



2006年第27卷第8期
(总第269期)
(1980年创刊)

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
编辑二室(024)86391925(传真)
网络发行部(024)86391237
投稿邮箱:lg@feedindustry.com.cn
网站:www.feedindustry.com.cn
总编辑:裴春青
副总编辑:沈柱宇 陈广鹏
责任编辑:高雁
广告全权代理:沈阳阳光广告有限公司
地址:沈阳市长江街126号甲
B座4单元16楼
电话:(024)86276137 86276627
传真:(024)86276127
邮箱:gggh@feedindustry.com.cn
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:M4290
国内统一连续出版物号:CN21-1169/S
国际标准连续出版物号:ISSN1001-091X
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:中信银行沈阳分行营业部
帐号:72214101836000548-49
每册定价:6.00元

如蒙赐教本刊文章及图片,请注明
摘自《饲料工业》杂志,并寄样刊。

饲料

SILIAO GONGYE

(半月刊)

工业

企业标识展示



江苏北方
通威集团
(0412)3343018
(024)88080922



通威集团
(028)85188888



江苏正昌
(0519)7309988



江苏牧丰
(0514)7848811



江苏保龙
(0519)7966666



江苏良友
(0519)8309988



杭州康源
(0571)86433111



杭州康源
(0571)86433111



裕达机械
(0519)8305886



挑战集团
(010)62146105



江苏华翔
(0510)83797866



无锡华翔
(0510)83791888



北京爱绿
(010)88597542



成都大地
(028)85551741



广州海大
(020)84661699



广东恒威
(020)61368868

试验研究

- 36 复合微生态添加剂对断奶仔猪生产性能和血液生理生化指标的影响 宋凡 曹国文 戴荣国等
- 39 半乳甘露糖对肉兔生长性能、屠宰性能和胃肠道pH值的影响 杜冰 吴襟 张敏等
- 42 谷氨酰胺在断奶仔猪饲料中的应用效果 岳增华 薛志峰

营养研究

- 44 牛磺酸在动物营养上的研究进展 任和 占秀安
- 48 赖氨酸营养研究进展 周俊 宋代军

检测技术

- 51 磺胺间甲氧嘧啶单克隆抗体的制备 顾爱民 瞿明仁 李青梅等
- 54 细菌发酵大豆异黄酮成分的工艺及高效液相色谱检测 董青 吴周和 孙正博等

动物免疫

- 56 免疫增强剂有机硒在生长猪上的应用研究 魏凤仙 李绍钰 李春群等
- 59 维生素E对动物免疫的调控作用 卢亚萍 杜杰

专题论述

- 62 光合细菌在水产养殖业中的应用现状 赵小林

专家论坛

- 1 外源性免疫球蛋白对仔猪的作用及其应用 敖长金

饲料添加剂

- 7 乳铁蛋白的研究进展及应用前景 徐逸男 汪以真
- 11 无公害添加剂组合对猪生产性能的影响 周伏忠 张秀江 刘德海等
- 13 甘露寡糖的生物学功能及在畜牧业中的应用 孔涛 朱连勤 曲韵笙

生物技术

- 17 亚硝酸盐诱导黄霉素高产菌的研究 王惠 董应凯 吴兆亮等
- 19 培养条件对纳豆芽孢杆菌芽胞形成的影响 孙梅 匡群 施大林等
- 25 白腐真菌及其木质素酶的研究进展 刘玲 叶博 刘长江

水产养殖

- 29 酵母核苷酸对凡纳滨对虾生长、免疫以及抗应激影响的研究 王广军 朱旺明 谭永刚等
- 32 甲壳素在中华鳖养殖中的应用 魏立志 付立霞 黄薛俊等
- 35 养殖池塘里套养小体积网箱养殖黄颡鱼试验 邓学莲 周龙飞 秦永波

外源性免疫球蛋白对仔猪的作用及其应用

敖长金

摘 要 天然被动免疫对新生仔猪的健康和生存起着至关重要的作用;新生仔猪可通过吸吮初乳或采食外源免疫球蛋白才能获得被动免疫力。文章系统概述了外源免疫球蛋白对新生仔猪的作用及其存在的主要问题,以期为外源免疫球蛋白在仔猪生产中科学应用提供依据。

关键词 外源免疫球蛋白;仔猪;初乳

中图分类号 S852.4

目前,人们越来越意识到动物机体获得免疫力的重要性。机体获得特异性免疫力的途径有多种,但主要分为两大类型,即天然获得性免疫和人工获得性免疫。天然获得性免疫是指动物本身未经免疫接种而具有的对某些疾病的特异性抵抗力,其中包括天然被动免疫和天然主动免疫两种类型。天然被动免疫是指新生动物通过母体胎盘、初乳或卵黄从母体获得某种特异性抗体,从而获得对某种病原体的免疫力。

1 初乳对新生仔猪的重要性

表1 各种新生哺乳动物和婴儿获得被动免疫的途径

类别	胎盘类型	组织层次	转移途径	
			出生前	出生后
反刍动物	结缔组织绒毛膜	6	0	+++ (36h)
猪	上皮绒毛膜	6	0	+++ (36h)
马	上皮绒毛膜	6	0	+++ (36h)
犬	内皮绒毛膜	4	+	++ (10d)
小鼠	血管内皮	4	+	++ (16d)
大鼠	血管内皮	4	+	++ (20d)
海豚	血管内皮	2	+++	0
兔	血管内皮	2	+++	0
人	血绒毛膜	2	+++	0

注:“+”表示能够转移;“0”表示不能转移。

有蹄类动物(猪、牛、羊、马等)由于母体胎盘的特殊结构,母源抗体不能转移给胎儿,这些动物的仔猪出生后必须通过吸吮初乳才能获得天然被动免疫。所以,对于有蹄类动物的仔猪来说,由初乳获得的天然被动免疫在其免疫防治中起着非常重要的作用。

由此可见,初乳直接决定着新生仔猪的生存,而初乳的质量则取决于母畜。母畜通过其肠道环境的变

化所建立的各种适宜的抗体经初乳传递给仔畜,从而避免仔畜被各种传染病袭击。

养猪业在我国畜牧业生产中占有重要地位,猪肉是我国人民膳食结构中动物性蛋白的主要来源。经过几代畜牧专家和畜牧工作者们的共同努力,我国的养猪生产发展迅速,其成绩有目共睹。各种先进的饲养管理方法,如集约化养猪、封闭式网上饲养、早期断奶饲养等已被广大养猪者们所接受。由于上述新方法的普遍采用,母猪的生产效率得到大幅度提高。随着母猪产仔数的增多,每头仔猪从其母体所获得的乳量也在逐步减少,这直接影响了仔猪的生长和发育(Jackson等,1995)。另外,有些母猪分娩时持续的时间太长,而猪初乳中的免疫球蛋白于分娩后24h之内急剧下降(Klobasa等,1981、1985),使得晚出生的仔猪不能及时吃到富含免疫球蛋白的初乳,导致其免疫力下降、生长受阻,所以“僵猪”现象屡有发生,给养猪业带来了很大的经济损失。

上述损失在养羊业中尤为突出。据O'Brien和Sherman(1993)报道,在粗放式饲养条件下,羔羊死亡率为10%~60%;在集约化放牧条件下,也达8%~17%,并且,羔羊死亡的大多数情况发生在出生后的最初几天。造成羔羊早期阶段死亡的因素很多,如羔羊初生体重的过小、母羊妊娠期的缩短、每窝产羔只数增加、母羊泌乳力能减退、败血症、环境条件以及产羔时的天气情况等。而在以上死亡原因中,天然被动免疫转移不全是最主要的原因。法国的调查(Morand-Fehr等,1984)发现,未吃到初乳的羔羊其死亡率高达92%,并且,死亡都发生在出生后的最初2d。印度的一项研究(Nandakumar和Rajagopalaraaja,1983)也表明,羔羊吸吮初乳后的18h,其血清免疫球蛋白平均含量为7.35mg/ml,低于该平均值的羔羊在随后的两个月之内死亡率达44%;而高于该平均值的羔羊死亡率只

敖长金,内蒙古农业大学动物科学与医学学院,教授,博导,010018,内蒙古呼和浩特。

收稿日期:2006-03-27

有3.8%。这些数据有力地证明了天然被动免疫对幼畜早期阶段的重要性。

2 天然被动免疫转移的衡量指标

新生仔畜,吸吮初乳后12~18h血清IgG水平可以作为衡量被动免疫转移的指标(Nandakumar和Rajagopalaraaja,1983;Klobasa等,1986)。对于马、牛和羊,18h血清IgG水平若低于7mg/ml就被认为是被动免疫转移不全(Klaus,1969;Nandakumar和Rajagopalaraaja,1983;Pearson,1984)。而在猪上没有类似明确的报道,把没有吃任何初乳的仔猪(注:体内无免疫球蛋白)放在不同的环境中饲养,则其成活率是截然不同的。在非常清洁的环境(即无毒害气体,独立的笼圈等)中饲养能得到55%~98%的成活率(Varley等,1985);若在污浊的环境中饲养其仔猪的成活率只有0%~15%(McCallum,1977)。所以,Drew和Owen(1988)认为,由于相邻窝仔猪之间的接触传染所造成的仔猪死亡率高的主要原因是仔猪未能获得被动免疫或被动免疫转移不全。看来,在大型集约化养猪场中设计猪笼时应考虑避免不同窝间仔猪的相互接触传染问题。

3 影响天然被动免疫转移的因素

哺乳的新生仔畜出生时血液循环中缺乏免疫球蛋白,出生后必须通过吸吮初乳才能获得被动免疫,从而抵御病原菌的侵袭。新生仔畜从初乳中吸收免疫球蛋白受诸多因素的影响。

3.1 饲喂时间

新生仔畜从初乳中获得免疫球蛋白的能力在出生后12~36h就消失,而且这种消失是个逐渐的过程(Matte等,1982)。另外,初乳中的免疫球蛋白含量于母畜分娩后24h内急剧下降(Klobassa等,1981),所以,对于那些出生后未能在适宜时间内吸吮到充足初乳的幼畜,就面临着因获得被动免疫的能力下降而引起低血清免疫球蛋白,容易患各种传染性疾病(Yaguchi等,1980;de Passille等,1988),使得新生仔畜的抗病力降低和死亡率提高。但是,新生仔畜出生后禁食或只喂水不会影响其对免疫球蛋白的吸收(Carlson等,1980)。

3.2 初乳及初乳中的免疫球蛋白含量

犊牛出生后24h血清免疫球蛋白含量与所饲喂的免疫球蛋白量(Kruse,1970;Bush等,1970)和所吸吮的初乳量(McEwan等,1970;Morris等,1997)之间存在着强烈的正相关。羔羊(Devery Pocius等,1983)和仔猪(de Passille等,1988)也存在类似的现象。

3.3 初乳中的胰蛋白酶抑制因子

免疫球蛋白从初乳转移到新生仔畜的小肠后,面临着被新生仔畜胃肠道蛋白酶水解的威胁,所以必须受到保护(Laskowski和Laskosk,1951)。而起这种保护作用的物质就是存在于初乳中的胰蛋白酶抑制因子(Carlsson等,1974)。猪、牛、羊、马等有蹄类动物的初乳中含有很高活性的胰蛋白酶抑制剂(Sandholm和Honkanen-Buzalski,1979;Quigly等,1995)。与此相反,对于不依赖初乳就能获得被动免疫的人类而言,其初乳中的胰蛋白酶抑制剂活性和含量均很低(Sandholm和Honkanen-Buzalski,1979)。

3.4 其它因素

除以上因素外,应激(Lewis等,1978)、环境温度(Kelley等,1982)等都会影响新生仔畜从初乳中获得被动免疫的能力。

4 当前仔猪生产中存在的被动免疫转移不全问题及应采取对策

目前在畜牧业生产实践中,由于多种原因使得妊娠母畜营养不足,导致母畜分娩后缺奶或无奶,其结果是新生仔畜吸吮不到充足的初乳(Mellor等,1985),尤其是对于多胎家畜(如猪、山羊和产双羔或三羔的绵羊)而言上述影响更为明显,从而造成母源抗体转移不全,仔畜抗病力下降,容易引起消化道、呼吸道疾病,继而使仔畜的长势下降和死亡率上升。这些多胎哺乳动物的仔畜在出生后的早期阶段(出生后的3~7d)的高死亡率,给畜牧业生产造成极大损失,这种损失直接或间接都与幼畜的免疫机能差、抗病力弱有关;另外,仔畜由于抵抗力下降而引起的生长发育受阻,亦会直接地对畜牧业造成很大的经济损失。可见,在仔畜不能吸吮到充足初乳(天然被动免疫转移不全)的情况下,如何提高新生仔畜的抗病力,继而提高仔畜的生产性能是一个严峻而迫切需要解决的问题。为了解决这一难题,国内外营养免疫界的有关学者做了大量的研究工作,并提出了许多较为有效的技术措施。

4.1 血清制品的应用

将血清或其纯制品加工到人工乳中或注射到仔畜体内,可有效提高新生仔畜的抗病力,减少传染性疾病的发生,并提高其成活率和育成率(Wilson和Gordon,1948;Wells等,1974;张润东和徐克明等,1984;Heath,1985;Varley等,1986)。但由于血清不易保存、易污染、适口性差(Scoot等,1972)等原因,所以至今尚未形成产品。

4.2 牛初乳的应用

用牛初乳或混合初乳饲喂新生的羔羊、仔猪或马驹,亦取得较为满意的效果(张润东和徐克明等,1984;周建民、冯仰廉等,1987;Holmes 和 Lunn,1991)。但初乳只能从刚分娩的母畜获得,来源受到限制,而且保存又不方便,不易大量推广应用。

4.3 冷冻初乳或酸化初乳的应用

为了避免新鲜初乳保存不便的不足,有些学者采用冷冻或酸化方法制取冷冻初乳或酸化初乳来饲喂新生仔猪。但美国学者证明,仔猪摄取冷冻或酸化处理的初乳,容易引起消化道疾病,而且具有贫血的危险(Stabbings 等,1983)。

4.4 卵黄抗体的制备与应用

从注射某种疫苗后的高免鸡群产出的鸡蛋蛋黄中提取卵黄抗体,给初生仔猪口服,以预防某些疾病的发生。卵黄抗体虽然制备方便、成本低,但由于主要对某些特定疾病具有预防作用,广谱性差、半衰期短,因而不亦很好推广应用。

另外,接种疫苗是预防各种传染性疾病的有效措施,但由于初生仔猪的免疫应答能力差,因此,对初生仔猪接种疫苗也不是可取的方法。

4.5 血浆蛋白粉的应用

血浆蛋白粉的蛋白质含量在 70%以上、粗脂肪含量在 2%左右、灰分含量在 15%以下。蛋白质中氨基酸组成较为理想,比例较为平衡,赖氨酸、色氨酸和苏氨酸等必需氨基酸的含量较高;并且含有丰富的免疫物质,包括白蛋白、营养结合蛋白以及免疫球蛋白等功能性蛋白。据测定,免疫球蛋白占血浆蛋白粉中粗蛋白含量的 15.5%以上。另外,血浆蛋白粉还含有促生长因子、干扰素、激素、溶菌酶等其它免疫物质等。

早期断奶仔猪的免疫系统尚未发育完善,免疫力较低,因此,对疾病的抵抗力较差,容易产生腹泻、下痢等疾病。血浆蛋白粉由于含有较高的免疫球蛋白和其它免疫物质,具有较好的防治断奶仔猪腹泻和下痢等疾病的作用,这些物质多数能被仔猪吸收,可大大增强仔猪的免疫力,提高仔猪对疾病的抵抗力。此外,血浆蛋白粉能够缓解仔猪的断奶应激,提高仔猪采食量、平均日增重和饲料报酬等。

5 免疫球蛋白及其应用

从上世纪九十年代开始,澳大利亚、美国、加拿大、德国和中国等国家的学者们从动物血液中提取免疫球蛋白(主要是 IgG)制成人工初乳(Artificial milk)饲喂初生羔羊和初生仔猪,可使羔羊死亡率由 19%下

降到 7%,并且能够有效地防治仔猪的各种传染性疾病,并能促进仔猪的生长和发育。

猪的胎盘属于上皮绒毛膜型,具有这种类型胎盘的动物母体与胎儿之间存在着血胎屏障(Butler,1974)。血胎屏障不仅不妨碍母胎之间的营养物质交换,而且能够防止母体内的病原微生物的通过,因此,病原微生物很少能通过胎盘感染胎儿,不过对某些病毒起不到屏障作用(Fellenberg,1978);另外,血胎屏障也阻止了母源抗体向胎儿转移,仔猪出生后直接面临各种病原微生物等抗原侵袭的危险。由于新生仔猪对多种病原菌抗原的应答能力弱,因而,主动免疫的产生非常缓慢(Werhahn 等,1981)。所以,仔猪从出生到自身产生主动免疫之前,必须通过吸吮富含抗体的初乳所获得的被动免疫来抵御各种传染性病原菌的侵袭。尽管仔猪出生时其血液循环中含有非常微量的免疫球蛋白(0.12mg/ml),但出生后经过消化吸收初乳,其血清中的免疫球蛋白量迅速提高(Aumaitre 和 Seve,1978;de Passille 等,1988;敖长金,1998)。图 1 为在自然哺乳情况下猪乳和仔猪血清中 IgG 的动态变化规律。

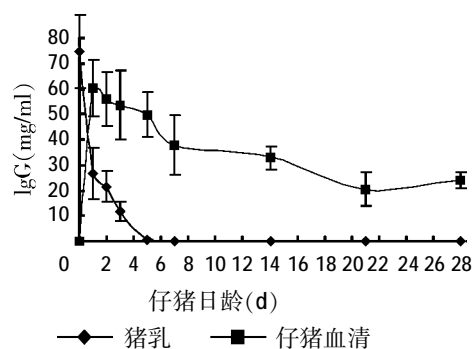


图 1 猪乳和仔猪血清中 IgG 的动态变化规律

仔猪从出生到断奶期间死亡大多数发生在出生后的最初几天(de Passille 等,1988)。仔猪在哺乳期死亡率与其初生重和窝重有关(Nielsen 等,1974),但是,最根本的死亡原因是由于出生后被动免疫转移不全所引起的抗病力降低(Yaguchi 等,1980;de Passille 等,1988)。

许多因素,如仔猪或母猪的冷热应激(Kelly 和 Easter,1987)、仔猪的出生顺序(Coalson 和 Lecce,1973)、母猪的产奶量及初乳中所含的 IgG 浓度(Milon 等,1983)等,都能通过减少仔猪摄入的初乳量而降低其从初乳中被动获得免疫球蛋白的能力。

初乳是仔猪出生后获取营养物质和免疫球蛋白的丰富来源。母猪为适应肠道环境的变化建立的各种

具有保护作用的适宜抗体(免疫球蛋白),通过初乳经“肠道(母猪)-乳腺(母猪)-肠道(仔猪)”的传递系统传递给仔猪。这种传递,对仔猪从出生到有能力通过其自身的免疫系统来抵御各种传染病期间起着至关重要的作用。猪初乳除含有丰富的免疫球蛋白(Klobasa等,1986)外,也含有丰富的免疫活性细胞,如淋巴细胞(Jan和Le,1994)和白细胞(Williams,1993)以及各种生长因子、激素(Grosvenor等,1992;敖长金,1998)。

由此可见,新生仔猪出生后从初乳获得充足的免疫球蛋白、各种免疫活性细胞、生长因子和激素等对其以后的生存、生长和发育起着重要的作用。

猪初乳中的免疫球蛋白主要是IgG,仔猪从初乳中所获得的IgG量受多种因素的影响,如母猪的品种、胎次、泌乳量以及其初乳中所含的IgG含量等。

由于猪胎盘的特殊结构,母源抗体不能转移给胎儿,所以仔猪出生时血液循环中只含有非常微量的免疫球蛋白(Porter,1969;Frenyo等,1981)。据敖长金的试验结果报道,仔猪出生时血清中的IgG含量只有 $(0.12 \pm 0.058)\text{mg/ml}$,说明在胎儿时期仔猪基本不能获得母源抗体。仔猪出生后只能通过吸吮初乳获得被动免疫(Aumaitre和Seve,1978)。新生仔猪的小肠在出生后的12~36h通过胞饮作用能够把初乳中的免疫球蛋白毫无改变地吸收进血液循环中(Lecce,1966)。仔猪出生后,小肠的通透性非常好,在自然哺乳条件下,出生后6h从仔猪血清中能检测出显著量 $[(39.85 \pm 4.79)\text{mg/ml}]$ 的IgG,而且仔猪出生后24h达到峰值 $[(60.10 \pm 11.18)\text{mg/ml}]$ 。仔猪出生后12~36h发生“肠封闭”,从而也就失去了吸收免疫球蛋白等大分子物质的能力(Lecce,1973;Westron等,1984a;Westron等,1984b)。当然,在自然哺乳条件下,“肠封闭”现象是一个逐渐过程,从仔畜出生后12h开始,到24h基本结束(Bush和Staley,1980)。仔猪出生24h后血清中的IgG含量开始下降($P < 0.05$),说明仔猪小肠已经开始封闭。另外,母猪分娩后24h初乳中的IgG含量显著下降,所以,在自然哺乳条件下,仔猪从初乳中获得IgG量也随之减少。

仔猪出生后被动获得的IgG到21d降至最低点 $[(20.53 \pm 6.46)\text{mg/ml}]$,因此,3周龄是仔猪免疫球蛋白的青黄不接期,最易患上痢,是最关键的免疫期;同时,仔猪这时已开始吃料,胃液又缺乏游离盐酸,对随饲料、饮水进入胃内的病原微生物没有抑制作用,从而成为仔猪多病的原因(张志龙等,1982)。另外,胃酸

低也限制了胃肠消化酶的活性和消化道的运动机能,继而限制了消化道对养分的消化吸收(宋玉等,1995)。仔猪到出生后的28d,其血清IgG又开始上升($P > 0.05$),这是主动免疫开始形成的结果(Drew和Owen,1988;Degregorio,1992)。

5.1 新生仔猪对外源IgG的吸收规律

图2是新生仔猪对猪血免疫球蛋白的吸收情况。

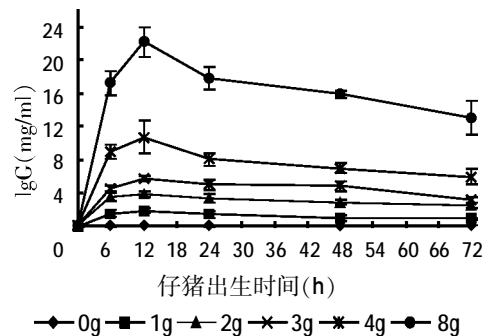


图2 新生仔猪对外源IgG的吸收

由图2可知,随着饲喂浓度的增加,新生仔猪对外源PIgG(猪血免疫球蛋白)的吸收量也增加($P < 0.05$),而且,到仔猪出生后的12h其血清PIgG含量达到峰值($P < 0.05$)。然后,各组仔猪血清中的PIgG含量逐渐下降,这与自然哺乳仔猪吸收初乳中的PIgG后其血清中的PIgG的消长规律相似,但是出现峰值的时间提前。到仔猪出生后的72h,饲喂浓度不同各组仔猪血清PIgG含量也有差异($P < 0.05$),即饲喂浓度越高,其血清PIgG含量也越高。若仔猪出生后仅喂给不含PIgG的人工乳,则仔猪血清中的PIgG水平在出生后的72h之内一直保持很低的水平($P > 0.05$),表明在此阶段内仔猪还没有合成自身PIgG的能力。

上述试验结果与Werhahn等(1981)用胃管灌注法给仔猪提供外源PIgG所获得的结果类似,所以,饲喂措施对其吸收没有影响。

仔猪出生后的6h之内,饲喂1.0~8.0g外源PIgG后,其血清中出现的PIgG峰值与饲喂量之间存在着一定的比例关系,即饲喂量(g)与血清中出现的PIgG峰值(mg/ml)的比例约为1:(2~2.77)。仔猪在出生后的6h之内,饲喂一定浓度的外源PIgG后紧接着饲喂牛的初乳,其血清中出现的PIgG峰值和对照组相比升高50%~70%(Werhahn等,1981),说明仔猪的小肠此时没有封闭,还存在吸收外源PIgG的潜力。瓶哺8.0g外源PIgG后,仔猪血清中的峰值能达到22.18mg/ml,若想达到自然哺乳仔猪血清中PIgG的峰值(60.10mg/ml)水平,每头仔猪需要饲喂大约20g左

右的外源 PlgG(相当于 260ml 刚分娩时的初乳量)。若要达到自然哺乳仔猪出生后 12h 时血清 PlgG 的水平 $[(45.95 \pm 7.17) \text{mg/ml}]$, 每头仔猪也至少需要提供 16g 左右的外源 PlgG。给每头仔猪提供 8g 以上的纯化 PlgG, 提纯这么大的 PlgG, 在人力、物力、财力和时间等方面是相当困难的。另外, 即使饲喂了 20g 外源 PlgG 后能否达到 60mg/ml 水平也还待于探讨。因为从血液中提取的 PlgG 和猪初乳中存在的 PlgG 被仔猪吸收时其吸收效率是否一样, 未见资料报道。不过, 新生仔猪的小肠未封闭之前对大分子物质的吸收是没有选择性的现象已经得到大家的公认。

在仔猪对从血液中提取的 PlgG 和猪初乳中存在的 PlgG 的吸收效率一样的前提下, 新生仔猪出生后 6h 之内, 大约从初乳中能获得 16g 左右的 PlgG (约 220ml 初乳)。Coalson 和 Lecce(1973)指出, 新生仔猪出生后 1h 的吸吮过程中只要吃到 40~60g 富含免疫球蛋白的初乳就能够获得足够的被动免疫。因为在自然哺乳条件下, 仔猪从初乳获得免疫球蛋白的效率肯定比人工饲喂方法所获得免疫球蛋白的效率。而在人工哺乳条件下, 影响仔猪对免疫球蛋白的吸收可能有 3 个方面(Selman 等, 1971; Stott 等, 1981): 其一, 仔猪在人工哺乳时不能象自然哺乳一样及早获得免疫球蛋白; 其二, 人工哺乳时给仔猪每次提供的免疫球蛋白的量没有自然哺乳的多; 其三, 仔猪与母畜分开会造成生理和心理上的影响。另外, 人工初乳虽然模仿天然初乳的成分(初乳成分复杂, 有些成分到目前为止还不知道, 人们称之为“未知因子”)而研制, 但其各成分之间的最佳搭配以及适口性等方面都与天然初乳有一定差别。

5.2 外源免疫球蛋白与初乳中免疫球蛋白作用类似

经过我们的研究发现, 新生仔猪采食外源免疫球蛋白和初乳后均能获得被动免疫, 从而确保其生存。如果新生仔猪未能及时采食到外源免疫球蛋白或初乳, 则死亡率为 100%, 所以, 外源免疫球蛋白与初乳中免疫球蛋白作用类似。

5.3 外源免疫球蛋白与初乳中免疫球蛋白的互补作用

新生仔猪吸吮母乳的基础上, 补喂 1~3g 外源免疫球蛋白可显著提高日增重和血清中的免疫球蛋白含量, 并显著降低其死亡率, 但对腹泻率无显著影响。

5.4 外源免疫球蛋白应用中存在的问题及可应用性

尽管外源免疫球蛋白在仔猪生产中的应用取得了良好的效果, 但还存在以下问题。

5.4.1 来源

工业化生产外源免疫球蛋白的最佳原料是猪血, 这是因为: ①猪的集约化养殖程度高, 集中屠宰率高; ②从猪血中提取的免疫球蛋白对猪的效果最佳。当然, 免疫球蛋白也可从牛血中提取, 但牛血中提取的免疫球蛋白对猪的效果相当于从猪血中提取的免疫球蛋白的 70%。

5.4.2 安全

目前人们担心的是猪血中提取的免疫球蛋白用在猪上是否安全的问题。由于免疫球蛋白的提取过程经过了一系列的盐析过程, 并采用了膜过滤等先进技术, 清除了病原菌和病毒, 因此, 安全是可以保证的。

5.4.3 提纯和脱盐

免疫球蛋白的提取过程中采用了中性盐的盐析技术, 所以, 必须经脱盐后才能用于仔猪生产。

5.4.4 干燥

冷冻干燥技术是免疫球蛋白干燥的最佳方法, 但是该方法成本高、效率低, 所以不适合于工业化生产。敖长金等(2004)采用喷雾干燥的方法后发现, 该方法尽管使免疫球蛋白活性损失约 15%~20%, 但非常适合于工业化生产。

5.4.5 饲喂时间

免疫球蛋白的使用因目的不同, 所使用的方法也不同。若想增强被动免疫力, 最好在仔猪出生后 24h 内饲喂, 24h 后饲喂的免疫球蛋白不能被吸收进血液循环, 只在肠道中杀死相应的病原菌和病毒, 从而保证消化道的健康。

5.4.6 成本

尽管免疫球蛋白在实际应用中取得了良好的效果。但由于成本高, 所以至今没有被广大养猪场接受。随着生产成本的降低, 在不久的将来肯定在仔猪生产中发挥越来越重要的作用。

参考文献

- 1 教长金. 新生仔猪吸收外源免疫球蛋白的影响因素及其机理研究. 内蒙古农业大学博士学位论文, 1998
- 2 Bush L J, Staley T E. Absorption of immunoglobulins in newborn calves. J. Dairy Sci., 1980(63):672~680
- 3 Carlsson L C T, Bergelin I S S, Karlsson B W. Trypsin inhibition in urine of developing neonatal pigs and in sow's colostrum. Enzyme, 1974(18):176~188
- 4 Carlsson L C T, Westrom B R, Karlsson B W. Intestinal absorption of proteins by the neonatal piglet fed on sow's colostrum with either natural or experimentally eliminated trypsin-inhibiting activity. Biology of the Neonate, 1980(38):309~320
- 5 de Passille, Hartstock T G. Within- and between-litter variation of proximate composition in newborn and 10-day-old Landrace swine.

- J. Anim. Sci., 1979(49): 1 449~1 457
- 6 Devery-Pocius J E, Larson B L. Age and previous lactations as factors in the amount of bovine colostrum Immunoglobulins. J. Dairy Sci., 1983(66): 221~226
 - 7 Drew M D, Owen B D. The provision of passive immunity to colostrum-deprived piglets by bovine or porcine serum immunoglobulins. Can. J. Anim. Sci., 1988(68): 1 277~1 288
 - 8 Heath J P, Harrell R. G. and Komuves L. G. 52nd Annu. Meet. Microsc. Soc. Am., 1994, 292
 - 9 Holmes M A, Lunn D P. A study of bovine and equine immunoglobulin levels in pony foals fed bovine colostrum. Equine Vet. J., 1991(23): 116~118
 - 10 Jackson J R, Hurley W L, Easter R A, et al. Effects of induced or delayed parturition and supplemental dietary fat on colostrum and milk composition in sows. J. Anim. Sci., 1995(73): 1 906~1 913
 - 11 Kelley K W, Blecha F, Regnier J A. Cold exposure and absorption of colostrum immunoglobulins by neonatal pigs. J. Anim. Sci., 1982(55): 363~368
 - 12 Klobasa F, Butler J E, Werhahn E, et al. Maternal-neonatal immunoregulation in swine. II. Influence of multiparity on de novo immunoglobulin synthesis by piglets. Vet. Immunol. Immunopathol., 1986(11): 149~159
 - 13 Klobasa F, Habe F, Werhahn E, et al. Changes in the concentration of serum IgG, IgA and IgM of sows throughout the reproductive cycle. Vet. Immunol. Immunopathol., 1985(10): 341~353
 - 14 Klobasa F, Werhahn E, Butler J E. Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulins of maternal origin. Res. Vet. Sci., 1981(31): 195~206
 - 15 Kruse V. Absorption of immunoglobulin from colostrum in newborn calves. Anim. Prod., 1970(12): 627~638
 - 16 Lewis L D. Calf diarrhea: Part III. Management, prevention and treatment of diarrhea. Norden News, Topics Vet. Med., 1978, 22
 - 17 Matte J J, Girard C L, Seoane J R, et al. Absorption of colostrum immunoglobulin G in the newborn dairy calf. J. Dairy Sci., 1982(65): 1 765~1 770
 - 18 McCallum I M M, Elliot J I, Owen B D. Survival of colostrum-deprived neonatal piglets fed gamma-globulins. Can. J. Anim. Sci., 1977(57): 151~158
 - 19 McCoy G C, Reneau J K, Hunter A G, et al. Effects of diet and time on blood serum proteins in newborn calf. J. Dairy Sci., 1970(53): 358
 - 20 Mellor D J, Murray L. Effects of maternal nutrition on under development during late pregnancy and on colostrum production in Scottish Blackface ewes with twin lambs. Res. Vet. Sci., 1985(39): 230~234
 - 21 Morand-Fehr P, Villette Y, Chemineau P. Influence des conditions de milieu sur la mortalité des chevreaux (Influence of environmental conditions upon the mortality of goats). In: P. Yvone and G. Perrin (Editors), Les maladies de la chèvre (Diseases of Goats). Les Colloques de l'INRA. No. 28, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1984. 31~46
 - 22 Morin D E, McCoy G C, Hurley W L. Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunoglobulin G1 absorption in Holstein bull calves. J. Dairy Sci., 1997(80): 747~753
 - 23 Nandakumar P, Rajagopalaya C A. Growth and mortality in relation to serum immunoglobulin level in neonatal kids. Kerala J. Vet. Sci., 1983(14): 49~52
 - 24 O'Brien J P, Sherman D M. Serum immunoglobulin concentrations of newborn goat kids and subsequent kid survival through weaning. Small Ruminant Research, 1993(11): 71~77
 - 25 Quigley J D, Martin K R, Dowlen H H, et al. Addition of soybean trypsin inhibitor to bovine colostrum: Effects of serum immunoglobulin concentrations in Jersey calves. J. Dairy Sci., 1995(78): 886~892
 - 26 Scoot A, Owen B D, Agar J L. Influence of orally administered porcine immunoglobulins on survival and performance of newborn colostrum-deprived pigs. J. Anim. Sci., 1972(35): 1 201~1 205
 - 27 Stubbings D P, Gibbons D G, Tindall J R. Feeding bovine colostrum to lambs. Vet. Rec., 1983(112): 88~89
 - 28 Varley M A, Fowler V R, Maitland A A. A rearing system for colostrum-deprived neonatal piglets. Lab. Anim., 1985(19): 290~296
 - 29 Wells P W, Snodgrass D R, Herring J A, et al. Antibody titres to lamb rotavirus in colostrum and milk of vaccinated ewes. Vet. Rec., 1978(103): 46~48
 - 30 Wilson D R, Gordon W S. J. Comp. Path. Ther. 1948(58): 210
 - 31 Yaguchi H, Murata H, Kagota K, et al. Studies on the relationship between the serum gamma globulin levels of neonatal piglets and their mortality during the first two months of life: an evaluation for the ammonium sulphate reaction. Bri. Vet. J., 1980(136): 63~70
 - 32 Laskowski M, Laskowski M. Crystalline trypsin-inhibitor from colostrum. J. Biol. Chem., 1951(190): 563~573
 - 33 Sandholm M, Honkanen-Buzalski T. Colostral trypsin-inhibitor capacity in different animal species. Acta Vet. scand., 1979(20): 469~476

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

·作者简介·

教长金,男,蒙古族,1962年9月生,教授,博士生导师,内蒙古通辽市科左中旗人。1986年毕业于北京农业大学(现中国农业大学)生物学院动物生理生化专业,并获学士学位;1993年和1998年在内蒙古农牧学院(现内蒙古农业大学)动物营养专业分别获得硕士和博士学位;2003年5月至2004年5月在澳大利亚新英格兰大学动物科学系做高级访问学者。

1998年入选内蒙古自治区“321人才工程”第二层;2000年入选内蒙古自治区高等教育“111工程”第一层。目前任内蒙古畜牧学会常务理事、《动物营养学报》编委、中国畜牧兽医学学会动物营养学会常务理事、内蒙古自治区动物营养与饲料科学重点学科副主任、内蒙古农业大学动物科学与医学学院副院长。

主要研究方向为仔猪营养与免疫、动物营养与畜产品品质。参加完成了3项国家自然科学基金课题和2项内蒙古自治区攻关课题,主持完成了1项内蒙古自然科学基金课题。目前主持1项国家自然科学基金项目和2项横向课题。曾获内蒙古自治区优秀教学成果一等奖1项,国家优秀教学成果二等奖1项,国家发明专利1项。在省级以上学术刊物上发表论文50余篇。

乳铁蛋白的研究进展及应用前景

徐逸男 汪以真

摘要 乳铁蛋白(LF)是一种多功能的糖蛋白,具有抗菌、抑菌、抗病毒、抗氧化、调节机体免疫和提高肠道对铁离子的吸收等作用。通过对乳铁蛋白的生产制备和基因调节作用的阐述,讨论乳铁蛋白在饲料添加剂中的应用前景。

关键词 LF;生理功能;基因调节;应用

中图分类号 S816.7

我国的养猪业发展迅速,但抗生素等药物的添加导致动物性食品中药物残留问题日益严重。因此,寻找一种安全、环保和高效的新型抗菌制剂已成当务之急。乳铁蛋白(Lactoferrin, LF)是一种相对分子量约为80 000Da的铁结合性糖蛋白,主要存在于乳汁、眼泪、唾液、精液、鼻腔分泌物等外分泌液或血浆、中性粒细胞中^[1]。乳汁,尤其是初乳中LF的含量很高,如牛初乳中的LF质量浓度为1g/l^[2]。深入研究发现,LF是一种具有多种生物学功能的蛋白质,它不仅参与铁的转运,而且具有抗菌、抑菌、抗病毒、抗氧化、调节机体免疫和提高肠道对铁离子的吸收等作用,被认为是一种新型的抗菌、抗癌药物和极具开发潜力的食品和饲料添加剂^[3-5]。

1 乳铁蛋白的分子结构

Groves 于1960年首次从牛乳中分离获得LF,由于LF与铁结合形成红色的复合物,故也称其为“红蛋白”。人和牛的LF一级结构具有高度的相似性,二者同源性高达69%,牛和人的LF分别含有689和691个氨基酸^[6]。由已确定的人LF的完整高级结构和牛LF的部分高级结构相比可见,LF的二级结构是由 α -螺旋和 β -折叠交替排列组成的。Anderson等用X射线分析法测定了结晶状态下的人LF二级结构的组成;徐跃用傅氏转换红外线光谱仪测定了重水溶液和粉剂状态下的脱辅基牛LF的二级结构组成。两个结果显示,人和牛的LF二级结构以 α -螺旋和 β -折叠结构为主(70%以上),同时 α -螺旋多于 β -折叠。Baker等用X射线分析法建立了人LF的完整立体结构,发现人LF的立体结构包括两个结构基本相同的叶,N端的叶叫N叶,由1~332个氨基酸残基组

成;C端的叶叫C叶,由334~703个残基组成。每个叶又包括两个结构域和一条裂隙,裂隙是结合 Fe^{3+} 的部位,每个LF可以结合两个 Fe^{3+} 和两个碳酸根离子。LF是糖蛋白,所有的LF分子都含有基本结构为双链状的多聚糖,该多聚糖与肽链上的天冬氨酸残基相连,不同来源的LF多聚糖在结构和组成上仅有细微的差别。

2 乳铁蛋白的功能和作用机理

2.1 乳铁蛋白具有广谱抑菌作用

1972年,Bullen等首先提出LF具有抑菌作用。乳铁蛋白对革兰阴性菌和阳性菌的抑菌作用,一方面是由于乳铁蛋白高度结合铁,使细菌失去生长所需的基本养分铁;另一方面,乳铁蛋白通过氨基末端强阳离子结合区域,增加细菌细胞膜的通透性,使细菌的脂多糖从外膜渗出,起到直接杀菌作用。现已确定,LF属广谱抑菌剂,既可抑制需铁的革兰氏阴性菌,如大肠菌群、沙门氏菌等;也可抑制革兰氏阳性菌;但基本不抑制对铁需求不高的菌,如乳酸菌^[6-11]。

2.2 乳铁蛋白具有抗病毒作用

乳铁蛋白通过抑制病毒进入细胞,减轻对人体肝细胞的损害。肝细胞病毒C(HCV)是一种有囊膜的单链RNA病毒,它可以引起慢性肝炎、肝硬化、肝癌。LF可通过结合在肝细胞病毒C的囊膜蛋白上阻止病毒与靶细胞结合。轮状病毒感染最容易引起初生婴儿和儿童的非细菌性胃肠炎,全世界每年平均有一百万儿童死于轮状病毒感染。轮状病毒(Rotavirus)的基因组是包裹在3层衣壳内的10段不同的RNA片段。Superti等(1997)研究发现,LF可阻止轮状病毒吸附于靶细胞上,从而防止感染,而且在病毒进入靶细胞后,LF仍然有抗病毒效果,但具体机理目前尚不清楚。LF在体外没有直接抗FVC(Friend virus complex)感染的效果,因此,其作用机制可能是作为一个转录因子促进了骨髓组织生成(Fleet, 1995)。LF对艾滋病(HIV)病毒也有抑制作用,Defer、Muller等发现,艾滋病患者

徐逸男,浙江大学饲料科学研究所,在读硕士,310029,浙江省杭州市秋涛北路164号。

汪以真,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-02-20

的血浆、唾液中 LF 水平明显下降,所以他们更容易感染其它疾病。Viani 等(1999)报道,LF 与叠氮羰基结合后能够增加 LF 抗 HIV 病毒效果。LF 对 HIV 病毒的作用主要发生在感染的早期,可能是在病毒吸附到靶细胞上时,如果在感染后给药,给药越晚 LF 的作用越弱,而且金属元素饱和的 LF 对 HIV 病毒的作用比空白 LF 的作用弱,其原因尚不清楚。除此之外,LF 抑制 herpes simplex virus(HSV)、cytomegalovirus(CMV)等病毒。几乎所有的研究都表明,LF 阻止病毒感染细胞不是在感染后阻止病毒复制,而是直接结合于 HCV、Polio、轮状病毒、HSV 以及 HIV 病毒粒子上而阻止其感染靶细胞。也有研究表明,LF 无直接抗病毒效果,而是通过间接地调节免疫系统的抗病毒反应来达到抗病毒的目的。

