粮)中三聚氰胺的提取

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g),准确加入 50 ml 三氯乙酸溶液,加入 2 ml 乙酸铅溶液。摇匀,超声提取 20 min。静止 2 min,取上层提取液约 30 ml 转入离心管,在 10 000 r/min 离心机上离心 5 min。

3.1.2 宠物饲料(罐头)中三聚氰胺的提取

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g),加入 50 ml 乙醚,摇床上 120 r/min 振荡 1 h,弃去乙醚,再加入 50 ml 乙醚,摇床上 120 r/min 振荡 1 h,弃去乙醚,准确加入 50 ml 三氯乙酸溶液,加入 2 ml 乙酸铅溶液。摇匀,超声提取 20 min。静止 2 min,取上层提取液约 30 ml 转入离心管,在 10 000 r/min 离心机上离心 5 min。

### 3.2 净化

分别用 3 ml 甲醇、3 ml 水活化混合型阳离子交换固相萃取柱,准确移取 10 ml 离心液分次上柱,控制过柱速度在 1 ml/min 以内。再用 3 ml 水和 3 ml 甲醇洗涤混合型阳离子交换固相萃取柱,抽近干后用氨水甲醇溶液 3 ml 洗脱。洗脱液 50 °C 氮气吹干,准确加入甲醇溶液 2 ml,涡旋振荡 1 min,过 0.45 μm 滤膜,上机测定。

### 3.3 衍生化

取净化后的滤液(浓度高时需稀释)适量用氮气吹干,加入 200 μl 的吡啶和 200 μl 的衍生化试剂,混匀,70 °C 反应 30 min。同时用三聚氰胺标准系列或相应浓度单点标准做同步衍生。

### 3.4 测定

3.4.1 GC-MS 条件

色谱柱:柱长 30 m,内径 0.25 mm,苯基甲基聚硅

蒋晨阳,青海省兽药饲料监察所,810003,青海省西宁市朝阳东路 60 号。

范倩、林德清、李海宁,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2008-02-21

氧烷涂层,膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ 。

载气:氦气,流速为 1.3 ml/min。

进样量:1  $\mu\text{l}$ 。

进样口温度:250  $^{\circ}\text{C}$

升温程序:起始温度 75  $^{\circ}\text{C}$ ,持续 1.0 min,以 30  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 300  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 2.0 min。

传输线温度:280  $^{\circ}\text{C}$ 。

运行时间:10.5 min。

扫描范围:60~400 m/z。

扫描模式:选择离子扫描,监测离子 99、171、327、

342 m/z。

离子源温度:230  $^{\circ}\text{C}$ 。

EI 源轰击能:70 eV。

#### 3.4.2 样品检测

取适量标准溶液,加入空白样品中,作多点校准,用以 342、327、171 和 99 峰面积之和进行多点校正定量,同时取空白样品和待测样品进行测定。试样与标准品保留时间的相对偏差不大于 0.5%,特征离子丰度与标准品相差不大于 20%。

