

n-3 多价不饱和脂肪酸营养强化轮虫技术研究

张利民 常建波 张秀珍 宋丽辉 孙玉增 李烟芬 王际英 于光溥 官向红

(山东省海洋水产研究所,烟台 264000)

肖险崎

(寻山渔业公司养鱼场,荣成 264300)

摘 要 通过甲酯型、乙酯型、脂肪酸型和甘油酯型化学型式 n-3 多价不饱和脂肪酸的营养强化饵料对轮虫的营养强化试验,观察了营养强化过程中轮虫生理生态变化,测定了轮虫体内 EPA、DHA 的含量。结果表明:不论是哪种化学型式的营养强化饵料,营养强化效果均好于微绿球藻强化对照组,轮虫中 EPA、DHA 含量明显提高,并在强化 12 h 达到最高峰。特别是 DHA 的转化吸收率,几种化学型式的营养强化饵料存在显著差异。假定甘油酯型营养强化饵料 DHA 的生物利用度为 100,根据测定结果推算,甲酯型为 54,乙酯型为 78,脂肪酸型为 129。由此可见,首次采用的脂肪酸型营养强化饵料效果最好,甘油酯型次之,单酯型较差。

关键词 n-3 多价不饱和脂肪酸,22 碳 6 烯酸,脂肪酸,营养强化,轮虫

轮虫是海水养殖苗种生产过程中前期的重要生物饵料,它所含有营养成份是否全面均衡,直接影响到苗种的生长及存活。我国南方各省应用酵母培养轮虫的较多,这种轮虫缺乏脂溶性维生素及 n-3 多价不饱和脂肪酸(n-3 PUFA)等营养物质,用作前期生物饵料,会造成苗种的营养不良。即使用微绿球藻(*Nannochloropsis* sp.)等营养强化的轮虫饲喂海水稚鱼,n-3 PUFA 仍然满足不了苗种的需求。然而 n-3 PUFA 又是海水稚鱼维持正常生长所必需的[渡边武 1978,竹内俊郎 1994]。1971 年古川等首先利用面包酵母培养的轮虫饲喂海水稚鱼,获得成功,但成活率很低。渡边武等[1975、1976]发现这是由于轮虫中缺乏海产鱼必需的 n-3 PUFA,特别是 22 碳 6 烯酸(DHA)、20 碳 5 烯酸(EPA)含量过低造成的。为此,1976 年今田和西口等人开发出了富含 n-3 PUFA 的油脂酵母及乳化乌贼肝油等,用其来强化轮虫,使稚鱼的存活率大大提高[山中达郎 1993]。最近日本、美国及比利时先后研制出了 Super Selco、SR、SA、ドコサ-65E(乙酯型)和 Ester 85(甲酯型)等轮虫、卤虫专用 n-3 PUFA 营养强化饵料。后两种产品的 DHA/FA、EPA/FA 含量已分别提高到 50%、25% 以上。我们自 1993 年开始研究,目前已有 50DE-A(脂肪酸型)、50DE-E(乙酯型)、50DE-M(甲酯型)等营养强化饵料应用于苗种的前期生物饵料轮虫等的营养强化。由于脂肪酸(A)型 n-3 PUFA 化学性质不同于甲酯(M)、乙酯(E)型,其提取工艺复杂,制品不稳定易氧化等原因,目前国内外尚未见研究应用这种类型营养强化饵料的报道。本研究通过脂肪酸型、甲酯型、乙酯型和甘油酯型几种不同类型 n-3 PUFA 的营养强化饵料对轮虫的营养强化试验,比较其吸收利用情况及营养强化效果,得知脂肪酸型的生物利用率及吸收转化率均好于单酯及甘油酯,为更好地应用 n-3 PUFA 的营养强化技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用营养强化饵料:50DE-A 微囊:脂肪酸型,DHA/FA:50%左右,EPA/FA:26%左右,微囊直径:2~6 μm ,密度:300~1 000 亿个/mL。50DE-E 微囊:乙酯型,其他与50DE-A相同。50DE-M 微囊:甲酯型,其他与50DE-A相同。日本乌贼肝油:甘油酯型,自身乳化,DHA/FA:24%左右,EPA/FA:15%左右。

