

鲍人工配合饲料中应用防腐剂效果的研究

蔡慧农¹, 吴永沛¹, 陈昌生², 钟幼平², 陈 戟¹

(1. 集美大学 生物工程学院 福建 厦门 361021; 2. 集美大学 水产学院 福建 厦门 361021)

摘要:在鲍人工配合饲料中添加苯甲酸、山梨酸、尼泊金丁酯等防腐剂,在实验室设置的模拟投喂水体中,以饲料中孳生的细菌总数作为饲料在腐败过程中的腐败程度指标,研究了上述3种防腐剂在鲍饵料中单独使用、混合使用以及多种添加量水平使用情况下的抑菌防腐效果及其特点。结果表明,鲍饵料中添加0.50‰~1.00‰的尼泊金丁酯,在模拟投喂水体中具有非常显著而持久的防腐效果,30℃下72h内的腐败程度仅相当于不添加防腐剂的对照组饲料在16~25h内的腐败程度。还采用简易的投喂对照实验,初步验证了添加0.50‰尼泊金丁酯的人工配合饲料投喂对鲍的安全性。作者分析和讨论了以饲料在腐败过程中孳生的细菌总数作为模拟投喂过程中饲料的腐败度指标的优越性。

关键词: 鲍; 人工配合饲料; 防腐剂; 腐败度指标; 细菌总数; 安全性

中图分类号: 963.73+7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2004)03-0012-06

近40年来,鲍人工配合饲料的制备与应用方面已开展了大量的研究工作^[1~8]。鲍的摄食习性及其养殖特点对鲍的人工配合饲料提出了在水中要有较长的稳定性的要求——不腐败变质和保持完整的形态。饲料在水中稳定性的提高,有利于大量投饵以保证鲍的充分饱食,加速生长;有利于减轻投饵对水质的污染,延长“投饵—冲洗”周期,减少投饵工作量及排换水量,节省人力物力。由于鲍人工配合饲料属高营养基质,在投喂水体中主要因微生物侵染而导致腐败变质及水的作用而导致溃散,失去其稳定性。实际应用中,鲍饵的投喂周期一般只有1~2d(因水温高低而有差别)^[9]。尤其在高温季节(水温>25℃),鲍饵在水体中的快速腐败变质对鲍饵应用的限制更为突出。延缓鲍饵在投喂水体中的腐败变质,延长其稳定期,具有重要的实际意义。但在食品中早已广泛使用的、对于抑制营养基质腐败变质行之有效的防腐剂在鲍的人工配合饲料中的应用却至今未见有关报道。作者在鲍饵中引入了防腐剂,对防腐剂在鲍饵料中防腐效果及对鲍的安全性 with 养殖效果进行初步试验。

1 材料与方法

1.1 鲍人工配合饲料

1.1.1 基本配方

基本配方见表1,其中基本原料购自福建省饲料工业公司。

1.1.2 加工工艺

原料混合→粉碎→加水($m(\text{干基}):m(\text{水})=100:37$)搅拌调制成泥团→按表2分组添加防腐剂→挤压成形→15%CaCl₂溶液固定1min→80℃烘干→保藏待用(对照组:1种;实验组:分4组20种。共21种)。

1.2 陈海水的制备

取干净海水,在阴暗处放置3周,用滤纸过滤后备用(盐度32.4,pH7.62)。

1.3 模拟投喂过程及其残片饲料上孳生的细菌总数的检测

饲料浸入于模拟水体中,72h内定时测定其残片在腐败过程中孳生的细菌总数作为饲料的腐败进度指标,借以考核、评价防腐的效果。实验方法如下。

对于上述21种配合饲料,每种饲料使用4个500mL烧杯,每杯内加入396g陈海水、投入4g饲料,静置于30℃±1℃恒温箱,2h后开始计时,分别于0,24,48,72h各采出1杯,倾弃海水,夹取未融化的残

收稿日期:2003-09-26;修回日期:2003-12-20

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(B0010031)。

作者简介:蔡慧农(1957-),男,福建省厦门市人,副教授,从事专业:生物工程,E-mail:hec-chn@jmu.edu.cn

表 1 鲍人工配合饲料基本配方

Tab.1 Basic composition of the artificial diets for abalone

成分 (%)	鱼粉	大豆粉	褐藻酸钠	α -淀粉	海藻粉末	混合矿物质*	混合维生素*
	30	30	18	10	5	5	2

* 见参考文献 [2]

