

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

飼糧中三酸甘油酯之脂肪酸位置分佈對肉雞及離乳豬生產
性能之影響及其機制之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-029-005-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：東海大學畜產與生物科技學系

計畫主持人：姜樹興

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 26 日

摘要

本研究分為化學分析及動物實驗兩部分。化學分析部分在於熟悉測定三酸甘油酯之脂肪酸位置分佈之方法。經過調整脂肪酶的作用溫度、pH、濃度及作用時間，訂出脂肪酶之最適作用溫度為 40°C，pH 為 8，濃度為 80mg/mL，作用時間為 5 分鐘，如此可使三酸甘油酯之水解率達 55.5%，達到測定脂肪酸位置分佈所需之水解率。本研究測得之 C16:0 分佈於 *sn*-2 之比例，在動物油高於植物油，其中豬油最高。在動物實驗部分已熟悉飼糧配製及飼養管理之細節，有待往後進行動物實驗。

(關鍵語：三酸甘油酯、位置分佈、肉雞、消化率)

Abstract

Chemical analysis and animal trial are the two components of the study. The chemical analysis was conducted to determine the positional distribution of fatty acid in dietary triglycerides. Optimal hydrolysis conditions of lipase were determined as hydrolyze 50mg triglycerides at 40°C, pH 8 for 5 minutes with 80 mg lipase/mL. Degree of hydrolysis could reach 55.5% and it satisfied the degree of hydrolysis for the determination of positional distribution of fatty acids. Our analyses have found that the *sn*-2 % of C16:0 were higher in animal fats than that of in vegetable oils with lard had highest percentage. Procedures of feed formulation and animal cares were refined for conducting further animal trials.

(Key words: Triglyceride, Positional distribution, broilers, digestibility)

前言

前人研究指出，脂肪酸位置分佈，顯著影響動物對脂肪酸、脂肪及鈣之消化率 (Brink *et al.*, 1995; Lien *et al.*, 1993; 1997)；尤其於高鈣飼糧中影響更大 (Brink *et al.*, 1995)。胰解脂酶主要水解三酸甘油酯中甘油之第一及第三個碳原子 (*sn*-1 及 *sn*-3) 上之脂肪酸，但並不水解第二個碳原子 (*sn*-2) 上之脂肪酸；水解後釋出兩個游離脂肪酸及一個 2-單酸甘油酯 (Carriere *et al.*, 1993)。游離脂肪酸，尤其是長鏈飽和者，因熔點高於體溫，在腸道內呈固態 (Small, 1991)，不易形成微膠粒 (micelle) (Hottman and Bergstrom, 1963; Lien, 1994)，且易與腸道中之鈣或鎂離子形成不溶之皂鹽 (Small, 1991)，不易被小腸所吸收，不僅降低脂肪酸本身之消化率，亦會降低整個脂肪及鈣之消化率 (Brink *et al.*, 1995; Lien *et al.*, 1997)。而 2-單酸甘油酯則因乳化能力強，極易形成微膠粒 (Hottman and Bergstrom, 1963; Lien, 1994)，可直接被小腸所吸收，使得 *sn*-2 要比 *sn*-1 及 *sn*-3 脂肪酸，尤其是

長鏈飽和者，具較高之消化率。

回顧文獻中脂肪酸位置分佈對脂肪及鈣消化率之影響，差異明顯，唯多以年幼動物（如嬰兒、離乳大鼠或哺乳仔豬）作為試驗模式，探討脂肪酸位置分佈對脂肪、鈣吸收及骨骼發育 (Brink *et al.*, 1995; Lien *et al.*, 1997; Koo *et al.*, 2003)，脂蛋白質代謝及心血管性疾病 (Innis *et al.*, 1993; 1997)之影響，主要偏重在嬰兒奶粉配方及人類心血管健康上，針對畜產方面之研究及應用，則付之闕如；且年幼動物，如離乳仔豬，對胰解脂酶 (Lindemann *et al.*, 1986) 及膽鹽 (Flores *et al.*, 1992) 之產生可能仍嫌不足，是否影響 *sn*-2 與 *sn*-1 或 *sn*-3 脂肪酸在消化率方面之差異，使其較年長動物更為明顯，相關機制尚待研究。

另肉雞因生長快速，故對能量及鈣之需求亦隨之提高，一般均飼予添加脂肪及碳酸鈣之高能及高鈣飼糧。而飼予高營養濃度飼糧之肉雞，腿弱或軟腳造成之損失實為一常見問題 (Kestin *et al.*, 1992)，若脂肪酸位置分佈在肉雞如同嬰兒或大鼠一樣，會影響脂肪及鈣之消化率，且於高鈣飼糧中更為明顯的話，調整飼糧中三酸甘油酯之脂肪酸位置分佈是否會影響肉雞之脂肪及鈣之消化率、骨骼發育及腿部正常，值得探討。

