

中国期刊方阵双效期刊

北方优秀期刊

辽宁省一级期刊

《中国学术期刊(综合评价数据库)来源期刊》
《中国期刊网》、《中文学术期刊(光盘版)》
全文收录期刊

2007年第28卷第8期
(总第293期)
(1980年创刊)

主办单位:

辽宁省农业机械研究所

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

编辑室(024)86391926(传真)

编辑室(024)86391925(传真)

网络发行部(024)86391237

投稿信箱:tg@feedindustry.com.cn

网站:www.feedindustry.com.cn

总编辑:慕春野

副总编辑:沈桂宇

责任编辑:王芳

广告总代理:沈阳同兴广告有限责任公司

总经理:林勇

副总经理:刘立

业务内勤:刘立

地址:(110036)沈阳市长江街126号甲

B幢4单元16楼

电话:(024)86276137 86276627

传真:(024)86276127

邮箱:ggbb@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

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:ISSN1001-991X

邮发代号:8-163

发行范围:国内外发行

广告许可证:辽广字01-82号

开户行:中信银行沈阳分行皇姑支行

帐号:72214101826000548-49

每份定价:6.00元

如需转载本刊文章及图片,请注明
摘自《饲料工业》杂志,并寄样刊。

饲料

SILIAO GONGYE

(半月刊)

工业

企业标识展示



正育人才工程
(0519)7309867



通成集团
(028)85188888



江苏教育
(0514)7848811



江苏北方
(0412)3430018
(024)88080922



东阳光自动化
山东烟台
(0315)3719406



FDSO
江苏良友
(0519)8300988



Diabetes-clubby
杨凌迪高维尔
(029)87035008



RZ
杨凌机械
(0519)7906658



KINGS
杭州康德威
(0571)86433111



KINGS
杭州康德威
(0571)86433111



Leader
广州立达尔
(020)87636309



Leader
上海蓝普
(021)64191716



Applied Nature
龙昌机械
(029)7112228



Applied Nature
上海蓝普
(021)64191716



BFI
广州海大
(020)84661699



BFI
广东中山北克
(0760)3113061

目次

专家论坛

■1 鱼粉的质量控制及其在淡水鱼饲料中的应用

叶元士

饲料添加剂

■7 合成氨基酸在水产饲料中的应用

叶元士

■10 谷氨酰胺二肽在断奶仔猪饲料中的应用

朱亚平 郑银桦 薛敏等

酶制剂

■13 非淀粉多糖酶制剂的研究进展

汪勇

■17 葡萄糖氧化酶产生菌的快速筛选及其产酶条件的研究

郭晓贤 刘峰

水产养殖

■21 谷胱甘肽对凡纳滨对虾生长、存活和饲料系数的影响

郭晓贤 刘峰

■24 中草药对虹鱼非特异性免疫功能的影响

顾雪飞 陈玉春 刘敬

试验研究

■27 利用原生质体诱变筛选产酸高产菌株

李秀珍 薄泉 杨平平等

■30 饲用高产产乳酸菌的复合诱变

王德培 揣玉多 王艳萍等

饲养试验

■34 中药-甜菜碱复方对高温环境中三黄鸡血清SOD、MDA及NO变化的影响

李进 冯业 刘映娟等

■37 半胱胺对三黄肉鸡生产性能及肉质影响

邵秀林 罗献梅 龙翔

营养研究

■39 牛膝多糖的生物学功能研究进展

刘祝英 贺建华

■42 反刍动物的理想氨基酸与小肠氨基酸供给模式的研究

王梦芝 曹恒春 李国祥等

兽医兽药

■46 石河子几个鸡场大肠杆菌门疫苗的研制及应用效果观察

罗盘根 王新华 薄新文等

■48 硫酸丁胺卡那霉素溶液对鸡大肠杆菌病的临床疗效试验

赵英虎 高莉 赵恒寿

动物免疫

■50 中草药对动物的免疫增强作用

史良

■52 维生素B₆和苏氨酸对动物免疫功能的影响

郭旭东 刁其玉 张明雄

专题论述

■55 类胡萝卜素在水产饲料中的应用

周凡 邵庆均

■57 维生素E和苏氨酸对动物免疫功能的影响

马文强 冯杰 何军豪

问题探讨

■60 影响动物微生物制剂应用效果的因素及解决方法

马志勇 倪学勤 曾东

基因工程

■62 牛抵抗素基因的cDNA克隆

黄建龙 王哲 张才等

信息采编

■33 宁夏活羊及羊肉有望走进非洲市场

鱼粉的质量控制及其在淡水鱼饲料中的应用

叶元土

1 鱼粉质量

1.1 鱼粉质量标准

鱼粉的质量标准是鱼粉质量控制的判别标准,我

国已经对鱼粉的质量标准作了修改,表1列出了新版鱼粉质量标准的主要技术参数。

1.2 鱼粉质量的主要内容

表1 鱼粉质量标准(鱼粉 GB.T 19164—2003)

项目	指标			
	特级品	一级品	二级品	三级品
蛋白质(%)	≥65	≥60	≥55	≥50
粗脂肪(%)	≤11(红鱼粉)	≤12(红鱼粉)	≤13	≤14
	≤9(白鱼粉)	≤10(白鱼粉)		
水分(%)	≤10	≤10	≤10	≤10
盐分(以 NaCl 计)(%)	≤3	≤3	≤3	≤4
灰分(%)	≤16(红鱼粉)	≤18(红鱼粉)	≤20	≤23
	≤18(白鱼粉)	≤20(白鱼粉)		
砂分(%)	≤1.5	≤2	≤3	≤3
赖氨酸(%)	≥4.6(红鱼粉)	≥4.4(红鱼粉)	≥4.2	≥3.8
	≥3.6(白鱼粉)	≥3.4(白鱼粉)		
蛋氨酸(%)	≥1.7(红鱼粉)	≥1.5(红鱼粉)	≥1.3	≥1.3
	≥1.5(白鱼粉)	≥1.3(白鱼粉)		
胃蛋白酶消化率(%)	≥90(红鱼粉)	≥88(红鱼粉)	≥85	≥85
	≥88(白鱼粉)	≥86(白鱼粉)		
挥发性盐基氮(VBN)(mg/100g)	≤110	≤130	≤150	≤150
油脂酸价(mg/g)	≤3	≤5	≤7	≤7
尿素(%)	≤0.3	≤0.7	≤0.7	≤0.7
组胺(mg/g)	≤300(红鱼粉)	≤500(红鱼粉)	≤1 000(红鱼粉)	≤1 500(红鱼粉)
	≤40(白鱼粉)			
铬(以 6 价铬计)(mg/g)	≤8			
粉碎粒度(%)	≥96(通过筛孔为 2.8 mm 的标准筛)			
杂质(%)	不含鱼粉原料的含氮物质(植物油饼粕、皮革粉、羽毛粉、尿素、血粉、肉骨粉等)以及加工鱼露的废渣			

鱼粉作为一种重要的蛋白质原料,其质量内容主要包括以下几个方面:①营养质量。指作为蛋白质原料的营养学价值,包括粗蛋白质含量、氨基酸组成、粗脂肪含量、消化率等内容。②安全质量。指鱼粉作为饲料原料的安全性问题,包含对养殖鱼体的安全、养殖鱼体作为食品对人体的安全(是否药物残留、有毒物质残留等),具体可操作的检测指标包括鱼粉的新鲜度、药物残留和卫生指标等。③掺假物质对鱼粉质量的影响。

1.2.1 鱼粉营养质量的评价

评价一种蛋白质原料的营养质量最综合的指标是养殖效果,即对养殖鱼类生长速度、饲料利用效率

及鱼体生理机能影响的定量评价指标,鱼粉作为一种优质蛋白质原料在这方面的效果已得到公认。但是,对于一种具体需要采购、使用的鱼粉产品,如果要进行这方面的定量评价是一件较为费时的工作,一般需要进行养殖试验才能得到结果。因此,在采购原料判别质量时通常要选用快速的检测方法和有效的评价指标。

粗蛋白质含量是评价产品营养价值的重要指标之一,利用粗蛋白质指标对鱼粉营养进行评价必须结合其它指标同时进行。最理想的评价指标是粗蛋白质的消化率,而测定消化率要通过养殖试验才能进行。目前采用离体消化率指标则可以快速进行这方面的评价。

消化率是鱼粉中可被消化吸收的粗蛋白质含量的真实反映,是评价鱼粉质量的重要指标。目前,鱼粉工业发达的国家和地区,在鱼粉质量控制方面都有对

叶元土,苏州大学生命科学学院,教授,215123,江苏苏州。

收稿日期:2007-03-13

鱼粉胃蛋白酶消化率的规定。秘鲁鱼粉标准中规定,优质鱼粉的胃蛋白酶消化率应为 94.0%~95.0%;智利相关的鱼粉质量标准中规定为 94.0%。我国新版鱼粉标准中规定鱼粉胃蛋白酶消化率为:特级品红鱼粉 $\geq 90\%$ 、白鱼粉 $\geq 88\%$;一级品红鱼粉 $\geq 88\%$ 、白鱼粉 $\geq 86\%$;二级品、三级品红鱼粉和白鱼粉 $\geq 85\%$ 。

离体消化率测定包括胃蛋白酶消化率、胃蛋白酶-胰蛋白酶消化率、多酶片消化率和鱼体肠道消化率几种测定方法,具体选用哪种测定方法可以结合实际情况选用。我们主张使用鱼体肠道消化率方法,即使用鱼体肠道匀浆后得到的消化酶粗酶液作为酶源,按照离体消化率测定方法对鱼粉进行蛋白质消化率测定。在实际操作时,可以将待测定鱼粉与已知的标准鱼粉进行同时测定,在判别时只要将待测定样品的结果与标准鱼粉测定结果进行对比即可,只要两者的测定结果差异在可以接受的范围内就可以视为合格鱼粉。这种相对比较的方法有很多好处,既可以对待测定鱼粉的蛋白质消化率进行判别,又可以针对不同鱼类对鱼粉的消化率是否有差异进行判别;同时,还可以避免离体消化率测定因技术水平、操作方法等因素对消化率测定结果的影响,如鱼粉标准的胃蛋白酶消化率要大于 80%,而由于试验条件限制,或试验人员操作技术的影响,其结果难以达到 80%的离体消化率,对结果的判定就难以进行,而与标准鱼粉结果同时进行测定时,只需要将待测定鱼粉的结果与标准鱼粉的结果进行比较就可以了。

对于鱼粉营养质量、蛋白质质量鉴定最有效的方法是测定氨基酸组成,因此对氨基酸测定结果进行分析、判定非常重要。我们建议从以下几个方面进行氨基酸测定结果的判定和分析。

① 氨基酸总量。理论上氨基酸总量应该大于蛋白质总量,因为氨基酸在水解过程中加入了水分子。而实际上通常是氨基酸总量小于蛋白质含量,主要是色氨酸、部分苯丙氨酸等在酸水解时被破坏,如果掺入的是化学含氮物质,则氨基酸总量会更低。

② 必需氨基酸平衡模式。必需氨基酸模式是指单一必需氨基酸占 10 种必需氨基酸(或氨基酸分析实际得到的 9 种必需氨基酸)总量的百分比;“平衡”是指鱼粉的必需氨基酸模式与鱼体需要模式的接近程度。在做鱼粉必需氨基酸平衡模式判定时,可以将待测定鱼粉的必需氨基酸模式与标准鱼粉样品的必需氨基酸模式对比进行判定。对这两种模式的接近程度进行计算的最好方法是计算两种模式的相关系数,相关系数越高,平衡度就越好;如果相关系数很低,表明待测定鱼粉氨基酸组成有问题。掺假鱼粉要使 10

种或 9 种氨基酸的平衡模式与正常鱼粉一致是非常困难的。因此,这既是鉴定鱼粉氨基酸质量的有效方法,也是鉴别鱼粉是否掺假的有效方法。而两种模式的相关系数可以使用 Excel 表中数据处理功能进行计算。操作方法是:在 Excel 表中输入两种模式的数据(即两组数据)→鼠标移至一空格并点击上方的“=”号→点击最左边的“▼”弹出下拉菜单→选择“其它函数”弹出“粘贴函数”菜单并选择“统计”→在右边框里选择“CORREL”(下方显示为“返回两组数值的相关系数”)→点击“确定”弹出“Array1”和“Array2”数值框→分别在“Array1”和“Array2”中选择需要计算的两组数据并“确定”→得到两组数据的相关系数。

③ 特征氨基酸判定。目前在鱼粉中为了提高粗蛋白质含量,一般加入处理过的羽毛粉的情况较多,此时,丝氨酸、胱氨酸、脯氨酸的含量较正常鱼粉高。

1.2.2 鱼粉的新鲜度

鱼粉的新鲜度是影响鱼粉养殖效果和安全性的重要指标,如何鉴定鱼粉的新鲜度也是一件复杂的工作。鱼粉新鲜度不好主要是指原料鱼或鱼粉在储存、运输等过程中,由于微生物污染、脂肪酸变质、鱼粉自燃等因素,导致蛋白质分解、腐败、脂肪酸酸败、蛋白质“焦化”等变质反应。因此,鱼粉新鲜度鉴定的重点是对蛋白质、脂肪酸等变质的鉴定。有定性和定量 2 种鉴定方法。

定性鉴定最有效的方法是感官鉴定,通过看、闻、品尝等方法进行定性判别。感官鉴定的主要内容包括:① 鱼粉的颜色和基本形态。不同鱼粉样品具有不同的色泽和外观形态,正常鱼粉的色泽较为均一,不会出现较多的黑色、褐色杂点,鱼肉、鱼骨、鱼鳞等基本可以分辨;掺有处理过羽毛粉的鱼粉外观呈现出肉松状,掺得越多、肉松状外观越明显。② 是否有异味。正常鱼粉、新鲜鱼粉有一股浓烈的咸腥味,加入肉粉的鱼粉有肉粉、猪油的味道;变质鱼粉有腥臭味、氨味;油脂氧化后鱼粉有酸败味、哈喇味;焦化鱼粉有焦臭味。

定量鉴定方法中,采用挥发性盐基氮(VBN)和组胺作为评价鱼粉蛋白质新鲜度的主要指标,表 1 中列出鱼粉标准规定值。新鲜的原料制成的鱼粉,其挥发性盐基氮(VBN)和组胺值都低,蛋白质含量高且质量好;而新鲜度差的原料制成的鱼粉,其挥发性盐基氮和组胺值高,蛋白质含量低且质量差。对挥发性盐基氮(VBN)和组胺测定结果的评价可以结合鱼粉标准进行判定。

酸价也是评价鱼粉脂肪新鲜度的重要指标之一。鱼粉的新鲜程度与其所含粗脂肪的氧化程度有关,鱼粉的水分、粗脂肪含量高及保藏条件差等因素都将加

快油脂的氧化酸败,导致产生不良气味,酸价升高,影响鱼粉的质量。酸价测定结果可以结合鱼粉标准进行判定。

2 劣质鱼粉对饲料质量和鱼类养殖的主要影响

首先,在饲料配方中鱼粉的使用量是依据鱼粉的生物学功能而确定的,使用劣质鱼粉、掺假鱼粉后就难以达到饲料配方设计的营养价值和养殖效果,可能导致严重经济损失。

其次,劣质、掺假鱼粉可能引发一系列饲料质量问题和养殖事故,导致严重的经济损失。就淡水鱼类而言,使用劣质、掺假鱼粉引发的饲料质量事故和养殖事故,主要有以下几种情况:①配合饲料难以达到配方设计的要求,甚至出现了添加鱼粉饲料的养殖效果还不及未添加鱼粉饲料的养殖效果好。如在鱼粉中掺入较多处理过的羽毛粉后,在鱼体肠道里就会形成一层较厚的胶质层,解剖肠道还可以发现与肠道形态一致的胶状物,这些胶质层和胶状物是由不能消化、吸收的角蛋白形成的,胶质层可以严重影响鱼体对饲料营养物质的消化和吸收,使饲料的养殖效果、饲料利用效率显著下降。②出现不明原因的“疑难杂症”。如果鱼粉变质严重和掺入含“蛋白精”的非蛋白氮鱼粉,由于氨氮等对鱼体消化道、内脏器官等造成伤害,出现鱼肠道发红、皮肤发红、鱼体免疫力下降等症状,严重的会出现鱼体死亡,而这种情况从饲料配方、养殖环境、病害分析中难以找到真正的原因。③养殖鱼体体色出现严重异常。如鱼体表颜色发白、发红、发黑,或出现花斑症状,这类情况在斑点叉尾鲷、云斑鲷、黄桑鱼、黄鳝、塘鲷、长吻鮠、武昌鱼等种类中发生较为频繁。④鱼体药残超标。对于出口水产品的药物残留控制非常严格,经常会出现鱼体药物残留超标而无法出口的严重情况。从养殖环境、鱼病药物使用、饲料配方中均难以找到原因时,就可能来源于饲料原料,目前这种情况在罗非鱼、斑点叉尾鲷上出现的频率较高。

3 关于“配方鱼粉”

鱼粉的主要原料是捕捞的海水鱼类和鱼片加工的副产物,对于利用捕捞鱼类加工的鱼粉,其质量受鱼种类、大小的影响,不同批次的鱼粉产品蛋白质含量等指标有显著的差异,这是正常的。饲料企业在使用鱼粉或鱼粉企业在销售鱼粉时,要想做到鱼粉的蛋白质含量等指标基本固定不变,就要对鱼粉进行“配方”处理,使鱼粉产品的蛋白质含量达到设定的值,这就是鱼粉的“配方技术”,而鱼粉不安全质量问题就发生在配方使用的原料上。为了提高蛋白质含量,鱼粉中常加入处理过的羽毛粉、血粉、皮革粉,甚至加入含有非蛋白

氮的“蛋白精”(如羟甲基羧氮、磷酸脲等)。加入一个百分点的这类物质就可以提高鱼粉3个百分点左右的粗蛋白质含量。这些非蛋白氮对于反刍动物可能还有一点利用价值,而对于淡水鱼类则可能导致鱼体氨中毒。在“配方鱼粉”中使用较多的是处理过的羽毛粉、皮革粉等高蛋白质,处理方式有水解、部分水解、膨化加工,经过这些处理后,其原有的形态发生显著变化,在显微镜下一般难以辨认。这类物质的蛋白质含量可以达到80%以上,如果对于真实蛋白质含量只有55%左右的鱼粉,只要按照“80:20”(80%的粗蛋白为55%的鱼粉+20%的处理羽毛粉)的配方就可以使鱼粉粗蛋白含量达到60%以上。在鱼粉中使用“配方技术”的还有鱼片加工副产物制成的鱼粉,这类物质主要是鱼排、内脏等原料,其直接蛋白质含量只有40%左右,而经过配方技术处理后其粗蛋白质含量可以达到60%以上。对于上述配方鱼粉只要测定氨基酸组成和离体消化率,并按照必需氨基酸平衡模式、真实鱼粉离体消化率进行判别就可以进行有效鉴定。

4 鱼粉掺假技术的变化及其鉴定方法

4.1 鱼粉掺假技术的变化

随着饲料生产企业对鱼粉掺假认识的不断提高,制假者也在设法提高掺假技术,使掺假物质更具隐蔽性。主要表现在以下几方面:①掺假鱼粉外观越来越好,色泽、气味更接近于真实鱼粉,使感官判断鱼粉质量难度增加;②掺假鱼粉的粗蛋白和纯蛋白含量越来越理想化,通过单测粗蛋白、真蛋白,或单计算氨基酸总量的方法难以鉴定,必须用消化率、氨基酸平衡模式等进行有效鉴定;③通过对掺假物着色、剥离表层、水解、发酵、膨化及超细化粉碎等工艺处理,尽可能地改变其原有特征,提高检出难度;④利用技术手段不断研制出如“蛋白精”等新型非蛋白氮物质掺入鱼粉中以提高鱼粉蛋白质含量,这在低价、高蛋白鱼粉中是常用的掺假方法。

在大多数掺假物中,处理过的羽毛粉、皮革粉等在国产和进口掺假鱼粉中出现概率最高。这是因为羽毛粉、皮革粉等蛋白质含量非常高,能够提高掺杂鱼粉的蛋白质含量,而且对其采用不同的处理(粉碎、水解、半水解等),其形态变异非常大,掺入鱼粉中不易被检出。

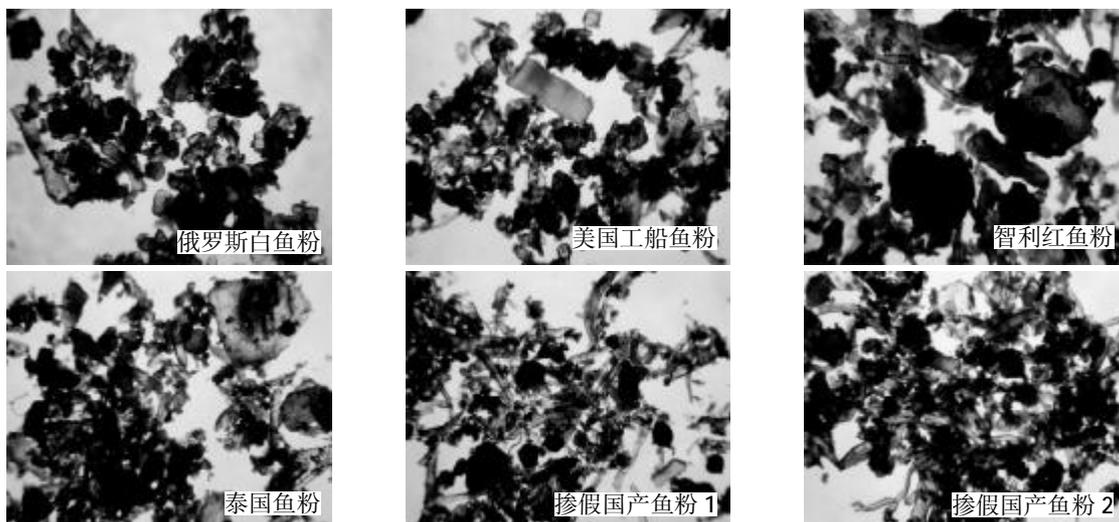
4.2 鱼粉鉴定技术指标

根据上述分析,对鱼粉的鉴定指标提出如下建议:①必测指标为水分、粗蛋白、水溶总氮和挥发性盐基氮(VBN)、总灰分、酸价、离体消化率,并用显微镜分析。这些指标的测定基本可以对鱼粉的品质、新鲜

度和是否掺假作出有效的判别,关键是饲料企业要很好地执行,品管部门要把测定工作作为日常工作内容,并建立技术档案,积累数据和经验。②选测指标为氨基酸分析。氨基酸分析是最有效的方法,但是,由于

仪器设备购置和维护费用高,使用成本也较高,可以作为选择测定指标,在必测指标难以满足要求的时候,存在质量争议,需要法定机构仲裁时再进行测定。

4.3 鱼粉的显微镜分析(见图 1、图 2)



注:粗蛋白含量均在 60%以上。

图 1 进口鱼粉与掺假的国产鱼粉显微镜图片比较

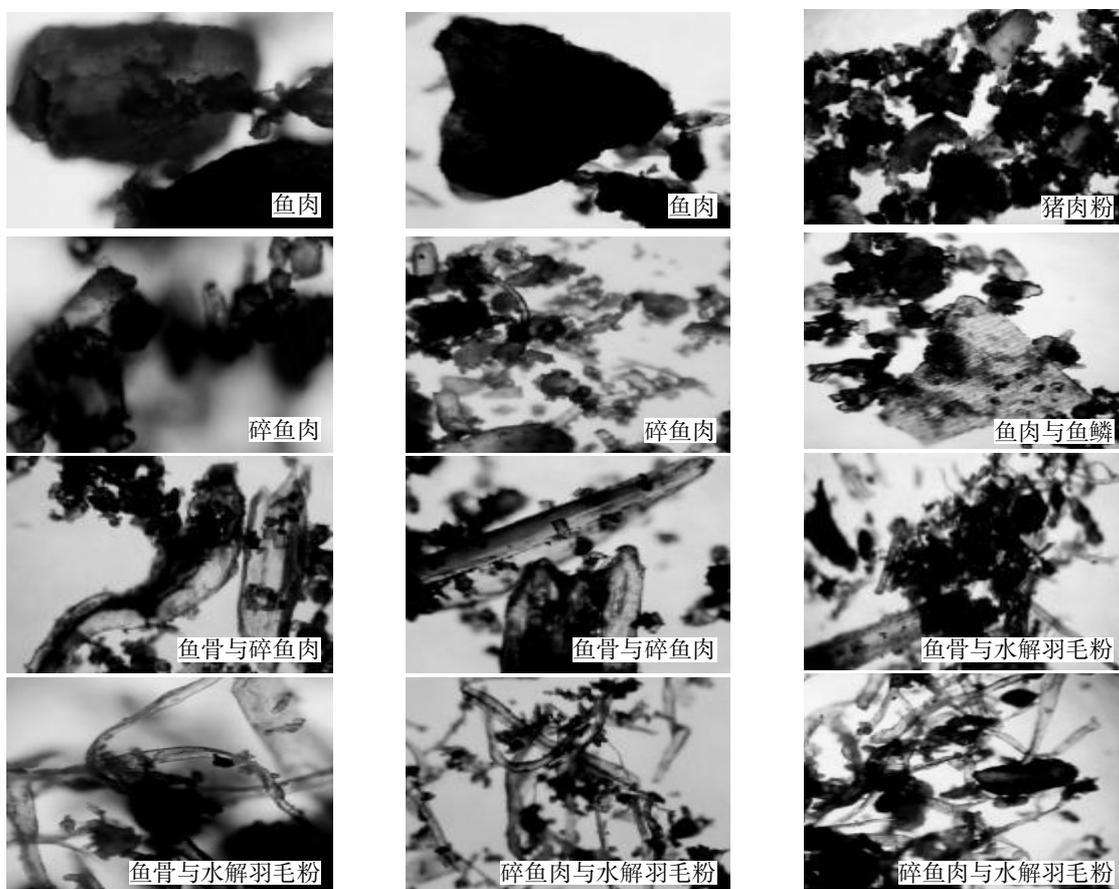


图 2 鱼肉、鱼骨、鱼鳞与掺入鱼粉中的水解羽毛粉显微镜图片比较

显微镜分析是可以很直观地对鱼粉进行观察的技术方法,而一般化验人员没有长期坚持、或没有习惯使用显微镜观察分析。难点在于经显微镜放大数倍后,在光照强度变化下物体的表面光泽与通常情况有一定的差异,只有长期坚持才能逐渐习惯,并进行有效分析。在没有经验的情况下,可以选用标准鱼粉样品进行对比观察、分析。观察内容包括:①是否有异物。鱼粉中应该有的物质包括鱼肉、鱼骨、鱼刺、内脏、鱼鳞等,鱼肉的表面形态特征较为明显(可以与肉粉进行比较),并带有一定的颜色,其颗粒大小与粉碎细度有关(见图1);鱼骨、鱼刺在显微镜下为白色,透明或半透明状,其大小与鱼的大小有关(见图2);鱼鳞表面有纹路,在显微镜下容易区分(见图2);内脏在显微镜下一般为深色颗粒。如果有上述成分之外的物体,即有可能掺假。②观察不同物体的比例,质量好的鱼粉,鱼肉所占的比例很高,是鱼粉中的主要组成物质,而鱼骨、鱼刺、鱼鳞所占比例相对较小。如果在显微镜下发现鱼骨、鱼刺状物体成分超过鱼肉的比列,则有可能掺假,如罗非鱼、斑点叉尾鲷加工副产品——鱼排粉,其鱼骨、鱼刺的比例很高,蛋白含量一般只有40%左右,如果要达到60%蛋白含量就只能掺假,即可能是掺入了处理过的羽毛粉、毛发粉,这些物体在显微镜下类似鱼刺,且比例会超过鱼肉,同时物体大小较正常的鱼骨、鱼刺要小很多(见图2);鱼鳞的比例和内脏的比例在鱼粉中是很小的,如果黑色、深色颗粒过多,也有可能掺假。

5 鱼粉在淡水鱼饲料中使用的技术方案

5.1 鱼粉是营养品质最好的饲料蛋白质原料之一

在所有的饲料原料中,鱼粉在促进养殖动物生长、提高饲料利用效率方面的效果是最为明显的。在配合饲料中是否使用鱼粉及使用量不同所获得的养殖效果会有很大的差异,即饲料中鱼粉的使用量与养殖鱼产品的生长速度、饲料效率具有显著的正相关关系,鱼粉在配合饲料中的使用对配合饲料的质量有非常直接的关系,如在草鱼、武昌鱼饲料中基本不用鱼粉,但是使用1%~2%的鱼粉后,鱼体生长速度可以提高10%以上,同时鱼体的生理机能也会得到改善。

5.2 鱼类养殖利润状况影响鱼粉在饲料中的使用

水产饲料的终端市场是鱼类养殖业,鱼类养殖追求的是养殖利润,而养殖利润的获得取决于养殖鱼类

的成本和鱼产品的市场价格的差异。鱼产品的价格是随鱼类品种和市场需求而变化的,除了养殖品种可以由养殖生产者选择外,其它的都随市场波动而发生变化,因此,对市场价格基本没有可控制性。养殖成本的70%以上是饲料成本,其中最为关键的是养殖单位鱼产品所消耗的饲料成本。单位鱼产品的饲料成本除了与养殖生产者的技术水平相关外,更主要的是配合饲料的质量,这是可以控制的。配合饲料的质量体现的是养殖鱼类的生长速度、饲料转化率(饲料系数),这就存在一个鱼类生长速度、饲料转化率与养殖单位鱼产品饲料成本的平衡问题,同时也决定了饲料中是否使用鱼粉、使用多少鱼粉的问题。

养殖鱼类的生长速度、饲料转化率与养殖单位鱼产品所需要饲料成本的关系有几种可能。

① 生长速度快、饲料转化率高,养殖单位鱼产品的饲料成本也高,这是一种可以追求的目标方案。当养殖鱼产品价格好、养殖效益好的时候,为了尽快使养殖鱼类达到上市规格,养殖者主要追求鱼类的生长速度和鱼产品的上市规格,即使浪费部分饲料原料、单位鱼产品增加一点饲料成本,养殖者也还有较好的利润率。在这种情况下,为了提高养殖鱼类的生长速度,就必须提高配合饲料的质量,而使用鱼粉、或增加鱼粉的用量就可以显著提高养殖鱼类的生长速度,这是较为便捷的饲料技术方案。此时,不管是什么种类的淡水鱼,其配合饲料中均可以适当增加鱼粉1~2个百分点的使用量。

② 生长速度慢、饲料转化率低,但养殖单位鱼产品的饲料成本也低,这是另外一种可以追求的方案。当鱼产品市场价格低、养殖鱼类利润很低的时候,就可以采用该方案。此时,对配合饲料的质量要求也会下降,在饲料中可以不用、或减少1~2个百分点的鱼粉使用量。

③ 生长速度快、饲料转化率高,养殖单位鱼产品的饲料成本低,这是养殖者和饲料企业追求的理想目标,这必须依赖于饲料技术的显著提高和养殖者养殖技术水平的提高。此时,饲料中鱼粉的使用达到科学化,饲料品种、鱼粉用量、鱼粉使用时间、鱼粉停用时间等问题在饲料配方技术方案里都实现了规范化。而就目前的情况看,淡水鱼类饲料在草鱼、武昌鱼、罗非鱼、鲤鱼饲料中基本能够达到这种较为理想的技术水平,但我国的淡水养殖种类近100种,淡水鱼类营养

研究的任务还很艰巨。

④ 生长速度慢、饲料转化率低,养殖单位鱼产品的饲料成本高,这是最不理想的情况,但是,这种情况在我国淡水鱼饲料中还较为普遍,这种现状对鱼粉的浪费也非常严重。

6 无鱼粉或低鱼粉饲料技术对策

鱼粉在饲料中的营养作用主要是提高氨基酸平衡性和利用效率,与其它蛋白原料相比有比较显著的优势,但鱼粉的作用不仅在于其蛋白、氨基酸的作用优势,还在“未知生长因子”、维生素、微量元素等方面具有营养作用优势。因此,在不使用鱼粉或低鱼粉饲料中考虑的技术处理主要包括以下几方面的内容。

6.1 配合饲料中氨基酸的平衡性和有效性

蛋白质的营养实际上是通过氨基酸的营养作用来实现的,因此,在无鱼粉或低鱼粉饲料中优先考虑的技术处理是氨基酸的平衡性。由于鱼类对单体氨基酸的利用效果很差,在部分种类鱼中使用单体赖氨酸、蛋氨酸是没有效果的。对于饲料氨基酸的平衡就只能依赖于饲料原料中氨基酸的互补作用来实现,在设计无鱼粉或低鱼粉饲料配方时可以选择肉粉、肉骨粉、豆粕、菜粕、棉粕等通过比例调整来实现必需氨基酸的平衡。氨基酸平衡效果的评判可以采用必需氨基酸模式相关系数的大小来判定,即以养殖对象鱼肌肉必需氨基酸模式作为标准模式,将配方中必需氨基酸模式与此进行比较,计算两组模式的相关系数,相关系数越大,表明配方中必需氨基酸的平衡效果越好。但要考虑氨基酸的利用率问题,即必需氨基酸的有效性。有些原料虽然蛋白含量很高,但消化利用率很低,如羽毛粉、皮革粉蛋白含量可以达到80%以上,但消化率只有30%左右,无论是单独使用、或是加入鱼粉(掺假鱼粉)中,均会使配方中必需氨基酸的有效性显著降低。因此,在计算必需氨基酸平衡效果时,尽可能选择消化率高的饲料原料组成配方来进行必需氨基酸的平衡。

6.2 增加油脂的使用量,实现对蛋白质的节约效果

鱼类对于碳水化合物利用效果没有陆生动物显著,主要利用氨基酸和脂肪作为能量来源;鱼类与其它动物一样,对于能量的满足始终是第一位的。在鱼粉使用量很低或没有使用鱼粉时,必须增加油脂的使用量,以满足鱼类对能量的需要,以此提高鱼类的生长速度。可以选择的油脂包括猪油、牛油、动植物混合

油、豆油、菜油等。有资料表明,使用大豆、油菜籽、新鲜米糠提供的油脂较纯油脂具有更好的养殖效果,因此,有条件(油菜籽的粉碎、米糠新鲜度的保持等)的企业可以选择这些油脂油料作为饲料油脂的来源,效果会更好。

由于硬颗粒饲料中油脂达到7%以上时,颗粒的粉化率会显著增加,因此,饲料中的油脂水平应该控制在7%以下。在要求的范围内尽可能多用油脂,如控制在6%~7%就可以获得很好的养殖效果。

当然,饲料油脂水平提高后,为了保障饲料油脂被充分利用,减少氧化油脂对鱼体的伤害,应该使用一些添加剂才能有效保证养殖效果和鱼体健康。

6.3 提高维生素的使用量

鱼粉中含有“未知生长因子”、维生素、微量元素等成分,在饲喂无鱼粉或低鱼粉饲料的情况下要保障鱼体正常的生理机能,可以在这类饲料中增加维生素的使用量。通过几年的养殖试验发现,其在保护鱼体健康、保护鱼体粘液等方面具有很好的效果。在原有水平上再增加20%~30%的维生素使用量,可以获得较好的经济效益。

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

· 作者简介 ·

叶元土,苏州大学生命科学学院教授,硕士生导师。

从事淡水鱼类营养与饲料技术研究20余年,在鱼类消化生理、蛋白质代谢、脂质代谢、矿物质营养与鱼体形体控制、饲料原料营养价值评定、饲料配方优化等方面的研究取得了一定成绩。发表论文100余篇,出版技术书籍《水产集约化健康养殖技术》,培养了一批硕士研究生,获得农业部丰收奖一等奖1次、二等奖2次,北京市星火奖1次、重庆市科技进步奖三等奖1次。

现任中国水产学会水产动物营养与饲料专业委员会副主任委员,中国畜牧兽医学学会动物营养分会理事。

合成氨基酸在水产饲料中的应用

朱亚平 郑银桦 薛敏 丁建忠 任泽林 吴秀峰

鱼粉由于氨基酸平衡、适口性佳、消化率高,一直是水产饲料尤其是肉食性水产动物饲料的主要蛋白原料。但由于世界鱼粉资源有限,世界水产养殖产量保持高速增长,所以替代蛋白的应用研究已成为水产动物营养研究的热点。Alam等(2004)认为,蛋白原料除了其所含的抗营养因子及适口性等因素外,氨基酸平衡与否是决定饲料蛋白营养价值最主要的因素。Takeshi等(2000)通过试验发现,氨基酸的平衡程度比粗蛋白含量对虹鳟生长性能的影响更大。如何改善饲料蛋白的氨基酸平衡成了研究的热点,饲料蛋白源的合理配伍是解决这一问题的方法之一,且合成氨基酸的添加无疑是最为直接的解决办法。关于合成氨基酸在水产饲料中的应用效果及使用方法在学术界一直存在较大争议,本文就合成氨基酸在水产饲料中的应用效果的研究概况做一综述,以期为今后的相关研究提供参考。

1 合成氨基酸在水产饲料中的应用效果

关于合成氨基酸在水产动物饲料中应用的研究很多,但结论存在较大分歧。部分学者认为,添加合成氨基酸可以改善氨基酸不平衡状况,促进蛋白质吸收利用,因而促进水产动物的生长。Eric等(2000)在用低脂豆粉部分替代鱼粉的研究中,加入多种合成氨基酸显著提高了美国龙虾的生长性能。Floreto等(2000)报道,在豆粕型饲料中添加合成氨基酸可以显著提高美国龙虾的生长性能。Kim等(1991)在以酪蛋白为蛋白源的饲料中添加蛋氨酸和精氨酸(酪蛋白的限制性氨基酸)饲喂虹鳟,粗蛋白含量为30%的饲料组即可达到未添加氨基酸、粗蛋白含量为40%的饲料组的生长效果。Markus(2000)试验表明,在不同粗蛋白水平的虹鳟饲料中添加赖氨酸均有促进生长、增加蛋白沉积的作用。Cheng等(2003)研究表明,在植物源饲料中添加合成赖氨酸可以显著提高虹鳟的生长速度。Ian Forster等(1998)报道,随着赖氨酸的添加,日本褐牙鲈

和真鲷幼鱼的生长率和氮沉积量都显著增加,脂肪沉积量下降。Stroebakken等(2000)研究表明,在大西洋鲑大豆浓缩蛋白饲料中添加合成氨基酸可有效降低料重比,改善其生长性能。Williams等(2001)研究指出,鲈鱼可以较好地利用饲料中的合成氨基酸。

并非所有研究都认为水产动物可以有效地利用合成氨基酸,而且即使针对同一品种,结论也不相同。Pongmaneerat等(1993)的研究表明,在鲤鱼的无鱼粉饲料中添加赖氨酸、蛋氨酸和苏氨酸对提高饲料的蛋白质和能量沉积量没有帮助。Aoki等(2000)和Takagi等(2001)研究指出,真鲷不能有效地利用合成氨基酸。Sveier等(2001)的研究显示,在饲料中添加L-Met对大西洋鲑的生长性能没有影响。同样,对于甲壳类动物也有类似的报道。麦康森(1987)研究认为,在中国对虾饲料中添加氨基酸反而会抑制其生长。Teshima等(2004)和Alam等(2004、2005)都通过试验证明日本沼虾不能很好的利用合成氨基酸。

导致合成氨基酸应用效果差异的原因有很多,其中最主要的一个原因是氨基酸需求量标准的缺乏。相对于畜禽,关于水产动物氨基酸需求的研究报道很少,仅对部分品种的几种限制性氨基酸(如Lys、Met、Arg)的需求量进行了初步研究,且结论不统一,缺乏全面性和系统性。以尼罗罗非鱼为例,NRC(1993)标准中赖氨酸的需求量仅为1.43%,而以尼罗罗非鱼肌肉氨基酸模式确定的赖氨酸需求量为1.66%。Furuya等(2004)以尼罗罗非鱼肌肉氨基酸模式为依据,在无鱼粉的饲料中通过添加蛋氨酸、赖氨酸和苏氨酸使氨基酸水平平衡,其生产效果与添加鱼粉组相同。随着合成氨基酸的生产工艺日渐完善,成本逐渐降低,对水产动物氨基酸需求的研究将更有助于推进合成氨基酸在水产饲料中的应用,通过在饲料中补充合成氨基酸达到理想蛋白模式,提高蛋白质利用效率,从而缓解蛋白资源紧缺的现状。

2 限制合成氨基酸在水产饲料中应用的因素

2.1 合成氨基酸在水中溶失率高

合成氨基酸易溶于水。Wilson等(1980)在用添加了合成氨基酸的饲料饲喂斑点叉尾鲷(Ictalurus punctatus)时,检测到50%以上的合成氨基酸溶失在养殖水体中。Alam等(2005)在试验中检测到对虾饲料在水中浸泡10 min,其合成氨基酸损失达40%。因

朱亚平,中国农业科学院饲料研究所,100081,北京市海淀区中关村南大街12号。

郑银桦、薛敏、吴秀峰,单位及通讯地址同第一作者。

丁建忠、任泽林,北京英惠尔生物技术有限公司。

收稿日期:2007-02-26

此,对于水生动物而言,饲料中合成氨基酸在水中的溶失率高限制了其应用效果。

2.2 合成氨基酸和完整蛋白质吸收不同步

部分水产动物消化道自身特点造成的合成氨基酸和完整蛋白质吸收不同步是影响合成氨基酸应用效果的关键因素。李爱杰和麦康森(1987)在中国对虾饲料中添加同位素标记的合成赖氨酸,试验发现,添加的赖氨酸大部分在中肠前的中肠腺已被吸收,而蛋白质此时还没有被分解吸收,二者吸收时间上的不同步导致蛋白质合成受阻,生长性能非但没有提高反而下降。Teshima等(2004)对日本沼虾的研究也证实这一点。