铁离子是几乎所有细菌生长所必需的物质(是细菌生物氧化酶所必需的),而 LF 能够夺取细菌生长所需的 Fe^{3+} 。嗜中性粒细胞是含 LF 最多的细胞,在未释放到血液中时 LF 未结合铁离子,当释放到血液中后便有较强的结合铁离子的能力,因而具有较强的抑菌作用。有研究表明,当 LF 培养基中加入 Fe^{3+} 时,随 Fe^{3+} 浓度的加大抑菌作用减弱,当加入过量的 Fe^{3+} 抑菌作用完全消失,这证明 LF 通过与细菌竞争铁离子达到抑菌的目的。也有研究者认为,LF 通过与细菌竞争结合位点来抑制细菌。

LF 还具有直接的杀菌能力。Ellison 等报道,LF 可粘附于细菌胞膜上,通过改变膜的通透性而使细菌死亡;LF 可以导致革兰氏阴性菌外膜中脂多糖的释放,从而改变胞膜的通透性。LF 还具有杀真菌的能力,尤其是对假丝酵母属作用的研究报道较多。这些抗细菌和真菌活性不仅仅靠夺取病原体微环境中的铁离子,而且还通过以其 N-端结合细菌和真菌的细胞壁破坏细胞膜,导致细胞内容物的泄露来杀死它们。

2.3 乳铁蛋白具有抗氧化作用

研究结果显示,乳铁蛋白能抑制铁诱导的脂质过氧化过程所产生的硫代巴比妥酸和丙二醛的生成。另外,牛乳铁蛋白能降解酵母中的转运 RNA,具有核糖果核酸酶的活性,且能抑制超氧离子的形成。所有这些都可降低人体内自由基对动脉血管壁弹性蛋白的破坏,达到预防和治疗动脉粥样硬化和冠心病的目的。

人和牛的 LF 都已被发现有抑制脂质过氧化的作用,因此,LF 用作食品和饲料添加剂可以起到抗氧化剂的作用。

2.4 乳铁蛋白具有抗癌作用

铁与其它微量元素的平衡,在补充机体缺铁,降低铁在机体内沉积引起的铁过负荷,以及由此引发的一系列临床疾病中均发挥重要的预防和治疗作用。另外,乳铁蛋白对消化道肿瘤,如结肠癌、胃癌、肝癌、胰腺癌,具有化学预防作用,并可抑制由此引发的肿瘤转移。最后,乳铁蛋白能启动宿主防御系统的初始活化反应,调控不同类型淋巴细胞比例的改变对机体免疫反应的影响,在提高免疫力、预防丙型肝炎病毒的感染和治疗慢性肝炎方面都起到了积极作用。

2.5 乳铁蛋白调节机体免疫反应

据报道,LF 可以促进中性粒细胞或巨噬细胞的杀菌作用和吞噬作用,对 NK 细胞的活性和淋巴细胞、中性粒细胞的繁殖具有调节作用。在一般情况下,每毫升血清中含有 LF $0.3\sim 0.5\mu\text{g}$,但一旦发生感染,LF 将从活化的嗜中性粒细胞中释放到血液中,放出量可增加到平时的 20 倍,因此,LF 可被视为抗炎因子。据日本的角田研究小组报道,他们做了鱼类 LF 的防御感染效果试验,将金鱼预先用添加 0.4% LF 的饵料分别饲喂 3d 和 14d,再和患白斑病的金鱼一起用普通饵料饲喂 10d,结果对照组的存活率为 20%;而用添加 LF 的饵料预先饲喂 3d 的组存活率为 60%;预先饲喂 14d 的组存活率为 80%。在口服 LF 对金鱼血液性状影响的试验中发现,淋巴球数随着饲喂天数的延长而增多。

2.6 乳铁蛋白调节胃肠道对铁的吸收

乳铁蛋白通过它的氨基和羧基末端两个铁结合区域能高亲和性地、可逆地与铁结合,并维持十二指肠细胞在一个较广的 pH 值范围内对铁元素的吸收和利用。

2.7 乳铁蛋白同药物的协同作用

研究显示,乳铁蛋白能同多种抗生素和抗病毒药物协同作用,减少药物用量,降低抗生素或抗病真菌制剂对人体肝、肾功能的损害,同时,增强体内微生物对药物的敏感性。

2.8 基因调节作用

乳铁蛋白的转录可由雌激素在其基因的 3 个不同部位进行调节,还可能通过其 mRNA 的 3' 端非翻译区富含腺嘌呤和尿嘧啶的不稳定序列进行转录性调节^[2]。乳铁蛋白自身可能也是一种其它基因表达的调节物质,乳铁蛋白可同一些特异 DNA 序列结合并调节一定的基因表达,这些现象揭示了外源性乳铁蛋白可发生细胞内转化并被转运至核质部位,但作用机制

尚不清楚。后来发现乳铁蛋白对纤维母细胞内 GM-CSF 有下行调节作用,特别当受 IL-1 刺激时,这种下行调节作用更为明显,这些报道支持了上述说法^[15]。

另外,对乳铁蛋白基因结构及其表达调控的研究也取得了很大进展。人乳铁蛋白 (hLF) 的基因全长 2.35kb, 其中有一个 2 133bp 的开放阅读框架(ORF)、编码分泌信号肽(19 个氨基酸残基)和成熟的乳铁蛋白(692 个氨基酸残基)^[16,17];猪 LF 基因定位于猪 2 号染色体长臂的 2q¹² 区域, 编码 19 个残基组成的分泌信号肽和 685 个氨基酸组成的完整蛋白, 在体外转录、翻译后产生一个 78kDa 的蛋白^[18,19];LF 在异源生物体中的表达特征及可能的应用前景越来越引起人们的

关注^[20-22]。

3 乳铁蛋白的生产工艺

自 1960 年以来, 人们就尝试采用各种方法制备乳铁蛋白,例如采用色谱法、超滤法、盐析法以及酸沉淀法等从人或牛乳中分离纯化 LF (姬德衡,1996)。目前,随着分离精制技术不断完善,已在工业上成功地开发了从干酪乳清和脱脂乳中制备纯度高达 95% 以上的 LF,其生产技术要点是组合使用膜技术和色谱分离技术(山内恒治,1999)。利用超滤(ultrafiltration, UF) 技术制备乳铁蛋白制品的生产工艺(于长青,1999)见图1。

用该工艺制备乳铁蛋白的回收率可达 70%左右, 浓缩倍数达 2.7 倍,操作简便,生产成本相对较低,易

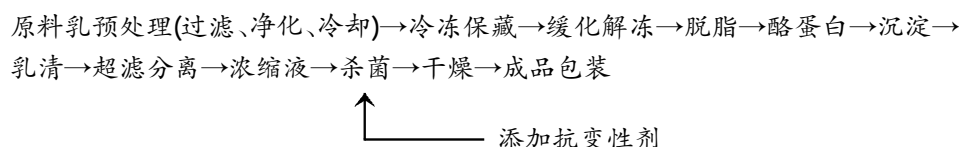


图1 利用超滤技术生产乳铁蛋白制品的工艺流程

于工业化生产;缺点是制备的乳铁蛋白纯度低,膜需要经常处理。

我国每年有大量乳清和 8~10 万吨富余牛初乳^[13,14] 可用于生产乳铁蛋白,在现有的基础上进一步优化工艺、降低生产成本,形成工业化生产,就能实现乳铁蛋白的商品化。

4 应用前景

新生仔猪普遍存在的贫血和腹泻是导致其死亡的主要原因。LF 能促进铁的转运和吸收,可以治疗仔猪贫血;具有广谱的抗菌、抗病毒作用,可用来预防和治疗仔猪腹泻。所以促进母猪乳汁中产生内源性 LF 或增加仔猪日粮中的 LF,将是预防仔猪腹泻和贫血的最佳选择^[23]。此外,LF 还具有调节免疫系统活性的作用,能增强家畜对疾病的抵抗力;具有抗真菌和抗脂质氧化作用,可用作防霉剂和抗氧化剂;具有耐高温特性,使其在饲料加工过程中不易变性失活。总之,LF 具有广泛而独特的生物学功能和理化特性,在乳品、食品、生化、医药、化妆品等领域,特别是饲料行业开发前景广阔。由于乳铁蛋白为动物初乳中的天然蛋白质,因此,必将为绿色畜牧业发展发挥其应有的作用。

参考文献

1 罗献梅,陈代文,张克英.乳铁蛋白及其活性肽的营养生理作用及

应用前景[J].饲料工业,2005,26(2):5~9

2 曹劲松.初乳功能性食品[M].北京:中国轻工业出版社,2000

3 Hiroyuki Tsuda, Kazunori Sekine, et al. Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrin [J]. Mutation Research, 2000(462):227~233

4 Keiichi S Z. Lactoferrin: A marvelous protein in milk [J]. Animal Science Journal, 2000, 71(4): 329~347

5 Masanori Ikeda, Akito Nozaki, et al. Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cell [J]. Virus Research, 2000(66): 51~63

6 Nibbering P H, E. Ravensbergen, M. M. Welling, et al. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. Infect. Immun., 2001(69): 1469~1476

7 Cohen M S, J. Mao, G. T. Rasmussen, et al. Interaction of lactoferrin and lipopolysaccharide (LPS): effects on the antioxidant property of lactoferrin and the ability of LPS to prime human neutrophils for enhanced superoxide formation. J. Infect. Dis., 1992(166): 1375~1378

8 Elaiss-Rochard, E. D. Legrand, V. Salmon, et al. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. Infect. Immun., 1998(66): 486~491

9 Elaiss-Rochard, E. A. Roseanu, D. Legrand, et al. Lactoferrin - lipopolysaccharide interaction: Involvement of the 28~34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to Escherichia coli O55B5 lipopolysaccharide [J]. Biochem., 1995(312): 839~845

10 Ellison R T. III. The effects of lactoferrin on gram-negative bacteria. In T. W. Hutchens and et al. (eds.), Lactoferrin: Structure and Function. Plenum Press, New York, 1994. 71~90

- 11 Nikawa H, L.P.Samaranayake,J.Tenovuo,et al. The effect of antifungal agents on the in vitro susceptibility of *Candida albicans* to apo-lactoferrin. Arch.Oral. Biol.,1994 (39):921~923
- 12 Christina T Teng.Lactoferrin gene expression and regulation :an overview [J].Biochemical and cell biology,2002,80(1):7~16
- 13 唐传核,曹劲松,潘彬全,等.乳铁蛋白最新研究进展.中国乳品工业,2000,28(3):14~17
- 14 凌雪萍,鹿广昌,邢伟.乳铁蛋白的开发利用及其研究进展.中国乳品工业,2002,30(4):18~21
- 15 刘红云,童富淡.乳铁蛋白生理功能研究现状[J].上海畜牧兽医通讯,2003,3(3):2~4
- 16 Wei X.Charactererization of the complete cDNA sequence of human neutrophil lactoferrin and isolation of genomic clones [J].Blood, 1988,72(2):155~160
- 17 Rey M W.Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin[J].Nucleic acids research,1990,18(17):5 288~5 294
- 18 钟发刚.猪乳铁蛋白基因的分离与表达.动物医学进展,1999,20(1):47~49
- 19 何新,陈清轩.用原位杂交法定位猪乳铁蛋白基因于染色体 2q12.生物工程学报,1998,14(1):96~100
- 20 Matra A,Zhang ZY.Expression of human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial proteins[J].Plant Physiol.,1994 (106):977~981
- 21 曹阳,高华颖,等.人乳铁蛋白基因克隆及细胞表达研究.遗传,2002,24(1):9~14
- 22 李树芹,章立群,孙雪梅,等.人乳铁蛋白在原核中的融合表达.中国乳品工业,2002,30(3):3~5
- 23 齐莉莉,许梓荣.乳铁蛋白及其生物学功能.中国饲料,2002(10):29~31

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

· 光盘推荐 ·

品 名	定价(元)	品 名	定价(元)	品 名	定价(元)
中国牧业企事业单位名录	100	肉鸡饲养管理与屠宰	25	海狸鼠养殖技术	25
畜牧业经济与规模化养殖场经营管理	125	养鸡生产	125	麝鼠 果子狸养殖技术	25
高致病性禽流感预防与控制	25	鸡的饲养	50	兰狐养殖	25
家畜生理学	325	雏鸡和蛋鸡的饲养与管理	25	养鹿	25
兽医微生物学	250	农村养鸡	25	中国对虾的养殖	25
兽医药理学	200	良种肉鸭大棚饲养技术	25	罗氏沼虾 大口鲈鱼的养殖	25
兽医学	375	鸭鹅养殖技术	25	海参人工养殖秘诀	25
瘦肉型猪的繁殖与饲养	25	鸭病防治	25	珍珠的养殖	25
猪的养殖	75	养鹅 蛋鸭的放牧饲养管理	25	河蟹的养殖	50
猪病防治	50	四季鹅的养殖技术	25	实用养鳖新技术	25
养牛技术	75	獭兔	50	塑料大棚控温快速养鳖	25
人工培育天然牛黄	25	兔病防治	25	甲鱼	25
高产奶牛饲养技术	25	家兔的饲养与管理	25	海产养殖致富经	25
肉牛养殖技术	50	家兔繁殖与兔病防治	25	稻田养鱼 河蚌育珠	25
奶牛繁育技术南方梅花鹿养殖	25	养蝎技术	75	黄鳝鳊鱼福寿螺养殖技术	25
养牛养羊学	125	养蛇技术	50	鲍鱼人工养殖秘诀	25
奶牛的饲养管理	50	毒蛇饲养技术	25	流水养鲟	25
牛羊育肥技术	25	鹌鹑及蜗牛的养殖	25	药用虫养殖技术	25
波杂羊繁育饲养技术中华土元养殖技术	25	蜗牛的室内养殖	25	观赏昆虫	25
绵羊山羊养殖技术	50	蜗牛 蚯蚓饲养	25	怎样办好一个养鸽场	25
高腿小尾寒羊饲养秘传	25	肉鸽的饲养	25	怎样办好一个养牛场	25
高效养羊技术	25	肉用犬养殖新技术	25	怎样办好一个养羊场	25
肉羊饲养及胴体分割羊的品种及放牧	25	特种鸡养殖	25	怎样办好一个养兔场	25
怎样养火鸡	25	七彩山鸡 鹧鸪人工养殖技术	25	怎样办好一个养鸭场	25
简易人工孵化技术及红外线养鸡新技术	50	土元 蚂蚁养殖技术	25	怎样办好一个养鹅场	25

邮局汇款地址:110036沈阳市金沙江街 16 号 6 门(本社发行部收)

联系电话:(024)86391237

银行汇款单位:辽宁省农牧业机械研究所有限公司 开户行:中信银行沈阳分行皇姑支行 帐号:72214101826000548-49

无公害添加剂组合对猪生产性能的影响

周伏忠 张秀江 刘德海 安明理 徐文彦

摘要 实验应用几种无公害饲料添加剂组合进行商品猪饲养,结果发现,在提高维生素等营养水平基础上,无公害饲料添加剂能有效保障商品猪的健康及生产性能。实验筛选出不含抗生素的预混料配方应用实验表明:猪平均日增重比对照组提高 11.26%,料肉比和腹泻率比对照组分别下降 7.56%和 36.95%;而且应用无公害饲料添加剂的育成猪组与抗生素组相比,其生产性能有提高的趋势。

关键词 无公害饲料添加剂;猪;抗生素;生产性能

中图分类号 S816.7

近几年来,人们相继研究出微生态制剂、饲料用酶、酸制剂、低聚寡糖、天然植物提取物(糖萜素、大蒜素、牛至油、大豆黄酮)等抗生素替代品,这些抗生素替代品在畜禽养殖生产中应用后获得了良好的效益。在此基础上,本实验对几种无公害饲料添加剂组合进行了一些动物实验研究,拟开发无抗生素的商品猪专用预混料配方,取得了较为理想的效果。

1 材料和制备

1.1 无公害饲料添加剂

微生态制剂(益生菌)由山东宝来利来生物技术有限公司生产,主要成分为酵母菌、芽孢杆菌、乳酸杆菌等益生菌(6×10^{10} 个/g);糖萜素由宁波联合生物技术有限公司生产,主要成分是糖类($\geq 30\%$)和三萜皂甙($\geq 30\%$);植酸酶由北京挑战饲料科技集团生产,酶活为 2 500U;饲料复合酶和酸制剂由河南省科学院生物研究所自主研发,复合酶主要酶种为纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶、 β -葡聚糖酶、糖化酶、蛋白酶等。

1.2 预混料配方设计

试验采用双因子设计,分为 4 个组合。试验一、二组添加剂配方为:第一阶段(15~60kg)0.06%益生菌+1 500mg/kg 酸化剂+500mg/kg 糖萜素;第二阶段(60~90kg)0.05%益生菌+300mg/kg 糖萜素。试验三、四组添加剂配方为:第一阶段(15~60kg)0.06%益生菌+1 500mg/kg 酸化剂+500mg/kg 糖萜素+800mg/kg 复合酶+500U/kg 植酸酶;第二阶段(60~90kg)0.05%益生菌+300mg/kg 糖萜素+800mg/kg 复合酶+500U/kg 植酸酶。营养性添加剂水平见表 1。对照组饲喂商品型预

混料,为国内某名牌厂家生产的产品;药物添加剂为金霉素。

表 1 试验 1~4 组两阶段维生素、微量元素水平

项目	试验一、三组		试验二、四组	
	15~60kg	60~90kg	15~60kg	60~90kg
铜(mg/kg)	180	30	180	30
铁(mg/kg)	80	30	80	30
锰(mg/kg)	10	8	10	8
锌(mg/kg)	80	30	80	30
碘(mg/kg)	0.15	0.15	0.15	0.15
硒(mg/kg)	0.30	0.30	0.30	0.30
维生素 A(IU)	3 000	3 000	10 000	6 000
维生素 D ₃ (IU)	400	300	1 000	800
维生素 E(IU)	10	10	25	20
维生素 K ₃ (mg/kg)	1.5	1.5	1	1
维生素 B ₁ (mg/kg)	1.2	1.2	2.5	2
维生素 B ₂ (mg/kg)	2.0	1.8	4	3
维生素 B ₆ (mg/kg)	1.5	1.5	5	4
维生素 B ₁₂ (μ g/kg)	10	10	30	20
烟酸(mg/kg)	15	10	35	25
叶酸(mg/kg)	0.6	0.6	0.5	0.3
泛酸(mg/kg)	8	8	15	13
维生素 H(mg/kg)	0.05	0.05	0.15	0.10
维生素 C(mg/kg)	55	40	110	55
胆碱(g/kg)	0.30	0.30	0.50	0.50

1.3 试验动物、日粮和营养水平

试验选用断奶后体重为 15kg 左右的三元杂交(杜×长×白)仔猪 120 头,随机分成 5 组(各组间平均始重差异不显著, $P>0.05$);每组设 3 个重复(栏),每重复 8 头猪,公母各半。各试验组的基础日粮所用原料除自配预混料(1%)有所不同外,其它原料及营养成分完全相同(见表 2)。

2 试验方法和步骤

2.1 饲养管理

试验前设 15d 预试期,预试期结束时称体重进行分组,试验期间天气晴朗,日平均气温(20 ± 6)℃,水泥地面平养,常规免疫程序接种、驱虫、去势,自由采食和饮水,试验期 90d。

周伏忠,河南省科学院生物研究所,副研究员,450008,郑州市花园路 28 号。

张秀江、刘德海、安明理,单位及通讯地址同第一作者。

徐文彦,郑州牧业工程高等专科学校。

收稿日期:2006-03-06

表2 基础日粮组成及营养水平

项目	15~60kg	60~90kg
玉米(%)	74	75.34
麸皮(%)	1.5	5
鱼粉(%)	3.8	0
豆粕(%)	15	14.7
棉粕(%)	3	2.2
磷酸氢钙(%)	0.53	0.24
石粉(%)	0.98	1.2
食盐(%)	0.19	0.3
赖氨酸盐酸盐(%)	0	0.02
预混料(%)	1.0	1.0
营养水平		
消化能(MJ/kg)	13.40	13.30
粗蛋白(%)	16.4	14.2
钙(%)	0.66	0.52
磷(%)	0.54	0.40
赖氨酸(%)	0.80	0.63
氨基酸+胱氨酸(%)	0.55	0.47

2.2 记录猪体重及饲料消耗

试验开始当天、45d、试验结束时以重复组为单位对全群进行个体空腹称重,称重时先称各试验组的重复1组,再称各试验组的重复2组、3组,直至称完。饲料消耗计算每7d进行一次,如有死亡或淘汰,及时称重和结算饲料,以便试验结束时将死亡或淘汰猪的饲料消耗剔除。

2.3 计算腹泻率

试验期间详细记录各试验组腹泻发生情况,试验结束时计算腹泻率。

腹泻率(%)=[试验期内腹泻头数/(试验天数×试验头数)]×100%。

3 结果与分析

3.1 生产性能(见表3)

表3 生产性能统计

项目	对照组	试验1组	试验2组	试验3组	试验4组
始重(kg)	15.32	15.41	15.18	15.65	15.44
末重(kg)	83.56	88.12	89.58	89.34	91.36
15~60kg 阶段					
平均日增重(g)	685.26	698.52	712.54	708.25	725.73
平均日采食量(g)	1 877.61	1 892.99	1 866.86	1 883.95	1 843.35
料重比	2.74	2.71	2.62	2.66	2.54
腹泻率(%)	5.32	4.61	3.22	3.56	3.24
60~90kg 阶段					
平均日增重(g)	802.21	875.47	895.32	890.56	911.85
平均日采食量(g)	2 526.96	2 722.71	2 632.24	2 636.06	2 689.96
料重比	3.15	3.11	2.94	2.96	2.95
腹泻率(%)	2.80	2.73	2.51	2.42	1.88
15~90kg					
平均日增重(g)	758.22	807.89	826.67	818.78	843.56
平均日采食量(g)	2 202.29	2 307.85	2 249.55	2 260.01	2 266.66
料重比	2.91	2.86	2.72	2.76	2.69
腹泻率(%)	4.06	3.67	2.87	2.99	2.56

整个试验期间,各组平均日采食量基本相同,但试验2、3、4组的平均日增重明显高于对照组和试验1组($P<0.05$);试验2、3、4组料肉比和腹泻率明显低于对照组及试验1组($P<0.05$);特别是试验4组,与对照组相比,平均日增重提高11.26%,料肉比下降7.56%,腹泻率下降36.95%。

3.2 饲料成本分析(见表4)

表4 各组试验的饲料成本分析

项目	头数	试验时间 (d)	饲料成本 (元/kg)	增重成本 (元/kg)	成本比较 (%)
对照组	24	90	1.546	4.50	100
试验1组	24	90	1.556	4.45	98.9
试验2组	24	90	1.612	4.39	97.6
试验3组	24	90	1.558	4.30	95.6
试验4组	24	90	1.628	4.38	97.3

由表4可以看出,从每千克增重来衡量,试验1~4组较对照组节省费用分别为0.05元、0.11元、0.20元、0.12元,饲料成本分别降低1.1%、2.4%、4.4%、2.7%,其中以试验3组经济效益最好。由于试验组中益生菌、复合酶和酸化剂的添加,提高了营养物质的消化利用率,可以适当的提高大宗廉价原料的用量,所以饲料成本不但没有提高,反而有所降低。

4 讨论与结论

长期以来,抗生素在饲料中的使用得到了广大饲料、养殖企业的普遍认可,抗生素对增进动物健康、提高集约化养殖的效益的确起到了重要作用。但是,随着抗生素的大量使用甚至滥用,人们发现抗生素的负面作用越来越多,如引起内源性感染、产生耐药性、破坏肠道正常菌群以及在畜产品和环境中残留等,给人类健康造成严重威胁。我国加入WTO后,畜禽产品的出口要求和出口量逐年增加,但进口国设置的高科技壁垒和苛刻的附加性限制条款,制约着我国畜禽产品的出口,其中最主要的就是抗生素残留、超标问题。因此,我们必须逐步放弃对饲用抗生素类药物添加剂的依赖。另外,随着人们对绿色食品的迫切需要、饲料原料资源的短缺和人们对环境保护意识的增强,研制开发无抗生素又具有环保优势的无公害饲料添加剂的呼声越来越高,绿色、高效饲料添加剂的需求量将逐年增加。本研究顺应时代发展的要求,对商品肉猪生产中应用无公害添加剂组合及其预混料进行了初步探索,并取得一些具有一定推广应用价值的试验结果。研究表明,在适当提高维生素等营养物质水平基础上,使用无公害添加剂预混料,能有效保证猪生产性能的发挥;使用无公害饲料添加剂的猪的生产

甘露寡糖的生物学功能及在畜牧业中的应用

孔 涛 朱连勤 曲韵笙

摘 要 甘露寡糖是一种新型饲料添加剂,在动物体内起着抑制肠道病原菌繁殖及免疫促进剂的作用。大量研究表明,甘露寡糖在提高家禽及幼龄动物日增重及饲料转化率、降低死亡率、增强动物免疫力等方面有明显作用,并能在较大程度上取代抗生素。

关键词 甘露寡糖;生物学功能;饲料添加剂

中图分类号 S816.7

近年来不少研究表明,甘露寡糖(Mannose oligosaccharide, MOS)不但可以促进有益菌增殖,还能吸附病原菌,改善肠道微生态,提高机体免疫力^[1,2]。同时,甘露寡糖克服了以往抗生素、益生菌、酸化剂等不足,用量少、纯天然、无残留且稳定性强。在饲料中添加少量 MOS 就能改变动物消化道微生物菌群,提高动物日增重、饲料转化率、机体抗病能力,在动物营养上有良好的应用前景。

1 来源及理化性质

MOS 是由几个甘露糖分子或甘露糖与葡萄糖通过 α -1,2、 α -1,3、 α -1,6 糖苷键组成的寡聚糖^[3]。商品用甘露寡糖主要通过酶作用于微生物细胞壁、瓜胶、魔芋粉、田菁胶等进行生产。其理化性质很大程度上取决于它的化学组成,一般在生理 pH 值和通常饲料加工条件下较为稳定,易溶于水和其它极性溶剂;当溶液中加入有机溶剂时会使其沉淀或结晶;甜度低于蔗

糖。

2 代谢特点

MOS 不被单胃动物消化道酶分解。MOS 及其它功能性寡糖与很多饲料纤维类似,含有大量不能为消化道酶打断的化学键,在小肠几乎不被消化利用,而进入消化道后段被浓缩,并为动物消化道后段菌群选择性发酵利用^[4],以有机酸、 CH_4 、 CO_2 、 H_2 的形式释放或参与代谢,提供能量。

3 生物学功能

3.1 优化肠道微生态系统

动物分泌的消化酶如淀粉酶只消化 α -1,4 糖苷键,对于其它的键几乎不起作用。甘露寡糖由于含有极少量 α -1,4 糖苷键,不被动物本身利用,只被有益菌如乳酸杆菌、双歧杆菌、梭状芽孢杆菌等选择性地利用。甘露寡糖消化分解后,肠道丙酸、丁酸等挥发性脂肪酸明显增加^[5],降低了肠道内的 pH 值,抑制了对酸度敏感的大肠杆菌、沙门氏菌等有害菌的生长^[6,7],促进了双歧杆菌等有益菌的生长^[8]。体外试验表明,乳酸杆菌、双歧杆菌等代谢产生的高分子产物——细菌素类物质对病原菌有抑制作用,可抑制革兰氏阳性和阴性病原菌的生长。此外,乳酸杆菌等有益菌对病原微生物有屏障作用,在肠道中通过磷壁酸与肠粘膜上

孔涛,莱阳农学院动物科技学院临床兽医专业,266109,山东省青岛市城阳区春阳路。

朱连勤(通讯作者),莱阳农学院科技处。

曲韵笙,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-02-13

性能不但没有降低,而且猪日增重、料肉比、腹泻率均有更好的改善趋势;使用无公害饲料添加剂使单位增重饲料成本降低了 1.1%~4.4%。添加植酸酶与复合酶后,明显提高了植酸磷等养分的利用率,减少了猪粪磷对环境的污染(数据未列出)。因此,用以微生态制剂、糖萜素、复合酶、酸化剂、植酸酶等为基础的无公害添加剂组合及其预混料完全可以代替商品肉猪生产中的常规预混料(含有抗生素、抗菌药物等生长促进剂)的使用,可以预测,无公害饲料添加剂的应用将越来越广泛。

参考文献

- 1 李焕友,叶文标. 小猪环保型饲料添加剂预混料的应用研究[J]. 饲料广角,2002(21):32~34
- 2 零汉益. 无抗生素的仔猪断奶料研究 [J]. 饲料工业,1999,20(11):14~16
- 3 张金枝,吴晓琴. 竹叶黄酮对断奶仔猪生产性能的影响[J]. 中国畜牧杂志,2000(2):38~39
- 4 李雅林,牛钟相,何元龙. 微生态制剂的研究进展[J]. 广西畜牧兽医,2003,39(1):25~26
- 5 董志岩,方桂友,张玉宏. 饲料中添加不同维生素浓度对断奶仔猪生产性能、免疫及血液生化指标的影响[J]. 饲料博览,2003(12):1~3

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

皮细胞的相互作用密切结合,与其它厌氧菌一起共同占据肠粘膜表面,形成生物学屏障,阻止致病菌、条件致病菌的定植和入侵,使其被竞争性地排出体外^[9]。

3.2 对病原微生物的识别、粘附和排除作用

饲料中添加小剂量的 MOS 就可与肠粘膜上皮细胞中所含甘露糖的受体竞争病原微生物甘露糖特异性凝集素的结合位点, MOS 与病原菌凝集素结合后使病原菌凝集素与肠粘膜上皮细胞相应受体结合的位点饱和,阻碍了病原菌的粘膜黏附;又由于 MOS 有非消化性,这种复合物就可顺利通过胃肠道被排出体外,这也可能是 MOS 和病原菌结合后,病原菌无法利用其提供的营养而饥饿死亡。还有研究发现^[9],加入甲基 α -D-甘露糖苷,可使已黏附在粘膜细胞上的大肠杆菌部分解离,这可能是由于甘露糖可以结合到菌毛的亲水基团上,进一步增加菌毛亲水性,促使其脱落。

3.3 免疫调节作用

甘露寡糖具有一定的免疫原性,能够刺激机体免疫应答,而且能与某些毒素、病毒和真菌细胞的表面结合而作为这些外源抗原的佐剂,减缓抗原的吸收,增加抗原的效价,从而增强动物体的细胞和体液免疫反应。据报道,甘露寡糖和 β -葡聚糖均能加快仔猪被抑制的免疫系统的恢复,并能有效减少死亡率和降低腹泻率^[10]。叶成远^[11]指出,酵母细胞壁具有很强的抗原激活特性,此特性正是甘露寡糖在动物体内生理功能的体现之一。此外,由于源自微生物的特殊多糖在加入疫苗时还具有佐剂作用,因而添加适量甘露寡糖可提高抗体反应能力,从而加强疫苗的保护功能。甘露寡糖除具有佐剂和抗原特性外,还能刺激肝脏分泌甘露糖结合蛋白,从而影响免疫系统。

3.4 吸附霉菌毒素

甘露寡糖可通过物理吸附或直接结合霉菌毒素来消除毒素对机体的有害影响。研究发现,甘露寡糖可结合玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素^[12]。Raju^[13]模拟肉鸡消化道体外试验表明,甘露寡糖对黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素的结合率分别为 82.5%、51.6%和 26.4%,对黄曲霉毒素的结合能力取决于 pH 值、毒素浓度及所用甘露寡糖的剂量。

4 甘露寡糖在畜牧业中的应用

4.1 甘露寡糖在养猪业中的应用

4.1.1 提高生产性能,降低腹泻率

黄小红^[14]、岳文斌等^[15]、周红丽^[16]、邹志恒^[17]、Davis^[18]和 Dvorak^[19]试验证明,在断奶仔猪日粮中添加甘露寡糖可显著提高仔猪日增重、饲料转化率,降低腹泻率。

4.1.2 改善仔猪肠道菌群

周红丽等^[20]试验证明,不同 Bio-Mos(一种商品用甘露寡糖)添加量都能极显著抑制结肠、盲肠和直肠中大肠杆菌的增殖。岳文斌等^[15]研究表明,甘露寡糖可显著降低仔猪盲肠和结肠中大肠杆菌数,提高盲肠中乳酸杆菌和双歧杆菌数,但对结肠中乳酸杆菌与双歧杆菌的影响不显著。杨林等^[21]报道,甘露寡糖能显著抑制仔猪肠道内需氧菌中大肠埃希菌、猪葡萄球菌的繁殖,明显增进仔猪肠道内厌氧菌的繁殖,显著提高厌氧菌数与需氧菌数的比值,明显改善仔猪肠道的微生态平衡。

4.1.3 提高仔猪免疫力

岳文斌等^[15]试验表明, MOS 可极显著提高血液 T 淋巴细胞数和 IgG 含量。邵良平等^[22]试验证明,甘露寡糖能显著提高哺乳仔猪血清 IgA ($P<0.01$)、IgG ($P<0.05$) 的水平,但对 IgM 的含量没有明显影响 ($P>0.05$)。Spring 等研究表明,甘露寡糖能显著提高无菌仔猪血清 IgA、IgG 及 IgM 的含量;但对普通仔猪研究结果认为,甘露寡糖可显著提高血清 IgA 水平,而对 IgG、IgM 没有明显影响。宋琼莉等^[23]研究表明,未注射疫苗时,添加适宜的寡聚糖能在一定程度上提高仔猪血清中 IgG 水平,但差异不显著 ($P>0.05$);注射疫苗后,日粮中添加适宜的寡聚糖与对照组相比能显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$) 提高仔猪血清中 IgG 水平,这在一定程度上说明寡聚糖具有免疫增强剂的功效。White 等^[24]发现,添加主要含甘露寡糖酵母的寡聚糖可使猪血清 IgG、IgA 水平上升(前者 $P<0.01$;后者 $P<0.1$)。周红丽等^[20]试验表明,添加甘露寡糖能显著提高血清 IgG 的含量,对 IgA、IgM 含量的影响不显著。

4.1.4 提高 GSH-Px(还原型谷胱甘肽)、SOD(超氧化物歧化酶)活性

岳文斌等^[15]、邵良平等^[25]观察到甘露寡糖可提高仔猪 SOD 和 GSH-PX 的活性。

4.2 甘露寡糖在养禽业中的应用

4.2.1 提高生产性能

高树冬等^[26]研究表明,日粮中添加甘露寡糖可显著提高肉鸭日增重。Sims^[27]报道, MOS 有提高火鸡生产性能的作用。Hooge 等^[28]试验表明,甘露寡糖可显著提高肉仔鸡生产性能。

4.2.2 改善肠道内环境

邵良平^[29,30]、于桂阳^[31]、周映华^[32]、Gills^[33]研究表明,日粮中添加甘露寡糖显著促进乳酸菌、双歧杆菌增殖,抑制大肠杆菌的生长。邵良平^[29,30]研究认为,日粮

中添加甘露寡糖,肠内容物 pH 值显著降低。Sims 等^[27]报道,MOS 可显著降低火鸡大肠产气荚膜梭菌数。

4.2.3 提高免疫力

邵良平等^[29,30]研究表明,日粮中添加甘露寡糖能显著提高鸡的细胞免疫功能、白细胞吞噬能力和 PHA 淋巴细胞转化率。李广等^[34]研究表明,MOS 有明显增加免疫器官重量的作用。周映华等^[32]研究表明,添加 Bio-Mos 极显著提高了血液中 T 淋巴细胞百分率。研究发现,甘露寡糖能使肉鸡胆汁中 IgA 水平提高 14.2%^[35],显著提高火鸡肠粘膜中 IgA、IgG、IgM 的水平,提高肉种鸡抗传染性法氏囊病毒抗体水平^[36-38]。

4.2.4 降低鸡蛋中胆固醇含量

Stanley 等^[39]报道,添加甘露寡糖实验组与对照组相比,鸡蛋中胆固醇含量降低。

4.3 甘露寡糖在养牛业中的应用

4.3.1 调节免疫力

王定发等^[40]对犊牛试验前后血液 IgG、IgA 进行检测发现,MOS 显著提高了血液 IgA、IgG 水平。Franklin 等^[41]研究表明,饲喂 MOS 提高了干奶期母牛对轮状病毒的特异性免疫反应。

4.3.2 提高犊牛の日增重,降低发病率

Newman 等^[42]、Dildey 等^[43]报道,甘露寡糖能显著提高犊牛日增重,降低发病率。王定发等^[40]研究表明,给犊牛饲喂 MOS,牛增重和经济效益显著提高。

5 对甘露寡糖作用效果的影响因素

5.1 甘露寡糖的纯度、聚合度和生理活性

由于单糖连接方式多种多样,因而寡糖结构非常复杂,不同种类甘露寡糖具有不同纯度与聚合度;同种类不同厂家、不同批次间的甘露寡糖产品结构可能不同,甘露寡糖生物学活性和作用效果存在不同程度差异。

5.2 甘露寡糖的添加量与添加方式

日粮中甘露寡糖量的添加须适当,添加量不足达不到预期的添加效果;添加过量导致动物腹泻。另外,不同给予方式会导致效果的差异。

5.3 饲养管理水平

石宝明等^[44]报道,良好饲养管理条件下,日粮添加甘露寡糖效果不明显,只有当生产性能的降低受肠道因素影响较大时,甘露寡糖才能表现出显著的促生长作用。

5.4 动物的年龄与健康状况

动物的年龄与健康状况是影响甘露寡糖使用效果的直接因素。动物年龄和生长发育阶段不同,消化

道菌群有很大变化。断奶后大肠杆菌等致病菌浓度上升是导致仔猪腹泻的主要原因之一,因此,在该阶段添加寡糖效果可能更为明显。

5.5 日粮的类型

玉米中非消化糖类含量很低,但大麦、小麦、大豆产品中非消化糖类含量很高,如棉籽糖和水苏糖等。因此,大麦、小麦、大豆产品中寡糖的“掩盖或稀释效应”会对试验结果产生影响。

5.6 甘露寡糖与抗生素、其它类型寡糖的联合使用

研究表明,甘露寡糖与抗生素、其它类型寡糖联合使用效果比单独使用好。

6 展望

动物胃肠道疾病是影响幼龄动物体况的重要因素,也是导致初生动物死亡的重要因素之一。甘露寡糖在动物体内的应用研究表明,它可通过与胃肠道病原菌竞争肠上皮的附着点及提高动物免疫力而达到影响动物健康和生产性能的效果,并能在一定程度上起到替代抗生素的作用。甘露寡糖为饲料中的天然成分,不会带来污染,并能提高动物机体的抗病能力,在动物营养上有良好的应用前景。但甘露寡糖在动物营养上的作用机理还不清楚,因此,应加强甘露寡糖组分、结构与功能的关系,影响机体功能的直接或间接途径,作用在动物种类、年龄、生理状况不同时的特异性等方面的研究。

参考文献

- 1 Bland E J, Keshavarz T, Bucke C. The influence of small oligosaccharides on the immune system [J]. Carbohydrate research, 2004, 339 (10): 1 673~1 678
- 2 Grieshop C M, Flickinger E A, Bruce K J, et al. Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan - oligosaccharides [J]. Archives of animal nutrition, 2004, 58(6): 483~493
- 3 毛胜勇.甘露寡聚糖在动物生产中的应用研究[J].饲料研究,2000 (9):10~13
- 4 潘淑媛,陈必芳,张日俊,等.微生态效应添加剂甘露寡糖应用研究[J].中国饲料,1999(22):15~17
- 5 Zduńczyk Z, Juskiewicz J, Jankowski J, et al. Performance and caecal adaptation of turkeys to diets without or with antibiotic and with different levels of mannan-oligosaccharide [J]. Archives of animal nutrition, 2004, 58(5): 367~378
- 6 Zdunczyk Z, Juskiewicz J, Jankowski J, et al. Metabolic response of the gastrointestinal tract of turkeys to diets with different levels of mannan-oligosaccharide [J]. Poultry science, 2005, 84 (6): 903~909
- 7 Spring P, Wenk C, Dawson K A, et al. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks

- [J]. Poultry science, 2000, 79 (2): 205~211
- 8 Grieshop C M, Flickinger E A, Bruce K J, et al. Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan-oligosaccharides [J]. Archives of animal nutrition, 2004, 58(6): 483~493
 - 9 张红梅,甄二英,姜会民. 化学益生菌甘露寡聚糖在动物营养中的应用研究进展[J]. 饲料广角, 2003(9): 15~18
 - 10 陈文斌,艾薇. 甘露寡糖应用研究进展[J]. 中国饲料, 2004(4): 28~30
 - 11 叶成远. 寡糖饲料添加剂[J]. 畜禽业, 1999(10): 12~13
 - 12 Zaghini A, Martelli G, Roncada P, et al. Mannan-oligosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxins B1 and M1 residues in eggs, and aflatoxin B1 levels in liver [J]. Poultry science, 2005, 84(6): 825~832
 - 13 Raju A G. Effect of mannan-oligosaccharide supplementation on the taxonomy in the crop Food chemistry semtemper 80-81 [J]. Poultry Sci., 1998, 50(1): 61
 - 14 黄小红,林藩平. 甘露聚糖-寡糖对断奶仔猪腹泻的防制[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(增刊): 163~165
 - 15 岳文斌,车向荣,臧建军. 甘露寡糖对断奶仔猪肠道主要菌群和免疫功能的影响[J]. 山西农业大学学报, 2002, 22(2): 97~100
 - 16 周红丽,张石蕊. 甘露寡糖对断奶仔猪生长性能和肠道菌群的影响[J]. 饲料研究, 2002(8): 4~6
 - 17 邹志恒,宋琼莉,文虹,等. 果寡糖+甘露寡糖对仔猪生长性能的影响[J]. 江西农业学报, 2004, 16(2): 60~63
 - 18 Davis M E, Maxwell C V, Brown D C. Effect of dietary mannan oligosaccharides and (or) pharmacological additions of copper sulfate on growth performance and immunocompetence of weanling and growing/finishing pigs [J]. Journal of Animal Science, 2002, 80(11): 2 887~2 893
 - 19 Dvorak R A. Effects of Bio-Mos, FOS and Carbadox on performance of pigs Days 0~21 postweaning [J]. Anim. Sci., 1998
 - 20 周红丽,张石蕊,贺建华. 甘露寡糖对断奶仔猪肠道菌群和抗体水平及生长性能的影响 [J]. 湖南农业大学学报, 2002, 28(2): 135~139
 - 21 杨林,霍贵成,杨丽杰,等. 微生态制剂对仔猪肠道非特异性免疫功能的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2004(7): 13~15
 - 22 邵良平,周伦江,李国平,等. 口服甘露寡糖(MOS)对哺乳仔猪免疫功能 and 血液 GSH-Px、SOD 的影响[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(3): 257~260
 - 23 宋琼莉,邹志恒,文虹,等. 果寡糖与甘露寡糖替代抗生素对仔猪 IgG 水平的影响[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2004(6): 24~25
 - 24 White L A, Newman M C, Cromwell, et al. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs [J]. Journal of Animal Science, 2002, 80 (10): 2 619~2 628
 - 25 邵良平,周伦江,费政芳,等. 甘露寡糖对仔猪免疫功能和血液抗氧化酶的影响[J]. 营养学报, 2000, 22(1): 82~84
 - 26 高树冬,马健,纪明山,等. 小麦型日粮添加和美酵素及麦质素酶对肉鸡生产性能影响的调查与研究[J]. 饲料广角, 2003(4): 33~35
 - 27 Sims M D, Dawson K A, Newman K E, et al. Effects of dietary mannan oligosaccharide, bacitracin methylene disalicylate, or both on the live performance and intestinal microbiology of turkeys [J]. Poultry science, 2004, 83 (7): 1 148~1 154
 - 28 Hooze D M, Sims M D, Sefton A E, et al. Effect of Dietary Mannan Oligosaccharide, With or Without Bacitracin or Virginiamycin, on Live Performance of Broiler Chickens at Relatively High Stocking Density on New Litter [J]. Journal of Applied Poultry Research, 2003, 12(4): 461~467
 - 29 邵良平,周伦江,李国平,等. 不同剂量甘露寡聚糖对鸡细胞免疫和肠道微生态的影响[J]. 福建农业大学学报, 1999, 28(1): 86~89
 - 30 邵良平,周伦江,李国平,等. 甘露寡糖和粪链球菌对鸡细胞免疫和肠道微生态的调节作用[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(1): 58~61
 - 31 于桂阳,张昊,郑春芳. 甘露寡糖对肉鸡肠道微生物的影响. 兽药与饲料添加剂, 2004, 9(5): 7~9
 - 32 周映华,张石蕊. 甘露寡糖对肉鸡生产性能和肠道微生物以及免疫功能的影响[J]. 湖南农业大学学报, 2003, 29(3): 250~253
 - 33 Gills B V. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to Salmonella Enteritidis colonization [J]. Avian Pathology, 2002, 31 (1): 49
 - 34 李广,付明哲,刘璐. α -甘露低聚糖对雏鸡免疫器官发育的影响. 甘肃农业大学学报, 2001, 36(4): 383~387
 - 35 Savage T F, Zakrzewska E I, Andreasin J R. Effect of MOS (Bio-Mos) added to poultry starter in performance and health [J]. Poultry Sci., 1996a, 70 (1): 139
 - 36 Savage T F, Zakrzewska E I, Andreasin J R. The effect of feeding mannan oligosaccharide on immunoglobulins, plasmas IgG and bile IgA of worldstad MW male Turkeys [J]. Poult. Sci., 1996b, 76(1): 139
 - 37 Cetin N, Güçlü B K, Cetin E. The effects of probiotic and mannanoligosaccharide on some haematological and immunological parameters in turkeys [J]. Journal of veterinary medicine, 2005, 52(6): 263~267
 - 38 Shashidhara R G, Devegowda G. Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity [J]. Poultry Science, 2003, 82 (8): 1 319~1 326
 - 39 Stanley V G, Grayand C, Chukwu H. Effects of mannano-ligosaccharide (Bio-Mos) on liver and egg cholesterol and tissue protein concentration in chickens [J]. Poultry Sci., 1996, 75(1): 61
 - 40 王定发,王春芳,刘晓华. 甘露寡糖饲喂犊牛的重复试验[J]. 粮食与饲料工业, 2004(9): 34~35
 - 41 Franklin S T, Newman M C, Newman K E, et al. Immune parameters of dry cows fed mannan oligosaccharide and subsequent transfer of immunity to calves [J]. Journal of dairy science, 2005, 88 (2): 766~775
 - 42 Newman K E, Sping P, Snitcer S. Effect of theimal treatment on the ability of mannanoligosaccharide to adsorb enteric bacteria [J]. Anim. Sci., 1995, 73 (1): 325
 - 43 Dilley D, Selars K. Effect of mannan-oligosaccharide supplementation on performance and health of Holstein calves [J]. Dairy Sci., 1997, 80(1): 9
 - 44 石宝明, 单安山. 寡聚糖及其在猪饲料中的应用 [J]. 养猪, 2000 (1): 2~6

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

亚硝酸诱变选育黄霉素高产菌的研究

王 惠 童应凯 吴兆亮 胡金刚

摘 要 采用亚硝酸诱变方法对黄霉素产生菌进行诱变处理,利用菌株抗自身代谢物的特征,在添加高浓度黄霉素的分离培养基上选育获得优良高产突变株 sg2-N₂-2,比发酵菌株的发酵单位提高了 7.2 倍,而且变株的菌落形态与亲本菌株差异较大。

关键词 黄霉素;亚硝酸诱变;菌种选育

中图分类号 Q815

Research on screening of high yielding flavomycin strain by mitrous acid mutation

Wang Hui, Tong Yingkai, Wu Zhaoliang, Hu Jin'gang

Abstract This essay is concerned about screening for flavomycin producing strain by mitrous acid mutation method, which is resistant to the material produced by itself, on the isolation medium plus high concentration flavomycin after inducing mutatioan. As a results, mutant strain sg2-N₂-2 was obtained, its biological titer was increased by 7.2-fold. And the colony of the mutant is different from the parent strain.