轮虫:褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)。

1.2 观察与取样

试验观察与取样于1995年12月25日2时40分至26日22时40分在山东荣成寻山养鱼场进行。试验分成五个组:A为对照组,B至E为试验组,轮虫培养于0.5 m^3 玻璃钢水槽中,水槽中水体0.25 m^3 ,水温控制在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,微绿球藻浓度为770万个/mL,不间断充气。试验B、C、D、E各组分别添加50DE-M、50DE-E、50DE-A、日本乌贼肝油各50 mg/L,对照A组未添加营养强化饵料,其他条件一致,于0、6、12、18和24 h在解剖镜下观察轮虫的密度、挂卵率、摄食和活力等情况,取三次观察结果平均值,并用200目筛绢收集每个时刻的轮虫样品速冻、待测。

1.3 样品处理及脂肪酸的测定

样品处理:称取10.0 g速冻轮虫样品于研钵内研磨10 min,加入甲醇与氯仿各20 mL,继续研磨4 min,然后放入具塞的250 mL三角瓶内,用甲醇与氯仿各10 mL洗研钵,洗液并入,浸泡24 h。次日将三角瓶内容物过滤入250 mL具塞三角瓶内,并用35 mL氯仿分三次重复洗涤三角瓶及残渣,加入15 mL蒸馏水,轻轻来回倒置2次,再将其倒入离心管中,用LXJ-II型离心机恒速(2 000 r/min)3 min,将上层液移去,用无水硫酸钠脱水,过滤于干燥洁净的反应烧瓶内,在 40°C 以下减压蒸去氯仿,至2 mL终止。加入10 mL无水甲醇使之溶解。慢慢加入1 mL浓硫酸,加热回流20~30 min。冷却后移入分液漏斗,并以15 mL石油醚分三次洗涤烧瓶。洗液并入分液漏斗,略振荡分液漏斗进行萃取,液面分清后放去下层液,加入蒸馏水反复洗涤提取液至中性。通过无水硫酸钠滤入洁净小试管中,定容至4 mL。

脂肪酸测定:取定容后的样品1 μL ,用SQ-206气相色谱仪进行测定,测定条件及计算方法参照沈小婉[1992]。

2 结果

2.1 试验各组轮虫生理生态变化

对照A组与B、C、D、E各试验组,营养强化过程中0、6、12、18和24 h每个时刻的轮虫密度、挂卵率、摄食及活力情况观察结果如表1、图1和图2。

从表1、图1和图2可知,轮虫密度:除对照A组先升后降又升外,甲酯型B组、乙酯型C组、脂肪酸型D组和甘油酯型E组均先降后升。轮虫挂卵率:除甲酯型B组6 h显著降低外,其余各组均正常。同时不难看出乙酯型C组、脂肪酸型D组、甘油酯型E组在同一时刻的挂

卵率明显高于对照 A 组。轮虫的活力及摄食情况: 甲酯型 B 组、乙酯型 C 组、脂肪酸型 D 组明显好于对照 A 组及甘油酯型 E 组, 特别是脂肪酸型 D 组与其余各组有明显差异。