#### 4 结果(见图 1~图 11)

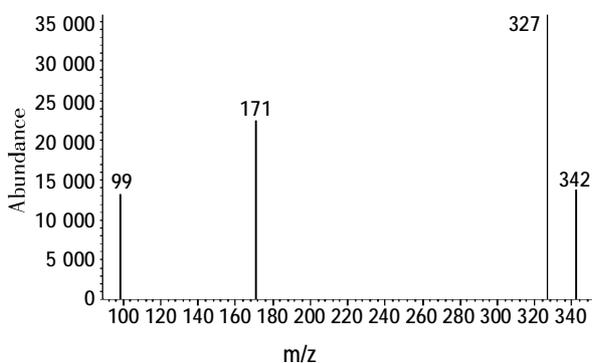


图 1 标准品的 SIM 质谱图

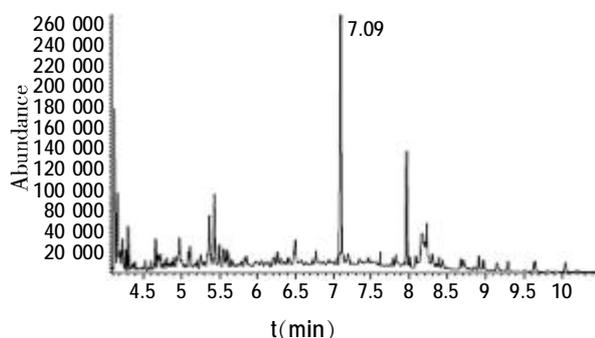


图 2 标准品总离子流

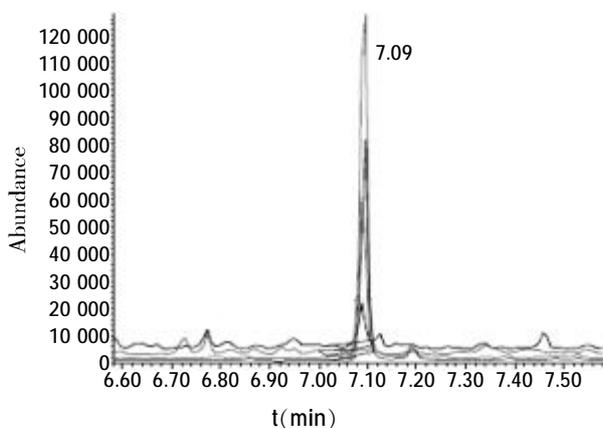


图 3 标准品重叠特征离子色谱图

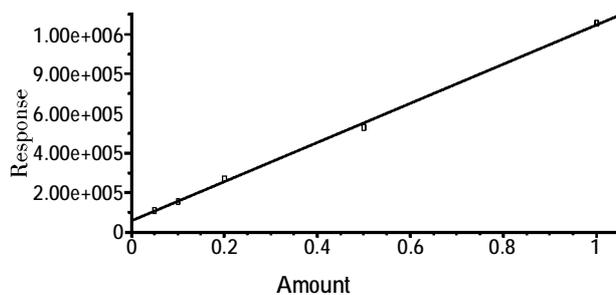


图 4 标准曲线

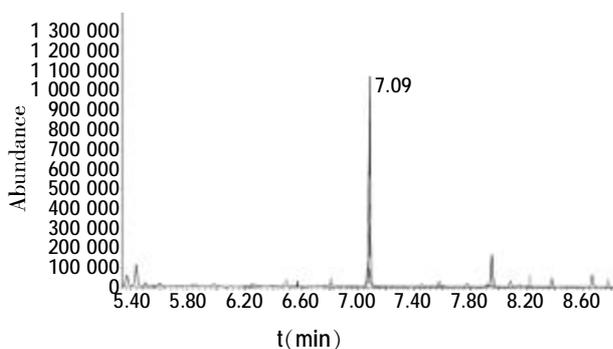


图 5 阳性样品重叠特征色谱图

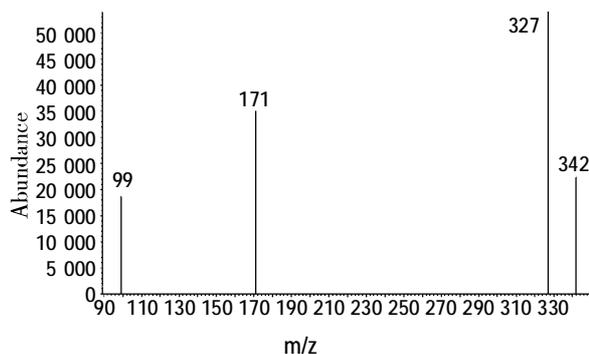


图 6 阳性样品 SIM 质谱图

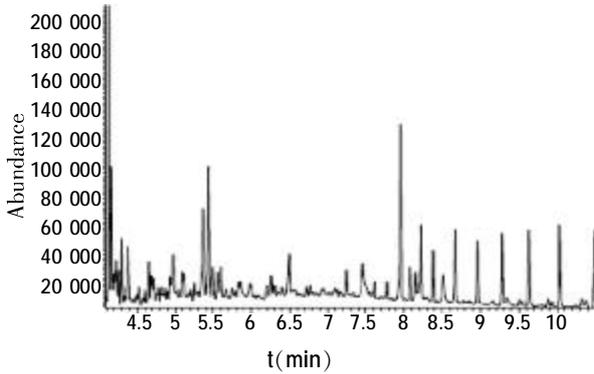


图7 空白样品总离子流

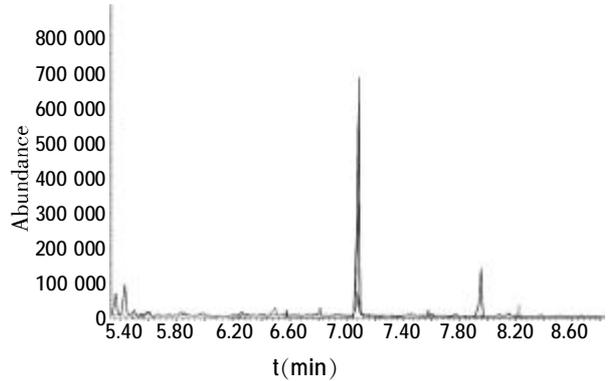


图11 假阳性样品重叠特征色谱图

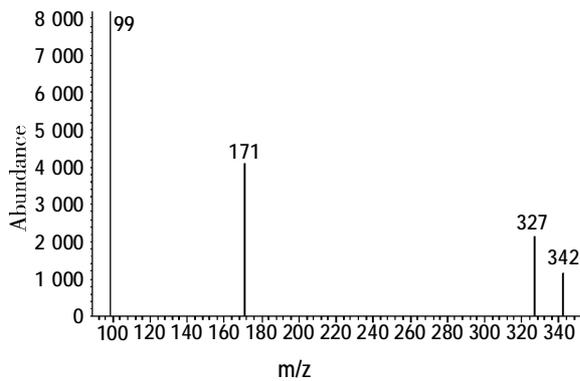


图8 空白样品 SIM 质谱图

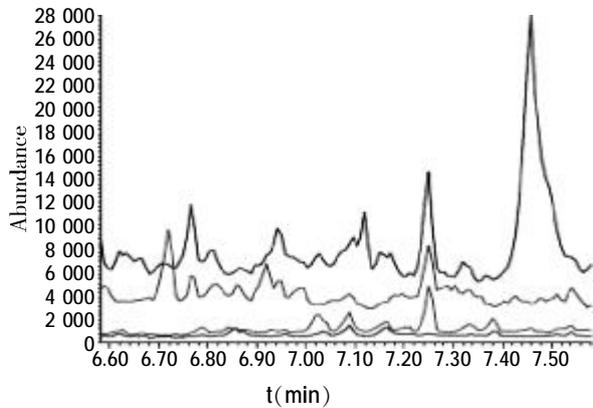


图9 空白样品重叠特征色谱图

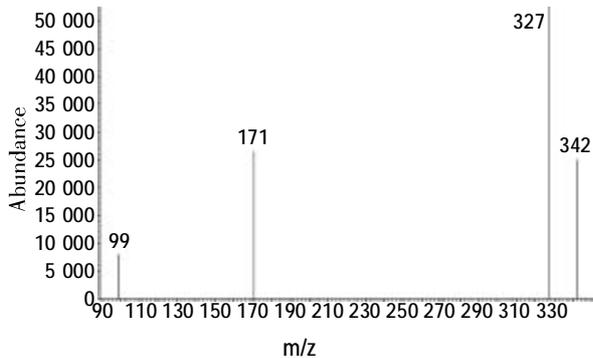


图10 假阳性样品 SIM 质谱图

#### 4.1 线性

取三聚氰胺浓度为 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0  $\mu\text{g/ml}$  标准工作液作标准曲线  $\text{Response} = 9.88 \times 10^5 \text{Amount} + 5.73 \times 10^4$  ( $R^2$  为 0.999)。

#### 4.2 检测结果

323 个样品中用高效液相色谱法测定 56 个样品的保留时间与标准工作液的保留时间相同,再用气质联用法确证 56 个阳性样品中有 38 个样品的保留时间与标准工作液的保留时间不相同;另有 10 个样品保留时间与标准工作液的保留时间相同,但特征离子质谱图与标准品的特征离子不匹配,匹配率相差大于规定的 20%。

8 个样品的保留时间与标准工作液的保留时间相同,特征离子质谱图与标准品的特征离子的匹配率大于 80%,确认检出三聚氰胺。

### 5 分析与讨论

5.1 本次 323 批饲料样品中用高效液相色谱法检测三聚氰胺含量,检出阳性样品为 56 批,阳性率为 17.33%,再用气质联用法确认 8 批检出三聚氰胺,阳性率为 2.47%。说明部分饲料中含有与三聚氰胺结构相似的物质,用高效液相色谱法测定三聚氰胺有一定的局限性,高效液相色谱法测定的阳性样品,必须经气质联用法测定。

5.2 衍生化前,必须吹干,衍生时如果含有水分,对检测结果影响较大。

5.3 萃取净化环节中过萃取柱,过柱流速要保持恒定,过快可能造成三聚氰胺损失。

(编辑:沈桂宇,guiyush@126.com)

# 转基因饲料 DNA 在加工过程中的降解研究进展

梁克红 李俊 李军国 秦玉昌

自 1994 年首例商业化生产的转基因番茄“Flay Savr”问世以来,转基因作物已在全球得到大面积推广。全球转基因作物种植面积从 1996 年的 170 万公顷到 2006 年猛增至 1.03 亿公顷,仅仅 10 年中增长 60 倍。全球商业化生产最广泛的转基因作物主要是大豆、玉米、棉花和油菜。大豆和大豆粕是饲料中蛋白质的主要来源,2006 年转基因大豆的种植面积达到 5 860 万公顷,占全球转基因作物种植面积的 57%,其总产量的 97%用于动物饲料。其次是转基因玉米,种植面积为 2 520 万公顷,占全球转基因作物种植面积的 25%,用于动物饲料的约占转基因玉米总产量的 75%。而转基因棉籽粕和油菜籽粕每年用于饲料生产的约为 480 万吨。目前,美国每年向中国出口价值近 20 亿美元的大豆,其中约 70%是转基因产品,这些大豆除一小部分用作食品原料外,绝大部分在提取油以后用作动物饲料原料。随着转基因作物的迅速发展与应用,转基因作物及副产品将越来越多的用作饲料原料。

目前,世界许多国家都建立了转基因饲料的限制和标识制度。我国政府也在 2001 年 6 月 6 日颁布了《农业转基因生物标识管理办法》,规定作为饲料原料的转基因豆粕、玉米、油菜籽粕,必须进行标识。

转基因饲料虽然在降低饲料生产成本、提高产品品质等方面显示出独特的优势和发展前景,但也可能带来一定潜在或不可预知的后果。目前,关于转基因食品以及饲料方面的研究很多,主要是针对转基因成分的检测及安全性评价的研究,此外,食品加工对转基因成分的影响也有一些相关报道。但由于饲料加工的特殊性,对其加工过程中 DNA 的降解变化研究还很少。

## 1 转基因饲料的安全问题

梁克红,中国农业科学院饲料研究所,100081,北京海淀区中关村南大街 12 号。

李俊、李军国、秦玉昌(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2008-01-14

利用基因工程的手段不仅能培育出大量的新品种,同时也减少了农药的用量,增加了农业收益。虽然通过转基因技术和常规杂交育种一样都能培育出新品种,但是常规育种技术是模拟自然现象进行的,而转基因技术是人为的将外源基因片段插入到原有基因中,从而实现新品种的培育,完全颠覆了自然界中繁殖的概念,所以有人认为转基因产品本身就具有天生的危险性。转基因饲料中导入的外源基因所表达的目标蛋白是否可能产生过敏原和毒素;转基因是否与普通饲料一样能在消化道中迅速消化降解;转基因饲料中外源基因和蛋白质是否在动物体内发生转移和残留等,这些问题都有待于研究解决。

转基因饲料的安全性评价主要包括两个方面:一是转基因饲料营养性和其对畜禽的影响;二是对转入蛋白的毒理安全和蛋白质致敏的可能性检测。

通常使用常规的化学分析方法对转基因饲料营养成分进行分析,目前的研究并没有发现其营养成分与传统的非转基因饲料有所不同。Clark 等分别用转基因饲料和非转基因饲料饲喂不同的动物,结果发现转基因饲料对牛、羊、猪与传统的饲料并不存在差异性。到目前为止,尚未发现转基因饲料对畜禽的生长性能、健康状况、肉、蛋、奶的组成产生危害性的影响。R.H.Phipps 用转基因豆粕和玉米饲喂奶牛,在牛奶和血液中并没有检测到外源基因。但在十二指肠的食糜中检测到了外源基因。由此可见,这方面的情况复杂,还需要进一步地研究。

外源基因和其表达的蛋白残留到动物产品中,直接会对消费者产生危害。因此人们十分关注对转入蛋白的毒理性和致敏性的安全问题。美国 Hi-Bred 公司曾经开发过一个新的产品,将巴西坚果中二硫清蛋白基因转入到大豆中,从而增加大豆的含硫氨基酸含量,这种大豆主要作为动物饲料原料,结果发现巴西坚果的过敏蛋白也同时被引入到大豆中,而大豆通过食物链对人类存在着潜在的危险,最终该产品未能获批准进入商品化生产。

转基因植物的所有方面都会影响到人类的健康,因此应对转基因植物进行全面的安全评价。一个功能性的基因要想从转基因植物转移到细菌中需要达到

250 bp 以上,因此对转基因饲料进行风险性评估,不仅要关心是否含有转基因成分,而且也必须知道外源基因片段在饲料中的最大长度。

## 2 加工过程对转基因饲料 DNA 的降解研究

与转基因成分在饲料中的存在情况及其在瘤胃模型中的稳定性方面研究的大量数据相比,有关转基因产品在加工过程中 DNA 的降解研究就太少了,目前国内外只有一些关于食品加工过程中内外源基因的降解研究。在实际生产中,转基因饲料原料和普通饲料一样都要经过一定的加工,加工过程中的物理化学因素对 DNA 造成了不同程度的破坏。

英国利兹大学所进行的研究表明加工工艺可使某些转入的外源 DNA 断裂。他们认为,当外源 DNA 片段小于单个基因的大小时,物质就不可能通过遗传而生存。因此,当这些加工后的原料作为饲料原料被使用时,它们应该不具有遗传活性。

Chiter 等(2000)对饲料中的一些植物性原料,如榨油前和榨油后的油菜籽、小麦粉、亚麻籽、大豆、新鲜的玉米粉和玉米粒、甜菜及甜菜浆中 DNA 的稳定性进行了研究,结果表明,高温和高压蒸汽可降解小麦和玉米粉中的基因组 DNA 和 Rubisco SS 基因。

饲料组成成分复杂,不同的饲料原料经过加工以后其降解变化情况的差异性很大。王卫国等(2004)对多种饲料原料,如小麦、小麦叶、亚麻仁、亚麻叶、大豆、大豆叶、玉米、玉米叶、压片玉米、玉米蛋白粉、油菜叶、黑麦、黑麦草、菜籽、菜籽粕、菜籽饼、干甜菜渣进行了不同加工方法对饲料 DNA 降解影响的研究,结果表明,粉碎和青贮不能降解饲料中的 DNA;加工温度高于 95 °C、加热时间在 5 min 以上时饲料的 DNA 就会发生降解现象;采用高、低压蒸汽处理 30 s 以上也能使 DNA 得到降解。这一试验结果与 Chiter 的结果相符,说明对饲料进行高压(低压)蒸汽处理以后,饲料 DNA 会出现一定程度的降解。目前饲料工业中迅速发展的膨化工艺,是将物料加温、加压进行调质处理后挤出模孔或突然喷出压力容器,使之骤然降压从而实现体积膨大。由此可见,这种加工工艺会对饲料中的 DNA 起到一定程度的降解作用。以上两个试验都是以非转基因植物为试验材料的,由于不同的基因在受到同样处理时其破坏程度并不相同,因此,需要对转入的外源基因进行深入的降解研究。