造成合成氨基酸与完整蛋白质吸收不同步的原因可能有许多。Cowey等(1983)研究指出,动物体内存在氨基酸库,可暂时储存多余的氨基酸,而水产动物尤其无胃鱼体内游离氨基酸库存储能力有限,突然增加的某一种氨基酸使其不堪重负,机体启动氨基酸分解体系,“过量”的氨基酸被大量分解。Cowey(1988)通过对氨基酸进行同位素标记试验,短时间内在排泄物中就检测到了标记物,证实了这一说法。饲料中的游离氨基酸在进入水产动物消化道后,很快被机体吸收入血液、组织液中,可能会很快形成单个氨基酸量的高峰值,但饲料蛋白质在消化道内分解尚未完成的情况下,机体难以启动蛋白质合成机制。Annette等(1997)通过检测饲喂蛋白和合成氨基酸复合物饲料的虹鳟血浆氨基酸水平发现,饲喂合成氨基酸组血浆氨基酸峰值出现时间比饲料组提前了一半。此时氨基酸体内内稳态机制可能会启动,这将刺激氨基酸氧化分解机制将单个氨基酸形成的高峰值削减下来以保持内稳态。这样,在饲料中添加的限制性氨基酸进入体内后很快被氧化分解掉,起不到补充限制性氨基酸的作用,也就不具有促生长效果。Cowey等(1983)通过测定虹鳟摄食后经鳃和肾排出的含氮物质发现,鱼所摄食的合成氨基酸有36%被排入水中。Murai(1985)的研究也发现,有高达40%的合成氨基酸未参与蛋白质合成而直接从鳃、肾排出。Liou等(2005)报道,摄食合成氨基酸饲料的对虾尿液中总氮和游离氨基酸的含量极显著的高于摄食蛋白饲料的对虾组。

2.3 其它因素

除了以上两个主要原因外,养殖环境(如水温、pH值)、饲料制作、投饲管理等因素也会影响到合成氨基酸在水产饲料中的应用。Higuera等(1998)试验研究表明,随着温度的升高,鲤鱼对合成氨基酸的利用率逐渐下降,分析原因可能是肠道蠕动加快,加大了合

成氨基酸和蛋白质吸收的时间差。pH值对合成氨基酸利用效率的影响也有不少报道。Wilson等(1977)报道,在pH值接近7时,斑点叉尾鲷对饲料中的合成氨基酸利用率最高。Lim等(1993)报道,在pH值4.8~8.0时,给对虾投喂合成氨基酸饲料,其生长性能和摄食量随着pH值的升高而提高。另外,饲料成形度、溶失率会影响到合成氨基酸的水中稳定性,进而影响其在饲料中的应用效果。Chiji等(1990)认为,晶体氨基酸和完整蛋白对肠道内特定酶制剂刺激程度不同而影响晶体氨基酸的利用效率。

3 改进合成氨基酸生物效价的措施

3.1 增加投喂频率

增加投喂频率可以在一定程度上改善吸收的不同步,为添加的游离氨基酸与饲料中蛋白分解的氨基酸提供一个相遇、结合的机会。Yamada等(1981)研究表明,用添加了合成氨基酸的饲料投喂鲤鱼,当日投喂3次时,增重率较未添加合成氨基酸组提高39%;当投喂频率增加到18次/d后,增重较对照组提高了175%。李爱杰(1989)试验证实,增加投喂次数可显著提高中国对虾对合成氨基酸的利用率。Zarate等(1999)研究指出,增加投喂频率可以显著提高斑点叉尾鲷对饲料中合成赖氨酸的利用率而改善其生长性能,降低饲料系数。王冠(2005)研究表明,日投喂2~3次时,补充合成氨基酸不能改善异育银鲫的生长性能,当将日投喂次数增加到4次后,异育银鲫的生长性能得到显著改善。周小秋等(2005)在幼建鲤的研究中也得到相似的结论。建议生产中添加合成氨基酸的饲料时,通过使用自动投饵机适当增加投喂频率。

3.2 对合成氨基酸进行稳定化处理

对合成氨基酸进行稳定化处理,可以减少氨基酸的溶失率,改善与完整蛋白质吸收不同步的状况。稳定化处理的方法一般有螯合、合成小肽和包膜等方法,其中有关氨基酸螯合物作用的报道主要侧重于改善矿物质吸收方面;而小肽的研究侧重于其免疫功能方面;包膜处理是一种工艺相对简单,缓释作用显著的稳定化处理方法。

微胶囊及各种包膜技术首先应用于开口饵料的研究中,试验过程中发现,这一技术可以延缓营养物质的释放,并逐渐将这一技术借鉴到合成氨基酸应用中。Murai等(1981)在幼鲤纯化饲料中分别添加游离氨基酸和酪蛋白包膜的氨基酸,通过比较两组鱼血浆中游离氨基酸的变化发现,酪蛋白包膜的氨基酸通过改变色氨酸和亮氨酸的吸收和保留倍数,保证了血浆中氨基酸平衡,使鱼生长速度提高了4倍,饲料

效率提高了2倍。Yúferaa等(2003)在研究金头鲷幼苗的开口饵料时,将幼苗生长需要的多种营养物质,包括多种游离氨基酸包被于微胶囊内发现,通过微胶囊包被可有效减少氨基酸的溶失,提高其利用率,得到了很好的生长效果。Alam等(2005)通过试验证明,在饲料中添加包膜赖氨酸或蛋氨酸,日本沼虾增重率显著提高。Murai等(1982)研究表明,摄食包膜氨基酸组的鲤鱼生长速度和生长率分别是未包被氨基酸组的4倍和2倍。阎军等(2004)试验证明,在鲤鱼无鱼粉饲料中补充适量的包膜氨基酸可达到与添加鱼粉组相同的生长效果,显著优于不添加氨基酸的无鱼粉组。周小秋等(2005)在幼建鲤饲料中添加不同形式的赖氨酸后发现,包膜赖氨酸组增重率显著高于未经包膜处理组。刘永坚等(2002)在草鱼饲料中分别补充合成赖氨酸和包膜赖氨酸,结果表明,补充包膜赖氨酸组与不补充或补充合成赖氨酸组比较,增重率、蛋白质效率、血清必需氨基酸平衡指数(Essential amino acids index, EAAI)和蛋白质合成率都得到改善。Manuel等(2004)研究发现,包膜蛋氨酸可以减少其在水中溶失,并延缓其在尼罗罗非鱼肠道中的吸收速度。

目前关于包膜材料的研究有限,多数研究仅停留在包膜和未包膜氨基酸添加效果的比较,深入比较不同包膜材料优缺点的报道还非常有限。Manuel等(2004)通过试验比较了聚乙烯醇三棕榈酸甘油酯和邻苯二甲甲基乙酸纤维素作为包膜材料的缓释效果发现,用聚乙烯三棕榈酸甘油酯包膜可以有效的延缓合成氨基酸在尼罗罗非鱼肠道的吸收速度。Yúferaa等(2002)的试验结果显示,和明胶相比,以蛋白质作为包膜材料可以减少内容物的损失。今后研究的重点应该是在确定吸收时间差的基础上,体外模拟消化环境,筛选最适合的包膜材料。

4 合成氨基酸的使用方法

为了使添加的合成氨基酸发挥最大效应,除了对合成氨基酸进行有效处理和增加投喂频率外,还应当根据不同水产动物对合成氨基酸的利用规律选择恰当的使用方法。

4.1 氨基酸的添加依据

根据特定水产动物的营养需求和氨基酸的限制性进行氨基酸平衡设计,以此决定饲料中添加限制性氨基酸的种类。Meng等(1998)通过试验证明,在氨基酸基本平衡的低蛋白日粮中添加合成赖氨酸、蛋氨酸对美洲鲈无促生长作用,说明只有在某种限制性氨基酸缺乏的情况下进行添加才能发挥作用。Alam等(2005)试验证明,在日本沼虾饲料中同时添加包膜赖氨酸或蛋氨酸,比仅添加一种氨基酸时增重率显著提

高,说明添加多种限制性氨基酸效果优于添加单一的。Gerd等(1998)试验发现,添加过量的赖氨酸(Lys)会阻碍精氨酸(Arg)的利用而影响试验动物的生长,因此添加氨基酸时要注意避免氨基酸之间的拮抗作用。

4.2 氨基酸的添加量

根据动物的营养需求添加合成氨基酸,确定最适添加量,达到理想氨基酸模式(ideal amino acid pattern, IAAP)。NRC(1981)首次提出理想氨基酸模式并将理想蛋白质定义为饲料蛋白质中的各种氨基酸含量与动物用于特定功能所需要的氨基酸量相一致。Fuller和Wang(1989)等对生长猪做了大量有关理想蛋白模式的试验,认为运用理想蛋白模式配制日粮时,可以明显降低日粮粗蛋白质含量。Akiyama等(1989)认为,试验动物的机体或肌肉氨基酸模式可作为指导合成氨基酸添加模式的有益参数。Alam等(2002)以酪蛋白-明胶作为基础蛋白源,分别参照试验动物卵、幼体、稚体以及成鱼机体氨基酸模式,用合成氨基酸替代饲料中部分基础蛋白,共设计5组饲料,试验证实按照成鱼机体氨基酸配制的合成氨基酸替代饲料组的增重率和饲料转化效率最高,其次是对照组,然后是稚鱼模式组、幼体模式组,最后是卵模式组。Furuya等(2004)根据以机体成分确定的理想蛋白模式向豆粕型饲料中添加合成氨基酸,尼罗罗非鱼达到了与鱼粉组相似的生长效果。

过多或过少的添加合成氨基酸都不利于水产动物的生长。Alam等(2003)向日本对虾饲料中添加由低到高几个梯度的精氨酸,试验结果表明,只有在添加量适当时,日本对虾才表现出较好的促生长效果,过量的精氨酸不能有效转化为机体蛋白。Wilson等(1977)研究表明,添加过量赖氨酸可抑制斑点叉尾鲷和尼罗罗非鱼的生长,最佳添加剂量的确定还需要考虑饲料原料的特殊性。涂永锋等(2004)分别以菜籽粕和血粉为主要原料,按照鲫鱼肌肉必需氨基酸模式添加和倍量添加合成异亮氨酸(Ile)配制饲料,与缺乏Ile的饲料进行对比饲养试验,结果表明,菜籽粕组添加异亮氨酸无促生长效果,倍量添加表现出抑制生长;血粉组2种添加剂量均表现出明显的促生长效果。这是因为血粉中可利用的异亮氨酸极度缺乏,添加的异亮氨酸缓解了氨基酸不平衡状态,从而促进鲫鱼生长,但2种原料中异亮氨酸含量的差异导致不同试验结果,说明过量添加不但不能促进鲫鱼生长,反而有抑制作用。

(参考文献59篇,刊略,需者可函索)

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

谷氨酰胺二肽在断奶仔猪饲料中应用的可行性

陈娟娟 车向荣

谷氨酰胺(Gln)是唯一具有抗氧化和渗透特性的氨基酸,是动物肠、肝和免疫细胞优先利用的燃料,是抗氧化物的前体,并被认为是炎症情况下的一个条件性必需氨基酸。在应激状态下,Gln通过动物肠道或非肠道减少细菌在细胞内的粘附来减少细菌移位的发生。Gln为蛋白合成提供氮的先体,是快速分裂细胞优先利用的呼吸燃料。已有大量研究证实,Gln能减轻断奶仔猪的腹泻,提高其生产性能。

Gln单体稳定性差,溶解度低,易形成对机体有害的焦谷氨酸和氨。Gln在液体中的分解速度取决于溶液温度、pH值和离子浓度。Gln二肽避免了Gln单体的缺点,且经二肽酶的水解可以释放出Gln。甘氨酸谷氨酰胺(Gly-Gln)和丙氨酸谷氨酰胺(Ala-Gln)是两种常用的人工合成的Gln二肽,其纯度可达100%,在水溶液中溶解度高,20℃时Gly-Gln和Ala-Gln在水中的溶解度分别为154、586 g/l,能耐受高温,常温下2年仍能保持稳定。

1 谷氨酰胺二肽的吸收与代谢

研究证明,肠道能以完整形式吸收小肽(主要是二肽、三肽)进入循环系统而被组织利用,肠道小肽的吸收是依靠肠粘膜上的肽类转运系统逆浓度进行的。肠粘膜肽类转运系统主要是具有pH值依赖性的非耗能性H⁺/Na⁺交换转运系统,转运过程依靠H⁺向细胞内的电化学质子梯度供能;当缺少H⁺时,依靠膜外的底物浓度进行,当存在细胞外高内低的H⁺时,则以逆底物浓度的生电共转运进行(Daniel等,1994)。小肽转运蛋白(PepT1)参与二肽、三肽的跨膜转运,由酸性、碱性和亲水性氨基酸组成的小肽都能被PepT1转运。猪PepT1mRNA仅存在于小肠中,有2.9 kb和3.5 kb两条带(Chen等,1999)。对mRNA分析表明,大多数猪小肠PepT1mRNA丰度在空肠中最高,其次为十二指肠,而在回肠中最低。小肠粘膜吸收Gln二肽有两种可能的

途径:①Gln二肽在细胞外经胞膜二肽酶水解释放出Gln,再被肠粘膜吸收;②Gln二肽被转运到上皮细胞内,经胞质内二肽酶水解释放出Gln。有研究证明,肠粘膜上皮细胞胞质内和胞膜上均有二肽酶,但胞质内二肽酶活性高于胞膜上的。

动物和人体试验表明,Gln二肽在体内能被快速分解为氨基酸,再被机体利用合成蛋白质或用作氮源和能源,仅有微量(摄入量的1%~2%)Gln二肽从尿中排出。

Gln二肽在动物机体内能很快进行分解代谢。血浆、肝、肾、肠、脾以及骨骼肌等器官中均含有二肽酶,能分解Gln二肽。应用器官物质代谢平衡方法研究发现,给予Gln二肽后,肝、肾、肠和骨骼肌中的二肽都处于正平衡状态,说明它们都参与了Gln二肽的代谢。但不同的器官清除Gln二肽和利用Gln的能力不同。有研究表明,在给予Gln二肽之前,通过肠和肾的Gln平衡为净摄取,肝脏和骨骼肌的Gln平衡为中性。而给予Gln二肽后,肝脏Gln平衡为净摄取;肾脏为净释放,且与给予二肽的量成比例地增加或减少;肠和骨骼肌中Gln平衡却无明显变化。机体大部分Gln二肽都被肾分解为氨基酸,再被释放入血液中,被其它器官利用,尿中仅能检测到极微量的Gln二肽和Gln。

血液中Gln二肽的代谢可能有3种途径:①在血液循环中水解;②被血管壁膜上的二肽酶水解;③经主动转运或被动扩散,以完整形式进入细胞后再被酶水解。血液中存在水解二肽的酶,可以分解Gln二肽,但不是清除Gln二肽的主要形式。肝脏和骨骼肌内没有二肽转运系统,二肽的水解主要是通过血管壁膜上的二肽酶在细胞外水解,肝血窦内皮细胞以及骨骼肌血管内皮细胞上都发现存在水解二肽的酶,对Gln二肽的清除能起一定的作用。肾小管上皮细胞刷状缘上存在两类二肽转运系统(一类是高亲和力、低饱和性的,依赖H⁺浓度且受膜电位的影响;另一类是低亲和力、高饱和性的,不受H⁺浓度和膜电位的影响),能将二肽以完整形式转运到细胞内,再被水解利用。

Gly-Gln和Ala-Gln在机体内的代谢存在一定的差异,但它们都能被有效地分解为氨基酸而被机体利用,因而都能用于替代Gln发挥作用。应用Gln二肽引起血液中Gln浓度升高的同时,也会引起Gln的载

陈娟娟,山西农业大学动物科技学院动物营养实验室,030801,山西太谷。

车向荣(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-02-25

★ 山西省科技攻关项目(编号为041045)

体氨基酸,如甘氨酸或丙氨酸的升高,从而造成血中氨基酸模式的改变。

2 谷氨酰胺二肽对断奶仔猪生产性能的影响

大量试验研究表明,Gln 二肽能促进肠道细胞的修复及维持正常的局部免疫功能,从而减轻断奶对仔猪肠道的损伤并使修复提前,能减少断奶造成的仔猪生产性能下降和腹泻。杨彩梅等(2005)在 28 日龄断奶的杜长大仔猪日粮中分别添加 0%、0.15%、0.3%、0.5%、0.6% 甘氨酸-L-谷氨酰胺 (Gly-L-Gln) 和 1% Gln,结果表明,添加 0.3% Gly-L-Gln 和 1% Gln 组显著提高断奶仔猪平均日增重,降低腹泻率。黄冠庆等(2003)在断奶仔猪饲料中添加 0.25%、0.5% 甘氨酸谷氨酰胺,在添加后第 10~21 d,试验组仔猪平均日增重均高于对照组,其中添加 0.25% 甘氨酸谷氨酰胺组仔猪日增重显著高于对照组。张勇等(2004)在 35 日龄断奶仔猪饲养试验中发现,添加 Gln 二肽组(0.5%)与对照组相比,日增重提高 27.7%、料重比降低 31.8%、腹泻率降低 37.1%;与乳清粉组(3%)相比,日增重提高 14.9%、料重比降低 12.7%、腹泻率降低 11.4%。Gln 二肽与乳清粉协同组与对照组相比,日增重提高 37.8%、料重比降低 34.2%、腹泻率降低 70.7%;与乳清粉组相比,日增重提高 23.9%、料重比降低 15.7%、腹泻率降低 58.7%。由此可见,仔猪饲料中添加 Gln 二肽能提高仔猪生产性能。

Gln 二肽对断奶仔猪生产性能的提高主要是因为 Gln 二肽对仔猪肠道吸收功能的改善。杨彩梅(2005)的研究表明,断奶可使仔猪肠道吸收功能明显减弱,而且断奶 21 d 后仍不能恢复到正常水平。日粮中添加 Gly-L-Gln 和 Gln 可使肠道吸收功能得到明显改善,使断奶 21 d 后恢复到断奶前水平,这可能是因为 Gln 促进了肠道粘膜细胞的更新与再生,维持了粘膜的完整性。

3 谷氨酰胺二肽对断奶仔猪免疫功能的影响

Gln 二肽分解成谷氨酰胺后,主要是通过参与淋巴细胞的代谢,影响多种激素以及细胞因子的分泌等方面对机体免疫应答发挥作用,它既是淋巴细胞和巨噬细胞的主要能源,又是淋巴细胞受抗原刺激后大量增殖分化中核苷酸合成的重要前体,使胸腺细胞计数增多,植物血凝素(PHA)有丝分裂原的产生增加,并且显著提高 T 淋巴细胞对有丝分裂原的反应性,有利于巨噬细胞在免疫应答过程中合成 mRNA,释放大量

分泌性细胞因子,如 TNF、IL(白细胞介素),增强巨噬细胞吞噬能力。

周荣艳(2004)的研究发现,在体外细胞培养液中,Ala-Gln 在一定的浓度范围对体外培养的早期断奶仔猪肠系膜淋巴结细胞增殖有促进作用,浓度在 1 mmol/l 时刺激指数最大,且与浓度为 2 mmol/l 游离 Gln 作用效果相似。刘涛等(2002)研究发现,在饲料中添加 1.0% Gln 可提高仔猪断奶后短期内血液 CD4⁺数量和 CD4⁺/CD8⁺比值,从而增强仔猪细胞免疫机能,但并不影响外周血 T 淋巴细胞的增殖能力;在断奶后 5 d,对照组仔猪小肠粘膜中 S-IgA 阳性细胞数和 IL-6 基因表达量较断奶前显著降低 (P<0.05),试验组 S-IgA 阳性细胞数和 IL-6 基因表达量均与断奶前无显著差异;在断奶后 11 d 时,试验组与对照组之间上述指标均无显著差异。邹晓庭等(2005)研究表明,饲料中添加 Gln 可提高断奶仔猪血清 IgA、IgG 和 IgM 水平,提高肠系膜淋巴结细胞的体外增殖率,提高肠系膜淋巴结和空肠粘膜中 DNA 含量。

4 谷氨酰胺二肽对断奶仔猪抗氧化能力的影响

Gln 是肠粘膜细胞的主要能源物质,并参与机体内还原型谷胱甘肽(GSH)的合成。动物机体内 GSH 和超氧化物歧化酶(SOD)在清除自由基和维持细胞的结构方面具有重要的作用。曾翠萍(2004)在 21 日龄断奶仔猪饲料中分别添加 0.3% Gln、0.15%、0.3% Gly-Gln,结果显示,添加 0.15%、0.3% Gly-Gln 组血清 SOD 水平在 35 和 49 日龄时显著高于对照组 (P<0.05);添加 0.15% 的 Gly-Gln 最有利于组织(肝、脾、肠粘膜)SOD 水平的提高,添加 0.3% Gln 和 0.3% Gly-Gln 对各组织中 SOD 水平无明显影响;添加 0.3% Gln 和 0.15%、0.3% Gly-Gln 均能提高肝脏和回肠中 GSH-Px 活性,且 0.15% Gly-Gln 对肝脏的作用最明显,对脾脏、十二指肠中 GSH-Px 活性影响不大;0.15%、0.3% Gly-Gln 都能显著提高空肠 GSH-Px 活性,0.3% Gln 对空肠 GSH-Px 的影响不大。席鹏彬等(2005)报道,高剂量(0.50%)Gln 二肽可显著提高血清 SOD 水平。张军民等(2001)报道,日粮中添加 Gln 可以增加仔猪肝脏和肠系膜淋巴结中 GSH 水平,但仔猪脾脏和肝脏中 SOD 均显著降低。日粮 Gln 可提高早期断奶仔猪肝脏中 GSH 的水平,有改善机体抗氧化功能的趋势,但与对照组相比无显著差异。对全血中 GSH 和谷胱甘肽过氧化酶活性无显著影响。余晓明等(2003)探

讨 Gln 二肽对急性胰腺炎大鼠自由基代谢及抗氧化作用的影响, 结果发现, 经颈脉注射 2.5 g/kg Ala-Gln 预处理后, 各时间点动物血浆 GSH、SOD 浓度均显著升高, 而 MDA 浓度则明显降低, 表明应用 Ala-Gln 可有效升高血浆还原型 GSH 浓度, 减少氧自由基的产生, 减轻氧自由基对机体的损害。

5 谷氨酰胺二肽对内分泌激素水平的影响

曾翠萍(2004)的研究表明, 日粮中添加 0.15% Gly-Gln 可显著提高血清中 IGF-I 胰岛素水平和胰岛素与胰高血糖素比值, 降低仔猪血清 IGF-BP-3 水平, 对 49 日龄仔猪肝脏组织中 IGF-I 含量也有一定程度的提高, 而增加 Gly-Gln 的添加量对 IGF-I 分泌没有明显的促进作用。日粮添加适量的 Gly-Gln 能明显降低 49 日龄仔猪下丘脑 CRH 的分泌 ($P < 0.05$), 并有降低皮质醇分泌的趋势。黄冠庆(2003)的试验表明, 在饲料中添加 0.25%、0.5% Gly-Gln 可提高断奶仔猪在 31 和 42 日龄时血液中的三碘甲腺原氨酸 (T_3)、游离甲状腺素 (T_4) 和胰岛素的含量, 其中饲料中添加 0.5% Gly-Gln 可显著提高断奶仔猪在 31 日龄时的血液中 T_3 水平和显著提高断奶仔猪 42 日龄时的血液中胰岛素水平。添加 0.25%、0.5% Gly-Gln 有提高断奶仔猪在 31 和 42 日龄时血液中 IGF-I 水平的趋势; 可降低断奶仔猪血液中皮质醇水平。

6 谷氨酰胺二肽在断奶仔猪上的应用前景

大量的动物试验证明, Gln 对动物机体生长和免疫机能具有增强作用, 虽然 Gln 二肽在畜禽生产中的应用目前还不是很多, 但从理论上和一些已经在畜禽生产上应用的结果来看, 应用 Gln 二肽是安全有效的, 它与 Gln 的生理作用没有明显的差别, 可以用来代替 Gln。目前面临的问题是, 化学合成法生产的 Gln 二肽产量较低, 成本较高。有人研究用生物工程菌来生产 Gln 二肽, 应该是一条很有潜力的途径。如果能在断奶仔猪上广泛地应用 Gln 二肽, 将能有效地解决断奶仔猪因 Gln 不足引起的腹泻这一养猪生产问题, 会给养猪业带来很好的经济效益。

参考文献

- Petra G Boelens, Alexander PJ, Houdijk. Plasma taurine concentrations increase after enteral glutamine supplementation in trauma patients and stressed rats [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2003, 77(1): 250-256
- Mittendorf B, Gore D C, Herndon D N, et al. Accelerated glutamine synthesis in critically ill patients cannot maintain normal intramuscular free glutamine concentration[J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr., 1999, 23:243-250
- Newsholme EA, Crabtree B, Ardawi MSM. The role of high rates of glycolyses and glutamine utilization in rapidly dividing cells [J]. Biosci Rep., 1985, 5:393-400
- Daniel H. Function and molecular structure of brush border membrane peptide/H⁺ symporters[J]. J. Membr. Biol., 1996, 154:197-203
- Chen H, Wong E A, Webb K E. Tissue distribution of a peptide transporter mRNA in sheep, dairy cows, pigs, chickens [J]. J. Anim Sci., 1999, 77:1 277-1 283
- 曾翠萍. 甘氨酸谷氨酰胺对早期断奶仔猪的促生长作用及其机制. 华南农业大学博士学位论文, 2004
- Adihi SA. Experimentable base for use of peptide as substrates for parenteral nutrition: A review Metabolism. 1987, 36:1 001-1 006
- Adibi SA. Intravenous use of glutamine in peptide form clinical application of old and new observations. Metabolism. 1989, 18:892-896
- 桑剑锋. 丙氨酸谷氨酰胺二肽的代谢及在肠外营养中的应用[J]. 肠外与肠内营养, 2001, 8(1):46-49
- Abumrad N N, Morse E L, Lochs H, et al. Possible source of glutamine for parenteral nutrition impact on glutamine metabolism[J]. Ani. J. Physiol., 1989, 257: 288-291
- Daniel H, Morse E L, Adibi S A. The high and low affinity transport system for dipeptide in kidney brush border membrane respond differently to alteration in pH gradient and membrane potential[J]. Biol. Chem., 1991, 261:19 917-19 921
- 杨彩梅, 徐卫丹, 陈安国, 等. 甘氨酸-L-谷氨酰胺对断奶仔猪生长性能及肠道吸收功能的影响[J]. 中国畜牧, 2005, 41(8):6-7
- 黄冠庆, 傅伟龙, 高萍, 等. 甘氨酸谷氨酰胺二肽对断奶仔猪生长性能及血液激素水平的影响[J]. 华南农业大学学报, 2003, 24(3):66-68
- 张勇, 李树忠, 段丽娟, 等. 谷氨酰胺二肽饲喂仔猪的效果[J]. 畜牧兽医, 2004, 36(2):21-22
- 周荣艳. 谷氨酰胺及丙氨酸谷氨酰胺对早期断奶仔猪肠上皮细胞增殖和肠道免疫的影响[D]. 华中农业大学研究生学位论文, 2004
- 刘涛, 彭健, 周诗其, 等. 外源性谷氨酰胺和谷氨酸对早期断奶仔猪肠黏膜形态、结构和小肠吸收功能及骨骼肌中 DNA、RNA 浓度的影响[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(1):62-65
- 尹兆正, 邹晓庭, 钱利纯, 等. 谷氨酰胺对断奶仔猪免疫功能的影响. 中国兽医学报, 2005, 25(5):536-538
- 席鹏彬, 林映才, 朱选, 等. 谷氨酰胺二肽对断奶仔猪生长性能、细胞免疫及血液生化指标的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(9): 900-905
- 张军民, 王连进, 高振川, 等. 日粮添加谷氨酰胺对早期断奶仔猪抗氧化能力的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(2):105-109
- 刘涛. 谷氨酰胺对早期断奶仔猪肠道营养与免疫功能影响机理[D]. 华中农业大学博士学位论文, 2002
- 余晓明, 陈纪伟, 周雪峰, 等. 谷氨酰胺二肽对急性胰腺炎大鼠自由基代谢的影响[J]. 武汉大学学报(医学版), 2003, 24(3):251-253

(编辑:王芳, xfang2005@163.com)

本栏目由北京挑战生物技术有限公司协办



非淀粉多糖酶制剂的研究进展

汪 勇

摘 要 非淀粉多糖是饲料中的主要抗营养因子之一,不能被单胃动物自身分泌的内源酶降解,同时增加肠道内食糜的黏度,降低饲料养分的消化利用率。非淀粉多糖酶对于改善饲料品质、消除抗营养因子的影响及提高动物生产性能都有重要意义。文章就非淀粉多糖的多样性,非淀粉多糖酶的种类、来源及酶活测定方法等进行了综述,并介绍了影响非淀粉多糖酶应用的因素及其在畜禽业中的应用进展。

关键词 非淀粉多糖酶;抗营养因子;内源酶
中图分类号 S816.11

随着人们对饲料化学成分和植物学结构认识的深入,近年来对非淀粉多糖(Non-starch Polysaccharides, NSP)在动物日粮中的营养及抗营养作用提出了许多新的观点,并对开发利用富含 NSP 的饲料资源作了大量研究,尤其是可溶性 NSP 的抗营养效应受到国内外许多学科领域学者的重视。目前,普遍认为 NSP 可能通过多种方式影响饲料的营养价值。NSP 是植物细胞壁的主要成分,不能被动物自身分泌的内源酶降解,因此,细胞内容物释放不出来,降低了饲料的可消化性。同时,可溶性 NSP 使肠道内食糜黏度升高,降低胃肠道运动对食糜的混合效率,影响了消化酶与底物的有效接触;并且减慢了养分向小肠上皮绒毛的渗透,影响了动物对饲料养分的消化和吸收^[1]。

酶作为活细胞所产生的一种生物催化剂,它通过参加生化反应来促进动物对营养物质的吸收和利用,提高饲料的利用率和畜禽的生产性能。从全球范围来看,大约 65% 的谷物饲料中添加了酶制剂,尤其是 NSP 酶制剂的使用,是目前消除饲料中 NSP 的抗营养作用最为有效可行的措施,为开辟新的饲料资源、降低饲料成本提供了有效的途径。

1 NSP 的概念及饲料中 NSP 的多样性

NSP 是植物组织中除淀粉以外所有碳水化合物

的总称,由纤维素、半纤维素和果胶 3 部分组成,是构成植物细胞壁的主要成分。半纤维素主要包括 β -葡聚糖、木聚糖和甘露聚糖等。纤维素与 β -葡聚糖都由葡萄糖缩合而成,但纤维素是指仅由 β -(1,4)糖苷键组成的葡聚糖链,而 β -葡聚糖则是由 β -(1,3)和 β -(1,4)两种糖苷键连接而成的。果胶与半纤维素也有很多相似之处,二者的区别在于前者含有大量半乳糖醛酸和鼠李糖,后者一般不含糖醛酸,主要由中性糖组成^[2]。

各种谷物的 NSP 含量及其多糖构成有明显区别,如玉米中的 NSP 主要是纤维素;大麦和燕麦中的 NSP 主要是纤维素和 β -葡聚糖;而黑麦、小麦中则以木聚糖和阿拉伯木聚糖为主,其中部分 β -葡聚糖和阿拉伯木聚糖存在于种皮和糊粉层细胞壁中。同种谷物中 NSP 的结构和含量也会随品种、产地等自然条件的变化而变化。Annison(1990)检测了澳大利亚 20 种小麦,结果表明,小麦中阿拉伯木聚糖含量为 5.27%~8.10%。Kundsen 等(1995)报道,不同品种小麦阿拉伯木聚糖中阿拉伯糖与木糖的比例在 0.45~0.86 之间变化。

2 NSP 酶制剂的分类与来源

2.1 纤维素酶

根据酶的作用方式将纤维素酶分为 C_1 酶、 C_x 酶和 β -葡萄糖苷酶。 C_1 酶主要作用于天然纤维素,使之降解为水合非结晶纤维素。 C_x 酶又分为 C_{x1} 酶和 C_{x2} 酶,前者是内切纤维素酶,它从水合非结晶纤维素分子内部作用于 β -1,4-糖苷键,生成纤维糊精与纤维二糖;后者是外切纤维素酶,它作用于水合非结晶纤维

汪勇,北京挑战生物技术有限公司,100081,北京市海淀区中关村南大街 12 号。

收稿日期:2007-03-21

素分子的非还原末端。 β -葡萄糖苷酶又称纤维二糖酶,它作用于纤维二糖,生成葡萄糖。这些酶协同作用可将纤维素彻底降解为还原糖(葡萄糖)。目前纤维素酶的生产主要来源于木霉、黑曲霉和青霉,如长柄木霉、李氏木霉等。

2.2 半纤维素酶

半纤维素酶是降解半纤维素(包括各种戊聚糖和己聚糖)的一类酶的总称,主要包括木聚糖酶、 β -葡聚糖酶、甘露聚糖酶和半乳聚糖酶等。这些酶通过降解畜禽消化道内的纤维多糖,降低食糜黏性,促进营养物质的消化吸收,减少畜禽下痢,从而促进畜禽生长和提高饲料转化率。目前半纤维素酶主要由各种曲霉和木霉发酵产生,如米曲霉、黑曲霉、长柄木霉等。

2.3 果胶酶

果胶酶是分解果胶的酶,也是一个多酶体系,通常包括原果胶酶、果胶酯酶和果胶酸酶。这3种酶的联合作用使果胶质得以完全分解。天然的果胶质在原果胶酶的作用下,被转化成水溶性果胶。果胶被果胶酯酶水解催化去除甲酯基团,生成果胶酸和甲醇。果胶酸酶能够切断果胶酸中的 α -1,4糖苷键,生成游离的半乳糖醛酸^[3]。工业生产果胶酶的菌种主要是霉菌,如黑曲霉、米曲霉、苹果青霉等。

3 NSP 酶活性的测定方法

3.1 还原糖法

原理是NSP酶水解相应底物产生还原糖,与显色剂反应后,利用分光光度计比色测定还原糖含量,计算酶活。一定条件下,以1 min水解相应的NSP底物产生1 μ mol还原糖所需的酶量为一个酶活单位。根据显色剂的不同,还原糖法又可分为3种。

① DNS法。水解NSP产生的还原糖与3,5-二硝基水杨酸(DNS)反应生成棕红色物质,在500-540 nm处比色测定还原糖含量,计算酶活。该方法简单方便、显色稳定,尽管有一定干扰和误差,目前仍是众多实验室和饲料企业应用最多的测定方法。

② 砷钼酸盐法。酶解NSP产生的还原糖与碱性 Cu^{2+} 反应生成氧化亚铜,在浓硫酸存在下,氧化亚铜将砷钼酸盐还原成蓝色化合物,通过比色测定还原糖含量,计算酶活。该法干扰少,灵敏度和重现性较高,但测定中要使用有毒的砷酸二氢钠,且操作较复杂,使用较少。

③ 地衣酚法。NSP酶降解底物产生的还原糖与地

衣酚反应显色呈绿色,比色测定还原糖的生成量来表示酶活。此法稳定性好、准确度高,但过程较为复杂。

3.2 黏度法

原理是NSP经多糖酶降解后,其黏度降低,通过黏度计测定流速的改变来计算酶活。该法灵敏度较高,较适宜于饲料酶制剂活性的测定,但重现性差,操作复杂费时,同时还需换算成国际酶活单位,应用难于普及。

3.3 琼脂扩散法

原理是将NSP底物与琼脂混融制成琼脂平板,将酶样点于琼脂板上的小孔中,培养一定时间,选用能与底物发生显色反应的显色剂染色,显示出染色背景区和无色透明的水解区,水解区直径与酶量的对数呈正相关,利用水解区直径大小计算酶活。此法灵敏度高,测定所需样品量小,无需特殊设备,是目前唯一可针对配合饲料终产品进行酶活测定的方法。但因能与刚果红显色的多糖很有限,使该法的使用范围受到限制。

3.4 色原底物法

此法是20世纪80年代测定酶活的新型方法,其原理是人工合成的含色原基团的底物在酶的作用下释放出有色物质,利用分光光度计比色测定有色物质的含量计算酶活。该法操作简单、重现性好,灵敏度高于还原糖法和黏度法。但酶作用于合成底物与作用于天然底物的效果有一定区别,用合成底物测定的酶活并不能代表酶制剂在应用于天然饲料时所能发挥的酶活大小。

4 NSP 酶在饲料畜牧业中的应用

4.1 NSP 酶在单胃动物中的应用

Annison和Choct(1993)报道,添加木聚糖酶和 β -葡聚糖酶使低代谢能小麦和正常小麦型肉鸡饲料中的干物质消化率提高17%和2.31%;表观代谢能(AME)值提高24%和2.13%^[4]。王修启等(2002)在两种小麦(戊聚糖含量分别为6.25%和7.23%)中添加0.12%木聚糖酶使饲料AME值分别提高7.07%和6.53%;有机物消化率分别提高6.07%和7.23%。且试验结果还表明,对戊聚糖含量高的小麦添加木聚糖酶具有更佳的改善效果^[5]。Brenes等(1993)的研究表明,小麦基础饲料中添加以木聚糖酶和 β -葡聚糖酶为主的复合酶制剂可使肉鸡增重提高32.8%、饲料转化率提高7%;肉鸡采食小麦加酶饲料与采食玉米饲料相比,肉鸡的生长性能和饲料转化率与玉米的相同,甚

至超过玉米饲料的⁶⁾。许梓荣(1998)在30%高麦麸的肉鸡饲料中添加含木聚糖酶的复合酶制剂,使肉鸡空肠内容物黏度下降17.1%、粪中大肠杆菌数下降61.2%。众多试验结果表明,加入以木聚糖酶、 β -葡聚糖酶为主的NSP酶制剂可提高大麦、燕麦、小麦等饲料的表观代谢能及饲料转化率,降低畜禽肠道内容物的黏度,抑制肠道有害微生物的增殖,促进畜禽生长。

在以麦类为基础的家禽日粮中添加NSP酶的应用效果较为一致,但在猪日粮中的应用效果却很不一致。Dreschel等(1999)报道,在大麦型仔猪日粮中添加以木聚糖酶和 β -葡聚糖酶为主的复合酶制剂,使仔猪盲肠粗纤维消化率由7%提高到57%,表观代谢能增加了0.5 MJ/kg。汪傲(1997)报道,小麦日粮中添加木聚糖酶,能显著提高肉仔鸡粗蛋白和淀粉的消化利用率。但也有研究表明,在以燕麦为基础的育成猪日粮中添加木聚糖酶不仅没有效果,小肠内食糜的黏度反而增加(Thacker等,1992)。此外,Thacker(1992)还研究了NSP酶制剂(主要为 β -葡聚糖酶和木聚糖酶)和盐霉素的互作效应,当盐霉素和NSP酶制剂各自单独添加到生长猪的大麦日粮中时,对饲料干物质、能量、粗蛋白消化利用率没有影响,但两者结合使用则显著提高了粗蛋白的利用率⁷⁾。

4.2 NSP酶在反刍动物中的应用

Hristov等(1998)在对外源多糖降解酶的研究中发现,羧甲基纤维素酶、木聚糖酶、 β -葡聚糖酶可以通过反刍动物前胃并在小肠中影响营养物质的利用,十二指肠消化液中木聚糖酶酶活比对照组高出近30倍⁸⁾。Antunovic等(1999)在研究复合酶制剂对羔羊育肥使用效果的试验中发现,在以小麦、燕麦、玉米为主的饲料中添加以木聚糖酶、纤维素酶为主的NSP酶制剂,饲料转化率提高5.6%、日增重提高8.83%,并且表现出良好的屠宰指数。Lewis等(1999)报道,纤维水解酶(主要为纤维素酶和木聚糖酶)按一定比例添加于饲料中能够提高泌乳早期和泌乳中期奶牛的泌乳量⁹⁾。在添加外源多糖降解酶(EDPE)的试验中,对饲以大麦日粮的8头母牛进行观察发现,酶处理显著降低了瘤胃pH值,增加了氨态氮的浓度。同时EDPE显著增加了瘤胃液中甲基纤维素酶和木聚糖酶的酶活,降低了瘤胃消化液的黏稠度,但不影响瘤胃液中淀粉酶的酶活(Hristov等,2000)。

5 影响NSP酶在饲料中应用的因素

5.1 饲料组成

酶制剂具有高度专一性和特异性,饲料不同,酶作用的底物就不同。玉米含量高的日粮中使用NSP酶制剂,对其营养价值改善效果不大,而对以小麦、大麦等麦类基础日粮,添加NSP酶制剂则可以提高饲料利用率,促进动物生长。因此要充分发挥酶制剂的作用,就应根据日粮配制情况选择相应的酶制剂。

5.2 动物的种类和年龄

一般来说,消化功能越简单的动物,酶制剂的应用效果越明显。家禽消化道较短,肠道后段的微生物较少,饲料中添加NSP酶制剂的应用效果较好。成年反刍动物由于其瘤胃微生物的作用,添加酶制剂效果不明显,但在幼年反刍动物并以青贮料为主的日粮中添加纤维素酶和淀粉酶可获得满意的效果。总之,NSP酶制剂用于单胃动物的效果要优于反刍动物;用于幼龄动物的应用效果要好于成年动物。