表 1 试验各组营养强化饵料强化轮虫的试验观察结果

Table 1 Observations of rotifer enrichment with various enriching diets

组别	A	B	C	D	E
n-3PUFA 类型	无	甲酯	乙酯	脂肪酸	甘油酯
开始时	R = 223 个/mL R 卵 = 43.5% 活力较好 摄食较好	R = 241 个/mL R 卵 = 44.0% 活力一般 摄食较好	R = 245 个/mL R 卵 = 48.5% 活力一般 摄食较好	R = 295 个/mL R 卵 = 53.0% 活力较好 摄食较好	R = 266 个/mL R 卵 = 42.0% 活力较好 摄食较好
6 h 后	R = 242 个/mL R 卵 = 33.5% 活力好 摄食好	R = 213 个/mL R 卵 = 23.5% 活力一般 摄食较好	R = 228 个/mL R 卵 = 46.5% 活力好 摄食较好 稍有粘结	R = 252 个/mL R 卵 = 45.8% 活力好 摄食较好 稍有粘结	R = 223 个/mL R 卵 = 48.7% 活力一般 摄食较好粘结 有浮沫粘壁
12 h 后	R = 238 个/mL R 卵 = 31.3% 活力好 摄食较好 稍有粘结	R = 219 个/mL R 卵 = 44.7% 活力好 摄食好 稍有粘结	R = 246 个/mL R 卵 = 43.1% 活力好 摄食较好 稍有粘结	R = 241 个/mL R 卵 = 49.8% 活力很好 摄食较好 稍有粘结	R = 221 个/mL R 卵 = 45.7% 活力好 摄食较好 有粘结对雄虫
18 h 后	R = 212 个/mL R 卵 = 42.3% 活力好 摄食较好	R = 227 个/mL R 卵 = 45.4% 活力好 摄食较好	R = 256 个/mL R 卵 = 54.7% 活力好 摄食较好 稍有粘结	R = 283 个/mL R 卵 = 60.1% 活力好 摄食好 稍有粘结	R = 253 个/mL R 卵 = 53.4% 活力好 摄食较好 有雄虫
24 h 后	R = 231 个/mL R 卵 = 34.6% 活力较好 摄食较好 有雄虫	R = 225 个/mL R 卵 = 46.7% 活力好 摄食好	R = 309 个/mL R 卵 = 60.2% 活力好 摄食好	R = 316 个/mL R 卵 = 44.6% 活力很好 摄食很好	R = 306 个/mL R 卵 = 55.6% 活力较好 摄食较好 有雄虫

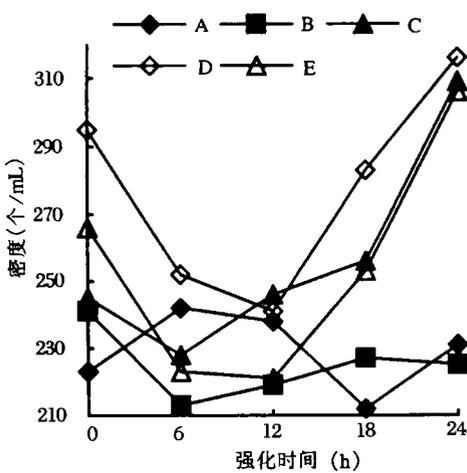


图 1 试验各组轮虫密度变化情况

Fig.1 Variation of rotifer density in every testing group

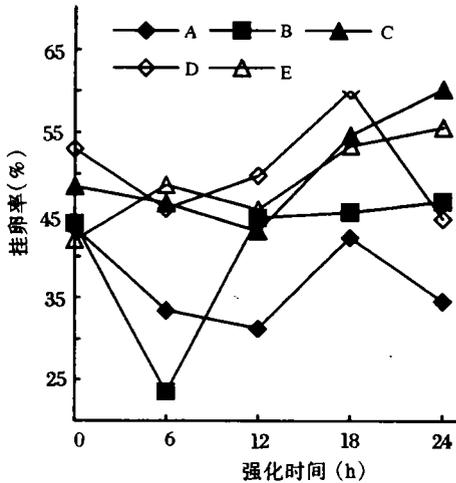


图 2 试验各组轮虫挂卵率变化情况

Fig.2 Variation of egg-hanging rate of rotifer in every testing group

2.2 试验各组轮虫 DHA、EPA 含量的变化

对试验各组 0~24 h 每隔 6 h 取样,进行轮虫体内 DHA、EPA 和 FA(总脂肪酸)的测定,以标样为基准,换算出 10 g 轮虫(鲜活)所含 EPA、DHA 的毫克数,结果如表 2,并分别比较于图 3、图 4、图 5 和图 6。