加工后的基因片段遭到一定程度的破坏,为了避免假阴性的出现,检测的目的片段不能太大,目前常

用荧光定量 PCR 技术对加工产品进行研究。F. Debode 等(2007)将转基因大豆粉分别进行微波、加热、超声波破碎、高压蒸汽处理,使用荧光定量 PCR 技术对内源及外源成分进行定量测定,结果发现,物理处理导致 Ct 值(每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数)的增加,即物理处理将会使 DNA 含量减少。但是,最终的  $\Delta Ct$  值并没有改变,即物理处理不会减少转基因成分的相对含量。他们的试验同时也发现物理处理很难使 DNA 降解到 100 bp 以下。

Sarah R. Murray 等(2007)使用实时荧光 PCR 技术对玉米内源基因(叶绿体的 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因及细胞壁转化酶基因)在蒸煮、挤压时的含量变化进行了研究,结果发现,当玉米粉在 100 °C 下蒸煮 60 min 以后, DNA 含量骤然下降,特别是细胞壁转化酶基因。对玉米渣进行挤压试验时,分别在温度 60 °C 和 170 °C, 扭矩分别在 6、18、36 nm 下对玉米渣进行处理,温度 60 °C 时变化不明显,而温度 170 °C 时 DNA 显著减少。扭矩 6 nm 时,温度 170 °C 与 60 °C 时相比,小片段的 DNA 含量明显减少。扭矩 36 nm 的情况下, 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因的 68 bp 片段和细胞壁转化酶基因的 97 bp 片段几乎不能检测出来,该研究表明,温度和机械力都对 DNA 降解有影响,更重要的是温度和机械力的复合作用是正向加强的。

转基因植物一方面经过加工以后直接进入人们的餐桌,另一方面大豆、油菜籽加工后的副产品(如豆粕、菜籽粕)以及玉米等作为饲料饲喂畜禽后间接进入人们的生活,转基因饲料通过食物链间接地影响到人类的健康。目前对转基因食品在加工过程中基因的降解研究相对更多一点,对转基因饲料 DNA 降解研究完全可以借鉴一些食品方面好的方法,并结合自身存在的一些特点展开系统研究。Torsten Bauer 等(2003)发现,在食品加工中温度和 pH 值是影响 DNA 降解的两个重要参数。试验分别进行了质粒和植物 DNA 的降解研究,使用 HPLC 方法可以区分闭合环状和刻痕的质粒 DNA,结果发现,质粒 DNA 的刻痕随 pH 值的降低而显著增强。转基因玉米在 65 °C, pH 值 4.0、90 min 时仍可以检测到 957 bp 的片段。而对于转基因大豆制成的豆奶和豆腐,生豆奶煮沸 10 min,基因片段从 1 714 bp 降到 1 339 bp。而在豆腐中并没有发现进一步的 DNA 降解。在商品性大豆蛋白(深加工产品)中, DNA 片段至少可检测到 714 bp 的片段。

陈颖等(2005)对以转基因和非转基因大豆为原料制成的豆腐、豆奶、豆粉主要的加工过程中内外源基因的降解变化进行了研究,结果发现,原料经过磨浆后,外源基因的片段大小由 1 512 bp 降至 807 bp;点浆、加热等工艺又使外源基因继续降解至 400 bp 左右;挤压成型、高温杀菌及喷雾干燥以后,基因片段大小降到 190 bp 左右。大豆的内源基因 lectin 片段经过磨浆、煮浆、均质等工艺,使其由 1 883 bp 降解至 836 bp;随着进行的点浆、高温杀菌或喷雾干燥等工艺使豆腐的内源基因片段降到 500 bp 以下,豆奶、豆粉中内源基因片段大小仅为 200 bp 左右。这与 Bauer T 对豆制品降解的研究结果有所差异,这表明食品加工中加工工艺的差异对 DNA 降解变化情况会造成不同的影响。因此,对其展开安全性评价更应针对于具体工艺进行。饲料的安全性评价也同样面临着相同的问题,饲料加工方法繁多复杂,也需要针对具体工艺进行安全性的研究。

### 3 展望

转基因作物用作饲料的安全性受到越来越多的

关注,要减少外源基因传播的可能性,保证其安全性,就必须严格控制加工条件,但是有关这方面的研究目前还很少。鉴于饲料的特殊性,饲料的组成成分复杂,并且 DNA 降解又涉及取样、定性、定量等复杂问题,需要进一步地系统研究。

随着转基因成分检测手段的不断提高,不仅能定性研究片段大小的变化情况,并且定量技术的出现也为 DNA 的降解研究提供了优越的条件。由于饲料的原料种类多成分复杂,而且很多都是油料植物的副产品,所以要追踪转基因饲料在加工过程中的降解变化情况就要从最初的原料开始。每一种饲料原料,每一道加工工序,都为 DNA 降解变化提供了一个独一无二的环境。因此对 DNA 降解研究,有必要在其相对应的一个加工条件下进行。展开从粉碎到最后的成品中主要加工工艺对 DNA 片段大小及含量的影响研究,全面研究饲料加工全过程中的内外源基因的变化情况十分必要。

(参考文献 18 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:王芳,xfang2005@163.com)

## · 广告 ·



## 中美合资湖南尤特尔生化有限公司

中美合资湖南尤特尔生化有限公司是由美国新世纪生化公司、广东德美精细化工股份有限公司、广东慧通数字传媒股份有限公司共同组建的现代高科技生化企业。

公司在北美设立了专门的研究机构,拥有国际领先的生产试验设备和生化检测实验室。公司年产 8000 吨高活性、高纯度的纤维素酶、半纤维素酶和 1000 吨其他生化产品。2001 年被认定为湖南省高新技术企业,产品被认定为高新技术产品。2004 年被评为全国酶制剂行业重点企业,同年,产品在首届湖南畜牧渔业暨饲料工业博览会上被评为“金奖产品”。

公司通过了 ISO9001:2000 质量管理体系认证,产品质量居国际前列,产品被广泛应用于棉麻纺织、服装、造纸、饲料、酿造、食品等领域,显著地提高了这些行业的产业水平,有效地减少了资源浪费和环境污染。

招聘岗位:销售经理(5 名)

招聘条件:

- 1、男女不限、28 ~ 35 岁、身体健康;
- 2、大专以上学历,动物营养及畜牧专业或饲料配方工作经验等相关专业;
- 3、有从事饲料添加剂销售经验者优先。

地址:中国湖南岳阳市云溪工业园(107 国道 1458 公里处) 邮编:414009

电话:(0730)8418609 传真:(0730)8418628 E-mail:ncb@0730.net.cn

## 营养成分对基因表达的调控

高雁 徐奇友

目前,我国动物营养学的研究是在机体水平上研究各种营养素对机体的作用,在机体内研究吸收、代谢与平衡等。随着分子生物学的发展及其在动物营养学上的应用,从分子水平上弄清养分的代谢规律,准确确定动物群体及个体的营养需要,掌握养分摄入过量及缺乏的后果,预防和治疗营养代谢疾病以及解决其它营养问题将成为可能。尤其是同基因工程技术相结合,从分子水平来解释各种营养素对机体的作用机制、动物机体的生理病理变化等问题,这也是动物营养学今后发展的必然趋势之一。Clarke(1992)和 Towle等(1995)的研究认为,畜禽日粮中的主要营养物质以及某些维生素和矿物质等对许多基因的表达有着显著影响,而这些基因中往往含有控制机体代谢关键酶的密码子,从而影响了机体的代谢过程。养分或者是核酸或蛋白质的合成原料,或者是某一中间代谢的辅酶,或者是某一环节的激活剂或抑制剂,或者可为代谢提供能量。如何通过改变日粮组成成分来调节动物体内相关基因的表达,从而使动物处于最佳生长状况已成为现代动物营养学的研究重点,通过营养对动物基因表达的调控途径及其机制的研究,将为人们如何更加有效地对某些特定有益基因的表达提供理论依据。

## 1 主要营养素对 FAS 基因表达的调控

### 1.1 碳水化合物对基因表达的影响

#### 1.1.1 碳水化合物对 FAS 基因表达的影响

脂肪酸合成酶(Fatty Acid Synthase FAS)是脂肪酸合成的主要限制酶,存在于脂肪、肝脏及肺等组织中,在动物体内起催化丙二酰 CoA 连续缩合成长链脂肪酸的反应,其活性高低将直接控制着体内脂肪合成的强弱,从而影响整个机体中脂肪的含量。Coupe等(1990)给吮奶的仔鼠饲喂碳水化合物,能在几小时内诱发肝脏和白脂肪组织中 FAS 和乙酰 CoA 羧化酶

(ACC)mRNA 的出现。Iritani 等(1992)在成年鼠的研究中,当给禁食的成鼠饲喂含高碳水化合物、低脂肪的饲料时,脂肪酸合成酶基因的表达就增强,而且相应的 mRNA 含量的增加幅度与碳水化合物的摄入量成正比。这主要是高碳水化合物、低脂肪的饲料激活了脂肪合成途径中 3 个主要的代谢酶:FAS、ACC、ATP-柠檬酸裂解酶(ATP-CL)。这些酶活性提高的同时伴随着相应的 mRNA 含量增加。因此,Girard 等(1994)认为这是由于含高碳水化合物的日粮使这些酶基因的转录得到加强。

碳水化合物对基因表达的调控实质是葡萄糖的作用。葡萄糖的含量能显著影响 FAS 基因的表达,但在活体研究中很难区分是由于葡萄糖单纯作用,还是存在激素水平变化的协同作用。为区分活体中激素水平变化的协同作用,Foufelle(1995)通过体外细胞培养的方法研究葡萄糖和胰岛素的作用效果,研究表明,加入葡萄糖和胰岛素的脂肪细胞培养组织中,FAS 的 mRNA 水平比对照组提高 28%;单独添加葡萄糖比对照组提高 7%,而单独添加胰岛素则没有效果。因此,可以得出结论:葡萄糖对 FAS 基因的表达调控可以通过与胰岛素的协同作用而得到提高。