5.3 酶制剂的使用方法

酶制剂的使用方法可分为干喂、湿喂和预处理。干喂即在饲料混合或制粒时加入酶,酶在肠道中受到液体和温度激活而发挥作用,但酶制剂的作用效果要受到加工制粒的高温和动物消化道内环境的影响;湿喂是饲喂之前在饲料中加入酶,酶在体外有充足的时间、水分和丰富的底物供其发挥作用,避免干喂的不利因素,但比较费工时;预处理即用酶对配合饲料原料进行预处理,可产生良好的效果,饲料厂家往饲料中添加酶时,通常选择干燥颗粒的酶预混料,因此,酶预混料颗粒的大小、混合均匀度也是影响饲料中酶活性的主要因素¹⁰⁾。

5.4 饲料的加工工艺

饲料在生产过程中,由于粉碎、预混、制粒以及其它添加剂的影响,都可能使酶制剂的活性受损甚至变性,因此使用酶制剂应尽可能减少生产工艺对酶活的影响。酶是蛋白质,除了极个别酶可以在90℃左右的高温保持结构和功效的稳定,绝大多数不具有耐受70℃以上高温的性质。没有经过特殊稳定性处理的酶制剂很难经受住制粒工艺的影响而仍维持较高的酶活,更不能适应膨化工艺。对于必须制粒或膨化的饲料,宜采用后喷涂工艺技术将饲用酶(液态)均匀添加到配合饲料中。

6 NSP酶制剂存在的问题

6.1 耐热稳定性

在颗粒饲料热处理加工过程中,酶制剂的热稳定性是饲料生产厂家最为关心的。国外对当前几种主要酶制剂产品的研究表明,进口酶制剂在 80~85 °C 下处理 15 min, 相对酶活一般在 40%~60% 之间。Inbarr (1994) 报道, β -葡聚糖酶在 75 °C 时调质 30 s, 其酶活仅为处理前的 64%, 再经 90 °C 的制粒, 其酶活仅为处理前的 29%。因此, 耐热稳定性是酶制剂生产应用中的一大难题。据有关资料显示, 在粉料中, 低温制粒或制粒后喷涂酶制剂的使用效果较好。

6.2 酶活的统一标准

酶活的准确测定是酶制剂和饲料产品质量监测控制的依据, 也是根据饲料中 NSP 含量和组成合理调整添加酶的种类与剂量的依据。同时, 统一的酶活性测定方法有利于信息共享, 便于不同来源的同类酶制剂产品间的比较, 从而推动酶制剂的应用与研究。目前所采用的分析方法不统一, 结果可比性差。因此, 建立适用于酶制剂产品中各种酶活测定的统一方法, 或确定各种测定方法间的可比性关系亟待解决^[1]。

6.3 酶制剂产品质量不稳定

国内饲用酶制剂的生产大多采用固体发酵法, 由于固体发酵生产工艺存在的一些缺陷目前无法克服, 造成产品质量不如液体发酵生产的稳定, 在生产中有时带入杂菌, 给酶制剂的应用带来一些不利因素。

6.4 酶制剂的配伍问题

目前, 饲用酶制剂除植酸酶外, 通常为复合酶, 其中各种酶的种类和比例与饲料的组成有关。不同饲料含抗营养因子的种类和比例不同以及动物的不同种类和不同生长阶段, 这些因素在酶制剂的使用过程中都应考虑。因此, 饲用复合酶制剂中各种酶的配比既与饲料化学成分的性质有关, 也与动物消化系统的生理特点有关, 如将来源于真菌和细菌的酶制剂混合使用, 可以扩大酶制剂对肉鸡消化道内 pH 值的适应范围(郑卓夫译, 1990)。因此, 当前急需解决的问题是研制出准确、高效的降解细胞壁多糖的 NSP 酶制剂的酶谱, 开发适合各种日粮组合的新型酶制剂产品。

7 结语

随着畜牧业的进一步发展, 我国饲料资源特别是玉米等能量饲料的短缺现象日趋严重。据预测, 2000~2020 年我国能量饲料供给量的缺口将达 0.24~0.83 亿吨。因此, 必须结合实际, 充分有效地开发和利用我国丰富的麦类谷物和麸糠等资源, 其中最关键的问题是

饲料中抗营养因子的消除, 而 NSP 酶的添加使用是最方便有效的消除抗营养因子手段, 对于开发我国谷物、糠麸类的巨大资源具有十分可观的潜在价值。因此, 随着生物工程技术的不断发展, 可以从几个方面来扩大酶的生产和应用: ①可以通过对以木聚糖酶、 β -葡聚糖酶为主的 NSP 酶制剂在各种动物的不同时期饲喂不同日粮时作用模式的研究, 确定酶的最佳用量和最佳酶活环境; ②可通过筛选或诱变产生高产菌株, 并可以利用基因工程以及生产工艺的改进, 来高效地生产酶活高、适应性强的酶制剂; ③可以开发利用廉价原料或废物生产多糖降解酶, 降低生产成本, 并可变废为宝; ④运用蛋白质工程技术增强酶制剂的抗逆性。总之, NSP 酶制剂作为一类高效、无毒副作用和环保型的绿色饲料添加剂必将在未来的畜牧业发展中, 发挥其所具有的巨大潜力和作用。

参考文献

- 1 刘强, 冯学琴. 非淀粉多糖酶制剂的研究与应用进展[J]. 动物营养学报, 1999, 11(2): 6~11
- 2 刘强. 我国麦类饲料中非淀粉多糖抗营养作用机理的研究[D]. 博士学位论文, 1998
- 3 方希修, 谢献胜, 岳常彦. 饲料添加剂与分析检测技术[M]. 中国农业大学出版社, 2006
- 4 Annison G, M Choct. Anti-nutritive activities of cereal non-starch polysaccharides in broiler diets and strategies minimizing their effects[J]. World's Poultry Science Journal, 1993, 47:232~242
- 5 王修启, 李春喜, 林东康, 等. 小麦戊聚糖含量及添加木聚糖酶对鸡表现代谢能值和养分消化率的影响[J]. 华北农学报, 2002, 17(4): 104~107
- 6 Brenes A, M. Smith, W. Guenter, et al. Effect of enzyme supplementation on the performance and digestive tract size of broiler chickens fed wheat-and barley-based diets[J]. Point. Sci., 1993, 72:1 731~1 739
- 7 Thacker P A, G. L. Campbell, J. Groot, et al. The effect of enzyme supplementation on the nutritive value of rye-based diets for swine [J]. Can. J. Anim. Sci., 1992, 71:489~496
- 8 Hristov A N, McAllister T A, Cheng K J. Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility [J]. J. Anim. Sci., 1998, 76:3 146~3 156
- 9 Lewis G E, Sanchez W K, Hunt C W, et al. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows [J]. J Dairy Sci., 1999, 82: 611~617
- 10 贺普霄, 贺克勇. 饲料与绿色食品[M]. 中国轻工业出版社, 2004

(编辑:高 雁, snowyan78@tom.com)

葡萄糖氧化酶产生菌的快速筛选及其产酶条件的研究

郭晓贤 刘峰

摘要 通过平板快速筛选方法从土壤样品中分离得到一株产葡萄糖氧化酶菌株,此菌株属于产胞内酶的黑曲霉。采用文献报道的相关工艺测得其初始酶活为 0.86 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。经过培养基配方的优化试验及摇床发酵工艺的调整,其摇床发酵的产酶率有了较大的提高,发酵液过滤液酶活达到 9.91 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。

关键词 葡萄糖氧化酶;发酵;筛选

中图分类号 Q554

葡萄糖氧化酶 (EC.1.1.3.4 β -D-葡萄糖氧化还原酶,简称 GOD)能专一地催化 β -D-葡萄糖与氧发生氧化反应,氧化后生成 D-葡糖酸内酯,并释放出过氧化氢,自动地继续同水反应形成葡糖酸,其反应式如下:



目前,GOD的生产条件一般都采用黑曲霉和青霉菌株作为生产菌。自从20世纪50年代起葡萄糖氧化酶体系已经被安全有效地应用于食品和饮料工业上,通常是用来提高保藏期和保持风味稳定性。与其它化学抗氧化剂相比,葡萄糖氧化酶是一种天然产物。作为一种催化剂它能提供连续的保护,因为它不会在反应中被破坏。葡萄糖氧化酶在仪器工业上有广泛的用途,主要有去葡萄糖、脱氧、杀菌、测定葡萄糖含量等作用。葡萄糖氧化酶具有改善面团强度和弹性,提高面包质量的作用,它与其它酶制剂和VC之间具有协同效应,用于烘焙面包,能获得理想的烘焙效果,同时葡萄糖氧化酶凭其天然的优良特性,可作为一个较为理想的溴酸钾取代物。我国是一个面粉生产大国,因此葡萄糖氧化酶具有广阔的应用前景。

1 材料与方法

1.1 培养基

1.1.1 平板分离培养基

底层培养基:葡萄糖 80 g/l、蛋白胨 3 g/l、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

0.388 g/l、 KH_2PO_4 0.188 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.156 g/l、 CaCO_3 3.5 g/l、琼脂 20 g/l,自然 pH 值。

上层培养基:葡萄糖 80 g/l、可溶性淀粉 10 g/l、KI 1.7 g/l、去氧胆酸钠 0.2 g/l、磷酸缓冲液 0.1 mol/l、琼脂 20 g/l,pH 值 5.6。

1.1.2 种子培养基

NaNO_3 2 g/l、 K_2HPO_4 1 g/l、KCl 0.5 g/l、 MgSO_4 0.01 g/l、蔗糖 30 g/l、琼脂 20 g/l,自然 pH 值。

1.1.3 发酵培养基

葡萄糖 80 g/l、蛋白胨 3 g/l、 KH_2PO_4 2 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7 g/l、KCl 0.5 g/l、 NaNO_3 4 g/l,自然 pH 值。

1.2 培养条件

斜面培养:30 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 3 d 后置于 5 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

摇床培养:30 $^\circ\text{C}$ 恒温摇床培养 6 d,摇床转速为 200 r/min。

1.3 菌株筛选与诱变

1.3.1 初筛

根据 Fiedure K. J. 显色法,称取 10 g 采集来的土样于灭菌处理的装有 100 ml 生理盐水且含有玻璃珠的 250 ml 锥形瓶中振荡 30 min。然后用无菌水稀释成 10^{-4} 、 10^{-5} 两个稀释度,分别用灭菌的移液管吸取 0.1 ml 涂布于预先配制并且灭菌的分离培养基中,在 28 $^\circ\text{C}$ 下培养 3 d 后置于 5 $^\circ\text{C}$ 冰箱中静置 2 d,然后在室温下存放至出现蓝色颜色圈。选取颜色圈中的菌株接种到斜面上培养。

1.3.2 复筛

将初筛得到的斜面转接于摇瓶中继续培养 6 d,测定发酵液的酶活。

1.3.3 诱变

郭晓贤,福建师范大学生命科学学院,350108,福建师范大学闽侯新校区生活区 A8-215。

刘峰,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-01-15

用 0.85%的生理盐水洗下斜面上的孢子,使每毫升溶液含 10^6 个孢子,然后取 0.5 ml 的孢子悬浮液,加入现配的 0.05 mol/l NaNO_2 溶液 0.5 ml,充分摇匀后使终浓度为 0.025 mol/l。在 27 °C 保温 10 min 后加入 9 ml 浓度为 0.07 mol/l、pH 值为 8.6 的 Na_2HPO_4 溶液中中止反应。稀释涂平板后置于 30 °C 培养箱内培养,一定时间后选取可疑菌株接到斜面进行培养,再经摇床发酵培养后进行酶活测定。

1.4 酶活的测定方法

取 250 ml 三角瓶,加入 2% 葡萄糖磷酸缓冲液 (pH 值 5.6) 25 ml 及 1 ml 酶液,立即于 29 °C 下振荡 1 h,然后加入 0.1 mol/l NaOH 溶液 20 ml 以终止反应,用 0.1 mol/l 盐酸滴定剩余的 NaOH ,记录所消耗的盐酸毫升数 A; 对照样在加酶液之前加入 0.1 mol/l NaOH 溶液 20 ml,不必振荡,其它操作相同,记录所消耗的盐酸毫升数 B。

酶活单位表示方法:在上述试验条件下,每分钟催化氧化 1 μmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活单位 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)。

计算式为: $\text{GOD 酶活} = [(B - A) \times f \times N \times 1000] / 60$ 。

式中: N —— 盐酸浓度 (0.1 mol/l);

f —— 稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 筛选结果

经过对在不同地点取得的 40 个土样进行初筛和复筛得到几株具有 GOD 活性的菌株,其酶活如表 1 所示。挑选酶活最高的一株命名为 GD-GD,经过镜检观察其形态,发现它是一株霉菌,其孢子颜色为黑色,菌丝有隔,断定其为黑曲霉,测得其酶活为 0.86 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。用冷冻法将筛选得到的菌株保藏起来,并以这个菌种进行后面的试验。

表 1 从土样中分离菌株的酶活 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

菌株	GD-1	GD-2	GD-3	GD-4	GD-5	GD-6	GD-7
酶活	0.42	0.26	0.22	0.34	0.40	0.36	0.86

2.2 摇瓶工艺研究

2.2.1 培养基配方试验

2.2.1.1 碳源试验

在发酵培养基中使用浓度为 8% 的不同种类碳源,培养基中其它成分与含量均保持不变。在 30 °C 下培养 6 d。测定发酵过滤液的酶活,其结果见图 1。

从图 1 可以看出,该菌对不同的碳源具有不同的选择性。使用葡萄糖为碳源时其发酵液的酶活达到

0.86 $\mu\text{mol}/\text{min}$,由此判断葡萄糖是该菌的最佳碳源。

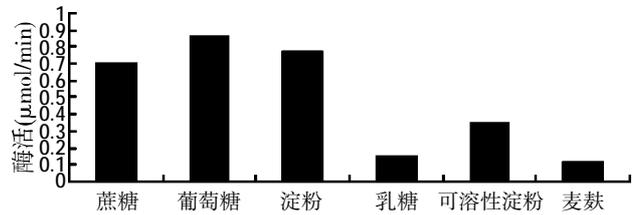


图 1 不同碳源对酶活的影响

2.2.1.2 碳源浓度试验

在碳源试验结束后,选用葡萄糖作为其碳源,分别用 4%、6%、8%、10%、12%、14% 的碳源浓度进行摇床发酵培养,培养条件同碳源试验。测定其发酵过滤液的酶活,结果见图 2。

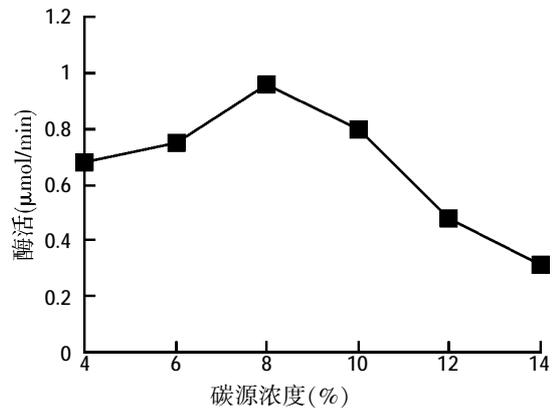


图 2 碳源浓度对酶活的影响

从图 2 可见,以葡萄糖作为碳源时的最佳浓度为 8% 时,发酵过滤液的酶活最高,为 0.96 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。因此,最佳的碳源浓度为 8%。

2.2.1.3 氮源试验

以 8% 的葡萄糖为碳源,改变摇床发酵培养基中的氮源种类,其浓度仍为 0.7%。同样的培养条件下培养 6 d。测定发酵液的酶活,结果见图 3。

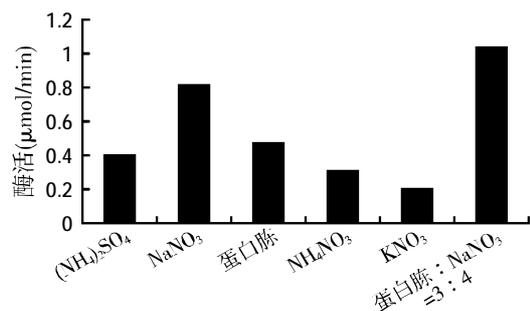


图 3 不同氮源对酶活的影响

试验结果表明,当蛋白胨与 NaNO_3 以 3 : 4 的比例混合能达到较好的产酶效果,其发酵液的酶活可达到 $1.03 \mu\text{mol}/\text{min}$ 。

2.2.1.4 正交试验

由前面的试验可见,把 NaNO_3 与蛋白胨视为一个因子,发酵培养基中的其它组成成分分别作为一个因子。设计一个 5 因子 3 水平的正交试验。选用 $L_{18}(3^5)$ 正交表。试验中各因子与水平排列如表 2 所示,试验中各因子与水平的设计以及试验结果见表 3。

根据正交试验的结果,该菌株产酶的最佳培养基配方组合见图 4。

表 2 不同因素水平设计(g/l)

因素	水平		
	1	2	3
NaNO_3 +蛋白胨	2+1	4+3	6+5
葡萄糖	80	100	120
KH_2PO_4	1	2	3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	0.7	0.9
KCl	0.3	0.5	0.7

表 3 正交试验结果

项目	NaNO_3 +蛋白胨(g/l)	葡萄糖(g/l)	KH_2PO_4 (g/l)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/l)	KCl(g/l)	酶活($\mu\text{mol}/\text{min}$)
1	2+1	80	1	0.5	0.3	1.865 638
2	2+1	100	2	0.7	0.5	1.989 3
3	2+1	120	3	0.9	0.7	1.948 079
4	4+3	80	1	0.7	0.5	0.892 83
5	4+3	100	2	0.9	0.7	1.109 63
6	4+3	120	3	0.5	0.3	0.319 07
7	6+5	80	2	0.5	0.7	2.154 183
8	6+5	100	3	0.7	0.3	1.183 83
9	6+5	120	1	0.7	0.5	1.989 3
10	2+1	80	3	0.9	0.5	1.288 546
11	2+1	100	1	0.5	0.7	0.752 67
12	2+1	120	2	0.7	0.3	0.876 34
13	4+3	80	2	0.9	0.3	1.741 975
14	4+3	100	3	0.5	0.5	1.082 442
15	4+3	120	1	0.7	0.7	0.431 15
16	6+5	80	3	0.7	0.7	1.412 208
17	6+5	100	1	0.9	0.3	1.208 244
18	6+5	120	2	0.5	0.5	1.107 174
K1	1.453	1.559	1.190	1.214	1.199	
K2	0.930	1.221	1.496	1.131	1.392	
K3	1.509	1.112	1.206	1.548	1.301	
R	0.579	0.447	0.306	0.417	0.193	

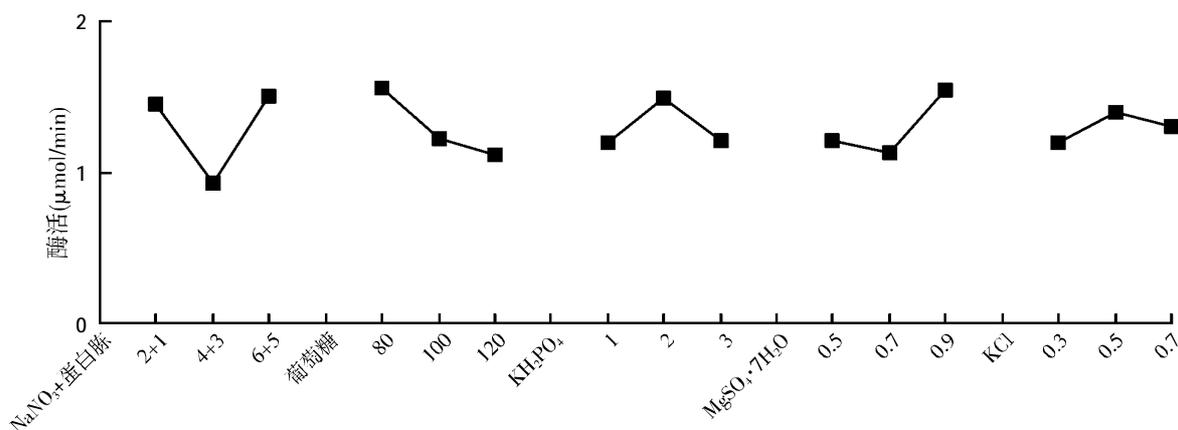
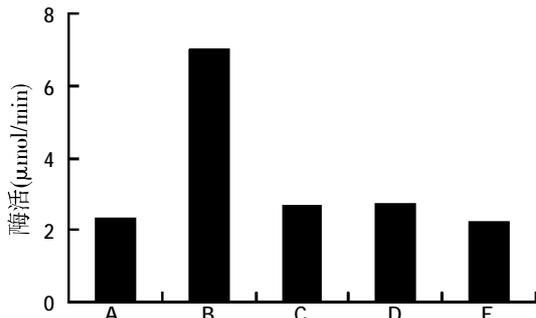


图 4 正交试验结果

由正交试验结果可知,最佳发酵培养基组成为: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9 g、KCl 0.5 g、葡萄糖 80 g、蛋白胨 5 g、 NaNO_3 6 g、 KH_2PO_4 2 g、

2.2.2 发酵液的后处理(见图 5)

用上述的最佳培养基培养,培养条件不变,最后对发酵液编号分别做不同的后处理。由试验结果可以看出,经过超声波处理后酶活有大幅度的提高,而静置处理与 5℃放置都对酶活影响不大。说明此菌产生的是胞内酶。经过超声波破壁后胞内酶释放出来后,酶活就提高了。在下一步骤测定酶活的试验之前先把发酵液用超声波处理 30 min。



注:A. 室温放置 30 min; B. 超声波处理 30 min; C. 5℃放置 30 min; D. 5℃放置 30 min 后用超声波处理 30 min; E. 不做后处理

图 5 后处理发酵液酶活

2.2.3 不同发酵条件对产酶的影响

2.2.3.1 产酶进程试验

用上述的培养基进行摇床培养 6 d, 分别测定发酵液的酶活, 结果见图 6。

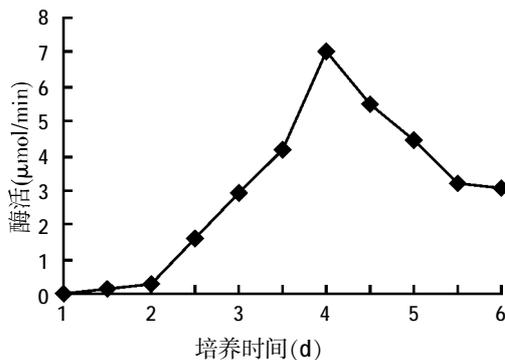


图 6 产酶时间对产酶的影响

由图 6 可见, 最佳培养时间为 4 d, 酶活可达 7.04 μmol/min。

2.2.3.2 培养基初始 pH 值对产酶的影响

用 HCl 和 NaOH 调节灭菌前培养基的初始 pH 值, 进行摇床发酵, 分别测定发酵液的酶活, 结果见图 7。

从图 7 可以看出, 培养基的初始 pH 值对该菌产酶是一个重要的影响因素, 其产酶最适的初始 pH 值为 5, 酶活可以达到 7.52 μmol/min。

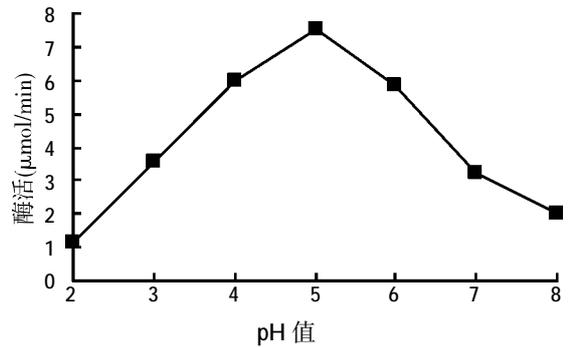


图 7 培养基初始 pH 值对产酶的影响

2.2.3.3 装料量对产酶的影响

在 250 ml 的三角瓶中分别测定不同的装料量对产酶的影响, 试验结果见图 8。

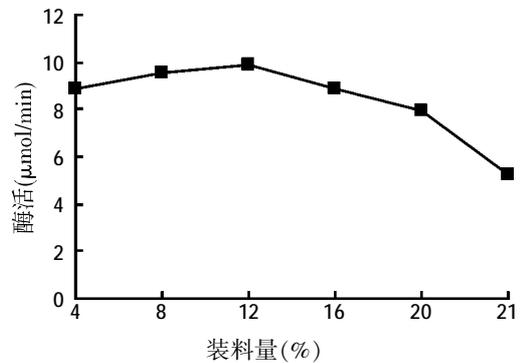


图 8 装料量对产酶的影响

从图 8 中可以看出, 对于 250 ml 的三角瓶, 12% 的装料量最有利于该菌产酶。

经过上述的优化过程后, 该菌的产酶能力得到了大幅度的提高, 从原来的 0.86 μmol/min 提高到现在的 9.91 μmol/min。

3 菌种诱变

取一支试管斜面, 按前述的方法进行亚硝酸钠诱变, 筛选后接种于摇瓶进行培养, 测定发酵液的酶活。诱变后几个可疑菌株的发酵液酶活见表 4。

表 4 诱变后菌株的酶活 (μmol/min)

菌株	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5
酶活	5.84	6.63	7.00	0.28	7.18

此次的诱变没有得到较好的结果, 可能是因为筛选的数量比较小。若加大筛选的量可能会取得较好的结果。

(编辑: 高 雁, snowyan78@tom.com)

谷胱甘肽对凡纳滨对虾生长、存活和饵料系数的影响

刘晓华 曹俊明 朱选 周盟 蓝汉冰 马力 艾春汉 刘汉生

摘要 试验以(0.79±0.019) g左右的凡纳滨对虾为试验对象,在其纯化日粮中分别添加0、100、150、200、250、300、350、400 mg/kg的还原型谷胱甘肽,放养在室外大棚水族箱(内径80.0 cm、水深55.0 cm)中进行8周的饲养试验,观察谷胱甘肽(GSH)对凡纳滨对虾生长、存活率及饵料系数的影响。结果表明,在日粮中添加200 mg/kg的GSH,凡纳滨对虾的生长效果最好。

关键词 凡纳滨对虾;谷胱甘肽;饵料系数;存活率

中图分类号 S945.4*6

谷胱甘肽(GSH)是由γ-谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸组成的生物活性肽。还原型谷胱甘肽有许多生理功能,如增加蛋白质和核酸的合成,增加氧气和营养物质的运输,增强机体免疫力,影响激素分泌,提高酶的活力,保护肝脏细胞,参与三羧酸循环和糖代谢,清除体内过多的自由基,解毒、降血脂、抗菌、抗病毒、预防糖尿病和癌症等。

GSH作为药物已应用于医学及食品工业等行业中,在动物中的应用尚处于起步阶段,如它能提高公畜冷冻精液的品质(Saweta等,1987;Brezinska等,1995),缓解黄曲霉毒素B₁对雏鸡的毒性(刘珊玫等,1995),缓解水产动物因一些毒素引起的中毒症状(张甬元,1996),提高动物的泌乳量(Pocius,1981;Atroschi,1982)。另外,GSH还对动物肠粘膜具有保护作用,能调节免疫系统,促进DNA、蛋白质的合成,促进细胞的生长与增殖等功能,添加到饲料中可被完整吸收。最新研究表明,GSH能通过调节仔猪和黄羽肉鸡的生长轴,从而促进它们的生长,并且能调节仔猪、黄羽肉鸡、罗非鱼的抗应激能力。

本试验研究在饵料中添加不同浓度的GSH饲喂凡纳滨对虾,探讨其对凡纳滨对虾生长性能的影响,为GSH在水产养殖中的应用提供参考。

1 材料和方法

刘晓华,武汉市农科院畜牧兽医科学研究所,高级畜牧师,430065,武汉市武昌张家湾。

曹俊明、朱选、周盟、蓝汉冰、马力,广东省农科院畜牧研究所。

艾春汉、刘汉生,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-02-25

★ 广东省自然科学基金资助(编号为05006223)

1.1 试验设计和饵料组成

用酪蛋白、明胶为蛋白源,玉米淀粉为糖源,鱼油和豆油为脂肪源配制纯化日粮,辅以矿物质和多维预混料,配制成基础日粮,基础日粮配方及营养水平见表1。设计8个处理组,GSH浓度分别为0、100、150、200、250、300、350、400 mg/kg(试验1~8组),试验1组为对照组,每个处理组设3个重复,每个重复放养30尾凡纳滨对虾。

表1 基础日粮配方及营养水平(%)

原料	含量	营养成分(实测值)	含量
酪蛋白	36.0	粗蛋白	36.51
明胶	9.0	粗脂肪	7.87
玉米淀粉	25.0	灰分	8.67
鱼油	7.0	水分	11.22
大豆磷脂(50%)	1.5		
胆固醇	0.5		
复合矿预混料	12.0		
多维预混料	6.4		
α-纤维素	2.6		

注:1.复合矿预混料为每千克预混料提供MgSO₄·7H₂O 102.45 g、KI 0.08 g、ZnSO₄·7H₂O 4.05 g、MnSO₄·5H₂O 2.19 g、CoCl₂·6H₂O 0.5 g、FeSO₄·7H₂O 16.55 g、Na₂SeO₄ 0.004 g、CaH₂PO₄·2H₂O 251.67 g、KCl 17.51 g、载体(沸石粉) 605.00 g;

2.多维预混料为每千克预混料提供VA 12 500 000 IU、VD 80 000 IU、VE 3.145 g、VK₃ 0.315 g、VB₁ 0.94 g、VB₂ 0.94 g、VB₆ 1.85 g、VB₁₂ 3.1 mg、烟酸 4.68 g、泛酸 2.34 g、叶酸 0.32 g、生物素 31.2 g、肌醇 4.69 g、VC 15.6 g,不足部分用沸石粉作为载体补充至1 000 g。

所有原料经粉碎后过60目筛,多维和复合矿预混料用载体多级稀释混匀备用,基础日粮经充分混匀后,分成8份,分别添加不同浓度的GSH,混匀,用膨化机挤压成形,50~60℃烘干,冷却后密封于样品袋里,放在-20℃冰箱保存,备用。

1.2 试验虾苗

本试验于5月27日至7月24日在广东省农科

院畜牧所水产研究室试验基地进行。挑选活泼、体质健壮、体重接近(0.79±0.019) g 的凡纳滨对虾,随机分成 8 组,每组 3 个重复,共计 24 个缸。

1.3 饲养管理

采用饱食投喂,投喂频率为每天 3 次,时间分别为 8:30、14:30、20:30,每周根据对虾生长和死亡情况,调节投喂量。试验全过程不间断充气增氧,保证循环系统流量 0.4~0.6 l/min,自然光照。饲养期间水质条件为:水温 25~30 ℃、溶解氧浓度(7.25±0.56) mg/l、氨氮浓度(0.17±0.06) mg/l、亚硝酸氮浓度(0.018±0.008) mg/l、pH 值 7.95±0.04、海水盐度 5‰~8‰。试验进行 8 周,试验结束前 24 h 停止投喂。

1.4 指标的测定

试验结束后,称重,计数。分别计算增重率、饵料系数、存活率、蛋白质效率、日摄食量和肝体比。

增重率(%)=(终末体重-初始体重)/初始体重;

存活率(%)=试验结束时虾尾数/试验开始时放虾尾数;

饵料系数(FCR)=摄食量/(终末体重-初始体重);

蛋白质效率(%)=(终末体重-初始体重)/(饲料摄入量×蛋白质含量);

日摄食率(%)=2×摄食量/[总天数×(起始重+终末重)];

肝体比=肝胰腺重/体重。

1.5 试验数据的统计分析

采用 SPSS 12.0 版软件统计分析,先作单因子方差分析(ANOVA),处理间若有显著差异,再作邓肯氏多重比较,P<0.05 表示差异显著,P<0.01 表示差异极显著。

2 试验结果

2.1 谷胱甘肽对凡纳滨对虾生长的影响(见表 2)

表 2 摄食不同水平谷胱甘肽对凡纳滨对虾生长的影响

试验组	起始均重(g)	终末均重(g)	增重(g)	增重率(%)
1(对照组)	0.80±0.015	2.50±0.19	1.69±0.18 ^a	211.25±20.08 ^a
2	0.79±0.023	2.62±0.14	1.83±0.16 ^{ab}	231.64±26.01 ^{ab}
3	0.79±0.021	2.62±0.36	1.83±0.36 ^{ab}	231.64±43.00 ^{ab}
4	0.79±0.025	2.71±0.22	1.92±0.22 ^{ab}	243.04±31.29 ^{ab}
5	0.80±0.015	2.85±0.34	2.05±0.34 ^b	256.26±43.72 ^b
6	0.80±0.018	2.70±0.47	1.90±0.49 ^{ab}	237.50±68.66 ^{ab}
7	0.79±0.021	2.83±0.16	2.04±0.16 ^b	258.23±20.02 ^b
8	0.80±0.016	2.77±0.34	1.97±0.36 ^{ab}	246.25±51.90 ^{ab}

注:表中同列数据肩标含相同字母表示差异不显著(P>0.05);含不同字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。

由表 2 可以看出,谷胱甘肽能提高凡纳滨对虾的增重、增重率。与对照组相比,试验 2、3、4、5、6、7 和 8 组的增重率分别提高了 9.65%、9.65%、15.05%、21.31%、12.43%、22.24%和 16.57%,其中试验 5 组和试验 7 组与对照组相比,差异显著(P<0.05),其它各组有所提高,但没达到显著水平(P>0.05)。

2.2 谷胱甘肽对凡纳滨对虾饲料利用率的影响(见表 3)

表 3 摄食不同水平谷胱甘肽对凡纳滨对虾饲料利用率的影响

试验组	日摄食率(%)	饵料系数	蛋白质效率(%)
1(对照组)	2.67±0.02	2.21±0.056 ^a	1.26±0.012
2	2.76±0.01	2.13±0.059 ^{ab}	1.30±0.021
3	2.75±0.13	2.12±0.065 ^{ab}	1.31±0.011
4	2.74±0.09	2.11±0.021 ^{bc}	1.32±0.008
5	2.71±0.17	2.04±0.066 ^c	1.36±0.031
6	2.77±0.16	2.14±0.21 ^{ab}	1.30±0.031
7	2.68±0.02	2.12±0.051 ^{abc}	1.31±0.043
8	2.78±0.09	2.17±0.049 ^{ab}	1.28±0.011

由表 3 可见,GSH 提高了试验各组凡纳滨对虾的日摄食率,它们比对照组提高了 0.37%~4.12%;同时,GSH 降低了凡纳滨对虾的饵料系数,与对照组相比,试验 2、3、4、5、6、7 和 8 组分别降低了 3.62%、4.07%、4.52%、7.69%、3.17%、4.07%和 1.81%,其中试验 4、5 组的饵料系数显著低于对照组(P<0.05),试验 5 组饵料系数最低;GSH 还提高了试验各组凡纳滨对虾的蛋白质效率,可能是 GSH 通过提高蛋白质的利用效率而影响了饵料系数。

2.3 谷胱甘肽对凡纳滨对虾存活率和肝体比的影响(见表 4)

表 4 谷胱甘肽对凡纳滨对虾的存活率和肝体比的影响

试验组	存活率(%)	肝体比
1(对照组)	64.44±10.18 ^a	3.55±0.33 ^a
2	78.89±9.62 ^b	4.06±0.58 ^{abc}
3	73.33±6.67 ^{ab}	3.87±0.26 ^{ab}
4	77.78±7.70 ^b	3.89±0.10 ^{ab}
5	75.56±5.09 ^b	4.28±0.21 ^{bc}
6	73.33±8.82 ^{ab}	4.04±0.10 ^{abc}
7	64.44±1.93 ^a	4.01±0.06 ^{abc}
8	72.22±6.94 ^{ab}	4.45±0.40 ^c

从表 4 可以看出,试验 2、3、4、5、6 和 8 组凡纳滨对虾存活率分别比对照组提高了 22.42%、13.80%、20.70%、17.26%、13.80%和 12.07%,其中试验 2、4 和 5 组凡纳滨对虾的存活率显著高于对照组(P<0.05)。GSH 能够提高凡纳滨对虾肝体比,试验 5、8 组和对照组相比差异显著(P<0.05);试验 8 组和试验 3、4 组相比差异显著(P<0.05)。

3 讨论

3.1 GSH 对凡纳滨对虾生长的影响

从本试验的结果可见,GSH 能促进凡纳滨对虾生长,其中添加剂量在 250 或 350 mg/kg 时,促生长作用最佳。有研究报道,GSH 在动物肠腔(Aw,1994)和肠粘膜细胞(Kelly,1993)中起着保护肠粘膜免受毒物和过氧化物损伤的作用。肠腔 GSH 可跨小肠绒毛刷状缘被完整吸收(Hagen 等,1987;Vincenzini 等,1992);GSH 在小肠上皮细胞内将脂质过氧化物清除,发挥对脂肪酸氢过氧化物的脱毒作用(Aw,1992;Kowalski,1990);外源性 GSH 被小肠吸收后,可降低肠上皮细胞对脂质过氧化物的吸收,进一步保护着肠粘膜(Diane,1990)。还有研究发现,GSH 对激素分泌具有调节作用,对大鼠胰岛细胞的体外培养试验表明,外源性 GSH (0.01 mmol/l) 可促进葡萄糖介导的胰岛素分泌(Meister 等,1983)。所有这些是 GSH 在动物生产中应用的理论基础。

另外,最新研究表明,GSH 对断奶仔猪、黄羽肉鸡和罗非鱼的生长性能以及与生长有关的激素水平及相关基因的表达有明显的影 响(刘平祥,2002;吴觉文,2003;焦彩虹,2003);GSH 与罗非鱼内分泌激素之间也具有协同作用(焦彩虹,2003)。

本试验中 GSH 可能通过影响凡纳滨对虾内分泌激素的分泌而影响动物机体的生长,其具体的作用机理有待进一步探索和验证。

从本试验还可以发现,凡纳滨对虾的生长性能并不是随着 GSH 添加量的增加而增加,在适量范围内添加,增重作用明显;而高剂量的添加,增重的幅度反而有下降的趋势。

3.2 GSH 对凡纳滨对虾日摄食率、饵料系数和蛋白质效率的影响

Venturini 等(1987)研究发现,GSH 能提高水螅(Hydra)的摄食反应。水生生物的生长与摄食量关系很大,摄食量增加往往预示着生长速度的加快,本试验在对虾日粮中添加 GSH 均能提高日摄食率,试验各组的饵料系数和蛋白质效率均有所提高,说明 GSH 在提高摄食率的同时也提高了饲料的利用率,至于它们之间的因果关系有待于以后的试验进一步探讨和验证。

3.3 GSH 对凡纳滨对虾存活率和肝体比的影响

试验结果表明,饲料中添加 GSH 能明显提高凡纳滨对虾的存活率。分析其原因,可能与 GSH 在机体

内抗氧化作用有关,动物机体的抗氧化水平,从一定的程度上反映了机体的健康状况。氧自由基可攻击动物细胞膜上的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化反应,脂质过氧化物可引起细胞代谢及功能的障碍,甚至死亡。脂质过氧化物对鱼类有毒害作用,主要表现为死亡率升高、肝脏病变及贫血等(黄柏炎等,1999)。Rudneva 等(1997)研究发现,对于鱼类等低等动物,非酶类的抗氧化物质在机体的抗氧化过程中发挥的作用要大于其在高等动物中发挥的作用。焦彩虹(2003)的研究也表明,GSH 能提高罗非鱼的抗氧化水平,降低脂质过氧化物含量,从而提高罗非鱼存活率。所以,GSH 提高凡纳滨对虾存活率可能是通过提高其体内抗氧化水平而实现的,GSH 对凡纳滨对虾体内抗氧化水平的作用机制还需深入的研究。

本研究还发现,在凡纳滨对虾日粮中添加大剂量 GSH,与期望的效果并不一致,有资料表明,这可能与机体对 GSH 的吸收存在自我保护机制有关。当日粮含量适宜时,GSH 可通过转氨酶机制和直接跨膜转运至机体;当日粮含量较高时,GSH 特异转运载体达到饱和状态(吴觉明,2003)。另外,GSH 在清除氧自由基时发挥抗氧化作用,但也有研究表明,过多的 GSH 可与多种化合物(醛类、酮类、卤烯烃类)结合产生毒性代谢物,这些代谢物可与 DNA 共价结合产生氧自由基或引起肿瘤(Monks,1990)。Steven 等(1998)报道,GSH 本身也可以作为抗氧化物的前体,在较高浓度时产生毒性,该毒性最终表现为动物解毒器官——肝胰脏的增大,在本试验中表现为随着添加水平的增加,肝胰脏有增大的趋势。

4 结论

在凡纳滨对虾日粮中外源性添加适宜剂量的 GSH,能提高其生产性能、降低饵料系数、提高对虾存活率。综合考虑增重率、存活率、饵料系数和成本等因素,建议在日粮中添加剂量为 200 mg/kg。