Key words flavomycin; mitrous acid mutation; strain screening

黄霉素 (Flavomycin) 又名默诺霉素 (Moeno-mycin)、黄磷酯素 (Flavophospholipl)、斑伯霉素 (Bambermycin), 是德国赫斯特公司在 20 世纪 70 年代初期开发的一种新型抗生素类促生长剂。黄霉素至少由 4 个微生物活性物质组成, 即默诺霉素 A、B₁、B₂ 和 C, 其中默诺霉素 A 为主要成分, 它是由 Lindner 等人于 1955 年从灰绿链霉素菌 *S. banbergiensis* (斑伯氏链丝菌) 的发酵产物中分离的磷酸多糖类抗生素。此种抗生素通过真菌的厌氧发酵形成, 存在于菌丝体中, 可通过提取分离。对纯化后的抗生素进行理化分析表明, 它是一种含磷的糖酯, 不同于现有的任何一种抗生素。

黄霉素具有较强杀菌作用, 无抗原性和毒副作用, 稳定性好, 与其它添加剂不发生反应, 不与其它常用抗生素产生交叉抗性, 用量少, 促生长效果显著, 对 R 因子耐药菌有强烈抑制作用, 特别是越来越多的畜禽需要能对 R 质体耐药菌起特别消除作用的药物。生态环境日益被人类所重视, 不被动、植物体吸收和残留, 不污染土壤, 不危害生态环境的黄霉素的应用前

景十分广阔。黄霉素在国外畜牧及水产养殖业中已得到普遍应用, 而在我国应用刚刚起步就显示了十分广阔的应用前景。目前国内有关黄霉素的报道主要集中在使其作为饲料添加剂方面, 关于黄霉素自身的诱变育种等方面的研究则较少。本研究将对黄霉素菌种诱变育种的初步结果予以报道。

1 材料和方法

1.1 菌种

1.1.1 出发菌株

加纳链霉素 (*Streptomyces ghanaensis*) DMS40746, 来自德国国家菌种保藏中心。

1.1.2 生物鉴定菌

金黄色葡萄球菌 26003。

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 斜面及平板分离培养基

可溶性淀粉 20g/l、KNO₃ 2g/l、MgSO₄·7H₂O 0.5g/l、Fe₂(SO₄)₃ 0.01g/l、K₂HPO₄ 0.5g/l、NaCl 0.5g/l、琼脂 20g/l、pH 值 7.2~7.4。

1.2.2 发酵培养基

豆饼粉 37.5g/l、玉米粉 15g/l、葡萄糖 10g/l、淀粉 37.5g/l、(NH₄)₂SO₄ 2.5g/l、MgSO₄ 0.15g/l、CaCO₃ 3g/l、KH₂PO₄ 0.08g/l。

1.2.3 生物测定培养基

牛肉膏 1.5g/l、蛋白胨 6g/l、酵母浸出膏 6g/l、葡萄

王惠, 河北工业大学生物工程系, 在读硕士, 300130, 天津。

童应凯, 天津农学院农学系。

吴兆亮、胡金刚, 单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期: 2006-02-10

糖 1g/l、琼脂 18g/l, pH 值 7.2。

1.2.4 摇瓶种子

37℃振荡培养 24~36h, 摇床转速 240r/min。

1.2.5 摇瓶发酵

37℃振荡培养 168h 左右, 摇床转速 240r/min。

1.3 试剂

亚硝酸钠(上海试剂一厂)、黄霉素(德国赫斯特公司)。

1.4 方法

1.4.1 单孢子悬液的制备

将成熟孢子斜面加入生理盐水, 洗下孢子, 倒入装有玻璃珠的灭菌三角瓶中, 振荡 25~30min, 使孢子分散活化, 再经纱布过滤, 制备成单孢子悬液, 并将孢子悬液稀释至 10^7 个/ml 备用。

1.4.2 亚硝酸钠诱变处理

取 0.2mol/l 亚硝酸钠溶液 1ml 于大试管中, 加入 1ml 孢子悬液后, 立即加入 1ml pH 值为 4.5 的醋酸缓冲液, 充分混合后, 置 27℃水浴, 诱变不同时间后加 0.07mol/l pH 值为 8.6 的 Na_2HPO_4 溶液 2ml 以终止反应。

1.4.3 耐自身代谢产物菌株的筛选

1.4.3.1 最低抑菌浓度(MIC)的测定

将制备好的孢子悬液分别涂布于含有不同浓度黄霉素的培养基平板上, 28℃培养 4~5d。观察不同平板上的菌落生长情况, 记录未长菌落的黄霉素最低作用浓度, 即为黄霉素对该菌的最小抑制浓度。

1.4.3.2 抗性菌株的筛选

把经过亚硝酸钠处理过的单孢子液, 适当稀释后涂布于含最小抑制浓度的黄霉素培养基平板上, 28℃培养 4~5d, 生长出的菌落即为黄霉素抗性突变株。

1.4.4 发酵效价测定

发酵液经 4 000r/min 离心 20min, 取上清液以牛津杯测定发酵效价, 指示菌为金黄色葡萄球菌 26003。

2 结果

2.1 菌株对自身代谢产物的耐受性

将准备好的单孢子悬液分别涂布在不同浓度的黄霉素分离培养皿中, 28℃培养 4~5d, 观察其生长情况(见表 1)。

表 1 出发菌株在含不同浓度黄霉素培养基中的生长情况

浓度(U/ml)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900
CK	++++	++++	+++	+++	++	++	+	±	-	-

结果表明, 黄霉素浓度在 0~600U/ml 的范围内, 孢子不受影响, 即产生菌可耐受 700U/ml 的自身代谢

产物。随着黄霉素浓度的增加, 孢子逐步减少, 当浓度达到 800U/ml 时, 孢子数量明显减少, 表现为菌落生长迟缓, 培养时间延长。可以推测, 一定量的自身代谢产物对菌株的生产能力产生反馈抑制, 高剂量的自身代谢产物对菌株有明显抑制作用。有研究表明, 大多数抗生素对产生菌本身没有强烈的代谢干扰作用, 产生菌具有一套与临床分离得到的耐药菌相似的自身防卫系统, 此系统愈完善, 则对自身产物的耐药性愈高, 其产生高浓度抗生素的可能性愈大。

可见, 800U/ml 已影响了菌体的代谢过程, 因此, 可以利用这个敏感浓度位点对菌体进行诱变后的筛选, 以期得到高产黄霉素的突变株。

2.2 诱变处理的致死率和正变率(见图 1)

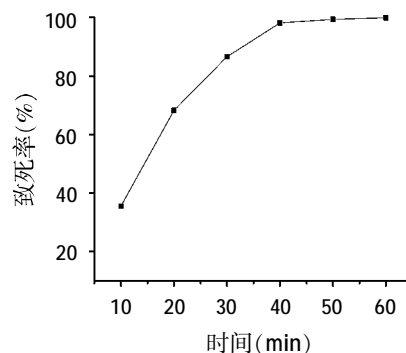


图 1 亚硝酸钠的致死率

从图 1 可见, 亚硝酸钠诱变时间与菌株的致死率之间存在明显的剂量效应关系, 随着诱变时间的延长致死率逐渐提高, 诱变 30min 时致死率超过 80%, 诱变 60min 时致死率为 100%, 故诱变时间控制在 30~60min 之间, 可达到预期的致死率。

采用 3 种不同时间处理后, 按前述方法进行耐自身抗性突变株的筛选。并经摇瓶发酵, 测定活力, 与出发菌株比较, 以观察突变株, 结果见表 2。

表 2 不同时间对黄霉素产生菌的诱变效果

出发菌株	时间(min)	死亡率(%)	筛选菌株(株数)	正变率(%)
DMS40746	30	85.56	170	36.3
	40	98.19	154	23.4
	50	99.35	183	30.6

由表 2 可知, 30min 时正变率最高, 因此选 30min 为最佳时间。

2.3 发酵筛选和高产菌株的稳定性试验

以 DMS40746 为出发菌株, 通过亚硝酸钠诱变和耐自身代谢产物的筛选, 共挑菌种约 100 株, 经初筛

培养条件对纳豆芽孢杆菌芽孢形成的影响

孙梅 匡群 施大林 刘淮 胡凌红 陈秋红 沈玥 陆茂林 司竑飞

摘要 为了提高纳豆芽孢杆菌芽孢形成率及芽孢数量,在摇瓶、15L 自动发酵罐中考察了营养条件、pH 值、接种量、溶氧水平对纳豆芽孢杆菌液体培养形成芽孢的影响。结果表明,芽孢形成的最适培养基组成为:葡萄糖 15g/l、大豆饼粉 10g/l、 KH_2PO_4 3g/l、NaCl 5g/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.4g/l, pH 值 7.0, 接种后最适起始芽孢浓度为 10^6 个/ml, 控制溶氧水平不低于 30%, 培养 20h, 芽孢数量可达 7.7×10^9 个/ml, 芽孢率达 98% 以上。

关键词 纳豆芽孢杆菌; 芽孢形成; 培养条件
中图分类号 Q815

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)是从日本传统食品中分离出来的芽孢杆菌,其原始菌株与枯草芽孢杆菌相同,是枯草芽孢杆菌的一个亚种^[1]。纳豆芽孢杆菌能产生具有溶纤活性的纳豆激酶^[2],其芽孢能耐酸碱、耐高温(100℃)及耐挤压,在饲料制粒过程及酸性胃环境中均能保持高度的稳定性;在肠道中不增殖,只在肠道上段迅速发育转变成代谢活跃的营养型细胞^[3],增强

以厌氧菌为优势菌群的肠道正常菌群的生长,促进动物对营养物质的吸收,增强机体的免疫功能^[4]。体外试验研究表明,添加纳豆芽孢杆菌能使肠道酸化而有利于铁、钙及维生素 D 等的吸收,促进动物生长,缩短饲养周期,同时纳豆芽孢杆菌具有很强的蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活性,能降解植物性饲料中某些复杂的碳水化合物,从而提高饲料的转化率并增加饲料的可利用种类^[5]。动物饲养试验结果表明^[6,7],在仔猪前、后期日粮中添加纳豆芽孢杆菌能明显提高仔猪生长性能和饲料转化率,经济效益显著;日粮中添加适宜用量的纳豆芽孢杆菌能提高鸡十二指肠消化酶的活力,显著提高肉仔鸡生长性能。因此,纳豆芽孢杆菌是一种较好的微生物饲料添加剂,目前在家畜及水产养殖中的应用日益扩大。

孙梅,江苏省微生物研究所有限公司,助理研究员,214063,无锡市钱荣路 7 号。

匡群(通讯作者)、施大林、刘淮、胡凌红、陈秋红、沈玥,单位及通讯地址同第一作者。

陆茂林、司竑飞,江苏省微生物制药工程中心。

收稿日期:2006-02-10

和复筛发酵,获得数株高产菌株,其中 sg2-N₂-2 菌株摇瓶发酵效价比亲株提高 7.2 倍。

菌种的稳定性试验(表 3)表明,sg2-N₂-2 菌株接种传 3 代,生物效价无明显影响。

表 3 sg2-N₂-2 斜面传代对发酵效价的影响

传代代数	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅
相对效价(%)	100	99	102	90	78

2.4 菌落形态与生产能力的关系

在筛选过程中,发现菌落形态与亲本菌株形态发生变化,并且与生产能力存在一定的相关性,从分离出来的菌落形态可归纳出下列 3 种。

I 型扁平型,表面平滑,白色菌落,孢子丰满;II 型褶皱型,边缘不整齐,孢子丰满;III 型光秃型,表面平滑,白色小菌落,孢子稀少。

表 4 不同型菌落的生产能力

菌落形态	I 型	II 型	III 型
相对效价(%)	78	100	89

从表 4 中可看出,不同型菌落的生产能力差异较大,褶皱型菌株产量高。筛选出的 sg2-N₂-2 高产菌属于褶皱型菌落。

3 讨论

诱变育种方法简便有效,至今仍是工业微生物育种的重要手段,但一般都需要对很大数量的菌株进行筛选方能奏效,这种育种方式近年来在理论与技术上都有新的发展,但如何提高效率,减少盲目性,仍是当前的重要问题。在黄霉素高产菌株的筛选过程中,本文采用了抗自身代谢推理选育方法。

本实验中采用亚硝酸钠诱变,从结果看,DMS40746 对亚硝酸钠很敏感,在诱变 30min 得到的菌株正突变高,经过亚硝酸钠诱变和耐自身代谢处理得到了 sg2-N₂-2 菌株,其产黄霉素的能力是原菌株的 7.2 倍。

诱变后的菌落形态发生了变化,并且与生产能力有关,褶皱型菌株产量高,为该菌株以后的诱变筛选工作提供了条件。(编辑:孙崎峰, sqf0452@126.com)

由于纳豆芽孢杆菌的芽孢较其营养体细胞易保藏,复活率高,是制备纳豆芽孢杆菌制剂的理想存在形式。因此,获得高浓度、高活性的芽孢是制备纳豆芽孢杆菌制剂的关键。目前,国内对纳豆芽孢杆菌的研究大多集中于纳豆固体培养、纳豆激酶,液体深层培养研究也以收获营养活菌体为目的,在其芽孢形成方面的研究不多。因此,本文旨在通过对影响纳豆芽孢杆菌液体培养形成芽孢的营养条件、pH 值、接种量、溶氧水平方面进行研究,为纳豆芽孢杆菌芽孢制剂的产业化生产提供参考。

1 材料

1.1 菌种

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)JS-NDT-05,由江苏省微生物研究所选育、分离纯化和保藏。

1.2 试剂

乳糖、蔗糖、麦芽糖、蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、玉米浆粉、酵母粉均为国产生化试剂;尿素、葡萄糖、 NH_4Cl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCO_3 为国产分析纯试剂;玉米淀粉、小麦淀粉、木薯淀粉、红薯淀粉、鱼粉、大豆粉、大豆饼粉、花生饼粉均为市售。

1.3 培养基

1.3.1 斜面种子培养基

BPY 培养基^[9]:牛肉膏 5g/l、酵母膏 5g/l、蛋白胨 10g/l、葡萄糖 5g/l、NaCl 5g/l、琼脂 15~20g/l、蒸馏水 1L,pH 值 7.2。

1.3.2 摇瓶培养基

根据试验需要配制培养基或在基础培养基中添加 C 源、N 源或无机盐配制培养基。C 源基础培养基:酵母膏 3g/l、蛋白胨 10g/l、NaCl 5g/l,pH 值 7.2~7.4;N 源基础培养基:葡萄糖 5g/l、NaCl 5g/l,pH 值 7.2~7.4。

1.3.3 活菌及芽孢检测用培养基

营养琼脂(NA)培养基^[9]。

1.4 器材

pH 计(梅特勒-托利多 Delta320pH)、HYG-11a 迴旋式恒温调速摇瓶柜(上海欣蕊自动化设备有限公司)、自动发酵罐(B.BRAUN BIOSTAT C15-3)、721 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 培养方法

2.1.1 种子培养

用接种针从菌种斜面上沾取少量菌泥,划线接种于 BPY 培养基,37℃培养 18~24h,镜检以芽孢为主即

成熟。

2.1.2 摇瓶培养

将成熟的种子用无菌水从斜面上刮洗下来,放入内装无菌玻璃珠的灭菌三角瓶中,振荡,制成均匀的菌悬液,80℃水浴加热 10min,以 2%(v/v)的接种量接入孢子悬液,摇瓶装量 10%~20%(v/v),在 37℃条件下,200~220r/min 的迴摇培养 20~48h。

2.1.3 15L 自动发酵罐培养

发酵罐装液量 70%~80%(v/v),将成熟的斜面种子菌悬液经 80℃水浴加热 10min 后,接入 15L 自动发酵罐,37℃培养 24h 左右,搅拌转速 300~450r/min,通气量 4.0L/min。培养过程中 pH 值、溶氧水平可根据实验需要进行电脑自动控制和监测。

2.2 测定方法

pH 值测定用梅特勒-托利多 Delta320pH 计测定;活菌总数计数采用周佳庆介绍的方法^[10];芽孢平板计数是在 80℃水浴加热 15 min 后,采用平板菌落计数法检测芽孢的生成量^[11];芽孢染色法观察芽孢^[12];芽孢率是指样品按活菌总数计数、芽孢平板计数分别计数活菌总数和芽孢数,计算公式为:

$$\text{芽孢率}(\%) = (\text{芽孢数} / \text{活菌总数}) \times 100\%。$$

3 结果与讨论

3.1 C 源对芽孢形成的影响

在培养基成分中,碳源及其浓度是影响芽孢形成的主要因素^[12-15],在 C 源基础培养基中分别添加不同 C 源,即:玉米淀粉 20g/l、小麦淀粉 20g/l、木薯淀粉 20g/l、红薯淀粉 20g/l、乳糖 5g/l、蔗糖 5g/l、麦芽糖 5g/l、葡萄糖 5g/l,配制培养基,250ml 三角瓶分装培养基 50ml,进行纳豆芽孢杆菌的摇瓶培养,结果如表 1 所示。

实验结果表明:纳豆芽孢杆菌 JS-NDT-05 具有良好的淀粉酶活性,能直接利用淀粉且生长良好。与葡萄糖、乳糖等速效碳源相比较,在玉米淀粉、小麦淀粉等淀粉类长效碳源中,菌体生长较慢,14~16h 时生长进入平衡期,比葡萄糖、乳糖等速效碳源晚 2~6h。在芽孢形成方面,淀粉类碳源的芽孢形成极缓慢,培养 24h 左右镜检,除木薯淀粉、红薯淀粉培养基中有少数菌体开始形成芽孢外,玉米淀粉和小麦淀粉培养基中的菌体均呈营养体形态,未形成芽孢,延长培养时间至 40h,木薯淀粉、红薯淀粉分别有 93.5%、90% 的菌体形成了芽孢,而玉米淀粉和小麦淀粉则不理想;而在葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖培养基中,菌体在 10h 左右生长进入平衡期后即开始形成芽孢,培养 24h,除麦芽糖芽孢形成不理想外,葡萄糖、乳糖、蔗糖

表 1 不同 C 源对芽孢形成的影响

C 源添加量 (g/l)	浓度 (g/l)	培养时间 (h)	活菌数 (个/ml)	芽孢数 (个/ml)	芽孢率 (%)	pH 值	备注
玉米淀粉	20	40	1.1×10^9	0	0	7.71	16h 菌体生长进入平衡期,40h 菌体开始形成芽孢
小麦淀粉	20	40	5.4×10^8	1.1×10^8	20.0	8.50	14h 菌体生长进入平衡期,40h 时菌体形成芽孢
木薯淀粉	20	40	7.3×10^8	6.8×10^8	93.5	8.35	14h 菌体生长进入平衡期,24h 开始形成芽孢
红薯淀粉	20	40	4.1×10^8	3.7×10^8	90.0	8.40	16h 菌体生长进入平衡期,22h 开始形成芽孢
乳糖	5	24	2.8×10^8	2.7×10^8	95.0	8.64	10h 菌体生长进入平衡期,开始形成芽孢
蔗糖	5	24	5.8×10^8	5.2×10^8	90.0	8.15	10h 菌体生长进入平衡期,开始形成芽孢
麦芽糖	5	24	4.1×10^8	2.5×10^8	60.0	8.01	12h 菌体生长进入平衡期,开始形成芽孢
葡萄糖	5	24	6.1×10^8	5.7×10^8	93.6	8.01	10h 菌体生长进入平衡期,开始形成芽孢

均已有 90%以上的菌体形成了芽孢。从总体看来,玉米淀粉的营养菌体数量最多,但不利于芽孢形成;木薯淀粉芽孢形成数量最高,葡萄糖次之,两者的芽孢形成率相近,但所需培养时间不同,木薯淀粉需 40h,而葡萄糖只要 24h。因此,葡萄糖对纳豆芽孢杆菌的芽孢形成最适宜。

在 C 源基础培养基中,以葡萄糖为 C 源,配制含不同葡萄糖浓度的培养基,250ml 三角瓶分装培养基 25ml,进行摇瓶培养,考察葡萄糖浓度对纳豆芽孢杆菌 JS-NDT-05 芽孢形成的影响,结果如图 1 所示。

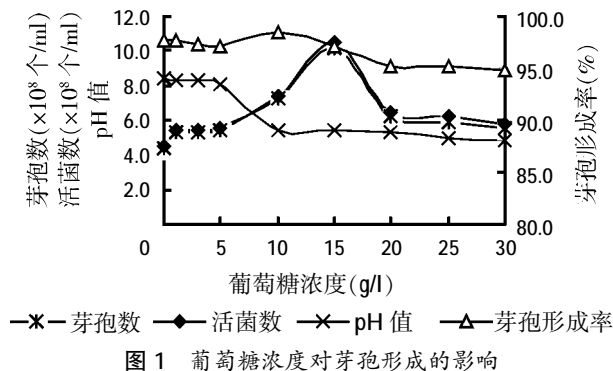


图 1 葡萄糖浓度对芽孢形成的影响

实验结果表明:随着葡萄糖浓度的提高,活菌数

和芽孢数都呈先升后降变化趋势,芽孢形成率总体呈下降趋势,在葡萄糖浓度达 15g/l 时,活菌数及芽孢数达峰值。当葡萄糖浓度在 0~15g/l 范围内变化时,芽孢形成率变化不大,均在 97%以上,说明提高葡萄糖浓度能提高芽孢浓度。当葡萄糖浓度超过 15g/l 时,不仅芽孢形成率明显下降,而且活菌数和芽孢数也下降至葡萄糖浓度为 5g/l 时的水平。这可能是由于菌体利用葡萄糖生长时,产生酸性代谢物,葡萄糖浓度越高,生长对数期的 pH 值就越低,起始葡萄糖浓度超过 15g/l 后,生长对数期 pH 值均低于 5,菌体代谢改变,生长和芽孢形成受抑制。因此,为了在提高菌体浓度的同时,维持较高的芽孢形成率,提高最终收获的芽孢数,必须控制葡萄糖浓度,葡萄糖的起始浓度控制在 15g/l,对芽孢形成最适宜。

3.2 N 源对芽孢形成的影响

培养基中氮源也影响芽孢的形成^[3]。在 N 源基础培养基中分别添加有机氮源,如蛋白胨、酵母膏、玉米浆粉、大豆粉、大豆饼粉、花生饼粉、鱼粉和酵母粉各 10g/l 及无机氮源,如尿素、 NH_4Cl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 各 20g/l,配制培养基,250ml 三角瓶分装培养基 25ml,进行摇瓶培养,考察不同 N 源对纳豆芽孢杆菌 JS-NDT-05 芽孢形成的影响,结果如图 2 所示。

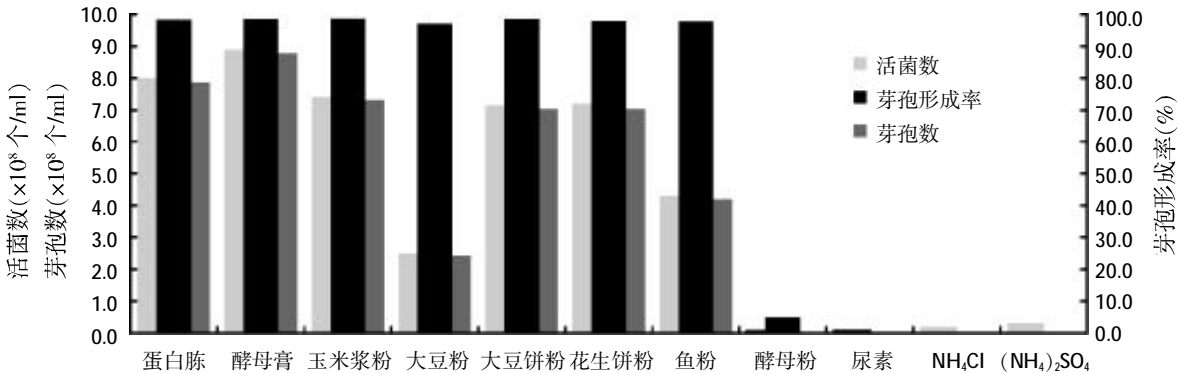


图 2 不同 N 源对芽孢形成的影响

实验结果表明:纳豆芽孢杆菌 JS-NDT-05 的生长有机氮源适宜,在以无机氮为唯一氮源时,生长弱,芽孢难以形成,此结果与陈丽花等^[10]的部分研究结果相同。在有机氮源中除酵母粉外,芽孢形成率均能达 98%以上,芽孢数量从高到低依次为酵母膏、蛋白胨、玉米浆粉、花生饼粉、大豆饼粉、鱼粉、大豆粉。玉米浆粉、花生饼粉、大豆饼粉为工业副产物,价格较低廉,是低成本工业化大规模培养芽孢的优选 N 源。因此,以下实验中的 N 源均采用大豆饼粉。

3.3 无机盐

在纳豆芽孢杆菌液体深层培养时,培养基组成中以 NaCl 为唯一无机盐,获得的菌体量高^[10],为了在提高活菌数的同时,提高芽孢数量,以葡萄糖 5g/l、大豆饼粉 10g/l、NaCl 5g/l 为对照,再分别添加无机盐:CaCO₃、MgSO₄·7H₂O、KH₂PO₄、K₂HPO₄ 各 3g/l;KH₂PO₄ 1g/l+K₂HPO₄ 3g/l,配制培养基,250ml 三角瓶分装培养基 25ml,进行摇瓶培养 23h,考察不同无机盐对纳豆芽孢杆菌 JS-NDT-05 芽孢形成的影响,结果如表 2 所示。

表 2 无机盐对纳豆芽孢杆菌 JS-NDT-05 芽孢形成的影响

无机盐	浓度 (g/l)	活菌数 (个/ml)	芽孢数 (个/ml)	芽孢形成率 (%)
NaCl(对照组)	5	5.1×10 ⁸	5.0×10 ⁸	98.1
CaCO ₃	3	4.4×10 ⁸	4.4×10 ⁸	99.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3	5.4×10 ⁸	4.5×10 ⁸	83.3
KH ₂ PO ₄	3	5.7×10 ⁸	5.6×10 ⁸	99.0
K ₂ HPO ₄	3	5.2×10 ⁸	5.1×10 ⁸	98.6
KH ₂ PO ₄ +K ₂ HPO ₄	1+3	1.1×10 ⁹	2.8×10 ⁸	25.5

实验结果表明:添加 CaCO₃,芽孢形成率高,但不利于活菌数量和芽孢数量的提高;MgSO₄·7H₂O 利于菌体的生长,但不利于芽孢形成,芽孢形成率较低;分别添加 KH₂PO₄ 和 K₂HPO₄,对菌体生长和芽孢形成情况与 NaCl 相似,但同时添加则促进菌体生长,显著提高活菌数,但强烈抑制芽孢的形成。由于添加 KH₂PO₄ 后活菌数、芽孢数量和芽孢形成率均有所提高,因此,后续实验用培养基中无机盐除 NaCl 外,添加 KH₂PO₄。

Mn 作为一种微生物生长所需的微量元素,是超氧化物歧化酶、L-阿拉伯糖异构酶等许多酶的辅助因子,对活菌数和芽孢形成有影响^[17,18]。因此,按上述实验获得的最适 C 源、N 源及无机盐组成配制培养基,即葡萄糖 15g/l、大豆饼粉 10g/l、KH₂PO₄ 3g/l、NaCl 5g/l,添加不同浓度的 MnSO₄·H₂O 使 Mn²⁺浓度分别为:0、1.2、2.4、3.5、4.7、5.9、7.1mmol/l,考察 Mn²⁺浓度对芽孢形成的影响,结果如图 3 所示。

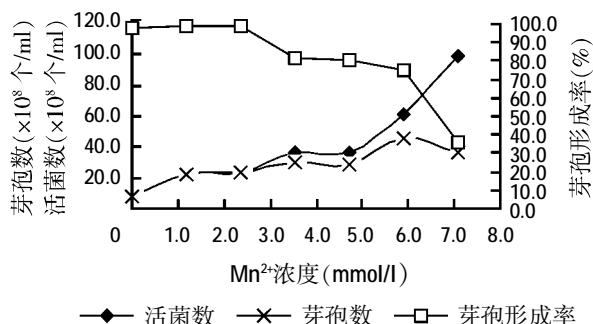


图 3 Mn²⁺浓度对芽孢形成的影响

实验结果表明:Mn²⁺对菌体生长有促进作用,营养菌体数量和芽孢数量随着 Mn²⁺浓度的提高而提高,但芽孢形成率则在 Mn²⁺浓度为 1.2~2.4mmol/l(即 MnSO₄·H₂O 0.2~0.4g/l) 时达 98%以上,随后呈下降趋势,当 Mn²⁺浓度达 7.1mmol/l 时对芽孢的形成产生显著抑制。因此,在获得较高菌体量同时,还要求保持理想的芽孢形成率,则 Mn²⁺浓度为 2.4mmol/l (即 MnSO₄·H₂O 0.4g/l)时最适宜。

3.4 pH 值对芽孢形成的影响

如前述以最适 C 源、N 源及无机盐配制培养基,接种前用无菌 NaOH 或 HCl 调整起始 pH 值分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5,250ml 三角瓶分装培养基 25ml,进行摇瓶培养,考察起始 pH 值对 Bacillus natto JS-NDT-05 芽孢形成的影响,结果如图 4 所示。

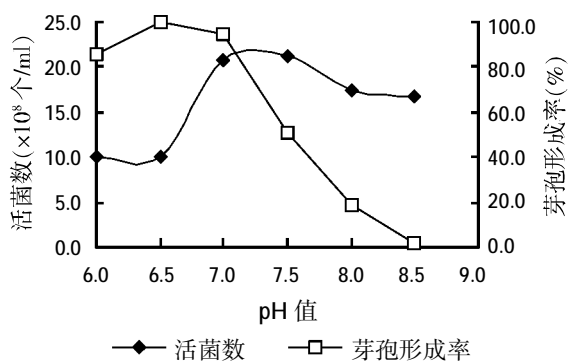


图 4 起始 pH 值对芽孢形成的影响

实验结果表明:从菌体生长数量来看,起始 pH 值 7~7.5 最适宜,但对芽孢形成率来说,起始 pH 值 6.5~7.0 最适宜,因此,pH 值 7.0 是最适宜的起始 pH 值。

3.5 接种量对芽孢形成的影响

250ml 三角瓶分装培养基 25ml,接种 Bacillus natto JS-NDT-05 芽孢,使摇瓶中芽孢数量分别为 10⁴、10⁵、10⁶、10⁷ 数量级,进行摇瓶培养 24h,考察接种量对芽孢形成的影响,结果如表 3 所示。

表3 接种量对芽孢形成的影响(个/ml)

接种芽孢数量(个/ml)	6.0×10^4	3.0×10^5	1.8×10^6	1.7×10^7
24h 培养后芽孢数量(个/ml)	6.0×10^8	7.3×10^8	1.6×10^9	2.1×10^9

实验结果表明:收获的芽孢数量随着接种量的提高而提高,低接种量表现出很高的孢子增长倍率,但不能够获得较高的芽孢数量,最高接种量能收获最大孢子数量,但孢子增长倍率最低,因此,控制芽孢接种量,起始使芽孢浓度在 10^6 个/ml 数量级最适宜。

3.6 溶氧水平对芽孢形成的影响

氧气是影响芽孢形成的一个重要因素,不同的菌株形成芽孢所需的供氧条件不同。Mohamed Ismail 等^[19]研究过球形芽孢杆菌溶解氧与芽孢形成的关系,发现随着溶解氧浓度升高,芽孢形成率也越高,但有的学者却得出了相反的结论^[20]。为了考察溶氧对纳豆芽孢杆菌 JS-NDT-05 芽孢形成的影响,在 250ml 三角瓶中分别装培养基 25ml、50ml,进行摇瓶培养 24h,结果如图5 所示。

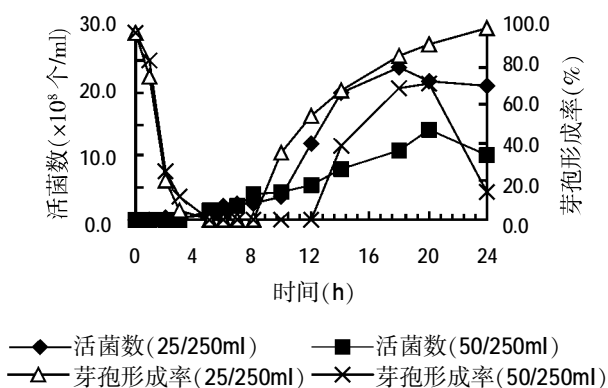
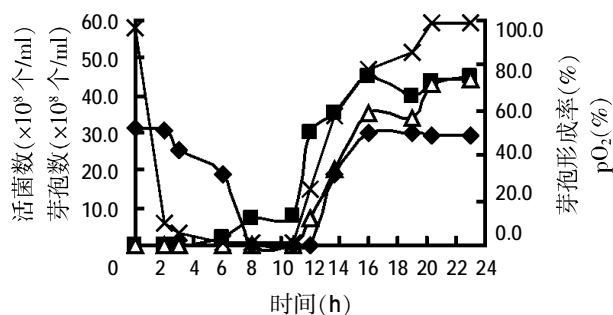
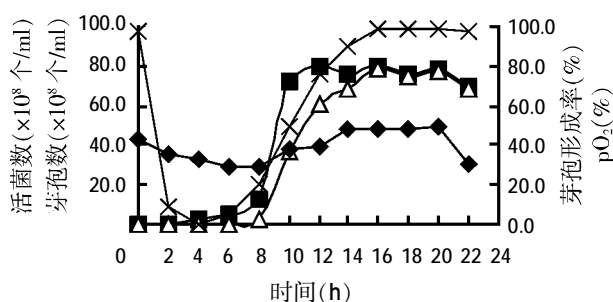


图5 通气时间对芽孢形成的影响

实验结果表明:通气量大(通气时间长),溶氧水平高,有利于菌体的生长、芽孢的形成和后期芽孢活性的保持。比较摇瓶装量 25/250ml 和 50/250ml,在菌体生长前期,两者相似,进入对数生长期后,供氧对菌体生长影响显著,通气量大的 25/250ml 装量菌体生长快,活菌数量高,芽孢形成早,芽孢数量高,而供氧水平低的 50/250ml 装量菌体生长慢,平衡期短,菌体易衰老,芽孢形成率最高仅为 80%左右且芽孢极易失活。由于摇瓶培养不便于监测培养基中的溶氧变化,因此,在 15L 自动发酵罐中分别进行不控制溶氧水平、用搅拌转速和通气量控制溶氧水平不低于 30% 的实验,对培养过程进行观察,进一步考察溶氧对菌体生长和芽孢形成的影响,结果如图 6 所示。



(a) 不控制溶氧



(b) 控制溶氧

图6 在 15L 自动发酵罐中溶氧对纳豆芽孢杆菌的菌体生长和芽孢形成的影响

观察比较不控制溶氧水平和控制溶氧水平两个培养过程,从图 6 可以看出:菌体进入对数生长期后,快速消耗氧气,若不通过调整搅拌转速或通气量进行溶氧水平的调控,则培养基中溶氧水平可降至 0%,时间长达 4h,此时菌体处于厌氧生长,菌体生长减缓,而在控制溶氧水平的罐批中菌体的生长不受影响,生长速度快,生长量高,9h 左右就已结束对数生长期,进入平衡期。从对数生长中后期开始,菌体生长减缓,耗氧减少,溶氧逐步回升。在芽孢形成方面,在以芽孢方式接种后,由于芽孢萌发,两个罐批的芽孢率均急剧下降,当菌体结束迟滞期时芽孢率几乎降至为 0%,在平衡期的中后期,菌体开始形成芽孢。由于控制溶氧水平的罐批,菌体生长快,生长量多,芽孢形成也快,且芽孢数量也多,20h 芽孢数可达 7.7×10^9 个/ml。就最终芽孢形成率来说,两个罐批的结果相似,均在 98%以上。

4 小结

芽孢是产芽孢细菌在生长过程中形成的一种抗逆休眠体,并非细菌生活史不可缺少的部分,它的形成受营养物质和环境因素的影响。本文考察了营养条件、pH 值、接种量、溶氧水平方面对纳豆芽孢杆菌 JS-NDT-05 液体培养形成芽孢的影响。在营养条件方

面,纳豆芽孢杆菌 JS-NDT-05 具有淀粉酶活性,能直接利用淀粉类 C 源,且与葡萄糖、蔗糖等速效碳源在菌体生长方面相似,但芽孢形成缓慢。玉米淀粉最适宜菌体生长,能提高营养活菌的数量,但不利于芽孢形成。就芽孢形成来说,木薯淀粉和葡萄糖的芽孢形成率相近,前者芽孢收获量略高,但培养时间约是后者的 2 倍。因此,兼顾芽孢量的收获和培养时间的缩短,葡萄糖是最适宜的 C 源。葡萄糖浓度对菌体生长和芽孢形成有影响,浓度低时,提高葡萄糖浓度能提高菌体量,芽孢形成几乎不受影响,过高的葡萄糖浓度抑制菌体的生长,降低芽孢形成率,因此,培养基最适宜的起始葡萄糖浓度为 15g/l。