表 2 鲍人工配合饲料的分组及其添加的防腐剂种类与用量

Tab.2 Abalone artificial diets with addition of different preservatives in the experiment

组别	防腐剂	防腐剂添加量(%)				
CK ¹⁾	—	—	—	—	—	—
A 组	苯甲酸 ²⁾	0.05	0.25	0.50	1.00	2.00
B 组	山梨酸 ³⁾	0.05	0.25	0.50	1.00	2.00
C 组	尼泊金丁酯 ³⁾	0.01	0.05	0.25	0.50	1.00
D 组	苯甲酸 ²⁾ + 尼泊金丁酯 ⁴⁾	0.05	0.25	0.50	1.00	2.00

1) 对照组 2) 采用其钠盐 3) 先用少量乙醇溶解后加入于饲料中 4) 苯甲酸、尼泊金丁酯各占 1/2 表中数据为总添加量,以湿饵料计。

片饲料,以无菌纱布吸干表面水后,称取 1.00 g,加无
菌生理盐水 199 mL 经均质器 10 000 r/min 捣碎 1 min
后,用平板菌落计数法检测残片饲料中的细菌总数
(CFU)。保温时间超出 24 h 的实验瓶,每隔 24 h 后更
换海水 1 次。

1.4 安全性初步验证试验

从原来投喂江蓠 (*Gracilaria* spp.) 的鲍中挑选健
康、大小整齐的九孔鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*)
180 只 随机分为 3 组(每组 60 只),分别量取壳长、总
体重后于室内水平流水泥养殖槽中 第 1 组投喂江蓠作
为海藻投喂对照组;第 2 组投喂表 2 中 CK 组饵料作
为不添加防腐剂的人工饵料投喂对照组;第 3 组则投
喂表 2 C 组中尼泊金丁酯添加量为 0.5% 的饵料作为
添加防腐剂的人工饵料投喂试验组。对比养殖 60 d。

2 结果与分析

2.1 饲料在腐败过程中细菌总数的变动

按上述实验方法,连续 3 d 测得的残片饲料中的
细菌总数列于表 3。

2.2 防腐剂抑制细菌总数增长效果的比较
与分析

以不添加防腐剂的对照组 (CK) 饲料作为参照,
分别以添加有 A(苯甲酸)、B(山梨酸)、C(尼泊金丁
酯)、D(苯甲酸+尼泊金丁酯)等防腐剂的 4 组饲料在
30 ℃海水浸泡过程中测得的细菌总数(表 3)的常用
对数值作为纵坐标值,时间作为横坐标值作图(图 1,
2,3,4)。借以简捷地分析和比较各种防腐剂的防腐效
果及其特点(总菌数的常用对数值每变动 1,意味着
总菌数量变动 10 倍)。

2.2.1 各组防腐剂总体抑菌效果的比较

表 3 浸泡于水中不同时间饲料中的细菌总数

Tab.3 CFU in the artificial diets immersed in seawater at
different time intervals

