

发酵豆粕饲料对异育银鲫非特异性免疫功能的影响

陈萱¹ 梁运祥^{1,2} 陈昌福^{2,3}

(1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070;

2. 华中农业大学农业微生物学国家重点开放实验室, 武汉 430070;

3. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘要 经微生物混菌发酵的豆粕与未经发酵的豆粕依不同比例混合, 按 30.0%的比例添加在某种市售鲫鱼饲料中, 连续投喂异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 30 d后, 通过测定供试鱼的增重量、血清中溶菌酶活性、谷丙转氨酶活性 (SGPT)、血清总蛋白含量和白细胞吞噬活性, 比较不同添加量的发酵豆粕对异育银鲫非特异性免疫功能的影响。结果表明, 随着饲料中发酵豆粕添加量的上升, 供试异育银鲫不仅增重量有所提高, 各项非特异性免疫指标也有所改善, SGPT的活性出现下降趋势。与未经过发酵的豆粕相比, 发酵豆粕具有一定的促进生长、增强非特异性免疫功能和改善肝功能的作用。

关键词 异育银鲫, 发酵豆粕, 免疫功能

豆粕的营养丰富, 是渔用饲料重要的蛋白源^[1]。但是, 豆粕中存在胰蛋白酶抑制剂、大豆凝血素及致甲状腺肿素等多种抗营养因子, 在一定程度上会干扰饲养动物对饲料的消化、吸收和有效利用, 造成饲养动物的生产性能下降^[2]。国内外的研究者采用物理、化学和生物技术等多种方法, 对除去豆粕中的抗营养因子均显示了不同程度的效果^[3]。采用酵母菌、乳酸杆菌等微生物进行混菌发酵后的豆粕, 不仅能有效地除去多种抗营养因子, 而且能明显提高其营养价值^[4]。

对除去豆粕中抗营养因子效果的评价, 研究者们大多采用直接测定处理前后豆粕中部分化学成分的变化^[4], 或者测定饲养动物的表观积蓄率、血液性状和血清成分的变化等^[5], 有关处理后的豆粕对饲养动物非特异免疫功能的影响, 尚未见报道。本研究将混菌法发酵后的豆粕定量添加在饲料中投喂异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*), 通过测定供试鱼的非特异性免疫活性指标, 评价了发酵豆粕对异育银鲫非特异免疫功能的影响。

1 材料与方法

1.1 发酵豆粕

豆粕从武汉市场购买 (东海粮油公司产品), 按本研究室开发的混菌发酵法在 20 L 全自动固体发酵罐中发酵后使用。

1.2 供试鱼及其饲养条件

采用武汉市南湖渔场饲养的个体体重为 (176 ± 7.8) g、活泼无外伤的异育银鲫作试验鱼。在 7 个直径 1.3 m, 深 1.5 m 的玻璃水族缸中, 以曝气的自来水分别饲养 40 尾试验鱼 (编号分别为 、 、 、 、 、 组)。驯养 10 d, 待供试鱼适应环境, 并确认无疾病症状后, 开始试验。试验前称量各试验组鱼的总体重, 记录其平均初始体重。试验期间饲养水温的变化范围为 24 ± 3 。

1.3 豆粕饲料的制作与投喂

从武汉市场上购买某厂家生产的鲫鱼饲料, 将其粉碎后作为试验饲料的基础饲料, 将未发酵豆粕和发酵豆粕按 5 0、4 1、3 2、2 3、1 4和 0 5 的比例分别混合后, 定量添加在粉碎的基础饲料中做成试验用颗粒饲料, 使各组饲料中 2 种豆粕的总含量均达到 35.0%。

收稿日期: 2005 - 02 - 02

资助项目: 国家自然科学基金项目 (批准号: 30271032)

通讯作者: 陈昌福

用未发酵豆粕和发酵豆粕按 5:0 配制的饲料投喂第 1 组 (发酵豆粕的对照组), 按 4:1 配制的为第 2 组, 按 3:2 配制的为第 3 组, 按 2:3 配制的为第 4 组, 按 1:4 配制的为第 5 组, 按 0:5 配制的为第 6 组 (未发酵豆粕的对照组), 对第 6 组投喂未添加豆粕的鲫饲料, 作为各试验组的对照组。根据各组试验鱼的总体重, 每天投喂相当于鱼体重 2.0% 的饲料, 每天早、晚各一次, 连续投喂 30 d。

1.4 采血

于投喂饲料结束后的第 2 天, 从各组中分别随机捞取 30 尾供试鱼, 切断腹动脉取血。将每尾鱼的血液分为 2 份, 其中 1 份以肝素抗凝, 制备抗凝血, 供检测白细胞吞噬活性; 将另一份血液首先在室温下静置 1 h 待其凝固, 置 4℃ 冰箱保存 4 h 后, 于 4℃ 条件下以 4000 r/min 离心 10 min, 收集上层血清, 保存在 4℃ 冰箱中备用。