纳豆芽孢杆菌 JS-NDT-05 适宜有机氮源,芽孢形成率除酵母粉外均能达到 98%。以无机氮为唯一氮源时,纳豆芽孢杆菌生长弱,芽孢难以形成;以酵母膏为氮源时,芽孢数量最高,但从利用廉价工业副产品的角度,玉米浆粉、花生饼粉、大豆饼粉应是低成本、大规模培养芽孢的适宜氮源。NaCl 是适宜菌体生长的无机盐, CaCO_3 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 分别与组成培养基的无机盐组分时,对菌体生长和芽孢形成的影响不同,添加 KH_2PO_4 后,活菌数、芽孢数量和芽孢形成率均有所提高。 Mn^{2+} 促进菌体生长,随着 Mn^{2+} 的提高,纳豆芽孢杆菌的营养活菌数随之提高,但对芽孢形成来说,低浓度 Mn^{2+} 不影响芽孢形成率,当浓度超过 7.1mmol/l 时则显著抑制芽孢形成, Mn^{2+} 浓度为 2.4mmol/l 时对芽孢形成率和活菌数均有利。

对于培养基的起始 pH 值来说,在 6.0~8.5 的考察范围内,菌体生长和芽孢形成对 pH 值的要求有所不同,7.0~7.5 是适宜生长的 pH 值范围,6.5~7.0 则是适宜芽孢形成的 pH 范围。因此,为了在提高菌体量的同时提高芽孢数量,pH 值 7.0 最适宜。在接种后起始芽孢数 $10^4 \sim 10^7$ 个/ml 的实验考察范围内,接种量的提高有利于芽孢数量的提高,但接种后芽孢的倍增率则下降了,芽孢接种量在 10^6 数量级可取得最佳的平衡。

纳豆芽孢杆菌是好氧菌,溶氧是菌体生长和芽孢形成的重要因素。摇瓶实验结果显示,通气量大有利于菌体生长,提高芽孢形成率,有利于芽孢活性的保持。在 15L 自动发酵罐中对培养过程进行观察,结果显示,在对数生长期菌体快速生长,供氧速度跟不上耗氧速度,导致菌体处于厌氧生长状态,不仅减缓了生长速度,延后芽孢的形成,而且也不利于活菌数和芽孢数量的提高,在培养过程中,控制溶氧水平,则能显著

改善这一状况,提高芽孢收获量,缩短培养时间。

参考文献

- 1 R.E.布坎南(中国科学院微生物研究所).伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M].北京:科学出版社,1984.735~792
- 2 Simi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nootokinase) in the vegetable cheesenatto, a typical and popular soybean food in the Japanese diet [J]. *Experientia*, 1987(43): 1 110~1 111
- 3 刘学剑.微生物理论与绿色饲料添加剂的开发应用[J].湖南饲料, 2000, 59(5): 2~7
- 4 张俐,杨迎伍,等.微生态制剂及其在功能食品中的应用[J].食品工业与科技, 2002, 23(6): 72~74
- 5 胡束兴,谱康威.微生态制剂及其作用机理[J].中国饲料, 2001(3): 14~16
- 6 陈兵,缪志伟,朱凤香,等.仔猪日粮中添加纳豆芽孢杆菌的效果试验[J].浙江畜牧兽医, 2003(4): 5~6
- 7 陈兵,何世山,朱凤香,等.纳豆芽孢杆菌剂对 AA 鸡生产性能和十二指肠消化酶的影响[J].浙江农业学报, 2003, 15(5): 289~292
- 8 中国科学院微生物研究所,中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心.菌种目录[M].北京:科学出版社,1982.12~140
- 9 范秀容,李广武,沈萍.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社, 1989.260~261
- 10 周德庆.微生物实验手册[M].上海科学技术出版社,1983.30~31; 81~83
- 11 杜连祥.工业微生物实验技术 [M]. 天津:天津科学技术出版社, 1992. 104
- 12 王天云,陈振凤,王福源.一种促使乳酸芽孢杆菌大量生成芽孢的方法[J].工业微生物, 2001, 31 (3): 13~18
- 13 郭秀君,郑平,王蔚,等.蜡质芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)芽孢的形成与 PHB 的关系[J].山东大学学报(自然科学版),1994,29(1): 101~108
- 14 申烨华,孙珏,张粉艳,等.苏云金杆菌发酵培养基的研究[J].西北大学学报(自然科学版), 2000, 30(2): 132~135
- 15 Kang B C, Lee S Y, Chang H N. Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture [J]. *Biotechnol. Lett.*, 1992, 14(8): 721~726
- 16 陈丽花,陈有容,齐凤兰,等.纳豆芽孢杆菌 SFU-18 液体深层发酵培养基的优化.上海水产大学学报, 2001, 10(4): 323~327
- 17 Yokota A, Sasajima K. Derepressed Syntheses of Sporulation Maker Enzymes in a *Bacillus* Species Mutant [J]. *Agric. Biol. Chem.*, 1981 (45): 2 417~2 423
- 18 周德庆.微生物学教程[M].北京:高等教育出版社,1993.33~38
- 19 Mohamed Ismail A K. The effect of oxygen on the sporulation and toxicity of *Bacillus sphaericus* 2362. *Biotechnol. Lett.*, 1993, 15 (1): 34~43
- 20 Yousten A A, Wallis D A, Singer S. *Current Microbiol.*, 1984(11): 175~178

(编辑:刘敏跃, lm-y@tom.com)

白腐真菌及其木质素酶的研究进展

刘玲 叶博 刘长江

白腐真菌是一种作用于木质类结构,专门用于降解木质素、纤维素、半纤维等多糖类物质的真菌,在现代轻工业中的作用非常重要。近年来关于白腐真菌的研究逐渐增多,主要集中在3个方面:①白腐真菌的发酵培养;②白腐真菌降解的机理;③白腐真菌酶的研究。

1 白腐真菌的作用

木质素是植物的重要组成成分之一,它是填充在细胞间和细胞壁的结构成分,占细胞结构的15%~30%。秸秆中的非水溶性木质纤维素很难被酸和酶水解,主要是因为纤维素的结晶度、聚合度以及环绕着纤维素与半纤维素缔合的木质素鞘所致。木质素与半纤维素以共价键形式结合,将纤维素分子包埋在其中,形成一种天然屏障,使酶不易与纤维素分子接触,而木质素的非水溶性和化学结构的复杂性,导致了秸秆的难降解性。要彻底降解纤维素,必须首先解决木质素的降解问题。白腐真菌能够降解木质素,也能够降解纤维结构,但降解木质素的能力优于其降解纤维素的能力,它能分泌胞外氧化酶,使木材中的木质素发生降解且不产生色素,被认为是主要的木质素降解微生物。

目前我国对白腐真菌作用的研究集中在降解木质素上,除了这个主要的作用之外,白腐真菌还有很多工业用途,如在造纸工业、食品工业、生物肥料等方面都有着微生物特有的降解功能,日渐引起关注。

2 白腐真菌降解机理的研究

白腐真菌所具有的降解木质素和纤维素、脱色和制浆能力都源于白腐真菌所产生的酶系统。20世纪80年代末开始,研究降解木质素酶类的重点集中在

有分解能力的菌种的产酶能力和酶学特性上。同样是以担子菌为主,尤其是以黄孢原毛平革菌为对象,但进一步研究的是真菌分解木质素的机理。真菌分解木质素是依靠一个复杂的胞外过氧化物酶系统,这一系统主要由3种酶构成:木质素过氧化物酶(Lip)、锰过氧化物酶(MnP)、漆酶(Lac),另外还有其它几种酶的综合作用。总的来说,这些酶的作用机理是:在适宜的条件下,白腐真菌的菌丝首先利用其分泌的超纤维素酶溶解表面的蜡质,然后菌丝进入秸秆内部,产生纤维素酶、半纤维素酶、内切聚糖酶、外切聚糖酶,降解秸秆中的木质素和纤维素,使其成为含有酶的糖类。

2.1 木质素过氧化物酶及其理化性质

木质素过氧化物酶(Lip)是一系列含有一个Fe(S)-卟啉环(IX)血红素辅基的同功酶,分子量37 000~47 000,等电点为3.5左右。Kirk等人在1983年从限氮培养黄孢原毛平革菌时发现了过氧化物同工酶,在这些同工酶中,H₁、H₂、H₆、H₇、H₈和H₁₀是木质素过氧化物酶,其中H₂和H₈的数量占优。木质素过氧化物酶在温度大于35℃时开始失活,pH值为4.5时很稳定,在pH值3.0以下极不稳定,加入藜芦醇可极大地增加酶的稳定性。EDTA、叠氮化物、氰化物和3-氨基-1,2,4-三吡咯都能抑制它的活性,但氯离子不会抑制。无其它还原性底物时,H₂O₂会引起酶的部分和不可逆失活。Lip的催化机理:高铁酶首先被H₂O₂氧化生成二价氧化产物——复合物I(Compound I),然后复合物I获得一个电子而被还原,得到一价酶中间产物——复合物II(Compound II)和一个自由基产物,复合物II能够作用于木质素或其它基质,这个催化反应因为一个电子的还原反应而不断进行下去(见图1)。在有过氧化物存在时,可以继续氧化为复合物III(Compound III),但这不是催化反应的部分。

2.2 锰过氧化物酶及其理化性质

锰过氧化物酶(MnP)是一种糖蛋白,分子量约为46 000,由一个铁血红素基和一个Mn²⁺构成了活性中心,另外还有两个起稳定结构作用的Ca²⁺,其分子中有10条长的蛋白质单链,一条短的单链,它是唯一的一个中间过氧化物酶,因为它的主要底物为有机酸。

刘玲,沈阳农业大学食品学院,讲师,110161,沈阳市东陵路120号。

叶博,辽宁名特优农产品开发服务中心。

刘长江,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-01-10

★ 辽宁科技厅科技攻关课题(2000050107)、校青年基金资助项目

Kirk 等人发现的 10 种过氧化物酶中 H_3 、 H_4 、 H_5 和 H_6 均是锰过氧化物酶。锰过氧化物酶的活性不仅依赖于 H_2O_2 , 还依赖于 Mn^{2+} 的存在。在温度大于 40°C 时开始失活, 它的最佳稳定 pH 值是 4.8, 加入“惰性”蛋白质 (如牛血清蛋白) 和 Mn^{2+} 可提高酶的稳定性。另外, Mn^{2+} 、蛋白质 (如凝胶、牛血清蛋白、蛋清蛋白) 和 α -羟基酸 (如苹果酸、柠檬酸) 都能促进酶活的提高。锰过

氧化物酶催化反应机理是: H_2O_2 的两个电子将高铁酶氧化, 形成中间产物——复合物 I (Compound I), 复合物 I 将 Mn^{2+} 氧化为 Mn^{3+} , 酶被还原为一价中间产物——复合物 II (Compound II), 复合物 II 是锰过氧化物酶非常重要的中间物质, 如图 2。在过量的过氧化物存在时, 酶被氧化为复合物 III (Compound III), 但同样这不是催化反应的部分。

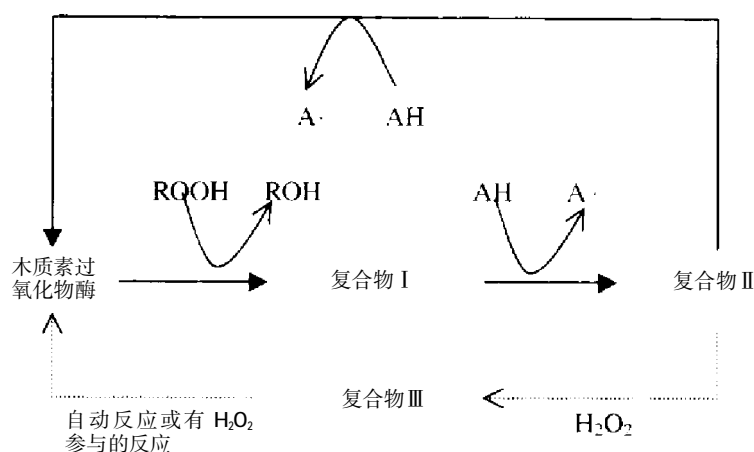


图 1 木质素过氧化物酶的催化反应机理

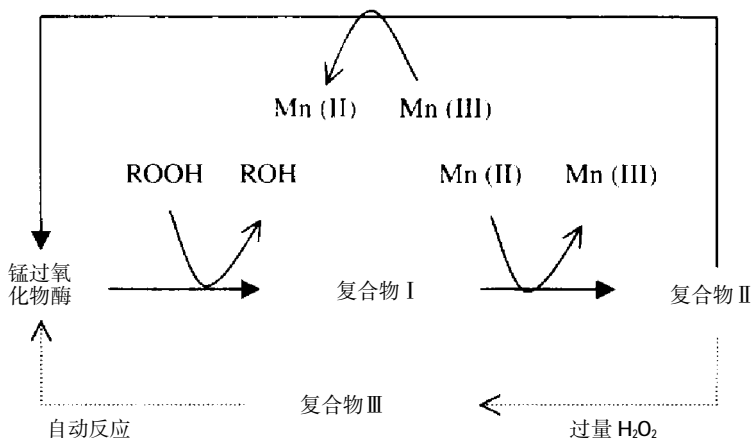


图 2 锰过氧化物酶的催化反应机理

2.3 漆酶及其理化性质

漆酶(Lac)是一种含铜的多酚氧化酶, 主要来源于生漆和真菌, 分子量为 60 000~80 000, 含有 15%~20% 的碳水化合物、520~550 个氨基酸残留物。很多白腐真菌产生的漆酶, 它的确切作用机制尚不清楚。但其主要作用是催化氧化还原反应, 在植物体内, 它催化木质素的聚合过程, 使木质素沉积, 而真菌产生的漆酶则进行相反的过程, 使木质素发生降解。漆酶的作用因不同菌合成的类型不同而不同。漆酶作为一种

多酚氧化酶, 它可催化氧化酚类或芳胺类等多种底物, 同时分子氧被还原为水。在这一过程中, 漆酶从底物分子中提取一个电子, 使之形成自由基, 该自由基不稳定, 可进一步发生聚合或解聚反应。

2.4 乙二醛氧化酶及其理化性质

乙二醛氧化酶(GOx)是一种胞外氧化酶, 它能催化乙二醛、甲基乙二醛等一些简单醛类的氧化, 它是胞外酶液中含有较少的酶蛋白。乙二醛氧化酶的 pH 值活力范围很宽, pH 值 6.0 时呈现出最大活力。 Cu^{2+}

加入到纯化的乙二醛氧化酶中会显著增加其活力,同时它的活性受木质素过氧化物酶系统的活化,这一点可能具有相当的生理学重要性。木质素过氧化物酶性质中很重要的一点是它在无适合底物时,不管是在胞内还是胞外,都会因 H_2O_2 的存在而发生不可逆失活,而对乙二醛氧化酶来说,在无过氧化物酶的底物时,它会可逆地失活以阻止体内高浓度的形成,这样就防

止了过氧化物酶的失活。黄孢原毛平革菌的降解活动主要发生在次级代谢阶段,与降解有关的酶只有当一些主要营养物(如氮、碳、硫)限制时才形成。营养限制使黄孢原毛平革菌应答产生了对底物的降解酶系统。图3表示了在白腐真菌反应体系中不同酶所形成 H_2O_2 的几种途径,其中以芳基醇氧化酶(AAO)和乙二醛氧化酶(GOx)为主产生 H_2O_2 的酶;苯基醇在 AAO

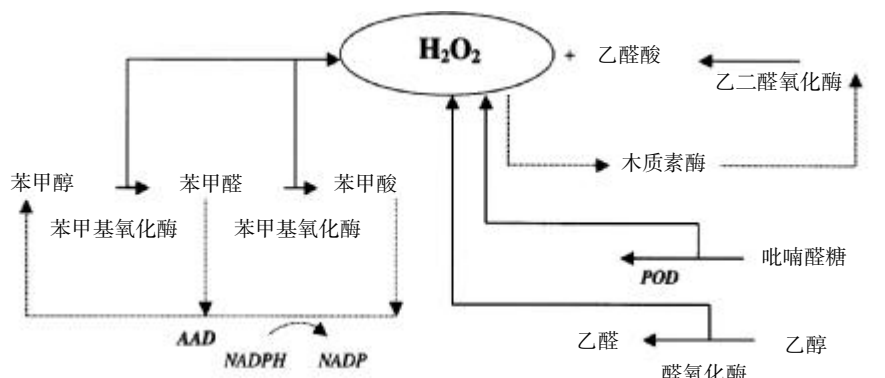


图3 白腐真菌反应体系中几种酶所形成 H_2O_2 的几种途径

催化下形成 H_2O_2 ;乙二醛在 GOx 氧化下生成 H_2O_2 。

3 酶活调控与最适培养基

3.1 碳源和氮源

在自然条件下,大多数白腐真菌合成的酶量很低。国内外曾利用多种不同有机、无机或复合碳、氮源来研究它们对白腐真菌产酶能力、关键酶系构成及酶活性的影响。结果表明,碳源和氮源是微生物降解木质素和产酶的一个极为重要的影响因素。在报道的某些模型木质素分解菌中,碳、氮源的营养限制可用于刺激木质素降解酶的合成,如黄孢原毛平革菌的木质素降解和木质素降解酶的产生是发生在氮源或其它营养被消耗的次级代谢过程中。比较胞外酶和胞内酶活性发现,同种碳源时,若胞外酶活性较高,其胞内酶活性一般也较高,说明碳源对胞外酶和胞内酶的影响是基本一致的,各碳源对酶类由胞内分泌到胞外的影响差别不大。有研究表明:糊精是最优碳源,D-葡萄糖、纤维二糖和麸皮浸汁(1%)均有利于木质素过氧化物酶的合成,混合糖源比单独糖源好。氮源的影响情况与碳源基本相同。在氮源中,复杂的有机氮源酵母浸汁和牛肉膏培养基中木质素过氧化物酶酶活最高,而菌丝体的产酶效率以酒石酸铵最好;硝酸铵、硫酸铵、丙烯酰胺和 L-谷氨酸也有利于酶的合成。Pickard 研究了几种稻谷麸皮原料,包括麸皮、麦麸、燕麦麸、松屑等,结果证明以麸皮为碳源产生的酶活最高,此

研究对于目前降解秸秆资源具有实际意义。

3.2 培养条件

白腐真菌的培养有固态和液态两种。在固体发酵中,培养物的气体交换是影响白腐真菌对秸秆降解作用的重要因素之一,气体交换量是由预混物中固相与液相之比决定的,含水量过高或过低都会阻止白腐真菌的生长。实验表明,最适的固液相之比为 3:1。Dosoretz 等人考察限氮浸没培养条件下通氧和通空气对两种过氧化物酶合成的影响。他们研究了 5 种通氧和 4 种通空气的情况,发现通气条件对酶的合成有很大影响。通空气条件下菌丝不合成木质素过氧化物酶,能合成锰过氧化物酶,但酶活低于通氧条件下的。连续通氧比周期性通氧增加了葡萄糖的消耗,产生较多的蛋白酶和多糖,因此得到的两种过氧化物酶酶活相应较低,酶活越过峰值后下降也越快。大多数白腐真菌适宜生长在微酸性环境内,pH 值在 4~5 之间;而对于耐碱性白腐真菌,最适 pH 值为 7~9。不同菌种适宜的 pH 值范围不尽相同,但是在实际生产中对于大多数喜微酸性环境的白腐真菌,固体发酵接种时,不必考虑秸秆基料的 pH 值,因为其可在发酵早期产生大量有机酸,使秸秆从 pH 值为 6 左右迅速下降至 4.0 左右,为后期发酵创造适宜的酸碱环境。除了上述影响因素外,白腐真菌在开始生长时还需要基质处于无菌和高度需氧的环境。在有杂菌存在时,杂菌可能占

优势,致使处理失败。

3.3 微量元素

白腐真菌对产木质素降解酶有重大影响的微量元素主要是 Cu 和 Mn。Bonnarme 等人研究了 Mn^{2+} 对锰过氧化物酶合成的调节作用,发现在合成 MnP 过程中, Mn^{2+} 的作用至关重要。MnP 的合成是由 Mn^{2+} 诱导的, Mn^{2+} 的存在增加了 MnP mRNA 的合成量,提高了 MnP 基因的转译,所以培养基中缺乏 Mn^{2+} 时就不能合成 MnP。 Mn^{2+} 的浓度在 0~40mg/l 之间时,浓度越高越有利于 MnP 的合成,当 Mn^{2+} 浓度超过 200mg/l 时酶活性有所下降。 Mn^{2+} 对 Lip 合成的影响比较复杂, Mn^{2+} 可以提高 Lip 的活性,当培养基缺乏 Mn^{2+} 时,细胞可以合成藜芦醇,它既是合成 Lip 的诱导物,同时又能保护 Lip 不因 H_2O_2 而失活,由此细胞能够合成一定量的 Lip。当培养基中只有微量的 Mn^{2+} 时,无 MnO_2 形成,同时细胞也不能合成藜芦醇来诱导 Lip 的合成;而在高浓度 Mn^{2+} 的条件下,大量的 Mn^{2+} 在 MnP 的作用下被氧化成 Mn^{3+} 。

Cu^{2+} 对于漆酶的产生和酶活性是相当重要的。研究发现,发酵培养基中不添加 Cu^{2+} 时,漆酶活性极低;添加量在 0~5mol/l 范围内,酶活水平随 Cu^{2+} 浓度的增加迅速提高;当大于 10mol/l 以后,漆酶酶活水平反而降低。说明培养基中适量的 Cu^{2+} 对菌株漆酶的合成及活性是必不可少的,但过多的 Cu^{2+} 又抑制菌株漆酶的表达分泌。

3.4 诱导物

诱导物的浓度高低对白腐真菌木质素降解酶的合成有着重要的影响。一些诱导物在诱导合成关键酶的同时,还可能起到分散剂、保护剂的作用。有文献报道,一些木质素及其亚结构类似物是木质素降解酶生成的有效诱导剂。有些学者认为,白腐真菌被诱导分泌酶类可能是由于其从培养基中消除了某些有害芳香物的毒害作用,故可依此用于提高木质素降解酶产量。从已有的研究结果来看,所使用的诱导剂,如吐温 80、香豆酸、香草酸、藜芦醇、愈创木酚、儿茶酚等,其作用机理大都是与降解底物有相似结构的化合物,这些化合物既是诱导底物,又是代谢底物,其降解的同时促进了难降解化合物的降解,此时,代谢底物之间可能发生相互作用,如电子传递等。值得指出的是上述诱导剂的作用机理并非完全相同。如 Bar-1ev 等的研究表明,静置培养时,吐温 80 能够提高细胞膜的渗透性,解除已合成的锰过氧化物酶在细胞内对酶基因的转录或 mRNA 翻译的阻碍,有利于酶的分泌。在

利用不同的菌种降解目标化合物时,最佳的诱导剂可能不同。藜芦醇作为 Lip 的诱导剂有极其重要的作用,它是木质素降解过程中非常重要的次生产物;藜芦醇还可以阻止过量的过氧化氢对 Lip 的损伤。藜芦醇可以由木质素降解体系内源产生,也可以通过外源投加。 H_2O_2 也是一种诱导剂,关于它的作用在酶的机理中已经阐述。不同的诱导物其诱导产生的主要木质素降解酶不同;诱导物对产酶及酶活性的影响也因菌种而异;不同的菌种在不同的环境条件下其产酶所需的最适宜诱导剂及其浓度也可能有较大的差异。

参考文献

- 1 Yoshida S, Yonehara S, Minami S, et al. Production and characterization of ligninolytic enzymes of *Bjerkandera adusta* grown on wood meal /wheat bran culture and production of these enzymes using a rotary-solid fermenter[J]. *Mycoscience*, 2002(37):417~425
- 2 Rao S K, Tien M. Oxidation of guaiacol by lignin peroxidase [J]. *Journal of Biology Chemical.*, 1995(270):22 254~22 258
- 3 Vishal Shah, Frantisek Nerud. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002(48):857~570
- 4 A. rdon O, Kerem Z, Hadar Y. Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *P.leurotostreatus* [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998(44):676~680
- 5 M.A.Pickard, H.Vandertol, R.Romand, et al. High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1999(45):627~631
- 6 Dosoretz C G, Chen A H C, Grethlein H E. Effect of oxygenation conditions on submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *App1. Microbial, Biotechnol.*, 1990(34): 131~137
- 7 Bonnarme P, Jeffries T W. Mn (II) regulation of lignin peroxidases and manganese dependent peroxidases from lignin degrading white rot fungi[J]. *App1. Environment Microbiology*, 1990, 56(1):210~217
- 8 Bar-lev S S, Kirk T K. Effects of molecular Oxygen on lignin degradation by *P.chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1981(99):373~378

(编辑:孙崎峰, sqf0452@126.com)

· 书 讯 ·

由集美大学水产学院王渊源教授编著的《水产配合饲料》一书,近期已由海洋出版社出版(北京)。该书 22 万字,共九章,分别阐述组成水产配合饲料的植物性原料、动物性原料、油脂原料和营养性与非营养性添加剂的来源、性质、作用、用量,例举各种添加剂配方和水产养殖动物的饲料配方,介绍加工技术,质量管理的项目和方法,论述水产配合饲料的评价指标,书后附有名称名词外文索引。全书以各类相关原料、产品的质量标准为准绳,信息颇丰,论证据实,力求实用,可供饲料厂家、水产研究机构的科技人员和大专院校的师生阅读参考。

该书定价每本 28 元(含邮资)。欲购者可通过邮局汇款至:厦门市深田路 28 号之一 401 室王渊源收(邮编:361003),并写明汇款人和详细地址、单位、邮编,款到发书。需要购书发票者在汇款附言栏注明。

酵母核苷酸对凡纳滨对虾生长、免疫以及抗应激影响的研究

王广军 朱旺明 谭永刚 康 莹

摘 要 每吨饲料中分别添加 0(对照)、172、344 和 516g 酵母核苷酸制成实用饲料,来饲养凡纳滨对虾 60d,并通过测定对虾的增重倍数、成活率等生长指标,超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)、过氧化物酶(POD)和溶菌酶(LZM)活性等免疫指标以及对低温、低氧的耐受能力,来研究饲料中酵母核苷酸添加量对其生长、免疫和抗应激的影响。结果表明,饲料中添加酵母核苷酸可以显著提高凡纳滨对虾的增重倍数和降低饲料系数。饲料中添加酵母核苷酸对凡纳滨对虾肌肉中 ACP 无显著影响,但显著增加了 LZM、SOD 和 POD 活性。与对照组相比,添加酵母核苷酸可以提高凡纳滨对虾耐低氧和低温的能力,344g/t 组和 516g/t 组比对照组出现死亡一半时的温度下降了 1℃。因此,酵母核苷酸具有显著促生长和提高机体抗应激以及增强机体免疫能力的作用,建议在实际生产中的添加量为 344g/t 较为合适。

关键词 凡纳滨对虾;酵母核苷酸;生长;非特异性免疫;应激

中图分类号 S945.4⁹

凡纳滨对虾引种繁育获得成功以后,尤其是高密度养殖和淡水养殖成功以后,养殖规模迅速扩大,养殖总产量逐年增加^[1,2]。但在其养殖业蓬勃发展的同时,也暴露出一系列的问题,如生长速度减慢、病害问题日趋严重,所以开发新的免疫促生长剂成为凡纳滨对虾营养与饲料研究的重点^[3-6]。

核苷酸是生物体内遗传物质的基本单位,也是蛋白质合成必需的中间体的基本单位。核苷酸促进畜禽的生长和免疫功能已经被证实^[7-9],但核苷酸在水产上应用的报道还很少。苗玉涛等^[10]在配合饲料中添加 300g/t 核苷酸时能促进苏氏芒鲶的生长并提高了成活率;Burrells 等^[11]发现,在饲料中添加 300g/t 核苷酸时,促进了大西洋鲱的生长并显著降低死亡率。本试验的目的在于探讨酵母核苷酸对凡纳滨对虾生长、免疫以及抗应激的影响,为酵母核苷酸在凡纳滨对虾配合饲料中的应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 酵母核苷酸

王广军,中国水产科学研究院珠江水产研究所,助理研究员,510380,广州市荔湾区芳村西朗兴渔路 1 号。

朱旺明、谭永刚、康莹,广州市信豚水产科技有限公司。

收稿日期:2006-02-07

酵母核苷酸由广州市信豚水产技术有限公司提供,商品名为“信豚 1 号”,酵母核苷酸有效含量为 8.6%。

1.1.2 试验用虾

实验所需要的凡纳滨对虾取自深圳农科中心水产基地,暂养 1 周后挑选体质健壮、外观无明显症状、规格整齐的个体用于试验。

1.1.3 试验地点

试验在中国水产科学研究院珠江水产研究所深圳(海水)试验基地完成。

1.1.4 试验条件

试验在 2m×2m×0.8m 的小网箱中进行,试验期间水深 0.5m。网箱置于室内的水泥池中,网箱四周固定于池壁上。

试验用水为海边直接抽提的天然海水,经过沙滤,盐度为 32~34,试验期间为自然水温,温度为 21~27℃。试验整个过程连续充气,溶解氧保持在 6.0mg/l 以上。

1.2 试验方法

试验以酵母核苷酸添加水平为试验因子,采用单因素梯度法。添加量设 3 个水平,分别为 1 组(172g/t)、2 组(344g/t)和 3 组(516g/t),一个对照组(酵母核苷酸添加量为 0),每组设 4 个平行。

1.3 日常管理

试验期间投饲率为其体重的 6%~8%, 具体根据虾的摄食情况, 每天进行调整。每天分 3 次投喂, 分别在 8:00、12:00 和 16:00。每天收集残饵和污物一次, 每周换水一次, 换水量为 30%~50%。

1.4 试验时间

试验时间从 2005 年 10 月 1 日到 11 月 30 日, 共 60d。试验结束时每个平行逐尾记录虾的尾数, 计算成活率, 并称量全部体重。

增重倍数=(末重-初重)/初重;

饵料系数=摄食饲料的重量/虾体重增加量;

成活率=收获尾数/放养尾数×100%。

1.5 抗应激试验

1.5.1 耐低氧能力试验

试验结束后, 每个网箱随机抽取 30 尾, 置于密闭的有一定水体的塑料袋中, 测定并记录每组虾死亡一半时的时间。

1.5.2 耐低温试验

试验结束后, 每个网箱随机抽取 30 尾置于有一定水体的玻璃缸中, 用冰块缓慢降低温度, 记录受试虾死亡一半时的温度。

1.6 非特异性免疫指标的测定

试验结束后, 每个网箱取 3 尾虾的部分肌肉, 称重后于冰浴中匀浆, 加入无菌生理盐水, 使浓度达到 0.1g/ml, 于 4℃ 条件下, 以 4 000r/min 离心 10min 后, 除去沉淀即为凡纳滨对虾肌肉组织提取液。

选用超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)、过氧化物酶(POD)和溶菌酶(LZM)作为非特异性免疫指标。SOD、ACP、LZM 采用试剂盒测定(试剂盒购自南京建成生物研究所, 具体测定步骤按说明书进行); 过氧化物酶活性的测定参照 Worthington 法测定, POD 的活性(U/ml)=(E510×3×10)/(6.58×0.1)。

式中: E510 为波长 510nm 处每分钟内吸光度的降低值; 3 为反应体积; 10 为稀释倍数; 6.58 为波长 510nm 处 1μmol 底物的吸光度; 0.1 为检测体系中过氧化物酶活力。

1.7 数据处理

所有数据均采用 SPSS 统计软件进行分析处理, 利用方差分析(ANOVA)来检验各组之间的显著性。

2 试验结果

2.1 添加酵母核苷酸对凡纳滨对虾生长的影响 (见表 1)

从表 1 可以看出, 饲料中添加酵母核苷酸对凡纳滨对虾的生长有显著影响。试验组的增重倍数均比对

照组有所提高, 特别是 3 组比对照组提高了 39.4%。成活率除 1 组外, 各试验组和对照组没有显著差异。证明在饲料中添加酵母核苷酸可以提高凡纳滨对虾的生长速度。

表 1 试验结果

组别	饲料系数	成活率(%)	增重倍数
对照组	1.27±0.03 ^a	87.38±1.32 ^a	9.21±1.10 ^a
1 组	1.25±0.10 ^a	82.13±1.93 ^b	10.36±2.07 ^{ab}
2 组	1.23±0.09 ^a	87.00±4.53 ^a	11.72±2.52 ^b
3 组	1.19±0.07 ^b	88.63±6.06 ^a	12.84±3.12 ^b

注: 同列中相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著。

2.2 添加酵母核苷酸对凡纳滨对虾饲料系数的影响

饲料系数是评价饲料质量的一项重要指标。从表 1 可以看出, 对照组的饲料系数为 1.27, 而试验组均比对照组有所下降, 3 组比对照组下降了 6.3%。统计结果分析, 1 组和 2 组与对照组没有显著差异, 但与 3 组存在着显著差异。证明在饲料中添加 516g/t 的酵母核苷酸可以提高饲料利用效率, 降低饲料系数。

2.3 添加酵母核苷酸对提高凡纳滨对虾耐低氧的影响 (见表 2)

表 2 耐低氧试验结果

项目	对照	1 组	2 组	3 组
死亡一半所需要的时间 (min)	195±102	255±102	360±161	330±164
比对照组延长时间 (min)		60	165	135

从表 2 可以看出, 在一定的水体中(1L), 对照组死亡达到一半时的时间最短, 2 组和 3 组差别不是很大。

2.4 添加酵母核苷酸对凡纳滨对虾耐低温的影响

随着用冰块缓慢降低温度, 凡纳滨对虾逐渐开始出现死亡。由于在饲料中添加了不同含量的酵母核苷酸, 出现死亡一半时的最低温度也不尽相同。2 组和 3 组比对照组出现死亡一半时的温度下降了 1℃, 结果见表 3。

表 3 耐低温试验结果

项目	对照	1 组	2 组	3 组
死亡一半时的温度 (℃)	11.58±0.17	10.76±0.27	10.53±0.29	10.50±0.21
比对照组降低的温度(℃)		0.82	1.05	1.08

2.5 添加酵母核苷酸对凡纳滨对虾非特异性免疫功能的影响

2.5.1 添加酵母核苷酸对肌肉中酸性磷酸酶(ACP)

活性的影响

在饲料中添加酵母核苷酸,凡纳滨对虾肌肉组织提取液中 ACP 活性的测定结果如表 4 所示。肌肉中的 ACP 活性虽然有所上升,但与对照组虾相比,没有明显差异。

表 4 添加酵母核苷酸对凡纳滨对虾肌肉中 ACP、LZM、SOD、POD 的影响

项目	0 组	1 组	2 组	3 组
ACP (金氏单位)	2.52±0.23	2.65±0.56	2.71±0.47	2.68±0.31
LZM(U/ml)	1.36±0.25 ^a	2.47±0.14 ^b	2.63±0.24 ^b	2.39±0.19 ^b
SOD (Nu/mg)	62.05±5.82 ^a	70.36±9.30 ^b	77.53±7.56 ^c	67.1±8.51 ^b
POD(U/ml)	4.31±0.34 ^a	4.52±0.54 ^{ab}	4.89±0.33 ^b	5.66±0.58 ^c

注:1.Nu/mg 是通过亚硝酸盐单位(Nu/ml)换算而来的。

2.同行中相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著。

2.5.2 添加酵母核苷酸对肌肉中 LZM 活性的影响

在饲料中添加酵母核苷酸,凡纳滨对虾肌肉组织提取液中 LZM 的测定结果见表 4。试验组虾肌肉中的 LZM 较对照组有所上升,统计结果表明,试验组和对照组之间存在显著差异。

2.5.3 添加酵母核苷酸对肌肉中 SOD 活性的影响

在饲料中添加酵母核苷酸,凡纳滨对虾肌肉组织提取液中 SOD 活性的测定结果见表 4。试验组虾肌肉中的 SOD 活性较对照组有所上升。统计结果表明,试验组和对照组之间存在显著差异,并且 2 组和 1 组、3 组之间也存在显著差异。

2.5.4 添加酵母核苷酸对肌肉中 POD 活虾影响

在饲料中添加酵母核苷酸,凡纳滨对虾肌肉组织提取液中 POD 活性的测定结果如表 4 所示。试验组肌肉中的 POD 活性较对照组有所上升。统计结果表明,除 1 组和对照组之间不存在显著差异外,2 组和 3 组之间均与对照组之间存在显著差异。

3 讨论

3.1 关于免疫促生长剂的给予方法

免疫促生长剂因具有有效地改善机体免疫能力、促进生长以及良好的抗应激能力,近十几年来在水产养殖中有着广泛的应用。实际使用时,有不少外源因素和内在因素影响免疫增强剂的应用效果。其中一个最重要的因素就是作用方式的选择,即使是同一种物质,不同的使用方法(如注射、浸泡和口服等)也会产生不同的效果。在不同的使用方法中,注射法被视为是一种最为有效的方法,包括腹腔注射和静脉注射,而腹腔注射相对好操作,易于被采纳;浸泡法一般

用于幼体或较小个体,其使用在一定程度上受到个体大小的限制;在实际生产操作中,口服法因可操作性强、不受水产动物个体大小限制以及不给机体带来应激反应等优点,被视为是最为合适、最易被接受的一种操作方式^[12,13]。基于这一点,本次试验将酵母核苷酸添加到饲料中,通过口服方式验证其作用效果。

3.2 关于添加免疫促生长剂对生长的评价

目前,对生长的评定主要还是通过在室内或室外养殖一段时间,然后测量体长、体重以及成活率作为指标。规格大、产量高,说明添加剂的效果好,这是最直接的方法^[9]。

饲料系数是用来衡量配合饲料的质量好坏以及鱼、虾对配合饲料的利用程度。用饲料系数评定饲料质量的好坏较为准确可靠,因为它综合了有关配合饲料质量的各项指标以及鱼虾本身对配合饲料的利用程度^[14]。

3.3 关于非特异性免疫评价

利用给予各种免疫激活剂的方法,通过提高水产养殖动物的免疫功能和免疫调节能力而达到预防传染性疾病的目的是,已经为国内、外众多研究者所关注^[15-17]。在评价免疫激活剂对水产动物免疫系统的激活效果时,常用的指标是能否增强吞噬细胞活性、对淋巴细胞的促分裂作用、激活补体和溶菌酶的效果以及促进抗体生成的作用等^[8],在本次试验中,采用了 ACP、SOD、LZM、POD 等活性变化作为评价指标。SOD 是一种重要的抗氧化酶,可清除超氧阴离子自由基,使自由基的产生与消除处于一个动态平衡状态,从而减少超氧阴离子自由基对生物体自身的损伤。ACP 是巨噬细胞内溶酶体的标志酶,是溶酶体的重要组成部分,已经有研究结果证明,在甲壳动物血细胞进行吞噬和包围化的免疫反应中,会伴随有 ACP 的释放。POD 广泛存在于动物、植物及微生物体内,是生物体内重要的酶类之一,参与多种生理代谢反应。溶菌酶又称细胞壁质酶,广泛存在于自然界动物、植物和微生物的组织、体液以及分泌物中。溶菌酶在引发和维持机体防御免疫的过程中起着重要的作用,它在机体免疫过程中除了溶解细菌细胞壁外,还可诱导和调节其它免疫因子的合成与分泌。

本次结果证实了在饲料中添加酵母核苷酸可以显著提高凡纳滨对虾肌肉组织中的 LZM、SOD 和 POD 活性,提高机体免疫水平;ACP 的活性则没有显著差异,可能原因是 ACP 在不同组织中含量分布有关。

3.4 酵母核苷酸的适宜添加量

甲壳素在中华鳖养殖中的应用

魏文志 付立霞 黄薛俊 丁建梅

摘 要 在基础饲料中分别添加 0(对照组)、0.3%、0.6%、1.2% 的甲壳素,用其饲养中华鳖 31d 后,测定中华鳖增重率、成活率及血清中溶菌酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶的活性。结果表明,添加 0.6% 的甲壳素能显著促进中华鳖的生长和非特异性的免疫能力。

关键词 甲壳素;中华鳖;溶菌酶;酸性磷酸酶;碱性磷酸酶;超氧化物歧化酶

中图分类号 S966.5

甲壳素是虾、蟹等甲壳动物,蚕、蝇等昆虫外骨骼的主要成分,是地球上数量最大的含氮有机化合物,也是自然界中贮量仅次于纤维素的第二大天然有机物质,每年自然界合成的甲壳素近 100 亿吨,目前甲壳素已经广泛应用于食品、环保、纺织、医药卫生、农业等领域。在水产业中的应用,主要是作为饲料添加剂和免疫增强剂。胡品虎^[1]报道,稀土甲壳素有促进河

蟹生长,显著提高河蟹产量和河蟹规格,并且具有防治河蟹蜕壳障碍症,减少疾病,降低死亡率的效果。向泉^[2]等报道,甲壳素能促进罗非鱼的生长并降低饲料系数;Kono M^[3]等报道了甲壳素具有促进真鲷、日本鳗鲡及黄尾笛鲷增重率的效果。但一直未曾见到甲壳素在中华鳖养殖中的相关研究和应用的报道。本文的目的在于探讨甲壳素在中华鳖中应用的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用幼鳖购自扬州市邗江水产公司,选择体重为 (8.99 ± 1.024) g 的健康幼鳖 144 只,分成 12 箱,每 3 箱为一试验组,饲喂基础饲料训养 1 周后开始实验。

魏文志,扬州大学动物科学与技术学院,讲师,225009,江苏扬州。

付立霞、黄薛俊、丁建梅,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-01-16

从以上结果可以看出,在饲料中添加酵母核苷酸的对虾,无论是增重倍数、饲料系数,还是抗应激以及提高非特异性免疫方面均显著优于对照组。酵母核苷酸具有显著促生长、提高机体抗应激以及增强机体免疫能力的作用。结合生长和免疫两方面考虑,建议适宜的添加量为 344g/t。

参考文献

- 1 王吉桥.南美白对虾生物学研究与养殖[M].北京:海洋出版社,2003
- 2 王广军.南美白对虾的生物学特性及繁殖技术[J].水产科技情报,2000,29(3):128~130
- 3 宋理平,张宇峰,闫大伟.中草药作为免疫增强剂在水产动物上的应用[J].饲料工业,2005,26(6):10~12
- 4 谭北平.对虾和贝类非特异性免疫增强剂的研制与应用[J].饲料工业,2005,26(10):1~6
- 5 凌统,程树东,李英文.免疫增强剂—— β -葡聚糖在水产饲料中的应用[J].饲料工业,2005,26(12):36~38
- 6 宋理平,宋晓亮,董文,等.虾类免疫系统及其免疫增强剂的研究[J].饲料工业,2005,26(22):48~55
- 7 王兰芳,乐国伟,施用晖.日粮核苷酸对早期断奶小鼠生长发育的影响[J].无锡轻工大学学报,2003,22(4):18~22
- 8 冯尚连.核苷酸和低聚糖对仔猪生产性能的影响[J].中国饲料,2000(17):14~16
- 9 施用晖,乐国伟,刘建文,等.外源核苷酸对肉鸡生产性能的影响[J].