饲料组	不同时间饲料中的细菌总数(CFU/g)			
	0	24	48	72
CK	2.43×10^4	1.45×10^6	1.00×10^7	9.13×10^7
A _{0.05}	2.38×10^4	1.15×10^6	9.13×10^6	7.23×10^7
A _{0.25}	2.41×10^4	9.53×10^5	5.73×10^6	5.03×10^7
A _{0.50}	2.20×10^4	5.73×10^5	3.03×10^6	1.58×10^7
A _{1.00}	2.32×10^4	4.00×10^5	1.91×10^6	1.10×10^7
A _{2.00}	2.13×10^4	1.73×10^5	6.61×10^6	3.03×10^6
B _{0.05}	2.21×10^4	9.13×10^5	5.73×10^6	6.02×10^7
B _{0.25}	2.23×10^4	5.73×10^5	4.40×10^6	3.33×10^7
B _{0.50}	2.10×10^4	3.50×10^5	2.29×10^6	1.19×10^7
B _{1.00}	1.97×10^4	2.29×10^5	1.58×10^6	5.50×10^6
B _{2.00}	2.17×10^4	1.35×10^5	5.73×10^5	2.05×10^6
C _{0.01}	1.87×10^4	8.71×10^5	5.80×10^6	4.40×10^7
C _{0.05}	2.12×10^4	5.23×10^5	3.20×10^6	1.91×10^7
C _{0.25}	1.83×10^4	2.90×10^5	1.32×10^6	5.03×10^6
C _{0.50}	1.80×10^4	1.19×10^5	5.75×10^5	1.56×10^6
C _{1.00}	1.76×10^4	7.60×10^4	2.73×10^5	4.80×10^5
D _{0.05}	2.16×10^4	1.05×10^6	7.23×10^6	6.63×10^7
D _{0.25}	2.26×10^4	6.93×10^5	5.03×10^6	4.00×10^7
D _{0.50}	2.13×10^4	4.60×10^5	2.63×10^6	1.26×10^7
D _{1.00}	2.10×10^4	2.90×10^5	1.74×10^6	7.93×10^6
D _{2.00}	1.94×10^4	1.32×10^5	6.03×10^5	1.74×10^6

注 试验温度为 30 ℃ $\pm$ 1 ℃;A,B,C,D 表示添加不同防腐剂的
饲料组别(与表 2 一致),其右下标表示防腐剂添加量(%);CK
表示不添加防腐剂的对照组饲料。

对表 3 中 A,B,C,D 各组,取添加量为 0.05 ~
1.00 所对应的 24,48,72 h 的细菌总数(扣除 0 小时的

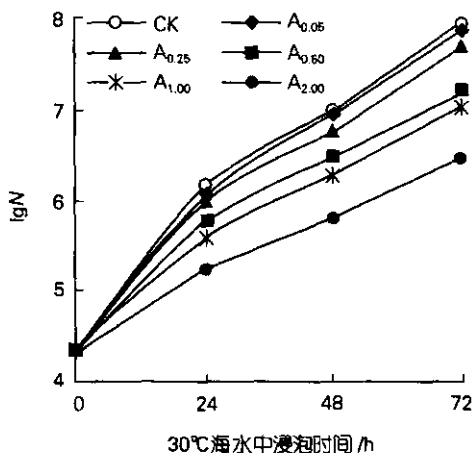


图 1 不同添加量苯甲酸的抑菌效果比较

Fig.1 The effect of bacteriostasis of benzoic acid at different treatment levels

N 为细菌总数

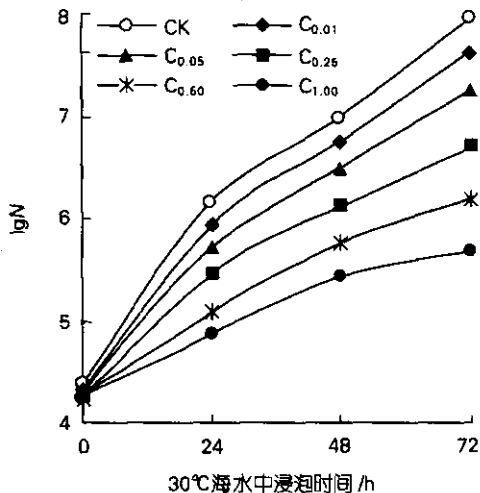


图 3 不同添加量尼泊金丁酯的抑菌效果比较

Fig.3 The effect of bacteriostasis of butyl p-hydroxybenzoate at different treatment levels