#### 1.1.2 碳水化合物对磷酸烯醇式丙酮酸激酶(PEPCK)基因表达的调控

PEPCK 是动物肝和肾中糖元异生作用的关键酶,目前研究较为清楚的是日粮中糖含量对 PEPCK 基因表达的调控。营养成分对 PEPCK 基因的调控主要是通过与其启动子作用而实现的。Short 等(1992)通过对大鼠 PEPCK 基因的分析表明,该基因启动子位于 -460 至 +73 之间的片段内,它包含了大多数组织特异性和基因转录激素调控所必需的元件。PEPCK 基因转录的调控区相当复杂,它包含着 3 个功能区,每个区由蛋白质结合位点群构成。区域包含了基本必需的元件和 cAMP 调控区;区域由一系列蛋白质结合位点组成,它可以通过与结合区域上的转录因子的相互作用来调节 PEPCK 基因的转录,其中被命名为 P3(I)的调控元件对肝脏 PEPCK 特异性表达具有重要意义,并为 PEPCK 启动和 cAMP 充分作用所必需;区域 III 含有一套复杂的调控元件,包括糖皮质激素、视黄酸对基因转录的正调控和胰岛素的负调控作用。在上

高雁,辽宁省农牧业机械研究所有限公司,110036,沈阳市皇姑区金沙江街 16 号 6 门。

徐奇友,中国水产科学研究院黑龙江水产研究所。

收稿日期:2008-01-14

★ 黑龙江水产研究所基本科研专项 2007HSYZX-YZ-07

述调控元件中最主要的有 CRE (-87~-74) 和 P3(I) (-248~-230), 如 cAMP 的诱导和胰岛素的抑制作用就是通过这两个元件完成的。当日粮中含有大量糖类时, 由于胰岛素的作用而抑制了 PEPCK 基因的转录, 导致其水平下降, 当禁食或日粮中含低糖时, 情况则刚好相反。

### 1.2 脂肪和脂肪酸对基因表达的影响

日粮脂肪抑制肝脏脂肪合成作用, 除了脂肪对 FAS 的直接作用(如 FAS 是 ACC 的变构抑制剂)外, 脂肪可以调节生脂酶的表达, 是抑制生脂作用的重要原因。日粮中的 n-6 和 n-3 PUFA 对脂肪酸的生化合和氧化有独特的调控作用, PUFA 之所以能产生这样的效果是因为 PUFA 可以调控一些编码代谢关键酶的基因表达。而饱和脂肪酸和单一不饱和脂肪酸对脂类合成基因的表达则无抑制作用。目前为止, 已发现多种基因表达受到 PUFA 的调节, 如对编码 FAS 糖酵解酶、葡萄糖转运体 4 (GLUT4)、S14 蛋白、硬脂酰基辅酶 A 去饱和酶(SCD)、L-丙酮酸激酶(LPK)和白细胞介素等的基因表达的抑制, 以及对编码脂肪酸氧化酶的基因表达的诱导。周晓蓉研究了共轭亚油酸对饮食诱导肥胖大鼠脂联素基因表达的影响, 研究表明, 共轭亚油酸可增加肥胖大鼠脂肪组织脂联素 PPAR $\alpha$  mRNA 的表达水平。赵华研究发现, 日粮添加 PUFA 能抑制动物生脂酶基因的表达, 并增加脂肪分解相关酶基因的表达, 从而调节体脂代谢。PUFA 主要在基因转录和 mRNA 的稳定性两个水平上调节基因表达, 其调节机制目前认为主要有两种: 一种为 PUFA-PPAR 依赖性机制; 另一种为 PPAR 非依赖性或 PUFA 特异性机制。

### 1.3 蛋白质和氨基酸对基因表达的影响

#### 1.3.1 蛋白质对基因表达的影响

生长激素(GH)是控制鱼类生长的主要激素, 而 GH 对生长的控制受激素受体(GHR)和胰岛素样因子 IGF-1 协调作用。因此, 这二类因子在鱼体内的正常表达, 即正向地通过 DNA 复制, mRNA 的转录和蛋白质翻译等生物学过程, 在生理学上保证鱼类的正常生长。大量研究证实, 这类基因正常表达与投喂饵料蛋白质成分和比例直接相关。人为控制鱼类饵料的投喂, 饥饿禁食, 导致肝组织 GH 受体数量下降, 阻碍 GH 效应, 从而降低 IGF-1 mRNA 的转录。相反, 如果恢复投喂, GH 和 IGF-1 mRNA 表达水平可随之恢复或达到新的平衡。Mildner(1991)和 Clarke(1991)研究表明, 高蛋白质饲料将抑制猪脂肪组织中 FAS 基

因的表达, 脂肪组织中 FAS 基因的 mRNA 含量会显著下降: 用蛋白质含量分别为 14%、18%、24% 的日粮饲喂 60~110 kg 的育肥猪, 屠宰后测定脂肪组织中 FAS mRNA 的含量发现, 高蛋白日粮组(18%、24%)中 FAS mRNA 的含量分别下降了 11.73% 和 48.2%, 而肝脏中的含量却基本没有变化。由此可见日粮蛋白质将会影响脂肪组织中 FAS 基因的表达。

#### 1.3.2 氨基酸对基因表达的影响

生长受遗传、激素和营养的复杂调控。其中胰岛素样生长因子(IGF-1、IGF-2)起重要作用。IGF 活性受胰岛素样生长因子结合蛋白-1(IGFBP-1)的调节。IGFBP 可与 IGF-1、IGF-2 特异结合(Beaker, 1993)。IGFBP-1 主要在肝脏合成, 其表达受胰岛素、生长激素和血糖调节。而氨基酸也是一个重要的代谢因子调节 IGFBP-1 的表达。Bruhat(1996)研究了亮氨酸限制对人类 Hepa 肝细胞 IGFBP-1 mRNA 和蛋白质表达的影响, 结果表明: IGFBP-1 mRNA 和蛋白质在细胞中的基础水平很低, 而当培养基中亮氨酸浓度下降时, 其浓度迅速上升。用分离的大鼠肝细胞培养也得到了类似的结果(Jousse, 1998), 表明氨基酸调控 IGF-BP-1 表达不限于肝原细胞, 对已分化的肝细胞也适用。对其它氨基酸的研究表明, 耗竭精氨酸、胱氨酸及其它必需氨基酸都对人肝原细胞系 Hepa2 的 IGFBP-1 的 mRNA 水平产生显著影响。

目前关于亮氨酸对 CHOP 基因的调控研究比较清楚。CHOP 的诱导与激活内质网的应激反应有关, 可能是由内质网中不正确的折叠蛋白质的堆积调节(Wang 等, 1996)。CHOP 编码 1 个小核蛋白, 属于 C/EBP 转录因子家族。C/EBP 家族成员与能量代谢, 细胞分裂、分化及细胞特异性基因表达调节有关。通过与 C/EBP 家族成员结合为稳定的异构体, CHOP 蛋白可影响基因表达。已证明亮氨酸限制可诱导所有受试细胞 CHOP 基因的表达。近来, 已经证明亮氨酸限制可诱导所有受试细胞 CHOP 基因的表达, 既可以增加 CHOP mRNA 的转录, 又可以增加转录产物的稳定性。在亮氨酸限制后 4 h, CHOP 基因的转录速率大大增加(21 倍), 而核糖体 S26 基因的转录速率保持不变。

### 2 矿物元素对基因表达的影响

某些金属元素的存在和缺乏将影响一些基因的表达, 这种基因的表达产物(蛋白质或肽)往往与这些金属离子具有较强的亲和性有关, 因此有时金属离子的浓度起到了启动该基因表达的功能, 有关这方面最好的例证是金属元素对金属硫蛋白(MT)表达的调

控。现有资料表明,金属离子对基因表达的调控可以发生在转录水平,也可以发生在转录后水平。

### 2.1 铁含量对运铁蛋白基因表达的调控

铁的吸收与转运需要运铁蛋白及其受体的参与,而铁蛋白是铁在体内的贮备形式和高剂量铁的解毒形式,两种蛋白的表达均受翻译后调节机制的调控。运铁蛋白是血清中运输铁元素的蛋白质,它将铁从肝脏运送到网织红血球中用于合成血红蛋白。当日粮中缺铁导致血红蛋白合成量不足时,肌体就需要更多的运铁蛋白来加快铁的运输。运铁蛋白受体 mRNA 的 3'UTR 上含有铁调节区(IRE)。缺铁时,铁调节蛋白(IRP)就与 IRE 结合,保护 mRNA 使其不被 RNA 裂解酶裂解,从而提高运铁蛋白受体的水平。当有铁存在时,IRP 就脱离 mRNA 分子,失去保护的 mRNA 不稳定,其翻译率下降,从而导致运铁蛋白受体的合成量减少,铁的吸收率下降(Klausner, 1989; Koeller, 1989; Theil, 1994)。Mcknight 等(1980)在肉鸡的试验中发现,日粮中缺铁将导致血清中运铁蛋白含量迅速增加,肝脏中运铁蛋白基因的 mRNA 含量增加到正常水平的 2.5 倍,因此,可以认为缺铁所引起的运铁蛋白基因表达的加强是通过增加转录水平来实现的。当饲料中补加铁后,运铁蛋白基因的 mRNA 含量和蛋白质合成量在 3 d 内回到正常水平,鸡肝脏中铁的贮存量也同时增加。铁的状况并不影响运铁蛋白受体基因的转录(Klausner, 1989)。但 Zakin(1992)的综述指出,虽然很多组织都含有运铁蛋白基因,但不同组织的基因含有不同的转录调节因子,使运铁蛋白基因的表达具有明显的组织特异性。

铁对铁蛋白基因表达的调控正好与运铁蛋白基因相反,铁含量越高铁蛋白基因表达就越强,而且这种调控并非发生在转录水平,因为放线菌素 D 和蛹虫草菌素并不能抑制高铁的这种诱导作用,因此这种调控应该发生在转录后水平。Zahringer 等(1976)研究发现,这是由于当铁含量低时,铁蛋白的亚基与该基因的 mRNA 结合,使后者不能与核糖体结合,从而抑制了该基因的表达。当铁含量增加时,铁蛋白亚基与铁离子结合,而使该基因的 mRNA 能游离出来与核糖体结合并开始大量表达铁蛋白。