无锡轻工大学学报,2000,19(6):597~600

- 10 苗玉涛,王安利.核苷酸在苏氏芒鲶配合饲料中的应用效果[J].广东饲料,2005,14(2):36~37
- 11 Burrells C, Williams P D, Southgate P J, et al. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds -2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) [J]. Aquaculture, 2001(199):171~184
- 12 王军.免疫添加物对大黄与血液白细胞数量及吞噬功能的影响.海洋科学,2001,25(9):17~19
- 13 Kakuta I, Kurokura H. Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against *Cryptocaryon* irritants infection of red sea bream[J]. Fish Pathology, 1995(30):289~290
- 14 李爱杰.水产动物营养与饲料学[M].北京:中国农业出版社,1994.177~184
- 15 Cheng T C. The role of lysosomal hydrolases in molluscan cellular response to immunologic challenge[J]. Comp. Pathobiol., 1978(4): 59~71
- 16 Hashimoto T, Ohno N, Yadomae T. Subgrouping immunomodulating β -glucans by monitoring IFN- γ and NO syntheses [J]. Drg Develop. Res., 1997,42(1):35~40
- 17 陈昌福,陈莹,陈超然,等.水产甲壳动物的免疫防御机能及其免疫预防研究进展[J].华中农业大学学报,2003,22(2):197~203
- 18 牟海津,江晓路,刘树青,等.免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响[J].青岛海洋大学学报,1999,29(3):463~468 (编辑:孙崎峰,sqf0452@126.com)

实验在玻璃顶温室内的水族箱中进行,水族箱规格 1.5m×0.5m×0.7m,水深 0.3m,内设 0.4m×0.1m 的木板作为食台,放置水花生作为鳖隐蔽和休息场所。实验时间为 2005 年 9 月 16 日~10 月 16 日,水温 25~30℃。甲壳素来自济南海得贝海洋生物工程有限公司,基础饲料为宝应县东阳特种饲料有限公司幼鳖料,具体成分见表 1。

表 1 基础饲料成分(%)

组分	水分	粗蛋白	粗脂肪	粗纤维	粗灰分	钙	总磷	挥发性盐基氮
含量	≤10.0	≥47.0	≥4.5	≤1.5	≤17.0	3~5	≥1.5	≤1.0

1.2 实验设计

采用单因素实验设计方法,基础饲料中分别添加 0、0.3%、0.6%、1.2%的甲壳素,共 4 组,每组 3 个重复。

1.3 饲养管理

采用逐级扩大方法将甲壳素加入基础饲料中,并混匀成实验饲料。投喂时按 $V(\text{饲料}):V(\text{水})=10:8$ 的比例,并加入数滴色拉油,混成饼状饲料。投喂时将饼状饲料粘于食台上,日投喂量为鳖体重的 3%,每日投喂 2 次,分别为上午 9 时和下午 4 时。

1.4 生长测定

放养时及每 15d 分别测鳖体重一次,计算池中鳖的总重量和成活率,并调整投喂量。其中:平均增重率(%)=[(结束平均重-初始平均重)/初始平均重]×100%;成活率(%)=(结束时数量/初始时数量)×100%。

1.5 血清制备

从各实验组中各随机抽取 10 只鳖,断头取血,室温放置 1h,3 000r/min 离心 15min,取血清,-18℃保存备用。

1.6 溶菌酶活力的测定

溶菌酶活力测定按 Hultmark 等^[4]采用的试管法进行。用 0.1mol/l 的磷酸钾缓冲液将溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*) (来自中科院微生物研究所)配成悬液($OD_{570} \approx 0.3$),取 3ml 悬液于试管内冰浴,再加入 50μl 待测样品,混匀后测其吸光度(A),然后将试管于 37℃温浴 30min 后,取出,冰浴 10min 终止反应,测吸光度(A_0),溶菌酶活力=(A_0-A)/ A_0 。

1.7 酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的测定

均采用磷酸苯二钠法^[5]:酸性磷酸酶以每 100ml 血清在 37℃与底物作用 60min,产生 1mg 酚者定义为一个酶活力单位;碱性磷酸酶以每 100ml 血清在 37℃与底物作用 15min,产生 1mg 酚者定义为一个酶活力

单位。

1.8 超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定

血清中 SOD 活力的测定采用连苯三酚自氧化法^[6]。测定时,在 150mmol/l pH 值为 8.3 的 4.5ml 磷酸缓冲液中加入 50mmol/l 邻苯三酚 10μl,迅速摇匀,倒入光径 1cm 的比色杯中,在 325nm 波长下每隔 30s 测 A 值 1 次,要求自氧化速率每分钟 OD 值变化约 0.07。活力测定方法与上相同,加入邻苯三酚前,加入待测 SOD 样,得数据按下式计算酶活力。酶活单位定义:每毫升反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50%的酶量为 1 个酶活单位(U/ml):

$$\text{酶活性 (U/ml)} = \left[\frac{\left(\frac{0.070 - A_{325\text{nm}}/\text{min}}{0.070} \right) \times 100\%}{50\%} \right] \times \frac{\text{反应液总体积} \times \text{样液稀释倍数}}{\text{样液体积}}$$

注: $A_{325\text{nm}}/\text{min}$ 为在 325nm 下,以时间为横坐标、吸光度为纵坐标所得回归直线的斜率。

1.9 数据处理

所得数据利用 Excel 进行单因素方差分析和 Duncan's 多重比较进行统计分析。

2 结果

2.1 甲壳素对中华鳖生长的影响(见表 2)

表 2 甲壳素对中华鳖生长的影响

项目	初始平均重(g)	结束平均重(g)	平均增重率(%)	成活率(%)
对照组	8.917±0.149	9.551±0.320	17.89 ^c	52.766 ^a
0.3%组	8.977±0.153	10.262±0.348	20.39 ^b	63.867 ^a
0.6%组	9.022±0.035	11.217±0.650	24.69 ^a	72.233 ^a
1.2%组	9.171±0.175	10.459±0.251	20.06 ^b	50.033 ^a

注:同列中肩标相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

经 31d 的饲养试验,添加甲壳素组增重率显著高于不添加组,顺序依次为 0.6%组>0.3%组>1.2%组>对照组,且添加 0.6%组高于对照组 38.01%。成活率未见显著差异。

2.2 甲壳素对中华鳖非特异性免疫功能的影响(见表 3)

2.2.1 溶菌酶活力

溶菌酶活力以 0.3%组最高,和其它 3 组相比差异显著。

2.2.2 酸性磷酸酶和碱性磷酸酶

酸性磷酸酶以 0.6%组最高,但组间差异不显著。碱性磷酸酶添加甲壳素各组均显著高于对照组,且以 0.6%组最高。

2.2.3 超氧化物歧化酶活力

表 3 甲壳素对中华鳖免疫指标的影响

项目	溶菌酶(U/ml)	酸性磷酸酶(U/mg)	碱性磷酸酶(U/mg)	超氧化物歧化酶(U/ml)
对照组	0.033 4±0.012 6 ^a	6.965±2.665 ^a	8.479±0.198 ^a	156.779±16.445 ^a
0.3%组	0.098 0±0.015 6 ^b	7.952±1.924 ^a	20.789±3.369 ^{bc}	176.133±27.255 ^a
0.6%组	0.058 0±0.015 5 ^a	11.390±1.643 ^a	27.147±3.789 ^b	779.472±107.884 ^b
1.2%组	0.047 5±0.010 5 ^a	9.735±2.565 ^a	18.823±6.621 ^c	438.175±80.865 ^c

注:同列中相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著(P<0.05)。

超氧化物歧化酶活力 0.6%、1.2%组均显著高于其它 2 组,且 0.6%组显著高于 1.2%组。

3 讨论

3.1 甲壳素对中华鳖生长的影响

甲壳素是从虾、蟹等甲壳动物和蚕、蝇等昆虫外骨骼中提取出来的天然物质,本实验中添加 0.6%的甲壳素时,明显的促进了中华鳖的生长。据报道,甲壳素之所以能促进水产动物生长,是因为它能够吸附氢离子(H⁺),结合相当数量的酸性物质,抑制胃酸分泌,从而保护胃粘膜。由于甲壳素吸附了 H⁺,可以使体液 pH 值倾向碱性,同时也能够促进肠道内双歧杆菌的生长而有益于改善内环境^[7]。也有报道认为,水产动物消化道内有内源性甲壳素酶,能够消化甲壳素,从而为水产动物提供能量^[8]。但当甲壳素添加量超过一定限度时,反而会抑制生长。Shi-Yen Shiau^[9]报道,在罗非鱼饲料中添加 10%的甲壳素时,抑制了罗非鱼的生长,其原因可能是甲壳素的量超过了鱼体内酶的分解能力。中华鳖食性以动物性为主,小蟹、小虾和一些水生昆虫是中华鳖喜食的饵料之一,中华鳖消化道内有无甲壳素酶,如果有其活力的大小如何,仍有待于进一步的研究。

3.2 甲壳素对中华鳖非特异性免疫功能的影响

甲壳素具有促进动物机体免疫的功能在畜禽、水产上均有报道。黄俊明等^[10]报道,通过口服甲壳素能提高绵羊红细胞诱导的小鼠迟发型变态反应能力,增强受试动物的血清溶血素抗体反应和巨噬细胞的吞噬反应。张莉等^[11]在鸡的颈部皮下注射甲壳素疫苗后发现,鸡 T 淋巴细胞的免疫功能显著增强。在水产上, Sakai^[12]向虹鳟腹腔内注射甲壳素,饲养 6 周后,发现甲壳素能提高虹鳟巨噬细胞的吞噬活性和呼吸爆发能力。以注射的方式将甲壳素应用在水产动物上并不是很现实,因此, M. A. Esteban^[13]在金头鲷饲料中添加甲壳素,同样发现了甲壳素能增强金头鲷体液和细胞免疫应答活力、天然淋巴补体活性、呼吸爆发能力及吞噬活性。溶菌酶是吞噬细胞杀菌的物质基础;酸性磷酸酶和碱性磷酸酶都是巨噬细胞溶酶体酶的重要组成部分,在体内均直接参与磷酸基团的转移和代

谢;超氧化物歧化酶是一种抗氧化酶,可清除体内自由基,保护细胞免受损害,使细胞能正常合成各种酶类,增强吞噬细胞活性。因此,以上 4 种酶对整个机体的非特异性免疫功能具有重要的作用,除了酸性磷酸酶外,甲壳素能显著促进其它 3 种酶的活性,也说明了甲壳素能促进中华鳖的非特异性免疫功能。

参考文献

1 胡品虎. 稀土甲壳素在河蟹养殖中的应用[J]. 水产养殖, 1999(5): 13-14

2 向泉, 向勇, 冯君, 等. 甲壳素和左旋咪唑对罗非鱼的实验[J]. 饲料研究, 2002(12):4-6

3 Kono M, Matsui T, Shimizu C. Effect of chitin, chitosan, and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1987, 53(1):125-129

4 Hultmark D. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. European Journal of Biochemistry, 1980 (106):7-16

5 宋善俊. 临床医师手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 185-187; 199-200

6 邓碧玉, 袁勤生, 李文杰. 改良的连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(2):163

7 徐春来, 汪以真. 甲壳素在水产养殖中的应用[J]. 中国饲料, 2005 (7):30-32

8 Gabriel J H Lindsay, M. J. Walton. The growth of rainbow trout (*salmo gairdneri*) given diets containing chitin and its relationship to chitinolytic enzymes and chitin digestibility [J]. Aquaculture, 1984 (37): 315-334

9 Shi-Yen Shiau, Yi-Ping Yu. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* [J]. Aquaculture, 1999(179):439-446

10 黄俊明, 吴丽明, 陈瑞仪. 甲壳素和壳聚糖对小鼠免疫调节的研究. 广东卫生防疫, 1999, 25(1):4-6

11 张莉, 尹燕博, 崔尚金, 等. 甲壳素、油乳剂和蜂胶对鸡新城疫疫苗免疫调节作用的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(2): 136-138

12 Sakai D K. Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish [J]. Annual Review of Fish Diseases, 1992(2): 223-247

13 M. A. Esteban, A. Cuesta, J. Ortuño, et al. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2001(11): 303-315

(编辑: 高 雁, snowyan78@tom.com)

养殖池塘里套放小体积网箱养殖黄颡鱼试验

邓学莲 周龙飞 秦永波

1 试验材料和方法

1.1 池塘条件

养殖池塘面积为 8 340m²,长方形,条石池埂,东西走向,平均水深 2.30m,水中泥沙含量较少,透明度 35cm 左右,周围没有工矿企业污染,溶氧充足,一般在 5.5mg/l 左右。4~10 月份的水温在 16~32℃之间,平均水温 20℃。

1.2 网箱的制作与设置

1.2.1 网箱的制作

网箱采用 3×4 聚乙烯单层网片制成,网目为 2cm,网箱的规格为 1m×1m×1.1m。网箱上方设有遮光盖,网箱底部用直径为 8mm 的圆钢焊接成 1m×1m 方框,固定在小体积网箱的底部,保持网箱的形状和作为网箱的沉子。在网箱的中间垂直放置一根直径为 110mm 的聚乙烯(PE)管作为投饲管,PE 管底端距网箱底部 15cm,投饲管上端在遮光盖以上 20cm,便于投饲料。网箱底部及周围网片下部 18cm 处用 30 目的筛绢做成饲料台。

1.2.2 网箱的设置及增氧设施

在池塘的中央配备一台功率为 3kW 叶轮式增氧机,在距增氧机 2~3m 的四周平均放置 4 个小体积网箱。每个小体积网箱配备 1 台 60W 的充气泵,以备缺氧时使用。

1.3 鱼种放养前的准备及鱼种的放养

在鱼种放养前 10d,装好网箱,固定在池塘预定的位置,使其附着少许的藻类,以防擦伤鱼体。

试验用黄颡鱼、鲤鱼、鲢鱼、鳙鱼鱼种都来源于丰都县鱼种场,体质健壮、规格整齐、活动敏捷,鱼种在入箱(池)时用 15g/l 的食盐水浸泡 3~10min。黄颡鱼平均每尾体重为 21.6g,体长为 7~8cm,每个网箱放养黄颡鱼种 220 尾。箱外放养鲤鱼 10 300 尾,平均每尾体长为 6~8cm;鲢鱼 1 536 尾、鳙鱼 1 100 尾,其规格平均每尾体长为 12~14cm。

1.4 饲料及其投饲

1.4.1 投饲时间及投饲次数

箱内黄颡鱼的投饲是直接从投饲管里投下,每日投喂 2 次,分别在 6:00、19:00 投喂。在通常情况下,饲料入箱后 10min 内吃完,若 15min 还有残饵,应及时分析原因,采取措施,调整投饲量。箱外鲤鱼种在 150g 以下时日投饲次数为 3 次,分别在 8:00、12:00、16:00 投喂;150g 以上日投饲次数为 2 次,分别在 8:00 和 16:00 投喂。鲤鱼投饲地点应远离小体积网箱,目的是投饲时箱内、外鱼类互不影响。根据表 1 来选择投饲粒径。

表 1 饲养鱼规格与相应颗粒饲料粒径的大小

体长(cm)	体重(g)	颗粒粒径(mm)
6~8	10~15	1
8~12	15~30	2
12~15	30~60	2.5
15~23	60~250	3.5
23~30	250~500	4
30 以上	500 以上	5

1.4.2 投饲数量

箱内、外的投饲数量根据吃食性鱼类总重量来计算,具体方法是分别随机抽取箱内、外的吃食性鱼类 50~100 尾称总重,计算出鱼的平均体重,再根据表 2 鱼投饲率参考表,按日投饲量公式计算出箱内、外日投饲量。生长旺季,日投饲量每隔 10d 调整一次。

$$W=\omega \times M \times R \times F$$

式中:W——网箱内(外)的日投饲量(kg);

ω ——抽样鱼平均体重(kg/尾);

M——网箱内(外)放养鱼的尾数(尾);

R——平均成活率(%);

F——该水温条件下的日投饲率(%)。

表 2 日投饲率(%)

水温(℃)	鱼体重规格(g/尾)								
	<15	25	50	100	150	200	300	400	500
16~19	4.2	3	2.5	2.2	2.1	2	1.7	1.5	1.3
20~24	5.6	4	3.4	3	2.8	2.6	2.2	2.0	1.7
25~32	7	5	4.2	3.7	3.5	3.3	2.8	2.5	2.2

1.5 日常管理

加强日常管理是本试验重要工作之一。为防止箱内黄颡鱼缺氧,3~5d 必须清洗附着在网箱上的藻类和其它污垢,同时观察网箱是否有破损。加强巡塘,一

邓学莲,重庆市丰都县水产科技推广站,水产工程师,408200,重庆市丰都县新湾路 49 号。

周龙飞、秦永波,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-01-04

复合生态添加剂对断奶仔猪生产性能与血液生理生化指标的影响

宋凡 曹国文 戴荣国 陈春林 周淑兰 徐登峰 郑华

摘要 试验通过以蜡样芽孢杆菌、乳酸杆菌和酵母菌等多种益生菌制成的猪用复合生态饲料添加剂,进行60d仔猪饲喂试验,观察其对断奶仔猪生产性能与血液生理生化指标的影响。试验结果表明:猪用复合生态饲料添加剂能显著提高断奶仔猪日增重(23.2%),明显降低料耗(6.8%)和腹泻发生率(84.6%),提高仔猪血液中淋巴细胞转化率(7.06%)和血清中ALP(碱性磷酸酶)活性(20.61%),对仔猪血清中ALT(谷丙转氨酶)、AST(谷草转氨酶)活性分别降低4.46%和24%,对仔猪血液中TP(血清总蛋白)、GLB(血清球蛋白)和WBC(白细胞数)等生化指标的含量无明显影响。表明猪用复合生态饲料添加剂可明显提高断奶仔猪生产性能和抗病力,是一种可以替代抗菌促长剂的安全无公害饲料添加剂。

关键词 复合生态添加剂;仔猪;生产性能;血液生理生化指标

中图分类号 S816.32

1 材料与方法

宋凡,重庆市畜牧科学研究院,畜牧师,402460,重庆市荣昌县城昌州中段770号。

曹国文、戴荣国、陈春林、周淑兰、徐登峰、郑华,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-01-23

★ 基金项目:重庆市科委攻关项目(编号:2002-20)资助

旦缺氧,及时开启增氧机和充气泵,保证养殖鱼类正常呼吸。观察鱼的健康状况、摄食情况、生长情况和水质环境情况。做好日常记录,每天测定水温,记录天气情况、投饲情况和摄食情况。适时向池塘加注新水,保证箱内外水体充分及时交换。

2 试验结果与分析

2.1 试验鱼产量与饲料消耗情况

经过7个月左右的养殖,池塘具体产鱼情况如下:黄颡鱼52kg、鲤鱼9199kg、鲢鱼1618kg、鳙鱼1226kg。在试验过程中,使用了黄颡鱼饲料116kg,其饵料系数为2.23;鲤鱼饲料17478kg,其饵料系数为1.90;鲢鱼、鳙鱼吃水体中的浮游生物。

2.2 成本分析

2005年丰都县的鱼价比较好,黄颡鱼市场价达到50~60元/kg,鲤、鳙鱼市场价达到8元/kg,鲢鱼市场价达到6元/kg。总共收入95708元,减去鱼种费2980元、饲料及鱼药费49396元、池塘承包费8960元、劳务费4000元、设备折旧费312元,利润30060元,平均每666.7m²利润为2403元。

3 问题讨论

3.1 池塘套放小体积网箱的养殖特点

池塘套放小体积网箱养殖模式是把同一个池塘里的主养鱼类、名特鱼类和辅助鱼类结合起来,充分发挥池塘的最大养殖潜力。具体表现在以下几点:①

1.1 试验设计

选择健康的40日龄断奶仔猪24头(长白×荣昌二元杂交),按体重相近,公母各半的原则随机分为2组,一组为微生物饲料添加剂组、另一组为空白对照组,每组3个重复,每个重复4头猪,试验前给猪接种猪瘟弱毒疫苗,预试期一周。

1.2 试验材料

在不影响主养鱼产量的前提下,适量放置小体积网箱养殖黄颡鱼,每666.7m²可增收200元左右(与该渔场没有设置小体积网箱养殖的池塘相比);②能有效的控制主养鱼类与名特鱼类的市场价格,小体积网箱养殖的黄颡鱼可以均匀上市提供给高收入群体,这样始终能保持黄颡鱼较高的市场价格,减少养殖风险;③不同价值的饲料完全分给了不同价值的鱼类,这是传统的池塘养殖达不到的。小体积网箱养殖的名特鱼类,投喂的是高价值饲料,在向箱内投喂饲料时,箱外中、低档鱼类不能吃到;同样箱外投饲料时,箱内的名特鱼类也不能吃到,这样有利于降低饵料系数和养殖成本,从而大大提高了养殖户的养殖利润。

3.2 合理的放养密度及单位面积小体积网箱的设置

如何确定合理的放养密度及单位面积设置小体积网箱的个数,可根据以下几点:①水质好,水源丰富,溶氧丰富,有害气体和淤泥少。②鱼的种类不同,生物学特性也不同,对溶氧需求也不同,放养的规格、种类可随之调整。③通过对历年各类鱼的放养量、产量、出塘时间、规格等技术参数的分析及综合评估来计算鱼类的放养密度及设置小体积网箱的个数。

试验表明,池塘适量套放小体积网箱养殖模式产量高,回收投资快,利润高,风险小,管理方便,可进一步挖掘池塘的生产潜力,是渔民致富的新途径。

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

1.2.1 猪用复合微生态饲料添加剂

试验用复合微生态饲料添加剂由重庆市畜牧科学研究所《畜禽微生物饲料添加剂的研究》项目组提供。主要成分为蜡样芽孢杆菌、乳酸菌与酵母菌,含活菌数为 5×10^9 个/g,添加量为 0.2%。

1.2.2 试剂盒

碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒、谷丙转氨酶 (ALT) 试剂盒、谷草转氨酶 (AST) 试剂盒、总蛋白 (TP) 试剂盒、白蛋白 (ALB) 试剂盒均由中生北控生物科技股份有限公司提供。

1.2.3 试验仪器

全自动生化分析仪 (AGII) 和 Gentra-MP49 离心机 (2438) 由美国生产。

1.2.4 基础日粮及饲养管理

试验于 2005 年 9 月至 2005 年 11 月在重庆市畜牧科学研究所猪场进行,试验期为 60d。基础日粮及营养水平两组相同 (见表 1),饲养管理按常规进行,自由饮水、自由采食,并观察统计试验期间猪腹泻发生情况。

表 1 基础饲料组成及营养水平

饲料组成	含量 (%)	营养水平	
玉米	62.5	消化能 (MJ/kg)	12.92
豆饼	14.0	粗蛋白 (%)	16.13
麦麸	9.0	赖氨酸 (%)	0.91
菜籽饼	6.0	蛋氨酸+胱氨酸 (%)	0.61
蚕蛹	2.0	钙 (%)	0.72
米糠	3.4	总磷 (%)	0.67
磷酸氢钙	1.4		
碳酸钙	0.8		
食盐	0.3		
赖氨酸	0.1		
矿物添加剂	0.5		
合计	100.0		

注:矿物添加剂约含 Cu 9mg、Fe 100mg、Zn 110mg、Mn 60mg、复合多维 200mg。

1.3 试验指标的测定与分析

1.3.1 测定指标及方法

试验猪在每个阶段起始和结束时空腹 12h 称重,同时结算剩余料。测定平均日增重 (ADG)、耗料增重比 (F/G) 及腹泻率 (DR)。

1.3.2 血清样品采集与制备

于试验第 35d 早晨空腹,前腔静脉采血 2 管,1 管血样在室温下静置半小时,待血清析出后于 2 000~2 500r/min 离心 10min,制得血清样品备用;另 1 管血样加肝素钠抗凝,供血细胞分类计数用。

1.3.3 血液生理生化指标测定

测定方法按试剂盒说明:碱性磷酸酶 (ALP) 采用磷酸苯二钠法、谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 采用赖氏法、总蛋白 (TP) 和白蛋白 (ALB) 采用双缩脲法、淋巴细胞率 (LY%) 采用《兽医免疫学》^[1] 中的方法进行测定,其它指标按常规测定方法测定。

1.3.4 数据处理与分析

数据均用 SPSS 统计软件进行分析,并以平均数±标准差表示。

2 试验结果

2.1 复合微生态饲料添加剂对断奶仔猪的 ADG、F/G 及 DR 的影响 (见表 2)

从不同试验阶段来看,0~30d 阶段:ADG 试验组与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$),生长速度提高 48.98%;F/G 试验组优于对照组,试验组的 F/G 比对照组降低 25.69%,差异显著 ($P < 0.05$)。31~60d 阶段:ADG 试验组较对照组提高 12.40%,差异显著 ($P < 0.05$);F/G 试验组较对照组降低 2.92%,无显著差异。0~60d 阶段:ADG 试验组较对照组有显著差异 ($P < 0.05$),生长速度提高 23.2%;试验组 F/G 低于对照组 6.8%,组间无显著差异。

表 2 复合微生态添加剂对断奶仔猪 ADG、F/G 及 DR 的影响

	始重 (kg)	ADG (kg/d)			F/G			DR
		0~30d	31~60d	0~60d	0~30d	31~60d	0~60d	
对照组	7.5±0.26	0.245 ^a	0.597 ^b	0.418 ^b	2.18 ^b	2.74	2.50	79.9
试验组	7.4±0.18	0.365 ^a	0.671 ^a	0.515 ^a	1.62 ^a	2.66	2.33	12.3

注:同列间标各数据标示不同字母表示差异极显著 ($P < 0.01$) 或差异显著 ($P < 0.05$)。

从表 2 看出,试验组的腹泻率比对照组显著降低,降低幅度为 84.6%。表明复合微生态制剂有良好的抗腹泻作用。

2.2 复合微生态添加剂对仔猪血液生理生化指标的影响 (见表 3)

从表 3 可以看出:血清中 TP、GLB 含量,复合微生态添加剂组与对照组相比,无明显变化;血清中 ALT 和 AST 活性,复合微生态添加剂组与对照组相比,分别降低了 4.46% ($P > 0.05$)、24% ($P > 0.05$);血清中 ALP 活性较对照组提高了 25.97% ($P > 0.05$);血液中的 LY 百分率,复合微生态添加剂组比对照组提高 7.06% ($P > 0.05$);血液中 WBC、RBC、HGB、HCT、PLT 和 ALB 含量无明显变化。

3 讨论与分析

3.1 复合微生态添加剂的功能

表3 复合微生态添加剂对仔猪血液生理生化指标的影响($\bar{X} \pm SD$)

项目	复合微生态添加剂组	对照组
TP (g/l)	59.33±2.18	59.53±1.05
GLB(g/l)	23.17±1.49	23.73±1.48
ALB(g/l)	36.15±0.90	36.17±0.96
ALT(IU/l)	39.17±4.25	41.00±4.79
AST(IU/l)	38.00±6.37	50.00±4.28
ALP(IU/l)	261.17±27.82	207.33±15.48
PLT(10^9 个/l)	567.83±45.16	530.50±53.57
WBC(10^9 个/l)	17.65±1.48	19.83±1.19
RBC(10^{12} 个/l)	6.24±0.21	6.26±0.30
HGB(g/l)	117.00±4.73	122.00±6.18
HCT(%)	35.13±1.27	36.33±1.87
LY(%)	61.10±2.51	57.07±2.51

复合微生态添加剂中的不同功能微生物在体内生长代谢,可产生淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶等消化酶,可以明显加强机体对饲料中各种营养成分的消化吸收,提高饲料利用率。同时,益生菌还可产生大量的菌体蛋白和生理活性物质,促进动物机体的生长发育。制剂中的蜡样芽孢杆菌既能产生蛋白酶、脂肪酶,又能分泌过氧化物酶和多种营养因子。乳酸菌能够分解在常态下不易分解的木质素和纤维素,并可促进有机物的发酵分解,它能分泌细胞内乳糖酶,将乳糖分解成葡萄糖和半乳糖,半乳糖可被乳酸菌发酵成乳酸。而葡萄糖又可供给酵母菌进行发酵作用,当乳酸菌进入肠道后产生乳酸,使空肠内容物 pH 值下降,由于肠道酸化,又有利于铁、钙及其维生素等的吸收。酵母菌亦可产生淀粉酶、植酸酶等多种酶类,其代谢产物可促进结肠微生物的发酵,为动物增加养分的供应,合成特有的酶及其它辅助因子,增强动物对干物质的消化吸收率,同时酵母菌产生的单细胞蛋白也是动物不可缺少的养分。多菌合用,达到促进猪生长,提高饲料报酬的作用。

3.2 复合微生态添加剂对微生物生态系统的平衡作用

在动物肠道微生物系统内,微生物区系中的优势菌群对整个微生物生态系统的平衡起决定作用,一旦优势菌群发生更替,肠道微生物生态平衡将发生改变,从而导致动物腹泻病的发生,而微生态制剂具有调整肠道菌群功能,使用微生态制剂就可以恢复肠道优势菌群,微生态制剂中的芽孢杆菌、酵母菌进入畜禽消化道后生长繁殖,消耗肠内的氧气,使局部环境的氧分子浓度降低,氧化还原电势下降,造成局部厌氧环境,利于专性厌氧菌如双歧杆菌、乳酸菌等的定植和生长,而使需氧菌和兼性厌氧菌(致病性大肠杆菌、肠球菌、变形杆菌等)的数量减少,使肠道内微生物之间恢复平

衡状态。而本试验所用微生态添加剂中的乳酸杆菌在胃肠道内发酵产酸,使猪胃肠道内的 pH 值降低,从而抑制致病性大肠杆菌的生长,达到减少仔猪腹泻的目的。

3.3 血清 TP 和 GLB 含量变化

血清 TP 和 GLB 含量反应了机体蛋白的吸收和代谢状况,并反应与体液免疫力的关系。试验结果表明,猪用复合微生态饲料添加剂对其没有明显影响。

3.4 血清 ALP 的活性变化

血清 ALP 活性高低反应了动物的生长状况,尤其是具有遗传标记的同工酶,其活性高低可以反应生长速度和生产性能。朱年华研究表明,ALP 活性与猪的日增重呈显著正相关。试验结果表明,猪用复合微生态饲料添加剂组 ALP 较对照组提高了 25.97%($P > 0.05$)。由此看出,猪用复合微生态饲料添加剂可以提高仔猪日增重和饲料报酬的原因可能与提高 ALP 酶活性相关。

3.5 血液 LY(%)的含量变化

血清淋巴细胞转化率(LY%)常作为衡量机体免疫水平的指标,T 淋巴细胞转化率越高,表示淋巴细胞在外来因子的刺激下增殖率上升,机体的细胞免疫能力提高。本研究发现,微生物饲料添加剂组比对照组提高了 7.06%。表明微生态添加剂可以提高仔猪机体细胞免疫力。

3.6 血液中其它生理生化指标的影响

血液中 WBC、RBC、HGB、HCT、PLT 和 ALB 含量,试验组与对照组相比无明显变化,说明复合微生态饲料添加剂对猪的这些血液生理生化指标无明显影响。

试验结果表明,猪用复合微生态饲料添加剂可明显提高断奶仔猪生产性能和抗病力,是一种可以替代抗菌促长剂的安全无公害饲料添加剂,值得推广应用。

参考文献

- 1 杜念兴主编.兽医免疫学[M].北京:中国农业出版社,1999
- 2 杨洁彬,郭兴华.乳酸菌——生物学基础及其应用[M].北京:中国轻工业出版社,1996
- 3 何明清主编.动物微生物学[M].北京:中国农业出版社,1993
- 4 张先勤,葛长荣,田允波,等.中草药添加剂对生长育肥猪胴体特征和肉质的影响[J].云南农业大学学报,2002,17(1):86~90
- 5 朱年华,肖永祚.生长猪血液生化指标与生产性能及肉质的关系[J].江西畜牧兽医,1997,10(1):13~17

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

半乳甘露寡糖对肉兔生长性能、 屠宰性能和胃肠道 pH 值的影响

杜冰 吴襟 张敏 张朋 张蓓蓓

摘要 选择健康的 50 日龄新西兰肉兔 30 只,向肉兔日粮中分别添加半乳甘露寡糖(GMOS)和抗生素,经过 20d 的饲养试验,在肉兔 70 日龄时进行屠宰,通过测定肉兔各项生长指标,比较 GMOS 和抗生素对肉兔生长、屠宰指标及胃肠道 pH 值的影响效果。试验研究结果表明:试验组的兔存活率比对照组有所提高($P>0.05$),料重比、腹泻率则比对照组相对降低($P>0.05$),而在屠宰率及胃肠道 pH 值方面试验组与对照组相比差异不显著($P>0.05$),说明 GMOS 在替代抗生素方面有可行性。

关键词 肉兔;生长性能;半乳甘露寡糖;屠宰指标;胃肠道 pH 值

中图分类号 S829.1

Studies on the effect of galactomannan-oligosaccharides(GMOS)on growth performance,
butcher index and the pH of stomach and intestine for rabbits

Du Bing, Wu Jin, Zhang Min, Zhang Peng, Zhang Beibei

Abstract The healthy 30 rabbits were fed on the diets containing the additive of olaquinox or GMOS (Galactomannan-oligosaccharides) at the age of 50 days respectively. During three weeks, the indices of growth performance, the analysis of butcher index and the pH of stomach and intestine of these rabbits were measured and compared. At the age of 70 days old, butchered the rabbits for examining. The results showed the rate of feed conversion and diarrhea incidence of rabbits in group GMOS were lower than those in group olaquinox ($P>0.05$). The analysis of butcher index and the pH of stomach and intestine were insignificant of the two groups ($P>0.05$). The predominance of GMOS which replaced antibiotics was discussed by analyzing these indexes. It was indicated that the GMOS was able to replace some antibiotics as a kind of good additive in the feed.

Key words rabbits; growth performance; GMOS; butcher index; pH of stomach and intestine

当前,在畜禽日粮中通过添加抗生素改善动物的健康状态和提高动物的生产性能已经非常普遍,然而研究表明,在使用抗生素抑制病原微生物的同时,也抑制了动物体内生理性微生物,扰乱了肠道微生物种群或群落间相互制约的格局,破坏了微生物平衡,造成原籍菌或过路菌过度繁殖而出现定位转移,引起内源性感染或二重感染。因此,世界上许多国家已经禁止抗生素在日粮中的添加和使用,越来越多的国

内外学者进行深入研究,期望寻找一些无污染、无残留、促生长、多功能的绿色饲料添加剂来代替抗生素的使用。目前研究较多的绿色饲料添加剂主要有微生物制剂、中草药、低聚糖、酶制剂等。

寡糖亦称低聚糖(Oligosaccharides, OS),是指由 2~10 个单糖经脱水缩合由糖苷键连接形成的具有直链或支链的低度聚合糖类的总称。半乳甘露寡糖(Galactomannan-oligosaccharides, GMOS)是半乳甘露多糖的酶降解产物,主要由甘露糖和半乳糖组成,分子量一般在 360~1 800 之间,其不能被人 and 哺乳动物肠道内自身分泌的酶所降解利用,但能被肠道中某些细菌,特别是肠道中重要益生菌——双歧杆菌、乳酸杆菌等选择性利用,并显著促进这些益生菌的增殖,从而起到维持肠道健康、增强动物免疫机能和调节动物生长代谢等重要作用。

本试验向肉兔基础日粮中分别添加抗生素和半乳甘露寡糖制成的预混料,通过对比试验,研究半乳

杜冰,延边大学农学院动物科学系,在读硕士,133400,吉林省延边市。

吴襟,中国科学院微生物研究所。

张敏(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

张朋、张蓓蓓,北京中科艾迪动物营养保健技术有限公司。

收稿日期:2006-01-07

★ 中国科学院知识创新工程重要方向项目(No.KSCX2-SW-323)

甘露寡糖替代抗生素对肉兔生长性能、屠宰率的影响情况。

1 试验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗生素

喹乙醇。

1.1.2 半乳甘露寡糖

由北京中科艾迪动物营养保健技术有限公司提供。

1.1.3 试验动物及场地

选择健康的 50 日龄新西兰肉兔,共 30 只,试验设对照组和试验组,每组设 3 个重复,每个重复 5 只,各重复公母比例基本一致混养,连续喂养 20d。试验场所由中国科学院遗传与发育生物学研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 添加剂量

对照组:按 0.005%量添加喹乙醇。

试验组:使用半乳甘露寡糖制成的预混料,按 0.25%添加到饲料中。

1.2.2 饲养试验

1.2.2.1 饲养前准备

饲养前 10d 彻底清扫兔舍,进行常规消毒和彻底消毒,饲养前 3d 用二氧化氯消毒剂熏蒸消毒 24h,安装调试空调、照明设备,检查水源及下水装置,并控制好兔舍的温、湿度。

1.2.2.2 兔舍管理

采用笼养,其间进行常规免疫和饲养。采用颗粒料饲喂,兔自由采食和饮水。每天用二氧化氯消毒剂带兔消毒 2 次。兔舍温度在 15~20℃左右,湿度保持在 40%~60%。

1.2.2.3 试验日粮

试验日粮配方及营养水平见表 1。

表 1 试验日粮配方及营养水平

日粮组成	含量(%)	营养水平	
玉米	28.30	消化能(MJ/kg)	10
豆粕	10.00	粗纤维(%)	18.08
豆油	0.70	粗蛋白(%)	18.13
麸皮	18.00	粗脂肪(%)	6.38
石粉	1.00	钙(%)	2.17
磷酸氢钙	0.46	磷(%)	1.19
苜蓿草粉	40.00		
盐	0.50		
预混料	1.00		

注:1.表内除消化能为估测值外,其余指标均为实测值;
2.配方参考法国肉兔饲养标准。

1.2.3 所测指标

记录全期的采食量、死淘数、每周龄体重、宰前活重、全净膛重、半净膛重。

2 结果

2.1 半乳甘露寡糖对肉兔生长性能的影响(见表 2)

表 2 肉兔生长性能指标

组别	对照组	试验组
始重(g/只)	1 005.77±286.44	1 025.31±178.96
末重(g/只)	1 765.57±215.22	1 790.31±186.28
死淘率(%)	7.0	0
存活率(%)	93	100
腹泻率(%)	2.7	1.67
日增重(g/只)	36.11±4.22	34.28±4.27
日采食量(g/只)	149.09±14.21 ^b	124.52±13.36 ^a
料重比	4.11±0.55	3.86±0.50

注:表中同行肩标小写字母不同者为差异显著。

由表 2 可以看出,在生长性能方面,除日采食量外,各指标间均不存在显著差异(P>0.05)。日采食量和日增重的降低可能是因为 GMOS 的适口性不佳或其随外界环境的变化而影响了兔的食欲;试验组的兔存活率比对照组提高了 7.5%,料重比、腹泻率相对降低 6.08%和 38.15%。

2.2 半乳甘露寡糖对肉兔屠宰性能的影响(见表 3)

表 3 半乳甘露寡糖对肉兔屠宰性能的影响

项目	对照组	试验组
全净膛率(%)	0.45±0.02	0.46±0.01
半净膛率(%)	0.50±0.01	0.50±0.02

由表 3 可以看出,试验组和对照组间在全净膛率和半净膛率方面差异不显著(P>0.05),但是试验组的全净膛率比对照组提高了 2.22%。

2.3 半乳甘露寡糖对肉兔胃肠道 pH 值的影响(见表 4)

表 4 半乳甘露寡糖对肉兔胃肠道 pH 值的影响

组别	对照组	试验组
盲肠 pH 值	5.60±0.68	5.60±0.89
十二指肠 pH 值	6.00±0.00	6.33±0.58
胃 pH 值	3.43±0.81	3.33±1.15

由表 4 可以看出,试验组和对照组在盲肠、十二指肠、胃 pH 值方面的差异不显著(P>0.05)。其中十二指肠的 pH 值寡糖组略高于抗生素组;胃 pH 值寡糖组略低于抗生素组。

3 讨论

3.1 半乳甘露寡糖对肉兔生长性能的影响

大量动物试验结果表明:功能性寡糖对仔猪、肉兔、鸵鸟、火鸡、牛、鱼和虾等水生动物具有很好的作用,它可以提高动物的抗病力,降低死亡率,而且对料肉比、动物体增重均有所改进。武书庚(2000)^[1]研究表明,甘露寡糖可以提高猪的增重和饲料转化率。王吉潭(2000)^[2]研究表明,半乳甘露寡糖有提高肉鸡采食量的趋势,半乳甘露寡糖在肉鸡日粮中的应用效果在一定程度上可以替代饲料中的抗生素;同时,半乳甘露寡糖可以增加体液的免疫机能,提高血清新城疫抗体滴度。王彬(2005)、张彩云(2003)^[3,4]试验表明,早期断奶仔猪日粮中添加 0.12% 的半乳甘露寡糖可明显提高平均日采食量和平均日增重($P<0.05$),并可降低腹泻发生的次数。

本试验中,除日采食量试验组显著低于对照组外,其它各项指标试验组和对照组相比没有显著差异,这可能与寡糖添加剂量和环境因素对寡糖作用影响有关。但是试验组较对照组具有降低死淘率和腹泻率,提高肉兔存活率的相对优势,同时可以降低料重比,说明半乳甘露寡糖对提高肉兔的生长性能还有一定的改善作用。

3.2 半乳甘露寡糖对肉兔屠宰性能的影响

屠宰率是评定胴体品质的重要指标,宰前活重愈大的个体,皮张面积愈大,屠宰率越高。本试验中试验组和抗生素组在全净膛率和半净膛率方面差异不显著($P>0.05$),并且在日增重略低于抗生素组的情况下,可以看出试验组有提高全净膛率的趋势。