本研究之目的在於探討脂肪中三酸甘油酯之脂肪酸位置分佈對肉雞及離乳仔豬生產性能之影響及其機制之研究。

材料及方法

研究方法分為化學分析及動物試驗兩部分，首先建立測定脂肪酸在甘油中三個碳原子上之位置分佈之分析技術，其次進行脂肪酸位置分佈影響肉雞生產性能及其機制之動物試驗。脂肪酸位置分佈之分析步驟簡列如下：

一、脂肪水解：

1. 加入 1 mL, 1 M, pH 8 tris buffer, 0.1 mL 22% calcium chloride solution, 0.25 mL 0.1% bile salts solution 於離心管中，水浴 37°C，2 分鐘。
2. 秤取 50 mg 脂肪樣品，加入 lipase solution 於管中，37°C 水浴並震盪之。
3. 反應結束加入 6 N HCl 0.5ml 將內容物酸化，以乙醚萃取。
4. 萃取物以蒸餾水沖洗，水層丟棄，殘留物以氮氣吹乾，溶於 chloroform 以備進一步分析。

二、薄層色層分析：

1. 矽膠板置於 100°C 烘箱活化，展開液倒入展開槽中，內放置濾紙平衡。
2. 樣品置入離心管，以 chloroform 溶解，以氮氣吹乾。
3. 加入少量 chloroform: methanol (2 : 1, v/v) 之混合試劑。
4. 點樣於矽膠板上，置於展開槽中並蓋上槽蓋，待展開至預定位置。

5. 將矽膠板自展開槽中取出，用鉛筆註記展開液前緣位置，置於抽氣櫃中令其自然乾燥。
6. 於 UV 燈照射下圈出分離之區域。
7. 刮取斑點加入 5 mL 之 chloroform: methanol: water (5 : 5 : 1, v/v/v) 混合試劑，均勻混合過濾，於 10 mL 濾液中加入 4.5 mL chloroform 及 2.0 mL 0.05 M tris buffer，均勻混合使其分離，上層液丟棄，以氮氣吹乾。
8. 再溶於 5 mL 之 chloroform : methanol (2 : 1, v/v) 之混合試劑及 1.0 mL 去離子水，均勻混合使其分離，上層液丟棄，以氮氣吹乾。
9. 殘留物以 chloroform : methanol (2 : 1, v/v) 之混合試劑溶解，樣品冷凍保存於 -20°C，以備進一步分析。

三、脂肪酸甲基化及氣相色層分析儀 (Gas chromatography, GC) 分析：

1. 秤取樣品，加入 2 mL benzene 及 3 mL methanolic HCl 至離心管。
2. 水浴 70°C，2 小時，水浴後取出離心管冷卻至室溫。加入 5 mL 6% K₂CO₃ 及 2 mL benzene 混合，離心後取上清液置微量離心管，加入 1g 之 anhydrous sodium sulphate 及 1g 之 activated charcoal，離心後取上清液至微量離心管中，即得甲基化之脂肪酸樣品，樣品冷凍保存於 -20°C，以備進一步分析。
3. 樣品注入氣相色層分析儀 (Hitachi G-3000, Tokyo, Japan)，由積分儀報表判讀數據。

動物試驗之材料及方法簡述如下：

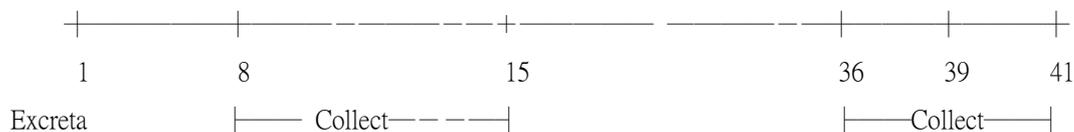
1. 100 隻 1 日齡之 Arbor Acres 公雛肉雞，選取體重相近之 30 隻雛雞，逢機分成 6 處理組，每處理 5 重複，每重複 1 隻。
2. 各處理組雞隻皆個別飼養於溫控室之金屬網底代謝架 (1-15 日齡) 及代謝籠 (16-42 日齡) 內，溫度由 1 日齡之 33°C，每日降低 0.3°C。
3. 飼糧營養份含量參考 NRC (1994) 白色肉雞之營養標準，並視雞隻年齡調整 (0-3 週，4-6 週兩期)，各處理組飼糧之脂肪添加量均為 8%，但脂肪酸 C16:0 分佈於三酸甘油酯中甘油之第二個碳原子位置之比例 (% *sn*-2 C16:0) 及鈣含量不同，添加量如下：