### 2.2 锌对基因表达的调控

锌作为动物体的一种必需微量元素,具有增强机体免疫功能、促进细胞增殖分化、参与核酸蛋白质代谢、维持细胞周期正常进行等生物学功能。上述作用

以前曾被认为主要是由于含锌酶活性的改变以及对细胞信号传导系统产生影响的结果。但近年来的研究表明,事实并不如此,锌主要是通过对基因的转录和表达的影响而产生一系列的生物学效应。Michelsen (1993)认为,锌离子是 DNA 聚合酶的一个重要组成成分,锌对于维持 DNA 聚合酶的活性具有相当的重要性;另外锌通过影响 RNA 聚合酶活性及转录因子的作用,能够导致基因转录异常,从而使蛋白质表达也发生变化;饲料中锌的含量,可以通过影响金属调节蛋白的转录活性而影响金属硫蛋白(MT)基因的表达。

MT 可以结合多种金属元素,是元素转运、维持细胞中的元素平衡、防止重金属中毒所必需的蛋白质。有时金属离子的浓度起到了启动该基因表达的功能。当体内金属元素含量增加时,组织中金属硫蛋白的含量就会升高,特别是镉、锌、铜、汞等元素的增加将显著提高 MT 基因的表达量(Bremner 等,1990)。因此,Sullivan 等(1997)认为可将 MT 基因的表达量作为体内锌状况的重要衡量指标。

金属元素对基因表达的这种调控有时将严重影响动物的生长。McNall(1995)等发现,低锌日粮限制动物生长的直接原因是由于低锌抑制了体内 IGF-1、GH 受体、GH 结合蛋白等基因的表达。Cui(1998)用大鼠进行试验表明,饲料中缺锌可明显降低肝脏、肾脏和小肠 MT-1 mRNA 水平,但给大鼠注射白细胞介素-1 后,MT-1 mRNA 明显升高,且缺锌组的 MT-1 mRNA 水平明显高于加锌组。在不同的生理状态下,锌对 MT-1 的调控性质完全不同。尽管认为 MT 是金属元素转运的必需蛋白质,但 Davis(1998)的研究表明,MT 过度表达(用转基因技术)的小鼠,锌的吸收率下降。因此,MT 的作用与表达及其与锌代谢的关系尚需深入研究。

### 2.3 硒对基因表达的调控

硒以半胱氨酸硒的形式参与硒蛋白(如 GSH-Px, 碘化甲状腺氨酸-5'-脱碘酶)的组成。在硒蛋白翻译过程中,UGA 密码子不在作为终止信号,而是作为半胱氨酸硒的编码信号,从而在蛋白中插入半胱氨酸硒(Shen,1993)。Burk(1993)、Bermano(1995)研究表明,日粮硒水平不但能够调节硒蛋白的含量与活性,而且可以调节相应的 mRNA 的量。但对不同组织,不同硒蛋白及 mRNA 对不同硒水平的敏感程度存在差异,如在硒耗竭时,磷脂过氧化氢 GSH-Px mRNA 的降解率不受影响,但胞液 GSH-Px mRNA 的降解率下降。因此,缺

硒时,2种酶的活性不同(Bermano,1996)。不同硒蛋白 mRNA 的 3'UTR 结构的差异是决定 mRNA 翻译程度及硒缺乏的敏感性的关键因素(Bermano,1996)。

GPX1 蛋白及 GPX mRNA 表达调控研究可为人与动物硒需要量的相对稳定机理(0.1~0.3  $\mu\text{g/g}$ )提供直接试验依据。硒是 GPX1 辅助因子,硒缺乏时,GPX1 活性将快速下降。试验表明,大鼠饲料硒缺乏,GPX1 蛋白及 GPX1 活性呈指数快速下降。GPX1 克隆试验表明动物硒营养状态对 GPX1 mRNA 水平有很大影响。缺乏硒对大鼠肝中 GPX1 mRNA 水平只有硒适宜动物的 1/10,在硒缺乏过程中,GPX1 mRNA、GPX1 活性及 GPX1 蛋白协调地呈戏剧性指数下降。这些试验结果提示,GPX1 mRNA 水平可能存在分子调控机理。

#### 2.4 其它微量元素对基因表达的调控

镉、铜、汞等元素的增加将显著提高 MT 基因的表达到量。Zhou(1994)等发现,高铜的促生长作用可能是由于其具有提高 GH 表达量的缘故。

### 3 维生素对基因表达的影响

#### 3.1 维生素 A(VA)

视黄酸与细胞核的视黄酸受体结合可以调节特异基因的表达。视黄酸受体在结构上与固醇类激素受体和甲状腺受体相似,3种受体均是转录调节的配位激活因子。因此,生长激素基因上的甲状腺素调节区也是视黄酸受体的作用位点。用脂肪细胞体外培养研究发现,视黄酸和糖皮质激素对 S14 基因的表达均具有显著的促进作用。二者协同作用可提高 S14 mRNA 水平 200~360 倍(Jump,1992),协同作用发生在基因转录水平上。视黄酸对脂肪酸和肌动蛋白基因表达没有影响,但可以使甘油磷酸脱氢酶 mRNA 水平降低 75%。这可能是视黄酸能够阻止未成熟脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞的原因(Jump,1992)。视黄酸可以促进肝脏、骨骼、肾脏和小肠碱性磷酸酶的表达(Nikava,1998)。刘恭平研究了维生素 A(VA)缺乏及再补充对小鼠胚胎 HoxC4(3.5)基因表达的影响,VA 通过调控 Hox 基因的表达来影响胚胎发育。张敬研究了  $\beta$ -胡萝卜素对白血病细胞中 c-Myc 癌基因表达的影响, $\beta$ -胡萝卜素(50  $\mu\text{mol/l}$ )对 HL-60 细胞内 c-Myc 的表达有显著性促进作用 ( $P<0.05$ ), $\beta$ -胡萝卜素通过上调 c-Myc 基因的表达,进一步诱导白血病细胞凋亡,从而抑制白血病细胞增殖。

#### 3.2 维生素 D(VD)

Hausler 等认为,肠粘膜细胞核中存在一种染色

体蛋白质,它可与活性最高的 VD 代谢物特异性结合。Holick 等(1971)证明这种代谢物为 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,是活体中 VD 受体的激素配位体。后来发现这种受体分布于禽类和哺乳类肠道、肾脏、骨骼、胰腺皮肤等多种组织。1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 受体的分子结构清楚表明它涉及基因转录的调控,但从分子水平看,受体到底是诱发还是抑制基因的表达尚不清楚。

#### 3.3 维生素 E(VE)

VE 可能是通过减轻金属离子对 DNA 的加合作用,从而抑制染色体的改变。铬可以引起 DNA 单链断裂和 DNA 加合,VE 可以抑制铬所造成的 DNA 损伤。VE 可以诱发角质细胞中热蛋白基因 HSP70 的表达,这表明 VE 对于铬引起的基因毒性具有保护作用。当铁离子存在时,VE 可以减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱发的 DNA 的加合作用。张敬研究 Se 和 VE 均能诱导白血病细胞 HL-60 和 K562 细胞凋亡。VE(100  $\mu\text{mol/l}$ )能够抑制 HL-60 细胞中 c-Myc 基因的表达,结果有显著性;VE 却不能抑制 K562 细胞内 c-Myc 基因的表达。相反,Se(8  $\mu\text{mol/l}$ )不能够抑制 HL-60 细胞中 c-Myc 基因的表达,却能抑制 K562 细胞内 c-Myc 基因的表达。

#### 3.4 维生素 K(VK)

VK 是肾结石形成的拮抗剂,适量应用 VK 对尿结石症有一定的预防作用。肾骨桥蛋白是一种多功能的磷酸化糖蛋白,是机体抵御结石形成的重要因素之一,VK 可上调大鼠肾骨桥蛋白(Osteopontin,OPN)及其 mRNA 的表达,降低结石模型尿草酸和钙的浓度,偏光显微镜观察结果显示大鼠结石模型肾晶体沉积明显减少(常连胜等,2001)。

### 4 结语

综上所述,以基因工程为核心的分子生物学技术应用于动物营养学研究领域具有很大的潜力,它不仅为动物营养学研究提供了一套全新的技术和方法,而且可在基因水平上解决动物机体的相互关系等问题。今后还需要从细胞内代谢物的特点、基因的调控蛋白等角度入手,把日粮信号以及激素与基因表达的关系弄清,从而进一步扩展人们从分子水平上对动物机体代谢进行调控的领域和手段,以达到调控动物生产的目的。

(参考文献62篇,刊略,需者可函索)

(编辑:王芳,xfang2005@163.com)

# 不同品种猪早期消化酶活性差异的研究

王磊 王康宁

不同品种的猪具有不同的种质特性,目前国内外对各猪种消化酶活性的研究主要集中在断奶阶段,并且由于日粮、饲养管理、取样方法、酶活分析方法以及酶活性表达方式的不同,所得数据的可比性有限。不同品种猪的消化酶活性是否存在差异,有待于进一步研究。本试验对长白猪、大白×太湖二元杂交猪(简称大太二杂猪)和太湖猪从初生到90日龄阶段消化酶

的发育规律进行研究,揭示了各猪种消化酶活性存在的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验日粮

日粮的配制参照NRC(1998)猪的营养需要。分25~60日龄、60~90日龄两个阶段配制饲粮,第一阶段为颗粒料,第二阶段为粉料。日粮组成及营养水平见表1。

表1 日粮组成及营养水平

日粮组成(%)	第一阶段	第二阶段	营养水平	第一阶段	第二阶段
玉米	57.81	65.03	DE(MJ/kg)	14.21	14.17
豆粕	10	26	CP(%)	20.00	17.92
全脂大豆	20	-	Ca(%)	0.80	0.60
麸皮	-	2	AP(%)	0.40	0.23
鱼粉	5	2	DLys(%)	1.15	0.83
乳清粉	5	-	DMet+DCys(%)	0.66	0.53
豆油	-	3	DTrp(%)	0.21	0.21
Lys-HCl	0.19	0.05	DThr(%)	0.71	0.64
DL-Met	0.05	-	Dlle(%)	0.66	0.61
Thr	0.05	-			
食盐	0.3	0.3			
CaCO <sub>3</sub>	0.62	0.64			
CaHPO <sub>4</sub>	0.4	0.40			
多维	0.03	0.03			
氯化胆碱	0.05	0.05			
矿添	0.5	0.50			
合计	100	100			

注:1. 每千克饲料中含 Fe 120 mg、Cu 7.2 mg、Zn 120 mg、Mn 4.8 mg、I 0.168 mg、Se 0.36 mg;