N 为细菌总数

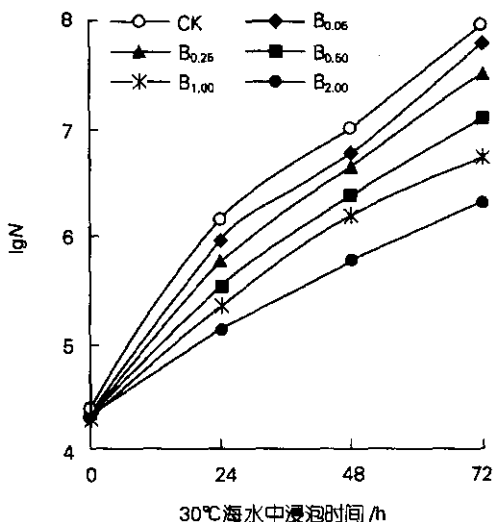


图 2 不同添加量山梨酸的抑菌效果比较

Fig.2 The effect of bacteriostasis of sorbic acid at different treatment levels

N 为细菌总数

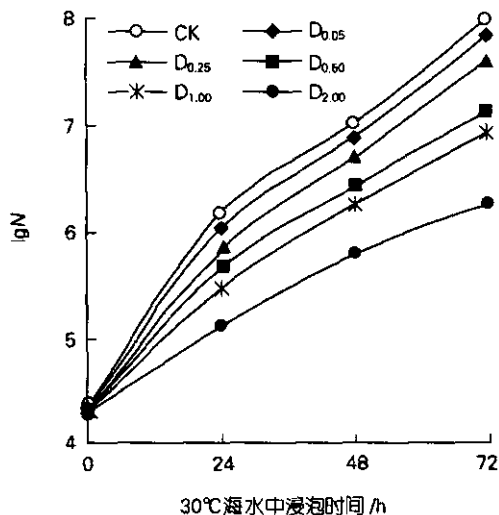


图 4 不同添加量苯甲酸 + 尼泊金丁酯的抑菌效果比较

Fig.4 The effect of bacteriostasis of the combination benzoic acid and butyl p-hydroxybenzoate at different treatment levels

N 为细菌总数

本底)与CK组对应的细菌总数对比,作 t -检验分析,结果表明A,B,C,D4组处理所对应的细菌总数与对照组间均有显著性差异(A组: $P < 0.05$;B组: $P < 0.05$;C组: $P < 0.005$;D组: $P < 0.01$),说明4组防腐剂的添加均起到显著的抑菌效果,其中C组和D组的抑菌效果达到极显著水平。

比较图1,2,3,4,可以看出,在实验的防腐剂添加量范围内,A组(苯甲酸,0.05%~2.00%)不同添加量间抑菌效果的差异最小,而且48~72h时段的曲线上升趋势加剧,防腐效果总体较差,且缺乏持久性;B组(山梨酸,0.05%~2.00%)、D组[苯甲酸

+ 尼泊金丁酯), 0.05‰ ~ 2.00‰] 不同添加量间的差异及总体防腐效果与 A 组相当; C 组(尼泊金丁酯, 0.01‰ ~ 1.00‰)不同添加量间的差异最大, 总体防腐效果最好。

2.2.2 同种防腐剂不同添加量间抑菌效果的比较

以添加尼泊金丁酯为例。从图 3 可以看出, 添加尼泊金丁酯的抑菌效果具有如下特点:

(1) 实验范围内, 最低添加量(0.01‰)的尼泊金丁酯即有轻微的防腐效果, 随着添加量的提高, 防腐效果明显增强, 添加量最高(1.00‰)时, 防腐效果也最强。

(2) 尼泊金丁酯添加量为 0.50‰ 时, 饲料就已具有很好的防腐效果, 该饲料在 30 ℃ 的海水中浸泡 72 h, 其孳生的细菌总数仅相当于不添加防腐剂的对照组饲料在同等条件下浸泡 25 h 所孳生的细菌总数的量, 而当尼泊金丁酯添加量为 1.00‰ 时, 饲料在上述条件下浸泡 72 h 所孳生的细菌总数仅相当于对照组饲料浸泡 16 h 所孳生的细菌总数的量。提示少量的尼泊金丁酯的添加, 即可能将鲍饵的投喂周期由 1 d 延长到 3 d。

(3) 当尼泊金丁酯的添加量 $\geq 0.50‰$ 时, 图中的对数曲线($C_{0.50}$, $C_{1.00}$ 两条)前、中、后三段对比, 其上升趋势显现出明显趋缓的变化, 说明这样的饲料在水中具有持久的防腐能力。

2.2.3 同一添加量不同防腐剂间抑菌效果的分析比较

以比较添加量同为 1.00‰ 的 4 组不同防腐剂的抑菌效果为例。图 5 将实验中同一添加量的 4 组不同防腐剂所对应的总菌数对数曲线汇总在同一坐标系中, 并以不添加防腐剂的 CK 组作为对照, 借以分析比较不同防腐剂在鲍人工配合饲料中的防腐效果。