(参考文献 32 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

中草药对鲤鱼非特异性免疫功能的影响

顾雪飞 陈玉春 刘敏

摘要 用添加刺五加、蒲公英、枸杞子、金银花和大蒜等单方中草药的配合饲料饲喂鲤鱼,在第15 d和第30 d测定其巨噬细胞对绵羊红细胞的吞噬能力、NBT阳性细胞数、免疫器官指数及血清中补体C3的活性等非特异性免疫指标。结果显示,15 d时,所有试验组巨噬细胞对绵羊红细胞的吞噬能力与对照组相比均有显著差异($P<0.05$),金银花组和大蒜组NBT阳性细胞数与对照组相比有显著差异($P<0.05$),所有试验组免疫器官指数和血清中补体C3的活性与对照组相比差异均不显著($P>0.05$);30 d时,所有试验组巨噬细胞对绵羊红细胞的吞噬能力和NBT阳性细胞数与对照组相比均有显著差异($P<0.05$),所有试验组免疫器官指数与对照组相比均差异不显著($P>0.05$),金银花组和大蒜组血清中补体C3的活性与对照组相比有显著差异($P<0.05$)。

关键词 鲤鱼;中草药;非特异性免疫

中图分类号 S965.116

随着现代集约化和规模化水产养殖业的发展,各种鱼病的发生已经成为一个非常突出的问题,而长期使用抗生素和其它化学药物防治水产动物病害容易引起水体污染和抗药性。人们在寻求其它解决途径时已经认识到中草药是一种天然的、无污染的物质,中草药中含有生物碱、多糖、皂甙、蒽类、挥发油和有机酸等,它们与动物免疫功能密切相关^[1]。中草药的许多种类都是很好的免疫增强剂,可以提高机体的免疫水平^[2]。本试验在基础饲料中添加中草药来饲喂鲤鱼,分析某些非特异性免疫指标,希望能为中草药作为免疫增强剂的开发和利用提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验药材

刺五加、蒲公英、枸杞子和金银花购自哈尔滨市某药店,经烘干、粉碎后备用;大蒜为市场购买的新鲜大蒜。

1.1.2 药饵的制备

称取干燥、粉碎后的刺五加30 g,置于沙锅中加入300 ml蒸馏水,煎煮3次,每次30 min,合并3次滤液添加到1 kg的鲤鱼全价配合饲料(国产鱼粉17%、豆粕47%、麸皮23%、面粉10%、食盐0.6%、磷酸二氢钙1.2%、预混料1.2%)中混匀,制成含3%刺五加的药饵,

烘干备用。蒲公英、枸杞子、金银花的药饵均按上述方法制备及添加。大蒜药饵则是将30 g新鲜大蒜捣成糜状直接添加到1 kg全价配合饲料中,混匀后备用。

1.1.3 试验动物饲养

试验用的1龄鲤鱼购自中国水产科学研究院黑龙江省水产研究所松浦实验站,平均体重(160 ± 15) g,暂养于室内玻璃水族箱中。以经过充分曝气的自来水作为水源,水温控制在(23 ± 1) °C,持续以曝气的形式进行充氧,日投喂量为鱼体重的1.5%,分3次投喂。经过14 d的适应训练后,将试验鱼按体重随机分为6组,5个试验组和1个对照组,每组12尾,每组2个重复,进行30 d的试验。

1.1.4 绵羊红细胞的制备

取绵羊全血(加肝素抗凝)以2 500 r/min离心5 min,弃上清液和中间白细胞层,取下层红细胞层加入20倍体积的生理盐水以2 500 r/min离心3 min,吸去上清液,得到的沉淀即为绵羊红细胞,于4 °C下保存备用。

1.1.5 氯化硝基四氮唑兰(NBT)应用液的制备

将NBT用无菌生理盐水配制成2 g/l的水溶液,室温下搅拌1 h使之完全溶解,过滤,滤液要呈透明的淡黄色,储存于棕色瓶中。试验前取NBT水溶液与等量的0.067 mol/l的磷酸盐缓冲液(PBS, pH值6.4)混合,即为NBT应用液。NBT应用液应现用现配。

1.2 试验方法

1.2.1 血清的制备和血细胞的收集

尾部静脉采血,一部分血直接装入Eppendorf管中制备血清,剩余的血用肝素钠抗凝,收集血细胞用以测定巨噬细胞对绵羊红细胞的吞噬能力和NBT阳性细胞数量。

顾雪飞,东北农业大学动物科学技术学院,150030,黑龙江省哈尔滨市。

陈玉春、刘敏(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-03-12

★ 黑龙江省教育厅科研项目(编号为10541022)

1.2.2 巨噬细胞对绵羊红细胞吞噬能力的测定

取 0.2 ml 抗凝血加入 0.1 ml 绵羊红细胞,摇匀,在 28 °C 水浴中孵育 45 min,每隔 10 min 摇动一次,用吸管吸取血细胞,涂片,甲醇固定 10 min,基姆萨染色 1 h,水洗风干后镜检,显微镜下观察计数 100 个巨噬细胞中吞噬绵羊红细胞的巨噬细胞数及所吞噬的绵羊红细胞总数,求出吞噬百分率(PP)及吞噬指数(PI)。

吞噬百分率(PP,%)=100 个巨噬细胞中参与吞噬的细胞数/100 个巨噬细胞;

吞噬指数(PI)=吞噬的绵羊红细胞总数/参与吞噬的巨噬细胞数。

1.2.3 NBT 阳性细胞的测定

取 0.2 ml 抗凝血和 2 g/l 的 NBT 应用液 0.2 ml 放入试管中混匀,37 °C 孵育 30 min,中间振摇一次,移至室温下放置 15 min,混匀,吸取 1 滴于载玻片的一端做推片,立即吹干,用 Giemsa-Wright 染色,自来水冲洗,自然干燥,油镜检测,细胞被染成浅黑色的为 NBT 阳性细胞。

1.2.4 免疫器官指数的测定

分别将采血后的鲤鱼头肾、中肾和脾分离,分离的脏器用 4 °C 的生理盐水冲洗干净后用吸水纸吸干水分,称重,并计算各免疫器官指数(各免疫器官重量与体重的比值)。

1.2.5 血清补体 C3 活性的测定

血清中补体 C3 活性采用上海荣盛生物技术有限公司的补体单体 C3 检测试剂盒进行测定。

1.2.6 数据分析

采用“SPSS 13.0 FOR WINDOWS”软件对数据进行统计学分析。先对试验数据进行单因素方差分析,若有显著差异,再作 LSD 多重比较,若 P<0.05,则表示有显著差异。

2 结果

2.1 采食中草药鲤鱼的巨噬细胞对绵羊红细胞吞噬能力的影响(见表 1)

表 1 采食中草药鲤鱼的巨噬细胞对绵羊红细胞吞噬能力的影响($\bar{X}\pm SE$)

组别	15 d		30 d	
	PP(%)	PI	PP(%)	PI
对照组	21.33±0.49 ^a	3.21±0.72 ^a	30.33±0.61 ^a	4.50±0.32 ^a
刺五加组	28.50±0.76 ^b	5.76±0.29 ^b	48.17±1.19 ^b	6.41±0.82 ^b
蒲公英组	27.83±1.58 ^b	5.53±0.61 ^b	51.00±0.68 ^b	6.88±0.42 ^b
枸杞子组	31.83±1.01 ^b	5.85±0.73 ^b	53.00±1.10 ^b	6.53±0.90 ^b
金银花组	30.67±0.76 ^b	5.28±0.56 ^b	50.00±0.93 ^b	6.74±0.76 ^b
大蒜组	31.00±1.06 ^b	5.69±0.44 ^b	51.01±1.37 ^b	6.59±0.87 ^b

注:同列数据肩标字母不同表示差异显著(P<0.05)。下表同。

由表 1 可以看出,在饲喂药饵 15 d 与 30 d 后,所有试验组鲤鱼的巨噬细胞对绵羊红细胞的吞噬能力(PP 和 PI)均显著高于对照组(P<0.05)。

2.2 NBT 阳性细胞数量的变化(见表 2)

表 2 中草药对鲤鱼 NBT 阳性细胞数量的影响(个)($\bar{X}\pm SE$)

组别	15 d	30 d
对照组	21±2.06 ^a	22±2.41 ^a
刺五加组	29±2.32 ^a	47±4.86 ^b
蒲公英组	31±3.17 ^a	55±6.76 ^b
枸杞子组	32±2.46 ^a	59±5.33 ^b
金银花组	40±2.45 ^b	64±6.94 ^b
大蒜组	40±3.83 ^b	84±8.35 ^b

由表 2 可以看出,在饲喂药饵 15 d 后,金银花组和大蒜组的 NBT 阳性细胞数与对照组相比显著提高(P<0.05),刺五加组、蒲公英组和枸杞子组与对照组差异不显著(P>0.05),但也有提高趋势;在饲喂药饵 30 d 后,所有试验组的 NBT 阳性细胞数与对照组相比均显著提高(P<0.05)。

2.3 免疫器官指数的变化(见表 3)

表 3 中草药对鲤鱼免疫器官指数的影响($\bar{X}\pm SE$)

组别	15 d			30 d		
	脾指数	头肾指数	中肾指数	脾指数	头肾指数	中肾指数
对照组	0.0026±0.0002 ^a	0.001 7±0.000 2 ^a	0.004 2±0.000 4 ^a	0.002 2±0.000 2 ^a	0.001 3±0.000 1 ^a	0.003 5±0.000 3 ^a
刺五加组	0.0024±0.0003 ^a	0.001 4±0.000 1 ^a	0.003 8±0.000 2 ^a	0.002 5±0.000 2 ^a	0.001 7±0.000 2 ^a	0.004 0±0.000 7 ^a
蒲公英组	0.0028±0.0005 ^a	0.001 7±0.000 1 ^a	0.004 2±0.000 3 ^a	0.002 4±0.000 2 ^a	0.001 4±0.000 2 ^a	0.003 7±0.000 2 ^a
枸杞子组	0.0028±0.0004 ^a	0.002 0±0.000 3 ^a	0.004 1±0.000 3 ^a	0.002 5±0.000 2 ^a	0.001 1±0.000 1 ^a	0.003 8±0.000 2 ^a
金银花组	0.0024±0.0003 ^a	0.001 3±0.000 2 ^a	0.003 6±0.000 3 ^a	0.002 5±0.000 3 ^a	0.001 5±0.000 2 ^a	0.003 5±0.000 3 ^a
大蒜组	0.0026±0.0005 ^a	0.001 7±0.000 4 ^a	0.003 7±0.000 3 ^a	0.002 6±0.000 2 ^a	0.001 1±0.000 1 ^a	0.003 3±0.000 2 ^a

由表 3 可以看出,在饲喂药饵 15 d 与 30 d 后,所有试验组的各免疫器官指数与对照组相比均无显著性差异(P>0.05)。

2.4 血清中补体 C3 活性的变化(见表 4)

由表 4 可以看出,在饲喂药饵 15 d 后,所有试验组血清中补体 C3 的活性与对照组相比差异不显著(P>0.05);在饲喂药饵 30 d 后,金银花组和大蒜组血清中补体 C3 的活性与对照组相比显著提高(P<0.05)。

表4 中草药对鲤鱼血清中补体 C3 活性的影响(g/l)(M±SE)

组别	15 d	30 d
对照组	0.136±0.014 ^a	0.143±0.027 ^a
刺五加组	0.141±0.021 ^a	0.186±0.033 ^a
蒲公英组	0.145±0.032 ^a	0.189±0.039 ^a
枸杞子组	0.152±0.026 ^a	0.197±0.028 ^a
金银花组	0.154±0.024 ^a	0.247±0.041 ^b
大蒜组	0.155±0.028 ^a	0.241±0.037 ^b

3 讨论

3.1 鱼类的免疫器官主要有胸腺、肾脏和脾,其中头肾和脾与体液免疫关系密切^[9]。有研究表明,饲料中添加某些中草药对鲤鱼免疫器官重量会产生一定的影响^[4,5],结果因中草药种类不同而不同。也有试验研究表明,饲料中添加中草药对鲤鱼免疫器官指数并未产生显著影响^[6]。本研究表明,饲料中添加的这5味中草药对鲤鱼免疫器官指数的变化并未产生显著的影响。因此,中草药对免疫器官指数是否有影响还有待于进一步研究。

3.2 一般认为,动物体内的吞噬细胞可吞噬进入体内的异物,在动物体的非特异性免疫中发挥重要作用。吞噬细胞在消化病原微生物的同时,可保留有关的抗原信息并将其传递给有关的淋巴细胞,从而激发机体的体液免疫和细胞免疫。因此,吞噬细胞的吞噬活性直接与动物的免疫机能有关^[7]。与其它脊椎动物一样,鱼类的非特异性免疫功能也包括体液免疫和细胞免疫两部分。在鱼类的细胞免疫中,血液中的巨噬细胞的作用是至关重要的^[8],巨噬细胞的吞噬功能是动物非特异性免疫的重要组成部分。它们吞噬能力的高低可以直接反映出鱼类非特异性免疫能力的大小,因此,通过测定血液中巨噬细胞的吞噬功能,可以反映机体的非特异性细胞免疫状态^[9]。有研究表明,中草药可以提高鱼类外周血巨噬细胞的吞噬功能^[10,11]。本研究表明,试验中选用的5种中草药均可使鲤鱼的外周血巨噬细胞的吞噬能力增强,并且增强速度较快,在饲喂15 d时所有试验组与对照组相比差异显著,并且能持续到30 d仍然差异显著,由此可说明中草药对提高鲤鱼血液巨噬细胞吞噬能力的影响较为明显。

3.3 补体是一组非特异性血清蛋白质系统,存在于正常新鲜的血清中,在抗体存在情况下,必须有补体参与作用才能使细胞性抗原死亡或者溶解。补体系统的主要生理功能是促进吞噬和溶解靶细胞,因此,补体系统是机体非特异性免疫防御机制的重要组成部分,对消除外来抗原的侵害,维护机体内环境的平衡具有重要作用。有研究表明,在饲料中添加适量的免疫多糖可以提高中华鳖血清中补体 C3 的活性^[12]。本研究表明,

在饲喂15 d时,所有试验组血清中补体 C3 的活性与对照组虽然差异不显著,但也有提高的趋势;而在饲喂30 d时,所有试验组与对照组相比仍有提高,并且金银花组和大蒜组与对照组相比提高显著($P<0.05$)。说明这5味中草药对鲤鱼血清中补体 C3 的活性均有一定的影响,并且在30 d时金银花和大蒜可以显著提高鲤鱼血清中补体 C3 的活性。

3.4 在鱼类的细胞免疫中,嗜中性粒细胞、单核细胞和吞噬细胞等具有吞噬和杀灭病原微生物的能力,是鱼类的非特异免疫指标之一,对机体的免疫保护具有非常重要的作用^[13]。本研究中的 NBT 阳性细胞就是这3种细胞的总称。有研究表明,中草药可以提高鱼类的 NBT 阳性细胞数^[11,14]。本研究表明,在饲喂15 d时,所有试验组与对照组相比 NBT 阳性细胞数均有所提高,并且金银花组和大蒜组与对照组相比显著提高($P<0.05$);在饲喂30 d时,所有试验组和对照组相比均显著提高($P<0.05$)。这说明这5味中草药可以显著提高鲤鱼的 NBT 阳性细胞数,从而进一步说明中草药对鲤鱼的非特异性免疫功能具有明显的促进作用。

参考文献

- 1 刘红柏. 中草药免疫增强剂的研究现状及其在水产上的应用[J]. 水产学杂志, 2002, 15(2): 91-95
- 2 谢仲权, 牛淑琦. 天然植物饲料添加剂生产技术与质量标准[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005. 23-28
- 3 李亚南, 陈全震, 邵健忠, 等. 鱼类免疫学研究进展[J]. 动物学研究, 1995, 16(1): 83-94
- 4 蔡中华, 陈成勋, 郭永军, 等. 几种中草药对鲤鱼非特异性免疫影响初探[J]. 淡水渔业, 1996, 26: 218-221
- 5 蔡中华, 陈成勋, 邢克智, 等. 4种中草药对鲤鱼非特异性免疫功能的影响[J]. 天津农学院学报, 1998(5): 31-34
- 6 刘红柏, 张颖, 卢彤岩, 等. 饲料中添加中草药对鲤鱼免疫功能的影响[J]. 集美大学学报, 2004(9): 317-321
- 7 Sovenyi J. F., Yamamoto H, Fujimoto S, et al. Lymphomyeloid cells, susceptibility to erythrodermatitis of carp and bacterial antigens[J]. DeVe Con Immunol., 1990, 14: 185-200
- 8 Sakai M. Current research status of fish immunostimulants [J]. Aquaculture, 1999, 172: 63-92
- 9 大野尚仁. β グルカンの生体防御系修饰作用 [J]. 日本细菌学, 2000, 55(3): 527-537
- 10 蔡中华, 邢克智, 董双林. 维生素 E 对鲤鱼健康的影响[J]. 动物学报, 2001, 47: 120-124
- 11 简纪常, 吴焯和. 中草药对建鲤非特异性免疫功能的影响[J]. 大连水产学院学报, 2002(2): 114-119
- 12 汪成竹, 姚娟, 吴凡, 等. 免疫多糖(酵母细胞壁)对中华鳖非特异性免疫功能的影响[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(4): 421-425
- 13 Sakai M. Current research status of fish immunostimulants [J]. Aquaculture, 1999(172): 63-92
- 14 刘华忠, 刘定忠, 赵学明. 复方中草药对彭泽鲫非特异性免疫功能的影响[J]. 淡水渔业, 2004, 34: 31-32

(编辑:徐世良, fi-xu@163.com)

利用原生质体诱变筛选植酸酶高产菌株

李秀珍 薄泉 杨平平 王燕

摘要 对产植酸酶的纯化黑曲霉用混合酶制取原生质体进行了研究。研究发现,经诱变后的原生质体在再生过程中菌落形态发生了明显变化,从中选育出了一株植酸酶的高产菌株,并对其遗传稳定性进行了鉴定。

关键词 植酸酶;黑曲霉;紫外诱变;原生质体

中图分类号 Q814

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要原料及试剂

植酸钠(由美国 Sigma 公司提供)、钼酸铵、冰醋酸、磷酸二氢钾、三水乙酸钠、偏钒酸铵、葡萄糖、氯化钾、硫酸镁、硫酸锰、硝酸等。

1.1.2 菌种

实验室保藏的黑曲霉 2 株、米曲霉 1 株。

1.1.3 培养基

斜面培养基:PDA 培养基,自然 pH 值。

初始平板分离培养基:麦芽汁培养基(糖度为 5.8),121 °C 灭菌 20 min,自然 pH 值。

产酶培养基:100 ml 培养基中含葡萄糖 3.0 g、 NH_4NO_3 0.5 g、KCl 0.05 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g、植酸钙 0.01 g,121 °C 灭菌 20 min,自然 pH 值。

再生平板培养基:100 ml 培养基中含葡萄糖 4.0 g、 NaNO_3 0.3 g、KCl 0.05 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g、 KH_2PO_4 0.01 g,用 0.6 mol/l NaCl 溶液配制,自然 pH 值,121 °C 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌种筛选

1.2.1.1 菌种初筛

将实验室保存的菌种运用稀释平板法分离,30 °C 培养 3 d,选取单菌落(50 株)接入斜面培养基,每种菌株斜面接入到 1 个三角瓶进行发酵,250 ml 三角瓶装液量为 50 ml,30 °C、200 r/min 摇瓶培养 72 h,测

定酶活。

1.2.1.2 菌种复筛

经初筛得到 3~5 株酶活较高的菌株,每种菌株斜面接入 3 个三角瓶进行平行发酵试验,250 ml 三角瓶装液量为 50 ml,30 °C、200 r/min 摇瓶培养 72 h,测定酶活。

1.2.2 原生质体的制备

1.2.2.1 黑曲霉菌丝液的制备

将生长 5 d 的黑曲霉斜面孢子洗下,在 6 度麦芽汁中摇瓶培养 8~12 h,收集菌丝体;菌丝用无菌水离心洗涤(5 000 r/min)2 次,并用高渗液(0.6 mol/l NaCl)稀释适当倍数。

1.2.2.2 原生质体的制备

取菌丝悬浮液 1 ml,加入 1%的纤维素酶、1%的蜗牛酶溶液各 0.5 ml,37 °C 水浴,振荡处理 3~4 h,取样镜检,当有大量原生质体形成时停止酶处理,再用高渗液(0.6 mol/l NaCl)洗涤原生质体,500 r/min 离心,即得原生质体。

1.2.3 原生质体紫外诱变及再生

原生质体用高渗液稀释至适当倍数,取 10 ml 放入无菌的 Φ 为 9 cm 平板内,30 W 紫外灯,距平板 30 cm 处照射 5、10、15 min 后,红光下涂布于再生平板上,观察菌落生长情况。

1.2.4 植酸酶酶活的测定

以植酸钠为底物,采用钒钼酸铵法测定植酸酶的酶活。

将培养 72 h 的发酵液经 4 000 r/min 离心除去菌体,利用截流分子量为 10 000 Da 的透析袋在无离子水中将上清液透析 2 h,得到去除无机磷的酶液。吸取 1 mmol/l 的植酸钠(酶作用底物,用 0.25 mol/l、pH 值 5.50 醋酸-醋酸钠缓冲液配制)1.0 ml,37 °C 预热 5 min 后,准确加入适当稀释的酶液 0.5 ml(对照组先加反应终止液),37 °C 水浴反应 30 min 后,再加入 4 ml 反应终止液(现用现配)冷却至室温,利用 722 型可见光

李秀珍,山东轻工学院,250353,山东省济南市西部新城大学科技城。

薄泉,单位及通讯地址同第一作者。

杨平平、王燕(通讯作者),浙江工业大学。

收稿日期:2007-02-20

分光光度计在 415 nm 处测定 OD 值, 利用无机磷标准曲线计算出酶活。

酶活单位定义: 在 37 °C, 每分钟从 1 mmol/l 植酸钠溶液中(用 pH 值 5.5 的醋酸-醋酸钠缓冲液配制)释放出 1 nmol 无机磷所需要的酶量为一个酶活单位(U)。

1.2.5 诱变菌株的遗传稳定性考察

对选出的有利诱变菌落进行传代接种摇床培养, 测其酶活, 初步考察其遗传稳定性。

2 结果与分析

2.1 出发菌株的选择

从实验室保存的 2 株黑曲霉、1 株米曲霉中分别分离到 50 株单菌落, 经过反复筛选得到 3 株酶活较

高的菌株, 其酶活情况见表 1。

表 1 不同菌株的酶活

菌种	体积增加量(ml)	OD 值	酶活(U/ml)
米曲霉 1	1.07	0.008	1.07
黑曲霉 1	1.03	0.037	7.52
黑曲霉 2	1.08	0.019	3.52

通过多次筛选和酶活大小的比较, 黑曲霉 1 产酶量始终较高, 所以选出黑曲霉 1 为原生质体诱变的出发菌株。

2.2 原生质体的制备

2.2.1 原生质体形态观察(见图1)



图 1 黑曲霉原生质体释放过程

从图 1 中可以看出, 供试菌株的原生质体和其它许多常见丝状真菌一样, 可以从菌丝顶端和其它部位释放。在菌丝顶端和其它部位均同时出现菌丝膨大变形情况。这说明细胞壁已被水解掉, 细胞膜凸出将要成为原生质体。原生质体释放时, 通常是在菌丝的释放部位先膨大形成 1 个小球体, 然后该球体逐渐增大, 最后脱离菌丝, 有的还可以在原有的释放部位紧接着又形成一个或几个原生质体。释放的原生质体多呈球形, 大小不一。

2.2.2 菌龄对原生质体制备的影响

菌体的生理状态对原生质体的形成有很大的影响, 用不同菌龄的菌丝制备原生质体的结果见图 2。由图 2 可以看出, 随着菌龄的增大, 原生质体的产量逐渐减少, 以菌龄为 9 h 时原生质体形成数较高。原

因可能是菌龄增大后, 菌体细胞老化和细胞壁上沉积较多的不易被酶解的物质, 因而不易酶解, 或者酶解后得到的原生质体活力不高, 不能再生。

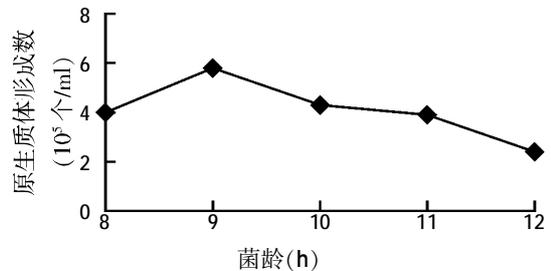


图 2 菌龄对原生质体制备的影响

2.2.3 不同酶系统对原生质体制备的影响

由于真菌的细胞壁组成比较复杂, 由外向内依次

是不定形的葡聚糖层、糖蛋白层、蛋白质层、几丁质层。用不同的酶系统制备原生质体的结果见表 2。

由表 2 可以看出, $V_{\text{纤维素酶}} : V_{\text{蜗牛酶}} = 3 : 7$ 时, 原生质体产量达到最高, 为 3.5×10^5 个/ml。

表 2 不同的酶系统对原生质体形成的影响

酶系统	2%蜗牛酶	2%纤维素酶	$V_{\text{纤维素酶}} : V_{\text{蜗牛酶}} = 3 : 7$	$V_{\text{纤维素酶}} : V_{\text{蜗牛酶}} = 1 : 1$
原生质体形成数(个/ml)	2.5×10^5	1.0×10^5	3.5×10^5	1.5×10^5

2.2.4 酶作用时间对原生质体制备的影响

酶作用时间不同对制备原生质体的影响见图 3。由图 3 可以看出, 2.5 h 时原生质体形成数较高, 2.5 h 以后变化不大。但考虑到酶作用时间越长, 细胞脱壁越完全, 而原生质体的再生需要一定的细胞壁的酶解残余物作为引物。综合考虑, 酶作用时间应该选取 2.5 h。

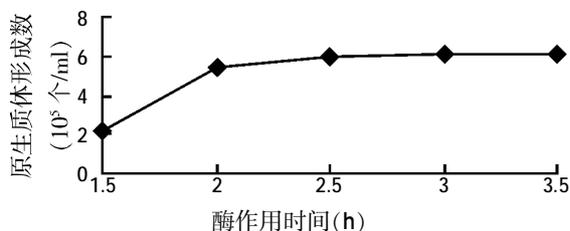


图 3 酶作用时间对原生质体形成的影响

2.3 菌种的诱变选育

2.3.1 诱变的时间(见表 3)

表 3 诱变时间对致死率和酶活的影响

紫外诱变时间(min)	致死率(%)	相对酶活(%)
5	95	100
10	98.3	98
15	99.2	96

表 3 结果可见, 黑曲霉原生质体经过不同时间的诱变对致死率没有较大的影响, 相对酶活也相差不大, 因此, 诱变时间确定为 5 min。

2.3.2 诱变前后菌落形态特征

从菌体诱变前后来看, 菌体的生长周期、菌落形态发生了一些变化, 表现在: ①诱变前后, 菌落的生长周期发生了明显变化, 原始菌种平板菌落生长期只需 2~3 d 长成, 而诱变后的菌落生长期延迟到了 4~5 d。②诱变后的黑曲霉平板菌落比原始菌种平板菌落大且厚实。这说明, 菌体制成原生质体后, 加上紫外线对它的诱变作用, 菌体基因确实受到影响, 内在基因的变化导致菌体表现的改变, 诱变效果比较明显。

2.3.3 高产菌株的选育

经过一轮诱变从中挑选出 30 株生长旺盛的菌落, 接入摇瓶培养基, (30 ± 1) °C 恒温培养 72 h 后测定酶活, 进行初筛。从中挑选出 3 株酶活较高的菌株进

行复筛, 结果见表 4。

表 4 不同菌株的酶活

菌种	体积增加量(ml)	OD 值	酶活(U/ml)
黑曲霉 UV-1	2.0	0.340	77.81
黑曲霉 UV-2	1.7	0.298	68.50
黑曲霉 UV-3	1.4	0.205	46.21

通过多次筛选和酶活大小的比较, 黑曲霉 UV-1 产酶量始终较高。

2.4 遗传稳定性试验

将经原生质体诱变筛选出的高产菌株黑曲霉 UV-1 连续传代 5 次, 测其酶活, 见表 5。从表 5 中可以看出, 黑曲霉 UV-1 的遗传性状基本稳定。

表 5 遗传稳定性试验

代数	1	2	3	4	5
酶活(U/ml)	72.05	73.89	68.65	69.35	68.46

3 结论

本试验以实验室保存的 2 株黑曲霉和 1 株米曲霉为出发菌株, 经过分离纯化筛选出 1 株酶活较高的黑曲霉 1, 采用原生质体紫外诱变处理能显著提高黑曲霉的植酸酶产量, 酶活比出发菌株提高了 10.35 倍, 其遗传性状基本稳定。

参考文献

- Zyla K. Phytase application in poultry feeding: selected issues [J]. Journal of animal and feed science, 2001, 10(2): 247~258
- 李佳, 刘钟滨. 植酸酶的研究进展及应用[J]. 同济大学学报, 2004, 25(6): 541~545
- 杨平平, 许正宏, 王燕, 等. 植酸酶菌株筛选方法的研究[J]. 工业微生物, 2004, 34(3): 12~15
- 陈红歌, 苗雪霞, 张世敏. 植酸酶高产菌株的诱变选育[J]. 微生物学通报, 1997, 24(3): 27~274
- 彭益强, 贺淹才, 全成恒. 用原生质体诱变选育高植酸酶酶活的黑曲霉变异株[J]. 微生物学, 2002, 22(5): 7~9
- 杨文博. 微生物学实验[M]. 化学工业出版社, 2004. 104~104
- 朱萍, 梁海秋, 张弘, 等. 黑曲霉 Ni-5K 原生质体的制备及再生[J]. 广西农业生物科学, 2005, 24(4): 339~342
- 曹军卫. 黑曲霉原生质体的制备及再生[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1984(4): 95~102

(编辑: 高雁, snowyan78@tom.com)

饲用高产丙酸菌的复合诱变

王德培 揣玉多 王艳萍 丁友昉 张学炜

摘要 以费氏丙酸菌 IFFI.10019 为出发菌株,经 2 次紫外线、2 次亚硝基胍、1 次亚硝基胍-氯化锂多重复合诱变处理,选育获得饲用高产丙酸菌 NL-3,其丙酸产量由原来的 0.20 g/l 提高到 1.23 g/l,提高率达到 515%;乙酸产量由原来的 1.79 g/l 提高到 2.61 g/l。试验结果表明,经复合诱变处理得到的丙酸菌 NL-3 是一种较好的微生物饲料添加剂。

关键词 丙酸;复合诱变;丙酸菌 NL-3

中图分类号 Q939.1

丙酸(Propionic Acid)分子式为 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$,是葡萄糖等碳源在丙酸菌的作用下通过糖酵解反应的副产物^[1],产生丙酸的同时还伴有乙酸、琥珀酸等有机酸的生成^[2]。

丙酸菌作为一种微生物饲料添加剂,1989 年已由美国食品和药品管理局列入可以直接饲喂且一般认为是安全的 42 种微生物菌种名单之中^[3]。其代谢产物——乙酸、丙酸及其衍生物是世界上公认的无毒抑菌剂,在谷物仓贮和新鲜饲料保存方面有很好的防腐、防霉作用,对人畜基本无害,且对动物而言还有营养价值^[4,5]。因而,丙酸菌作为良好的食品防腐剂、动物饲料添加剂以及除草剂被人们广泛应用^[6]。

本研究以费氏丙酸菌 IFFI.10019 为出发菌,运用紫外线(UV)、亚硝基胍(NTG)、亚硝基胍(NTG)-氯化锂(LiCl)复合诱变育种技术,选育并获得了 1 株遗传特性稳定的饲用高产丙酸菌 NL-3,丙酸产量由原来的 0.20 g/l 提高到 1.23 g/l,乙酸产量由原来的 1.79 g/l 提高到 2.61 g/l,为生产应用提供了良好的辅助原料。

1 材料与方法

1.1 菌种

费氏丙酸菌(*Propionibacteria freudenreichii*) IFFI.10019 由中国食品发酵研究所保存。

1.2 培养基

基础培养基:蛋白胨 10 g/l、蔗糖 20 g/l、酵母膏 10 g/l、磷酸铵 5 g/l,pH 值为 7.2~7.4。

筛选培养基:在基础培养基中加入 5 g/l 碳酸钙,pH 值为 7.2~7.4。

氯化锂培养基:在基础培养基中加入 5 g/l 氯化锂、5 g/l 碳酸钙,pH 值为 7.2~7.4。

以上若用固体培养基,加入 2%琼脂,培养基灭菌条件均为 121 ℃、15~20 min。

1.3 培养方法

厌氧培养:从活化后的斜面上取一环丙酸菌接种于盛有 100 ml 基础培养基的厌氧培养瓶中,置于 30 ℃ 培养箱中静置培养。

好氧培养:从活化后的斜面上取一环丙酸菌接种于盛有 50 ml 基础培养基的 250 ml 三角瓶中,30 ℃、180 r/min 摇床培养。

1.4 分析方法

1.4.1 分光光度计法测生物量 A_{600}

将 1 ml 发酵液用 0.1 mol/l 的 HCl 稀释 20 倍,用 WFJ2000 型分光光度计在波长 600 nm 处测光密度值,所测得的光密度值即其生物量 A_{600} 。

1.4.2 pH 计测定发酵液中的[H⁺]

用 METTLER TOLEDO DELTA320 型 pH 计测定。

1.4.3 丙酸含量测定

用 GC-7890 II 气相色谱仪测定丙酸含量。色谱条件为不锈钢色谱柱,GDX-401 固定相,色谱柱温度为 200 ℃,进样气温度为 220 ℃,检测器温度为 220 ℃,进样量 1 μl ,外标法测定。

样品处理:取 1 ml 发酵液于 EP 管中,加入 0.02 ml 50% H_2SO_4 酸化,10 000 r/min 离心 3 min,取上清液测定丙酸产量(X_{pr})、乙酸产量(X_{Ac})。

1.5 诱变条件与方法

1.5.1 丙酸菌生长曲线的测定

王德培,天津科技大学,副教授,300457,天津市泰达开发区 13 大街 29 号。

揣玉多、王艳萍、丁友昉,单位及通讯地址同第一作者。

张学炜,天津农学院动物科学系。

收稿日期:2007-02-08

★ 天津市农委推广项目《微生物发酵绿色奶牛饲料》(编号为 04100)

以基础培养基为空白对照,0.5~1 h为间隔,进行生物量测定。

1.5.2 菌悬液制备

取对数期后期的菌体,5 000 r/min离心5 min,收集菌体,用0.1 mol/l pH值7.5的tris-HCl缓冲液离心、洗涤两次,制成 10^8 个/ml菌悬液。

1.5.3 紫外线(UV)诱变

取5 ml菌悬液于 Φ 为5 cm的培养皿中,磁力搅拌,15 W紫外灯距培养皿30 cm处照射15、30、45、60、75、90、120 s。

1.5.4 亚硝基胍(NTG)诱变

用3 mg/ml NTG溶液与菌悬液制成终浓度为0.6 mg/ml的NTG溶液,30℃处理20、30、40、45、50、60 min,稀释法终止诱变。

1.5.5 亚硝基胍(NTG)-氯化锂(LiCl)复合诱变

按照1.5.4方法,终止诱变后将其倾倒入氯化锂固体培养基平板中,30℃培养1~2 d。

1.5.6 突变株分离

采用1.5.3、1.5.4的方法诱变处理的菌悬液,取0.1 ml倾倒入固体筛选培养基平板中,30℃培养1~2 d,挑取透明圈直径与菌落直径比值较大的单菌落于斜面保存,待进一步筛选。

1.6 筛选方法

1.6.1 初筛方法

将分离出的突变株于基础培养基试管中,放入30℃恒温水浴振荡器中培养,通过测定发酵液的pH值确定复筛菌株。

1.6.2 复筛方法

采用1.3.2的方法培养,1.4.3方法测定发酵液中丙酸、乙酸产量,以丙酸产量为主要标准筛选饲用高产丙酸菌株。

2 结果与讨论

2.1 培养方式对费氏丙酸菌 IFFI.10019 产丙酸、乙酸及菌体生长的影响

使用基础培养基,接入同量的费氏丙酸菌 IFFI.10019,分别采用不同的培养方法培养,测定培养1~7 d的 X_{Pr} 、 X_{Ac} 和 A_{600} 值,见图1、2、3。

由图1~3可知,丙酸菌好氧培养1 d,丙酸含量可达到0.21 g/l,以后没有明显增加,反而略有下降;而厌氧培养到5 d时,丙酸含量达到0.19 g/l,比好氧培养略低。而好氧培养的乙酸含量远远高于厌氧培养的乙酸。另外,在氧气充足的情况下,费氏丙酸菌 IFFI.10019生长速度快,培养1 d就进入稳定期;而无氧状

态下,菌体生长缓慢,培养5 d才进入稳定期,而菌浓度仍然没有有氧情况下高。因此,好氧培养方法更有利于费氏丙酸菌 IFFI.10019 高产丙酸,使丙酸菌成为良好的饲料添加剂。

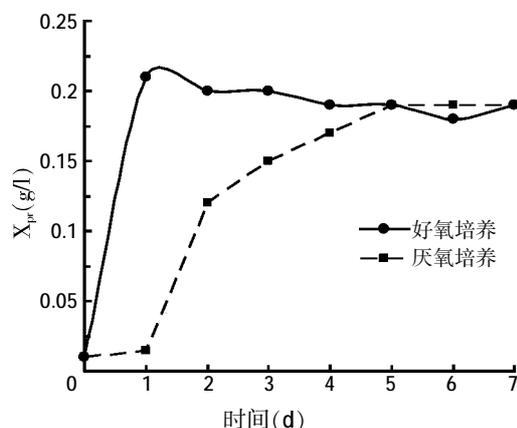


图1 费氏丙酸菌采用两种培养方法发酵7 d的 X_{Pr} 对比

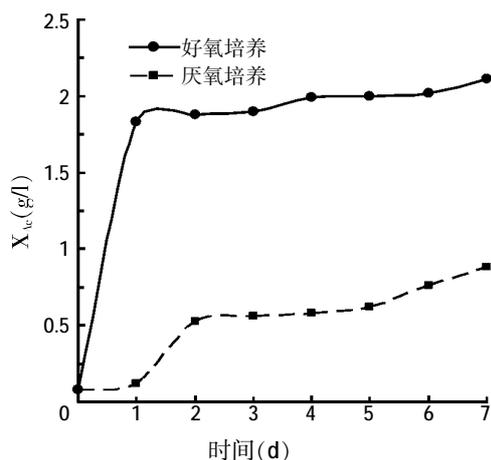


图2 费氏丙酸菌采用两种培养方法发酵7 d的 X_{Ac} 对比

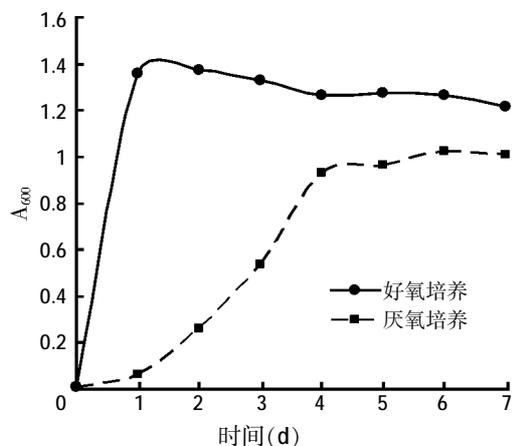


图3 费氏丙酸菌采用两种培养方法发酵7 d的 A_{600} 值对比

2.2 费氏丙酸菌 IFFI.10019 生长曲线的测定

斜面菌种好氧培养12 h活化后,按1%接种量分

别转接到盛有 50 ml 新鲜培养基的 250 ml 三角瓶中好氧培养,以培养时间为横坐标,吸光度为纵坐标,作生长曲线,见图 4。

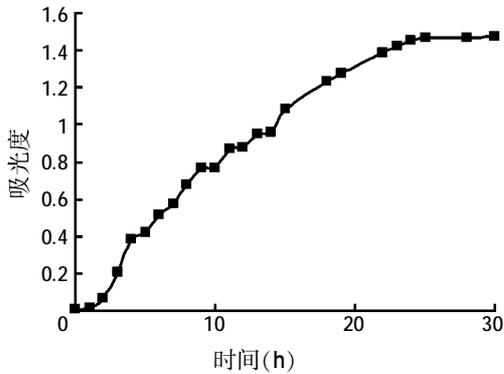


图4 费氏丙酸菌生长曲线

由图 4 可以看出,费氏丙酸菌 IFFI.10019 培养 2 h 后,进入对数生长期,24 h 后生进入稳定期,因此诱变试验选用好氧培养 20 h 的 IFFI.10019 进行诱变选育。