1.5 吞噬菌体的制备

将金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 接种在液体肉汤培养基中, 37℃ 下培养 48 h 后, 离心集菌, 在菌液中加入浓度为 0.5% 的福尔马林, 37℃ 下灭活 24 h, 用灭菌生理盐水清洗 3 次, 并将其浓度调整至 1.0×10^8 cells/mL, 即为福尔马林灭活的 *S. aureus* 菌体 (formalin killed *S. aureus*, F-SA), 用作检测白细胞吞噬活性的吞噬菌体。

1.6 白细胞吞噬活性的测定

在 0.2 mL 抗凝血中加入 0.1 mL F-SA, 摇匀, 在 28℃ 的恒温水浴锅中孵育 45 min, 每隔 10 min 摇动 1 次。用吸管吸取血细胞涂片, 每个样品涂 5 张, 用甲醇固定 10 min, Giemsa 染色液染 1 h, 水洗风干后镜检, 并依下式计算白细胞吞噬百分比 (phagocytic percentage, PP) 和吞噬指数 (phagocytic index, PI)。

$$\text{吞噬百分比 (PP)} = \frac{100 \text{ 个吞噬细胞中参与吞噬的细胞数}}{100} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数 (PI)} = \frac{\text{细胞内总菌数}}{\text{参与吞噬的细胞数}}$$

1.7 溶菌酶活性的测定

依简纪常等^[6]的方法进行。用 0.067 mol/L 的磷酸缓冲液 (PBS, pH 6.4) 将溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 配制成 0.2 mg/mL 的菌悬液。每个样品取 3.0 mL 菌悬液, 吸取血清 0.04 mL 加入到菌悬液中, 混匀后, 立刻在 540 nm 下测定 A_0 值。然后在 28℃ 水浴中温育 30 min, 取出后置于 4℃ 冰浴中终止反应, 再测定

A 值。按如下公式计算溶菌酶的活性: $U = (A_0 - A) / A_0$

1.8 血清中谷丙转氨酶活性的测定

采用谷丙转氨酶试剂盒 (上海科欣生物技术研究所产品, 批号: 20041003) 测定。

1.9 血清中总蛋白含量的测定

采用血清总蛋白试剂盒 (上海科欣生物技术研究所产品, 批号: 20041108) 测定。

2 结果

2.1 发酵豆粕的促生长效果

试验期间各组异育银鲫的增重量测定结果如表 1 所示。从表中可以看出, 投喂发酵豆粕的试验组鱼体的增重量均明显高于对照组的增重量, 随着发酵豆粕在饲料中添加量的增加, 鱼体的平均增重量逐渐上升, 但各组之间鱼体的增重量并无显著差异 (t 测验, $P > 0.05$)。

表 1 各组异育银鲫的增重量 (n=30, g)

组别	开始时体重	结束时体重	增重量
	179.3	186.6	7.3
	178.6	186.4	7.8
	178.2	186.8	8.6
	177.9	186.4	8.5
	179.5	188.6	9.1
	178.8	188.4	9.6
	177.8	185.4	7.6

2.2 溶菌酶活性和白细胞吞噬活性的变化

投喂添加豆粕的饲料后, 各组异育银鲫的血清中溶菌酶活性和白细胞吞噬活性的测定结果如表 2 所示。

表 2 各组异育银鲫血清中溶菌酶活性和血液白细胞的吞噬活性

组别	溶菌酶活性 (U/mL)	白细胞吞噬百分比	
		PP	PI
	0.029 ± 0.005	49.6 ± 6.84	4.3 ± 1.16
	0.030 ± 0.006	51.3 ± 6.47	4.5 ± 1.32
	0.033 ± 0.006	53.7 ± 4.58	4.6 ± 1.36
	0.034 ± 0.007	55.4 ± 7.12	5.1 ± 1.45
	0.033 ± 0.004	55.9 ± 5.72	5.3 ± 1.35
	0.034 ± 0.007	55.8 ± 6.63	5.7 ± 1.34
	0.030 ± 0.004	50.8 ± 7.01	4.8 ± 1.42

从表 2 可以看出, 投喂发酵豆粕比例较高的第 2、第 3、第 4 和第 5 组异育银鲫血清溶菌酶活性显著高于 2 个对照组 (t 测验, $P < 0.05$)。白细胞吞噬活性的测定结果表明, 投喂发酵豆粕的供试鱼血液中白细胞的 PP 和 PI 均稍高于 2 个对照组。但