- (1) 高 *sn*-2 C16:0 (79%)，高鈣 (1.20 或 1.08%) 組；
- (2) 高 *sn*-2 C16:0 (79%)，中鈣 (1.00 或 0.91%) 組；
- (3) 高 *sn*-2 C16:0 (79%)，低鈣 (0.80 或 0.72%) 組；
- (4) 低 *sn*-2 C16:0 (14%)，高鈣 (1.20 或 1.08%) 組；
- (5) 低 *sn*-2 C16:0 (14%)，中鈣 (1.00 或 0.91%) 組；
- (6) 低 *sn*-2 C16:0 (14%)，低鈣 (0.80 或 0.72%) 組。

另於飼糧中添加 0.25% Cr₂O₃，作為消化率測定之指示劑。

4. 收集 8~15 日齡間 (8 天) 及 36~41 日齡間 (6 天) 雞隻之排泄物，樣品冷凍保存於-20°C 以備進一步分析。

5. 試驗期間餵飼時程圖如下：



6. 試驗為期六週 (42 天)，試驗結束時實驗組雞隻以 CO₂ 犧牲，迅速取出脛骨，裝入塑膠袋密封保濕，並立即冷凍保存於-20°C 以備進一步分析。

7. 測定試驗飼糧中脂肪、脂肪酸及鈣含量、脂肪酸組成及 sn-2 C16:0 (%) 及各處理組雞隻排泄物中脂肪、脂肪酸及鈣含量。

8. 計算不同年齡 (8~15 天及 36~41 天) 肉雞之脂肪，個別脂肪酸及鈣之表面消化率。

9. 測定雞隻脛骨骨骼破裂強度、灰分及鈣含量。

結果與討論

脂肪酸位置分佈之分析：

一、脂肪水解：

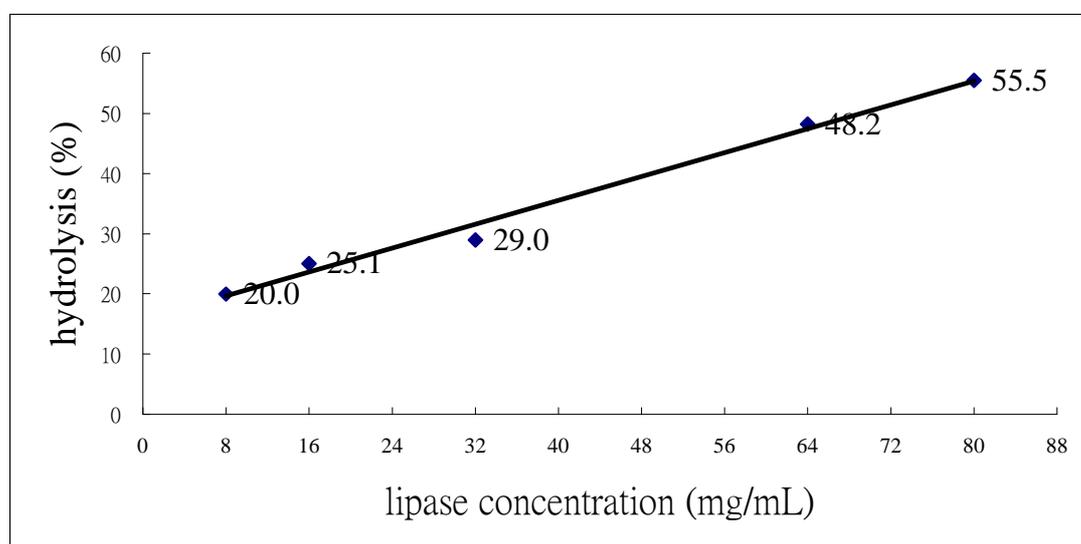
不同酵素在不同作用環境下之水解能力會有差異，因此利用酵素於水解受質時，測定其水解率 (%) 可以確定待測樣品之水解程度及此酵素之最適作用條件，水解率接近 50±5 % 時為最佳，此時水解產生之單酸甘油酯幾乎達最大量 (Luddy *et al.*, 1964)，單酸甘油酯產生量足夠情況下，進行薄層色層分析以分離各水解產物，較具意義。