从图 5 可以看出, 添加量同样为 1.00‰ 时, 苯甲酸(A 组)、山梨酸(B 组)、苯甲酸 + 尼泊金丁酯(D 组) 3 种防腐剂的抑菌效果相当接近, 其对应的饲料在 30 ℃ 的海水中浸泡 48 h 所孳生的细菌总数相当于不添加防腐剂的对照饲料在同等条件下浸泡 24 h 所孳生的细菌总数的量; 而浸泡 72 h 所孳生的细菌总数则相当于对照饲料浸泡 48 h 所孳生的细菌总数的量。这 3 种防腐剂 1.00‰ 的添加量能使饲料在实验期间(3 d)内延缓 1d 的腐败进度。显然, 尼泊金丁酯(C 组) 1.00‰ 添加量的防腐效果明显优于以上 3 组。如前所述, 其对应的饲料在上述条件下浸泡 72 h 所孳生的细菌总数仅相当于对照饲料浸泡 16 h 所孳生的细菌总数的量, 而且它还可能具有比本实验周期(72 h)更为持久的防腐能力。

2.2.4 苯甲酸 + 尼泊金丁酯组合防腐剂的抑菌效果分析

由苯甲酸 + 尼泊金丁酯组合(D 组)的防腐剂, 其 1.00‰ 的添加量中包含着 0.50‰ 的苯甲酸和 0.50‰ 的尼泊金丁酯, 但其抑菌效果却表现为介于此二者分别单独添加的抑菌效果之间(图 6)。不同种防

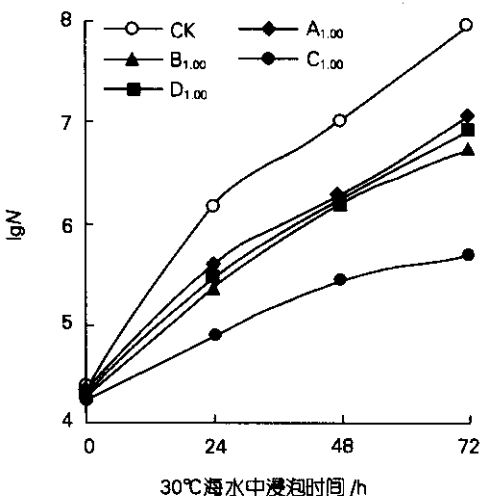


图 5 同一添加量不同防腐剂的抑菌效果比较

Fig.5 Comparison of the effect of bacteriostasis of different preservatives at the same treatment level

N 为细菌总数

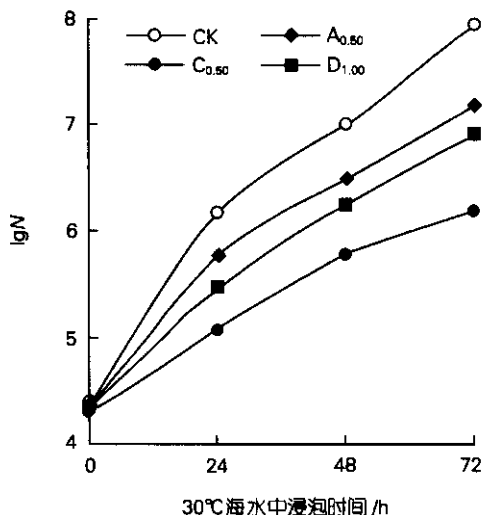


图 6 $D_{1.00}$ 与 $A_{0.50}/C_{0.50}$ 的抑菌效果比较

Fig.6 Comparison of the effect of bacteriostasis between $D_{1.00}$ and $A_{0.50}/C_{0.50}$

N 为细菌总数

防腐剂合并使用,效果上一般表现为简单叠加或有协同效应,但本实验结果却是例外。0.50‰苯甲酸与0.50‰尼泊金丁酯的合并使用,其防腐效果虽然强于0.50‰苯甲酸单独使用的效果,但却明显不如0.50‰的尼泊金丁酯单独使用的防腐效果,其机制有待进一步探讨。