3.3 半乳甘露寡糖对肉兔胃、十二指肠、盲肠 pH 值的影响

家兔虽为单胃动物,但其盲肠却有着同反刍动物瘤胃相似的发酵功能。饲料中未被消化吸收的淀粉和葡萄糖进入盲肠,盲肠内的细菌对其作用,分解产生挥发性脂肪酸和气体,同时,盲肠是消化粗纤维的主要器官,粗纤维在胃和小肠中不发生变化,只有经盲肠中细菌发酵、分解成为挥发性脂肪酸(VFA)。VFA 可提供家兔维持所需代谢能的 10%~12% 外,最主要的营养功能是和未被消化的纤维一起维持兔盲肠正常菌群(拟杆菌、双歧杆菌、消化球菌、乳酸杆菌等厌氧菌为主)的微生态环境,防止正常菌群失调,继而发生内源性或外源性腹泻。有研究表明,家兔盲肠 pH 值为 5.7~6.1,且盲肠内的 pH 值随家兔年龄的增长和盲肠内微生物发酵消化的加强而降低。微生物

的生长繁殖需要合适的酸度环境,而这种酸度环境由食糜在盲肠内发酵而积聚的游离氨基酸、挥发性和不挥发性脂肪酸等酸性物质来维持。

邵良平^[5]等报道,饲喂抗生素、寡糖能降低肠道 pH 值。本试验结果显示,各因素对兔盲肠内容物 pH 值影响不大,这与石宝明、王岭^[6,7]报道一致。李同洲(1998)^[8]研究表明,喹乙醇可以提高空肠、盲肠和血液乙酸含量,可降低胃肠道 pH 值。从本试验结果看出,寡糖组兔胃、盲肠、十二指肠 pH 值与添加抗生素喹乙醇组相比无显著差异($P>0.05$),胃肠道 pH 值的下降对微生物发酵消化的加强有重要意义。

4 结论

本试验结果中试验组虽未能提高肉兔的日采食量及日增重等生长性能指标,但在提高存活率及降低腹泻率和料重比方面有重要意义。在屠宰率方面有提高肉兔屠宰率的趋势,同时对胃肠道 pH 值的影响在一定程度上与抗生素的作用相当,这说明在肉兔饲养中寡糖的利用在一定程度上有一定的改善作用。半乳甘露寡糖取代抗生素确实取得了不错的效果。本研究为开发半乳甘露寡糖提供了理论依据,但还存在以下需解决的问题:①半乳甘露寡糖对于不同生长阶段、不同种类动物的适宜添加量的研究探讨;②半乳甘露寡糖的作用机理及与其它添加剂的配伍问题;③半乳甘露寡糖与外界环境共同作用对家畜的影响等。

参考文献

- 1 武书庚,齐广海.甘露寡糖可取代抗生素[J].国外畜牧科技,2000(1):19~20
- 2 王吉潭,李德发,龚利敏,等.半乳甘露寡糖对肉鸡生产性能和免疫机能的影响[J].中国畜牧杂志,2003,39(2):5~6
- 3 张彩云,高天增,李德发.半乳甘露寡糖对早期断奶仔猪生长性能的影响[J].饲料研究,2003(3):1~3
- 4 王彬.半乳甘露寡糖和金霉素在育肥猪日粮中的效果对比试验[J].饲料工业,2005,26(13):40~41
- 5 邵良平,周伦江.不同剂量甘露寡糖对鸡细胞免疫和肠道微生态的影响[J].福建农业大学学报,1999,28(1):86~89
- 6 石宝明.寡聚糖在仔猪饲料中的应用研究[J].饲料研究,2000(4):13~18
- 7 王岭.果寡糖对肉仔鸡饲料中的应用研究[D].东北农业大学硕士学位论文,2001,5
- 8 李同洲.饲用抗生素与甘露寡糖对仔猪肠道菌群及物质代谢影响的研究[D].中国农业大学博士学位论文,1998,38~39

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

谷氨酰胺在断奶仔猪饲料中的应用效果

岳增华 解志峰

摘要 选取108头28日龄杜大长三元杂交断奶仔猪,按饲养试验随机分成3组,每组设3个重复,每个重复12头。Ⅰ组为5%乳清粉日粮组、Ⅱ组为0.5%谷氨酰胺二肽日粮组、Ⅲ组为2%乳清粉+0.5%谷氨酰胺二肽日粮组。试验从28日龄开始至52日龄时结束,试验期为24d,进行断奶仔猪日粮中添加谷氨酰胺对提高断奶仔猪生长性能的试验研究。试验结果表明:Ⅱ组(0.5%谷氨酰胺二肽)比对照Ⅰ组(5%乳清粉)平均日增重提高了3.8%,差异不显著($P>0.05$);Ⅲ组(0.5%谷氨酰胺二肽+2%乳清粉)比对照Ⅰ组(5%乳清粉)平均日增重提高了19.2%($P<0.05$),增重效果显著。这表明断奶仔猪日粮中添加0.5%谷氨酰胺二肽可替代5%的乳清粉,谷氨酰胺和乳清粉联合使用(用0.5%的谷氨酰胺二肽替代3%的乳清粉)对断奶仔猪来说能取得更理想的饲养效果,并且显著降低了饲料成本。在饲料报酬和采食量方面,Ⅱ组(0.5%谷氨酰胺二肽)与对照Ⅰ组(5%乳清粉)相比饲料转化率降低了1.17%,差异不显著($P>0.05$);Ⅲ组(0.5%谷氨酰胺二肽+2%乳清粉)与对照Ⅰ组(5%乳清粉)相比饲料转化率提高了9.25%,差异显著($P<0.05$)。表明谷氨酰胺能改善仔猪肠道功能,增加营养物质的吸收,谷氨酰胺与乳清粉联合使用可显著提高饲料转化率,同时可促进仔猪的采食量。在仔猪腹泻方面,试验各组的断奶仔猪均保持在一较低水平的腹泻率,并且差异不显著($P>0.05$)。

关键词 断奶仔猪;谷氨酰胺;日增重;采食量;饲料转化率;腹泻率

中图分类号 S816.32

随着养殖技术水平的不断提高,仔猪的早期断奶技术基本普及,当前各猪场普遍采取21~35日龄断奶。但仔猪早期断奶后以生长滞缓、腹泻和采食量低等为主要应激表现的仔猪断奶综合症(SEW)严重影响了仔猪的生长发育。大量研究表明,断奶导致仔猪暂时性营养不足和断奶饲粮改变引起了仔猪胃肠微生物区系及肠粘膜结构功能的变化。谷氨酰胺(Gln)是猪乳中含量最丰富的氨基酸(Wu等,1994),是仔猪肠道绒毛生长的主要能量来源,在维持早期断奶仔猪肠道结构和功能方面起着重要的作用。当早期断奶仔猪的母源谷氨酰胺供应消失后,来自肌肉和血液中的内源谷氨酰胺尚不足以维持肠道绒毛的完整性,不能维持小肠上皮细胞的代谢、增殖和成熟以及隐窝细胞的迁移,也不能维持免疫细胞的功能,导致绒毛萎缩、腹泻,从而抑制采食量,这是早期断奶综合症产生的根本原因(Alverdy, 1990)。而仔猪日粮中添加谷氨酰胺有利于维持正常的肠道功能和结构,提高机体免疫力,显著降低腹泻,促进采食,减轻断奶应激给仔猪造成的损伤。

试验以乳清粉为参照,旨在进一步验证谷氨酰胺

的确切效果以及对谷氨酰胺在断奶仔猪日粮中实际应用做一探索。

1 材料与方法

1.1 试验材料

谷氨酰胺(Gln):本试验采用谷氨酰胺二肽,可避免谷氨酰胺单体不稳定、吸收率不高等缺点,充分发挥谷氨酰胺的功能。

乳清粉:生产中常用的市售某进口品牌乳清粉。

1.2 试验动物与分组

试验选择发育正常、健康良好的三元杂交杜大长断奶仔猪108头,在24~25日龄断奶,断奶后使用对照日粮(日粮中添加5%乳清粉)预饲至28日龄,根据胎次、日龄、体重随机分成3组,每组3个重复,每个重复12头。3组分别为:Ⅰ组(对照组)为饲喂添加5%乳清粉日粮组;Ⅱ组为饲喂添加0.5%谷氨酰胺二肽日粮组;Ⅲ组为饲喂添加2%乳清粉+0.5%谷氨酰胺二肽日粮组。

1.3 日粮组成及营养水平

根据理想氨基酸配比设计3组饲料配方,3组饲料的营养水平一致,试验饲粮配方见表1。

1.4 试验猪的日常管理

试验各组环境条件一致,自由采食、自由饮水,每天保持猪舍清洁卫生,每周消毒2次,其它管理条件、免疫程序等按猪场常规制度进行。试验进行过程中每天记录各组仔猪腹泻数,于试验期结束时对仔猪进行

岳增华,黑龙江省农业职业技术学院,讲师,154007,黑龙江省佳木斯市胜利路52号。

解志峰,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-02-07

个体称重,记录各组仔猪饲料消耗量。

表 1 饲料配方及主要营养水平

饲料组成	配比(%)			营养水平	I 组	II 组	III 组
	I 组	II 组	III 组				
玉米	56	61	59	粗蛋白(%)	20.07	20.10	20.12
豆粕	19.7	19.7	19.7	消化能(MJ/kg)	13.83	13.79	13.79
膨化大豆	11	11	11	钙(%)	0.93	0.90	0.91
鱼粉	4	4	4	总磷(%)	0.635	0.628	0.63
大豆油	0.3	0.3	0.3	有效磷(%)	0.448	0.443	0.445
乳清粉	5	-	2	盐(%)	0.38	0.38	0.38
石粉	1.2	1.2	1.2	赖氨酸(%)	1.258	1.252	1.255
磷酸氢钙	1	1	1	蛋氨酸(%)	0.359	0.357	0.358
食盐	0.3	0.3	0.3	蛋氨酸+	0.681	0.674	0.675
酸化剂	0.2	0.2	0.2	胱氨酸(%)	0.832	0.821	0.825
谷氨酰胺二肽	-	0.5	0.5	苏氨酸(%)			
赖氨酸	0.19	0.19	0.19				
蛋氨酸	0.01	0.01	0.01				
复合酶	0.1	0.1	0.1				
1%预混料	1	1	1				

注:1.预混料向每千克配合饲料中提供维生素 A15 000IU、维生素 D₃1 750IU、维生素 E 25IU、维生素 K₃1.5mg、维生素 B₁1.5mg、维生素 B₂ 5.4mg、维生素 B₆ 2.5mg、维生素 B₁₂ 0.02mg、烟酸 30mg、泛酸 12mg、叶酸 0.6mg、生物素 0.1mg、胆碱 1 000mg、Fe180mg、Zn170mg、Cu 220mg、Mn 20mg、I 0.5mg、Se 0.4mg;

2.粗蛋白、钙、磷、盐为分析值,其余为计算值。

1.5 试验时间与地点

2005 年 9 月 3 日~27 日在佳木斯市乐乐养猪场进行试验,共计 24d。

1.6 测定指标

平均日增重、平均日采食量、饲料转化率、腹泻率。

1.7 统计分析

试验数据用 SAS 软件进行统计分析。

2 结果与分析(见表 2)

表 2 试验仔猪生长性能指标

项目	I 组	II 组	III 组
始重(kg)	7.05±0.425	6.84±0.382	6.92±0.352
末重(kg)	14.31±0.796	14.38±0.610	15.57±0.587
增重(kg)	7.26	7.54	8.65
耗料(kg)	11.70	12.31	12.65
平均日增重(g)	302.5 ^a	314 ^a	360.4 ^b
平均日采食量(g)	487.6 ^a	512.5 ^b	527.2 ^b
料肉比	1.612 ^a	1.631 ^a	1.463 ^b
腹泻率(%)	3.56	3.60	3.45

注:同行肩标小写字母相同为差异不显著(P>0.05),不同为差异显著(P<0.05)。

2.1 体重及日增重

从表 2 可以看出,II 组(0.5%谷氨酰胺二肽)试验仔猪比对照组 I 组(5%乳清粉)平均日增重提高了 3.8%,差异不显著(P>0.05);III 组(0.5%谷氨酰胺二肽+2%乳清粉)比对照组 I 组(5%乳清粉)平均日增重

提高了 19.1%,差异显著(P<0.05)。这表明断奶仔猪日粮中添加 0.5%谷氨酰胺二肽可替代 5%的乳清粉,而谷氨酰胺二肽和乳清粉联合使用对断奶仔猪有明显的促生长作用。

2.2 采食量及饲料转化率

从表 2 可以看出,断奶仔猪日粮中添加谷氨酰胺二肽可促进仔猪的采食量。II 组(0.5%谷氨酰胺二肽)与对照 I 组(5%乳清粉)相比,饲料转化率降低了 1.18%,差异不显著(P>0.05);III 组(0.5%谷氨酰胺二肽+2%乳清粉)与对照组 I 组(5%乳清粉)相比饲料转化率提高了 9.24%,差异显著(P<0.05)。表明谷氨酰胺能改善仔猪肠道功能,增加营养物质的吸收。谷氨酰胺二肽通过提供小肠细胞必需的能量,维持营养吸收的最小单位——微绒毛的正常结构,改善了营养物质的吸收,从而提高了饲料摄入量和饲料转化率。

2.3 腹泻情况分析

试验各组的断奶仔猪均保持较低水平的腹泻率,并且差异不显著(P>0.05)。

3 讨论

3.1 谷氨酰胺二肽通过提供小肠细胞必需的能量,维持小肠绒毛的正常结构,改善了肠道的结构和功能,促进了营养物质的吸收,从而提高了饲料摄入量和日增重。

3.2 乳清粉以提供较好的能量来源来促进仔猪的生长发育,而谷氨酰胺二肽主要作用是维持或改善肠道的营养吸收功能(为小肠绒毛提供其必需能量),保证仔猪断奶后肠道绒毛的正常形态与功能。可见使用乳清粉或谷氨酰胺二肽是解决早期断奶综合症的不同方法。本试验充分说明了谷氨酰胺完全或部分的取代乳清粉的可行性。

3.3 传统断奶仔猪日粮中添加 5%乳清粉在生产中获得了良好的饲养效果,本试验表明,断奶仔猪日粮中添加 0.5%的谷氨酰胺二肽取得与添加 5%乳清粉的仔猪日粮相当的效果,用 0.5%的谷氨酰胺二肽替代 3%的乳清粉在断奶仔猪饲料中添加取得最为理想的效果,同时与添加 5%乳清粉的仔猪日粮相比饲料成本也明显降低。

4 结论

断奶仔猪日粮中添加谷氨酰胺后能有效改善断奶仔猪的吸收能力,使各种营养物质更容易被机体吸收利用,显著提高断奶仔猪的生长性能。本试验结果表明,用 0.5%的谷氨酰胺和 2%的乳清粉在仔猪日粮中联合使用获得了更理想的饲养效果,并且根据价格核算,明显降低了饲养成本。

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

牛磺酸在动物营养上的研究进展

任 和 占秀安

摘 要 牛磺酸广泛存在于动物体各组织器官内,具有多种生物学功能,在动物营养中具有十分重要的作用。通过对牛磺酸理化性质、生物学功能的研究,探讨其作为添加剂在养殖业中的应用。

关键词 牛磺酸;添加剂;渗透调节;细胞钙稳态;脂质过氧化

中图分类号 S816.7

牛磺酸(Taurine)也称牛黄酸、牛胆酸、牛胆碱、牛胆素,1927年首次从公牛胆汁中发现。过去牛磺酸一直被认为是机体内无功能的含硫氨基酸的终末代谢产物。1975年 Hayes 等发现牛磺酸对于幼猫视觉功能的维持有重要作用之后,牛磺酸的研究受到普遍关注。

牛磺酸参与维持机体内环境稳态调节,对神经、消化、生殖、心血管、免疫和内分泌等生理功能的正常发挥具有重要的调节作用。其作用可与水分子的作用相提并论(2000,杨占军),被广泛作为保健食品、医药和饲料添加剂的原料。

随着对牛磺酸营养机理研究的深入,它在养殖业中的应用也越来越广泛。本文对牛磺酸的结构、性质、组织分布和代谢、生物学功能、在养殖业中的应用及其发展前景作一综述,以促进它作为添加剂在养殖业中的推广和应用。

1 牛磺酸的结构、性质、组织分布和体内代谢

牛磺酸的化学名为 2-氨基乙磺酸,结构式为 $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$,分子量约 125Da,是一种非蛋白质结构的 β 型含硫氨基酸,常温常压下为无色四面针状结晶,熔点为 310℃,微溶于水,微溶于 95%乙醇,溶于乙酸。

牛磺酸不仅存在于牛胆汁中,还广泛分布于动物体和人体的脑、卵巢、子宫、肾、骨骼、肌肉、血液中。在神经、肌肉、腺体等可兴奋组织内含量较高;在心血管组织、胆汁中的含量也很高;除在中枢神经系统中牛磺酸含量仅次于谷氨酸外,在其它组织中都远高于其

它任何氨基酸。

牛磺酸以鲜蛤中含量最高,其次是孵化 19d 左右的鸡胚中含量较多。在鸡蛋、牛奶、蜂蜜、水果、蔬菜、谷类中未检出,在大多数植物中的含量几乎为零,但在坚果和豆科植物籽实(黑豆、蚕豆、嫩豌豆、扁豆及南瓜籽等)中的含量较多,分别为 15~46nmol/g 和 9.2~18.7nmol/g(赵红波,2003)。

在哺乳类动物体内,牛磺酸生物合成是由蛋氨酸和半胱氨酸的代谢中间产物半胱亚磺酸经脱羧和氧化作用产生的,肝、脑、心是合成牛磺酸的主要器官。牛磺酸是人、猴、猿、家畜、家禽等的条件性必需氨基酸,自身只能合成其生理需要的 30%~40%,必须从食物中补充一部分。牛磺酸在体内的代谢途径主要有:①与胆碱在肝脏中生成牛胆磺酸,随胆汁排到消化道中,可促进脂肪和脂溶性维生素的消化吸收。②在肝脏中经转氨基、甲酰基作用生成氨基甲酰牛磺酸,其具体功能还不清楚。③接受精氨酸的胍基,在 ATP-脒基转移酶催化下生成脒基牛磺酸,然后磷酸化生成磷酸脒基牛磺酸。在低等生物中可作为一种磷酸源,参与机体的能量代谢。④在分解为硫酸的过程中生成中间产物——乙基硫氨酸,与牛磺酸一起调节离子通过。⑤生物膜的转移作用。肾脏是牛磺酸排泄的主要器官,它依据牛磺酸体内含量调节其排出量。当牛磺酸过量时,多余部分随尿排除;当牛磺酸不足时,肾脏通过重吸收降低牛磺酸的排泄。

2 牛磺酸的生物学作用

Schaffer(2000)报道,牛磺酸在机体的作用包括:调节渗透压、调节细胞钙稳态、抗脂质过氧化、膜稳定,从而促进糖酵解和糖原合成,起到降低血糖和血脂作用。

2.1 渗透压调节作用

牛磺酸在中枢神经系统、视网膜、血小板、骨骼肌

任和,浙江大学饲料科学研究所,在读硕士,310029,浙江省杭州市秋涛北路 164 号。

占秀安,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-03-06

和心脏等许多器官中起渗透调节作用。海洋动物的渗透压主要靠牛磺酸来调节和维持;哺乳动物的渗透压的平衡也可以通过牛磺酸在体内的转移来调节。

2.2 Ca^{2+} 调节作用

Ca^{2+} 的摄取分为高亲和摄取和低亲和摄取两种途径:高亲和摄取时,机体由胞浆向胞外或细胞器转运 Ca^{2+} ;低亲和摄取时将 Ca^{2+} 由胞外或自线粒体及内质网这些聚集了高 Ca^{2+} 的细胞器向胞浆转运。牛磺酸可通过酶的活性来刺激 Ca^{2+} 的高亲和摄取过程,自细胞器中释放 Ca^{2+} 的过程亦受牛磺酸的影响。牛磺酸对内皮损伤导致的血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流的增加及细胞 Ca^{2+} 含量的升高都有明显的抑制作用,减轻 Ca^{2+} 的超载,有保护细胞的作用。

2.3 清除自由基、抗氧化

生物体在新陈代谢过程中不断产生自由基(氧自由基、羟自由基、过氧化氢、脂氢过氧化物等),它们具有活泼性和攻击性。它们一旦生成便向周围组织发挥破坏作用,使糖类和脂类物质发生氧化反应、蛋白质变性;使具有生命活性的酶类失活;使遗传物质DNA及多核苷酸主链断裂、碱基发生错误修饰等,导致机体氧化损伤而患多种疾病。

机体内的牛磺酸具有清除氧自由基的作用,能与维生素E、维生素C、类胡萝卜素和一些多酚类化合物共同组成动物机体内源性的防御系统,防止氧自由基对细胞、组织的损害。牛磺酸清除活性氧自由基和抗脂质过氧化损伤的作用与其剂量呈依赖关系。

2.4 保护机体细胞

牛磺酸对动物肝细胞、心肌细胞、红细胞和胃肠道黏膜等都具有保护作用。其机理可以概括为:①牛磺酸能够参与细胞膜的主要成分——磷脂的代谢,具有维持膜稳定作用;②能够维持细胞内外渗透压的平衡;③能够保持细胞的钙离子水平的稳态;④能够清除氧自由基的抗氧化损伤作用,减少脂质过氧化反应,保护细胞膜的完整性。

2.5 牛磺酸与环核苷酸系统的相互调节作用

在脑部海马区,牛磺酸可减轻由去甲肾上腺素、腺苷和组胺诱发的cAMP(环磷酸腺苷)水平升高现象,其作用机制可能是通过对受体的竞争性抑制来实现的。何天培等(1998)报道,牛磺酸可显著抑制应激大鼠心肌及血浆中cAMP、cGMP(环磷酸鸟苷)的升高,从而减轻由cAMP、cGMP介导的蛋白磷酸化及基因转录,并可抑制应激大鼠心肌细胞和线粒体中的钙超载及心肌细胞中的 Na^+ 含量的上升和 K^+ 含量的下降,

提高心肌细胞中的Mn、Mg、Fe、Cu及线粒体中的Fe、Zn水平,减轻大鼠应激性心肌损伤。

3 牛磺酸对代谢的影响

3.1 牛磺酸与营养代谢

3.1.1 参与胆酸合成,促进脂肪和脂溶性物质的消化吸收

牛磺酸可与胆汁酸结合形成牛磺胆酸,牛磺胆酸为胆汁中的胆酸盐,胆酸盐在小肠中能促进脂肪乳化,增加脂肪酶的活性,协助中性脂肪、胆固醇等的吸收。牛磺酸可以促进脂溶性的维生素,如VA、VD、VE、VK的生物利用率(Petrosian,2000)。牛磺酸还可以促进胆汁对胆固醇的溶解,起到保肝利胆作用。牛磺酸有降低血清胆固醇、升高血清高密度脂蛋白-胆固醇、防止动脉粥样硬化的作用。添加牛磺酸可以降低正常大鼠血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯、载脂蛋白C水平,促进粪胆汁酸排泄(杨燕等,2002)。牛磺酸促进脂肪代谢,其机制可能与调控甲状腺激素的代谢有关(何天培等,1998)。

3.1.2 促进糖代谢

牛磺酸与胰岛素或类胰岛素物质有协同作用,促进肌细胞对葡萄糖和氨基酸的摄取和利用,加速糖酵解,增强糖异生,降低血糖浓度,其作用的靶器官主要是骨骼肌、心肌、脂肪和肝脏。牛磺酸对糖代谢的调控与其诱导或抑制某些限速酶活性有关,它可使糖原合成酶I活力升高,而使糖原磷酸化酶活力降低。由于骨骼肌为糖代谢最重要部位之一,而且牛磺酸在骨骼肌中的含量占全身的75%以上,因此,牛磺酸对骨骼肌葡萄糖摄取和利用的加强及抑制肌糖原分解的作用,对全身葡萄糖自稳态有较大影响。牛磺酸灌流离体大鼠心脏,则剂量依赖性的促进心肌对葡萄糖的摄取,加快其透入心肌的速度,这在胰岛素释放不足或胰岛素抵抗情况下,具有重要的代偿意义。

3.1.3 促进蛋白质、氨基酸代谢

牛磺酸虽不参与蛋白质的生物合成,但添加适宜水平的牛磺酸可提高蛋白质的消化率。

刘晓军等(1996)研究表明,在蛋白质供应充足或不足时,添加1%牛磺酸均可提高蛋白质消化率,并推测其机制是促进一些与蛋白质消化有关的激素或酶的分泌。

肝中牛磺酸能促进含硫氨基酸代谢,高剂量的支链氨基酸均可通过促进牛磺酸与谷胱甘肽的合成而提高机体抗氧化能力。牛磺酸与谷氨酸关系密切,在大脑中牛磺酸与谷氨酸水平呈高度正相关,它可以激

活谷氨酸脱羧酶,在很多系统中牛磺酸对谷氨酸诱导的超极化现象具有抑制作用。

3.1.4 促进矿物元素、维生素代谢

何天培等(1998)报道,牛磺酸可促进 1~2 周龄的肉仔鸡铁、铜、锰、锌等矿物元素的吸收,增加锌在肠道内的吸收及其在体内各主要组织脏器的含量。牛磺酸还能通过加强肝的解毒功能促进鼠抗坏血酸生物合成。牛磺酸还可增强脂溶性维生素的吸收。

3.2 对神经系统的作用

牛磺酸在中枢神经系统中主要分布于大脑皮层、小脑、海马及嗅球等区域,是脑正常发育所必需的营养物质。牛磺酸可促进脑细胞增殖,促进神经细胞间突出的形成,加速神经细胞分化成熟过程,提高记忆力。牛磺酸是新生动物脑中含量最丰富的游离氨基酸,随着脑的发育,牛磺酸的含量逐渐下降,成年动物脑中牛磺酸的含量仅为新生动物的 1/3。牛磺酸具有抗惊厥作用,对神经元有抑制作用,是有效的抗癫痫剂。牛磺酸对神经系统的抗衰老也有一定的作用,能促进大脑细胞 DNA、RNA 及蛋白质的合成,对神经传导和视觉功能起重要作用。

3.3 对繁殖性能的作用

牛磺酸是母猫正常妊娠、分娩,仔猫成活和正常发育所必需的物质(1994,何天培)。猫饲料中牛磺酸含量低于 0.01%就可能会出现生殖功能不良,死胎、流产和先天缺陷率明显升高,幼崽成活率下降。国内学者也证明牛磺酸对于体外培养的小鼠、仓鼠和兔的胚胎发育有促进作用。牛磺酸促进黄鸡性腺组织形态的发育和内分泌功能,提高性成熟前公鸡睾丸的重量,增大曲细精管的直径,促进生殖细胞的发育,提高精子细胞形成的速度,且能提高性成熟前母鸡卵巢的相对重量,促进卵细胞的发育。牛磺酸提高公鸡血浆睾酮的含量以及血浆促黄体激素的含量,从而促进性腺发育。母猪日粮中缺乏牛磺酸时,产仔能力下降,易发生流产,且仔猪死胎多,成活率低。

3.4 对内分泌的作用

牛磺酸可调节生长激素(GH)、催乳素及脑内 β -内啡肽(β -EP)、精氨酸加压素(AVP)的分泌。低剂量的牛磺酸可增加催乳素的释放,而高剂量的牛磺酸则没有上述刺激作用。牛磺酸处理垂体细胞对生长激素有明显的促进作用。牛磺酸能够抑制生长抑素和血管活性肠肽的含量。牛磺酸可增加三碘甲状腺原氨酸的分泌量,增加机体的抗应激水平。刘惠芳(2003)报道,肉仔鸡日粮中添加 0.1%或 0.15%的牛磺酸提高 3 周龄

肉鸡血清中 T_3 含量, T_4 含量未受影响。

3.5 对机体免疫的影响

牛磺酸可保护血浆成分和白细胞免受氧化剂和自由基的损伤;在白细胞内牛磺酸可与局部产生的次氯酸结合形成氯胺,氯胺有助于防止细胞自溶;牛磺酸能够促进脾脏的生长发育,提高机体免疫机能;不同淋巴细胞中牛磺酸的含量是血浆中的 8~30 倍,这进一步说明了牛磺酸与机体免疫机能之间的关系。猫的淋巴细胞内有相当多的牛磺酸,缺乏牛磺酸时,淋巴细胞和噬中性细胞的免疫功能下降,血中白细胞总数下降,多形核细胞和单核细胞比例异常,过氧化物的产物减少,吞噬杀灭表皮葡萄球菌的能力减弱,血中 γ -球蛋白的含量降低,脾结节及其内细胞形态均出现异常。

4 牛磺酸在动物营养中的应用

牛磺酸广泛存在于动物体内,但一些较高级的动物自身合成牛磺酸的数量有限,不能满足机体需要,它们所需的牛磺酸主要从食物中获得。

4.1 牛磺酸在猪生产中的应用

卢福庄等(2000)报道,在以不含乳制品的基础饲料中添加 0.1% 牛磺酸饲喂 28 日龄的断奶仔猪,发现断奶 10d 后的平均增重比对照组多 0.55 kg,但增重差异主要在断奶 5d 后发生,他认为牛磺酸可能有抗断奶应激作用。

4.2 牛磺酸在水产动物中的诱食、促生长作用

牛磺酸是虾饵料中最好的诱食添加剂,凡含有牛磺酸添加剂的虾饵料,摄食效果比较好,并且对调节饵料的综合营养和微量元素的平衡也有良好的作用。牛磺酸对许多海产类动物都有促进摄食作用,牛磺酸对贝类有许多特殊的功能,如可作为能量贮存、调节细胞的可激发性,并通过渗透排泄来减少体内过多的硫化物积聚。

刘媛等(2005)报道,在饵料中添加 0.4%~0.8%的牛磺酸,日本沼虾的增重率显著增加;饵料中添加 0.4%的牛磺酸,日本沼虾肌肉中的酚氧化酶活性也显著升高,对日本沼虾的免疫力存在显著影响,这一结果可能与牛磺酸具有抗氧化作用有关,饵料中添加 0.4%的牛磺酸比较适宜。

罗莉(2005)报道,在草鱼饲料中添加牛磺酸促进草鱼生长,添加量为 600mg/kg 时,特定生长率、饲料转化率和蛋白质效率表现为最好;草鱼体内水分含量下降,体脂增加,体蛋白含量增加。

4.3 牛磺酸与肉鸡生产性能

何天培等(1995)报道,添加 0.1%的牛磺酸,可降低 3 周龄肉用仔鸡的料肉比;提高血清中甲状腺素(T_4)或三碘甲腺原氨酸(T_3)的水平;提高动物血清中 IgG 的含量;提高肉鸡新城疫抗体(ND-HI)效价以及免疫器官法氏囊和脾脏的相对重量。缺乏牛磺酸,则血清中白细胞总数下降,多形核细胞和单核细胞比例异常,脾结节、核结内细胞形态均出现异常。

何天培等(2000)报道,添加 0.1%牛磺酸可显著提高 AA 肉仔鸡 1~3 日龄时卵黄囊的吸收速度,并促进卵黄囊中的蛋氨酸和被称为“生命性氨基酸”的胱氨酸和赖氨酸的吸收。对于雏鸡来说,其出壳后最初几天的营养主要来自剩余的卵黄,促进剩余卵黄吸收无疑能促进雏鸡早期营养的利用和生长发育。

4.4 牛磺酸与蛋鸡生长免疫

在蛋鸡日粮中添加适量牛磺酸,可明显改善蛋鸡的产蛋率,并提高鸡蛋的营养品质。饲料中添加适量的 β -胡萝卜素和牛磺酸能够提高蛋重并改善蛋黄色泽。袁纛等(2002)报道,中后期蛋鸡日粮中添加牛磺酸不仅可以提高蛋黄中的锌含量,降低蛋黄中的总脂含量,而且可以提高蛋壳钙的含量和蛋壳的强度,改善蛋壳颜色,牛磺酸的适宜添加量为 80mg/kg。吴琼等(2004)报道,添加 0.05%的牛磺酸能够提高蛋鸡的产蛋率、平均蛋重,并且可以降低蛋鸡的日采食量和料蛋比,对蛋壳品质也有一定的影响。王俊萍(2004)报道,78 周龄蛋用母鸡日粮中分别添加牛磺酸,提高血清 SOD 活性,降低血清 MDA(丙二醛)和蛋黄 MDA 含量,并认为牛磺酸能够调节机体正常生理功能,增强细胞抗氧化性、抗自由基损伤及抗病毒损伤的功能,这可能是添加牛磺酸后产蛋后期蛋禽生产性能提高的原因。

李学俭等(2002)报道,饲料中添加 20~320mg/kg 牛磺酸的实验组成年蛋鸡群,在接种鸡新城疫疫苗后,与对照组相比,其 ND-HI 效价明显得到提高,而且牛磺酸的添加量与 ND-HI 效价提高之间存在一定的正相关。

5 小结

牛磺酸具有广泛的生物学功能,但其在动物生产实践中的应用尚缺乏深入的研究。因此,牛磺酸真正作为一种动物饲料添加剂尚有许多问题需要解决:①牛磺酸在饲料中的添加量,分析添加量与应用效果的相关性,以确定各种水产、畜禽在不同生长阶段饲料中牛磺酸的适宜添加水平、添加形式及添加时机,以较小的投入来产生最佳的经济效果;②牛磺酸在动物

体内主要的作用机制;③牛磺酸的主要生产工艺,如何降低生产牛磺酸的成本,提高产品质量;④牛磺酸添加的安全性。

参考文献

- 1 刘晓军,李玉声,沈芳兰.牛磺酸对大鼠蛋白质利用率、生长发育和辨别学习能力的影响.营养学报,1996,18(2):149~153
- 2 卢福庄,张宏福.牛磺酸的生理功能及其在畜牧生产中的应用[J].饲料广角,2000(15):22~23
- 3 杨占军.人体内一种不容忽视的氨基酸——牛磺酸[J].生物学杂志,2000,17(1):33~34
- 4 赵红波,姜利.牛磺酸与猫的营养[J].饲料博览,2003(11):24~25
- 5 杨燕,肖荣,邱服斌,等.补充牛磺酸对正常大鼠脂代谢的影响[J].卫生研究,2002,31(1):63~64
- 6 何天培.牛磺酸对饲高脂饲料大鼠脂肪代谢及免疫作用的影响[J].营养学报,1997,19(1):7~9
- 7 何天培,顾景范.牛磺酸对应激大鼠第二信使及心肌离子含量变化的影响[J].营养学报,1998,20(3):260~265
- 8 刘媛,王维娜,王安利,等.牛磺酸对日本沼虾生长及酚氧化酶活性的影响[J].淡水渔业,2005,35(2):28~30
- 9 罗莉,王琳,龙勇,等.牛磺酸对草鱼生长效应研究[J].饲料工业,2005,26(12)
- 10 袁纛,李学俭,潘树德.牛磺酸对中后期蛋鸡蛋品质的影响[J].沈阳农业大学学报,2002,33(6):433~436
- 11 吴琼,孙文志.牛磺酸对产蛋后期母鸡生产性能的影响.饲料研究,2004(7):6~9
- 12 王俊萍,黄仁录,冀建军.牛磺酸对蛋鸡抗氧化能力的影响.畜牧与兽医,2004,36(11):23~24
- 13 何天培,王玉江.牛磺酸在猫营养中的作用.国外畜牧科技,1994,21(2):36~37
- 14 何天培.牛磺酸对肉仔鸡卵黄囊吸收及甲状腺激素代谢的影响.动物营养学报,2000,12(1):38~41
- 15 何天培,周毓平.牛磺酸对肉仔鸡卵黄囊转移吸收及生产性能的影响[J].吉林畜牧兽医,1995,17(1):10~12
- 16 何天培,周毓平.牛磺酸对肉仔鸡生产性能的影响及其作用机制的研究[J].吉林农业大学学报,1995,17(2):68~73
- 17 何天培,冯于明.牛磺酸对肉仔鸡卵黄囊吸收及甲状腺激素代谢的影响[J].动物营养学报,2000,12(1):38~41
- 18 李学俭,潘树德,袁纛,等.牛磺酸对鸡 ND-HI 抗体产生影响的研究[J].动物科学与动物医学,2002,7(2):29~32
- 19 刘惠芳,周安国.牛磺酸在动物营养中的应用[J].中国饲料,2003(16):20~22
- 20 Martinez J B, Chatzifotis S, Divanach P, et al. Effect of dietary taurine supplementation on growth performance Schaffer S, Azuma J. Role of isoregulation in the actions of taurine [J]. Amino Acids, 2000, 19(3): 527~546
- 21 Petrosian A M, Haroutounian J E. Taurine as a universal carrier of liquid soluble Vitamins, a hypothesis[J]. Amino Acids, 2000, 19(2): 409~421

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

赖氨酸营养研究进展

周俊 宋代军

随着我国畜牧业的发展,蛋白质饲料资源供需缺口呈现出日益加大的态势(农业部全国饲料工业办公室,1994),大力开发新的蛋白质饲料资源无疑是解决这一供求矛盾的重要措施;同时,正确平衡畜禽日粮中的氨基酸营养、降低饲料成本、提高饲料报酬、促进蛋白质饲料资源的高效利用,则是缓解这一矛盾的又一有效途径。氨基酸营养需要的研究正是近年来国内外动物营养研究的热点之一。

赖氨酸是畜禽极其重要的必需氨基酸,在玉米-豆粕型生长日粮中,它还是第二限制性氨基酸,所以赖氨酸被称之为“生长性氨基酸”。一直以来赖氨酸的营养研究备受研究者的重视,是畜禽氨基酸营养研究的一个热点。

1 赖氨酸的营养

1.1 赖氨酸的存在形式

赖氨酸具有 L-型和 D-型两种同分异构体。L-赖氨酸的有效成分含量一般为 77%~79%。赖氨酸在单胃动物体内完全不能被自行合成,不参加转氨基作用。D-氨基酸和 L-氨基酸的 ϵ -氨基被乙酰化以后,才可受 D-氨基酸氧化酶或 L-氨基酸氧化酶的作用而脱氨基,脱氨基后的酮酸不再起氨基化作用,即脱氨基反应不可逆,因而,在动物营养上常常表现不足(王和民,1998)。

1.2 赖氨酸的营养生理功能

赖氨酸是动物体内必需氨基酸之一,它最重要的生理功能是参与体蛋白的合成,因此它与动物生长密切相关。赖氨酸在体内的功能有:参与体蛋白如骨骼肌、酶和多肽激素的合成;是生酮氨基酸之一,当缺乏可利用的碳水化合物时,它参与生成酮体和葡萄糖的代谢(在禁食情况下,它是重要的能量来源之一);维持体内酸碱平衡;作为合成肉毒碱的前体物,参与脂肪代谢;另外,赖氨酸还可以提高机体抵抗应激的能力。

1.3 赖氨酸的消化率和利用率

运用可消化或可利用氨基酸配制日粮可以提高日粮的准确性和蛋白利用效率。赖氨酸的 D-型和 L-型的吸收效率是不同的,D-赖氨酸几乎不能被吸收利用,具有生物活性的主要是 L-赖氨酸。赖氨酸的 ϵ -氨基非常活泼,易与饲料中的活性羰基基团结合生成难以被吸收利用的复合物。

有学者以玉米-花生饼作为基础日粮,利用 4 头末端回肠安装瘘管的猪测定赖氨酸的表观消化率以及可消化赖氨酸的需要量,结果表明,基础日粮中赖氨酸的表观消化率为 79.9%,在此基础上得到的可消化赖氨酸需要量为 1.03%;而采用比较屠宰法研究赖氨酸的利用率时,胴体赖氨酸的沉积与赖氨酸的采食量存在线性关系,赖氨酸用于胴体沉积的效率为 72%。

2 影响赖氨酸需要量的因素

2.1 环境因素

环境温度影响畜禽采食量,环境温度越低,采食量就越高,反之则越少。因此,在较热环境条件下,赖氨酸的需要量应提高;在较冷的环境条件下,这些数值应下调。高温环境不仅抑制畜禽的采食行为,而且会引起一系列热应激反应,如热性喘息、呼吸性碱中毒、以及体内过氧化作用的加强等,导致畜禽生产性能降低并改变其胴体组成,这可能会促使畜禽体内营养再分配,改变热应激状况下畜禽的营养需要。

2.2 动物因素

2.2.1 品系

不同类型、品种和品系畜禽的遗传特性不同,其生长速度、体格大小、胴体组成、产蛋性能以及消化生理不同,因而不同品种、品系畜禽的赖氨酸需要量也不同。Moran 等报道,6~8 周龄块大品系畜禽对赖氨酸的需要量高于同周龄矮小品系。

2.2.2 年龄和性别

畜禽的年龄和体重不同,对氨基酸的需要量也不同。总的趋势是当用日粮浓度表示需要量时,赖氨酸的需要量随年龄和体重的增长而下降,但当用“每只每天所需赖氨酸的克数”来表示时则随着年龄和体重

周俊,西南大学动物科技学院,重庆市牧草与草食家畜重点实验室,在读硕士,400716,重庆北碚。

宋代军,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-03-06

的增长而增加,即相对需要量下降,绝对需要量增加。

雌雄畜禽对赖氨酸的需要量也有所不同。Thomas 等的试验表明,公鸡对赖氨酸的需要量高于母鸡;Han 和 Baker 报道,要达到最佳生产性能,公鸡的赖氨酸需要量比母鸡的要高。其它的一些研究也得出了相似的结论。造成这种现象的原因是公鸡胴体较母鸡胴体含有较多的蛋白质和较少的脂肪。

2.3 日粮因素

2.3.1 日粮能量及蛋白质水平

畜禽以满足其能量需要量而调节采食量,即“为能而食”。日粮能量浓度影响畜禽的采食量,当日粮能量浓度高时,畜禽的采食量减少,反之则升高。因此,应根据日粮能量浓度来调整日粮蛋白质和必需氨基酸的浓度。

日粮蛋白质浓度影响多种必需氨基酸的需要量。研究发现,畜禽对必需氨基酸的需要量与日粮蛋白质水平相互关联,二者呈同向变化关系。一般而言,随日粮蛋白质水平增加,必需氨基酸需要量(占日粮百分比)增加。Mendanca 和 Jensen、Aberbe 和 Morris、Huyghebaert 和 Pack 的试验都证明了这一点。当日粮蛋白质水平降低时,由于单个或多个氨基酸的缺乏导致生长受阻,从而引起个别氨基酸需要量下降。