是, 各组之间鱼体血液中白细胞的 PP和 P均没有显著性差异 (*t*测验, $P > 0.05$)。

2.3 血清总蛋白和 SGPT活性的变化

供试异育银鲫的血清总蛋白含量和 SGPT活性测定结果如表 3 所示。从表中可以看出, 试验组鱼体血清总蛋白含量随着发酵豆粕添加量的增加而提高, 但是, 各试验组与 2 个对照组之间未出现显著性差异 (*t*测验, $P > 0.05$)。对 SGPT活性的测定结果表明, 在饲料中添加发酵豆粕可以降低鱼体血清中 SGPT的活性, 但是, 只有第 1 组和第 2 组试验鱼血清中 SGPT的活性显著性低于 2 个对照组 (*t*测验, $P < 0.05$)。

表 3 供试异育银鲫血清总蛋白和谷丙转氨酶活性

组别	血清总蛋白含量 (mg/mL)	谷丙转氨酶活性 (U/mL)
	26.38 ±1.34	16.47 ±1.75
	27.46 ±1.41	15.67 ±2.80
	28.16 ±1.27	14.98 ±1.68
	28.42 ±0.95	14.27 ±0.96
	28.72 ±0.49	13.93 ±2.00
	28.86 ±1.26	13.45 ±1.02
	26.66 ±1.54	16.02 ±1.30

3 讨论

从试验中异育银鲫的生长状况可以看出, 虽然在饲料中添加不同比例发酵豆粕后, 各试验组的生长速度与投喂未发酵豆粕和基础饲料的对照组鱼体之间没有显著性差异, 但随着饲料中发酵豆粕替代未发酵豆粕比例的上升, 供试鱼体的生长速度有明显提高的现象, 而鱼体增重量无显著差异, 这可能与本试验时间较短有关。

在饲料中添加发酵豆粕可以增强异育银鲫的血清溶菌酶活性, 并且在试验所选择的添加量范围内, 随着替代量的增加, 试验鱼的血清溶菌酶活性也随之增强。这种现象与利用酵母葡聚糖作为免疫刺激剂对虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*) 和大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 等鱼类进行的试验结果相似^[7,8], 这是否意味着发酵豆粕中的某些成分具有免疫刺激剂的功能, 值得

进一步研究。

对供试鱼血液中白细胞吞噬活性的测定结果表明, 与未投喂发酵豆粕的对照组相比, 投喂不同添加量发酵豆粕的异育银鲫血液中白细胞吞噬活性虽无显著差异, 但投喂发酵豆粕后的异育银鲫血液中白细胞吞噬活性有所上升, 说明白细胞的吞噬活性得到了增强。

测定供试鱼的血清总蛋白的结果表明, 投喂发酵豆粕饲料的异育银鲫血清总蛋白量有增加的趋势。而 SGPT的活性则有所降低, 此结果表明发酵豆粕可在一定程度上改善异育银鲫肝脏功能。

众所周知, 动物的特异性和非特异性免疫应答均属于生理学反应, 而各种免疫学指标均与整体的生理功能密切相关。因此, 测定动物的免疫学指标更有利于全面评价饲料对机体的影响, 根据本试验结果, 作者认为用鱼类的部分非特异性免疫指标来评价豆粕抗营养因子和营养价值的改善状况, 至少是一条值得深入探索的途径。

参考文献

- [1] 丁斌英, 房桂兵. 饲用大豆饼粕营养研究. 粮食与饲料工业, 2001, 1, 28~29
- [2] 王金龙, 李星华. 大豆脂肪氧化酶与籽粒营养品质关系的研究. 中国粮油学报, 2000, 15 (3): 36~38
- [3] 陈萱, 陈昌福. 日本用豆饼替代鱼粉饲养五条鲷的研究与应用效果. 养殖与饲料, 2004, (6): 4~6
- [4] 于敏, 励建荣. 去除大豆抗营养因子的研究. 营养学报, 2001, 23 (4): 383~385
- [5] 陈萱, 陈昌福. 不同方法改善豆饼营养与饲养鱼类的效果. 养殖与饲料, 2004, (8): 4~6
- [6] 简纪常, 吴灶和. 中草药对建鲤非特异性免疫功能的影响. 大连水产学院学报, 2002, (2): 114~119
- [7] Jorgensen J B, Robertsen B. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis, 1993, 16: 313~325
- [8] Baulny M O D, Quentel C, Fournier V. Effect of long-term oral administration of β -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* Dis Aquat Org, 1996, 26: 139~147

批发草种、鱼药、求购水蛭 (蚂蟥)

长期批发: 狼尾草、玉米草、串叶松香草、苦卖菜、皇竹草、小米草、鱼药、茶枯饼 (茶粕)、甲基睾丸素、硝酸亚汞、明矾、孔雀绿、亚甲基蓝、硫酸亚铁、鱼苗筛 3~5 寸、8~12 朝。长期求购: 水蛭 (蚂蟥)。

供 (求) 货单位: 福建永定县高陂农牧渔业站 邮编: 364101 联系人: 陈锦忠、邱金娘

农行帐号: 730401040000157 传真: (0597) 5635100 电话: (0597) 5636088 5631939