

高效降解蛋白枯草芽孢杆菌的筛选及促建鲤生长的研究

王嘉妮 熊焰* 胡敏 周辉霞 杜卫萍

(动物疫病与人类健康四川省重点实验室 四川农业大学 四川 雅安 625014)

摘要:【目的】从建鲤肠道分离并优选出了一株对蛋白具有强效降解力的菌株,探究其临床生产效果。【方法】使用牛奶平板进行筛选,经常规细菌学鉴定和 16S rDNA 序列分析确定 A7 菌株为枯草芽孢杆菌,通过临床饲喂试验探究其对建鲤促生长作用。【结果】A7 菌株在牛奶平板上的水解圈直径可达 27.5 mm,其最佳固体发酵条件为温度 28 °C、接种量 5% (1.2×10^9 CFU/mL)、料水比 1.0:1.2 和发酵时间 72 h。临床饲喂试验结果表明,饵料中添加 0.5%、1.0%和 1.5%的 A7 株菌粉均能促建鲤生长。其中,添加量为 1.0%的试验组,鱼体增重率和蛋白利用率最高,饵料系数最低,与产品对照组和空白对照组相比,均达到了显著性差异($P < 0.05$)。此外,随 A7 株菌粉添菌量的增加,各试验组肝胰脏和肠道的蛋白酶及淀粉酶活力出现先增大后减小趋势,与产品对照组和空白对照组相比,添加 1.0%的试验组增幅最大($P < 0.05$)。研究发现,试验组鱼肌肉中粗蛋白和粗脂肪含量较空白对照组也有明显的增减趋势($P < 0.05$)。【结论】饵料中添加 A7 株菌粉,可有效促进鱼的生长,降低饵料系数,提高肝胰脏和肠道的蛋白酶及淀粉酶活力,并提高鱼肌肉中的蛋白含量和降低脂肪含量。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 蛋白降解, 增重, 建鲤

Screening of high effective protein-degrading *Bacillus subtilis* and study on promotion to Jian carp growth

WANG Jia-Ni XIONG Yan* HU Min ZHOU Hui-Xia DU Wei-Ping

(Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: [Objective] To obtain *Bacillus subtilis* A7 and explore its clinical use. [Methods] A7 was screened through milk plate and identified by conventional bacteriology and 16S rDNA. Growth promoting effect on Jian carp was explored via clinical feeding experiments. [Results] Diameter of protein hydrolysis circle was 27.5 mm. The optimal solid fermentation conditions were: temperature 28 °C, inoculation amount 5% (1.2×10^9 CFU/mL), ratio of material to water 1.0:1.2, fermentation time 72 h. Diets with 0.5%, 1.0%, 1.5% A7 could promote Jian carp growth, and 1.0% A7 added displayed the highest weight gain and protein efficiency, and the lowest feed coefficient, difference was significant comparing with product group and blank group ($P < 0.05$). With increasing dosage of A7, protease and amylase activity in hepatopancreas and intestine of all test groups increased first,

基金项目: 教育部《长江学者和创新团队发展计划》创新团队项目(No. IRT0848)

*通讯作者: ✉: 469431253@qq.com

收稿日期: 2014-01-03; 接受日期: 2014-03-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-03-17

then decreased, and compared with product group and blank group, 1.0% added was also the best ($P<0.05$). Besides, fish fed with A7 had obvious trend of an increase content in crude protein and a decrease in crude fat comparing with blank group ($P<0.05$). **[Conclusion]** Fish baits with A7 can promote growth, reduce feed coefficient, increase protease and amylase activity, and improve fish flavor.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Protein degradation, Weight gain, Jian carp