本試驗採用 Sigma 編號 L3126 之脂肪酶，根據產品目錄所建議之作用條件為 37°C，pH 值 7.7，一單位的脂肪酶可水解 1 微當量之脂肪酸，計算求出本試驗所需添加之酵素濃度為 8mg/ml，依此條件實際操作後，發現以大豆油為受質情況下，延長作用時間 (Sigma 建議 30 分鐘，經延長為 60 分鐘，見表一) 水解率僅達 31.9% 左右，不符需求。提高作用溫度至 40°C，30 分鐘水解率即可達 37°C，60 分鐘之水準，約 31.6%，若延長至 60 分水解率可達 41.2%，於此溫度下再延長作用時間至 90 分鐘則水解率無明顯提昇 (約為 40.5%)，無再延長作用時間之必要，且作用時間過長可能會出現醯基受酵素破壞及移動之情況，故有文獻指出作用時間 1 至 2 分鐘已經足夠 (Luddy *et al.*, 1964)。但是在作用時間 2 或 5 分鐘時水解率最高只達 20%，其中又以 pH 值為 8 時較佳，故在此作用條件 (40°C，5 分鐘，pH 值為 8) 下，提高酵素濃度，檢測脂肪酶濃度對脂肪水解率之影響，結果如圖一所示，當脂肪酶濃度達 80(mg/mL) 時，脂肪水解率可達 55.5%，綜合上述，提高酵素濃度至 80(mg/mL) 可在較短之反應時間 (5 分鐘) 內，提高受

質水解率至本試驗所需程度 (約 50±5%)。

表一、脂肪酶作用條件對脂肪 (大豆油) 水解率之影響

溫度(°C)	時間(minute)	pH 值	酵素濃度(mg/mL)	水解率(%)
37	60	7.7	8	31.9
40	30	7.7	8	31.6
40	60	7.7	8	41.2
40	90	7.7	8	40.5
40	2	7.7	8	12.5
40	5	7.7	8	17.5
40	5	8.0	8	20.0



圖一、脂肪酶濃度對脂肪水解率之影響 (40°C, 5 分鐘, pH 8)。

二、常用脂肪中脂肪酸組成位置分佈 (sn %)

常見脂肪中脂肪酸 C16:0 分佈於三酸甘油酯中甘油之第二個碳原子位置之比例 (% *sn*-2 C16:0) 不同, 植物油如大豆油 (約 1-2%) 及棕櫚油 (約 9-11%) 較低, 而動物油如豬油 (約 62-72%) 及牛油 (約 17-23%) 之 *sn*-2 C16:0 較高, 本研究所測得之結果與文獻中所列者相近。C16:0 分佈於 *sn*-2 位置上之差距可達 70 % 左右 (大豆油及豬油; 表二)。

文獻中脂肪酸位置分佈影響脂肪及鈣消化率有, 尤其是長鏈飽和者, 非常明顯, Renaud *et al.* (1995) 指出, 提高脂肪中 *sn*-2 C16:0 之比率, 大鼠之脂肪消化率由 88% 提高至 93%, 其中 C16:0 之消化率由 81% 提高為 94%。Lien *et al.* (1997) 指出, 逐級提高脂肪中 *sn*-2 C16:0 之比率, 大鼠之脂肪消化率由 92.9% 直

線地提高為 99.5%。Brink *et al.* (1995) 則指出，提高脂肪中 *sn*-2 18:0 之比率，在低鈣 (0.3% Ca) 飼糧中，大鼠對脂肪消化率，由 92.7% 提高為 96.6%，鈣消化率則由 77.8% 提高為 84.6%；在高鈣 (0.98% Ca) 飼糧中，脂肪消化率更明顯的由 72.6% 提高為 89.0%，鈣消化率則由 38.5% 提高為 47.9%。