2.3 费氏丙酸菌 IFFI.10019 的选育

2.3.1 紫外线对丙酸菌的诱变效应

以费氏丙酸菌 IFFI.10019 为出发菌株,按 1.5.3 的方法进行紫外线诱变,照射时间为横坐标,致死率

为纵坐标,绘制紫外线诱变致死曲线,见图 5。

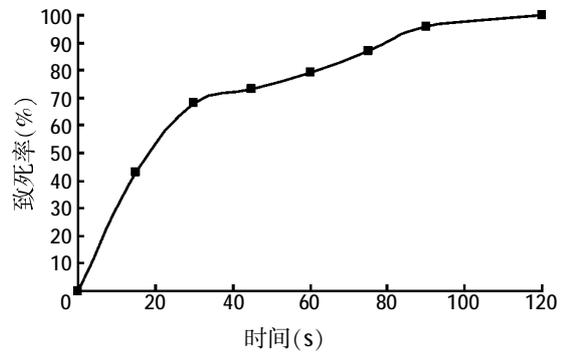


图5 紫外线诱变致死曲线

由图 5 可知,紫外线照射 60 s 时,致死率为 79%;照射 90 s 时,致死率已达 95%。故以 60~90 s 不同时间进行第 1 轮照射,共挑取 108 株菌,经初筛、复筛后,产丙酸浓度在 0.3 g/l 以上的菌株 13 株,其中 90 s 处理时间的 U₁-99 产丙酸浓度为 0.42 g/l、产乙酸浓度为 1.82 g/l。以 U₁-99 为出发菌株,用 90 s 进行第 2 轮紫外线照射诱变处理,同样操作,挑取 87 株菌,后经初筛和复筛,获得高于此轮出发菌产丙酸水平的突变株 11 株,其中 U₂-35 产丙酸浓度达 0.49 g/l,产乙酸浓度为 1.90 g/l(见表 1)。

表 1 紫外线诱变结果

诱变代数	出发菌株	诱变时间(s)	致死率(%)	挑菌数(株)	正变率(%)	代表株	X _{Ac} (g/l)	X _{Et} (g/l)
对照组	IFFI.10019						1.79	0.20
第一轮	IFFI.10019	60	79.0	57	8.8	U ₁ -11	1.53	0.30
						U ₁ -46	1.83	0.32
		75	84.5	33	12.1	U ₁ -69	1.87	0.28
						U ₁ -78	1.61	0.34
		90	95.0	18	22.2	U ₁ -99	1.82	0.42
第二轮	U ₁ -99	90	95.0	87	12.6	U ₁ -102	2.00	0.39
						U ₁ -103	1.77	0.41
						U ₂ -35	1.90	0.49
						U ₂ -71	1.76	0.43

从表 1 可以看出,在第 1 轮紫外线诱变的不同处理时间中,均有较为理想的诱变效果,产丙酸率较高, U₁-99 丙酸产量比出发菌 IFFI.10019 提高了 110%。而在第 2 轮的紫外线诱变突变株 U₂-35 丙酸产量比其出发菌仅提高了 17%,第 2 轮的诱变效果明显降低,原因可能是经同一方式数次诱变后,突变株对紫外线的敏感性降低,故应考虑采用其它诱变因子,以进一步提高诱变效应。

2.3.2 NTG 对丙酸菌的诱变效应

以 U₂-35 为出发菌株,按 1.5.4 的方法进行 NTG 诱变,处理时间为横坐标,致死率为纵坐标,绘制 NTG 诱变致死曲线,见图 6。

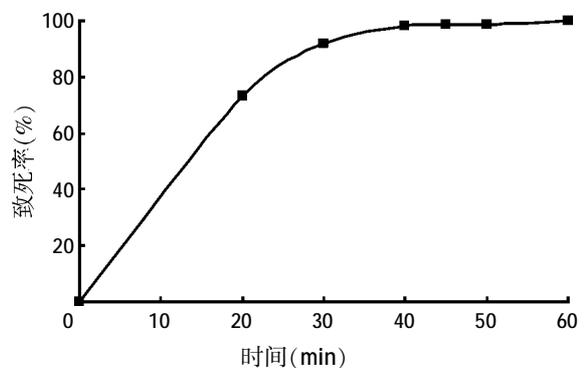


图6 亚硝基胍诱变致死曲线

由图 6 可知,NTG 处理 40 min,致死率为 97.8%;

NTG 处理 60 min,致死率已达 99.8%。故用终浓度为 0.6 mg/ml 的 NTG 溶液,40~60 min 不同时间进行第 1 轮诱变处理。在第 1 轮诱变的基础上进行第 2 轮诱变,结果见表 2。

从表 2 可看出,NTG 处理 45 min 时,正变率最高达 12.5%,并得到产丙酸较高的菌株 N₁-63,比菌株 U₂-

35 丙酸产量提高 29%,故选择 0.6 mg/ml 的 NTG 诱变剂量处理 45 min 继续第 2 轮的诱变选育,最终选出菌株 N₂-62,发酵产丙酸量为 0.84 g/l,较出发菌株 IFFI.10019 提高 320%,产丙酸水平明显提高,但为了进一步提高诱变效应,考虑使用 NTG-LiCl 复合诱变,以期达到更好效果。

表 2 亚硝基胍诱变结果

诱变代数	出发菌株	诱变时间(min)	致死率(%)	挑菌数(株)	正变率(%)	代表株	X _{Ac} (g/l)	X _{Pr} (g/l)
第一轮	U ₂ -35	40	97.8	62	8.1	N ₁ -9	1.99	0.51
		45	98.5	40	12.5	N ₁ -63	2.01	0.63
						N ₁ -91	1.82	0.58
						N ₁ -94	1.85	0.53
		50	98.7	40	10.0	N ₁ -105	2.13	0.60
第二轮	N ₁ -63	60	99.8	36	11.1	N ₁ -132	2.07	0.58
						N ₁ -159	1.92	0.57
						N ₂ -21	1.87	0.71
		45	98.5	115	16.5	N ₂ -30	2.14	0.74
						N ₂ -62	2.25	0.84

2.3.3 NTG-LiCl 复合诱变对丙酸菌的诱变效应

以 N₂-62 为出发菌株,按 1.5.5 的方法进行 NTG-LiCl 复合诱变,共挑取 70 株菌,经初筛和复筛,获得高于此轮出发菌产丙酸水平的突变菌 30 株,正变率达到 42.9%,其中丙酸菌 NL-3 产丙酸浓度为 1.23 g/l,产乙酸浓度为 2.61 g/l,丙酸产量较出发菌株 IFFI.10019 提高 515%。由此可知,NTG-LiCl 复合诱变对丙酸菌的诱变效应较紫外线、亚硝基胍更显著,正变率明显提高。

2.4 丙酸菌突变株的遗传稳定性

为了观察丙酸菌 NL-3 的遗传稳定性,进行了菌种传代产丙酸性能试验。结果证明丙酸菌 NL-3 在选定的好氧培养条件下,经传 10 代产丙酸浓度均在 1.2 g/l 左右,其性能基本稳定。

3 结论

以费氏丙酸菌 IFFI.10019 为出发菌,采用 UV、NTG、NTG-LiCl 多重复合诱变育种技术,选育得到饲

用高产丙酸菌株 NL-3,其产丙酸水平比出发菌有大幅度提高,产乙酸水平也有一定程度的提高。该菌株作为良好的微生物饲料添加剂,可以与其它菌剂合理配伍发酵饲料,提高饲料利用率,增强动物机体的免疫功能,防病治病,降低死亡率,提高经济效益。

参考文献

- 1 马小魁,姚培鑫. 发酵法生产丙酸的研究进展[J]. 微生物学报,1999,26(6):443-446
- 2 R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯编. 中科院微生物研究所翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1984. 876-888
- 3 黄庆生,王加启. 微生物饲料添加剂安全性问题的探讨[J]. 中国农业科技导报,2001,3(5):62-65
- 4 Flores-Galagarza R A, Glatz B A, Bern C J, et al. Preservation of high moisture corn by microbial fermentation [J]. Journal of Food Protection,1985,48:407-411
- 5 徐亲民. 丙酸及其盐类在饲料中的应用[J]. 饲料工业,1997(5):32-35
- 6 徐虹,欧阳平凯,王莎莎. 发酵法生产丙酸[J]. 食品与发酵工业,1997,23(6):62-65

(编辑:高 雁,snowyan78@tom.com)

·信息采撷·

宁夏活羊及羊肉有望走进非洲市场

近日,突尼斯考察团一行在宁夏出入境检验检疫局相关领导陪同下,就宁夏活羊及羊肉出口事宜对宁夏地区活羊养殖场、隔离场、加工厂进行考察和预检后,表示了首肯。

位于非洲北部的突尼斯信奉伊斯兰教。作为清真食品的宁夏羊肉已具有广阔的市场前景,2005年首次出口中东等地市场;2006年9月,宁夏羊肉经检验检疫合格后顺利进入马来西亚市场,获准进入国际市场“通行证”。此次有望通过突尼斯考察后,随时向突尼斯批量出口活羊及羊肉,自此实现中国出口非洲活羊零的突破,并以向突尼斯出口为突破口,向其它中东伊斯兰国家出口活羊及羊肉,进一步拓展、培育和扩大宁夏活羊和羊肉品牌的影响力。

中药-甜菜碱复方对高温环境中三黄鸡血清 SOD、MDA 及 NO 变化的影响

李 涟 冯 业 刘映娴 许英梅 安立龙

1 材料与方法

1.1 材料

试验鸡为三黄鸡(优质普通型);中药添加剂由生石膏、延胡索、生地、丹皮、山萸肉、薄荷、泽泻等组成,粉碎,过 40 目筛;甜菜碱。

1.2 试验设计与管理

1 日龄三黄鸡共 288 只,公母各半,育雏 2 周后随机分为 8 组(P>0.05),中药 I、II、III 组分别在日粮中添加 0.4%、0.8%、1.2% 中药,中药-甜菜碱 I、II、III 组则在中药 I、II、III 组的基础上分别添加 0.2% 甜菜碱,另设一个添加 0.2% 甜菜碱的甜菜碱组和一个对照组。公母分饲,每组公母鸡分别设 3 个重复,每个重复 6 只鸡。试验分 2 个阶段进行:15~42 日龄为第一阶段;43~70 日龄为第二阶段。

饲养试验于 2005 年 4 月至 7 月在广东海洋大学动物实验室进行。试验鸡采用笼养,常规免疫,自由采食、饮水,其各阶段日粮营养水平见表 1。每天记录鸡舍内温度和湿度(见表 2)。

表 1 各阶段日粮营养水平

项目	代谢能 (MJ/kg)	粗蛋白 (%)	赖氨酸 (%)	蛋氨酸 (%)	钙 (%)	有效磷 (%)
第一阶段	11.72	20	1	0.84	0.9	0.65
第二阶段	12.13	18	0.9	0.68	0.8	0.6

表 2 15~70 日龄的鸡舍温度和相对湿度

项目	8:00	12:00	18:00	总平均值
平均温度(℃)	30.88±0.94	32.02±1.26	31.30±1.27	31.40±1.16
平均相对湿度(%)	86.21±5.38	85.48±5.47	83.76±6.55	85.15±5.8

1.3 采样与分析

分别在 42、70 日龄早晨空腹采取血样,每组随机抽取 6 只鸡(公母各半),用一次性医用注射器从翅静脉采血,每只鸡采血 10 ml,经 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,-20 ℃冰箱保存待测。血清超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用黄嘌呤氧化酶比色法;丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸比色法;一氧化氮(NO)水平测定采用硝酸还原比色法。测定试剂盒由南京建成生物工程研究所生产。

1.4 统计分析

采用 SPSS10.0 软件对试验数据进行统计处理,单因素方差分析,用 LSD 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 中药-甜菜碱复方对高温环境下三黄鸡血清 SOD 活性的影响(见表 3)

由表 3 可知,在第一阶段,中药 III 组、中药-甜菜碱 I 组、中药-甜菜碱 II 组、中药-甜菜碱 III 组母鸡血清 SOD 活性分别比高温对照组高 8.14%(P<0.05)、6.55%(P<0.05)、8.67%(P<0.01)、6.91%(P<0.05);中药-

表 3 中药-甜菜碱复方对高温环境下三黄鸡血清 SOD 活性的影响 (U/ml)

组别	第一阶段		第二阶段	
	母	公	母	公
中药 I 组	145.109±2.12	146.023±1.00	152.437±1.25 ^a	156.043±2.26 ^a
中药 II 组	142.629±2.49	148.168±2.01	145.195±2.70	159.971±1.75 ^A
中药 III 组	153.693±3.50 ^a	145.566±1.50	163.487±1.71 ^A	149.675±1.02
中药-甜菜碱 I 组	151.432±2.26 ^a	154.195±3.60 ^a	150.428±2.26	162.985±1.76 ^A
中药-甜菜碱 II 组	154.446±1.77 ^a	157.962±2.26 ^A	160.724±2.52 ^A	163.788±2.10 ^A
中药-甜菜碱 III 组	151.935±3.29 ^a	156.204±1.53 ^A	165.998±3.26 ^A	163.738±3.54 ^A
甜菜碱组	144.055±3.01	156.410±2.30 ^A	151.451±1.09 ^a	159.468±2.76 ^A
高温对照组	142.118±2.53 ^{Bb}	145.154±1.51 ^{Bb}	142.894±2.76 ^{Bb}	142.864±1.37 ^{Bb}

注:同列数据肩标含有相同字母或未标字母者,表示差异不显著(P>0.05);不同小写字母表示差异显著(P<0.05);不同大写字母表示显著极显著(P<0.01)。下表同。

李涟,广东海洋大学农学院,524088,广东湛江。

冯业、刘映娴、许英梅、安立龙(通讯作者),单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-02-18

★ 广东海洋大学科研基金资助,广东省教育厅基金资助,广东海洋大学大学生创新基金资助

甜菜碱 I 组、中药-甜菜碱 II 组、中药-甜菜碱 III 组、甜菜碱组公鸡血清 SOD 活性分别比高温对照组高 6.23%(P<0.05)、8.82%(P<0.01)、7.61%(P<0.01)、7.75%(P<0.01)。在第二阶段,中药 I 组、中药 III 组、中药-甜菜碱 II 组、中药-甜菜碱 III 组、甜菜碱组母鸡血清 SOD 活性分别比高温对照组高 6.68%(P<0.05)、14.41%(P<

0.01)、12.48% ($P < 0.01$)、16.17% ($P < 0.01$)、5.99% ($P < 0.05$); 中药 I 组、中药 II 组、中药-甜菜碱 I 组、中药-甜菜碱 II 组、中药-甜菜碱 III 组、甜菜碱组公鸡血清 SOD 活性分别比高温对照组高 9.22% ($P < 0.05$)、11.97% ($P < 0.01$)、14.08% ($P < 0.01$)、14.65% ($P < 0.01$)、

14.61% ($P < 0.01$)、11.62% ($P < 0.01$)。综合分析可见, 0.8% 中药-0.2% 甜菜碱组效果最好, 能显著提高三黄鸡血清 SOD 活性。

2.2 中药-甜菜碱复方对高温环境下三黄鸡血清 MDA 含量的影响(见表 4)

表 4 中药-甜菜碱复方对高温环境下三黄鸡血清 MDA 含量的影响(nmol/ml)

组别	第一阶段		第二阶段	
	母	公	母	公
中药 I 组	3.426±0.69 ^A	4.082±0.18	5.525±1.08	5.149±0.29
中药 II 组	3.697±0.15 ^A	4.653±0.19	5.198±0.33	5.050±0.79
中药 III 组	2.277±0.19 ^A	4.864±0.58	5.594±1.13	5.347±0.49
中药-甜菜碱 I 组	3.515±0.55 ^A	4.109±0.13	5.099±0.37	3.421±0.25 ^B
中药-甜菜碱 II 组	2.426±0.14 ^A	4.109±0.34	4.802±0.35	4.158±0.39
中药-甜菜碱 III 组	2.624±0.34 ^A	6.585±1.23	4.901±0.84	4.703±0.13
甜菜碱组	4.208±0.14	5.743±0.18	4.703±0.23	4.555±0.89
高温对照组	4.611±0.04 ^B	6.718±1.08	5.941±0.25	6.288±2.54 ^B

由表 4 可见,在第一阶段,中药 I 组、中药 II 组、中药 III 组、中药-甜菜碱 I 组、中药-甜菜碱 II 组、中药-甜菜碱 III 组母鸡血清 MDA 含量分别比高温对照组低 25.70% ($P < 0.01$)、19.82% ($P < 0.01$)、50.62% ($P < 0.01$)、23.77% ($P < 0.01$)、47.39% ($P < 0.01$)、43.09% ($P < 0.01$),以中药 III 组效果最好,其次是中药-甜菜碱 II 组;公鸡各试验组血清 MDA 含量与高温对照组差异均不显著 ($P > 0.05$)。在第二阶段,母鸡各试验组血清

MDA 含量与高温对照组差异均不显著 ($P > 0.05$); 中药-甜菜碱 I 组公鸡血清 MDA 含量低于高温对照组 45.59% ($P < 0.05$)。综合分析可见,0.4% 中药-0.2% 甜菜碱组效果最好,能明显降低血清中的 MDA 含量,从而减少过氧化对机体的损害;其次为中药-甜菜碱 II 组。

2.3 中药-甜菜碱复方对高温环境下三黄鸡血清 NO 含量的影响(见表 5)

表 5 中药-甜菜碱复方对高温环境下三黄鸡血清 NO 含量的影响(nmol/ml)

组别	第一阶段		第二阶段	
	母	公	母	公
中药 I 组	22.77±2.77	26.93±1.08	37.70±0.85	31.92±0.50
中药 II 组	30.77±1.39 ^a	29.62±0.39	35.77±1.54	28.08±1.70
中药 III 组	28.08±1.54	32.31±0.48 ^a	36.16±1.62	23.08±0.77
中药-甜菜碱 I 组	28.85±0.39 ^a	36.92±0.41 ^a	33.08±0.77	34.23±0.50
中药-甜菜碱 II 组	42.31±0.77 ^A	43.85±1.31 ^A	38.46±0.69	22.69±0.69
中药-甜菜碱 III 组	41.54±0.85 ^A	44.23±0.46 ^A	34.23±1.15	30.39±0.39
甜菜碱组	24.23±1.92	28.85±0.39	31.54±0.92	30.39±0.39
高温对照组	22.93±0.93 ^{Bb}	24.23±1.92 ^{Bb}	33.08±0.85	28.85±1.93

由表 5 可知,在第一阶段,中药-甜菜碱 II 组、中药-甜菜碱 III 组、中药 II 组、中药-甜菜碱 I 组母鸡血清 NO 含量分别比高温对照组高 84.52% ($P < 0.01$)、81.16% ($P < 0.01$)、34.19% ($P < 0.05$)、25.82% ($P < 0.05$); 中药-甜菜碱 III 组、中药-甜菜碱 II 组、中药-甜菜碱 I 组、中药 III 组公鸡血清 NO 含量分别比高温对照组高 82.54% ($P < 0.01$)、80.97% ($P < 0.01$)、52.37% ($P < 0.05$)、33.35% ($P < 0.05$)。在第二阶段,无论是公鸡还是母鸡各试验组血清 NO 含量与高温对照组差异均不显著 ($P > 0.05$),但各试验组(中药-甜菜碱 I 组、甜菜碱组母鸡除外;中药 II 组、中药 III 组、中药-甜菜碱 II 组公鸡除外)的 NO 含量比对照组均有一定程度的提高。综合

分析可见,0.8% 中药-0.2% 甜菜碱组和 1.2% 中药-0.2% 甜菜碱组都能极显著提高第一阶段血清中 NO 含量,对第二阶段的 NO 含量影响不明显。

3 讨论

3.1 中药-甜菜碱复方影响 SOD 活性的原因

环境温度过高,肉鸡的总产热量(代谢的和环境的)超过散发热量时,导致热平衡失调、呼吸频率加快、血管收缩、血流加快,使肉鸡产生热应激。在热应激状态下,体内儿茶酚胺分泌增加,机体组织可能出现严重的缺氧、缺血。此外,细胞能量分解大于合成,这就为氧自由基大量生成提供了有利条件,诱导 O_2^- 、 OH^- 等自由基大量产生。同时,热应激使血液 pH 值显著升

高,出现呼吸性碱中毒、缺血,导致血液和组织中的 SOD 活性下降,造成氧自由基大量蓄积。

SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,能通过歧化反应清除生物细胞中的超氧自由基(O_2^-),生成 H_2O_2 和 O_2 ,从而减少自由基对机体的毒害,保护细胞免受损伤。因此,血清中含有一定量的 SOD,对机体抗氧化起着重要的作用。本试验结果表明,在日粮中添加中药、甜菜碱和中药-甜菜碱复方,都能提高高温环境下三黄鸡血清中的 SOD 活性,从而提高机体抗氧化能力。试验以添加 0.8% 中药-0.2% 甜菜碱(中药-甜菜碱 II 组)效果最好,在饲养期第二阶段,1.2% 中药-0.2% 甜菜碱(中药-甜菜碱 III 组)也能显著提高母鸡血清中的 SOD 活性。这与刘凤华的研究结果一致。

本试验中的中药添加剂根据热应激综合症进行组方,具有清热解表、利水祛湿,兼有营养物质和药物的双重作用;中药方中的丹皮、生地、延胡索等有抗衰老、抗氧化、清除氧自由基、减轻脂质过氧化反应及低密度蛋白(LDL)的氧化修饰,促进膜磷脂更新和膜稳定的作用,且中药组方中含有大量的提高抗氧化酶活性的维生素、多糖、黄酮类有效成分,能直接提高 SOD 的活性;而甜菜碱可以将甲基传给氨基乙醇生成胆碱,缓解胆碱不足所引起的脂肪代谢障碍,改善了细胞线粒体中脂肪酸的氧化过程。甜菜碱通过显著增强 SOD 活性,抑制脂质过氧化反应,减轻自由基损伤。与单独的中药组、甜菜碱组相比,中药-甜菜碱复方更能有效提高血清中的 SOD 活性,清除自由基,缓解因高温应激产生的大量自由基对机体造成的伤害。

3.2 中药-甜菜碱复方影响 MDA 含量的原因

机体内氧自由基增高,使脂类形成脂质过氧化物,引发脂质过氧化作用持续进行,产生过量脂质过氧化物丙二醛(MDA)。大量的 MDA 可以氧化细胞膜中的多不饱和脂肪酸(PUFA),破坏细胞膜的完整性,导致细胞膜的严重损伤。因脂质过氧化作用主要发生在生物膜和亚细胞器,致使脂质含量较高的机体细胞膜的结构发生变化,从而改变其对物质选择性透过的能力。加上脂质过氧化又可破坏维生素,使蛋白质、酶、激素以及核酸等变性失活,引起溶酶体颗粒崩溃,造成细胞破坏或死亡,释放出大量 MDA,使血清内 MDA 含量升高。胡国良的研究也证明了这一点。

本试验结果表明,在日粮中添加 4% 中草-0.2% 甜菜碱效果最好,能明显降低血清中的 MDA 含量,从而减少过氧化对机体的损害。其原因与中药-甜菜碱复方提高血清 SOD 活性的原因类似,SOD 活力高低间接反应了机体清除氧自由基的能力,而 MDA 的高低

又间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度。中药-甜菜碱复方能提高 SOD 活力,SOD 通过歧化反应清除了细胞中的氧自由基,使氧自由基减少,从而降低了脂质过氧化程度,因此脂质过氧化物 MDA 也减少了。这与魏彦明、李文雄的研究结果是一致的。另外,中药中含有大量的维生素(VE、VA 等)生物抗氧化剂,其保护作用包括对脂质过氧化的抑制作用。

3.3 中药-甜菜碱复方影响 NO 含量的原因

高温应激可能造成机体血液循环系统、呼吸系统、消化系统、内分泌系统以及机体组织结构等方面的损伤,NO 可能与热应激时循环机能障碍的发生有密切关系。NO 作为一种新型的细胞信使或效应分子,既是自由基,又是心血管机能的重要调节物质,同时也是重要的神经递质,具有独特的理化性质和生物学活性,内源性 NO 含量增加,对微循环具有一定的改善作用,它是机体的保护性反应。热应激初期,机体防御反应产生的炎性介质激活诱生型一氧化氮合酶(iNOS)时,产生大量的 NO,从而使损伤区的运动神经元表达 NOS,血清中 NO 和 NOS 含量水平升高。本试验结果表明,添加 0.8% 中药-0.2% 甜菜碱和 1.2% 中药-0.2% 甜菜碱都能显著提高第一阶段血清中 NO 含量。说明中药-甜菜碱复方能激活了诱生型一氧化氮合酶,使血清中 NO 和一氧化氮合酶含量水平升高,进而改善微循环。这与王凯等的推断结果一致。

从试验结果可以看出,第二阶段对照组的血清 NO 含量比第一阶段有一定的上升,试验组与对照组相比,无显著差异。说明中药-甜菜碱复方在第一阶段中可以有效的解除微循环障碍,提高内源性 NO 含量。由于 NO 生成增多可以减轻白细胞血小板的聚集及粘附程度,从而减轻对内皮细胞的损伤,抑制白细胞激活,减少氧自由基、溶酶体酶等杀伤因子的释放,减轻组织损伤,反过来抑制 NO 的持续增多。另外,前面的 SOD、MDA 试验也间接说明,中药-甜菜碱复方能有效缓解自由基代谢造成的机体损伤,使血清中 NO 释放减缓,当然不排除机体已慢慢适应高温环境,内环境日趋稳定的因素。关于中药-甜菜碱复方影响 NO 生成的机制有待进一步的研究。

4 结论

中草药-甜菜碱复方能显著提高高温环境中三黄鸡血清 SOD 活性和 NO 含量,减少 MDA 的含量,减少自由基的蓄积,对缓解热应激,稳定内环境具有一定的作用。从经济效益角度考虑,以添加 0.8% 中药-0.2% 甜菜碱为最佳选择。

(参考文献 19 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:王芳,xfang2005@163.com)

半胱胺对三黄肉鸡生产性能及肉质的影响

邵秀林 罗献梅 龙翔

近年来,随着养禽业的发展,关于半胱胺(Cystimine,CS)促生长作用的研究报道较多,CS的主要成分是动物机体内天然存在的一种生理活性物质,是辅酶A的组成成分,因含有活性巯基和氨基而具有多种生物作用。CS可作用于机体内的生长抑素,并间接影响与生长直接有关的激素分泌,从而促进动物生长,提高其生产性能,并且CS的应用效果无动物种属差异性,适用范围广,应用方便,成本低廉,是一种较好的生长调节剂,同时作为生长抑素(SS)的抑制剂,可有效的降低SS,是一种较好的通过神经内分泌途径调节动物生长的生理调节剂,在畜牧生产中有较好的应用前景。

半胱胺的添加量不同也会对肉鸡各个方面的性能有一定的影响。为此,本试验采用添加了不同量的半胱胺日粮来饲喂肉鸡,探讨其对肉鸡生长性能、氮代谢及屠宰性能方面的影响,旨在研究半胱胺在饲料中持续添加的有效性及其适宜剂量,为CS在肉鸡饲料中推广应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验动物与试验设计

采用单因素试验设计,将160只30日龄的三黄肉鸡随机分成1个对照组和3个试验组,每组设4个重复,每个重复10只鸡。试验组在基础日粮中添加半胱胺剂量分别为每千克体重50、100、150 mg,饲喂4周,每周饲喂半胱胺1次。使用时先将半胱胺溶于水,再与饲料拌匀。

1.2 试验日粮(见表1)

表1 基础日粮配方及营养水平

项目	组成(%)	营养水平	
玉米	67.00	代谢能(MJ/kg)	11.92
大豆粕	26.50	CP(%)	18.00
鱼粉	1.80	N(%)	2.88
植物油	1.20	有效P(%)	0.40
磷酸钙	1.80	Ca(%)	0.80
石粉	0.40	Lys(%)	0.85
食盐	0.30	Met(%)	0.30
预混料	1.00		

邵秀林,西南大学荣昌校区动物科学系,402460,重庆。

罗献梅(通讯作者)、龙翔,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-02-18

根据NRC(1994)肉仔鸡营养需要配制玉米—豆粕型基础日粮,见表1。

1.3 生长试验

试鸡全部饲养在半开放式鸡舍,笼养,按肉仔鸡常规饲养管理方法进行,自由采食,保持充足的饮水。定期进行常规消毒和疾病免疫。

1.4 代谢试验

代谢试验是在生长试验的基础上进行的,在生长试验结束后,每组选中等体重的试鸡4只,共16只鸡进行代谢试验,预试期3 d,正试期6 d。在整个代谢试验期间,每天记录肉鸡的采食量。采取全粪、尿收集法,每日收集鸡粪2次,在收集鸡粪时,需仔细拣出羽毛、皮屑等杂物,然后称重混匀,再将1/3的鸡粪放入集粪瓶中,按100 g鲜粪加入10%硫酸20 ml处理,在低温下保存,制样。

1.5 屠宰试验

在代谢试验结束后,每组选中等体重的试鸡4只,共16只鸡进行屠宰试验,取左半胴体的胸肌、腿肌和所有腹脂,取腹部板油和肌胃周围脂肪(肠脂不易剥离故不计算在内),称重。

1.6 测定指标

根据试鸡始重和末重,计算体增重、日增重、料重比和采食量。测定饲料原料和粪中的含氮量,计算消化氮、沉积氮及蛋白质的生物利用率。

氮的消化率(%)=(食入氮-粪氮)/食入氮;

沉积氮=食入氮-(粪氮+尿氮);

蛋白质的生物学利用率(即氮的生物学价值,%)=沉积氮/吸收氮;

胸肌率(%)=胸肌重/全净膛重;

腿肌率(%)=腿肌重/全净膛重;

腹脂率(%)=(腹脂重+肌胃外脂肪重)/全净膛重;

全净膛率(%)=全净膛重/活重。

1.7 数据处理及统计分析

采用SPSS11.5数据软件进行统计分析并作方差分析及多重比较。

2 结果与分析

2.1 半胱胺对三黄肉鸡生产性能的影响(见表2)

从表2可以看出,随着CS添加剂量的增加,肉鸡生产性能提高。试验1组试鸡的末重、总增重、日增重

均显著高于对照组($P<0.05$);试验 2 组和 3 组的末重、总增重、日增重均极显著高于对照组($P<0.01$);试验 2、3 组之间差异不显著。与对照组相比较,试验 1、2、3 组

的日增重分别提高了 4.91%、9.05%、10.28%;料重比与对照组相比,分别降低了 3.54%($P>0.05$)、5.01%($P<0.05$)、6.19%($P<0.05$)。

表 2 半胱胺对三黄肉鸡生产性能的影响

项目	起始重(g)	末重(g)	总增重(g)	日增重(g)	料重比
对照组	453.2±33.5	1 292.0±121.8 ^a	838.8±65.3 ^a	29.96±2.74 ^a	3.39±0.32 ^a
1 组	452.6±32.8	1 332.6±119.7 ^{ab}	880.0±82.6 ^{ab}	31.43±3.07 ^{ab}	3.27±0.41 ^{ab}
2 组	453.4±31.8	1 368.2±153.5 ^{ab}	914.8±102.4 ^{ab}	32.67±2.46 ^{ab}	3.22±0.28 ^b
3 组	452.8±33.4	1 377.8±128.3 ^{ab}	925.0±78.9 ^{ab}	33.04±3.42 ^{ab}	3.18±0.46 ^b

注:同列数据肩标含有相同字母表示差异不显著($P>0.05$);不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。

2.2 半胱胺对三黄肉鸡氮代谢的影响(见表 3)

表 3 半胱胺对三黄肉鸡氮代谢的影响

项目	日摄入氮量(g)	日排泄氮量(g)	日沉积氮量(g)	沉积率(%)
对照组	2.92±0.23	1.49±0.12 ^a	1.43±0.11 ^a	48.96±3.95 ^a
1 组	2.95±0.19	1.43±0.09 ^{ab}	1.52±0.08 ^{ab}	51.53±4.12 ^{ab}
2 组	3.03±0.20	1.40±0.13 ^b	1.63±0.14 ^b	53.80±4.36 ^b
3 组	3.02±0.25	1.38±0.16 ^b	1.64±0.10 ^b	54.30±2.97 ^b

从表 3 可以看出,在日摄入氮量基本一致的情况下,试验各组的日沉积氮量和沉积率均高于对照组,日排泄氮量均低于对照组。与对照组相比,试验 1 组日排泄氮量、日沉积氮量和沉积率差异不显著($P>0.05$);试验 2 和 3 组日沉积氮量和沉积率均显著高于对照组($P<0.05$),试验 2 组与 3 组之间的日摄入氮量、日排泄氮量、日沉积氮量和沉积率差异不显著($P>0.05$)。试验 1、2、3 组的氮沉积率与对照组相比分别提高了 5.25%、9.9%、10.91%。

2.3 半胱胺对三黄肉鸡屠宰性能的影响(见表 4)

表 4 半胱胺对三黄肉鸡屠宰性能的影响(%)

处理	全净膛率	胸肌率	腿肌率	腹脂率
对照组	67.8±5.32	23.7±1.89 ^a	13.44±1.09 ^a	2.64±1.09
1 组	68.2±6.16	24.1±2.02 ^{ab}	13.58±2.03 ^{ab}	2.58±0.96
2 组	67.5±4.94	24.8±1.97 ^b	13.81±1.59 ^b	2.41±1.24
3 组	68.1±7.02	25.2±2.14 ^b	14.14±1.9 ^b	2.44±1.38

从表 4 可以看出,各试验组的全净膛率(除 2 组外)、胸肌率、腿肌率均高于对照组,腹脂率均低于对照组。与对照组相比,各组胸肌率分别提高了 1.69% ($P>0.05$)、4.64% ($P<0.05$)、6.33% ($P<0.05$);腿肌率也分别提高了 1.04% ($P>0.05$)、2.75% ($P<0.05$)、5.21% ($P<0.05$)。全净膛率、腹脂率各组之间存在差异,但不显著($P>0.05$)。试验 2 组与 3 组之间的全净膛率、胸肌率、腿肌

率以及腹脂率的差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

本试验结果表明,半胱胺可以提高三黄鸡生产性能,提高氮沉积量、胸肌率和腿肌率。与前人的研究结果一致。韩正康等(1992)采用每周每千克体重一次性口服 100 mg CS 的方式处理 21 日龄红布罗肉仔鸡,试验组日增重提高 5.30% ($P<0.05$),料比重降低 5.7%。权志忠等(2002)在肉鸡日粮中每千克体重添加 100、150 mg CS,日增重较对照组分别提高 7.8%、6.0%;饲料转化率分别提高 3.88%、5.60%。半胱胺发挥作用的机理可能有两种:①CS 可能通过降低生长抑素含量的途径来提高体内的生长激素水平,促进氮沉积而加快动物生长;②CS 还可能通过抑制多巴胺-β-羟化酶的活性,从而抑制多巴胺 DA 向去甲肾上腺素 NE 转化,导致多巴胺含量显著升高,而多巴胺在下丘脑可促进生长激素的合成和分泌,从而促进动物的生长。

4 结论

在三黄鸡基础日粮中按每千克体重添加 50、100 和 150 mg 的半胱胺能提高三黄肉鸡的生产性能,降低了料重比;提高氮沉积量、胸肌率和腿肌率。本试验结果表明,以饲料添加剂形式在日粮中持续添加 100 mg/kg 和 150 mg/kg 的 CS 对三黄鸡均有明显的促生长作用。但两个试验组各性能指标的差异不显著,综合考虑生产成本,建议生产中半胱胺添加剂量为每千克体重 100 mg。

(参考文献 10 篇,刊略,需者可函索)
(编辑:王 芳,xfang2005@163.com)

牛膝多糖的生物学功能研究进展

刘祝英 贺建华

牛膝多糖 (Achyranthes bidentata polysaccharide, ABP)是由苋科植物牛膝(achyranthes bidentata)的根经水提、反复醇沉所得。它是由果糖-葡萄糖组成的小分子化合物,牛膝多糖是体内重要的信息分子,具有广泛的生物学活性。近几年来,国内外对牛膝多糖做了大量研究,本文就近几年来牛膝多糖的生物学功能研究进展做一综述。

1 牛膝多糖的生物学功能

1.1 延缓衰老与抗氧化作用

衰老是细胞和生物生命周期中的一个自然过程,主要由细胞氧化所致。体内某些抗氧化酶,如超氧化物歧化酶(SOD),能与机体代谢所产生的超氧阴离子自由基(O_2^-)进行歧化反应,将其清除;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)能清除细胞内的有害代谢产物,如 H_2O_2 、 OH^- 、 O_2 和RO等。王洪伟等(2006)研究发现,牛膝多糖可显著提高大鼠SOD活性,降低丙二醛(MDA)浓度,提高大鼠的抗氧化能力。TAN Feng等(2002)以果蝇为动物模型研究牛膝多糖组分的抗衰老作用发现,小分子量组分可显著增加果蝇平均体重,增幅为3.85%~5.47%,并使果蝇平均寿命延长2.61%~3.16%。崔丽等(1999)探讨了牛膝多糖对衰老免疫系统的作用机制表明,ABP能显著提高老年小鼠T淋巴细胞中肿瘤坏死因子(TNF- β)和可溶性白细胞介素2受体(sIL-2R)的含量。

自由基学说认为,衰老过程可能由细胞和组织中不断进行着的自由基损伤所致。D-半乳糖可导致动物体内的自由基过多而引起衰老。梁越欣等(2004)研究发现,ABP能提高经 $100 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 处理的人胚肺二倍体成纤维细胞(2BS)的存活率,降低细胞的 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色阳性率以及丙二醛水平,抑制细胞的单胺氧化酶B(MAO-B)活性,增强SOD活

力,起到延缓衰老的作用。所以,ABP在动物体内的抗氧化途径可能有两种:一是ABP直接清除体内过多的自由基;二是通过提高动物抗氧化酶活性的间接作用来清除过多自由基。

1.2 抗肿瘤作用

牛膝多糖能抑制肿瘤引起的白细胞数量下降,恢复免疫系统的创伤,起到恢复肝功能、增强骨髓造血功能、抑制肿瘤生长的作用。邵树军等(2002)研究表明,给小鼠每天每千克体重注射60 mg ABP,能显著提高免疫力低下小鼠的自然杀伤细胞(NK)以及外周血中肿瘤坏死因子(TNF)的活性;还能增强正常小鼠外周血中NK细胞及TNF活性;牛膝多糖能显著抑制小鼠移植性肉瘤 S_{180} 生长。张静燕等(2003)以牛膝多糖类化合物为主要原料,制成牛膝合剂,用于改善肿瘤病人化疗后引起的白细胞数量减少,效果明显。吕建新等(1999)研究通过ABP对体外培养的人胸腔巨噬细胞内乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)和酸性磷酸酶(Acid phosphatase, ACP)活性的调节作用,以及对人胸腔巨噬细胞表达肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)的诱导作用,探讨ABP对活化巨噬细胞的激活作用,发现牛膝多糖能提高胸腔巨噬细胞内乳酸脱氢酶和酸性磷酸酶活性,并能显著诱导胸腔巨噬细胞表达肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-6,而且对肿瘤坏死因子- α 的诱导表达具有显著的剂量效应。因此,认为牛膝多糖可诱导巨噬细胞表达细胞因子,并对巨噬细胞具有激活作用。

余上才等(1995)观察了ABP对 S_{180} 荷瘤小鼠的抑瘤作用与免疫效应,以及对体外培养的小鼠腹水型肉瘤 S_{180} 细胞增殖的影响,并从膜唾液酸、磷脂和胆固醇含量变化对其作用机制进行研究,结果表明,ABP对 S_{180} 荷瘤小鼠有明显抑制肿瘤作用,且与化疗药物环磷酰胺(在无明显抑瘤作用的剂量时)有协同抗肿瘤作用;ABP能显著提高 S_{180} 荷瘤小鼠脾细胞诱生杀伤细胞(LAK)活性和肿瘤坏死因子- β (TNF- β)生成。已知TNF在体外能杀伤肿瘤细胞,在体内能导致肿瘤出血性坏死。LAK是由来自胸腺的淋巴细胞经白细胞介素-2(IL-2)诱导演化而来的,具有广泛杀伤肿瘤细

刘祝英,湖南农业大学动物营养研究所,410128,湖南。

贺建华,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-01-23

★ 湖南农业大学青年科研基金资助项目(05Nk1001-03)

胞和异质细胞的能力,而对正常细胞无毒性。对 S₁₈₀ 细胞膜成分进行分析显示,ABP 与细胞接触 24 h 能引起细胞膜唾液酸含量升高,膜磷脂含量降低,这些变化差异均显著,提示其抗肿瘤机制与改变细胞膜生化特征有关。张健等(2003)研究羟乙基化牛膝多糖的合成及其活性研究药理试验表明,羟乙基化牛膝多糖对荷 Lewis 肺癌小鼠 NK 活性具有一定促进作用。ABP 体外对 S₁₈₀ 细胞无直接影响作用,但能增强巨噬细胞对 S₁₈₀ 的杀伤作用,且其抑制肿瘤机理与提高荷瘤小鼠自然杀伤细胞活性及植物血凝素(LPS)诱生的血清肿瘤坏死因子(TNF- α)产生有关。因此,ABP 是一种值得进一步开发的抗癌化合物。

1.3 免疫调节作用

1.3.1 非特异性免疫

巨噬细胞有重要的防御功能,它具有趋化性定向运动、吞噬和清除异物及衰老死亡细胞的功能,分泌多种生物活性物质及参与调节机体免疫应答。牛膝多糖可促进巨噬细胞分泌细胞因子,增强免疫功能。用牛膝多糖对体外培养的人胸腔巨噬细胞进行诱导培养 24 h,结果表明,牛膝多糖能上调胸腔巨噬细胞内乳酸脱氢酶和酸性磷酸酶活性,并能显著诱导胸腔巨噬细胞表达肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-6,牛膝多糖可诱导巨噬细胞表达细胞因子,并对巨噬细胞具有激活作用。唐黎明等(1996)以碳粒廓清指数、血清溶血素水平等免疫学指标观察牛膝多糖对小鼠免疫系统的影响,结果表明,牛膝多糖能提高小鼠单核巨噬细胞的吞噬功能,明显增加血清溶血素水平。