建鲤是养殖中重要的硬骨鱼类,在我国其年产量占普通鲤鱼的 50%^[1]。在日益关注绿色生态养殖的今天,天然绿色饲料添加剂的研究备受瞩目,已成为饲料添加剂发展方向。芽孢杆菌能产生耐热芽孢,既易于生产加工,又易在机体存活、定殖和繁殖^[2],具有较强的产蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和多种抑菌物质的特性,使用上具有无毒、无残留和不产生耐药性等特点,被认为是安全有效的有益微生物^[3]。Rengpipat 等(2000)^[4]和 Panigrahi 等(2007)^[5]研究表明,日粮中添加芽孢杆菌具有促进饵料蛋白的降解,鱼类生长,降低饵料用量,以及改善鱼肉品质的作用^[6-11]。但市售产品良莠不齐,产品的稳定性及临床应用效果差异甚大,且用于生产的菌株会因长期人工培养导致生物学活性的降低。因此,只有不断筛选对饵料蛋白具有高效降解能力的优良菌株,才能确保产品有效性和稳定性,使之更好的应用于生产实践。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株分离材料来源于雅安、眉山和成都等地的鲜活建鲤。豆粕购于雅安市场。试验鱼选用 80 g 左右,大小均匀,体长 6–8 cm 的健康彭泽建鲤,购自雅安鱼总站。产品对照菌粉选用河北沧州市康壮兽药有限公司生产的枯草芽孢杆菌菌粉[生产许可证号:饲添(2006)0169,含菌量:100 亿 CFU/g]。

1.2 菌株分离及初筛

无菌取新鲜建鲤肠道内容物,稀释后置 80 °C 水浴 15 min,取上清接种普通平板,28 °C 培养 24 h,挑取菌落表面粗糙、不透明、白色或微黄色且形态明显的单菌落镜检观察,并做分离纯化。

1.3 菌株的复筛

将纯化菌株接种 5%牛奶平板和 2%淀粉平板,

28 °C 培养 24 h,根据降解蛋白和淀粉的水解圈直径大小,最终筛选出对蛋白质和淀粉降解能力强的一株菌。试验重复 3 次。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 常规细菌学鉴定:对筛选菌株(编号 A7)进行常规细菌学鉴定,参阅《伯杰细菌鉴定手册》第 8 版^[12]。

1.4.2 16S rDNA 全序列分析:提取 A7 菌株 DNA,采用 16S rDNA 细菌通用引物进行扩增。正向引物为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物为 5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3',25 μL PCR 反应体系的扩增条件为:94 °C 3 min,94 °C 30 s,52 °C 1.5 min,72 °C 2 min 30 s,35 个循环;72 °C 10 min。所得序列利用 BLAST 进行同源性比对,并构建系统发育树。引物合成和测序由大连宝生物工程有限公司完成。

1.5 固体发酵优化试验

A7 菌株摇床培养 48 h,得到浓度为 1.2×10^9 CFU/mL 的菌液。取豆粕为发酵底物,以温度(25、28、30 °C)、接种量(2%、5%、10%)、料水比(1.0:0.8、1.0:1.0、1.0:1.2)和时间(24、48、72 h)为四因素,采用正交试验进行固体发酵优化,测定豆粕发酵后的蛋白水解度(DH)^[13]和平均肽链长度(APLL)^[14]。

1.6 临床试验

1.6.1 菌粉制作:麦麸 600 g、豆粕 300 g、玉米粉 100 g 和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 500 mL 配制固体发酵培养基,浓度为 1.2×10^9 CFU/mL 的 A7 株菌液按培养基干重的 5%接种,在上述最优条件下进行发酵培养,收集发酵物并与等量玉米粉混匀,烘干,粉碎,制成含菌量为 1.0×10^9 CFU/g 的 A7 株菌粉。

1.6.2 饲喂分组:600 尾建鲤经 2 周养殖驯化后随

机分成 3 个试验组(I、II、III)和 2 个对照组(IV、V), 每组 3 个重复, 每个重复 40 尾。试验组 I、II 和 III 饲喂饵料中分别按 0.5%、1.0% 和 1.5% 比例添加 A7 菌株粉, IV 组按产品说明书在饵料中添加 0.1% 河北沧州市康壮兽药有限公司生产的枯草芽孢杆菌菌粉作为产品对照组, V 组为饵料中不添加枯草芽孢杆菌菌粉的空白对照组。饲料原料粉碎后过 60 目筛, 按饵料配方(g/kg, 鱼粉 100.0, 豆粕 310.0, 菜粕 200.0, 面粉 323.4, 鱼油 19.4, 大豆油 14.3, 磷酸氢钙 17.4, 乙氧喹啉 0.5, 维生素预混料 10.0 和矿物质预混料 5.0)精确称重, 混匀备用。

1.6.3 饲养管理: 实验在 15 个 1.8 m×1.8 m×1.0 m 的水泥池(四川农业大学水产科研基地)中进行, 水温 22–30 °C, pH 7.0 左右, 水体溶氧量 5 mg/L 以上, 微流水养殖, 饲养期不使用任何药品和水体消毒剂。每天以鱼体重 3%–5% 定时投饵 2 次, 正式试验期为 60 d, 每日观察记录鱼体况、投饵量和死亡鱼数。