表二、各種脂肪中脂肪酸位置分佈

脂肪		8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Soybean oil											
福壽	2					1.3		0.4	26.1	67.4	5.0
	1,3					15.5		7.9	28.1	43.2	5.3
福懋	2					1.5		1.1	26.1	67.4	5.0
	1,3					13.8		8.8	28.1	43.2	5.3
Kubow, 1996	1					14.0		6.0	23.0	48.0	9.0
	2					1.0		<1	21.0	70.0	7.0
	3					13.0		6.0	28.0	45.0	8.0
Mattson and Volpenhein, 1963	2					1.0		0.0	22.0	69.0	8.0
Lard											
頂新	2				3.6	62.6	3.9	4.3	19.0	6.1	0.5
	1,3					9.8	1.4	17.3	55.3	15.7	0.6
Kubow, 1996	1				1.0	10.0		30.0	51.0	6.0	
	2				4.0	72.0		2.0	13.0	3.0	
	3							7.0	73.0	18.0	
Renaud <i>et al.</i> , 1995	2				4.4	65.0	4.5	4.0	14.0	4.5	0.8
	1,3				0.5	8.0	2.0	22.0	49.0	12.0	0.9
Tallow											
嘉吉	2				5.0	23.1	4.3	9.9	52.5	4.0	1.2
	1,3				2.8	25.3	2.8	21.8	42.6	4.0	0.8
強冠	2				5.3	16.1	4.4	13.1	57.7	2.7	0.8
	1,3				1.5	28.0	1.2	30.6	36.6	2.0	
Kubow, 1996	1				4.0	41.0		17.0	20.0	4.0	1.0
	2				9.0	17.0		9.0	41.0	5.0	1.0
	3				1.0	22.0		24.0	37.0	5.0	1.0
Palm oil											
強冠	2	1.5	2.3		0.4	9.7	0.2		66.1	19.6	0.2
	1,3		1.8		0.6	45.7		10.0	35.6	6.2	
Mattson and Volpenhein, 1963	2					11.0		2.0	65.0	22.0	

至此，本計畫之化學分析方法中，測定三酸甘油酯中脂肪酸位置分佈之分析步驟已建立，動物實驗之飼糧配製及飼養管理已熟悉其細節。本計畫原申請三年計畫，貴會審查後改為一年計畫，使得經費及時間均不足，尚需申請經費補助。

參考文獻

- Brink, E. J., E. Haddeman, N. J. D. Fouw and J. A. Weststrate. 1995. Positional distribution of stearic acid and oleic acid in a triacylglycerol and dietary calcium concentration determines the apparent absorption of these fatty acids in rats. *J. Nutr.* 125:2379-2387.
- Carriere, F., J. A. Barrowman, R. Verger and R. Laugier. 1993. Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterol.* 105:876-888.
- Flores, C. A., M.A. Wells, M. Morrill, S. A. Bustamante and O. Koldovsky. 1992. Diet, age and intestinal bile acids in pigs. *Nutr.* 8:418-420.
- Hofmann, A. F. and B. Bergstrom. 1963. Hydrolysis of long-chain monoglycerides in micellar solution by pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta.* 70:317-331.
- Innis, S. M., P. Quinlan and D. D. Schade. 1993. Saturated fatty acid chain length and positional distribution in infant formula: effects on growth and plasma lipids and ketones in piglets. *Am. J. Clin. Nutr.* 57:382-390.
- Innis, S. M., R. A. Dyer and E. L. Lien. 1997. Formula containing randomized fats with palmitic acid (C16:0) in the 2-position increases 16:0 in the 2-position of plasma and chylomicron triglycerides in formula-fed piglets to levels approaching Those of piglets fed sow's milk. *J. Nutr.* 127:1362-1370.
- Kestin, S.C., T. G. Knowles, A. E. Tinch and N. G. Gregory. 1992. Prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationships with genotype. *Vet. Rec.* 131:190-194.
- Koo, W. W. K., M. Hammami, D. P. Margeson, C. Nwaesei, M. B. Montalto and J. B. Lasekan. 2003. Reduced bone mineralization in infants fed palm olein-containing formula: a randomized, double-blinded, prospective trial. *Pediatr.* 111:1017-1023.
- Kubow, S. 1996. The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Nutr. Biochem.* 7:530-541.
- Lien, E. L. 1994. The role of fatty acid composition and positional distribution fat absorption in infants. *J. Pediatr.* 125:62-68.
- Lien, E.L., R. J. Yuhas, F. G. Boyle and R. M. Tomarelli. 1993. Corandomization of fats improves absorption in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 123:1859-1867.
- Lien, E. L., F. G. Boyle, R. Yuhas, R. M. Tomarelli and P. Quinlan. 1997. The effect of

- triglyceride positional distribution on fatty acid absorption in rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 25:167-174.
- Lindemann, M. D., S. G. Cornelius, S. M. El Kandelgy, R. L. Moser and J. E. Pettigrew. 1986. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *J. Anim. Sci.* 62:1298-1307.
- Luddy, F. E., R. A. Barford, S. F. Herb, P. Magidman, and R. W. Riemenschneider. 1964. Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by a semimicro technique. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41:693-696.
- Mattson, F. H., and R. A. Volpenhein. 1963. The specific distribution of unsaturated fatty acids in the triglycerides of plants. *J. Lipid Res.* 4: 392-396.
- Renaud, S. C., J. C. Ruf and D. Petithory. 1995. The positional distribution of fatty acids in palm oil and lard influences their biologic effects in rats. *J. Nutr.* 125:229-237.
- Small, D.M. 1991. The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* 11:413-434.