自然杀伤细胞在抗病毒感染中有着重要的作用,它能直接杀伤病毒感染细胞,主要通过自然杀伤来控制病毒感染。向道斌等(1994)研究发现,50~800 mg/l ABP 在体外能增强天然杀伤细胞的活性,ABP 在体外能剂量依赖性增强 NK 细胞活性,且效果显著。

1.3.2 特异性免疫

特异性免疫在抗微生物感染中起关键作用,其效应比先天性免疫强,分为体液免疫和细胞免疫。体液免疫的抗感染作用主要是通过抗体来实现的。抗体在动物体内可发挥中和作用、对病原体生长抑制作用、局部粘膜免疫作用、免疫溶解作用、免疫调节作用和抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用。有研究发现,牛膝多糖可明显提高小鼠抗体形成细胞的数量。50 mg/kg ABP 能明显提高血清总 IgG 及特异性抗体溶血素的含量,还能对抗环孢霉素 A 引起的空斑形成细胞(PFC)及 IgG 下降,能增强小鼠的体液免疫功能。王宇

学等(2005)研究发现,牛膝多糖在体外能增强单核细胞活性,上调单核细胞 HLA-DR α 表面分子的表达,ABP 还有增强单核细胞的抗原呈递功能。

参与特异性细胞免疫效应的 T 细胞主要是细胞毒性 T 细胞和迟发型变态反应 T 细胞。宋义平等(1998)研究发现,牛膝多糖可协同 LPS 诱导 B 淋巴细胞分裂增殖,促进 TNF- β 产生,在体内可以显著地促进 H₂₂ 肝癌小鼠生成 IL-2 及促进 LAK 细胞的形成,因此,可初步认为 ABP 能促进小鼠细胞免疫功能。季敬璋等(2003)用不同浓度的牛膝多糖对人 T 细胞进行体外诱导培养,用 ELISA 方法测定培养上清液的 IFN- γ 及 IL-4 的蛋白表达情况,结果表明,T 细胞受不同浓度 ABP 刺激,IFN- γ 分泌水平与 ABP 浓度相关,在浓度为 400 μ g/ml 时,IFN- γ 表达量最高;在蛋白表达水平上证实了 ABP 能诱导 T 细胞分泌 IFN- γ ,能够促进 Th1 型细胞因子的分泌,且该作用呈剂量依赖性。

1.4 治疗哮喘

支气管哮喘(以下简称哮喘)是由嗜酸性粒细胞、T 淋巴细胞等多种细胞和细胞组分参与的常见慢性呼吸道疾病。CD4⁺T 细胞受细胞因子、抗原特性(多糖类等)、激素等因素的影响,可分化为 Th1 和 Th2 细胞。Th1 型细胞因子(以 IFN- γ 为代表)和 Th2 型细胞因子(以 IL-4 为代表)两者可彼此调节,正常情况下两者相对平衡,维持正常的免疫功能。已发现肿瘤、变态反应性疾病等多种疾病有 Th1 与 Th2 漂移现象。Th1 与 Th2 的比例失衡也是支气管哮喘的重要免疫学发病机制之一。季敬璋等(2006)以牛膝多糖(800 mg/l)对哮喘病人外周血单个核细胞(PBMC)进行体外诱导培养,18 h 后以 RT-PCR 检测 IFN- γ 和 IL-4 的基因表达率,用牛膝多糖在不同时间内和不同剂量分别对 Th 细胞进行体外诱导其分化,并分别收集细胞悬液和抽提细胞中 RNA,采用 RT-PCR 和 ELISA 检测 Th 细胞所分泌的 IFN- γ 和 IL-4 的量,结果表明,应用牛膝多糖能初步纠正哮喘患者 Th1 和 Th2 细胞因子的失衡,能在转录水平和翻译水平促进 Th1 类细胞因子的分泌,而抑制 Th2 类细胞因子的分泌。胡晓光等(2004)研究牛膝多糖对哮喘 Th1 与 Th2 比例失衡的免疫调节作用,研究表明,牛膝多糖能抑制 Th2 型细胞因子白细胞介素 4(IL-4)的分泌并促进外周血 IFN- γ 的生成,ABP 对纠正哮喘 Th1 与 Th2 比例失衡有明显效果。

李昌崇等(2006)研究牛膝多糖对支气管哮喘大鼠

支气管信号转导子和转录激活子 6(STAT6)及其 mRNA 表达的影响,观察到 ABP 通过抑制 STAT6 信号转导途径调控细胞因子的表达,有抑制哮喘气道嗜酸性粒细胞(EOS)性炎症的作用。采用幼年 SD 大鼠哮喘模型,探讨 ABP 对哮喘气道炎症作用及机制,研究发现,ABP 能明显减轻哮喘大鼠的气道炎症,表现为 EOS 等炎症细胞在气道浸润明显减少。有研究表明,ABP 可通过调节 EOS 凋亡基因 fas、bcl-2 的表达,进而促进 EOS 在哮喘气道中凋亡,以至减轻或预防哮喘气道炎症的形成。但 ABP 治疗哮喘的最佳剂量、疗程以及可能出现的副作用还有待进一步的研究。

1.5 通络活血作用

牛膝多糖具有活血祛淤、补肝肾、引血下行之功效。粒细胞与单核巨噬细胞起源于粒单系造血祖细胞(CFU-GM),CFU-GM 膜表面有与粒单系集落刺激因子(GM-CSF)相结合的受体,机体的粒单系造血调控主要在此阶段进行。汪声恒等(1995)研究发现,当加入 100 mg/l ABP 即表现出对骨髓细胞粒单系祖细胞、混合祖细胞(CFU-mix)增殖有刺激作用,且随着加入 ABP 浓度提高,集落产率也逐步增加,得出牛膝多糖有改善造血功能的作用。严善福等(2003)研究了中药牛膝多糖刺激骨髓粒细胞集落形成的能力,发现牛膝多糖能有效促进粒系集落形成单位(CFU-G)的形成,并与粒细胞集落刺激因子有明显的协同作用,有粒细胞刺激因子的作用。

1.6 降低血糖

李海泉(2004)研究表明,牛膝多糖能够降低由四氧嘧啶和肾上腺素所致的小鼠血糖升高,促进糖尿病小鼠肝糖元合成,而对正常小鼠血糖无明显影响。牛膝多糖的降低血糖作用及免疫调节等作用可能是牛膝用于防治糖尿病的主要药理学基础。ABP 降低血糖的作用并无剂量依赖效应,以 1.0 g/kg ABP 效果最好,0.5 g/kg ABP 效果次之,说明 ABP 降低血糖作用有其最佳剂量。

1.7 其它作用

毛平等(2000)研究发现,牛膝多糖能延长小鼠凝血时间(CT)、大鼠血浆凝血酶原时间(PT)、白陶土部分凝血活酶时间(KPTT),有明显的抗凝血作用。牛膝多糖经硫酸化、羟基化生成的衍生物具有较强的抗病毒活性,能有效抑制乙型肝炎病毒 HBsAg 和 HBeAg 的活性,对 I 型单纯性疱疹病毒也有明显的抑制作用。彭颖等(2002)使用 Hela 细胞进行了粘附试验及粘附抑制试验,研究牛膝多糖对大肠埃希菌的细胞

粘附的影响,结果发现,牛膝多糖浓度为 0.8 mg/ml 时,对细菌的细胞粘附抑制效果最为明显,每个细胞粘附率由(257.0±5.2)个细菌降低到(63.6±3.6)个细菌。牛膝多糖对大肠埃希菌的细胞粘附具有抑制作用,说明牛膝多糖具有调节肠道微生态环境的潜在应用价值。

2 应用前景与展望

我国中草药资源丰富,目前在畜牧生产中使用的陆地中草药大概有 1 000 多种,常用的有 200 多种,牛膝多糖具有调节机体免疫、延缓衰老、有效治疗哮喘、抗病毒、抗肿瘤和抗氧化等作用,在临床上和畜牧业中具有广阔的应用前景。

在临床上,牛膝多糖具有安全性高、作用稳定、副作用小、适用面广、对机体损害小、既可注射又可服用等优点,已作为一种中草药应用于肿瘤等疾病的防治。将牛膝多糖开发为天然药物免疫促进剂和调节剂并应用于一些疾病的防治方面具有广阔的前景。

在畜牧业生产中将牛膝多糖开发为绿色环保型饲料添加剂,这对真正意义上减少抗生素等药物添加剂在饲料中的使用,推进动物饲料“无抗生素化”或尽量少用抗生素的进程,对保证畜产品的安全和我国畜牧业可持续发展具有重大意义。

(参考文献 32 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

征订启事

欢迎订阅 2007 年《饲料工业》

本刊为半月刊,大 16 开本,每期正文 64 页,公开发行,各地邮局均可订阅,也可直接向本刊发行部订购。国际标准连续出版物号 ISSN 1001-991X,国内统一连续出版物号 CN21-1169/S,邮发代号:8-163。每期定价 6 元,全年 24 期共 144 元。

地址:沈阳市金沙江街 16 号 6 门
邮编:110036
发行部电话:024-86391237

反刍动物的理想氨基酸与小肠氨基酸供给模式的研究

王梦芝 曹恒春 李国祥 王洪荣 郝青

随着对反刍动物蛋白质营养研究的深入,以小肠氨基酸为基础的新蛋白质体系逐步代替传统的粗蛋白或可消化粗蛋白等营养体系,新的体系更能反映反刍动物蛋白质消化代谢的实质,从而准确地指导饲养实践。小肠氨基酸的数量及比例不仅影响氨基酸在肠内的吸收和利用,而且和反刍动物的生产性能及成本密切相关。如何调节小肠可吸收氨基酸间的配比及平衡,使其成为理想氨基酸,满足动物的需求和效益的最大化,已成为20世纪90年代以来反刍动物氨基酸营养研究的重点。营养是动物的客观要求,饲料是营养素供应途径,营养与饲料科学研究的目标是解决畜禽对营养“求”与“供”的矛盾。因而研究反刍动物氨基酸营养的重点在于动物氨基酸需要和小肠平衡的理想氨基酸供给两个方面。

1 反刍动物氨基酸需求

1.1 必需氨基酸(EAA)

EAA是指动物机体不能合成、或合成速度不足以满足动物需要的AA。在组成蛋白质的20种主要AA中,Arg、His、Ile、Leu、Met、Phe、Thr、Trp、Val被认为是EAA。目前还没有证据表明非必需氨基酸(NEAA)的缺乏会导致机体蛋白质合成效率的降低,但当EAA满足动物需要量时,动物总AA需要量将下降,蛋白质合成效率最大(NRC,2001)。反刍动物生长、维持以及其它代谢活动的AA需要量认为与单胃动物相似。Black等(1957)用¹⁴C-乙酸对母牛和绵羊试验,结果在苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和赖氨酸中回收的放射性物质仅是痕量,而NEAA中则含有大量放射性物质。高产奶牛90%的蛋白质进食量(45 kg/d)是供给产奶需要的,其AA需要量与牛奶中AA的组成相似。乳腺组织除需要从血液中摄取与单胃动物相同的10种EAA以外,还需摄取Tyr(Mephram,1982)。EAA中Met、Phe、Trp、Tyr是产奶高峰期需要大量供应的AA,其它EAA也被组织大量吸收,极少被排出体外。供给动物平衡的AA会降低动

物尿氮的损失,提高AA的利用率(Fraser等,1991)。

1.2 限制性氨基酸(LAA)

在动物的EAA中,若由于某一种AA含量不足而导致其它AA的利用率下降时,则称之为限制性氨基酸(LAA),限制程度依次为第一、第二和第三LAA。LAA及其组成模式是决定动物体内含氮物质利用率的重要因素。从某种意义上讲,动物对特定AA的需求比对特定蛋白质的需求更重要。Mohn等(1994)研究发现,在低Lys摄入情况下,Lys是生长猪的第一LAA,而其它EAA的添加对氮沉积无影响;在中等Lys摄入量下,Lys的限制虽存在,但有一定程度的缓解,且第二LAA也开始影响蛋白质沉积;当Lys高水平摄入时,Lys的摄入对蛋白质沉积无影响,其它AA则变为第一LAA,反刍动物中也同样存在LAA问题。

Nimrick等(1970)、Richardson和Hatfield(1978)、Storm等(1984)由真胃和十二指肠灌注AA或酪蛋白或瘤胃分离微生物蛋白的试验结果表明,在特定的饲用日粮条件下,进入反刍动物十二指肠的AA中可能存在LAA,且各种LAA的相对限制程度不同。Fraser等(1991)用以酪蛋白为唯一氮源的产奶牛试验表明,Lys、Met、His分别为第一、第二、第三LAA,Phe也存在潜在的限制作用。Schwab(1992)在泌乳奶牛上的试验表明,Lys是第一LAA,而Met在产奶高峰期是第二LAA;在产奶中期Lys与Met起协同限制作用。Merchen和Tigemeyer(1992)研究指出,Leu、Ile、Val和含硫AA为奶牛的潜在LAA。Vanhatalo等(1999)给不含玉米和蛋白质补充料的芬兰爱尔夏奶牛皱胃灌注6.5 g/d的His,结果发现,产奶量、乳蛋白分别提高了3.1%、3.7%,但乳蛋白含量没有变化。隋恒凤(2006)研究高粗料日粮条件下泌乳奶牛的LAA的试验表明,His+Lys+Met组与加His+Met组相比,血浆游离AA浓度中的His浓度较其它AA显著下降,两组His的浓度分别为199.07、252.68 μmol/l。推测His可能是继Lys与Met之后的又一LAA。NRC(2001)总结了大量研究表明:①乳蛋白含量比产奶量对补充Lys和Met的反应更敏感,尤其是产奶高峰以后的奶牛;②乳蛋白含量的增加与产奶量无关;③酪蛋白是乳蛋白中最受影响的部分;④当可代谢蛋白中其它AA达到或接近估测需要量时,乳蛋白增加对添加Lys和Met反应最敏感;⑤在产奶量方面,奶牛泌乳早期比中期和晚期对Lys和Met更敏感。

王梦芝,扬州大学动物科学与技术学院,225009,扬州。

曹恒春、李国祥、王洪荣(通讯作者)、郝青,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-02-22

★ 国家自然科学基金项目(编号为30571344)

Thronimrich(1970)研究发现,以尿素为唯一氮源的生长绵羊其 LAA 为 Met、Lys、Thr。Greenwood(2000)通过给生长牛的真胃灌注 AA 和酪蛋白的试验证明,生长牛的 LAA 为 Met、Arg、Leu。Korhonen 和 Vanhatalo 等(2002)报道,以青贮饲料为基础日粮时,His 是第一 LAA。Richardson 和 Hatfiel(1978)报道,当 MP 主要由微生物蛋白提供时,生长牛的 LAA 的顺序是 Met、Lys。王洪荣(1999)以豆饼、亚麻饼和血粉 3 种不同氮源为基础日粮研究生长绵羊的 LAA,结果表明,饲喂亚麻饼型日粮,Lys 和 Arg 分别为第一和第二 LAA;饲喂血粉型日粮,Met 和 Arg 分别为第一和第二 LAA;Met 为豆粕型日粮的第一 LAA。王洪荣(1999)采用十二指肠中连续灌注合成 AA 的方法,确定生长绵羊在玉米型日粮条件下的 LAA 次序和相对限制程度,LAA 次序为 Met、Thr、Lys、Arg、Trp 和 His,相对限制程度分别为 46.67%、28.66%、23.50%、17.33%、15.89% 和 15.00%,即第一、第二、第三 LAA 分别为 Met、Thr 和 Lys。董晓玲(2003)研究内蒙古绒山羊的 LAA,根据氮沉积得出 AA 的相对限制顺序为 Cys、Ser、Arg、Met、His (72.17%、54.25%、51.76%、29.07%、20.45%),并认为内蒙古绒山羊的 LAA 为 Met 和 His。而甄玉国(2004)的试验表明,Met 不是影响羊绒生长的主要 LAA。

上述研究反映了不同饲料、不同种类的反刍动物,在不同的生长时期和不同的生产目的情况下,对特定 AA 的需求不同。奶牛的主要 LAA 为 Lys 和 Met,原因可能是奶蛋白中 Lys 和 Met 含量比较高,而 Leu 和 Ile 为潜在 LAA,是因支链 AA 与能量有关,被

认为是一种供能 AA。生长牛和羊的 LAA 为 Met,可能与肌肉组织中 Met 含量高有关。但综合许多研究的结果可见,在反刍动物的常规日粮条件下,其普遍的 LAA 可认为是 Lys、Met、His 及支链 AA。

1.3 反刍动物小肠平衡的理想氨基酸(IAA)需要模式
不同种类的反刍动物,不同的生长时期和不同的生产目的,AA 的需要量和 IAA 模式都不同。NRC (1985) 提出绵羊用于维持的 EAA 建议的需要量分别是 Leu 250 mg、Ile 167 mg、Val 167 mg、Met 122 mg、Phe 272 mg、Thr 122 mg、Tyr 28 mg、Lys 300 mg、Arg 167 mg 和 His 78 mg。表 1 中 Owens(1986)的 EAA 模式适用于 250 kg 肉牛维持需要和 1 kg 的日增重需要。Φorskov (1992)肌肉模式与王洪荣(1999)肌肉模式(生长绵羊小肠可消化 IAA 模式,EAA 与 NEAA 比值为 1 : 1.01)不同。甄玉国 (2002) 研究得出的绒山羊小肠可吸收 IAA 模式与王洪荣所确立的绵羊 IAA 模式相比,绒山羊所需含硫 AA(SAA)的比例约为绵羊的 2 倍,所需 Leu 和 Ile 的量明显低于绵羊,其它 AA 则差异不大。Storm(1982)建议把乳蛋白或微生物蛋白 AA 模式作为奶牛 IAA 模式。由于微生物蛋白受日粮因素和内源蛋白的影响,现在生产多数以乳蛋白 AA 模式作为奶牛 IAA 模式。与表 1 中肌肉模式相比,乳蛋白中的 Met+Cys 较高。由此可见,不同种类的反刍家畜、不同的生长时期和不同的生产目标(如生产肉、产毛绒、泌乳等)下 IAA 模式具有特异性,因而需对特定条件下的反刍动物 AA 营养进行研究以确定特定条件下的 IAA 模式,不能单纯以产品或某些组织 AA 模式来确定特定条件下的小肠 IAA 模式。

表 1 小肠理想氨基酸需要模式

项目	Lys	Met+Cys	Thr	His	Arg	Leu	Ile	Ile	Phe	Trp	来源
肌肉	100	31.3*	55.2	38.7	103.1	104.3	43.6	43.6	54.6	15.3	Ainslie(1993)
肌肉	100	31.3*	60.9	39.1	51.6	104.7	43.8	43.8	54.7	9.4	NRC(1996)
肌肉	100	39.37	76.17	40.51	72.25	157.54	81.47	81.47	81.02		王洪荣(1998)
肌肉	100	39.77	46.94	32.65	62.24	73.47	46.94	46.94	39.78		Φorskov(1992)
肌肉	100	48.73	55.33	36.44	33.84	96.91	62.89	62.89	91.34	13.68	Owens(1986)
牛奶	100	35.5*	48.7	35.5	44.7	121.1	76.3	76.3	63.2	19.7	NRC(1996)
牛奶	100	34.4*	55.6	34.4	45.0	121.9	71.3	71.3	62.5	18.8	Jacobson(1970)

注:*为 Met。

2 反刍动物小肠氨基酸的供给

反刍动物小肠 AA 包括瘤胃微生物 AA 和饲料瘤胃非降解 AA 两大部分及少量的内源性 AA。与反刍动物小肠 AA 代谢密切相关的因素主要有:①进入小肠瘤胃微生物 AA 的数量与组成瘤胃微生物的 AA 组成;②过瘤胃饲料蛋白质的数量与 AA 的组成;③小肠对 AA 的吸收利用。由于瘤胃细菌与原虫间、饲料蛋白质与 MCP 间、饲料蛋白质与 RUP 间在 AA 组成比

例上的差异,进入小肠的 MCP 与 RUP 的相对数量和组成会直接影响小肠可吸收 AA 的数量与组成模式。从营养学的观点来说,确定到达十二指肠部位的氮源种类和数量是很重要的。一般来说,到达十二指肠的氮有 30%~100%来源于 MCP,其余来源于 RUP。瘤胃微生物 AA 是小肠 AA 的主要部分,就多数日粮而言,瘤胃中合成的微生物蛋白约占进入小肠总 AA 氮的 60%~85%(Buttery, 1988)。Clark 等(1992)总结了 152 篇

相关文献,得出微生物氮提供了流向十二指肠非氨态氮的 35%~66%。当不同的饲料蛋白引起微生物蛋白产量与组成改变及 RUP 量与组成改变时,供应宿主小肠 AA 的量与组成模式会改变,所以不能单纯由日粮 AA 组成或由日粮的 AA 组成+统一微生物蛋白组成模式作为其宿主小肠 AA 的供给模式来确定 LAA 的种类与顺序。

2.1 瘤胃微生物的 AA 组成模式

微生物蛋白产量多少与组成模式改变对小肠 AA 的供应都有影响,关于微生物蛋白产量的报道很多,如微生物生长效率、影响瘤胃微生物蛋白质合成的因素(碳水化合物与降解蛋白质供应的同步化、原虫蛋白质在瘤胃内的再循环、瘤胃食糜外流速度、脂肪添加等)等。

Ersmus(1994)的研究认为,在相同日粮蛋白水平、相同能量水平下,不同蛋白质饲料来源的瘤胃细菌 AA 组成有一定差异,如饲喂向日葵粕日粮时,瘤胃细菌中 Leu 和 Val 含量比喂血粉日粮时分别降低 12.5%和

10.1%,而 His 含量提高了 18.2%。并推测是不同日粮对微生物区系进行了选择,因为瘤胃细菌和原虫的 AA 组成有所不同。王洪荣(1999)在豆饼、亚麻饼和血粉 3 种不同氮源的试验中发现,微生物 AA 组成差异虽然未达到统计显著水平,但表观上豆饼型日粮和亚麻饼型日粮下瘤胃分离微生物的 AA 组成相近,饲喂血粉型日粮绵羊瘤胃分离微生物中 His、Leu、Val 和 Pro 以及 EAA 比例较豆饼型和亚麻饼型日粮有所提高,而 Ile 比例下降;豆饼型日粮下 Lys、Val、Tyr 和 Pro 比例较低,并认为可能是因为不同日粮对瘤胃细菌和原虫产量的比例不同所致,因为细菌和原虫中 Lys、His 含量有一定差异。甄玉国等(2004)研究了日粮中添加无机硫对绒山羊和绵羊瘤胃微生物蛋白 AA 组成的影响,结果表明,绒山羊瘤胃微生物利用无机硫合成微生物蛋白的能力显著高于绵羊,其瘤胃混合微生物在含硫与不含硫日粮条件下 Met+Cys 变化很大,含硫日粮远高于不含硫日粮,而绵羊则变化不大。这也提示瘤胃混合微生物由于动物的不同、日粮的不同,其 AA 组成也不同(见表 2)。

表 2 瘤胃微生物的氨基酸组成模式

项目	Lys	Met+Cys	Thr	His	Arg	Leu	Ile	Val	Phe	Trp	来源
S-Deit	100	85.99	76.63	19.79	53.65	84.73	79.28	87.92	67.33	17.53	甄玉国(2004) ^a
NS-Deit	100	55.24	82.73	20.30	59.12	102.35	79.83	82.87	69.89	18.37	甄玉国(2004) ^a
S-Deit	100	35.70	82.22	20.52	60.19	104.24	84.54	87.55	74.42	18.60	甄玉国(2004) ^a
NS-Deit	100	36.48	82.38	20.77	62.16	103.42	80.87	86.48	73.63	18.72	甄玉国(2004) ^a
细菌	100	50.88	66.25	26.81	55.4	93.53	61.87	68.67	114.26	19.16	Titgemeyer(1989) ^b
细菌	100	32.91 ^{**}	71.96	25.32	64.56	103.16	72.78	79.11	64.56	17.09	Clark 等(1992) ^c
细菌	100	30.12 ^{**}	68.07	25.3	62.65	95.78	69.28	74.1	60.84	16.26	Storm 等(1982) ^d
原虫	100	20.39 ^{**}	50.97	18.45	45.15	76.7	61.65	47.09	51.94	13.59	Storm 等(1982) ^e

注:a.摘自甄玉国(2004),瘤胃微生物;b.摘自 Titgemeyer (1989),肉牛;c.Clark 等(1992)的 61 个饲料处理的平均值;d.

Storm 和 rskov(1982)62 篇文献的平均值;e.Storm 和 rskov (1982)15 篇文献的平均值;* 为芳香氨基酸;** 为 Met;S-Deit 及 NS-Deit 为含硫与不含硫日粮。

Martin(1996)分析了不同日粮组成(100%干草,65%干草+35%大麦)及饲喂后不同采样时间对瘤胃中原虫、固相菌、液相菌的 AA 组成的影响,结果显示,一方面,各微生物组分(固相菌、液相菌、原虫)的 AA 组成不受饲喂后时间及日粮组成(除去 Glu 和 Leu)的影响,由此推测,AA 组成是瘤胃原虫、细菌各不同区系固有的特性,它不随日粮、瘤胃 pH 值、微生物代谢活动而变化;另一方面,得到固相菌和液相菌的 17 种 AA 中的 10 种有差异;原虫与细菌 17 种 AA 中的 13 种有差异。与液相菌相比,固相菌中 Leu、Phe、His、Asp、Cys 和 Met 的含量较高,Thr、Ala、Gly 和 Asp 的含量较低,他认为该差异可能是液相菌、固相菌的菌种不同造成的,且有证据表明二者分解糖的能力不同。Chiquette 等(1998)曾观测到瘤胃微生物中 Arg、Asp、G1u 和 Leu 等 4 种

AA 的相对组成受日粮的影响。他们发现,G1u、Leu、Lys、Met、Phe 和 Pro 在固相菌中的含量较高,而 Ala、Gly、Thr 和 Val 在液相菌中的含量较高。周勃(2000)试验发现,液相菌与固相菌相比有 6 种 AA 的含量存在显著差异,其中 Cys、G1u、Ala 的含量显著高于固相菌,而 Leu、His、Pro 的含量则相反。另外,日粮对瘤胃微生物的 AA 组成能够产生明显影响,而且对不同组分的影响也不相同。Huerlplund(2001)总结了 70 个研究结果,认为微生物蛋白 AA 组成有本质的不同。Korbonen (2002)综合前面的研究结果发现,日粮会通过调节微生物各区系比例来影响混合微生物的 AA 组成。从表 2 列出的部分报道来看,瘤胃微生物的 AA 的组成模式各不相同,其中以 Met+Cys 或 Met 和 Leu 变化幅度较大,原虫与细菌相比,Val、Met、His、Ile 比例较低。

2.2 饲料供给小肠的氨基酸量与模式

饲料供给小肠的 AA 量与模式取决于瘤胃降解率及未降解蛋白质的组成模式。不同的日粮蛋白 AA 组成与水平不同,未降解蛋白质的数量和组成也不同,供给小肠的 AA 量与组成模式不同。

不同的日粮蛋白瘤胃降解率不同(见表 3)。由表 3 可知,谷物类饲料蛋白的降解率一般在 80%左右,饼粕类饲料蛋白的降解率一般在 60%左右,经保护处理,进入小肠的蛋白量则可达 60%以上。鱼粉的降解率很低,优质鱼粉降解率低于 30%。

表 3 各类饲料蛋白在瘤胃中的降解率

类别	饲料	降解率(%)
A	青草、大麦、小麦、豆粕(饼)、菜籽粕(饼)、向日葵粕(饼)	80(71-90)
B	青干草、青贮料、热处理豆粕(饼);棉籽、葵花籽、亚麻等粕(饼)	60(51-70)
C	压扁的大麦、玉米、鱼粉、肉骨粉	40(31-50)
D	甲醛处理的精料、压扁的小麦、肉粉、羽毛粉、血粉	<30(0-30)

表 4 不同饲料蛋白的过瘤胃氨基酸量(g)

氨基酸	豆粕	玉米面筋粉	血粉	鱼粉	苜蓿粉
赖氨酸	11.8	11.5	60.2	35.7	7.5
蛋氨酸	0	10.2	2.4	7.4	3.7
胱氨酸	0	7.4	4.5	1.1	-
组氨酸	1.4	11.8	41.6	7.2	1.9
精氨酸	9.3	24.5	33.1	32.5	9.6
苏氨酸	3.4	19.8	22.4	15.5	7.0
缬氨酸	10.2	46.6	61.8	26.6	11.0
异亮氨酸	9.9	28.8	5.6	18.1	9.4
亮氨酸	5.8	127.7	84.0	29.8	19.8
苯丙氨酸	7.0	49.9	44.8	21.3	12.6
色氨酸	8.5	35.0	14.7	19.0	8.1
总 EAA	64.2	373.1	374.7	213.9	90.6
总 NEAA	25.8	373.4	259.8	186.2	66.3
总 AA	89.9	746.6	634.6	400.2	156.8

注:表中数据为每千克蛋白的含量(Titgemeyer,1989)。

日粮蛋白瘤胃降解率不同,则由饲料供给小肠的 AA 量不同。Titgemeyer(1989)研究了肉牛的玉米与豆粕、玉米面筋粉、血粉、鱼粉和优质苜蓿粉的过瘤胃 AA 情况(表 4)。由表 4 可以看出,试验蛋白质饲料的过瘤胃 AA 顺序为玉米面筋粉>血粉>鱼粉>苜蓿粉>豆粕,且玉米面筋粉中含硫 AA 含量丰富,血粉中赖氨酸、组氨酸含量丰富,鱼粉中胱氨酸含量低。

瘤胃中非降解蛋白的 AA 组成不完全同于原来饲料蛋白的 AA 组成。Φrskov (1988)测定了鱼粉、花生粕、大豆粕和向日葵粕在瘤胃中培养 9 h 后尼龙袋残余物的 AA 组成与原样相比,植物性蛋白质的 AA 组成在降解前后比较相似,但鱼粉差异较大(鱼粉包括鱼干物质蛋白和鱼浸膏蛋白,鱼浸膏蛋白多为水溶性,所以降解也很快)。其它一些对精饲料降解前后 AA 组成的研究表明,其差异不大,认为精饲料瘤胃降解后残渣中 AA 含量可采用未降解前的 AA 含量参考。对粗饲料降解后残渣的 AA 含量研究较少,就现有的研究表明,降解后残渣的 AA 含量比原样中的要低,且其低的程度因粗饲料的种类而异。

由于不同的日粮蛋白 AA 组成与水平不同,未降解蛋白质的数量和组成也不同,则供给小肠的过瘤胃饲料蛋白质的数量与 AA 组成不同,并且不同的日粮也可能导致小肠瘤胃微生物蛋白质的数量与 AA 的组成不同,众多不定的因素都可能导致到达小肠的 AA 组成模式的不同。表 5 为不同研究报道的小肠食糜 AA 的组成模式,不同日粮小肠 AA 中 Val、Met+Cys 或 Met、Ile、Leu 等变化较大。

表 5 到达小肠的 AA 的组成模式(以 lys 为 100 计)

项目	玉米青贮组	苜蓿青贮组	精料组	豆饼	亚麻饼	血粉
苏氨酸	74.45	80.00	73.39	72.19	72.65	66.24
缬氨酸	81.93	80.72	95.54	96.81	101.84	99.63
含硫氨酸	55.64	48.70	60.00	33.37*	35.60*	29.36*
异亮氨酸	80.58	81.23	82.15	79.09	82.06	63.03
亮氨酸	132.86	127.39	165.21	135.74	137.34	142.11
组氨酸	29.28	28.12	37.27	33.47	34.14	41.10
赖氨酸	100	100	100	100	100	100
精氨酸	63.55	65.00	69.92	69.72	78.56	62.11
芳香氨基酸	128.83	139.13	143.14	77.24**	80.31**	76.06**
资料来源	Titgemeyer(1988) Cottrill(1982)	Atwell(1991) Merchen(1986)	Titgemeyer(1988) Spicer(1986)	王洪荣(1999)	王洪荣(1999)	王洪荣(1999)

注:由于本文以讨论反刍动物小肠氨基酸营养为主,所以将部分引用文献数据转换以 Lys 为 100 计 AA 组成模式指标体系,以便于比较,若在其它研究中可选择最适于反映研究对象特征和试验差异的指标体系。* 为 Met,** 为苯丙氨酸。

石河子几个鸡场大肠杆菌自家苗的 研制及应用效果观察

罗盘棋 王新华 薄新文 齐亚银

摘要 近年来从石河子周围几个不同地区分离到多株不同血清型的大肠杆菌,并对其进行了分离、培养及分型鉴定,结合不同养鸡场的需要,研制了大肠杆菌自家氢氧化铝灭活苗,并进行了临床观察试验,效果明显。

关键词 大肠杆菌;氢氧化铝灭活苗;效果观察

中图分类号 Q939.1

禽大肠杆菌病的病原为大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*),其血清型极多,其中菌体抗原(O)171种、

荚膜抗原(K)103种、鞭毛抗原(H)56种,这些抗原可组合成大量抗原性不同的血清型。高崧等^[1]从我国18个省、市、自治区分离出440株禽源性大肠杆菌,经鉴定有60多个血清型,而且不同地区的优势血清群差异很大,并且与国外报道的优势血清群为O₁、O₂、O₃₅、O₇₈不完全相同。国外家禽大肠杆菌病主要是由这4种血清型所致,很少分离到其它致病性血清型,而国内不同地区都有其独立的优势血清群,即使是在同一地区不同养殖场血清型相差也较大,甚至在同一鸡场

罗盘棋,新疆石河子大学动物科技学院,832000,新疆石河子。

王新华(通讯作者)、薄新文,石河子农垦科学院。

齐亚银,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-01-13

3 供给小肠的AA组成模式与平衡模式的差补

表1中Owens(1986)估计的EAA需要量适用于维持+日增重1 kg/d的250 kg体重肉牛,为满足肉牛EAA的需要,在青贮玉米、苜蓿粉组和精料等日粮条件下应该补充含硫AA、Lys和His高的过瘤胃蛋白质饲料,但也不能忽视其它AA,如Thr、Val和Ile等。甄玉国(2002)研究表明,内蒙古绒山羊小肠可吸收IAA模式,鉴于内脏组织消耗了大量的Leu,当根据肌肉和绒毛模式计算IAA模式时低估了Leu的实际需要。若以甄玉国(2002)的IAA模式,在玉米—豆粕型日粮条件下,应该适量提高Leu添加量,同时也应该增加Ile和Ser比例。苏鹏程等(2004)对AA平衡性研究的结果表明,在玉米—豆粕型日粮条件下,内蒙古白绒山羊小肠可吸收氨基酸平衡指数为0.69,要达到甄玉国的绒山羊AA平衡模式,需要量补充Met、Arg、His、Thr、Ser和Trp。甄玉国等(2004)研究表明,绒山羊瘤胃中微生物可利用无机硫和有机硫来合成微生物蛋白。也提示对于产毛的反刍动物来说,产毛期间应当补充含硫日粮,当无机硫的需要量得到满足时,含硫氨基酸的需要量也会得到满足,从而提高动物生产性能。上述研究表明,应根据特定条件下的AA需要模式,针

对不同日粮蛋白LAA含量及过瘤胃量,结合AA的吸收利用及代谢情况,对LAA进行调控,最终达到IAA模式。

4 结语

由于反刍动物的消化系统复杂,其小肠AA需要与供给的研究,应从整体出发,如生理状态与生产目的、营养物质的供给量与组成和吸收利用程度、瘤胃微生态系统等多角度综合考虑,才能做到AA需求的准确定量(李德发,2001)和理想供给。在深入具体的研究确定的特定条件下AA需要量和IAA模式的基础上,结合特定饲料条件下瘤胃微生物产量与AA组成模式、过瘤胃蛋白的量与AA组成模式,兼顾AA的吸收、利用与代谢,补充在特定的日粮下与IAA模式中相应的LAA之差以满足其AA的需要,即通过瘤胃微生物蛋白质和过瘤胃蛋白质的理想结合,同时补差以达到后消化道AA组成比例模式的平衡与理想,以最少量的蛋白饲料最有效地满足动物的需要,减少氮源随粪尿的排出量和提高动物氮沉积,来提高饲料蛋白的利用效率以及减少动物排泄物对环境的污染。

(参考文献28篇,刊略,需者可函索)

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

同一鸡群也可能存在多个血清型。不同血清型之间的抗原交叉保护力较弱,不可能制备一种覆盖所有血清型的超广谱疫苗。因此,家禽大肠杆菌疫苗在我国应用存在较大的局限性^[2,3]。

1 病原菌的分离、培养及鉴定

1.1 病原菌采集、分离和培养

对不同鸡场的死亡鸡剖检,在患心包炎、卵黄性腹膜炎、肝周炎、脑炎等病理变化的鸡上采集心血、肝、脾、脑、腹水等,培养在麦康凯琼脂平板上和普通肉汤中,37℃培养24h。一般初代就可以见到肉汤中呈均匀混浊状,管底有白色沉淀;麦康凯琼脂平板上呈中间红色的圆形光滑或略粗糙的菌落,镜检可见革兰氏阳性杆菌,大小均一,两端钝圆,散状分布的小杆菌。然后再纯化到普通兔血平板上,并检测其溶血性^[4]。

1.2 生化鉴定

此菌在三糖铁培养基上,培养基底部产酸、产气,不产生硫化氢,斜面产酸;各种糖发酵等生化反应符合大肠杆菌生化特性。

1.3 血清型鉴定

利用大肠杆菌定型血清(兰州生物制品厂制)对所分离的大肠杆菌进行血清型鉴定,其中该地区以O₂和O₁₅两者居多。

1.4 毒力试验

将主要血清型的代表菌株分别用普通肉汤培养18h之后,取0.2ml给15日龄健康雏鸡静脉注射,同时设对照组。观察72h,注射组全部发病,并出现死亡,剖检死鸡,可见心包炎、肝周炎等病理变化。并从肝、脾的细菌培养中分离到注射菌株,对照组无发病鸡^[5,6]。

2 灭活氢氧化铝佐剂疫苗的制备

选定该地区主要致病血清型,即O₂、O₁₅和各个不同鸡场的分离代表株。分别经营养肉汤进行增菌培养18~24h,并收集菌液。含菌量测定合格后加入甲醛灭活,并加入20%氢氧化铝佐剂^[7]。

3 疫苗的检验

3.1 安全试验

取未免疫的健康易感鸡30只,每只皮下注射5~10倍免疫剂量的菌苗,观察10d鸡只的健康存活情况。

3.2 效力试验

取36只2周龄健康鸡,按4种剂量分组注射菌苗,同时设对照组(6只)。定期采血,将制苗菌株制成抗原。做试管凝集试验,检测注射菌苗鸡血清中抗体

滴度,并观察鸡群健康和生长情况。2周后血清抗体滴度平均提高80倍,最高达320倍。于4、8、14周分别进行血检,抗体效价仍维持或接近这一较高水平。对照组鸡血清抗体滴度始终为0^[8]。

3.3 免疫期

继上述定期检测免疫鸡血清抗体后,至6个月时抗体效价仍在40倍以上,因此,免疫期可维持6个月以上,6个月以后未测定,试验鸡群也未发生大肠杆菌病。

4 现场应用观察

将制备的菌苗接种于8500只20日龄麻黄鸡体内。育成期未发生大肠杆菌病,育成合格率为90.2%,比以前提高10%。在120日龄加强免疫一次,整个产蛋期卵黄性腹膜炎减少65%,对死亡鸡的肝、脾细菌培养,未检出大肠杆菌,鸡的死淘率下降5%,产蛋量提高4%,种蛋孵化率提高7%,后代鸡雏健壮活泼。对每批鸡育成、产蛋前都用本菌苗免疫,基本控制住了大肠杆菌病,取得了一定的经济效益。

5 小结

由于大肠杆菌的血清型多且发病的病原复杂,采用抗生素疗法效果不但不佳,而且会带来一定的药物残留,采用自制大肠杆菌灭活苗免疫鸡群,能提高机体特异性免疫力,是预防、控制大肠杆菌病的较好方法。疫苗的效价和免疫期观察,主要依据血清凝集抗体效价评定,鸡群未出现疫情,效果显著。

参考文献

- 1 高蕊,刘秀梵,张如宽.禽大肠杆菌病的研究进展[J].养禽与禽病防治,1999(9):18~20
- 2 Simon Shane. Coliform infection are responsible for heavy losses[J]. World Poultry, 2001,17:35~37
- 3 卡尼尔克主编.高福,刘文军主译.禽病学(第九版)[M].北京:北京农业出版社,1991.574
- 4 韩正康.动物生理学[J].北京:中国农业出版社,1999.71~79
- 5 朱力军.动物大肠杆菌耐药性的变化趋势[J].中国兽药杂志,2001,35(2):16~18
- 6 刘倍增,张强.肉仔鸡大肠杆菌病的防治措施[J].中国家禽,2002,24(8):46
- 7 戴建军,郑明珠,兰敏然.不同来源鸡大肠杆菌致病性研究[J].畜牧与兽医,2001,33(2):3~5
- 8 辛朝安.透过大肠杆菌病的表面现象寻找致病的本质[J].养禽与禽病防治,2002(2):2~3