1.6.4 试验指标测定: (1) 生长指标测定: 各试验组和对照组在饲喂 0、30 和 60 d 后称重, 并计算增重率 [$WGR=(W_t-W_0)/W_0\times 100$]、饵料系数 [$FCR=W_f/(TW_t-TW_0)$] 和饵料蛋白质效率 [$PER=(TW_t-TW_0)/(W_f\times CP_f)$]。式中, W_0 : 初始体重(g), W_t : 试验后 30 d 或 60 d 体重(g), W_f : 饵料投喂总量(g), TW_0 : 每组鱼体初始总重(g), TW_t : 每组鱼体试验末总重(g), CP_f : 饵料粗蛋白含量。

(2) 肝胰脏和肠道的蛋白酶及淀粉酶活力测定: 各试验组和对照组分别于 30 d 和 60 d 随机挑选 10 尾建鲤, 取肝胰脏和肠管称重并剪碎, 加 10 倍去离子水, 冰浴下 600 r/min 匀浆 5 min, 经 4 °C、4 000 r/min 离心 20 min, 取上清检测蛋白酶活力(福林-酚试剂法^[15])和淀粉酶活力(碘-淀粉比色法^[16])。

(3) 肌肉粗蛋白和粗脂肪测定: 各试验组和对照组于 60 d 时取鱼背部肌肉检测粗蛋白质(凯氏定氮法 GB/T5009.5-1985), 粗脂肪(索氏抽提法 GB/T5009.6-1985)和水分(105 °C 烘干恒重法 GB/T5009.3-1985)的含量。

1.7 数据分析

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行单因素方差分析, 以 Duncan 氏多重比较方法检验组间差异, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

从 42 尾建鲤肠内容物中培养获得 55 株芽孢杆菌, 将纯化株接种 5% 牛奶平板和 2% 的淀粉平板, 最终筛选出一株对蛋白和淀粉降解能力强的菌株, 编号 A7。该菌株的水解圈直径明显大于其他菌株, 其在牛奶平板和淀粉平板的水解圈直径分别为 27.5 mm 和 11.0 mm (图 1、2)。

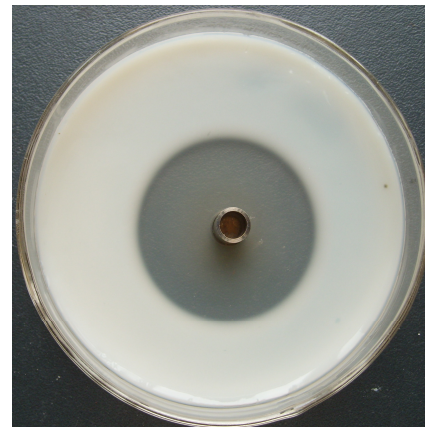


图 1 蛋白降解水解圈

Figure 1 Protein hydrolysis circle

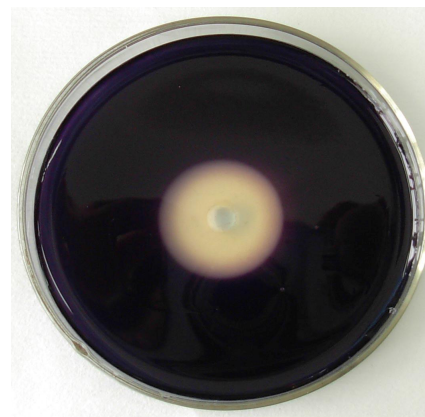


图 2 淀粉降解水解圈

Figure 2 Starch hydrolysis circle

2.2 菌株鉴定

2.2.1 细菌学鉴定: 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》第8版^[12], 对A7菌株进行染色、形态、培养和生化特性常规细菌学鉴定, 初步确定为枯草芽孢杆菌。

2.2.2 16S rDNA PCR 扩增: A7菌株经16S rDNA PCR扩增获得一条分子量为1 500 bp左右的条带, 序列在 GenBank 的登录号为 KC715735。利用 BLAST 进行同源性检测并构建系统发育树发现, A7菌株与 *Bacillus subtilis* AY172513 聚成一支, 一致性达到99% (图3)。