表 2 试验各组轮虫体内的 EPA、DHA 测定结果

Table 2 Determination of EPA and DHA in rotifer body

组别	A	B	C	D	E	
n-3PUFA 类型	无	甲酯	乙酯	脂肪酸	甘油酯	
开始时	EPA(mg/10g)	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4
	EPA/FA(%)	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0
	DHA(mg/10g)	1.21	1.21	1.21	1.21	1.21
	DHA/FA(%)	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
6 h 后	EPA(mg/10g)	6.08	13.68	14.59	16.42	11.36
	EPA/FA(%)	16.0	21.6	20.3	22.2	17.8
	DHA(mg/10g)	0.95	8.82	10.34	10.94	4.68
	DHA/FA(%)	2.5	13.9	14.4	14.8	7.3
12 h 后	EPA(mg/10g)	8.82	10.03	10.94	20.67	13.07
	EPA/FA(%)	20.0	17.8	18.0	25.1	22.2
	DHA(mg/10g)	1.52	6.99	9.42	14.59	6.38
	DHA/FA(%)	3.5	12.4	15.5	17.7	10.8
18 h 后	EPA(mg/10g)	5.16	12.16	13.98	12.46	13.52
	EPA/FA(%)	12.2	17.0	20.7	21.2	22.5
	DHA(mg/10g)	1.21	7.09	9.12	8.51	6.08
	DHA/FA(%)	2.9	13.2	14.9	14.5	10.1
24 h 后	EPA(mg/10g)	6.08	9.12	7.6	10.64	10.03
	EPA/FA(%)	9.4	16.4	15.3	15.3	15.5
	DHA(mg/10g)	0.61	4.86	4.25	6.08	3.95
	DHA/FA(%)	1.1	8.7	8.6	8.7	6.2

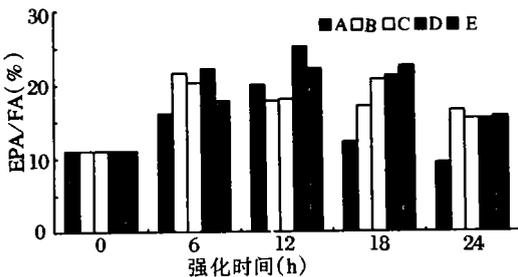


图 3 试验各组轮虫体内 EPA/FA 含量变化
Fig.3 Variation of EPA/FA content in rotifer body in every testing group

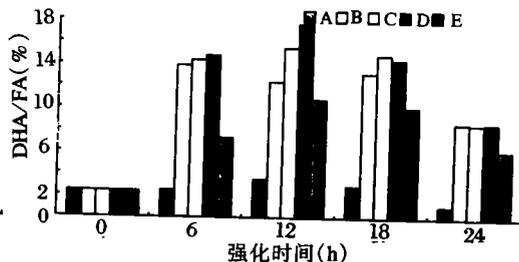


图 4 试验各组轮虫体内 DHA/FA 含量变化
Fig.4 Variation of DHA/FA content in rotifer body in every testing group

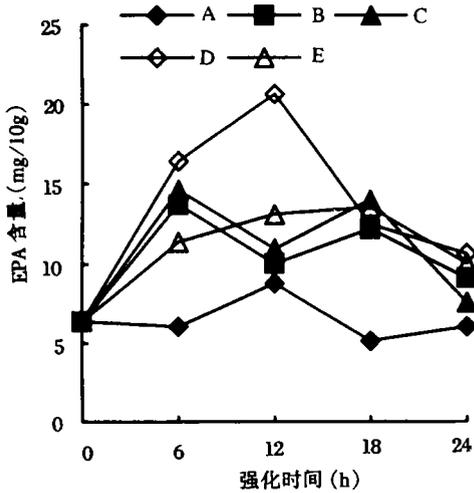


图5 试验各组轮虫体内 EPA 含量(湿重)变化
Fig.5 Variation of EPA content in rotifer body in every testing group

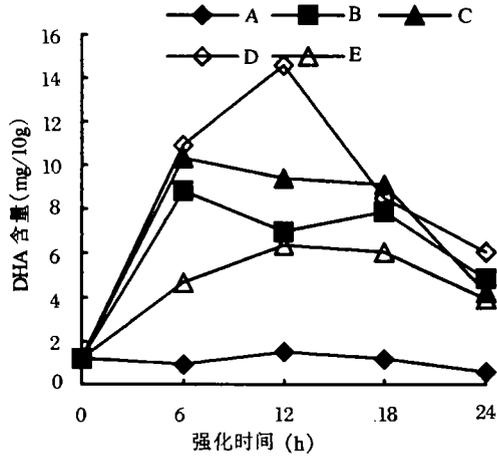


图6 试验各组轮虫体内 DHA 含量(湿重)变化
Fig.6 Variation of DHA content in rotifer body in every testing group