2.3 安全性初步验证结果

表4 养殖对比实验结果

Tab.4 Results of the feeding experiments

养殖组别	起始鲍数 (只)	平均壳长(mm)			平均体重(g/只)			存活数 (只)	成活率 (%)
		起始	最终	增长	起始	最终	增长		
海藻对照组	60	22.3	27.2	4.9	1.23	2.07	0.84	59	98.3
饵料对照组	60	22.4	27.6	5.2	1.26	2.56	1.30	58	96.7
饵料试验组*	60	22.6	27.9	5.3	1.28	2.61	1.33	59	98.3

* 添加尼泊金丁酯 0.50‰(鲜湿饵料)

是安全的,同时也表明它的养殖效果与不添加防腐剂的人工配合饲料的效果是一致的,均优于海藻养殖的效果。

3 讨论

苯甲酸、山梨酸、尼泊金酯等化学防腐剂早已被联合国粮农组织、世界卫生组织、美国食品药品监督管理局及我国有关机构列为安全防腐剂,广泛应用于食品、饮料、化妆品、医药等领域,其合理使用的安全性已得了到充分的论证。本实验中使用0.50‰~1.00‰的尼泊金丁酯作为鲍饵料防腐剂,显示了理想的防腐效果,其0.50‰添加量的初步投喂试验结果显示了对鲍的安全性。此外,尼泊金酯在食品中的安全用量通常为0.1‰~3.5‰^[10],因此,鲍饵料中实际添加量即使采用1.0‰~3.5‰,估计也在安全范围内。尼泊金丁酯作为防腐剂,具有高效、安全、抑菌作用不受基质pH值影响、热稳定性好、水中溶解度低等特点^[10, 11]。以其作为鲍人工配合饲料的防腐剂,具有添加工艺简单、效果理想、适应性强等优点,具有较强的实用性。

从实验结果可以看出,尼泊金丁酯在鲍饵料中的防腐效果明显优于苯甲酸和山梨酸,这除了与它们各自对菌体的作用机制上的差异有关外,显然在很大程度上与它们对介质pH的适应性及在水中的溶解度的差异有关。前者的抑菌作用不受介质pH的影响,而后两者的防腐效果随介质pH升高而降低,一般适用于pH5以下的酸性介质中。海水投喂环境的pH一般约为7.5~8.5左右,因此,苯甲酸及山梨酸的防腐效果

初步的安全性验证的养殖对比实验结果列于表4。

从成活率、平均壳长增长来看,试验组与饵料对照组及海藻对照组的差别微小;从平均体重增长来看,饵料试验组与饵料对照组间的差别很小,而2个饵料组(包括饵料试验组与饵料对照组)的平均体重增长均明显大于海藻对照组。这一结果初步表明添加0.50‰尼泊金丁酯的鲍人工配合饲料对于饲喂的鲍

受到了限制,而尼泊金丁酯的防腐效果则不受此限制;苯甲酸和山梨酸相对较易溶解于水中,随饵料在水中浸泡时容易流失,防腐效果较差,而尼泊金丁酯在水中的溶解度为0.0170 g/L,较难溶解于水,而能溶解于饲料中的脂质,因此,减少了流失,具有较好的和较持久的防腐效果。

实验结果表明,添加0.50‰~1.00‰的尼泊金丁酯可使得鲍饵料在模拟投喂(30℃)的条件下投喂后3d的腐败进度仅相当于不添加防腐剂的对照组饲料投喂后1d的腐败进度。这对于高温季节里鲍饵料使用的安全性以及将鲍饵料的投喂周期由1d延长到3d以提高经济效益等方面都具有重要的意义。

在以往的有关报道中^[3, 12],可以看到以模拟投喂水体中的溶解氧(DO)、pH和有机物耗氧量(COD)等作为饵料的腐败程度指标,具有检测简便等优势,但也存在一定的不足。其中,DO指标在较低实验温度(16℃左右)下,能够较好地反映饵料的腐败程度,但当水温较高(约25℃)时,水体中的DO一般在过短的时间内即降至为0,难于适用;pH指标对于不同的腐败程度的区别度不大;而COD值的增大,实际上反映的是饲料直接或间接进入水体而导致的水体中有机物量的增加,与饲料的腐败程度间的对应关系不够直接。作者采用模拟投喂过程中残片饲料中孳生的细菌总数作为饲料的腐败度指标。由于细菌总数的增长是细菌代谢与生长的直接结果,而细菌和其它微生物的生长与代谢则是饲料腐败的直接原因,因此,事实上总细菌数的增长强度直接对应着饲料的腐败程度。而且,细菌总数指标的测定难易程度适中,数值稳