根据菌株染色、形态、培养和生化特性, 参阅《伯杰细菌鉴定手册》第8版^[12], 并结合16S rDNA序列分析, 最终确定分离的A7菌株为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*), 并命名为A7菌株。

2.3 固体发酵优化试验

豆粕蛋白水解度结果显示, 影响A7菌株发酵的各条件因素主次顺序为: 时间>料水比>接种量>温度。表观分析最佳蛋白水解度组合为: A2B2C3D3, 即温度28℃、接种量5%、料水比1.0:1.2和时间72h。见表1。

豆粕蛋白平均肽链长度结果显示, 影响A7菌

株发酵的各条件因素主次顺序为: 时间>料水比>接种量>温度。表观分析最佳平均肽链长度组合为: A₃B₂C₃D₃, 即: 温度30℃、接种量5%、料水比1:1.2和时间72h。见表2。

2.4 A7菌株促建鲤生长效果

试验组建鲤增重率和蛋白质效率较空白对照组显著提高, 饵料系数大幅降低($P<0.05$); 除试验组III外, 试验组I、II的建鲤增重率、蛋白质效率及饵料系数与产品对照组相比, 均达到了显著性差异($P<0.05$)。试验组I-III终末体重比空白对照组分别提高了8.45%、22.62%和11.97% ($P<0.05$), 比产品对照组分别提高了4.17%、16.09%和6.72% ($P<0.05$)。试验组组间建鲤增重率在63.10%-84.94%之间, 差异显著($P<0.05$), 且随着添菌量的增加, 呈现先增大后减小的趋势, 其中饲喂添加1% A7株菌粉的建鲤生长最好, 与空白对照组相比, 增重率和蛋白质效率分别提高69.07%和48.55%, 饵料系数降低32.90% ($P<0.05$); 与产品对照组相比, 增重率和蛋白质效率分别提高46.93%和26.54%, 饵料系数降低21.32% ($P<0.05$)。见表3。

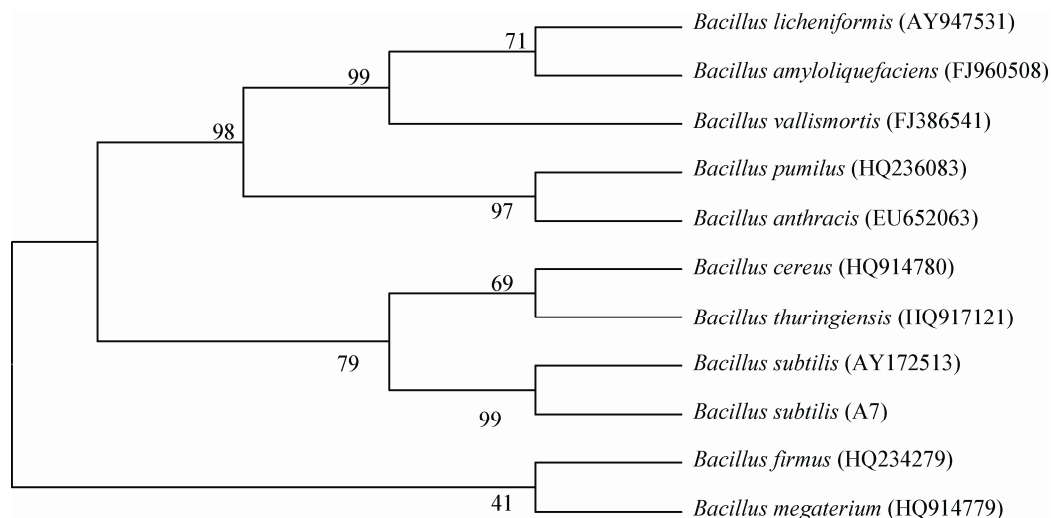


图3 A7菌株16S rDNA序列系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence of A7

表 1 豆粕蛋白水解度方差分析结果					
Table 1 The analysis on variance results of soybean meal degree of hydrolysis					
序号 Number	A 温度 Temperature (°C)	B 接种量 Inoculation amount (%)	C 料水比 Ratio of material to water	D 发酵时间 Fermentation time (h)	蛋白水解度 DH (%)
1	25	2	1:0.8	24	1.00
2	28	5	1:0.8	48	20.92
3	30	10	1:0.8	72	18.72
4	28	2	1:1	72	25.78
5	30	5	1:1	24	8.70
6	25	10	1:1	48	18.61
7	30	2	1:1.2	48	25.53
8	25	5	1:1.2	72	30.32
9	28	10	1:1.2	24	7.65
K ₁	49.93	52.31	40.64	17.35	
K ₂	54.35	59.94	53.09	65.06	
K ₃	52.95	44.98	63.50	74.82	
k ₁	16.64	17.44	13.55	5.78	
k ₂	18.12	19.98	17.70	21.69	
k ₃	17.65	14.99	21.17	24.94	
R	1.47	4.99	7.62	19.16	