2. 每千克多维提供 VA 5 000 万 IU、VD<sub>3</sub> 1 000 万 IU、VE 2.5 万 IU、VK<sub>3</sub> 5 000 mg、VB<sub>1</sub> 2 000 mg、VB<sub>2</sub> 1 600 mg、VB<sub>6</sub> 6 000 mg、VB<sub>12</sub> 30 mg、烟酸 35 000 mg、泛酸钙 25 000 mg、叶酸 500 mg、抗氧化剂 500 mg;

3. D 表示以可消化氨基酸为基础。

### 1.2 试验动物

选择刚出生健康正常的长白猪、大太二杂猪和太湖猪各24头进行90d的试验。每个品种设为1个处理,每个处理按体重一致原则设4个重复,公母各半,每个重复6头猪。舍温25~28℃,25日龄断奶,自由采食和饮水。

### 1.3 样品制备

#### 1.3.1 屠宰试验

分别于仔猪0、30、60和90日龄时,从每个重复中各选择1头仔猪称重后,颈动脉放血致死,打开腹

腔立即结扎食管与贲门结合部、幽门瓣、回盲瓣、胰腺管,以防止样品相互污染。迅速取出胃置于冰冷的生理盐水中,取出全部胃内容物并称重后,将内容物充分混匀,取一部分立即放入液氮速冻,然后移入-70℃冰箱中保存备用。迅速取出胰腺,剥离脂肪组织和结缔组织并称重后,立即放入液氮速冻,然后移入-70℃冰箱中保存备用。

#### 1.3.2 样品前处理

①胃食糜上清液的制备:准确称取一定量的胃食糜,按重量体积比(w/v)加9倍体积的匀浆介质,在冰浴条件下2 500 r/min离心10 min,取上清液即得粗酶液,于-20℃冷冻保存。②胰腺上清液的制备:取出冷冻胰腺,用眼科剪于胰腺头、体和尾部各剪取一定量组织,按重量体积比(w/v)加入9倍体积的匀浆介

王磊,四川农业大学动物营养研究所,625014,四川雅安。

王康宁,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2008-02-21

质,其它步骤同胃食糜上清液的制备。

#### 1.4 样品分析

胃食糜蛋白酶活性和胰腺蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的活性都采用购自南京建成生物工程研究所的试剂盒,并应用 721 可见光分光光度计和 UV-800 紫外分光光度计进行测定。

#### 1.5 数据处理

数据采用平均数±标准差的形式表示,用 SPSS12.0 统计软件进行方差分析(ANOVA),并用 LSD 法进行多重比较。

### 2 结果与分析

#### 2.1 胃食糜蛋白酶的活性(见表 2)

表 2 各猪种胃食糜蛋白酶活性测定值

项目	长白猪	大太二杂猪	太湖猪
胃蛋白酶单位活性(U/g)			
0 日龄	39.1±12.3	67.5±34.8	89.1±47.1
30 日龄	49.2±22.8	48.1±14.6	81.4±38.2
60 日龄	53.8±36.8 <sup>a</sup>	128.6±46.5 <sup>ab</sup>	135.4±56.7 <sup>b</sup>
90 日龄	66.7±45.4	139.0±64.5	167.5±125.7
胃蛋白酶总活性(U)			
0 日龄	28.8±12.6	71.3±46.8	20.8±10.3
30 日龄	2 754±2 000	3 316±2 062	1 177±720
60 日龄	9 524±4 952 <sup>a</sup>	29 504±25 216 <sup>b</sup>	8 526±1 938 <sup>b</sup>
90 日龄	14 544±8 164	21 039±12 513	19 600±13 805

注:同行数据肩标不同小写字母者表示差异显著(P<0.05),肩标不同大写字母者表示差异极显著(P<0.01)。下表同。

表 2 列出了各猪种胃食糜蛋白酶单位活性以及总活性的测定值,可以看出各猪种胃蛋白酶单位活性从初生到 90 日龄都增加了 2 倍左右,但太湖猪胃蛋白酶单位活性在各日龄都要高于其它两个猪种,60 日龄时太湖猪胃蛋白酶单位活性达到 135.4 U/g,比长白猪高 1.5 倍,差异达到显著水平(P<0.05)。就胃蛋白酶总活性而言,大太二杂猪胃蛋白酶总活性在 3 个猪种中是最高的。

从表 2 可以看出,各猪种胃蛋白酶单位活性和总活性随日龄增长所呈现的变化趋势,胃蛋白酶单位活性都随日龄增加而呈升高的趋势。长白猪和太湖猪胃蛋白酶总活性都随日龄增加而急剧升高,至 90 日龄时胃蛋白酶总活性分别升高 505 和 942 倍,这主要是由于胃蛋白酶分泌的增加所引起的。大太二杂猪胃蛋白酶总活性也随日龄增加而升高并于 60 日龄时达到顶峰,随后表现为下降的趋势。

#### 2.2 胰腺消化酶的活性(见表 3)

表 3 列出了各猪种胰腺消化酶单位活性的测定值。就胰蛋白酶单位活性而言,在各日龄段长白猪都高于大太二杂猪,尤其 60 日龄时长白猪胰蛋白酶单位活性达 9 479 U/g,比大太二杂猪和太湖猪分别高了 1.06 和 1.29 倍,差异达到显著水平(P<0.05)。90 日龄时太湖猪胰蛋白酶单位活性最高,达 12 961 U/g。就胰脂肪酶单位活性而言,从初生到 60 日龄长白猪都高于其它两个猪种,而 90 日龄时太湖猪胰脂肪酶单位活性在 3 个

猪种最高达到 738 U/g,与其它两个猪种的差异达到极显著水平(P<0.01)。

表 3 各猪种胰腺消化酶的单位活性(U/g)

项目	长白猪	大太二杂猪	太湖猪
胰蛋白酶			
0 日龄	2 339±1 268	1 664±792	2 440±633
30 日龄	3 203±804	2 546±1 603	2 714±1 225
60 日龄	9 479±4 673 <sup>a</sup>	4 597±927 <sup>b</sup>	4 141±1 815 <sup>b</sup>
90 日龄	8 556±2 259	8 245±3 103	12 961±6 521
胰淀粉酶			
0 日龄	2 696±1 953	2 351±604	2 271±1 043
30 日龄	7 533±2 788	7 758±3 345	9 121±3 422
60 日龄	18 644±9 608	22 528±9 305	13 364±5 815
90 日龄	44 373±11 468	35 810±14 210	37 440±11 454
胰脂肪酶			
0 日龄	225±38	207±53	188±60
30 日龄	361±183	194±62	292±157
60 日龄	522±150	357±202	397±95
90 日龄	510±112 <sup>Ab</sup>	342±134 <sup>Ab</sup>	738±18 <sup>B</sup>

表 4 给出了各猪种胰腺消化酶总活性的测定值。同单位活性的变化规律一样。从初生到 60 日龄长白猪胰蛋白酶总活性都显著地高于其它两个猪种,而 90 日龄时太湖猪胰蛋白酶总活性最高并显著地高于长白猪和大太二杂猪(P<0.05)。就胰淀粉酶总活性而言,初生时长白猪胰淀粉酶总活性已达 5 166 U,比大太二杂猪和太湖猪分别高 1.1 和 3.0 倍。从初生到 90 日龄长白猪、大太二杂猪和太湖猪胰淀粉酶总活性分别升高了 433、716 和 1 533 倍。就胰脂肪酶总活性而言,初生时胰脂肪酶总活性长白猪极显著地高于大太

二杂猪和太湖猪 ( $P<0.01$ ),而且从初生到 60 日龄长白猪胰脂肪酶总活性都高于其它两个猪种, 但到 90 日

龄时太湖猪胰脂肪酶总活性急剧升高并显著地高于长白猪和大太二杂猪。

表 4 各猪种胰腺消化酶的总活性(U)

项目	长白猪	大太二杂猪	太湖猪
<b>胰蛋白酶</b>			
0 日龄	4 268±2 041 <sup>a</sup>	1 744±832 <sup>b</sup>	1 408±417 <sup>b</sup>
30 日龄	31 864±8 083	23 390±18 948	21 806±10 556
60 日龄	274 763±123 229 <sup>Ab</sup>	131 105±23 963 <sup>b</sup>	65 660±38 878 <sup>Bb</sup>
90 日龄	401 578±92 069 <sup>a</sup>	408 707±127 448 <sup>a</sup>	629 693±202 345 <sup>b</sup>
<b>胰淀粉酶</b>			
0 日龄	5 166±3 543 <sup>a</sup>	2 504±911 <sup>ab</sup>	1 278±523 <sup>b</sup>
30 日龄	70 955±33 463	72 734±42 258	71 755±24 604
60 日龄	478 238±199 319 <sup>ab</sup>	652 012±381 797 <sup>a</sup>	183 861±68 696 <sup>b</sup>
90 日龄	2 234 586±726 418	1 794 618±742 362	1 959 186±651 537
<b>胰脂肪酶</b>			
0 日龄	459±80 <sup>A</sup>	219±68 <sup>Ba</sup>	108±38 <sup>Bb</sup>
30 日龄	3 203±1 384	1 783±906	2 284±1 190
60 日龄	14 472±5 555	9 944±6 556	6 227±4 024
90 日龄	25 591±9 144 <sup>a</sup>	17 237±6 953 <sup>Ab</sup>	38 647±7 378 <sup>Bb</sup>