定、可靠,不受模拟投喂实验的温度因素及充气、换水等操作的限制。因此,以残片饲料中孳生的细菌总数作为饲料在投喂过程中的腐败度指标更为适宜。

参考文献:

- [1] Ogino C. Studies on the nutrition of abalone I. Feeding trials of abalone, *Haliotis discus* REEVE, with artificial diets [J]. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, 1963, **29**(7): 691 – 694.
- [2] Uki N. Development of semipurified test diets for abalone [J]. **Bull Jap Soc Sci Fish**, 1985, **51**(11): 1 825 – 1 833.
- [3] 刘永峰,刘永襄,高绪生,等. 稚鲍人工配合饵料的初步研究[J]. 水产科学, 1984, **2**: 14 – 19.
- [4] 聂宗庆,王平,王在卿,等. 皱纹盘鲍幼鲍配合饲料的研制与喂养的初步研究[J]. 海洋水产研究, 1986, **7**: 53 – 64.
- [5] 高博,董明新. 海上成鲍养殖应用的配合饲料试验 [J]. 水产科学, 1990, **19**(1): 18 – 20.
- [6] Tan Beiping, Mai Kangsen, Liufu, *et al.* Response of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*, to dietary calcium, phosphorus and calcium/phosphorus ratio[J]. **Aquaculture**, 2001, **198**(1 – 2): 141 – 158.
- [7] Tan Beiping, Mai Kangsen. Effects of dietary vitamin K on survival, growth, and tissue concentrations of phyloquinone (PK) and menaquinone – 4 (MK – 4) for juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino[J]. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 2001, **256**(2): 229 – 239.
- [8] Thongrod S, Tamtin M, Chairat C, *et al.* Lipid to carbohydrate ratio in donkey's ear abalone (*Haliotis asinina*, Linne) diets[J]. **Aquaculture**, 2003, **225**(1 – 4): 165 – 174.
- [9] 吴永沛. 鲍人工配合饲料稳定性的研究[J]. 海洋科学, 2000, **24**(4): 47 – 49.
- [10] 李小莉,张乃茹,张永宏,等. 尼泊金酯类防腐剂的的研究进展[J]. 河北轻化工学院学报, 1995, **33**(1): 58 – 62.
- [11] 王淑军,杨从发,陈静. 尼泊金丁酯对食品污染菌抑制作用的研究[J]. 淮海工学院学报, 1998, **7**(4): 52 – 55.
- [12] 钟幼平,陈昌生,吴永沛,等. 九孔鲍人工配合饵料的初步研究[J]. 台湾海峡, 1998, **17**(增刊): 117 – 124.

Study on the effects of the application of preservatives on artificial diets for abalone

CAI Hui – nong¹, WU Yong – pei¹, CHEN Chang – sheng², ZHONG You – ping², CHEN Ji¹

(1. School of Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. School of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Received: Sep., 26, 2003

Key words: Abalone; artificial diet; preservative; index of decomposition degree; total bacteria number; safety

Abstract: By adding benzoic acid, sorbic acid and butyl p – hydroxybenzoate to abalone artificial diets individually or collectively and at different treatment levels, effects and functions these preservatives on bacteriostasis were studied. The experiments were carried out indoor in a simulated – feeding seawater system indoor by using the CFU of breeding – bacteria in artificial diets as an index for the decomposition degree of the artificial diets during feeding period. The results showed that the diets containing butyl p – hydroxybenzoate (0.50‰ ~ 1.00‰ by wet weight) can inhibit bacteria from breeding significantly, the decomposition degree of the diets when immersed in seawater at 30 °C for 72 h was just equivalent to that for 16 ~ 25 h of the control group with no preservative added. In the experiment, the safety to the abalone fed with the diets containing 0.50‰ butyl p – hydroxybenzoate was initially tested and verified. Based on some discussion, the author suggest using that the total bacteria number bred breeding – bacteria in the artificial diets as an advantage better index for evaluating the decomposition degree of the diets during the course of feeding.

(本文编辑 张培新)