3 讨论

3.1 轮虫营养强化时的生理生态变化

仅用微绿球藻营养强化的 A 组,6 h 后观察密度呈上升趋势,而 B、C、D、E 各试验组均呈下降趋势,降幅多在 10% ~ 15% 之间。据有关资料报道,日本及比利时的营养强化饵料也同样有此现象。这是由于轮虫对突然更换饵料种类及构成不适应所造成的,可采用在保种期进行种源驯化的方法来解决。一般是按同样的营养强化方法,在 24 h 之内连续营养强化两次,使轮虫种源能够适应这种变化,其后代也就会遗传这种适应能力。但 24 h 后试验各组(除甲酯 B 组外)较强化前都有不同程度的提高。各试验组同一时间轮虫的挂卵率均略高于对照组,这可能与强化饵料均添加了 V_E 有关,这从另一个方面也反映出了其营养强化效果。各试验组的活力及摄食情况要好于对照组,特别是脂肪酸 D 组的营养强化效果最好,12 ~ 24 h 取样观察轮虫的活力及摄食情况明显好于其他各组,而且强化过程中未有雄虫出现,这同该组轮虫的 DHA、EPA 测定结果相吻合。

3.2 不同类型营养强化饵料对轮虫 DHA、EPA 强化效果比较

1990 年美国研究人员 Reicks 等[1990]报道了利用大白鼠脑管插管回收淋巴液中脂肪酸技术,研究了 EPA、DHA 脂肪酸型、甘油酯型及单酯型的吸收率,发现天然鱼油中 EPA、DHA 的吸收速度较脂肪酸型差($P < 0.05$),但比单酯型要好($P < 0.05$)。进一步实验表明,其血浆及肠道组织中也有相同的差异($P < 0.05$)。最新的关于 EPA、DHA 不同化学型式生物利用度的报告[王建中 1992]更证实了这一点,对大白鼠的实验结果以甘油酯型 EPA、DHA 的生物利用度为 100,则脂肪酸型 EPA、DHA 的生物利用度分别为 186、136,单酯(甲酯)EPA、DHA 型的生物利

用度分别为 40、48,而轮虫、卤虫等饵料生物营养强化时的生物利用度,各种化学型式之间的差异较少有文章报道,根据我们的试验及测定结果,几种化学型式之间存在着明显差异。首先不论哪种化学型式的营养强化饵料,轮虫中 EPA、DHA 含量都较对照组有明显提高,营养强化效果十分明显。特别是最为重要的必需脂肪酸 DHA,未经强化时轮虫中含量仅为 1.21 mg/10g,DHA/FA 仅为 2.4%。几种化学型式的营养强化饵料在营养强化 12 小时后,轮虫中含量甲酯型为 6.99 mg/10g, DHA/FA 为 12.4%;乙酯型为 9.42 mg/10g,DHA/FA 为 15.5%;脂肪酸型为 14.59 mg/10g,DHA/FA 为 17.7%;甘油酯型为 6.38 mg/10g,DHA/FA 为 10.8%,而仅用微绿球藻强化 A 组的 DHA 含量始终未提高,12 h 达到最高含量时仅为 1.52 mg/10g,DHA/FA 为 3.5%。这表明仅用微绿球藻营养强化轮虫,并不能显著提高轮虫 DHA 的含量。