### 3 讨论

胃蛋白酶不是一种单一的酶,而是一组蛋白水解酶,包括胃蛋白酶 A、胃蛋白酶 B、胃亚蛋白酶和胃凝乳蛋白酶。胃蛋白酶对蛋白质肽键作用的特异性较差,主要水解分子中含有苯丙氨酸、酪氨酸和亮氨酸的肽键。Lindemann 等(1986)和 Eford 等(1982)研究表明,仔猪胃粘膜蛋白酶在出生后 2 周内活性很低,随后迅速升高。断奶后单位胃蛋白酶活性继续上升,同时胃粘膜重量亦升高,这样导致胃蛋白酶总活性有很大升高。本试验对各猪种胃食糜蛋白酶单位活性和总活性的研究表明,在各日龄段太湖猪胃蛋白酶单位活性都是最高的,大太二杂猪次之,长白猪最低。30 日龄时与初生时相比太湖猪和大太二杂猪胃蛋白酶单位活性呈现下降的趋势,分析可能是断奶应激所致,此后胃蛋白酶的单位活性稳步上升,这与杨琳等(2001)对杜长大三元猪的研究结果类似,在杨琳的研究中杜长大三元猪断奶后的第 7 d 胃蛋白酶单位活性仍低于断奶前水平,此后随着日龄的增长胃蛋白酶的活性逐渐升高。就胃食糜蛋白酶总活性来看,在 90 日龄内长白猪和太湖猪都随日龄增加而急剧升高。大太二杂猪胃蛋白酶总活性也随着日龄增长而急剧升高并于 60 日龄时达到顶峰,随后开始下降。在各日龄段大太二杂猪胃蛋白酶总活性在 3 个猪种中都是最高的,并于 60 日龄时显著高于长白猪和太湖猪 ( $P<0.05$ )。胃蛋白酶对进入胃中的蛋白质进行初步消化降解,从而有利于其在小肠中进一步的消化和吸收,由此推测大太二杂猪在生长早期对蛋白质的利用率可能较高。

各猪种胰腺分泌的蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶无论在单位活性还是总活性上都存在着较大差异。初生时各猪种胰蛋白酶单位活性都很低,而且从初生到 30 日龄各猪种胰蛋白酶单位活性上升的幅度都不大;从 30 日龄开始各猪种胰蛋白酶单位活性开始成倍升高。从 90 d 的试验结果来看,长白猪胰蛋白酶单位活性都高于大太二杂猪,并于 60 日龄时达到显著水平 ( $P<0.05$ );太湖猪与长白猪之间的差异出现在 60 和 90 日龄,60 日龄时太湖猪胰蛋白酶单位活性显著 ( $P<0.05$ ) 低于长白猪,而 90 日龄时太湖猪胰蛋白酶单位活性反而高于了长白猪。分析初生到 30 日龄各猪种胰蛋白酶单位活性上升幅度不大的原因,很可能是因为 30 日龄正是仔猪断奶后的第 5 d,断奶应激对胰蛋白酶分泌的抑制作用还没有消除所造成的。张振斌等(1999)对杜×大×长三元杂交猪的研究表明,与哺乳仔猪相比,胰腺中胰蛋白酶活性在断奶后 9 d 内不能完全恢复。Lindemann 等(1986)、Owsley 等(1986)也得出类似的结果。但 Makkink 等(1994)对大×长二元杂交猪以及 Jensen 等(1997)对长×大二元杂交猪的研究发现,胰脏中单位胰蛋白酶水平在断奶后并没有下降。因此仔猪断奶后胰脏胰蛋白酶水平下降可能与采食量不足有关。就胰蛋白酶总活性而言,长白猪从初生到 60 日龄都高于其它两个猪种,初生时长白猪显著高于大太二杂猪和太湖猪 ( $P<0.05$ ),60 日龄时长白猪显著高于大太二杂猪 ( $P<0.05$ ) 而极显著高于太湖猪 ( $P<0.01$ )。蛋白质的消化主要是胰蛋白酶来完成的,由长白猪较高的胰蛋白酶单位活性和胰蛋白酶总活性

可以推测长白猪对蛋白质的消化利用能力更强,这也同其胴体瘦肉率较高相一致。各猪种胰淀粉酶单位活性和总活性都随着日龄增长呈递增趋势。张振斌等(1999)指出断奶应激对淀粉酶活性的影响不大。就胰淀粉酶总活性而言,初生时长白猪胰淀粉酶总活性已达 5 166 U, 比大太二杂猪和太湖猪分别高 1.1 和 3.0 倍;30 日龄时各猪种胰淀粉酶总活性不存在明显差异;60 日龄时大太二杂猪胰淀粉酶总活性在 3 个猪种中最高,并与太湖猪的差异达到显著水平( $P<0.05$ )。从初生到 90 日龄长白猪、大太二杂猪和太湖猪胰淀粉酶总活性分别升高了 433、716 和 1 533 倍。Lindemann 等(1986)、Owsley 等(1986)以及 Makkink 等(1994)对其它猪种的研究也发现了淀粉酶活性的迅速升高。Jensen(1997)认为淀粉酶活性的迅速升高可能是为了能够适应饲料中淀粉大量增加的需要。各猪种胰腺脂肪酶总活性也随日龄增长而呈线性增加,但单位活性的变化却不相同。太湖猪胰腺脂肪酶单位活性在整个试验期内持续升高,并于 90 日龄极显著的高于其它两个猪种( $P<0.01$ );长白猪胰腺脂肪酶单位活性从初

生到 60 日龄持续增加,而 60 到 90 日龄基本稳定不变;大太二杂猪 30 日龄时胰腺脂肪酶单位活性比初生时有所下降,这很可能是还没有从断奶应激中恢复过来所致,60 日龄时大太二杂猪胰腺脂肪酶单位活性显著升高,但从 60 至 90 日龄大太二杂猪胰腺脂肪酶单位活性基本稳定不变,与此阶段长白猪的变化一致,这很可能说明 60 日龄时长白猪和大太二杂猪脂肪酶的发育已达到成年水平。Cera 等(1990)对杜长大三元猪、Jensen 等(1997)对长大二元猪研究发现,仔猪断奶后胰腺脂肪酶水平明显下降,且在断奶后 2 周内维持断奶时水平。由于本试验未测定仔猪断奶时的酶活性,所以就断奶对各猪种胰腺脂肪酶活性的影响还不能下结论,这方面还需要进一步的研究。太湖猪胰腺脂肪酶单位活性和总活性都随日龄增长而持续升高,并于 90 日龄时显著的高于其它两个猪种,推测随着太湖猪脂肪酶活性的升高,其对脂肪的利用能力提高,其体内脂肪的沉积也迅速增加,这是造成太湖猪胴体较肥的一个重要原因。

(编辑:沈桂宇,guiyush@126.com)

### ·信息采撷·

## 养鱼业微利时代如何节约饲料成本

目前养鱼业已走向微利时期,低迷的市场价格使养鱼业面临着严峻的考验。因此养殖业就要从节约成本做起,积极挖掘、扩展利润空间。而在养殖过程中饲料成本又是占第一位的要素(约占 60%~70%),所以,节约成本就要从科学、有效、节省使用饲料开始。

### 一、选择营养物质合理均衡、品质好的饲料

饲料品质的好坏直接关系到养殖成本,饲料品质好,鱼类吃食后可消化吸收的部分高,鱼类生长速度快,饲料系数低。反之,用品质差的饲料养殖鱼类则会大大加重养殖成本。

### 二、科学合理地投喂是减少饲料浪费、控制饲料成本的有效途径

投喂要依据“四定”(定时、定点、定质、定量)原则,做到均匀适量,避免忽多忽少,造成过饱过饿,消化不良,影响鱼类正常的消化吸收。要根据水质、天气、鱼类活动情况及摄食状况决定投喂量。

在投喂量上一般控制鱼类吃食到“八成饱”,即八成鱼吃饱,还有二成鱼吃不很饱;投喂 2 h 后,饲料基本吃完,略有剩余,或还有少数鱼群游来游去觅食。这样可以维持鱼群食欲旺盛,减少饲料损失。

合理确定投喂次数,要根据鱼类的吃食性、生长状况和摄食强弱来确定。合理的投喂量和次数,有利于提高鱼类对饲料的消化率,减少饲料在水中的损失,降低饲料系数。

恰当地掌握投喂时间和选好投喂场所。饲料食台要搭在池塘背风的一侧,水较深、底质较硬(少渗漏)、较开阔处。根据鱼类的品种、食性规格大小来确定投喂时间和次数。一般成鱼投喂分早晚两次,早上在 8~9 时,下午在 5~6 时为宜。

### 三、健康的水质管理

水质管理很重要,俗话说:“三分种,七分管。”管是指水质管理。池塘水质条件的优劣对鱼类饲料系数有重要的影响。一般来讲,水质无污染、清新、溶氧量充足的水体,鱼类摄食量大,食欲旺盛,饲料利用率高,生长速度快,饲料系数小。而在池塘水质各种理化因子中,水体溶氧量是对饲料影响最大的因素,水体溶氧充足,鱼体生长新陈代谢旺盛,对饲料消化时间大大缩短,鱼类的生长速度指数呈增长态势。经水产养殖专家试验,当水中的溶氧量从 7.6 mg/t 降到 3.1 mg/t 时,饲料系数提高了 5.6 倍,生长速度降低了 9~10 倍。

另外,在一定的水温范围内,鱼类饲料的消耗量与水温升高成正比。水温在一定范围内,每升高 1℃,对同体重的鱼类投饲率增加 0.1%~0.5%。因此同种鱼类规格,在不同的水温有不同的投饲率。

# 2008' 海因特鱼虾营养与饲料技术 北方研讨会 会议侧记

2008年3月20日在沈阳辽宁大厦举办的2008'海因特鱼虾营养与饲料技术北方研讨会,来自中国北方各省市的300多人参会,会议围绕饲料企业采购、加工工艺、养殖模式与疾病免疫预防、膨化水产饲料的配方技术与产品开发等方面进行了报告。与会代表反响很大,都认为这是一次难得的学习机会,为此,《饲料工业》特将此次会议的内容经录音整理,摘要刊发,与行业读者共享。



**报告题目: 饲料企业采购管理探索**  
**报告人: 许英灼, 广东海大集团股份有限公司, 副董事长**

在原料高价运行的市场形势下,饲料企业如何有效地管理采购工作至关重要。

**新时期的饲料企业采购特点:** 在国际化、信息化背景下,行业持续增长的同时加工利润微利化,行业过度竞争。全球化原料价格风险加大,与加工利润严重不对称,单纯饲料加工企业经营风险巨大。

**市场研究和风险管理两架马车:** 基于深入、全面、及时、系统以及持续的团队信息工作,专业化研究市场供需变化,同时利用好期货这种成熟的避险工具,

更加深入地提高采购的专业化水平是采购工作的长期核心竞争力所在。

**专业化采购的要求:** 集中采购。通过集中采购,实现采购专业化,相对降低公司原料采购的成本,成为公司综合竞争力提高的一个策略,特别是单纯的饲料加工企业。规模经济是自然的,但可能也是表面的、次要的,没有专业化作为基础,规模化不一定必然带来优势,甚至有可能成为风险扩大的原因,形成规模不经济。