硫酸丁胺卡那霉素溶液对 鸡大肠杆菌病的临床疗效试验

赵英虎 高 莉 赵恒寿

鸡大肠杆菌病是由致病性大肠杆菌引起的一种常见多发病,其中包括大肠杆菌性腹膜炎、输卵管炎、脐炎、滑膜炎、气囊炎、肉芽肿、眼炎等多种疾病,对养鸡业危害较大。各种年龄的鸡均可感染大肠杆菌病,但受到饲养管理水平、环境卫生、防治措施、有无继发其它疫病等因素的影响,使该病的发病率和死亡率有较大差异。

硫酸丁胺卡那霉素是一种氨基糖苷类半合成抗生素,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌等菌株都有很强的抑制作用。为了能更好地推广应用,客观地评价该药的确切疗效,本试验采用人工感染鸡大肠杆菌病的临床病理模型对其进行了临床疗效试验,旨在验证硫酸丁胺卡那霉素溶液对鸡大肠杆菌病的治疗效果,找出适用剂量和疗程,并考察其对鸡的安全性

的影响。

1 试验材料和方法

1.1 供试药品

硫酸丁胺卡那霉素溶液(100 ml : 5 g),由青岛六和药业有限公司提供(含量为标示量的 99.8%);对照药品为硫酸庆大霉素溶液(100 ml : 4 g),由济宁兽药厂提供(批号 20041208)。

1.2 菌种

鸡大肠杆菌(O₇₈血清型),购自中国兽药监察所的标准菌株。

1.3 试验动物

20日龄未经鸡大肠杆菌疫苗免疫的艾维茵雏鸡 180只,公母兼有,随机分为6组,试验鸡的体重和分组情况以及各组鸡的给药途径见表1。

表1 试验鸡的给药途径及分组情况

组别	数量(只)	体重(g, X ±SD)	处理
健康对照组	30	182.1±33.1	不感染、不给药
感染对照组	30	180.8±28.4	感染、不给药
低剂量组(硫酸丁胺卡那霉素溶液)	30	180.0±32.9	感染、饮水给药 1 ml/l
中剂量组(硫酸丁胺卡那霉素溶液)	30	180.0±32.9	感染、饮水给药 2 ml/l
高剂量组(硫酸丁胺卡那霉素溶液)	30	180.0±32.9	感染、饮水给药 4 ml/l
药物对照组(硫酸庆大霉素溶液)	30	183.0±25.9	感染、饮水给药 2.5 ml/l

1.4 MIC(最小抑菌浓度)测定

采用试管肉汤 2 倍稀释法对硫酸丁胺卡那霉素进行 MIC 测定。

1.5 人工诱发鸡大肠杆菌病

1.5.1 菌种

将鸡大肠杆菌菌种接种于普通琼脂平板,37℃培养 24 h 后,挑选典型菌落接种于肉汤中,37℃培养 18 h。将此肉汤培养物接种于试鸡,以求其毒力复壮并能将接种鸡致死,从死鸡的肝脏中分离大肠杆菌并接种琼脂平板培养,最后挑选典型菌落用普通肉汤培养,并用

肉汤稀释成攻毒菌液。以琼脂平板培养计数法测定其生长浊度单位,为每毫升含 10⁹ 个菌。

1.5.2 接种量和菌数

雏鸡按每 100 g 体重胸肌注射鸡大肠杆菌液 0.15 ml,约含 1.5×10⁸ 个菌。

1.5.3 观察反应

观察接种前及接种后鸡的临床表现,主要包括精神状态、食欲、粪便等,并分别记录。对死鸡进行尸体剖检,取肝、脾及心脏进行细菌分离培养。

1.6 治疗试验

给鸡接种大肠杆菌后 6 h, 分别按表 1 进行饮水给药,连用 3 d;观察期为 15 d,每日观察鸡的临床表现,并对死鸡进行尸体剖检,作细菌分离培养,确定死因,对每只鸡进行试验前后称重及体况观察。

1.7 疗效判定

1.7.1 死亡

赵英虎,中北大学信息商务学院,030051,山西太原学院路3号。

高莉、赵恒寿(通讯作者),山西农业大学动物科技学院。

收稿日期:2007-02-18

在试验期间,出现鸡大肠杆菌病的典型症状并死亡,尸体剖检有典型的病变特征,并从肝、脾及心脏分离培养出鸡大肠杆菌,判定为鸡感染该菌而死亡。根据死亡鸡数计算各组的死亡率。

1.7.2 治愈

在试验期间经内服给药后鸡精神状态、食欲恢复正常,不再出现排稀粪等临床症状,均属治愈。根据治愈鸡数量占试验组总鸡数的比率计算治愈率。

1.7.3 有效

经内服给药后,完全治愈的鸡和没有死亡但有临床症状表现者,均为有效;试验结束时,每组存活的鸡数占试验鸡数的百分率,为有效率。

1.7.4 增重

根据试验开始及试验结束时每只鸡的体重,计算每只鸡的增重量,然后据此计算每组试验鸡的平均增重和标准差。相对增重率是按各用药治疗组与健康对照组的增重之比计算,其中健康对照组鸡增重率设为100%。

1.8 数据的分析和处理

按生物统计方法进行数据的显著性检验,其中死亡率、有效率及治愈率用卡方检验;增重采用t检验。

1.9 计算

死亡率(%)=治疗中死亡鸡数/试验组鸡数;

治愈率(%)=治疗后治愈鸡数/试验组鸡数;

相对增重率(%)=试验组平均每只鸡增重/空白对照组平均每只鸡增重。

2 试验结果

2.1 体外最小抑菌浓度(见表2)

表2 不同浓度硫酸丁胺卡那霉素对鸡大肠杆菌的抑菌情况

项目	药物浓度($\mu\text{g/ml}$)											
	320	160	80	40	20	10	5.0	2.5	1.25	0.63	0.31	0
试验药物	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+
对照药物	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+

注:“-”为有效,“+”为无效,“±”为效果不明显。

硫酸丁胺卡那霉素对鸡大肠杆菌的体外最小抑菌浓度为2.5 $\mu\text{g/ml}$,较对照药物更敏感。

2.2 感染对照组

30只雏鸡中有29只在接种后1~4d出现死亡,主要临床症状为精神沉郁,食欲、饮欲下降或废绝,羽毛松乱,两翼下垂,头颈蜷缩,闭眼昏睡,不愿走动,离群呆立,排稀粪,严重者卧地不起。剖检结论:肝充血、肿胀、易碎,肝浆膜增厚,有大量渗出物;脾肿胀;心脏出现心脏包炎性变化,心包腔中有大量纤维素性渗出物。从肝、脾及心脏均分离出大肠杆菌。

2.3 治疗试验

硫酸丁胺卡那霉素溶液以及硫酸庆大霉素溶液饮水给药后,与感染对照组比较,能比较迅速地减轻临床症状。在给药后的16d内,各组鸡的死亡率、治愈率、有效率及增重情况见表3。

表3 硫酸丁胺卡那霉素溶液对鸡大肠杆菌病的临床试验结果

组别	死亡率 (%)	治愈率 (%)	有效率 (%)	增重 (g, $\bar{X}\pm\text{SD}$)	相对增重 (%)
健康对照组	0	-	-	248.9 \pm 9.1 ^a	100 ^a
感染对照组	96.6 ^A	0	-	-	-
低剂量组	30 ^{ab}	50 ^b	70 ^b	202.6 \pm 9.2 ^b	81.40 ^b
中剂量组	6.67 ^{ba}	90 ^a	93.3 ^a	236.5 \pm 8.9 ^a	95.21 ^a
高剂量组	6.67 ^{ba}	90 ^a	93.3 ^a	230.5 \pm 9.2 ^a	92.73 ^a
药物对照组	26.7 ^{ab}	60 ^b	74.3 ^b	203.5 \pm 9.1 ^b	81.76 ^b

注:1.“-”为无意义数据,对试验结果无影响,不考察;

2.同列数据肩标字母相同者表示差异不显著($P>0.05$),小写字母不同者表示差异显著($P<0.05$),大写字母不同者表示差异极显著($P<0.01$)。

3 讨论

本试验的体外抑菌结果表明,硫酸丁胺卡那霉素对鸡大肠杆菌的最小抑菌浓度为2.5 $\mu\text{g/ml}$ 。据报道,硫酸丁胺卡那霉素对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、假单胞杆菌、沙门氏菌的最小抑菌浓度大部分都小于4 $\mu\text{g/ml}$ 。硫酸丁胺卡那霉素对畜禽大部分病原菌敏感,具有广谱、不易产生耐药性的特征,显示它在畜禽细菌性疾病的防治方面会有广阔的前景。

本试验结果表明,应用硫酸丁胺卡那霉素溶液治疗鸡大肠杆菌病高剂量组有效率为93.3%;中剂量组有效率为93.3%;低剂量组有效率为70%;药物对照组有效率为74.3%;高、中剂量组同药物对照组相比差异显著($P<0.05$)。硫酸丁胺卡那霉素中剂量组和高剂量组以及药物对照组鸡死亡率均极显著低于感染对照组($P<0.01$);硫酸丁胺卡那霉素中剂量组和高剂量组之间试验鸡的死亡率、治愈率和有效率差异不显著($P>0.05$),但与药物对照组及低剂量组相比差异显著($P<0.05$),这可能与硫酸丁胺卡那霉素对血药浓度的依赖性有关,其血药浓度越高,抗生素后效应越强。在增重效果上硫酸丁胺卡那霉素中剂量组和高剂量组与药物对照组及硫酸丁胺卡那霉素低剂量组之间在增重效果上存在较大的差别($P<0.05$)。

4 结论

临床试验结果表明,硫酸丁胺卡那霉素溶液对鸡大肠杆菌病的临床疗效确实可靠。临床推荐应用剂量为:每升饮用水加2ml(即100mg硫酸丁胺卡那霉素)。

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

中 草 药 对 动 物 的 免 疫 增 强 作 用

郭旭东 刁其玉 史 良

1 中草药对动物免疫器官的作用

免疫器官是动物机体执行免疫功能的组织机构,它们的发育状况直接影响到机体免疫功能的发挥。

中草药对动物免疫器官的影响主要体现在对胸腺、脾脏、淋巴结等免疫器官重量的影响。重量的增加表明免疫器官能够提供更好的具有活性的免疫细胞。近年来,为客观准确地评价中草药对动物免疫器官的影响,人们通过研究免疫器官脏器指数(免疫器官重/动物体重)这一指标来进行评价。

张乐萃等(1998)^[1]报道,黄芪多糖、香菇多糖和复方多糖均能促进脾脏等免疫器官的发育,增加免疫器官重量,提高免疫活性。王福传等(2002)^[2]报道,给雏鸡饲喂黄芪、人参等添加剂,试验组鸡的脾脏和法氏囊重量显著高于对照组,各免疫器官的组织形态学变化均比对照组明显。胡松华等(2000)^[3]研究表明,雏鸡饮用由黄芪、绞股蓝、蒲公英、苦参和秦皮组成的“禽速康”后,脾脏和法氏囊指数显著高于对照组。张庆茹等(2002)^[4]报道,由红花、黄芪、绞股蓝、何首乌、大青叶、甘草等组成的“抗囊病散”能增加鸡法氏囊和脾脏的相对重量,拮抗法氏囊病毒对法氏囊淋巴滤泡的损伤。梁荣等(1998)^[5]在雏鸡日粮中添加1%中草药(由红花、黄芪、绞股蓝、大青叶、何首乌等组成),经人工感染传染性法氏囊病毒的试验证明,该药能提高雏鸡法氏囊的相对重量,感染该病后法氏囊肿胀不明显。此外,还有研究表明,女贞子多糖、肉芙蓉、肉桂、茯苓、白术等中草药对免疫器官的发育具有促进作用。

2 对非特异性免疫功能的促进作用

非特异性免疫系统是机体的一种天然防御机构,包括物理屏障、血液与组织的吞噬细胞、自然杀伤细胞等,所有这些都参与到有潜在微生物或有害物质的环境中保护机体。机体非特异性免疫功能的提高主要是通过增加吞噬细胞数量和增强其吞噬能力来实现的。单核-巨噬细胞吞噬系统能非特异性地吞噬侵入动物机体内的病原体等有害异物,将抗原递呈给T、B

淋巴细胞,从而参与机体的特异性免疫应答。有研究表明,人参、黄芪、刺五加、灵芝、女贞子、甘草均有增加动物血液中白细胞总数的作用。另外,通过对血液中异物清除速度的测试及巨噬细胞吞噬能力的检测发现,党参、白术、黄芪、灵芝等均有加速体内异物清除、增强巨噬细胞活力的作用。

薛明(1996)^[6]报道,用茯苓多糖等通过腹腔注射小鼠,可使小鼠巨噬细胞吞噬率和吞噬指数明显增加。张兴权等(1989)^[7]报道,党参多糖、柴胡多糖、当归多糖、黄芪多糖及白术、茯苓等中草药均能促进单核-巨噬细胞的数量和功能。杜爱芳等(1998)^[8]研究发现,不同浓度的合成鱼腥草素溶液均能提高鼠单核-巨噬细胞吞噬活性。方维焕(1990)^[9]研究发现,金银花、蜂胶注射液以及蒲公英、紫花地丁口服液均能显著增强小鼠白细胞吞噬功能($P<0.05$),尤其以紫花地丁的作用更为显著,吞噬率比对照组高26%。

中性粒细胞是血液中的主要吞噬细胞,有重要的抗感染作用,也是机体非特异免疫因子之一。有研究报告,黄芪、蒲公英等对白细胞免疫有激活和调理作用。王秋芳等(2002)^[10]用中草药饲喂奶牛,试验组中性粒细胞吞噬率升高,显著高于对照组($P<0.05$)。

T淋巴细胞在非特异物质刺激下,可被激活,向淋巴母细胞转化。在转化过程中DNA、RNA及蛋白质合成增加,使细胞分裂、增殖,而淋巴细胞的分裂、增殖则是T淋巴细胞发挥作用大小的一个衡量标准。王秋芳等(2002)^[10]用中草药饲喂奶牛,试验组淋巴细胞转化指数上升,显著高于对照组($P<0.05$),表明所用中草药组方对淋巴细胞转化有一定的促进作用。

补体存在于机体血清中(占血清蛋白总量的10%,且含量稳定),是具有类似酶活性的蛋白质。当存在抗原体复合物或其它激活因子时,补体被激活,进而具有杀菌及溶菌作用,以及补助和加强吞噬细胞和抗体的防御功能,是重要的非特异性免疫因子。天然物质中草药具有调节增强补体功能作用,如人参、附子、臭牡丹等,可增加血清补体量。

3 对特异性免疫功能的促进作用

动物特异性免疫主要包括体液免疫和细胞免疫。正常生理情况下,动物血液中的T淋巴细胞数目以及由活化的B淋巴细胞产生的抗体水平是衡量机体细胞免疫和体液免疫功能的重要指标。

郭旭东,中国农业科学院饲料研究所,100081,北京市海淀区中关村南大街12号25号楼213室。

刁其玉(通讯作者)、史良,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-02-12

研究发现,许多中草药都能促进免疫细胞的增殖分化,促进淋巴细胞,特别是 T、B 淋巴细胞数量的增加,从而增强动物机体的细胞免疫和体液免疫功能。

3.1 中草药对淋巴细胞数量的影响

许多中草药均能促进淋巴细胞数量的增加。毕可东(2000)^[11]报道,复方中药多糖可显著提高血液中白细胞、淋巴细胞数量,提高淋巴细胞转化率,并使因环磷酰胺而降低的白细胞及淋巴细胞数量、淋巴细胞百分率恢复至正常水平。黄一帆(1999)^[12]、邵光远(1998)^[13]等使用以黄芪为主的中药复方制剂饲喂鸡,结果发现,用药组鸡 T 淋巴细胞数量显著高于对照组。谷新利(1998)^[14]报道,中药免疫增强剂(由人参、黄芪、党参、白术等组成)不但可以促进外周血液淋巴细胞 ANAE 阳性率和 T 淋巴细胞总数的增加,而且能明显提高辅助型 T 淋巴细胞的数量,较好地增强雏鸡痘疹病毒疫苗对鸡马立克氏病的免疫效果。

3.2 中草药对细胞免疫的促进作用

细胞免疫是 T 淋巴细胞介导的一种重要的机体免疫反应。细胞免疫可以抵抗细胞内微生物(如病毒和细菌)感染,加快溶解被感染细胞的速度。T 淋巴细胞来源于骨髓造血干细胞,其分化和成熟依赖于胸腺,主要分布在淋巴结、脾脏等外周免疫器官和血液中。T 淋巴细胞是介导细胞免疫的重要细胞,通过检测血液中的 T 淋巴细胞数目可以了解机体的细胞免疫状况。有研究表明,许多中草药能增加血液中 T 淋巴细胞的数量,对细胞免疫起促进作用。步志高(1996)^[15]报道,用助阳中药淫羊藿、补骨脂等的粗提取物饲喂雏鸡,试验组的 T 淋巴细胞百分率均比对照组高。牛廷献(1998)^[16]报道,由金银花、连翘、黄芪等组成的银翘解毒合剂能显著提高鸡 T 淋巴细胞转化率。丁云月等(2004)^[17]报道,柴胡、黄连、黄芩、金银花、蒲公英等均可促进奶牛淋巴细胞的转化,增强细胞免疫。

3.3 中草药对体液免疫的促进作用

体液免疫是 B 淋巴细胞介导的机体另一重要特异性免疫反应,可防御细胞外微生物及毒素的入侵,体液免疫能力的高低常用机体循环血液中抗体的水平来反映。许多中草药能促进机体的体液免疫功能,促进抗体的生成,提高机体的免疫力。

黄芪对正常机体的抗体生成有明显的促进作用,可使免疫后早期的抗原结合细胞,包括抗体分泌细胞和 T、B 淋巴细胞以及 NK 细胞数量明显增加,血浆中 IgM、IgG、IgE 明显上升。花象柏等(1993)^[18]用黄连、黄芪、黄芩、党参、白术、板蓝根等 20 味中药组成金鸡散,按 2.5% 比例拌料连续饲喂 5 d,对鸡新城疫疫苗的免

疫有明显的增强作用,可显著提高血清中新城疫抗体滴度和 IgG 的含量,使 IgG 浓度高峰持续时间延长,并延缓 IgA、IgM 水平的下降。董发明(1991)^[19]报道,中药制剂(由党参、黄芪、淫羊藿等组成)可提高鸡新城疫抗体效价,延长新城疫抗体在体内的存留时间,并提高群体的保护率。徐诺(1998)^[20]用黄芪提取物、茯苓提取物组成新型免疫增强剂用于鸡新城疫的免疫试验,结果发现,试验组的 HI 抗体滴度明显优于对照组,而且维持时间长。中草药对动物的这些免疫增强作用,为中草药在动物饲料中的应用奠定了坚实的基础。

参考文献

- 1 张乐萃,王金宝,孙月平,等. 复方中药多糖对鸡免疫器官形态学的影响[J]. 中国兽医科技, 1998, 28(8): 26-28
- 2 王福传,韩一起,张玉焕. 复方中药免疫增强剂对鸡免疫器官组织形态学影响研究[J]. 兽药与饲料添加剂, 2002(7): 36-38
- 3 胡松华,杜爱芸. 复方黄芪、绞股蓝对鸡新城疫疫苗免疫效果的研究[J]. 中兽医学杂志, 2000, 99(2): 1-3
- 4 张庆茹,郭红斌,李清艳. 中草药防治鸡传染病研究进展[J]. 中兽医学杂志, 2002, 101(4): 25-29
- 5 梁荣,郭抗抗,伊岚,等. 中药免疫增强剂提高鸡免疫功能的研究[J]. 中国兽医科技, 1998, 28(9): 11-13
- 6 薛明. 生物活性多糖的免疫研究进展与展望[J]. 中兽医医药杂志, 1996, 15(3): 15-18
- 7 张兴权,陈鸿珊. 柴胡多糖的免疫药理作用[J]. 中国药理学与毒理学, 1989, 3(1): 30-33
- 8 杜爱芳,胡松华,鲍伟华. 合成鱼腥草素对单核-巨噬细胞吞噬功能的影响[J]. 中兽医医药杂志, 1998, 17(3): 7-9
- 9 方维焯. 几种中草药对中性白细胞吞噬功能的影响[J]. 中兽医学杂志, 1990, 89(1): 5-7
- 10 王秋芳,张森涛,效梅,等. 中药对隐性乳房炎奶牛细胞免疫功能的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(4): 408-411
- 11 毕可东. 中药多糖对鸡淋巴细胞转化百分率影响的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(4): 289-291
- 12 黄一帆. 天然物免疫促进剂和调节剂开发应用研究展望[J]. 福建畜牧兽医, 1999(1): 37-38
- 13 邵光远. 中药增强雏鸡免疫力实验[J]. 中兽医医药杂志, 1998, 17(1): 19-21
- 14 谷新利. 中药免疫增强剂对雏鸡免疫功能的影响[J]. 中国兽医科技, 1998, 28(2): 31-32
- 15 步志高. 淫羊藿蜂胶合剂对雏鸡细胞免疫功能的影响[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(1): 73-76
- 16 牛廷献,史智勇. 中药增强机体免疫功能研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 1998, 17(3): 38-40
- 17 丁云月,王恬. 中草药添加剂对奶牛乳房炎的预防治疗作用及其药理学机理[J]. 中国草食动物, 2004, 24(4): 51-53
- 18 花象柏,王兴金,何后军,等. 黄芪对 I 系苗接种鸡血液生化指标与免疫功能影响的研究[J]. 中兽医学杂志, 1993, 92(2): 1
- 19 董发明. 柴术散对 ND 苗诱导的体液免疫有显著增益作用[J]. 兽医大学学报, 1991, 11(3): 243-245
- 20 徐诺. 黄芪的药性对体外抗体生成作用的影响[J]. 国外医学中医中药分册, 1998, 20(2): 40

(编辑:高雁, snowyan78@tom.com)

维生素 B₆ 和苏氨酸对动物免疫功能的影响

金海霞 张明礁

动物营养与免疫的关系十分密切,在完善的饲养管理前提下,合理、平衡的日粮组分对畜禽生长、繁殖等生产性能的改善或提高至关重要。维生素和微量元素需要量虽少,但作用不容忽视。合理的营养可保证动物各组织、器官功能处于最佳状态,强化动物的免疫系统,增强动物对疾病的抵抗能力。可见,免疫功能要充分发挥,就要求有良好的营养条件。

1 苏氨酸与免疫功能

苏氨酸的化学名称为 α -氨基- β -羟丁酸,分子式为 $\text{NH}_3\text{CH}(\text{COOH})\text{CHOHCH}_3$,分子量为 119.18,它有 4 种异构体,其中 D-苏氨酸难以被动物吸收和利用(Baker 等,1998)。天然存在的苏氨酸是指 L-苏氨酸,工业上合成以及人们在畜禽饲料中实际添加的苏氨酸一般也指 L-苏氨酸。

大量试验表明,苏氨酸是畜禽维持生长所需的必需氨基酸。苏氨酸缺乏,可出现动物采食量降低、生长受阻、饲料利用率下降、免疫功能抑制等症状。在大多数植物性饲料(尤其是谷物类饲料)中,苏氨酸是第二或第三限制性氨基酸(Eckert 和 Allce,1974; Fuller, 1979; Allce 和 Hince,1971)。如在大麦、小麦、高粱中它是第二限制性氨基酸,在玉米中是第三限制性氨基酸,在其它谷物饲料中也存在不同程度的缺乏。近年来,随着合成 Lys、Met 等在配合饲料中的广泛应用,苏氨酸逐渐成为影响动物生产性能的主要限制性因素。

苏氨酸已被证明是鸡饲料中继蛋氨酸、赖氨酸之后的第三限制性氨基酸。由于苏氨酸的这种重要性,已成为影响肉鸡、蛋鸡生产性能的一个限制性因素。

添加苏氨酸不仅能提高鸡的生产性能,还可降低鸡的死亡率。

Bhargava 等(1971)研究了日粮苏氨酸水平低(0.3%)和过量(1.1%)添加苏氨酸对来航鸡生长和新城疫病毒抗体滴度的影响。结果表明,当日粮苏氨酸水平提高至 0.7% 时可获得最佳生长效果,雏鸡的新城疫病毒抗体滴度呈直线增加,但要达到理想的新城疫病毒抗体滴度,则需要更高的苏氨酸水平,因而苏氨酸在雏鸡的免疫反应中起重要作用。Takahashi 等(1994)研究发现,饲喂仔鸡苏氨酸含量不足(0.58%)和过量(1.02%)的日粮,对其绵羊红细胞的抗体效价无显著影响,这可能与苏氨酸水平的选择和动物品种、年龄等有关。

Keshavarz(1985)研究发现,禽类缺乏苏氨酸表现出对肿瘤和疟原虫敏感。对哺乳动物的试验发现,动物缺乏苏氨酸表现出对肿瘤和疟原虫感染的易感性增加(Jose 和 Good,1973)。在小白鼠饲料中添加苏氨酸和赖氨酸,其胸腺重量增加,并且增强皮肤对异源移植的排斥和对绵羊红细胞抗体效价的影响(Cuaron,1984)。苏氨酸在免疫系统中的重要作用可能与苏氨酸促进抗体合成有关。

苏氨酸是畜禽正常生长所必需的氨基酸,同时也是日粮中最易缺乏的限制性氨基酸之一,它在畜禽免疫系统中占有非常重要的位置。苏氨酸是 IgG 中含量最高的氨基酸,日粮添加苏氨酸能促进机体抗体和血浆 IgG 的生成、增加免疫器官的重量;苏氨酸对机体体液免疫和细胞免疫都起着相当重要的作用。关于免疫应激对苏氨酸营养需要量的影响有待进一步的研究。

氨基酸之间的不平衡和拮抗可影响动物对苏氨酸的需要量。苏氨酸需要量在很大程度上还与赖氨酸的需要量相关,高于需要量的赖氨酸水平使鸡的采食量下降,影响其它氨基酸的添加量,理想蛋白质概念提出了最佳日粮氨基酸比例(见表 1),若赖氨酸的需要量以 100 计,那么苏氨酸的需要量为 67~73。

金海霞,山西农业大学研究生学院,030801,山西农业大学 333# 信箱。

张明礁,梅河口市粮油卫生检验监测站。

收稿日期:2007-01-15

表 1 0~3 周龄肉仔鸡的理想氨基酸模式

氨基酸	NRC(1984) ^a	NRC(1994) ^b	IICP ^c	Baker(1995) ^d
赖氨酸	100	100	100	100
苏氨酸	67	73	67	67

注:1.a、b、c 摘自 Baker 和 Han(1994);d 摘自 Hwge(1995)。

2.a、b 氨基酸比例以总的氨基酸需要量为基础;c、d 氨基酸比例以可消化的氨基酸需要量为基础。

2 维生素 B₆ 与免疫机能

维生素 B₆ 是一组含氮的化合物, 主要以吡哆醇(Pyridoxine)、吡哆醛(Pyridoxal)、吡哆胺(Pyridoxamine)3 种天然形式存在。维生素 B₆ 是动物体内重要的营养素, 机体中的 100 多种与转氨、脱硫及脱羧反应有关的酶, 都需要维生素 B₆ 的参与, 主要是有活性的辅酶形式——5'-磷酸吡哆醛(Pyridoxal 5'-phosphate, PLP) 参与氨基酸及几种含氮化合物的反应。许多资料显示, 维生素 B₆ 与葡萄糖的异生作用、烟酸的形成、脂质代谢、神经系统和免疫系统有着十分密切的关系, 在免疫功能的调节中有着重要作用。与维生素 B₆ 相关的免疫系统有 T 淋巴细胞介导的细胞免疫, B 淋巴细胞介导的体液免疫, 单核吞噬细胞的吞噬、分解和抗原呈递功能, 血细胞的直接杀伤靶细胞功能以及红细胞的免疫粘附、促进吞噬和清除免疫复合物的功能。维生素 B₆ 对动物和人的免疫系统都有十分显著的影响。

2.1 维生素 B₆ 影响免疫细胞凋亡的机制

2.1.1 维生素 B₆ 与细胞内钙离子稳态(homeostasis)

Ca²⁺ 是细胞凋亡信号传递系统的重要组成部分。许多研究证明, 胸腺细胞内钙离子的浓度及其变化是胸腺细胞发生程序性死亡的一个重要调节和决定因素。在做胸腺细胞体内外凋亡试验中发现, 维生素 B₆ 可一定程度上阻断 Ca²⁺ 这一重要信使, 保护细胞避免发生程序性死亡。

2.1.2 维生素 B₆ 与糖皮质激素受体的作用

外来因素引起免疫抑制的间接作用包括糖皮质激素的作用途径。糖皮质激素能十分有效地诱导胸腺细胞的程序性死亡, 已经证实在这典型的过程中, 细胞内 Ca²⁺ 浓度是一个至关重要的因素。维生素 B₆ 的主要活性的辅酶形式是 5'-磷酸吡哆醛(PLP), 它可以显著地降低胞内以及胞外系统中糖皮质激素受体复合物的热稳定性。因此, PLP 可使这类激素难以发挥其本来的生物学效应。此外, 在热和盐激活的系统中, 加入 PLP 也能减少受体——DNA 络合物含量。类固

醇激素需要与受体结合, 然后受体与核内遗传物质结合才能发挥其生理作用, 减少这一过程的结合产物, 也能阻断糖皮质激素诱导的细胞程序性死亡。

2.1.3 维生素 B₆ 影响核酸的合成

有人提出吡哆醇缺乏导致的免疫功能损害的基础在于一碳单位的生成量下降, 而一碳单位是合成核酸的原料。合成一碳单位的关键因素是吡哆醇酶类, 即丝氨酸转羟甲基酶(serine hydroxymethyltransferase)。这种酶在静止的淋巴细胞中的表达水平很低, 但在抗原和促分裂素的刺激下会显著升高, 以适应免疫应答时合成核酸的需要。它的活性可被 PLP 的竞争抑制剂——脱氧吡哆醇(deoxypyridoxine)所抑制。所以维生素 B₆ 的缺乏, 会导致核酸合成的减少, 进而影响淋巴细胞的增殖分化。

2.1.4 维生素 B₆ 的抗氧化功效

维生素 B₆ 的类似物——B₆PR 具有抗氧化作用, 在体外它具有特殊的保护细胞作用, 激活免疫调节系统, 抑制细胞氧化损伤和凋亡。另外, 维生素 B₆ 参与维护谷胱甘肽的合成, 也是合成半胱氨酸、谷胱甘肽生物合成限速酶的辅酶。谷胱甘肽的还原型状态是保持其抗氧化功效的基础, 它的数量和质量都依赖于维生素 B₆ 的营养状态。因此, 维生素 B₆ 在防止免疫细胞受到外来因素影响而发生氧化损伤中起到重要作用^[9]。

2.2 维生素 B₆ 与细胞免疫

在围绕维生素 B₆ 和免疫关系上, 国内外科学家以人、啮齿动物等为对象, 做了大量的研究工作。Trakatelli 等(1992)体外研究显示, 小鼠和大鼠日粮缺乏维生素 B₆ 时, 其淋巴细胞的成熟、增殖及细胞活性均受到抑制, 而加入维生素 B₆ 后则完全消除了这种抑制作用。Shimoi(1992)研究表明, 正常细胞免疫功能的维持需要维生素 B₆ 的参与, 缺乏维生素 B₆ 的动物, 其细胞介导的免疫反应受损^[9]。

2.3 维生素 B₆ 与体液免疫

Freedman 等(1999)和 Roch 等(1996)对动物以及人体试验都表明, 缺乏维生素 B₆ 不仅影响细胞介导的免疫功能的发挥, 还影响到体液免疫。此时, 胸腺发生萎缩, 淋巴细胞分化成熟机能改变, 迟发型超敏反应强度减弱, 抗体的生成也间接受到损伤。补充维生素 B₆ 可以一定程度上恢复这些功能, 但大剂量添加并不能产生比中等剂量更好的效果。维生素 B₆ 对免疫系统、细胞免疫功能、体液免疫功能的影响非常大。

2.4 维生素 B₆与家禽免疫

在家禽方面,维生素 B₆缺乏时,肌胃糜烂,固有层腺体扩张,细胞群发生鳞片状变化。Daghir 等(1936)观察到当肉仔鸡采食维生素 B₆含量为 1.1 mg/kg 的日粮时,1 周龄左右时表现出生长缓慢、翅羽毛囊附近皮肤出血、羽毛蓬乱,还可观察到鸡兴奋、食欲下降、体弱、痉挛乃至死亡。4 周龄后,所有的试验鸡因维生素 B₆的缺乏而死亡。Blalock 等(1983)研究发现,当日粮中维生素 B₆含量低于 1.0 mg/kg 时,雏鸡血液中的红细胞数量明显增多,但每个红细胞的血红蛋白含量却明显降低,表现为小红细胞低色素贫血。成年鸡缺乏维生素 B₆时表现为体重、产蛋率下降,种蛋在孵化过程中出现胚胎早期死亡,孵化率下降。家禽对维生素 B₆的需要量一般为每千克日粮 2~5 mg。

另外,日粮蛋白质水平与蛋白质类型影响生长鸡

对维生素 B₆的需要量。在日粮蛋白质水平为 22% 时,维持正常生长且无缺乏症出现所需要的日粮维生素 B₆的水平仅为 1.4 mg/kg; 但当日粮蛋白质水平达到 31% 时,对维生素 B₆的需要量增加 5 倍,这与维生素 B₆在转氨反应中的作用有关。Kazemi 和 Kratzer (1980)发现,生长鸡饲用大豆饼(粕)型日粮时对维生素 B₆的需要量比饲用棉籽粕型日粮时要高。

3 维生素 B₆与苏氨酸的内在联系

维生素 B₆是动物体内重要的营养素。100 多种与转氨、脱硫及脱羧反应有关的酶,都需要维生素 B₆的参与,主要是有活性的辅酶形式(5'-磷酸吡哆醛)与氨基酸及几种含氮化合物反应。表 2 中总结了与 PLP 有关的 6 种主要酶反应。转氨反应在必需氨基酸和非必需氨基酸的生物合成和分解代谢过程中发挥重要作用。

表 2 由 5'-磷酸吡哆醛催化的各种酶反应

反应类型	实例
转氨酶	丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶
脱羧作用	色氨酸脱羧酶、酪氨酸脱羧酶
有碳-碳键形成的脱羧作用	d-氨基乙酰丙酸合成酶、丝氨酸棕榈酰基转移酶
侧链裂解	丝氨酸羟甲基转移酶、胱硫醚酶
脱水酶	L-丝氨酸脱水酶
消旋作用	D 和 L-氨基酸的相互转化(仅在细菌中)

苏氨酸在体内的分解代谢中,是唯一不经过脱氨基作用和转氨基作用,而直接通过苏氨酸脱水酶、苏氨酸脱氢酶和苏氨酸醛缩酶催化转变为其它物质的氨基酸,如苏氨酸可转变成丝氨酸、甘氨酸等。维生素 B₆和烟酰胺(NAD)辅酶是苏氨酸醛缩酶和苏氨酸脱水酶的辅酶,所以吡哆醇和烟酸对苏氨酸代谢有直接影响,日粮中添加维生素 B₆引起苏氨酸脱水酶活性上升,而胆碱缺乏导致苏氨酸的抗脂肪肝作用降低。可见,维生素 B₆可直接或间接影响苏氨酸的作用。

总之,氨基酸需要合理搭配才能发挥作用,在苏氨酸与其它必需氨基酸比例合适的情况下,在免疫方面与维生素 B₆有着非常重要的联系,有待于我们做进一步的研究和探索,探讨其相关性并将其应用于以后生产实践之中。

参考文献

- 1 杨汉春主编. 动物免疫学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996
- 2 冯于明主编. 家禽营养(第二版)[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2004.9
- 3 伍喜林. 动物苏氨酸营养研究进展[J]. 国外畜牧学猪与禽, 1993, 4:

12~16

- 4 胡倡华. 苏氨酸在肉鸡、蛋鸡饲料中的应用研究进展[J]. 中国家禽, 2001(2): 25~36
- 5 Bhargava K K, Hanson R P, Sunde M L. Effects of Thr on growth and antibody production in chicks infected with Newcastle disease virus[J]. Poultry Science, 1971, 50: 710~713
- 6 李德发主编. 中国饲料大全 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001
- 7 刘波, 章世元, 姜德兴, 等. 蛋白质氨基酸营养免疫研究[J]. 动物科学与动物医学, 2001, 9(8): 86
- 8 孙建成. 维生素 B₆ 对小鼠细胞免疫功能影响的实验研究[D]. 免疫学, 2002, 11(9): 30~34
- 9 Meydani S N. Vitamin B₆ and immune competence [J]. Nutr. Rev., 1993, 51(8): 217~25
- 10 余德谦. 营养与家禽免疫的相互作用 [J]. 广东畜牧兽医科技, 1998, 23(1): 1~2

(编辑: 高 雁, snowyan78@tom.com)

类胡萝卜素在水产饲料中的应用

周凡 邵庆均

随着我国水产养殖业的发展,人们对养殖鱼虾的品质要求也越来越高,色泽是影响水产品商品价格和观赏价值的重要因素。水产动物本身不能合成类胡萝卜素,必须从食物中摄取,因此,需要在饲料中添加类胡萝卜素作为着色剂。本文就近几年来国内外在水产动物上使用类胡萝卜素做为着色剂的研究成果做一综述。

1 类胡萝卜素的分类与来源

类胡萝卜素是一类广泛存在于动物体内的色素,在鱼类中主要贮藏在皮肤、鱼鳍、肌肉和组织器官中。目前已知结构的类胡萝卜素有 650 多种,可分为两大类:一类是碳氢型,由碳、氢组成,属于烃类色素,称为胡萝卜素类,其中 β -胡萝卜素是胡萝卜素类的主要代表;另一类是氧化型,由碳、氢、氧组成,是烃类色素的衍生物,称为叶黄素类,主要有虾青素、黄体素、角黄素和玉米黄质等。

色素按来源分为天然色素和人工合成色素两种。天然色素是从动、植物和微生物中提取或加工而成的类胡萝卜素,主要有万寿菊花色素衍生物和辣椒色素衍生物。我国允许生产的色素有胡萝卜素、玉米黄、桅子黄、辣椒红、红木素、柑橘黄、紫胶红等。另外,国内还经常直接使用天然动、植物作着色剂,如把万寿菊粉、紫育精粉、银合欢叶粉、虾蟹壳粉、藻类(如螺旋藻、小球藻和雨生红球藻)等作为水产品的色素源。虾青素主要从动物或其副产品(如龙虾的加工废弃物)、藻类和微生物(如法夫酵母)发酵中获得。

人工合成色素主要也是类胡萝卜素的衍生物,如 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛、 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯以及柠檬黄素、斑蝥素、 β -胡萝卜素-4,4-二酮(斑蝥黄)、加利素红、加利素黄、虾青素、辣椒红、叶黄素(万寿菊花提取物)和甲基睾酮等。迄今为止,已研发出两个完全不同的工业生产规模的合成技术路线。一条技术路线是通过维生素 A 合成对称的类胡萝卜素产品,可得到斑蝥黄素和虾青素;另一条技术路线是首先制备分子的中间部分——多聚烯链,然后再连接末端基

团。主要包括 Wittig 反应、Horner-Emmons 反应以及 Grignard 反应等。

2 水产动物类胡萝卜素的生理功能

2.1 着色功能

鱼类的体色主要依赖于皮肤中的色素细胞,主要含类胡萝卜素、黑色素、喋啶和嘌呤 4 类色素。类胡萝卜素为脂溶性,赋予机体从黄到红的颜色,对维持水生动物肌肉、鳍条、皮肤、性腺、甲壳等组织的特征颜色起着重要作用,如鲑、鳟鱼类的黄色、桔黄色、粉红色和深红色的体色都是由类胡萝卜素沉积形成的。它们从食物中吸收的类胡萝卜素直接沉积或转化为自身所需的类胡萝卜素,在体内沉积而显示出固有的体色和肉色。另外,在繁殖季节,成熟的雄鱼将类胡萝卜素集中到皮肤上形成第二性征——婚姻色;雌鱼则将类胡萝卜素集中在卵巢形成幼体的保护色。

2.2 增强免疫力

虾青素能显著影响动物的免疫功能,在有抗原存在时,能显著增强脾细胞产生抗体的能力。Pan 等给 5 日龄草虾的饲料中添加 71.5 mg/kg 虾青素,饲喂 8 周以后,这些幼虾接受弧菌(弧菌为 4.96×10^5 cfu/ml)浸泡 2 h 后观察其存活状况,48 h 后对照组的存活率明显低于喂食虾青素的处理组。Edgar 等在虹鳟的饲料中添加 β -胡萝卜素,经过 12 周的饲养后发现, β -胡萝卜素明显增强了虹鳟的免疫能力。

2.3 促进生长和成熟,改善卵质

国外的研究表明,类胡萝卜素在鱼类性腺成熟、胚胎发育和幼体发育过程中都起重要的作用。Mercadante 指出,在繁殖期饲喂添加类胡萝卜素的饲料能显著影响鲑、鳟鱼类卵子质量和早期幼体的健康和存活。当鲑类和鳟类卵子中类胡萝卜素含量为 1~3 mg/kg 时,卵子的孵化率为 60%左右;若卵子中类胡萝卜素的含量低于此水平,卵子的孵化率低于 50%。Blanc 等投喂添加了角黄素的饲料,斑节对虾的性腺指数、生殖力和孵化率显著改善。Wyban 等在南美白对虾繁殖期间,在饲料中添加辣椒粉明显提高了卵的质量和鱼苗的存活率。