2.3.2 日粮非必需氨基酸的含量与比例

虽然饲料中必需氨基酸含量是决定蛋白质营养价值的最重要因素,非必需氨基酸的影响作用相对较小,但已有证据表明,日粮中蛋白质提供的非必需氨基酸过剩会降低必需氨基酸的利用率。由于某些必需氨基酸可以作为合成某些特定的非必需氨基酸的前体,因而向日粮中充分提供某些非必需氨基酸即可节省相应的必需氨基酸的需要量。

2.3.3 氨基酸的互作

Harper 等将氨基酸的互作分为 4 类:氨基酸不平衡、氨基酸拮抗、氨基酸缺乏和氨基酸过量。日粮氨基酸不平衡会引起畜禽生产性能下降,这种不平衡可以通过添加缺乏的氨基酸加以解除。当氨基酸临界缺乏时,畜禽可以通过增加采食量来获得所需要的氨基酸量,但当氨基酸严重缺乏时,则会降低畜禽的采食量和生产性能,此时添加缺乏的氨基酸,生产性能又可以恢复。氨基酸过量时会出现氨基酸中毒,显著降低畜禽增重和采食量,使生产性能下降,甚至会出现严重的腿病。对于畜禽来说,蛋氨酸毒性最大,苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和组氨酸也有一定毒性。

氨基酸的拮抗是影响赖氨酸需要量的重要因素之一,结构相似的氨基酸之间会发生拮抗作用,它们在家禽的消化、代谢过程中相互竞争或排斥,一种氨基酸干扰另一种氨基酸的消化或利用;提高一种氨基酸的浓度将增加另一种氨基酸的需要量。

赖氨酸和精氨酸在体内共同转运。血液中赖氨酸浓度升高,会降低精氨酸在肾小管的重吸收,由尿中排出的精氨酸增多。另外,赖氨酸过剩使肾脏的精氨酸酶活性增加,从而使精氨酸的分解增多。对于肉鸭,赖氨酸过量对精氨酸的需要量将造成影响,但精氨酸过剩对赖氨酸的需要量影响较小。

2.3.4 饲料赖氨酸的利用率

不同饲料原料的赖氨酸利用率差异很大,因此,对于不同类型的日粮,赖氨酸的需要量也不同。氨基酸利用率是饲料蛋白质营养价值的一个重要指标,它对畜禽氨基酸需要量的测定具有重要的影响。目前,氨基酸的营养已深入到可利用氨基酸水平,并以此为基础配合日粮。Takahashi 认为,以可利用氨基酸需要量为标准可缩小各研究结果之间的差异。

2.4 其它营养物质

日粮中的矿物元素、维生素、抗生素、胆碱、尼克酸等都会对畜禽赖氨酸需要量产生一定的影响。另外,向日粮中添加甜菜碱、肉碱等也会影响畜禽赖氨酸的需要量。

3 畜禽日粮赖氨酸不同添加量的研究

3.1 肉鸭

许多研究表明,赖氨酸是肉鸭的第二限制性氨基酸(Dean,1986;Tane、Senmidtborn,1984)。在玉米-豆粕型饲料中,当 CP 为 22%(赖氨酸为 1.22%)时,赖氨酸能满足需要,只有当饲料 CP 低于 16%时,添加赖氨酸才有效。Dean(1986)报道,赖氨酸占饲料 CP 的 5.14%(占饲料干物质的 0.85% 或每兆焦代谢能为 0.72g)时,北京鸭可获得最大增重。Leclercq 和 De Carville(1979)推荐的 3~6 周龄和 7~10 周龄番鸭赖氨酸需要量分别为 0.60% 和每兆焦代谢能为 0.52~0.53g,或阶段需要量为 21g 和 30~35g。Chen 和 Shen(1979)报道,为使杂交鸭(番鸭和北京鸭杂交)获得最佳的 9~21 日龄增重和饲料转化率,至少分别需要总日粮赖氨酸 1.06%或可利用赖氨酸 0.97%(基础日粮代谢能为 11.88MJ/kg)。Adams(1983)报道,北京鸭(10~49 周龄)的赖氨酸需要量低于 0.70%;杂交鸭的赖氨酸需要量可能比北京鸭高。罗清尧、高振川(2002)在 0~2 周龄肉仔鸭日粮中分

别添加 0.80%、0.90%、1.00%、1.10% 的赖氨酸,结果表明,各处理间肉仔鸭体重以 0.80% 赖氨酸水平组生长较差,显著低于其它 3 个处理组 ($P<0.05$),饲料报酬 0~2 周龄差异不显著 ($P>0.05$)。推荐北京肉仔鸭 0~2 周龄赖氨酸适宜水平为 0.90%;2~5 周龄以 0.65%~0.75% 为宜。

3.2 猪

冯定远、刘玉兰、张守全(2005)在杜大长生长肥育猪赖氨酸需要量的研究中得出结论,体重为 20、35、65 和 100kg 生长肥育猪的真可消化赖氨酸需要量为 10.6、12.8、15.8 和 13.2g/d,转换为总赖氨酸的需要量为 12.3、14.8、18.3 和 15.3g/d,以占风干日粮百分比表示的真可消化赖氨酸需要量为 0.96%、0.91%、0.75% 和 0.50%,总赖氨酸需要量为 1.12%、1.06%、0.86% 和 0.58%。黄苇等(2005)在 21~42 日龄仔猪日粮中分别添加 0.60%、0.80%、1.00%、1.20%、1.40% 的赖氨酸,结果表明,各组之间体增重差异极显著 ($P<0.01$)。赖氨酸含量为 1.40% 和 1.20% 组仔猪的平均体重极显著高于赖氨酸含量为 0.60%、0.80% 的日粮组 ($P<0.01$)。赖氨酸含量为 1.00% 组仔猪的平均体重显著高于赖氨酸含量为 0.60%、0.80% 的日粮组 ($P<0.05$)。

3.3 肉鸡

罗兰等(1994)的试验得出结论,在 21~30 日龄时,采食含赖氨酸 1.35% 的日粮的公鸡增重最快;采食含赖氨酸 1.30% 日粮的公鸡在 31~40 日龄时增重最快;采食含赖氨酸 1.20% 日粮的公鸡在 41~50 日龄时增重效果最好。这表明,随着试验公鸡日龄的增长,它们对日粮中赖氨酸的需求减少。而母鸡的结果则不然,采食较低水平赖氨酸的日粮(1.20%),母鸡就可达到较快的生长速度。结果表明,达到较快生长速度的母鸡对日粮中赖氨酸的需求量低于公鸡。Han 和 Baker(1994)研究了 3~6 周龄 Ross×Ross 肉用仔鸡的可消化赖氨酸需要量,结果表明,维持最大体增重的可消化赖氨酸需要量为 0.85% (公鸡) 和 0.78% (母鸡),维持最佳饲料转化率和胸肉产量的可消化赖氨酸需要量比维持最大体增重的要高,分别为 0.90% (公鸡) 和 0.85% (母鸡)。Grisoni 等(1991)认为,对 4~7 周龄肉用仔鸡,维持最佳饲料转化率的赖氨酸需要量(0.98%)高于维持最大体增重的需要量(0.89%)。

4 目前研究中存在的问题

虽然日粮赖氨酸添加量是现在动物营养学的一个研究热点,但我国对畜禽业的某些领域(如肉鸭)还没

有制定出一个统一的饲养标准,各位学者所报道的研究结果也不尽一致,所以还需在以下几个方面进一步深入的研究:①研究鸭赖氨酸需要量与能量的关系;②测定鸭用饲料的赖氨酸消化率,建立适用的鸭用饲料营养价值表;③研究赖氨酸与脂肪沉积的关系。

参考文献

- 1 罗清尧,高振川.北京肉仔鸭蛋氨酸和赖氨酸需要量的研究[J].动物营养学报,2002(3):30~35
- 2 王勇生,侯水生.鸭氨基酸需要量的研究[J].畜禽业,2002(11):22~24
- 3 冯定远,刘玉兰,张守全.杜大长生长肥育猪赖氨酸需要量的研究[J].饲料与营养,2005(3):43~44
- 4 邢志刚,任花池.精氨酸与赖氨酸适宜比例的研究进展[J].饲料广角,2004(12):18~22
- 5 黄苇.赖氨酸采食量对早期断奶仔猪生长发育及胰腺内分泌机能的影响[J].畜牧兽医学报,2005,36(5):459~463
- 6 王和民.赖氨酸和精氨酸的营养需要特点[J].广东饲料,1998(4):12~14
- 7 罗兰.日粮赖氨酸、蛋氨酸水平对不同性别肉鸡生长性能的影响[J].中国畜牧杂志,1994,30(2):8~10
- 8 陈强,齐广海.肉用仔鸡氨基酸营养研究的最新进展[J].中国饲料,1996(22):6~9
- 9 Han Y, D.H.Baker. Effects of sex, heat stress, body weight, and genetic strain on the dietary lysine requirement of broiler chicks[J]. Poultry Science, 1993(72):701~708
- 10 吴维辉,蒋宗勇,林映才,等.0~3 周龄肉鸡蛋氨酸需求参数研究[J].动物营养与饲料科学研究进展,1999,19~22

(编辑:刘敏跃,lm-y@tom.com)

· 广 告 ·

争做稳定性 VC 系列优秀供应商——

**富阳市优派特
生物技术有限公司**

**L-抗坏血酸-2-磷酸酯 35%(2000 吨/年)
包衣 VC、VC 钙、VC 钠**

农业部生产许可证号:饲添(2003)1542

公司地址:杭州富阳市凤浦路 86 号(311400)

生产基地:富阳市灵桥镇工业小区 2 号

电话:0571-63349309

传真:0571-63340623

http://www.fyupdate.com

E-mail:sate@fyupdate.com

联系人:陈先生(13806517850)

磺胺间甲氧嘧啶单克隆抗体的制备

职爱民 瞿明仁 李青梅 杨艳艳 王选年 王自良 石团员 张改平

摘要 磺胺间甲氧嘧啶(Sulfamonomethoxine, SMM)与牛血清白蛋白(BSA)偶联,制备完全抗原(BSA-SMM),并以 BSA-SMM 免疫 Balb/c 小鼠,应用杂交瘤技术将免疫鼠脾细胞与 NS₀ 细胞融合,建立分泌 SMM 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。通过对杂交瘤细胞培养上清液的检测、鉴定,筛选出 12 株高亲和力的杂交瘤细胞株,其中 4B9、1H10、2E9 的腹水 ELISA 效价为 1×10^{-7} 、 5.1×10^{-6} 和 1×10^{-7} 。该单克隆抗体可用于饲料和动物源性食品中磺胺间甲氧嘧啶残留检测的免疫学快速检测方法的建立。

关键词 磺胺间甲氧嘧啶;细胞融合;单克隆抗体;交叉反应

中图分类号 R978.2

磺胺间甲氧嘧啶(SMM)作为一种长效的磺胺类药物,由于其具有较强的抗菌作用,常被用作饲料添加剂广泛的添加到畜禽饲料中,但它会引起人体的过敏反应^[1],并可能具有一定程度的致癌性^[2],因此,磺胺间甲氧嘧啶的残留问题备受关注。根据农业部无公害食品行动计划和动物源性食品药物残留监控计划的有关部署,从 2005 年起,农业部将把畜产品中磺胺类药物的残留情况作为继盐酸克伦特罗之后的又一个予以监控的重点。为此,将相应地增加检测样本数量和畜产品的检测种类,同时对检测出的阳性样品将全部进行跟踪处理^[3]。目前检测磺胺类药物残留的理化方法有高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)和气相色谱法(GC)等^[4-7],这些方法虽然灵敏、准确,但检测时间长、耗资大、对人员素质要求高,不适合用来对大批样品的测定。酶联免疫吸附法(ELISA)作为一种快速、特异和灵敏度较高的免疫测定技术正逐步被应用于磺胺类药物残留的检测^[8]。本试验用杂交瘤技术制备抗磺胺间甲氧嘧啶单克隆抗体,为进一步研制开发 SMM 的快速检测免疫试剂盒做准备。

1 材料与方法

职爱民,江西农业大学动物科技学院,在读硕士,330045,南昌。

瞿明仁,单位及通讯地址同第一作者。

李青梅、杨艳艳、王选年、张改平(通讯作者),河南农业科学院生物技术研究所。

王自良,西北农林科技大学。

石团员,河南农业大学。

收稿日期:2006-01-14

★ “十五”国家重大科技专项:食品安全关键技术综合示范(项目编号:2001BA804A30-08)

1.1 仪器设备和试剂

倒置生物显微镜(德国 LEICA 公司);550 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);GS-15R 多功能冷冻离心机(美国 BECKMEN 公司);3701 型 CO₂ 培养箱(美国 Precision 公司);96 孔、24 孔细胞培养板(美国 Costar 公司);96 孔酶标板(浙江玉环芦蒲塑化器械厂);S2-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);超净工作台(美国 Forma Scientific 公司)。

磺胺间甲氧嘧啶(Sulfamonomethoxine)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA)均为 Sigma 公司产品;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、RPMI-1640、100×HAT、100×HT、PEG 4000 均为 Gibco 公司产品;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 抗体(GAM-IgG-HRP)购自华美生物工程公司;其它未经说明的试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 细胞和动物

NS₀ 浆细胞瘤(Plasmacytoma cell line)细胞由英国国家动物健康研究院惠赠。Balb/c 小鼠购自郑州大学医学院实验动物中心,昆明鼠为本研究室繁育。

1.3 方法

1.3.1 完全抗原的制备

利用重氮化法^[9]把 SMM 偶联到载体蛋白 BSA、OVA 上,形成完全抗原。用 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶纯化偶联物 BSA-SMM 和 OVA-SMM,冻干存于 4℃ 备用。

1.3.2 动物免疫

选取 6~8 周龄 Balb/c 小鼠 10 只,每组 5 只,共 2 组,以 BSA-SMM 免疫,免疫剂量为 100μg/只(以蛋白浓度计)。首次免疫以等量弗氏完全佐剂乳化抗原,皮下多点注射,每只 200μl;每次间隔 14~21d 加强免疫一次,采用弗氏不完全佐剂乳化抗原。第 3、4 次免疫

后 10~14d 断尾分离血清,用间接 ELISA 测定抗体效价,用酶标仪测定 OD₄₅₀,最后选择抗体效价高者进行细胞融合;融合前 3~5d 小鼠尾静脉和腹腔各注射 50μg BSA-SMM 超强免疫。

1.3.3 细胞融合

分别取超强免疫后 4d 的小鼠进行细胞融合,摘珠分离阳性血清后处死小鼠。无菌手术取脾脏,研磨分离脾细胞,按照文献^[9,11]所报道的方法与 NS₀ 细胞进行融合,融合后用 37℃预热 HAT 的培养基,以每孔 50μl 加到 96 孔细胞培养板上,置于 37℃,5%的 CO₂ 细胞培养箱中培养。第 9d 换新鲜培养基,第 10~11d 取上清液进行阳性筛选。以有限稀释法进行阳性孔的克隆。

1.3.4 阳性杂交瘤的筛选及克隆

用间接 ELISA 进行阳性筛选。具体操作为:以 OVA-SMM 1μg/ml 包被酶标板,50μl/孔,4℃过夜,设 BSA、OVA 阴性对照;5%猪血清封闭 1h,PBST (含 0.05% Tween20 的 PBS)缓冲液洗涤 6 次;各孔加入待检的培养上清液 50μl,放入 37℃培养箱 15min 后,洗涤 6 次;加 1:1 000 GAM-IgG-HRP50μl/孔,37℃孵育 30min;洗涤 6 次,以 TMB 底物系统显色;2mol/l H₂SO₄ 终止反应,用酶标仪测定 450nm 下各孔吸光值,设 1:300 阳性血清对照和 PBS 阴性对照,以检测孔 OD₄₅₀/阴性对照 OD₄₅₀(P/N)值≥2.5 为阳性。对强阳性、细胞生长旺盛的孔进行 3 次有限稀释克隆化,扩大培养及冻存细胞。

1.3.5 单克隆抗体的制备

体外培养参照文献^[12]的方法进行,同时测其 ELISA 效价。

1.3.6 单克隆抗体间接 ELISA 效价及工作浓度的测定

应用间接 ELISA 以梯度浓度稀释的 OVA-SMM 包被 96 孔酶标板,测定 SMM 单抗 IgG 的效价和工作浓度。以 5 倍于空白吸光值时的 OVA-SMM 浓度为抗原包被浓度、以 SMM 单抗的最大稀释倍数作为单抗 IgG 的间接 ELISA 效价和工作浓度。用包被缓冲液将包被抗原 OVA-SMM 稀释至工作浓度,将杂交瘤细胞培养上清液倍比稀释后,按间接 ELISA 操作程序(同上)进行单克隆抗体效价测定。

1.3.7 单克隆抗体特异性鉴定

DOT-BLOT 实验:分别用 BSA、OVA、BSA-SMM、OVA-SMM 点膜,10%脱脂奶粉封闭,加工作浓度的单抗上清液,温育半小时后洗涤,加酶标的二抗(羊抗鼠 IgG),温育半小时后洗涤显色。

间接竞争抑制 ELISA 试验:以一定浓度的 SMM 标准溶液与单抗混合作用 10min 后作为一抗(自制备的单抗),每孔加入 50μl,37℃作用 0.5h,其它与间接 ELISA 操作相同。

交叉反应性:参照 Shelper 和 Smith 的方法^[13],以单抗对 SMM 的 50%抑制浓度(IC₅₀)与对竞争物的 IC₅₀ 之比的百分数为其交叉反应率(CR%)。用竞争性 ELISA 测定各竞争物在 100~1 000 000ng/ml 时的吸光度,应用 4 参数 Logit 法(BioRad Microplate Manager/PCver410)拟合竞争曲线,并计算 SMM 及各类竞争物的 IC₅₀ 和 CR%。

2 结果与分析

2.1 2 组共 10 只小鼠免疫 3 次以后血清的间接效价见表 1,效价的差异可能是由于实验动物之间的个体

表 1 菌种筛选

稀释倍数	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	空白组
小鼠 A1	1.509	1.404	1.001	0.752	0.415	0.332	0.120	0.048
小鼠 A2	1.867	1.685	1.235	0.843	0.437	0.203	0.098	0.058
小鼠 A3	1.205	1.120	0.985	0.653	0.297	0.123	0.100	0.036
小鼠 A4	1.551	1.320	0.996	0.602	0.262	0.125	0.092	0.067
小鼠 A5	1.548	1.456	1.023	0.634	0.321	0.231	0.096	0.065
小鼠 B1	1.641	1.526	1.423	1.021	0.856	0.423	0.258	0.071
小鼠 B2	1.757	1.702	1.523	0.980	0.650	0.348	0.118	0.076
小鼠 B3	1.759	1.689	1.258	0.876	0.306	0.201	0.100	0.052
小鼠 B4	1.860	1.758	1.562	0.987	0.854	0.451	0.300	0.048
小鼠 B5	1.975	1.885	1.568	1.023	0.921	0.500	0.326	0.065

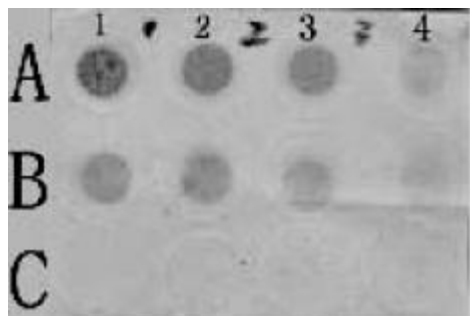
差异所至。

2.2 融合板阳性孔进一步用间接抑制 ELISA 检测后,在 24 孔培养板上扩大培养,10d 左右用有限稀释法进行亚克隆并冻存细胞,克隆后第 10~12d 再进行检测。

经连续 4 次亚克隆后得到 12 株抗 SMM 的单克隆抗体杂交瘤细胞株,选取其中 3 株继续克隆并分别命名为 4B9、1H10、2E9。

2.3 经 DOT-BLOT 和间接 ELISA 测定,上述 3 株单

克隆抗体能与 OVA-SMM 包被原发生反应,不与 BSA、OVA 反应,也不和同样用重氮化法连接的巴比妥与卵清白蛋白(PAPB-BSA)反应,排除了连接桥抗体,见图 1。



A1:BSA-SMM 6 μ g,A2:BSA-SMM 4 μ g,A3:BSA-SMM 2 μ g,A4:BSA-SMM 1 μ g,B1:OVA-SMMB 6 μ g,B2:OVA-SMMB 4 μ g,B3:OVA-SMMB 2 μ g,B4:OVA-SMMB 1 μ g,C1:BSA 6 μ g,C2:OVA 6 μ g,C3:PAPB-BSA 6 μ g。

图 1 点迹图

2.4 用间接 ELISA 测定腹水抗体效价(见表 2)

表 2 SMM 单抗的间接效价

单抗	培养上清液效价	腹水效价
4B9	1:512	1 $\times 10^{-7}$
1H10	1:640	1 $\times 10^{-7}$
2E9	1:320	5 $\times 10^{-6}$

2.5 单抗的交叉反应性

与磺胺类药物有不同程度的交叉,与抗生素、激动剂等没有交叉反应性,表明这 3 株单克隆抗体具有较好的特异性,结果见表 3。

表 3 SMM 单抗与其它药物的交叉反应性

竞争物	IC50(ng/ml)	CR(%)
磺胺间甲氧嘧啶	30	100
磺胺氯吡嗪钠	10 000	0.3
磺胺嘧啶钠	100 000	0.03
磺胺喹噁啉钠	100 000	0.03
磺胺对甲氧嘧啶	10 000	0.3
盐酸克伦特罗	>1 000 000	<0.003
链霉素	>1 000 000	<0.003
莱克多巴胺	>1 000 000	<0.003
氯霉素氨苄西林钠	>1 000 000	<0.003

3 讨论

3.1 完全抗原合成时,以过量的半抗原和载体蛋白反应,考虑到国内、国际关于抗原和载体在多大偶联比时更能激发机体产生有效抗体的说法不一^[14-16],并且现有的测定方法基本是估算,故本实验用的完全抗原合成后只是定性的检测了偶联情况,没有测定其偶联比就直接用于动物免疫实验,究竟偶联比对免疫的

影响如何,尚需要相关的实验证明。

3.2 动物免疫实验时可以把免疫抗原直接注射到脾内,可节约抗原和时间。

3.3 本研究在国内首次完成抗 SMM 单抗的制备,该单抗可用于 SMM 的免疫快速检测方法的建立。

参考文献

- Huber W G. Allergenicity of antibacterial drug residues [A]. Rico A G. Drug residues in animals [M]. New York: Academic Press, 1986.33~50
- Littlefield N A, Sheldon W G, Allen R, et al. Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulphamethazine in Fisher 344/N rats: two-generation exposure [J]. Food Chem.Toxicol, 1990(28):157~167
- 中国兽药信息网. <http://www.ivdc.gov.cn/>, 04-11-05
- Garden S W, Sporns P. Development and evaluation of an enzyme immunoassay for sulfamerazine in milk [J]. J. Agric.Food Chem., 1994(42):1 379~1 391
- 农业部畜牧兽医局.动物源食品中磺胺类药物残留的检测方法.中国兽药杂志,2002,36(6): 12~13
- Aerts M ML,Hogenboom A C, Brinkman U A. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products [J]. J. Chromatog. B, 1995(667): 1~40
- 林海丹. 动物源性食品中磺胺类药物残留的固相萃取-高效液相色谱法测定.分析测试学报,2003,22(1):94~96
- Muldoon M T,Holtzapple C K, Deshpande S S, et al. Development of a monoclonal antibody -based cELISA for the analysis of sulfa-dimethoxine. 1. Development and characterization of monoclonal antibodies and molecular modeling studies of antibody recognition[J]. J. Agric. Food Chem., 2000(48):537~544
- Fleeker J R, Lovett L J. Enzyme immunoassay for screening sulfamethazine residues in swine blood [J]. J. Assoc. Off.Anal. Chem.,1985(68):172~174
- Lane R D, Crissman R S, Ginn S. High efficiency fusion procedure for producing monoclonal antibodies against weak immunogens [J]. Methods Enzymol., 1986(121):183~192
- Heddy Zola 著,周宗安等译.单克隆抗体手册[M]. 南京:南京大学出版社, 1991.48~63
- 王选年,杨艳艳,李青梅,等. 盐酸克伦特罗单克隆抗体的制备及其特性.河南农业科学, 2002(6):30~33
- Shelver W L, Smith D J. Development of an immunoassay for the β -adrenergic agonist ractopamine[J]. J. Immunoassay ,2000,21(1) :1~23
- Roe R M.Enzyme-linked immunosorbent assay of small molecular weight toxicants [A].Hodgson E, Roc R M,Motoyama N. Pesticides and the future: toxicological studies of risks and benefits [M]. Raleigh N C: North Carolina State University, 1991.273~287
- 李君理,黄樵让. 免疫生物学概论[M].北京:高等教育出版社, 1992.55~78
- Erlanger B P. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey[J]. Methods Enzymol., 1980(70):85~104

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

细菌发酵大豆异黄酮甙元的工艺及

高效液相色谱检测

董青 吴周和 孙正博 李文彬

大豆异黄酮是一类存在于大豆中能对人体发挥有益作用的非营养物质。 β -葡萄糖苷酶是一种能将大豆中的异黄酮由结合型糖苷向具有生理活性的游离型糖苷转化的活性酶^[1]。据报道,发酵大豆制品中游离型糖苷的含量远高于未发酵的大豆^[2],这说明在大豆加工发酵过程中某些微生物所产 β -葡萄糖苷酶使糖苷向甙元进行了转化。本文用本课题组筛选的产 β -葡萄糖苷酶的菌种,对大豆黄素(大豆异黄酮甙元的一种)发酵条件进行优化,并通过 HPLC(高效液相色谱)进行检测。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆(购于武汉市中百仓储超市)、细菌 B.SP-4(本课题组筛选)。

1.2 主要仪器

高效液相色谱仪(日本岛津 LC-6A)、紫外扫描仪(日本岛津 UV-2550)、十万分之一电子天平(Germany Sartorius BP211D)、高速台式离心机(上海安亭仪器厂 TGL-16C)、超纯水器(HUMAN Corporation HUMAN UP900)、超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司 KQ-100B)、色谱柱[BDS Hypersil C₁₈(250×4.6×5)]。

1.3 试剂

大豆黄素(含量 97%,Sigma 公司)、甲醇(色谱纯)、乙酸(分析纯)、超纯水(0.22 μ m 级)、正己烷(分析纯)。

1.4 HPLC 条件确定及精确度和稳定性实验^[3,4]

用紫外扫描仪扫描大豆黄素(Daidzein)标样,确定紫外检测范围,再通过实验优化流动相的配比、流速、柱温等检测条件,绘制大豆黄素的标准曲线(质量-色谱峰面积),并进行精确度和稳定性实验。

1.5 发酵液样品的处理

将 60ml 的正己烷加入到发酵液中,用超声波振荡 30min 后除去正己烷(目的是除去体系中的脂肪)。真空干燥发酵液后加入 300ml 无水乙醇超声振荡 30min。离心,经 0.22 μ m 级尼龙微孔滤膜过滤后上 HPLC 检测。

1.6 发酵条件的优化^[5,6]

通过改变细菌 B.SP-4 的营养条件(C 源、N 源、无机盐、大豆含量)和发酵条件(温度、pH 值、转速、装液量、发酵时间)来提高大豆黄素的产量。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 实验

2.1.1 HPLC 条件的确定

流动相:甲醇(A 泵)-0.5%乙酸水溶液(B 泵);流速:1.0ml/min;柱温:35℃;波长:260nm;梯度洗脱 0~40min,甲醇(B 泵)由 10%线性递增至 60%,40~42min,甲醇(B 泵)保持 60%。

2.1.2 线性关系的确定

通过 2.1.1 所确定的色谱条件,测定梯度模式下大豆黄素的标准曲线: $y=30\ 348x-1\ 014.9$ ($R=0.999\ 8$),出峰时间为 4.816min。

2.1.3 精密度和稳定性测试

将大豆黄素标样连续进样 5 次,测定其含量及出峰时间,结果发现,出峰时间和甙元含量的相对标准偏差(RSD)均在 2%以下,表明本实验具有良好的重现性,色谱条件合理;另将大豆黄素标样放置 0、4、8、12、16、24h,测定其含量,发现大豆黄素在 24h 内所测结果的相对标准偏差在 5%以下,说明 24h 内测定结果稳定。

2.2 产量条件的优化^[5,6]

2.2.1 碳源对大豆黄素产量的影响(见图 1)

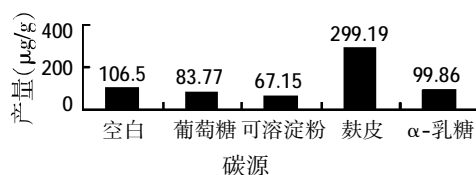


图 1 碳源对大豆黄素产量的影响

由图 1 可知,最佳碳源为麸皮(空白中仅含未发

董青,湖北工业大学工业微生物省级重点实验室,在读硕士,430068,武汉。

吴周和、孙正博、李文彬,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-01-04

★ 湖北省教育厅重点项目,项目编号(2003A003)

酵大豆,下同)。

2.2.2 氮源对大豆黄素产量的影响(见图 2)

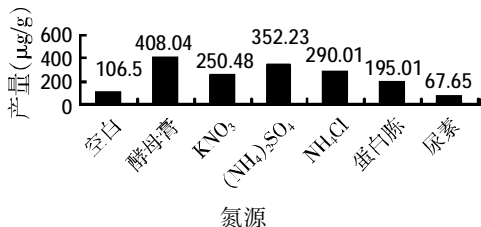


图 2 氮源对大豆黄素产量的影响

由图 2 可知,最佳氮源为酵母膏。

2.2.3 无机盐对大豆黄素产量的影响(见图 3)

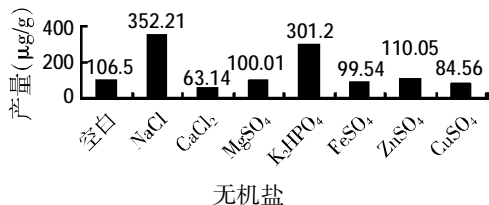


图 3 无机盐对大豆黄素产量的影响

由图 3 可知,NaCl 和 K_2HPO_4 对大豆黄素的产量有促进作用, Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 对大豆黄素产量的影响不大, Ca^{2+} 对大豆黄素的产量有一定的抑制。

2.2.4 装液量对大豆黄素产量的影响(见图 4)

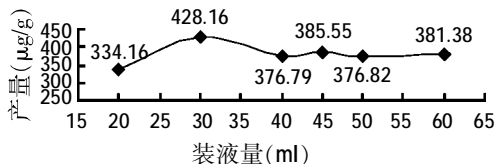


图 4 装液量对大豆黄素产量的影响

由图 4 可知,300ml 装液瓶中最佳装液量为30ml。

2.2.5 温度对大豆黄素产量的影响(见图 5)

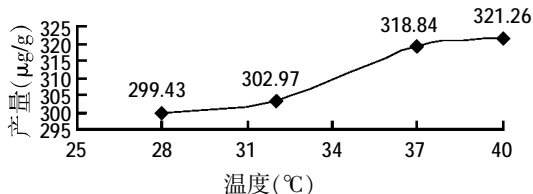


图 5 温度对大豆黄素产量的影响

由图 5 可知,最佳发酵温度为 40℃。

2.2.6 pH 值对大豆黄素产量的影响(见图 6)

由图 6 可知,最佳发酵 pH 值为 7.5。

2.2.7 转速对大豆黄素产量的影响(见图 7)

由图 7 可知,最佳转速为 180r/min。

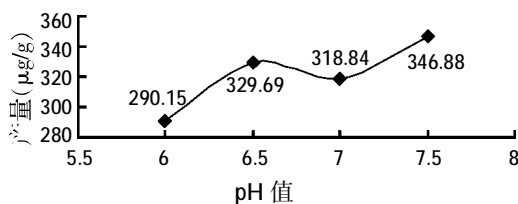


图 6 pH 值对大豆黄素产量的影响

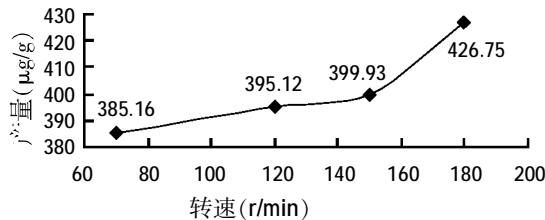


图 7 转速对大豆黄素产量的影响

2.2.8 发酵时间对大豆黄素产量的影响(见图 8)

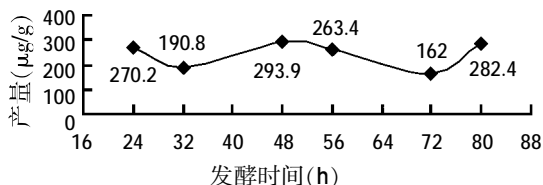


图 8 发酵时间对大豆黄素产量的影响

由图 8 可知,最佳发酵时间为 48h。

2.3 确定最佳发酵条件的正交实验(见表 1、表 2)

表 1 影响大豆黄素产量的因素水平

水平	麸皮(%)	酵母膏(%)	装液量(ml)	大豆(%)
1	0.5	0.5	60	2
2	1	1	30	1
3	2	0.2	45	0.5

表 2 影响大豆黄素产量的因素水平正交实验 $L_9(3^4)$

项目	麸皮	酵母膏	装液量	大豆	含量
1	1	1	1	1	228.72
2	1	2	2	2	442.74
3	1	3	3	3	565.98
4	2	1	2	3	407.22
5	2	2	3	1	375.01
6	2	3	1	2	219.60
7	3	1	3	2	302.93
8	3	2	1	3	208.53
9	3	3	2	1	253.89
K1	1 237.44	938.87	656.85	857.62	
K2	1 001.83	1 026.28	1 103.85	965.27	
K3	765.35	1 039.47	1 243.92	1 181.73	
k1	412.48	312.96	218.95	285.87	
k2	333.94	342.09	367.95	321.76	
k3	255.12	346.49	414.64	393.91	
R	157.26	33.53	195.69	108.04	
较优水平	0.5%	0.2%	45ml	0.5%	
主次因素	装液量→麸皮→大豆→酵母膏				

免疫增强剂有机硒在生长猪上的应用研究

魏凤仙 李绍钰 李春群 孔祥书 王琳焱

摘要 选择日龄相近、平均体重(30.0±0.5) kg的杜×长×大三元杂交小母猪20头,随机分为2个处理,每个处理10头,对照组为基础日粮组,处理组为基础日粮+有机硒(硒酵母200mg/kg),研究有机硒替代抗生素对生长猪免疫性能的影响。试验结果表明:在饲料中添加有机硒,能够提高生长猪血清中球蛋白与白蛋白比值,提高牛血清白蛋白(BSA)免疫抗体OD值(免疫第7d时差异达显著水平, $P<0.05$)及植物血球凝集素(PHA)刺激皮褶厚度增加值。

关键词 有机硒;生长猪;生产性能;免疫性能

中图分类号 S852.4

硒是动物必需的微量元素之一,它与动物生长、发育和疾病发生有着密切的关系。硒以无机硒和有机硒形式存在,无机硒包括亚硒酸钠、硒酸钠、硒化钠、亚硒酸钙;有机硒包括硒酵母、硒代蛋氨酸、硒代胱氨酸等。有机硒的生物利用率高于无机硒,易于动物吸收利用,且有机硒毒性小,不会对人和环境造成不良影响^[1]。硒与动物的免疫状况密切相关,被称为免疫促进剂^[2]。硒能刺激免疫球蛋白及抗体的生成,提高机体

体液免疫、细胞免疫和非特异免疫功能;缺硒可导致免疫能力低下,而补硒可提高机体免疫力。日前有机硒对促进生长猪免疫机能方面的研究在国内外报道较少,为寻求抗生素替代品,提高生长猪自身免疫力,以生产优质无公害猪肉而开展了本试验研究,旨在探讨有机硒对生长育肥猪免疫性能的影响,为今后指导生产提供参考。

1 试验材料及方法

1.1 试验地点及试验动物

试验在河南省黄泛区农场第一猪场进行。选择日龄相近、平均体重(30.0±0.5)kg的杜×长×大三元杂交小母猪20头,随机分为2个处理,每个处理10头,对照组为基础日粮组,处理组为基础日粮+有机硒(硒酵母0.02%)。

魏凤仙,河南省农业科学院畜牧兽医研究所,助理研究员,450002,河南省郑州市农业路1号。

李绍钰(通讯作者)、王琳焱,单位及通讯地址同第一作者。

李春群、孔祥书,河南省黄泛区欣鑫牧业有限公司。

收稿日期:2006-01-04

通过上述正交实验条件确定最佳组合为麸皮0.5%、酵母膏0.2%、大豆0.5%、NaCl 0.04%、 K_2HPO_4 0.1%。发酵条件为温度40℃、转速180r/min、装液量45ml、pH值7.5、发酵时间48h,在此条件下大豆黄素的最高产量达到565.98μg/g,是未发酵大豆的5.31倍。

2.4 讨论

2.4.1 通过发酵条件的优化使大豆中大豆黄素的产量达到565.98μg/g,是未发酵大豆的5.31倍。这表明所选育的菌株可以使结合型葡萄糖甙向大豆黄素转换。

2.4.2 本实验生产甙元所用的材料如酵母膏等,价格较高,不适合工业化大规模生产。同时,这些材料成分都很复杂,给大豆黄素的分离纯化带来困难。在今后的实验中希望能找到价格相对便宜,同时结构较为单一、与大豆黄素理化性质差异较大的,而且能提高产

量的材料作为营养条件,这样可以大大地降低下游分离纯化的成本,使工业化利用生物法制备大豆异黄酮甙元成为可能。

参考文献

- 1 王兆梅,李琳,郭祀远,等.大豆异黄酮分离特性及其检测的初步探讨[J].食品与发酵工业,2002(28):7
- 2 张炳文,宋永生,赫征红,等.发酵处理对大豆制品中大豆异黄酮含量与组分的影响.食品与发酵工业,2002(28):7
- 3 权静,卢定强,张筱,等.高效液相色谱法检测大豆粕中大豆黄素及染料木质素含量[J].粮食与油脂,2004(5)
- 4 苗虹,赵云峰,周蕊,等.高效液相色谱法测定食品中大豆异黄酮含量[J].中国食品添加剂,2004(5)
- 5 李季伦.《微生物学》(第二版).北京:科学出版社,1985.752
- 6 沈萍,范秀容,李广武.《微生物学实验》(第三版).北京:高等教育出版社,1999

(编辑:孙崎峰, sqf0452@126.com)

1.2 试验饲料及饲养管理

试验日粮营养水平采用 NRC(1998)标准,饲料配方及营养水平指标见表 1。试验期间试验猪饲养管理采用常规饲养管理模式,试验猪按常规饲养管理程序进行驱虫和免疫,采用干粉料日喂 3 次,自由采食、自由饮水,猪只发生病变或异常,要及时处理并记录猪只耳号。

表 1 饲料配方及营养水平

原料名称	原料配比(%)		营养水平
	对照组	处理组	
玉米 2 级	68.6	68.6	消化能 (MJ/kg) 13.79
大豆粕 2 级	23.1	23.1	粗蛋白质 (%) 16.97
鱼粉	1.0	1.0	钙 (%) 0.61
小麦麸	5.0	5.0	总磷 (%) 0.52
赖氨酸	0.08	0.08	有效磷 (%) 0.28
石粉	0.9	0.9	赖氨酸 (%) 0.90
磷酸氢钙	0.7	0.7	总含硫氨基酸 (%) 0.57
食盐	0.4	0.4	蛋氨酸 (%) 0.28
猪用多矿	0.2	0.2	
猪用多维	0.02	0.02	
有机硒	0	0.02	

1.3 试验检测指标及方法

1.3.1 血液生化指标

总蛋白(TP)、球蛋白(GLB)、清蛋白(ALB)、计算血清球蛋白与白蛋白的比值(G/A)。

1.3.2 免疫指标

1.3.2.1 体液免疫指标

使用牛血清白蛋白(BSA)试剂,采用酶联免疫吸附测定法,在酶联免疫自动读数仪 492nm 处读数,以 1 : 50 倍稀释光吸收值表示其抗体生成,测定血清中 BSA 抗体效价(OD 值)。

1.3.2.2 细胞免疫指标

迟发性过敏反应的测定,在生长猪左腿内侧皮下注射植物血球凝集素(PHA),右侧注射生理盐水,测定 24h 后腿皮褶厚度增厚差值。

1.4 试验处理

在正式试验开始后的第 7d,每个处理(对照组和处理组)选取 3 头体重相近的健康猪,每千克体重耳后肌肉注射牛血清白蛋白(BSA)1mg 进行免疫,并在免疫后的 0d(试验的第 7d)、7d(试验第 14d)和 21d(试验第 28d) 用 10ml 真空采血管颈静脉采血 5ml,3 000r/min 离心 15min,制备血清,-20℃冰箱保存备用。

于试验正式开始后的第 14d,对处理组剩余的猪只随机选取 2 头,进行皮肤过敏试验。其中在 1 头猪

的左大腿内侧腹骨沟皮下注射 0.5ml PHA (250μg/ml),右腿注射 0.5ml 生理盐水,圈圆圈标记。并分别于注射前和注射 24h 后用厚度计测定注射部位的皮褶厚度(3 次读数,求平均值),再求出两腿皮褶增厚的差值,观察过敏反应程度。另外 1 头左腿注射 1ml PHA(250μg/ml),右腿注射 1ml 生理盐水(其它处理同上 1 头猪),测定 24h 后皮褶厚度增厚值。

2 试验结果与分析

2.1 血液生化指标

分别于正式试验开始后的第 7d、第 14d、第 28d 前腔静脉采血制备血清,检测血清中的总蛋白、白蛋白,并计算血清球蛋白与白蛋白比值(G/A),试验结果见表 2。

表 2 血液生化指标

试验时间	组别	总蛋白(g/dl)	白蛋白(g/dl)	G/A 值
第 7d	对照组	5.863±0.642	3.475±0.083	0.691±0.225 ^a
	处理组	6.230±1.035	2.950±0.329	1.108±0.196 ^b
第 14d	对照组	6.788±0.616	3.808±0.348	0.797±0.271 ^a
	处理组	6.486±0.694	2.874±0.149	1.262±0.277 ^b
第 28d	对照组	7.170±0.920	4.161±0.538	0.725±0.105
	处理组	6.592±1.095	3.710±0.446	0.797±0.403