**采购的人力资源工作:** 人的因素是最为决定性的因素,“一把手工程”,观念理念的更新。

**选才:** 80%的人品+价值观,20%的能力; **考核:** 80%的制度+激励,20%的监督机制。

**报告题目: 草鱼的养殖模式与疾病免疫预防技术**  
**报告人: 吴建升, 广州海因特生物技术公司, 副研究员**

通过多级轮养技术,草鱼养殖2~3月可上市,1年能轮养3~4批商品鱼,综合产量达到4000kg/亩以上;提高了资金周转率和收益,缩短资金投入周期,缓解了养殖户资金压力;提高鱼类的生长速度和产量,解决了池塘养殖过程中养殖密度、生长速度和产量的平衡关系。充分利用了不同规格草鱼商品鱼的价格差(规格1000~1500g和3000g以上草鱼价格差价在2.0元/kg),弥补了高池租和饲料成

本增加的压力;多级轮养技术巧妙地应用池塘鱼载力和鱼产量的关系,密度、生长和产量的关系,极大地提高了池塘效率,缩短了养殖周期,从而提高了渔业生产效率。

**健康鱼种-配合饲料-水质调控即三连环疾病防治技术**是草鱼养殖中行之有效的办法。

追求养殖的综合效益和最佳效益养殖方案是中国池塘养殖的灵魂和价值所在。



**报告题目: 增进鱼类健康、控制鱼类疾病**  
**报告人: 王伟俊, 武汉新华扬集团有限公司, 研究员**

影响鱼类健康的四因素: 拥挤胁迫效应、适应性综合反应、营养代谢障碍和病原传播感染。前3种

因素使鱼类受损的缓解和控制措施: 调节水质;降低密度;停止一切药物施放;停食不少于2d,每周停食1d;开食调整营养配伍,逐步恢复投饲率;饲料中增加维生素和功能性添加剂;勿动网操作、运输。增进鱼类健康、控制鱼类疾病的关键: 产量与质量并重才是最大效益。健康是本,防治是标;防控措施早走一步;养殖业者的心态决定鱼类的健康水平。

**报告题目:生产鱼类膨化料的挑战****报告人:Anders Flarup,布勒(常州)机械有限公司,工程师**

水产膨化饲料颗粒的外观质量很大程度上取决于生产过程中的混合和切割两个工艺环节。合理的料仓设计可以避免物料出现“积拱”现象,持续喂料是保证连续生产的前提。物料在调质器里形成一种翻滚的瀑布状的物料流,物料和蒸汽最大范围接触,使得物料得到充分的加热。物料调质时间控制在 30~40 s 可达到比较好的效果。强制喂料器不仅能够确保对主轴的喂料相对恒定,也能够使旁通的功能更好发挥。剪切锁、蒸汽锁的使用可使物料在加工过程中达到理想的料流状态。蜘蛛轴承可以起到混合物料的作用,同时也可以确保料流正确,粒子均质,防止螺杆出现“漂

移”现象。压模板上开有很多洞,这样能够形成合适的逆压力而达到合适的粒子质量和合适的膨胀率。布勒设计的模头在中心和边缘都有支撑,中间有一个大螺栓,同时能够固定刀头。用锋利的切刀切割粒子对于保证粒子质量是必要的。设计切刀壳可以通过铰链摇到一边,有利于快速更换模板。新型刀头是在压模板固定在模头之后再固定在压模板上,压模板和刀的距离在生产过程中可以调节。切刀卸料装置是接在膨化机之后的一个重要单元,用来排出启动时产生的废料。

**报告题目:霉菌毒素对水产饲料的影响****报告人:张丞,百奥明饲料添加剂(上海)有限公司,博士**

饲料和原料霉菌毒素污染在全球范围日益严峻,其危害不容忽视。已报道的鱼虾霉菌毒素中毒病理表现包括:生长差、贫血、血凝受损、肝脏或其它器官受损、免疫反应降低,导致水产养殖业的经济

损失。越来越多证据表明了霉菌毒素对水产养殖业的负面效应。水产养殖者正慢慢认识到影响生产的各种因素,但是,需要更多关于霉菌毒素对各种水产品种的影响的具体资料;需要更多研究来验证近期的发现,确定饲料中的建议最低水平。

对水产饲料中霉菌毒素的来源、霉菌毒素对水产动物的危害和霉菌毒素的消除方法进行翔实的分析,是未来水产饲料安全生产的保障。

**报告题目:动物源蛋白质质量检测****报告人:虞予,美国动物蛋白及油脂提炼协会,博士**

如何选用和鉴定高价值的动物蛋白源将关系到饲料产品的品质好坏。根据动物源性蛋白在水产饲料中应用研究的经验,提出几种动物源蛋白质质量检测的建议方法:

**水解羽毛粉:**经体外胃蛋白酶(0.2%)酶解试验,消化率应在 75%~80%;比重应接近 480 kg/m<sup>3</sup>;赖氨酸应不低于 2%(2.3%粗蛋白);灰分含量最好不超过 5%;近红外氨基酸测定;假蛋白测定。



**鸡肉粉:**经体外胃蛋白酶(0.002%)酶解试验,消化率应不低于 72%;胱氨酸含量应不高于 0.7%(或 1%粗蛋白);赖氨酸含量应不低于 3.1%(或 4.8%粗蛋白);灰分含量最好不超过 25%;镜检;近红外氨基酸测定;假蛋白测定。

**血粉、血球粉:**经体外胃蛋白酶(0.2%)酶解试验,消化率应不低于 85%;赖氨酸生物利用率不低于 80%;赖氨酸含量应不低于 7.4%(8.2%粗蛋白);灰分含量最好不超过 5%;近红外氨基酸测定;假蛋白测定。

**报告题目:膨化水产饲料的配方技术与产品开发****报告人:杨勇,广州海因特生物技术有限公司,博士,技术总监**

膨化水产饲料具有消化率高、水稳定时间长、便于观察摄食和控制投料、毒害物质降低、利于生产高油脂饲料、便于热敏性成分或药物添加的特点。膨化饲料存在不足,但优点突出;发展是必然趋

势;配方结构有独特性;开发要综合考虑。膨化水产饲料正由南至北迅速普及,研究养殖品种的生理特性和生活习性,提高养殖技术是膨化饲料产品开发成功的重要保证!



**报告题目: 黄颡鱼的养殖与膨化饲料配方技术**

**报告人: 章太卓, 广州海因特生物技术有限公司, 技术经理**

良好的养殖效益、巨大的消费需求驱动着黄颡鱼规模化精养市场越来越大。南方市场应用和推广膨化料养殖黄颡鱼的成功经验对黄颡鱼的养殖与饲料配方提出了新的要求。配方要求: 配方营养水平科学合理, 过高的营养水平可能会导致鱼体代谢负

荷加重, 影响鱼体生长和体色; 配方的稳定性尤其重要; 严格控制原料质量。病害防治要求: 改善养殖池塘水质, 营造良好的池塘环境; 预防为主, 治疗为辅; 无鳞的黄颡鱼对硫酸铜、敌百虫等药物比有鳞鱼更为敏感, 使用药物时要掌握好用药浓度。



**报告题目: 现代饲料企业质量管理与效益提升**

**报告人: 夏国志, 广东海大集团畜牧水产研究中心, 博士**

在饲料原料高位运行的形势下, 应对原料上涨的对策: 稳定产品质量, 保持自己公司的产品质量稳定; 挖潜增效, 提升企业的管理能力, 向管理要效

益, 提升企业的竞争力。多年的实践验证证实, 稳定质量提升效益的内部着眼点是: 产品经营, 投入产出比, 精准营养, “跑、冒、滴、漏”的管理, 回机料管理, 设备及人员管理。按照以上几项操作进行粗略计算, 对一个年产 25 万吨饲料的企业一年可以为企业节约成本 894.5 万元, 说明从产品经营、生产过程管理、人员管理等环节内部挖潜的思路与实践。行之有效的实际操作方案对效益提升将带来有益的启迪。

**报告题目: 对虾饲料质量控制与实用配方**

**报告人: 王胜, 广东海大集团畜牧水产研究中心, 博士**

配方技术上的差异化优势和保持饲料品质的稳定性是 2008 年对虾饲料生产的主旋律! 多年虾料市场开发实践经验表明, 虾料质量标注、质量保证措施、饲料原料质



量、虾料配方、生产工艺等是保证对虾饲料质量的关键控制点。影响虾料产品质量的主要环节: 配方 42%、工艺 24%、设备 18%、操作 12%、其它 4%。优质原料、科学配方、先进设备、合理工艺、SLAM 贮存是虾饲料品质的保证。



**报告题目: 微生态制剂对水产养殖效果的提升**

**报告人: 丁振红, 广东海大集团畜牧水产研究中心, 教授**

水体中用微生态制剂可起到水质调节和营养作用; 饲用微生态制剂可改善环境、提高免疫、抵抗应激、促进生长。真实的

试验数据证实, 应用微生态制剂可改善稳定水质、降低鱼虾死亡率、提高鱼虾生长速度、提高饲料利用率, 从而提高养殖效益, 为提高饲料产品在终端市场的竞争力提供了强有力的支持。微生态制剂在水产养殖中已逐步得到广泛应用, 尤其是在南美白对虾养殖上的应用; 其对于水产养殖效果的提升作用得到肯定。微生态制剂在水产养殖中的应用是水产养殖的又一次新的技术变革!

**报告题目: 北方鲢鱼的养殖及膨化饲料**

**报告人: 王欣, 广州海因特生物技术有限公司, 技术经理**

土鲢传统的养殖模式导致水质恶化、疾病频发、劳动量大等严重束缚了土鲢养殖业的发展。2007 年海大集团率先在辽宁进行了膨化料养殖土鲢的全程生产试验, 试验取得了可喜的突破, 与海鱼+鸡肠饲

喂组相比, 饲喂膨化料的鲢鱼长势良好, 不发病、水质清新、投喂轻松, 养殖效益也大幅提高 40% 以上。试验证明, 膨化料投喂鲢鱼优势非常明显!