尽管微绿球藻营养强化对轮虫中 EPA 含量增加显著,12 h 达到 8.82 mg/10g,EPA/FA 为 20.0%,后一比值虽超过了甲酯、乙酯组的 17.8%、18.0%,但轮虫中的含量仍较甲酯、乙酯组的 10.03 mg/10g、10.94 mg/10g 为低,并且 12 h 后含量迅速降低。即使如此,仅用微绿球藻营养强化,轮虫中的 EPA 含量已可满足苗种的营养需求。但近期的研究表明,尽管轮虫中含有一定量的 EPA,仍可能出现苗种成活率较低的现象,随着 DHA 营养功能与代谢的深入研究,金沢昭夫[1990],林雅弘[1993]等已证实,n-3PUFA 中的 DHA 对苗种的营养需求起着决定性的作用,并将以往对 EPA 的注意力转移到 DHA 的作用上。

就 DHA 营养强化饵料而言,几种不同化学型式的轮虫生物利用度,可通过测定结果推算出。以 12 h 的测定值为参照,假定甘油酯 $E_{12} = K(6.38 - 1.52) \div 24\% = 100$,可算出利用系数 $K = 4.938$,则甲酯 $B_{12} = 4.938 \times (6.99 - 1.52) \div 50\% = 54$,乙酯 $C_{12} = 4.938 \times (9.42 - 1.52) \div 50\% = 78$,脂肪酸 $D_{12} = 4.938 \times (14.59 - 1.52) \div 50\% = 129$ 。这一结果与大白鼠的实验结果相类似。由此可见,几种化学型式的营养强化饵料,对轮虫体内 DHA 的强化效果存在显著差异,其中脂肪酸型强化效果最好,甘油酯型次之,单酯型较差。尽管如此,由于甘油酯型营养强化饵料中 DHA、EPA 等含量较低,与 DHA、EPA 高度提纯的单酯型营养强化饵料相比,效果要差许多。

参 考 文 献

- 王建中.1992.鱼油的加工技术与应用.日本国际协力事业团论文集.134-158.
- 沈小婉.1992.脂肪酸的测定.北京大学出版社.57-60.
- 山中达郎.1993.油脂酵母「協和」アスタキサンチン含有油脂酵母.养殖(日),30(12):106-107.
- 竹内俊郎等.1994.DHA 强化ワムシのマガラ仔魚に對する栄養価.水産誌,60(5):641-652.
- 金沢昭夫.1990.ヒラメ养殖における栄養と飼料.水産増殖,38(4):398.
- 林雅弘.1993.ユグけにする生物餌料の栄養強化.养殖(日),30(11):74-77.
- 渡邊武等.1976.種苗生産における初期生物餌料の栄養価に關する研究-I.昭和51年度日本水産學會春季大會講演要旨集.137.
- 渡邊武等.1978.脂肪酸組成からみたシズツボにおける初期生物餌料の栄養価.水産誌,44:1109-1114.
- Reicks Marla, et al. 1990. Recovery of fish oil-derived fatty acids in lymph of thoracic duct-cannulated wistar rats. Lipids,25(1):6-10.

STUDIES ON THE NUTRITION ENRICHMENT OF ROTIFER WITH N - 3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

ZHANG Li-Min, CHANG Jian-Bo, ZHANG Xiu-Zhen, SONG Li-Hui, SUN Yu-Zeng,
LI Yan-Fen, WANG Ji-Ying, YU Guang-Pu, GONG Xiang-Hong

(*Shandong Marine Fisheries Research Institute, Yantai 264000*)

XIAO Xian-Qi

(*Fish Farm of Xunshan Fishery Company, Rongcheng 264300*)

ABSTRACT Rotifer were enriched with different chemical type of n - 3 PUFA, including methyl esters, ethyl esters, fatty acids and triglycerides. The variation of physiology and ecology of rotifer during the experiments was observed and the EPA, DHA in rotifer body was evaluated. The results showed that all the enriching diets achieved better results than *Nannochloropsis* sp., EPA, DHA content increased obviously and reached to the maximum 12 h after enrichment. There was a significant difference in the rate of transformation and absorption of DHA. Suppose the utilization ratio of triglycerides is 100, according to the results, that of the methyl ester was 54, ethyl esters 78, and fatty acids 129. Therefore, the enriching diet of fatty acids that was used first time achieved the best result, the triglycerides took the second place, and the methyl esters and ethyl esters were relatively poor.

KEYWORDS n - 3 PUFA, DHA, Fatty acids, Nutrition enrichment, rotifer