2.4 抗氧化剂和脂质过氧化的抑制剂

类胡萝卜素分子结构中含有多个共轭双键,具有捕获动物体内过量的活性氧和自由基的能力,是有效的抗氧化剂,可减少自由基对细胞遗传物质和细胞膜的损伤,阻止光氧化和脂质的氧化。类胡萝卜素的抗

周凡,浙江大学动物科学学院,310029,浙江省杭州市凯旋路 268 号。

邵庆均,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-02-04

氧化顺序依次为虾青素> α -胡萝卜素> β -胡萝卜素>红木素>玉米黄质>黄体素>胆红素>胆绿素,其中虾青素的抗氧化能力最佳,比 α -胡萝卜素高10倍,比维生素E高100倍,故又被称为“超级维生素E”。

2.5 增强对低氧的耐受性

动物体内贮存的色素在细胞内生物氧化过程中,可能类似于氧分子,具有担当电子受体的能力,相当于对氧的储备。Chien等为了解喂食高量虾青素对斑节对虾在缺氧紧迫下的死亡情况及致死过程进行了致死溶氧量试验,结果显示,虾青素在不同溶氧状况下,在获取氧气时,可起到缓冲的作用。Linan等对甲壳类的研究也证实了这个观点。

2.6 抗紫外辐射的光保护作用

Yong等在强光下生长绿藻(Chlorophyta)的研究中发现,含有的酯类虾青素固着在细胞中心,在光诱导条件下向边缘分散,照明中止后,又移回到中心处。因此认为酯化虾青素可以过滤或屏蔽阳光,起光保护作用。

蟹和克原氏螯虾的表皮很可能是通过色素细胞内的酯化虾青素,依靠光的扩散过程来防止机体受光辐射的过度作用。这还是一种掩饰机构,通过颜色变化与生存环境相匹配的方式,在环境中寻求保护,从而使自身与周围环境融为一体。

2.7 具有维生素A活性

许多类胡萝卜素只要其分子一端具有 β 酮芷环,且其侧链长不少于1个碳原子,均具有维生素A活性,其中以 β -胡萝卜素活性最高。类胡萝卜素具有顺反构型,其中顺式构型的类胡萝卜素所具有的VA活性较高。鱼虾具有将类胡萝卜素作为VA源的能力,如虹鳟可将虾青素还原成玉米黄质,将角黄素还原为 β_2 胡萝卜素,进而合成维生素A。

3 类胡萝卜素的代谢

目前对鱼虾色素的代谢途径还不十分清楚,研究主要集中在类胡萝卜素上。类胡萝卜素以游离形式在中肠被吸收,在血液中以与脂蛋白结合的方式转运;肝脏是类胡萝卜素代谢的主要器官。对于未成熟鲑、鳟鱼类,类胡萝卜素主要以游离形式存在于肌肉中,在性成熟过程中,从肌肉转移到皮肤和卵巢。水产动物均不能合成类胡萝卜素。Simpson根据水产动物对虾青素的代谢转变途径,将水产动物分为3大类:

① 红鲤型(red carp type)。包括大部分淡水鱼类,如金鱼、红鲤和锦鲤等,可将黄体素、玉米黄质转变成虾青素,也可将食物中的虾青素直接贮于体内。Ohkubo等提出叶黄素A在金鱼体内可能的2条氧化代谢途径。

第一条途径:叶黄素A \rightarrow 叶黄素B \rightarrow (3S,4R,3'S,

6'R)-4-羟基叶黄素 \rightarrow α -皮黄素;

第二条途径:叶黄素A \rightarrow (3S,4R,3'R,6'R)-4-羟基叶黄素 \rightarrow 二羟基胡萝卜酮。

在考虑类胡萝卜素结构的基础上,Katayama等指出,作为金鱼红色素主要来源的虾青素由叶黄素通过氧化和异构化形成。它们虽然具有将 β_2 胡萝卜素转化为虾青素的能力,但能力极弱, β_2 胡萝卜素不是形成虾青素的主要前体物质。该类动物可将 β_2 紫罗酮环的4,4'C氧化,而难以将3,3'C氧化,故难以形成虾青素。

② 鲷鱼型(sea bream type)。包括大部分具有经济价值的海水鱼类,如鲷、大麻哈鱼和鲑、鳟鱼类等。以 14 C标记的 β_2 胡萝卜素、黄体素、玉米黄质直接导入虹鳟胃中,24 h后,可在其皮肤、肝、肌肉等处相对应的色素中找到 14 C的分布,但在虾青素中则检测不到 14 C的活性。以虹鳟为代表的该类鱼不能将 β_2 胡萝卜素、黄体素、玉米黄质转变成虾青素,但可将上述色素直接吸收而贮存于体内。

③ 大虾型(prawn type)。几乎所有甲壳类动物均属此类,可将 β_2 胡萝卜素、黄体素、玉米黄质转变成虾青素。Tanaka等认为类胡萝卜素在日本对虾体内也有两条代谢途径。

第一条途径: β -胡萝卜素 \rightarrow 异黄素 \rightarrow 海胆酮 \rightarrow 角黄素 \rightarrow 红黄素 \rightarrow 虾青素;

第二条途径:玉米黄质 \rightarrow 4-酮玉米黄质 \rightarrow 虾青素。

4 影响类胡萝卜素在水产动物体内利用的因素

已有研究表明,水产动物在体内储存或利用类胡萝卜素受到许多方面因素的影响:①水产动物的种类、品种、品系,动物的性别、年龄、生理状态和健康状况等。②人工合成的色素在水产动物肌肉内的沉积率比天然藻类色素高。类胡萝卜素的物理性状、颗粒大小、稳定性及种类等,还有饲料的氧化与脂化,饲料中脂肪含量,以及是否存在抗氧化剂和处理方法等都会影响类胡萝卜素在鱼体内的吸收与利用。③饲料中抗生素、药物及其它颜色抑制因子。④饲料着色剂的投喂方法。含虾青素饲料与不含虾青素饲料进行轮流投喂,与每餐都投喂含虾青素饲料的相比,其虾青素保留值要高。⑤动物体内维生素E、维生素A、钙的营养水平、肠内pH值的状态、胆酸和胆酸盐的分泌量等。⑥水产动物的养殖环境,如光照、水温、溶氧、pH值,浮游生物生长状况等。这些因素的存在限制了类胡萝卜素在水产动物中的应用,所以需要加大这方面的研究力度。类胡萝卜素作为着色剂,在水产养殖业中必将有广阔的应用前景。

(参考文献47篇,刊略,需者可函索)

(编辑:徐世良,fi-xu@163.com)

槲皮素的生物学效应及应用前景

马文强 冯杰 何军豪

槲皮素(Quercetin)是一种天然的黄酮类化合物,存在于多种植物的花、叶、果实中,具有抗炎、抗氧化、清除氧自由基、抗粘附、抗血栓、抗病毒、抗肿瘤、降血糖、降血脂、降低血压以及免疫调节作用^[1,2]。

1 槲皮素的生物学功能

1.1 抗氧化作用

槲皮素可显著提高超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性和降低丙二醛(MDA)含量,对经过运动训练的大鼠肝组织产生的自由基具有清除效果,并有保护肝组织的作用,可减少运动后因脂质过氧化产生的内源性自由基对机体的损伤,保护细胞膜的完整性,从而增强抗氧化酶活性^[3]。槲皮素还能抑制H₂O₂引起的人红细胞溶血和红细胞脂质过氧化作用^[4]。

槲皮素抗氧化清除自由基的机制可能与以下几方面有关:①与超氧阴离子络合而减少氧自由基的产生;②与脂质过氧化氢反应抑制脂质过氧化过程;③与铁离子络合而阻止羟自由基的形成;④抑制醛糖还原酶,减少还原辅酶Ⅱ(NADPH)消耗,从而提高机体抗氧化能力^[5]。

1.2 抗粘附和抗心肌损伤

小鼠烫伤后肠粘膜谷胱甘肽(GSH)含量明显降低,表明肠粘膜抗氧化能力下降。经槲皮素灌胃后,小鼠肠粘膜谷胱甘肽含量则明显升高,说明槲皮素可提高肠粘膜抗氧化能力^[6]。槲皮素抗粘附损伤机制可能与其抗氧化作用有关。唐玉等(2005)研究发现,大鼠急性心肌梗死后白细胞表面粘附分子CD11b平均荧光强度增高,血液中血清肌酸激酶(CK)活性、乳酸脱氢酶(LDH)活性、丙二醛(MDA)含量升高,超氧化物歧化

酶(SOD)活性降低(P<0.05);而槲皮素使CD11b平均荧光强度降低,降低CK、LDH活性和MDA含量,提高SOD活性(P<0.01)^[7],说明槲皮素能通过抑制细胞间粘附分子表达来减轻急性心肌梗死后的心肌损伤。

1.3 抗DNA损伤

体外试验结果表明,槲皮素对多环芳烃类化合物引起的细胞株DNA损伤具有保护作用^[8,9]。朱燕萍等(2004)将染毒后的小鼠用不同剂量的槲皮素处理后,DNA的损伤程度显著减少,且呈现明显的剂量依赖关系。在荧光镜下观察细胞的形态,阴性对照组细胞核边缘清楚,无拖尾现象;阳性对照组损伤的DNA片段从核中移出,呈现尾形分布;而槲皮素各剂量组的细胞只是其中部分出现拖尾现象^[10]。

1.4 抗肿瘤作用

近年来槲皮素抗肿瘤作用逐渐被人们所认识并引起广泛的重视。已有研究发现,槲皮素对胃癌细胞、白血病、肝癌细胞都具有抑制生长和诱导凋亡的作用^[11]。

于利人等(2005)研究发现,槲皮素对A549细胞增殖有明显的抑制作用,对细胞增殖的抑制率呈剂量效应关系;槲皮素对小鼠Lewis肺癌移植瘤生长有明显的抑制作用,并显著下调小鼠Lewis肺癌移植瘤的增殖细胞核抗原(PCNA)表达水平^[12]。国外也有研究发现,对肌肉注射了B16-BL6黑色素瘤细胞的小鼠,同时腹腔内给予槲皮素,观察到肿瘤生长明显延缓的现象。

罗进勇等(2005)试验研究发现,MTT法结果显示,槲皮素对体外培养的人肺腺癌A549细胞增殖具有明显的抑制作用,且具有一定的浓度和时间依赖性。流式细胞仪检测发现,30 μg/ml槲皮素作用A549细胞48 h后能将细胞阻滞于G₀/G₁期,且在细胞周期G₁峰的左侧出现了凋亡峰;电镜观察发现,有凋亡的特征性改变。免疫组化法分析结果显示,槲皮素使Bcl-2表达下调,而上调p53蛋白的表达。以上的结果表明了槲皮素能抑制肺腺癌A549细胞的生长,阻止细胞由G₀/G₁期向S期和G₂/M期移行,并诱发细胞凋亡^[13]。

大量研究表明,槲皮素抗肿瘤作用的机制为^[14-16]:

马文强,浙江大学饲料科学研究所,310029,杭州市秋涛北路164号。

冯杰,单位及通讯地址同第一作者。

何军豪,浙江海宁浙农饲料有限公司。

收稿日期:2007-01-14

①抑制原癌基因 *c-fos*、*c-jun* 和 *ras* 的表达。②可下调阻遏热休克蛋白(HSP)基因转录水平,诱发抗凋亡基因 *Bcl-2* 的蛋白发生降解;抑制肿瘤血管生成和转移;抑制蛋白激酶 C(PKC)的活性,并通过抑制 PKC 上调 *iNOS* 的表达,*iNOS* 的过量表达引发 *Caspase-3* 表达,诱导细胞凋亡。③减少 DNA 的复制,导致细胞分裂的延迟,能将不同的肿瘤细胞阻滞于不同的细胞周期。

1.5 抗耐药性和抗炎作用

全身炎症反应综合征(SIRS)可导致多脏器功能衰竭综合征(MODS),而促炎细胞因子,如 *TNF- α* 、*IL-8* 等是 SIRS 触发和级联效应的关键因素。黄亮等(2004)报道,槲皮素可抑制 *TNF- α* 、*IL-8* 等促炎介质的过度释放,显著降低多形核白细胞(PMN)选择素的表达,阻止 PMN 在肺内的“扣押”,减轻肺水肿病理改变,显著改善肺的气体交换功能^[17]。也有研究发现,槲皮素可抑制血小板与白细胞、白细胞与内皮细胞的粘附,减轻炎症反应。

浓度为 20~40 $\mu\text{mol/l}$ 的槲皮素在体外能明显提高柔红霉素对 K562/ADM 和 HL-60/ADM 耐药株的敏感性,并能下调多药耐药基因(*Mdr1*)和多药耐药相关基因 1(*MRP1*)及其膜蛋白产物(P-gP)的表达,从而逆转多药耐药,且有效浓度范围的药物对细胞本身无毒性作用^[18]。

1.6 抑制血小板聚集

血小板活化因子(PAF)是由血小板、白细胞、内皮细胞等多种细胞产生,具有广泛的生物活性,在许多疾病中起炎症介导作用。它与组织缺血再灌注损伤、冠心病、动脉粥样硬化等诸多心脑血管疾病病理密切相关。

陈文梅等(2002)试验研究发现,槲皮素可以抑制 PAF 诱导的血小板、多形核白细胞(PMN)内游离钙浓度升高,表明槲皮素可能通过抑制 PAF 所致细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高而使血小板、白细胞活化受到抑制,从而起到保护心血管的作用,并推测槲皮素的作用部位可能在细胞膜上,竞争性地抑制 PAF 与其受体的结合,拮抗 PAF 的生物效应^[19]。臧宝霞等(2004)研究也发现,槲皮素抑制血小板粘附、聚集与释放的反应是通过拮抗血小板活化因子与血小板膜上受体特异性地结合,抑制血小板活化而起抗血栓形成作用的^[20]。

浓度为 25~40 $\mu\text{mol/l}$ 的槲皮素能抑制凝血酶引起的血小板胞浆游离钙的升高,且呈剂量依赖关系,而使血小板活化聚集受到抑制,从而间接的起到保护心血管的作用,还能够扩张动脉,降低血压,抗心律失常,抑制胶原、二磷酸腺苷、花生四烯酸(AA)等诱导的血小板聚集及 5-羟色胺(5-HT)的释放^[21]。

1.7 止腹泻作用

肠道感染时,肠道受病原微生物及其毒素刺激,化学性炎症介质分泌增加,乙酰胆碱分泌增多,作用于肠道胆碱能受体,使肠道蠕动亢进,水、电解质、食物中的营养物质等在肠道停留时间缩短,来不及完全吸收而被排出体外,引起腹泻。

槲皮素能够抑制离体豚鼠回肠乙酰胆碱的释放,拮抗激动剂乙酰胆碱引起的离体豚鼠回肠的收缩反应,抑制离体豚鼠回肠的自发收缩,抑制小鼠小肠的推进功能。槲皮素还能够拮抗钙离子通道,减少钙离子进入细胞内,从而使细胞内钙离子浓度降低,使肠道蠕动减慢,从而延长水、电解质、营养物质在肠道内停留时间,促进其吸收,减少腹泻次数和排便量^[22,23]。张文学等(2003)研究发现,槲皮素具有抑制豚鼠离体回肠的收缩、小肠的推进功能及毛细血管的通透性等作用^[24]。

槲皮素具有一定的抗炎活性,通过改变腹腔毛细血管和肠粘膜的通透性,减少肠道水分和电解质的分泌,最终达到止泻的目的。

1.8 保护肝脏和肾脏

肝脏缺血再灌注后,谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)活性及 MDA 水平升高,肝脏黄嘌呤氧化酶(XO)活性、MDA 和活性氧(ROS)含量以及 DNA 断裂率增加,而 SOD、GSH-Px 活性、GSH 含量及总抗氧化力降低。槲皮素灌胃后肝脏中槲皮素浓度升高,血浆 GPT、GOT 活性及 MDA 浓度降低,肝脏 ROS 含量降低,GSH 含量及总抗氧化力升高,SOD、GSH-Px 活性有所恢复^[25,26]。

槲皮素对肝损伤有一定的保护作用,其机理可能为:①槲皮素具有抗自由基损伤作用,具有清除自由基及稳定作用。②抑制花生四烯酸的释放。花生四烯酸的产物,如 LTS 可直接刺激白细胞产生超氧化物而导致急性肝损伤。李列平等(2004)通过腺嘌呤诱导大鼠慢性肾功能衰竭(CRF),用槲皮素治疗后的肾组织病理损害明显轻于肾衰对照组;血浆 BUN、Scr、肾组织羟脯氨酸含量明显下降 ($P<0.01$);血浆和肾组织中

EPO 的含量均明显升高($P<0.01$)^[27]。说明槲皮素对防治 CRF 有显著效果,并能有效提高 CRF 时血浆及肾组织中红细胞生成素(EPO)的含量及减轻肾间质纤维化^[27]。

此外,动物药理试验表明,槲皮素具有一定的防辐射作用,对电离辐射产生的自由基具有较强的清除作用;槲皮素可显著改善 T 细胞活化的进程,在获得性免疫中发挥重要作用。

2 应用前景与展望

槲皮素具有抗炎、抗氧化、清除氧自由基、抗粘附、抗血栓、抗病毒以及免疫调节作用,已作为一种中草药应用于肿瘤等疾病的防治上,将槲皮素开发为天然药物免疫促进剂和调节剂应用于一些疾病的防治方面将具有广阔的应用前景。

在畜牧业中,抗生素长期和高剂量使用,导致肉、蛋、奶中药物的残留和细菌耐药性的产生,由此引起了人们对食品安全问题的日益关注。天然植物饲料添加剂因不易导致病原微生物产生耐药性、在动物体内残留量少、毒副作用小等特点,近年来已成为国内外研究的热点。槲皮素具有多种生物学功能,将槲皮素开发为绿色环保型饲料添加剂应用于畜牧业,这对真正意义上减少抗生素等药物添加剂在饲料中的使用,对我国畜牧业可持续发展具有重大意义。

参考文献

- Reiterer G, Toborek M, Hennig B. Quercetin protects against linoleic acid-induced porcine endothelial cell dysfunction [J]. *J. Nutr.*, 2004, 134(4): 771
- Murota K, Terao J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism [J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, 417(1): 12
- 董改宁, 熊正英. 槲皮素对运动训练大鼠肝组织自由基代谢及运动能力影响实验研究 [J]. *陕西师范大学学报(自然科学版)*, 2005, 33(1): 102~104
- 刘慧明, 丁航, 侯敢. 槲皮素对过氧化氢诱导的人红细胞过氧化损伤的抑制作用 [J]. *广东医学院学报*, 2003, 21(4): 317~318
- Kuklmann M K. Inhibition of oxidant induced Lipid peroxidation in renal tubular epithelial cells(LIC-PK1)by quercetion [J]. *Free Radic Research*, 1998, 29(5): 451~460
- 孟德胜, 汪仕良. 槲皮素等对烫伤后小鼠肠粘膜损伤的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2000, 16(6): 673~675
- 唐玉, 成亮, 高建, 等. 槲皮素对急性心肌梗死大鼠模型白细胞粘附分子表达的影响 [J]. *中国老年学*, 2005, 25(1): 80~82
- Szeto Y T, Collins A R, Benziel F F. Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure [J]. *Mutat Res.*, 2002, 20(1/2): 31~38
- Bla siak J, Trzeciak A, Gasiorowska A, et al. Vitamin C and quercetin modulate DNA-damaging effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)[J]. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2002, 57(1): 53~61
- 朱燕萍, 金念祖, 周建伟, 等. 槲皮素在苯并芘致小鼠 DNA 损伤中的作用 [J]. *中国公共卫生*, 2004, 20(11): 1 333~1 335
- Kang T B, Liang N C. Study on the inhibitory effects of quercetic on the growth of HL-60 leukemia cells [J]. *Biochem. Pharmacol.*, 1997, 54(6): 1 013
- Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, et al. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential [J]. *Int J Cancer*, 2000, 87(4): 595~598
- 罗进勇, 李林, 尹一兵. 槲皮素对人肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *重庆医学*, 2005, 34(4): 551~552
- Igura K, Ohta T, Kuroda Y. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro [J]. *Cancer Cell.*, 2001, 171(1): 11~16
- Xianming Zhang, Qiang Xu, Ikuo Saiki. Quercetin inhibits the invasion and mobility of murine melanoma B16-BL6 cells through inducing apoptosis via decreasing Bcl-2 expression [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2001, 18(5): 415~421
- Rong Y, Yang E B, Zhang K, et al. Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression [J]. *Anticancer Res.*, 2000, 20(6B): 4 339~4 345
- 黄亮, 李宪飞, 曹春水, 等. 槲皮素对内毒素急性肺损伤的保护作用 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2004, 13(2): 85~87
- 蔡讯, 陈芳源, 韩洁英, 等. 槲皮素对白血病细胞中膜转运蛋白的调节作用 [J]. *上海医学*, 2004, 27(10): 743~746
- 陈文梅, 金鸣, 吴伟, 等. 槲皮素抑制血小板活化因子介导的血小板、白细胞内钙升高 [J]. *中国药学*, 2002, 37(6): 455~456
- 臧宝霞, 金鸣, 吴伟, 等. 槲皮素抑制血小板活化因子受体结合作用的研究 [J]. *心肺血管病*, 2004, 23(2): 105~107
- 肖东, 顾振纶. 槲皮素对血小板激活时胞浆游离钙的影响 [J]. *苏州医学院学报*, 1995, 5(1): 40~42
- 于利人, 张东昌, 王瑞珉, 等. 槲皮素诱导 K562 细胞凋亡机制探讨 [J]. *中国肿瘤临床*, 2005, 32(9): 505~507
- Wu S N, Chiang H T, Shen A Y, et al. Differential effects of quercetin, a natural polyphenolic flavonoid, on L-type calcium current in pituitary tumor (GH3) cells and neuronal NG108-15 cells [J]. *J. Cell Physiol.*, 2003, 195(2): 298~308
- 张文举, 陈宝田, 王彩云, 等. 槲皮素止泻机制研究 [J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(10): 1 029~1 031
- 郭长江, 韦京豫, 苏俊锋, 等. 槲皮素对缺血再灌注损伤肝脏的保护作用 [J]. *营养学报*, 2003, 25(3): 282~285
- 何娅娜, 阳学风. 槲皮素对实验性肝损伤的保护作用 [J]. *美国中华临床医学*, 2003, 5(2): 105~106
- 李列平, 李雄, 彭自全, 等. 槲皮素对大鼠慢性肾功能衰竭及促红细胞生成素水平的影响 [J]. *中国医院药学*, 2004, 24(7): 412~413

(编辑:王 芳, xfang2005@163.com)

影响动物微生态制剂应用效果的因素及解决方法

马志勇 倪学勤 曾东

影响微生态制剂发挥其功效的因素很多,包括制剂的制备方法、贮藏条件、污染(如杂菌)、不正确的产品菌种组合方式、肠内菌群的状态、使用剂量和使用次数、动物(宿主)的年龄、菌群在肠道中的存活率、饲料成分的变化等,可归纳为3大类因素:①菌种因素;②宿主因素;③外界因素。了解这些因素对微生态制剂功效的影响是非常重要的。

1 菌种本身的特性是发挥其效能的关键因素

生产用微生态制剂菌株首先必须保证不产生任何内外毒素,无毒、无害、无副作用。由于多数微生态制剂是以活菌形式发挥作用的,如双歧杆菌、乳酸菌、芽孢杆菌、酵母菌类,大多数要通过消化道途径发挥作用,这就决定其必须经过胃的酸性环境和十二指肠上部的胆汁分泌区。因此,要筛选具有耐受胃酸、胆汁酸等对微生态制剂不利因素的菌株。

微生态制剂菌株必须具有粘附性才能在肠道中生存并发挥作用,因此,对菌株的粘附性应给予足够重视,某些制剂将粘附因子直接加入到制剂中加强菌株的粘附作用。对产乳酸菌株来说,既要有较强的抗胃酸能力,同时也要有自身的产酸能力及产生抗菌活性物质的能力。刘文佐等(1997)对3种市售常见双歧杆菌制剂进行了耐酸性的测定试验,结果发现,其在人工胃液中2h后,存活率均低于千分之二,这一结果提示人们,在研制微生态制剂的剂型上,必须加大力度,采取科学措施,以提高制剂抵御胃酸杀伤的能力。

目前微生态制剂菌种较少,可运用现代生物技术,研制开发新型菌种,并开发适合动物生理特性的专用型微生态制剂。

2 宿主因素对微生态制剂性能的影响

2.1 宿主的年龄或饲养阶段

宿主因素对微生态制剂的影响也是多方面的,宿主的生理性状改变,如年龄的改变(幼龄、育成期和老龄期或断奶期和泌乳期等)都会影响微生态制剂的应用效果。实际生产中,应根据动物的生理特点、生长期及不同目的选择相应的微生态制剂,如防治1~7日龄仔猪腹泻首选植物乳酸菌、乳酸片球菌、粪链球菌等产酸的制剂;促进仔猪生长发育、提高日增重和饲料报酬则选用双歧杆菌等菌株;反刍动物则选用真菌类,以曲霉较好,可加速纤维素的分解。预防动物常见疾病主要选用乳酸菌、片球菌、双歧杆菌等产乳酸类的细菌效果会更好;促进动物快速生长、提高饲料效率则可选用以芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌和霉菌等制成的微生态制剂。

2.2 宿主动物的饲料成分

饲料成分对微生态制剂功效的发挥也有影响。某些食物成分可以使胃酸或胆汁酸分泌增多,影响微生态制剂在经过胃或十二指肠时的存活率。刘来停等(2001)的试验表明,饲料中 Cu^+ 对微生态制剂有明显的抑制作用,铜离子对微生物体的毒害作用也可能是致使活菌损失的因素之一。目前动物饲料中常规成分对微生态制剂应用效果影响的研究较少,与其它饲料添加剂配伍使用研究较多,如与抗生素、寡糖、酸化剂、中草药、肽等配伍使用有相当好的效果。在使用过程中,一方面应注意对微生态制剂菌株和抗生素、寡糖、酸化剂、中草药、肽等的种类进行筛选,使之能协同发挥作用;另一方面,应注意配伍双方适宜比例,使其达到最佳的配伍使用效果。

2.3 宿主动物的肠道菌群状态

宿主肠内的微生物菌群对微生态制剂在宿主肠道中发挥作用具有多方面的影响。通常宿主肠道的正常菌群对外来菌群具有强烈的定植抗力,作为非宿主原有正常菌群成员的微生态制剂很难在宿主肠道中粘附定植。如果宿主处于菌群失调状态,微生态制剂就很容易发挥其作用,效果更明显。

3 生产条件对微生态制剂性能的影响

生产工艺条件对微生态制剂发挥其功效具有很大影响,如菌株在发酵时的生长条件以及发酵结束的

马志勇,四川农业大学动物科技学院,625014,四川农业大学研究生24号公寓211C。

倪学勤、曾东,单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期:2007-02-04

时间,都会影响菌体的存活率。同一初始菌株,由于发酵条件不同,其终端代谢产物不同,作为微生态制剂的作用效果也会有很大不同。可以重点考虑使用真空冷冻干燥技术和微胶囊技术,制剂采用真空包装或充氮气包装。

生产技术对微生态制剂的功效也有较大的影响,目前常用的发酵技术,主要包括液体深层发酵和固体发酵。利用液体深层发酵技术生产的产品,由于生产过程能够严格控制,一般来说效果比较稳定;用固体发酵的产品,由于灭菌不能彻底,经常有杂菌污染,从而影响了产品的功效。当前国际上通用的有代表性的厌氧培养装置有3大类,其中厌氧罐技术(anaerobic jar technique)是实验室中最常用的一类,仅限于培养过程中能保持良好厌氧状态的一般厌氧技术;若要使培养基的配制,菌种的接种、培养、观察和移种等一系列操作过程都保证能在严格无氧条件下进行,就必须采用更为复杂的严格厌氧技术,包括亨盖特的滚管技术(Hungate roll-tube technique)和厌氧手套箱技术(anaerobic glove box technique)。

微生态制剂主要包括以下几种:①液剂。单一菌种或混合菌种的发酵液,含有活菌和代谢产物。②发酵冻干制剂。液体发酵后,先浓缩,然后加保护剂冷冻干燥。③普通固体发酵生产的粉剂。④经液体深层发酵和一系列后加工生产的粉剂、片剂、胶囊和微胶囊制剂等。⑤软膏制剂(如牙膏状)。⑥气雾剂等。针对不同对象,可以采用不同的制剂和剂型,如饲料添加主要采用粉剂,包括②、③、④种;如预防治疗动物腹泻可用液剂、片剂、胶囊口服,喷雾剂口腔喷雾或软膏口服;如在制粒饲料中添加则宜用微胶囊包被的产品,效果较为理想。另外,对微生态制剂采用微胶囊化制剂工艺可显著提高制品的货架期和抗胃酸及抗胆汁酸的能力。国内外已有一些产品采用这种剂型,其货架期可延长到2年。

4 使用方法、使用剂量缺乏评价标准等因素对微生态制剂性能的影响

服用剂量和服用次数的不同影响微生态制剂的应用效果。一般认为,在饲料中添加微生态制剂用于促生长或预防疾病,至少每克饲料应含有 10^6 个有效活菌,否则难以发挥明显的功效。曹建民等(1999)试验表明,如果一种细菌在盲肠内容物中的浓度低于 10^7 个/g,则该菌产生的酶及代谢产物不足以影响宿

主;若数量过多,超出占据肠内附着点和形成优势菌群所需的数量,非但功效不会增加,反而造成浪费。德国学者认为,仔猪饲料中加入微生态制剂其含菌量应达到 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/g;育肥猪饲料中加入 10^6 个/g芽孢杆菌,粪中大肠杆菌减少35%,每天添加0.5~0.6 g/头方可治疗大肠杆菌引起的腹泻,而育肥猪饲料中乳酸菌数量不少于 10^7 个/g,每天添加1.0~3 g/头可治疗育肥猪腹泻。瑞典规定乳酸菌制剂活菌数要达到 2×10^{11} 个/g。我国正式批准生产的制剂中,对含菌数量与用量的规定是:芽孢杆菌含量 $\geq 5 \times 10^8$ 个/g;益生菌含量一般为 $10^6 \sim 10^7$ 个/g。

由此可以看出,目前对微生态制剂的使用剂量还没有形成一个统一的标准,其实包括筛选、效用、安全性和产品质量等方面都还没有统一技术标准,一方面是因为微生态制剂理论研究落后于实际应用,即使是应用历史很长的微生态制剂,其作用机理还不完全清楚,大多数的研究仅停留在试验使用效果方面上,且结果差异大,甚至可能出现相反的结果;另一方面由于必要的技术方法不完善,对于如何评价某一种微生态制剂的益生作用还需要进行深入的研究。

所以,微生态制剂作用机理的深入研究仍然是核心问题。加强微生态制剂在分子水平上的研究,通过研究消化道内菌体细胞的代谢、宿主对菌体细胞生产的功能性成分利用、微生物菌群对宿主各器官的影响以及菌群之间的相互作用,真正弄清楚微生态制剂在生物体内所扮演的“角色”将有助于解决以上问题。

5 结束语

综上所述,虽然微生态制剂已在畜牧业中蓬勃发展,但其存在的问题不可忽视,尚待研究的问题还很多。今后在开发研究中的重点应该是:①从细胞水平和分子水平上进一步深入研究微生态制剂的作用机理;②通过基因工程手段获得能“永久性”定居在肠道的微生态制剂和多功能性微生态制剂;③除稳定性研究外,如何提高菌体的耐酸性、胆汁耐受性和产酶能力,也应成为研究的重点。随着对微生态制剂的深入研究,可开发利用的菌种不断增加,微生态制剂配方日趋复杂化和生产加工技术的日益改进,微生态制剂的应用范围将继续得到扩展,产品将日趋稳定和完善。

(参考文献17篇,刊略,需者可函索)

(编辑:王芳,xfang2005@163.com)

牛抵抗素基因的 cDNA 克隆

黄建龙 王哲 张才 刘国文

抵抗素是新近发现的一种由脂肪细胞分泌的富含半胱氨酸的多肽。人抵抗素基因定位于 19p13.3, 负责编码 108 个氨基酸残基组成的抵抗素蛋白。Tokushi 确定了 478 bp 的牛抵抗素序列, 具有完整的开放阅读框架, 负责编码 109 个氨基酸残基组成的牛抵抗素蛋白。这一序列同人的抵抗素 cDNA 序列具有 83% 的同源性。

Steppan 等对禁食隔夜的小鼠腹腔注射重组抵抗素, 12 h 后再注射一次, 在 2 h 后测定葡萄糖耐量, 发现血糖峰值升高 28%, 同时血浆胰岛素水平也升高。这说明外源性抵抗素导致的糖耐量受损, 并非由于体内胰岛素分泌不足, 而与胰岛素抵抗(IR)有关。后来的很多发现都证明抵抗素能引起 IR, 肥胖、糖尿病和高脂血症等代谢综合征几乎普遍存在 IR 现象, 但是抵抗素作用的分子机制仍不清楚。本研究旨在体外克隆出牛抵抗素(Resistin)基因序列, 为进一步研究抵抗素的功能及对围产期奶牛能量负平衡的调控机制提供试验基础。

1 材料与方 法

1.1 动物组织

选取临床检查无异常的新生 1 日龄犊牛 1 头, 取其大网膜脂肪组织放入液氮中保存。

1.2 主要试剂

Tris 购自 Sigma 公司; 蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司; 乙醇、异丙醇、异戊醇、苯酚、氯仿、EDTA、NaOH、NaCl、Na₂SO₄·7H₂O、琼脂糖均为国产分析纯; T4DNA 连接酶、pfu 高保真 DNA 聚合酶购自 Promaga 公司; 焦磷酸二乙酯(DEPC)、反转录酶(AMV)、OligodT、PCR 相关试剂和各种核酸内切酶购自 TaKaRa 大连公司; 质粒 DNA 快速小提试剂盒、DNA 片段回收试

剂购自杭州维特洁生物技术公司; 克隆载体(pMD18-T)购自 TaKaRa 公司; 大肠杆菌 DH5 α 菌株由本实验室保存。

1.3 引物设计与合成

引物设计根据 GenBank 中牛 Resistin mRNA 序列设计牛 Resistin 引物。上游引物序列为 ACGGATC-CATGAAGGCTCTCTCCTT, 5' 端带 AC 保护性碱基和 BamH I 酶切位点; 下游引物序列为 GTCTCGAGCTG-GATATGCAGGCGGC, 5' 端带 GT 保护性碱基和 Xho I 酶切位点, 扩增的目的片段大小为 343 bp, 由上海生物工程有限公司合成。

1.4 大网膜脂肪组织总 RNA 的提取

取出冷冻在液氮中的大网膜脂肪组织标本, 使用剪刀及镊子迅速切取 30 mg 脂肪组织, 在液氮中反复研磨至粉末状, 将粉末倒入 1.5 ml 离心管中。向离心管中加入 1 ml Trisol 试剂吹打混匀裂解细胞, 加入 200 μ l 三氯甲烷, 剧烈振荡 15 s, 室温静止 10 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液 500 μ l 并移入另一洁净的离心管内, 向管内添加 500 μ l 异丙醇, 轻轻混匀, 室温静止 10 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 然后用 75%乙醇洗涤沉淀的 RNA, 4 $^{\circ}$ C、7 500 r/min 离心 5 min, 最后用 DEPC 水溶解 RNA。取 5 μ l 的 RNA 溶液, 加入上样孔, 以 5 V/cm 恒压电泳 (上样前先预电泳 5 min), 紫外光下观察总 RNA 条带质量并拍照。

1.5 RT-PCR 反应

RT 反应体系为 25 μ l: 总 RNA 5 μ l、5 \times RT Buffer 5 μ l、dNTP Mixture 2 μ l、Oligo(dT)₁₈ 5 μ l、Rnase Inhibitor (RNA 酶抑制剂) 1 μ l、AMV 1 μ l, 加无 RNA 酶的水至 25 μ l。RT 反应条件为 70 $^{\circ}$ C、5 min, 42 $^{\circ}$ C 逆转录 90 min。

PCR 反应体系为 25 μ l: 10 \times PCR Buffer 2.5 μ l、dNTP Mixture 2 μ l、上游引物和下游引物各 1 μ l、cDNA 2 μ l、pfu 酶 0.3 μ l, 加无菌水至 25 μ l。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 35 s、59 $^{\circ}$ C 退火 35 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s、32 个循环、最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 牛 Resistin 基因的克隆

1.6.1 PCR 产物的回收

黄建龙, 吉林大学农学部畜牧兽医学院动物营养代谢病与中毒病研究室, 130062, 吉林长春。

王哲(通讯作者)、张才、刘国文, 单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期: 2007-02-18

★ 国家自然科学基金项目(编号为 30571365)

将上述 PCR 扩增的产物经琼脂糖凝胶电泳分析并照相,将目的片段所在位置凝胶切下,利用琼脂糖凝胶试剂盒回收目的片段,操作方法按试剂盒说明书进行。

1.6.2 PCR 产物的连接

将纯化后的牛 Resistin 的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上,取回收片断 4 μ l、10 \times 连接 Buffer 1.5 μ l、T4 连接酶 1 μ l,用水补至 15 μ l,16 $^{\circ}$ C 连接 10 h。

1.6.3 PCR 产物的转化

取出制备好的 DH5 α 感受态细胞,置于冰水浴中,加入连接物 5 μ l,用手指轻弹管壁,使其混合均匀,继续冰水浴 30 min 之后,42 $^{\circ}$ C 热冲击 90 s,冰水浴 2 min,然后将转化物涂于含有氨苄抗性(50 μ g/ml)的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 温箱过夜培养。

1.7 重组克隆质粒的鉴定

用质粒快速小提试剂盒提取质粒,先进行 PCR 鉴定,鉴定为阳性的克隆质粒用 BamH I 和 XhoI 双酶切鉴定。酶切体系为:10 \times H Buffer 4 μ l、BamH I 和 Xho I 各 1 μ l、重组克隆质粒 20 μ l,用灭菌水补至 40 μ l,所有组分加完后混均,于 37 $^{\circ}$ C 下温育 2 h;酶切后取 10 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.8 序列测定

经 PCR 和双酶切鉴定阳性的重组质粒送上海生物工程有限公司进行测序,用 DNASTAR 软件分析测序结果。

2 结果

2.1 新生犊牛大网膜脂肪组织总 RNA 电泳结果(见图 1)

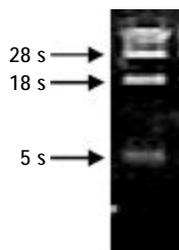
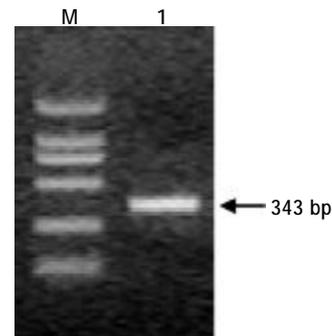


图1 新生犊牛大网膜脂肪组织总 RNA 电泳结果

由图 1 可见,提取的总 RNA 有 3 条清晰的条带。说明提取的总 RNA 比较完整,然后测定其 A260 和 A250 值, RNA A260/A280 值均大于 1.9,说明达到反转录要求。

2.2 牛 Resistin cDNA 片断的 RT-PCR 扩增结果

对牛 Resistin cDNA 片断进行 RT-PCR 扩增,对 PCR 产物进行 0.1%琼脂糖凝胶电泳(见图 2),在 250~500 bp 之间有一明显的条带,约为 343 bp,与预期要扩增的 Resistin 基因大小相符。

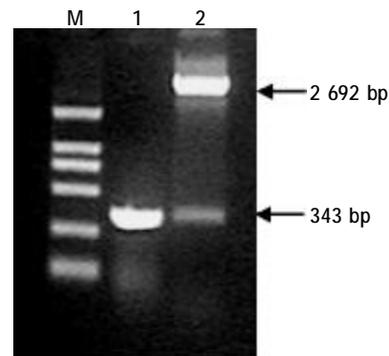


注:M 为 DL-2000 marker;1 为 Resistin RT-PCR 产物

图2 牛 Resistin 基因的 PCR 电泳结果

2.3 克隆质粒 PCR 和酶切鉴定结果

挑取白色菌落接种到含 100 mg/l Amp 的 LB 培养基中,提取质粒,经 PCR 扩增,在 343 bp 处有明亮的特异带。经 PCR 鉴定为阳性的重组质粒,用 BamH I 和 XhoI 双酶切,电泳结果显示有约 2 692 bp 和 343 bp 的目的片段,初步证明克隆成功(见图 3)。



注:M 为 D2000 marker;1 为牛 Resistin 克隆质粒的 PCR 鉴定;2 为牛 Resistin 克隆质粒的双酶切鉴定

图3 牛 Resistin 克隆质粒的 PCR 和酶切鉴定

2.4 序列测定结果

将 PCR 和酶切鉴定正确的重组质粒送上海生物工程有限公司进行序列测定。重组质粒的测序结果经 DNASTAR 软件分析,所得序列与设计序列的同源性为 100%(见图 4)。

3 讨论

3.1 抵抗素的生理功能

3.1.1 引起胰岛素抵抗

Steppan 等最初命名抵抗素时就是因为它能引起胰岛素抵抗。Satoh 等向雄性的 Wistar 鼠静脉注射一种由腺病毒编码的小鼠抵抗素,观察过度表达的抵抗素蛋白对胰岛素敏感性的慢性作用,结果显示,慢性的高抵抗素血症导致全身性胰岛素抵抗,从而导致糖