注:同列肩注有不同字母者表示差异显著(P<0.05)。

血清球蛋白的主要作用是用以维持机体血管内渗透压的平衡和物质的运输。抗体是球蛋白重要的组成部分,炎症反应和应激状态下,血清球蛋白的含量增加。由表 2 可见,对照组与处理组猪血清总蛋白含量在试验 1~28d 时均有上升趋势;且对照组上升幅度大于处理组,但统计分析差异不显著(P<0.05)。在整个试验期间对照组血清中白蛋白含量上升,而且对照组血清中白蛋白含量高于处理组;处理组猪血清中白蛋白含量在试验的第 14d 时稍有下降,而在试验的第 28d 时上升。在整个试验期,处理组和对照组血清中 G/A 值均表现出先升高后降低的趋势,同时,在试验的第 7d、第 14d、第 28d,处理组血清中 G/A 值均高于对照组,其中第 7d 和第 14d 时血清中 G/A 值统计分析差异达到显著水平(P<0.05)。本试验结果表明,在经过抗原牛血清白蛋白刺激后,机体的免疫系统被激活,更多的蛋白质用于抗体的合成,随着抗体产生量的提高,血液中的球蛋白含量随之增加,G/A 值升高。表明有机硒具有提高生长猪体液免疫的作用。

2.2 牛血清白蛋白(BSA)抗体 OD 值

前腔静脉采取 BSA 免疫后第 0d、第 7d、第 21d 的试验猪血清,检测 BSA 抗体 OD 值。对照组和处理组的牛血清白蛋白(BSA)抗体 OD 值结果见表 3。

表 3 BSA 抗体 OD 值

试验时间	对照组	处理组
免疫后 0d	1	1
免疫后 7d	1.091±0.097 ^a	1.461±0.234 ^b
免疫后 21d	1.066±0.046	1.286±0.307

注:同行肩注有不同字母者表示差异显著(P<0.05)。

分析发现,在 BSA 免疫前,猪血清中已经含有 BSA 抗体,且变异很大,而试验设计时认为 BSA 为一种异源蛋白抗原,猪血清中 BSA 抗体水平应该为零。估计这种抗体是由于许多疫苗如猪瘟疫苗中含有牛血清白蛋白成分(例如作为佐剂)造成的,而在本试验开始之前,该猪场已对试验猪群进行过两次猪瘟疫苗免疫。尽管如此,当以注射 BSA 抗体 OD 值为 1 时,用各时间点的 OD 值与之比较,则比值仍可出现较明显的规律性变化,即免疫后第 7d 时,BSA 抗体的 OD 值均升高,而且,处理组与对照组相比差异达显著水平(P<0.05)。免疫后第 21d 时 BSA 抗体的 OD 值均下降,且处理组(有机硒组)下降幅度大于对照组,表明有机硒能被用来合成谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),以消除由于应激而产生的更多自由基(主要是通过降低氧化磷酸化的偶联作用,导致电子渗透的增加和超氧化基的过量产生),具有降低免疫反应程度,避免机体长期处于高度应激状态,从而达到促进动物机体生长的作用。

2.3 皮褶厚度增加值

分别于正式试验开始后的第 7d、第 14d、第 28d 每个处理随机选择 1 头猪,在猪的左腿内侧肌肉注射植物血球凝集素(PHA)0.5ml,右腿内侧注射 0.5ml 生理盐水;再另外分别选择 1 头猪,在猪的左腿内侧肌肉注射植物血球凝集素 1.0ml,右腿内侧注射 1.0ml 生理盐水,并于 24h 后用厚度测量仪检测左、右腿皮褶厚度增加值,计算左右腿 24h 后皮褶厚度增厚差值,试验结果见表 4。

表 4 注射 PHA 后左右腿皮褶厚度增厚差值 (mm)

PHA 处理	试验第 7d	试验第 14d	试验第 28d
左腿注射 0.5ml PHA, 对照组	4.87	6.42	4.67
右腿注射 0.5ml 生理盐水 处理组	7.13	4.05	8.23
左腿注射 1.0ml PHA, 对照组	6.87	8.58	7.36
右腿注射 1.0ml 生理盐水 处理组	7.65	10.37	7.72

PHA 是一种促有丝分裂原。动物皮下组织对 PHA 的反应状况是细胞免疫的一项指标^[6-8]。免疫组织学分析,这种皮下反应的主要参与者为单核细胞和致

敏的 T 淋巴细胞,其反应包括局部发炎感染并向皮下扩散,血管周围白细胞聚集成套状、水肿以及皮肤胶原蛋白隆起。由表 4 可见,试验组猪 PHA 注射后 24h 皮褶厚度增厚值大于对照组(在试验第 14d 时,0.5ml PHA 注射剂量试验组猪 24h 后皮褶厚度增厚值小于对照组,这可能与个体差异有关),并且给试验猪注射 1ml PHA 皮褶厚度增厚差值大于注射 0.5ml PHA 剂量时皮褶增厚差值,表明给生长猪注射 PHA 24h 后皮褶厚度的增厚差值与注射 PHA 的剂量有关。同时,本试验结果显示,在试验的第 14d 时,皮褶增厚差值大于第 7d 时的皮褶增厚差值,而在试验的第 28d 时,皮褶增厚差值又下降,表明随日龄增加,生长猪机体免疫功能逐渐完善。本试验结果表明,在生长猪饲料中添加有机硒有提高生长猪细胞免疫的作用。

综上所述,有机硒(硒酵母)有提高生长猪血液中 G/A 值的作用,提高牛血清白蛋白(BSA)免疫抗体 OD 值(免疫第 7d 时差异达显著水平,P<0.05)及植物血球凝集素(PHA)刺激皮褶厚度增加值的作用,即具有提高动物机体免疫性能的能力。

参考文献

1 郝智慧,袁纭.微量元素硒的研究新进展[J].辽宁畜牧兽医,1999(1):27~30

2 毛胜勇.有机硒在动物生产中的应用研究[J].饲料与畜牧,2000(6):9~11

3 Kim Y Y,Mahan D C. Effect of dietary selenium source, level, and pig hair color on various selenium indices [J].Journal of Animal Science,2001,79(4):949~955

4 B.Wolter.Influence of dietary selenium source on growth performance and carcass and meat quality characteristics in pigs Canadian[J]. Journal of Animal Science,1999(1):119~121

5 李光辉摘译.有机硒化合物 Cn-1 对仔猪免疫系统的影响[J].动物医学进展,1999,20(2):62~63

6 Haggard D L, Stowe H D, Conner G H, et al. Immunologic effects of experimental iodine toxicosis in young cattle[J]. American Journal of Veterinary Research, 1980,41(4):539~543

7 Blecha F, Pollmann D S, Nichols D A. Weaning pigs at an early age decreases cellular immunity [J]. Journal of Animal Science, 1983,56(2):396~400

8 Regnier J A, Kelley K W. Heat and cold stress suppresses in vivo and in vitro cellular immune responses of chickens [J]. American Journal of Veterinary Research, 1981,42(2):294~299

9 张巧娥,刘红霞,杨库,等.有机硒对生长育肥猪生产性能的影响[J].宁夏农学院学报,2002(1):28~29

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

维生素 E 对动物免疫的调控作用

卢亚萍 杜 杰

摘 要 维生素 E 是一组具有生物活性的化学结构近似的酚类化合物,有 8 种不同的生育酚,为脂溶性断链抗氧化剂。适当剂量的维生素 E 能增强抗体和补体的产生以及抗体对抗原的应答反应,促使淋巴细胞的增殖、分化和细胞因子的产生,提高细胞的细胞毒作用和吞噬细胞的吞噬作用。维生素 E 缺乏或过量,能抑制机体的免疫机能,降低对疾病的抵抗能力。

关键词 维生素 E;免疫调控;分子机制

中图分类号 S852.4

维生素 E 因其环状结构而具有抗氧化特性,而且这种结构可通过与其结合的链直接变成细胞膜的一部分,在细胞膜上,它可能有作用点。亚细胞膜结构主要由多不饱和脂肪酸构成,这些不饱和脂肪酸决定了细胞膜的通透性,因此在许多过程中都起作用。不饱和脂肪酸易于发生氧化反应,这种反应如果控制不好,会导致细胞受到伤害或细胞死亡。对于吞噬细胞,情况更是这样,如巨噬细胞能首先处理有关外来病原的消息,并传递至其它免疫细胞作出进一步的反应,当这些吞噬细胞在裂解过程中释放杀菌物质时,除非有足够容量的细胞抗氧化剂,否则它们自身也会被杀死。维生素 E 具有这种典型的保护作用,而且能由维生素 C 再生。

1 维生素 E 的性质

维生素 E 是苯并二氢呋喃的衍生物,具有 β -色酮环和一个侧链,天然的维生素 E 有 8 种。依据侧链结构及色酮环上甲基位置不同分为有活性的衍生物 α 、 β 、 γ 、 δ 生育酚和 α 、 β 、 γ 、 δ 三烯生育酚,其中以 α -生育酚的生物活性最高(王俊东等,1996;Grimble,1997)。 α -生育酚为黄色油状液体,易溶于脂肪等有机溶剂,对酸及热稳定,但不耐碱,对氧敏感,极易氧化,特别是在光照、加热及碱,铁、铜等微量元素存在的情况下更是如此,因此,维生素 E 是有效的抗氧化剂。此外,维生素 E 与维生素 A 或不饱和脂肪酸等易氧化的物质同时存在时,可作为这些物质的抗氧化剂。

2 维生素 E 与免疫

早期研究认为,维生素 E 不影响免疫,但服用过量维生素 E 会刺激抗体形成(段德闲,1992)。近期更有

许多试验表明,维生素 E 与免疫反应之间有关。龚利敏等(1997)和任泽林等(1998)研究表明,VE 可增强机体免疫力,具有抗应激的作用。因为 VE 不仅作为细胞内抗氧化剂来稳定多不饱和脂肪酸及其合成与分解代谢的中间产物,使其不被氧化破坏,而且影响花生四烯酸的代谢和前列腺素的功能,而前列腺素水平和免疫保护作用直接相关,前列腺素影响淋巴细胞的活力、增殖和巨噬细胞的功能。VE 可以通过抑制前列腺素-2 和皮质酮的生物合成,促进体液、细胞免疫和细胞吞噬作用以及提高 IL-2 的含量来增强机体的整体免疫机能。显然 VE 对免疫细胞膜结构的维持有一定作用,VE 缺乏必然影响免疫。Meydani 等(1996)报道,VE 缺乏影响体液和细胞介导。

2.1 维生素 E 对体液免疫反应的影响

VE 通过阻止过氧化反应和自由基对淋巴网状细胞的破坏作用及通过阻止花生四烯酸的氧化反应影响氧化磷酸化关键酶,改变淋巴细胞受体功能来抑制前列腺素合成,达到增强体液免疫反应的目的。维生素 E 缺乏时抑制法氏囊、胸腺及脾的生长,循环淋巴细胞数减少。补充 VE 可提高血液中免疫球蛋白水平,增强对疫苗或其它抗原产生抗体的能力,而缺乏 VE 则与体液免疫抑制状态有关。Hidiroglou 等(1995)实验表明,牛补饲维生素 E 后,血清 IgM、IgG 均高于对照组。Meydani 等(1992)发现,缺乏 VE 大鼠的空斑形成细胞数和对绵羊红细胞(RBC)的凝集滴度显著降低,而补充 VE 则可改善体液免疫反应,提高鸡抗 E. coli 感染的能力。Reffett 等(1987)的实验结果表明,经饲料补充 VE 可提高羔羊抗副流感 III 型病毒抗体水平,尤其可提高二次免疫抗体的产生。

维生素 E 通过增强免疫反应,提高机体抗病能力。在雏鸡日粮中添加 300mg/kg 维生素有助于抵抗细菌及病毒感染(Morandi,1993)。对于 140 日龄蛋鸡,在接种新城疫前饲喂 300mg/kg 的维生素 E,0.25mg/kg

卢亚萍,浙江大学饲料科学研究所,农业部动物分子营养重点实验室,在读硕士,310029,浙江省杭州市秋涛北路 164 号。

杜杰,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2006-01-14

亚硒酸钠可大大提高免疫效果及抗体滴度(Bassiouni, 1990)。在日粮中分别补充 150mg/kg 与 300mg/kg 维生素 E, 可使鸡因大肠杆菌所致的死亡率从 40%降低到 27%和 5%。产蛋鸡用大肠杆菌免疫后, 补充维生素 E, 可提高孵出小鸡的被动免疫能力。文杰(1996)报道, 添加维生素 E 明显提高肉仔鸡血清 HI 抗体滴度, 表明维生素 E 可提高肉仔鸡体液免疫水平。母猪日粮中补充维生素 E 以后可以提高 1 日龄仔猪血清中的 IgG 水平(Babinsky, 1991)。维生素 E 可有效地预防奶牛产后早期发生中性粒细胞免疫功能下降。

Meydani 等(1997)对健康老年人的研究表明:每天服用 200mg VE, 对 B 型肝炎和破伤风疫苗的抗体应答反应最强, 而低于或高于此值(0、60 和 800mg), 应答反应都有降低; 而 VE 对白喉疫苗的抗体应答和 IgM、IgA、IgG 以及自身抗体的产生均无影响。当饲料中添加的 VE 为对照组的 15 倍时, 能明显降低由于反转录病毒感染所引起的小鼠脾细胞中的 IgA 和 IgM 的升高, 但对正常小鼠脾细胞的 IgA 和 IgM 的产生无影响(王云等, 1994)。

2.2 维生素 E 对细胞免疫反应的影响

维生素 E 参与免疫系统发育, 当维生素 E 缺乏时, 粘膜生长受到破坏, 导致粘膜和胸腺中淋巴细胞数量减少。

2.2.1 VE 对非特异性细胞免疫的影响

VE 对非特异性细胞免疫有明显促进作用, VE 的添加还能提高小鼠巨噬细胞的吞噬作用。VE 对非特异性细胞免疫的影响, 存在明显的个体差异。例如, VE 在饲料中的含量为 0~500mg/kg 时, 对正常小鼠的 NK 细胞的活动无影响, 但却有效地阻止了因羊红血细胞免疫所引起的老龄鼠 NK 细胞活性的下降(Meydani 等, 1988)。VE 过量或不足, 如同对特异性细胞免疫的影响一样, 都能起抑制作用。VE 缺乏, 不仅能抑制小鼠的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(王云等, 1994), 使小鼠的巨噬细胞缺乏辅佐功能, 而且还能使巨噬细胞具有抑制细胞的作用。

2.2.2 VE 对特异性细胞免疫的影响

VE 在一定范围内能促进免疫器官的发育和免疫细胞的分化, 但剂量过高反而有抑制作用。Moriguchi 等(1992)发现, 大剂量摄入 VE(100~2 500mg/kg)10d, 大鼠脾细胞数量显著增加, 脾细胞对丝裂原 ConA 的反应也显著增强, NK 细胞活性随着饲料中 VE 含量的增加而增强。许多研究表明, VE 能使外因引起的机体免疫机能下降得到改善, VE 的添加能显著提高由

于反转录病毒感染所降低的小鼠脾 T 细胞和 B 细胞的增殖, 逆转由高含量多聚不饱和脂肪酸和硒缺乏引起的免疫抑制。每千克体重肌肉注射 100mg 的 VE, 对创伤小鼠迟发型过敏反应受抑, 脾和胸腺指数降低、T 淋巴细胞转化下降以及 IL-2 生成减少, 均有明显的改善作用。同时, 对 T 抑制性细胞的抑制活性也有明显的降低作用(梁华平等, 1995)。

维生素 E 对淋巴细胞功能也存在很大的影响。VE 可影响血中多形核白细胞 (PMNs)、肺巨噬细胞 (AM)、腹腔巨噬细胞 (M ϕ) 功能, 进而影响吞噬细胞的吞噬、杀菌能力。Harris 等(1980)发现, VE 缺乏可降低大鼠中性白细胞或腹腔 M ϕ 对含补体 C₃ 颗粒的趋化和吞噬作用。进一步研究表明, 饲料中缺乏 VE 两个月后, 大鼠 PMNs 对细菌培养滤液发生的趋化作用消失, 对表面覆盖有 IgG、C₃ 及白蛋白的石蜡油小滴的吞噬作用也减弱; 非肠源性给予 VE 18h 后, 大鼠 PMNs 的趋化和吞噬作用恢复。

VE 对细胞免疫的影响同样有剂量效应。VE 缺乏时, 猪和狗外周血液淋巴细胞、大鼠脾淋巴细胞对 T 细胞丝裂原的反应受到严重抑制, 并降低大鼠胸腺细胞中 IL-2 的产生。但 VE 缺乏所导致的大鼠脾淋巴细胞增殖的抑制与 IL-2 含量的变化和 IL-2、铁转蛋白受体表达的变化并不一致, 这可能由于铁转蛋白内化的减少, 消耗了细胞内贮存的为细胞功能所必需的铁, 因而限制了淋巴细胞的增殖(Pighetti 等, 1998)。同样, 过量的 VE 抑制小鼠脾 T 细胞对植物血凝素的反应。

3 维生素 E 影响免疫反应的机制

VE 对动物和人的免疫功能的影响是多方面而且极其复杂的, 虽然 VE 的作用机制至今尚不明确, 但可以从以下几方面考虑。

3.1 影响细胞膜和细胞器膜的功能

VE 是所有细胞膜的必需组分, VE 通过清除自由基来抑制脂质过氧化反应。缺乏 VE 的膜脂质过氧化反应可引起膜流动性改变, 从而影响淋巴细胞膜上受体分布, 改变淋巴细胞对靶细胞或抗原的识别与结合。线粒体是细胞内的重要细胞器, VE 缺乏和脂质过氧化作用会减弱大鼠淋巴细胞线粒体膜去极化能力, 造成细胞器的大量丢失(Pieri 等, 1993)。

3.2 作用的靶细胞

VE 的作用可能涉及多种细胞, 首先, VE 通过叶绿基尾的 13 个碳原子固定于双层膜碳氢化合物部位, 作为细胞膜脂质的一部分, 发挥抗氧化剂的作用; 其次, VE 可能作为免疫系统普遍的刺激剂, 通过有选

择性地影响某些调节细胞簇,从而提高免疫反应。

VE 能通过提高辅助 T 细胞活性而有效刺激 B 淋巴细胞反应,Erf 等(1998)认为,VE 是 CD4⁺、CD8⁻ T 细胞的免疫调节剂。Sakai 等(1997)认为,VE 可能通过 3 种途径促进 ConA 诱导的淋巴细胞增殖作用:① VE 可以直接刺激对 ConA 反应特异的 T 细胞;② 由于 ConA 能激活淋巴细胞和 Mφ,因此,VE 可能通过提高 Mφ 功能来增强淋巴细胞增殖反应;③ VE 直接作用于 Mφ,并且降低 PGE₂ 产生。长期大剂量补充 VE 可刺激老龄鼠骨髓不成熟 T 细胞数量增多,并诱导不成熟 T 细胞分化和成熟,导致成熟 T 淋巴细胞数量的增加,因此,认为 VE 是调节 T 细胞成熟与分化的重要因子。

3.3 VE 调节前列腺素 E₂ 的合成

免疫细胞膜多不饱和脂肪酸——花生四烯酸在不同酶作用下转化为过氧化代谢产物前列腺素 E₂ (PGE₂)、白细胞三烯等。PGE₂ 作为负向免疫调节剂,在免疫反应中起重要调节作用。

T 细胞经历增殖、分化及激活而完成免疫反应。丝裂原诱导的 T 细胞增殖由丝裂原、IL-1、IL-2 三种信号启动:丝裂原刺激 T 细胞进入 G1 期,Mφ 产生的 IL-1 作用于 T 细胞产生 IL-2,IL-2 刺激细胞膜表达 IL-2 受体而使细胞进入 S 期,IL-2 信号作用的结果使 T 细胞完成细胞周期。已有多个实验表明,补充 VE 可通过限制环氧化酶而抑制淋巴细胞和 Mφ 产生 PGE₂,从而上调 Mφ 产生 IL-1、T 淋巴细胞产生 IL-2,促进淋巴细胞的增殖(Klin 等,1990),VE 的作用方式不只是简单的抗氧化剂作用。

4 维生素 E 与老年免疫

4.1 VE 与老年机体免疫功能

营养和免疫在衰老过程中起着重要的作用。不少学者致力于短期或长期补充 VE 改善老年人免疫功能的研究,该研究方向成为 VE 抗衰老的研究热点。Meydani 等(1995)报道,对老龄和成年小鼠饲以大剂量 VE(500mg)1 个月,可显著增强 T 淋巴细胞增殖反应和 DTH(迟发型过敏反应),增加 IL-2 产生。Sakai 等(1997)研究表明,对 PHA、ConA 诱导的增殖反应,常规饲料组老龄大鼠脾淋巴细胞增殖反应水平显著降低,而在 10 倍常规剂量补充 VE 12 个月后,老龄鼠 IL-2 产生增加,增殖反应也恢复至成年鼠水平。长期补充 VE 能够维持老年机体的免疫应激状态,同时能增强 T 细胞免疫反应。

4.2 VE 对老年机体免疫功能的作用

Sakai 等(1997)报道,摄食常规饲料的老龄大鼠的脾细胞增殖反应显著降低,并推测可能与淋巴细胞增殖反应或 Mφ 功能的减弱有关;实验还证实,老龄鼠 AM 仍保持着激活淋巴细胞产生巨噬细胞活化因子(MAF)的能力,但老龄鼠脾淋巴细胞产生 MAF 的量较成年鼠低。因此,即使老龄鼠能维持对 MAF 的反应,但不能产生足够量的 MAF 以激活 Mφ,从而导致细胞免疫功能显著降低。补充 VE 能够提高 AM 的吞噬活性。饲以高 VE 饲料老龄鼠的淋巴细胞增殖反应增强,表明 VE 具有提高 Mφ 功能的作用。此外,许多实验表明,补充 VE 能降低淋巴细胞或 Mφ 产生 PGE₂ 的水平,使老龄鼠 IL-2 的生成量达到成年鼠的水平。因此,适量补充 VE 可以防止老年机体血浆 VE 水平的降低,增强 Mφ 功能,降低 PGE₂ 形成,从而提高细胞免疫反应。

5 小结

VE 对机体免疫功能的影响在人和哺乳动物中研究得较多,但在我国起步较晚。VE 是一种天然的抗氧化剂和免疫调节剂,可提高人和多种动物对疫苗或其它抗原产生抗体的能力,促进细胞免疫和提高吞噬细胞功能,尤其在改善老年机体的免疫反应方面日益受到关注。VE 的作用机制复杂,可能是作为免疫刺激剂有选择地影响某些调节细胞簇,也可能是由于其抗氧化剂性质通过维持或改变免疫细胞膜流动性和调节 PGE₂ 的合成而调节免疫反应。随着机体衰老程度的增加,VE 缺乏可能是导致机体抵抗力下降的一个因素。理论上,补充 VE 可阻断过氧化反应,降低组织毒性,有助于恢复细胞介导的免疫反应,VE 的作用方式不只是简单的抗氧化剂作用,其作用机制有待进一步研究。

维生素营养免疫学从最初发现的营养不良导致病人胸腺萎缩,发展到今天的通过维生素的添加来增强和调节免疫功能,研究工作已从个体、组织和器官水平转向细胞内功能的变化。维生素营养免疫学是较年轻的研究领域,它的发展受到免疫学发展水平的限制,随着免疫学和细胞分子生物学研究的进一步深入,必将会使维生素营养免疫学研究取得更大的进展。

参考文献

- 1 王俊东,李敬玺.食品营养学(第 2 版)[M].北京:中国农业科技出版社,1996
- 2 Grimble R F. Effect of antioxidative vitam insonimmune function with clinical applications [J]. Int. JV. itam. in Nutr. Res., 1997(67):5
- 3 段得贤.家畜内科学[M].北京:中国农业出版社,1992

光合细菌在水产养殖业中的应用现状

赵小林

光合细菌(PSB)是 20 亿年前地球上最早出现的原核生物,它与其它光合生物一起构成了自然界生态系统中的原始生产者,并在自然界碳素循环和物质转化中起着重要的作用。它能以光作能源并以二氧化碳或小分子有机物作碳源,以硫化氢等作供氢体,是完全自养性或光能异养性生长,但不产氧的一类微生物,是细菌中最为复杂的菌群之一。光合细菌属于水圈微生物的一种,在自然界中分布极广,几乎遍布于土壤、泥炭、沼泽、淡水、海水、水生植物根系,甚至在 90℃的温泉、冰天雪地的南极海岸以及含 30%盐的水体中也能找到它的踪迹,只要有水和光存在,不论其环境为好气性或嫌气性均能生存繁殖,是一种生命力极强的菌体。在分类上,光合细菌属于原核生物界细菌门真细菌纲红螺菌目,可分为紫色细菌和绿色细菌。现已知的光合细菌包括 1 目、2 亚目、4 科、19 属共约 49 种^[1],其中应用于水产养殖中较多的是红色无硫菌科,一般以紫色非硫细菌和紫硫细菌较为普遍。近 20 年来,以小林正泰(1981)、小川静夫(1985)等人^[2-4]为代表的一批学者首先把它应用于高浓度有机废水处理,并

把它作为优质饲料和饵料,开展了水产、畜禽养殖等多方面实验,取得了显著成效。此后我国学者亦于近年对光合细菌在水产上的应用进行了多方面的研究。

1 水质净化剂

在鱼、虾类养殖池中,常因鱼、虾的排泄物及残饵的积累造成水体污染, $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度高,导致水质败坏,有害菌大量生长,从而导致水产动物缺氧、生病乃至死亡。遇到这种情况,一般需马上换水,但采用换水难以保持池塘水的适当肥度,还要消耗大量能源。在早春和冬季,换水不能保持最适水温,如在池塘中投入 PSB,因 PSB 是光能异养菌,能在厌氧光照和好氧黑暗两种不同条件下,以水中的有机物作为自身繁殖的营养源,并能迅速分解利用水中的氨态氮、亚硝酸、硫化氢等有害物质,能完全分解水产动物的残饵及粪便,同时可促进有益微生物的生长,起保护和净化养殖水体水质的作用,为水产动物提供非常有利的生活和生长环境。随着 PSB 投入量的增加,水体溶氧也明显提高,而且可以降低水体 GHI(苯并芘)。尤其在高密度饲养池中,在水质恶化或缺氧的情况下,应用 PSB,对避免浮头泛池具有极其重要的作用。试验证明,每天泼洒 PSB 3.3mg/l 时,鳞鲤鱼苗饲养水体中的氨态氮比对照组降低 60.2%,溶解氧提高 45.2%;泼洒浓度为 16mg/l 时,鲤鱼夏花鱼种试验池的氨态氮比对照池降

赵小林,四川农业大学林学园艺学院,625014,四川农业大学林学园艺学院 403#。

收稿日期:2006-01-16

- 4 Meydani SN. Nutr. Rev.. 1992, 50 (3) :85~87
- 5 Reffett JK. Amin. Sci.. 1988,66 (6):1 520~1 528
- 6 Tengerdy RP. Enhancement of humoral immune response by vitamin E[J]. Br. Vet., 1983(139):147~152
- 7 Moriguchi S. Vitamin E and immunity[J]. Nutr., 1990(120):1 096~1 102
- 8 Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB. VitaminE supplementation and in vivo immune response inhealthy elderly subjects. Clinical Investigation, 1997(277):1 380~1 386
- 9 Wang Y, Huang DS, Liang B, et al. Nutritionalstatus and immune responses in mice with murineAIDS are normalized by vitamin E supplementation[J]. Nutr., 1994(124):2 024~2 032
- 10 Harris RE. B lood. 1980,55(2):338~343
- 11 Pighetti GM, Eskew ML, Reddy CC, et al. Selenium and vitamin E deficiency impair transferrin receptor internalization but not IL-2, IL-2 receptor ,or transferrin Receptor expression.J. Leukoc. Biol., 1998(63):131~137
- 12 Pieri C. The impairment of mitochondrial membrane potential and mass in proliferating lymphocytes from vitamin E deficient animals is recovered by glutathione. Cell Mol. Bio., 1995, 41(6):755~762
- 13 Sakai S. J. Nutr. Sci. Vitam. inol.. 1997(43):113~122
- 14 Erf GF. Effects of dietary vitamin E on the immune system in broilers: altered proportions of CD4 T cells in the thymus and spleen. Poult. Sci., 1998,77(4):529~537
- 15 Kline K. Ann. N Y Acad. Sci.. 1990(587):294~296
- 16 Meydani SN, Barklund MP, Liu S, et al. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. Nutr. Rev., 1995,53(4):52~58
- 17 Kowdley KV. Gastroenterol., 1992(102):1~4
- 18 高宁,叶建锋. 维生素 E 的免疫调节作用.国外医学卫生学分册, 2000,27(1):46~48
- 19 周显青,孙儒泳,等. 部分营养素与免疫. 生命科学进展,2000,31 (2):163~166
- 20 谢浩,曾凡坤. 维生素 E 和维生素 C 在营养免疫中的作用. 中国饲料,2002(12):3~5
- 21 刘乾,李云. 维生素 E 对畜禽免疫功能的影响. 畜禽营养与免疫,2002(1):22~26
- 22 陈壁锋,黄俊明. 天然维生素 E 的抗氧化作用及其对免疫功能的影响. 华南预防医学,2002,28(5):46~48

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

低 35.7%,溶解氧提高 14.8%^[6]。于伟君等(1991)以每平方米水面用 15ml 的 PSB,拌入泥沙后撒于虾池中,30d 后,氨态氮比对照组降低 0.08~0.4mg/l,溶解氧增加 1.2~1.64mg/l,并可减少换水量多达 30%^[6]。马述法等(1989)在对虾养殖池中,按每平方米用 0.75gPSB 与沙均匀搅拌后投撒,结果是试验池的氨态氮比对照池平均下降 0.08mg/l,溶解氧增加 1.64mg/l^[7]。每天向无沙养鳖池中泼洒 2mg/l 的 PSB,可使氨态氮比对照降低 21.33mg/l,化学耗氧量降低 12.21mg/l,溶解氧增加 1.02mg/l^[8]。何筱洁等(1997)每 10d 向花鲈池中泼洒一次 PSB,浓度为 10、20 和 30mg/l,结果池中的亚硝酸盐含量比对照池降低 0.080~0.086mg/l,氨态氮降低 0.100~0.125mg/l。王育锋等(1990)在夏花鱼种培育池中施用 PSB(4mg/l)后,也收到了溶解氧比对照池高 0.4~10mg/l(提高 12.82%~28.60%),氨态氮下降 0.56mg/l(下降 53.83%)的好成绩^[9]。光合细菌在海、淡水中均能生长繁殖,如果向池中施加少量光合细菌,其固氮作用和利用低分子有机物及 H₂S 的功能,能将从池底不断产生的氨氮和有机物的初始分解物转化除去,从而不必换水就可保持良好水质。战培荣^[10]等在研究中还发现,在水中游离的光合细菌细胞不如经固化的光合细菌细胞发挥作用更持久,后者改善水质和促进鱼类生长的效果更明显。

2 能量转化剂

以投饵施肥为重要增产技术的精养池塘,随着养殖时间的延长,常因有机质投入过多,超过了池塘生态系统的消耗与转化能力,造成循环不畅。池内有机质的大量沉积,产生较严重的“能量陷阱”效应,致使一般池塘的能量转化效率偏低。王育锋等^[11,12]对 10 个普通鱼池的试验结果显示,能量转换效率在 3.34%~8.83%。LiSifa^[13]指出,上海南汇县淡水养殖场的池塘能量转化效率仅为 5.5%。施用了光合细菌的池塘,由于光合细菌发挥了其处理低分子有机物、转化 H₂S 等有害物质的作用,促使池塘中投入的氮、磷陷入“能量陷阱”的效应减低,加之这种转化是在黑暗、弱光和厌氧条件下进行的,从而起到相对增氧和降低 H₂S 含量的效能,使 DO、pH 值、H₂S 等诸项理化因子更适应鱼、虾、贝类生长需要,因而提高了单产和池塘的能量转换效率。王育锋^[11,12]在实验中发现,添加了光合细菌的池塘比普通池塘的能量转换效率最少的提高了 23.9%,高的甚至提高了 170.50%。换句话说,就是投入相同的外源营养,在施用了光合细菌的池塘能比普通池塘生产出更多的水产品。

3 营养添加剂

PSB 本身是活蛋白,营养丰富,其成分含量为:粗蛋白含量为 65.45%、粗脂肪 7.18%、可溶性糖类 20.31%、粗纤维 2.78%、灰分 4.28%,同时富含 B 族维生素、生物素、活性促生长因子、辅酶 Q 等^[14],易于消化,对水产动物的生长发育有促进作用。其粗蛋白质含量要远高于玉米、大豆、蚕豆、蚕蛹、豆饼、豆渣、花生饼、菜籽饼等,甚至高于国产鱼粉的粗蛋白含量,而且其它营养成分含量也较高。在饲料中少量添加 PSB,可以提高饲料效率、增加脂肪含量、提高鱼类繁殖率和抗病力、改善水产品色泽。日本静岗和高知的养鳗场,将光合细菌投入鳗池,使成鳗的体色变得接近于天然鳗,而且起捕率和增重效率较高。我国的水产工作者在研究光合细菌时,大多数也是将其作为饵料添加剂使用,在对虾、扇贝、鱼类养殖中起到了明显的促长和增重作用。在斑节对虾育苗中应用 PSB 可促进变态,缩短变态时间;对罗氏沼虾的养成可提高产量 21.5%^[15]。作为添加剂,在饲料中添加 5%的 PSB 后进行投喂,月鳢鱼种的平均增重比对照组提高 9.31%,饲料系数下降 9.96%,饲养成本下降 8.55%^[16]。以 1%~3%的添加量投喂 PSB 给其它水产动物时,也同样能收到良好的促长和增重等效果,可使大面积家鱼养殖成鱼产量提高 11.78%~20.83%,饲料系数降低 0.28~0.51(下降 10.57%~16.83%),产值提高 20.83%^[17];家鱼鱼种的饲料系数可下降 18.71%~23.34%^[18];美国青蛙群体增重提高 44.1%,成活率提高 24%^[19];生产 1kg 的其它淡水鱼类的成本平均降低 6.96%;鳗鱼的生长倍数增加 13.3%;并能使脊尾白虾幼体的变态率从 77%提高到 91.4%~94.1%,成活率从 44.4%提高到 53.9%~63.7%^[20]。在养殖水体中泼洒 1~2mg/l PSB,可使对虾产量增加 11.65%~21.35%^[11];泼洒 5mg/l PSB 使月鳢鱼苗培育成活率从 16%提高到 39.93%^[21]。泼洒 2~10mg/l,并通过饲料投喂 0.3%PSB 时,幼鳖的成活率为 99.73%,比对照组高 26.37%,个体平均净增重增加 11.8g,增幅为 59.3%,饲料系数低 1.55(降低 55.16%)^[10]。总之,施用 PSB 能使养殖水体的能量转换率提高 23.9%~170.5%^[22]。此外,PSB 还可用于培育轮虫等多种饵料生物,通过食物链关系,将 PSB 中所含的营养物质间接供给水产养殖动物,特别是作为鱼类的开口饲料资源,意义更为重大^[10]。

4 幼苗促活剂

鱼苗培育成败的关键在于充足的开口饵料。清水千秋认为,在育苗池中施放光合细菌可被浮游动物捕食,而浮游动物又作为各种鱼类的开口饵料,被鱼苗摄食,从而能大幅度提高鱼苗的成活率^[22,23]。王绪峨等^[24,25]分别在对虾、扇贝育苗中,利用光合细菌和单胞

藻混合投喂,明显地提高了幼体成活率,用光合细菌和单胞藻混合投喂扇贝亲贝,则能提高亲贝性腺指数,促进性腺发育。在使用光合细菌育苗时,许多专家指出,把光合细菌作为鱼苗的开口饵料并不理想,因为光合细菌中亚油酸和亚麻酸含量较低,而鱼、虾、贝幼体阶段需要大量的必需脂肪酸,所以最好还是把光合细菌作为饵料添加剂在育苗中使用。

5 防病保健剂

PSB 含有抗病毒因子及多种免疫促进因子,可活化机体的免疫系统,强化机体的应激反应,能提高水产动物体内血清免疫球蛋白的含量和免疫力,其辅酶 Q 的含量高达 1 744~3 399mg/g。PSB 在代谢过程中产生和释放的辅酶是具有消炎作用的抗病因子,对水体中的致病菌,如嗜水气单胞菌、爱德华氏菌、霉菌等均具一定抑制作用,可防治烂鳃病、肠道疾病、水霉病、赤鳍病等多种疾病。李勤生(1995)用 PSB(稀释)浸泡患有烂鳃病的鲤鱼、水霉病的金鱼和擦伤病的黑鲷 10~15min,这些鱼都 100%存活^[10]。日本学者北村博等(1984)发现,在恶臭污水中的 PSB 体内含有抗病毒物质,能纯化和消除水中某些动物和人类的致病病毒^[26]。小林正泰(1981)用病鱼体上分离到的病菌感染鲤鱼,试验组和对照组各 20 尾,结果是对照组鱼 3d 内全部死亡,而投喂 PSB 的试验组鱼 15d 后仍全部成活^[9]。王建文(1999)在斑节对虾养殖中施用 PSB 后,水面无“水皮”现象,在阴雨天气时,水中的 pH 值稳定,虾很安定;另外,在海区“水星”(夜光虫)流行季节,预先施用 PSB 的虾池中无“水星”现象,而不施用 PSB 的虾池中有大量的“水星”,造成危害,坚持使用 PSB 时防病效果极佳。在鱼池中少量使用光合细菌,能促进鱼类摄食,并能通过鱼鳃进入体内,补充鱼类营养,使鱼更健壮,对疾病抵抗力更强;同时,光合细菌又能改善水质,消除鱼类患病的条件,从内外两方面预防鱼病,这已经为许多研究所证明。小林正泰^[9]利用光合细菌对鲤鱼穿孔病、金鱼绵头病、鳊鱼水霉病和赤鳍病及南方黑鲷擦伤病等进行治疗,将病鱼放在光合细菌培养液稀释 10 倍的菌液中浸洗 10~15min,再放于投施适量光合细菌的池中饲养,15d 后病鱼康复。

综上所述,PSB 在水产养殖上应用价值越来越受到人们的重视,无论是泼洒还是作为饲料添加剂进行投喂,都能取得令人满意的效果,且无毒、无污染,应用前景十分广阔,PSB 将使饲料工业步入以生物技术为主导的时代。充分利用人类不能直接利用的廉价饲料资源,大力发展生物饲料,是保护自然生态环境和饲料工业发展的方向,PSB 的广泛应用,将会给我国水产养

殖业带来新的贡献。

参考文献

- 1 BUCHANANRE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Baltimore, MD: The Williams and Wilkins Company, 1974.4~64
- 2 小林正泰.光合成菌による高濃度有機废水处理(PSB 処理法).发酵工业,1978(9):735~766
- 3 小林正泰.养鱼と光合成細菌.养殖,1981,18(8):56~59
- 4 小川静夫.光合細菌在养鱼中的利用.养殖,1985(5):66~68
- 5 南春华,伊玉华.光合細菌在鱼苗鱼种饲养上的应用.大连水产学院学报,1992,6(2):65~69
- 6 于伟君,姚福相,侯玉成,等.光合細菌在对虾养殖中应用的初步试验.水产科学,1991,10(1):16~18
- 7 马述法.光合細菌在养虾生产中应用试验报告.中国水产,1989(7):32~33
- 8 叶奕佐,叶嵘,王革萍,等.光合細菌(PSB)和翻富(FAMP)在温室无沙养鳖中的应用研究.水产科技情报,1996,23(2):51~55
- 9 王育锋,彭秀真,周嗣泉,等.用光合細菌菌液池塘培育淡水鱼种的试验.水产学报,1990,14(4):347~350
- 10 战培荣.光合細菌固定化及其净化养鱼水质的研究[J].水产学报,1997,21(1):97~100
- 11 王育锋.用光合細菌菌液池塘培育淡水鱼种的试验[J].水产学报,1990,14(4):347~350
- 12 王育锋.光合細菌提高淡水养殖池塘生态能量转换效率[J].水产学报,1993,17(3):253~256
- 13 Li, Sifa. Energy structure and efficiency of atypical Chinese integrated fish farm[M]. Aquaculture, 1987(65):105~118
- 14 李长慧.光合細菌的营养价值及在养殖业中的应用.青海大学学报,2001,19(2):34~53
- 15 李勤生.光合細菌的基本特性及其在水产业中的应用研究概况.水利渔业,1995(1):3~5
- 16 黄钧,韦勇刚,周毅,等.在饲料中添加光合細菌饲养月鳢鱼种的初步试验.广西畜牧兽医,2000(1):14~16
- 17 叶惠恩,郑华.光合細菌在池塘成鱼饲养上的应用研究.水产科技情报,1993,20(6):256~258
- 18 俞吉安,林克新,言世贤,等.应用光合細菌饵料添加剂养鱼的研究报告.淡水渔业,1991(3):8~11
- 19 李绍奇,吴伟.光合細菌对美国青蛙幼蛙促长、防病等作用的初探.水产科技情报,1994,21(3):109~111
- 20 张道南.红螺菌科光合細菌的分离、培养及其作为鱼虾饵料添加剂的初步研究.水产学报,1988,12(4):367~369
- 21 黄钧,程光平,韦燕萍.PSB 和 WD 用于培育月鳢鱼苗试验简报.广西农业科学,1998(6):319~320
- 22 Clayton R K, Sistron W R. The photosynthetic Bacteria [M]. New York & London: Plenum Press, 1978.33~44
- 23 刘中,于伟群,刘义,等.光合細菌在淡水养殖中的应用研究[J].水产科学,1995,14(1):13~17
- 24 王绪斌.光合細菌在扇贝人工育苗中的应用[J].水产学报,1994,18(1):65~68
- 25 王绪斌.光合細菌在对虾育苗中的应用研究[J].齐鲁渔业,1993,(6):20~23
- 26 北村博,森田茂厂,山下平仁.光合成細菌.东京:山田猛学会出版,1984

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)