表 2 豆粕蛋白平均肽链长度方差分析结果					
Table 2 The analysis on variance results of soybean meal average peptide link length					
序号 Number	A 温度 Temperature (°C)	B 接种量 Inoculation amount (%)	C 料水比 Ratio of material to water	D 发酵时间 Fermentation time (h)	平均肽链长度 APLL (kD)
1	25	2	1:0.8	24	53.60
2	28	5	1:0.8	48	4.64
3	30	10	1:0.8	72	5.21
4	28	2	1:1	72	3.78
5	30	5	1:1	24	10.57
6	25	10	1:1	48	5.17
7	30	2	1:1.2	48	3.85
8	25	5	1:1.2	72	3.24
9	28	10	1:1.2	24	11.86
K ₁	62.01	61.23	63.45	76.03	
K ₂	20.28	18.45	19.52	13.66	
K ₃	19.63	22.24	18.95	12.23	
k ₁	20.67	20.41	21.15	25.34	
k ₂	6.76	6.15	6.51	4.55	
k ₃	6.54	7.41	6.32	4.08	
R	14.13	14.26	14.83	21.27	

表 3 A7 株菌粉对建鲤生长性能的影响					
Table 3 The effect of A7 on growth performance in Jian carp (n=30, x±s)					
试验组别	初始体重	终末体重	增重率	饵料系数	蛋白质效率
Experimental groups	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	WGR (%)	FCR	PER (%)
I	80.02±0.07	130.51±0.45 ^c	63.10±33.79 ^c	1.85±0.02 ^c	1.72±0.04 ^b
II	79.79±0.05	147.56±0.65 ^a	84.94±13.92 ^a	1.55±0.02 ^d	2.05±0.04 ^a
III	80.04±0.03	134.74±0.75 ^b	68.34±20.45 ^b	1.90±0.02 ^{bc}	1.67±0.04 ^{bc}
IV	80.00±0.05	126.25±0.22 ^d	57.81±17.87 ^d	1.97±0.03 ^b	1.62±0.03 ^c
V	80.10±0.03	120.34±0.76 ^e	50.24±16.95 ^e	2.31±0.06 ^a	1.38±0.04 ^d

注：同列肩注不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)，相同者差异不显著($P>0.05$)。
Note: In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with same small letter superscripts mean not significant difference ($P>0.05$).

2.5 A7 株菌粉对建鲤肝胰脏和肠道蛋白酶及淀粉酶活力的影响

试验组鱼肝胰脏和肠道的蛋白酶及淀粉酶活力均高于空白对照组，并且随着 A7 株菌粉添加量的增大，酶活力出现了先增大后减小的趋势。试验 60 d 时各组肝胰脏和肠道的蛋白酶及淀粉酶活性均大于试验 30 d，其中 60 d 时添加 1% A7 的试验组酶活性最高，与产品对照组和空白对照组相比，肝胰脏蛋白酶及淀粉酶活力分别增加 5.62%、7.07%和 5.62%、10.55% ($P<0.05$)，肠道蛋白酶及

淀粉酶活力分别增加 8.63%、5.83%和 30.79%、9.92% ($P<0.05$)。见表 4。

2.6 A7 株菌粉对鱼肌肉粗蛋白和粗脂肪的影响

试验组鱼肌肉粗蛋白含量和粗脂肪含量较空白对照组有显著的增减趋势($P<0.05$)，但与产品对照组相比变化不明显($P>0.05$)。其中以 II 组的增减幅度最大，与空白对照组和产品对照组相比，肌肉粗蛋白含量分别增加 2.41% ($P<0.05$)和 1.11% ($P>0.05$)，粗脂肪含量分别减少 3.52% ($P<0.05$)和 1.37% ($P>0.05$)。见表 5。

表 4 A7 株菌粉对建鲤肝胰脏和肠道的蛋白酶及淀粉酶活力的影响							
Table 4 The effect of A7 on protease and amylase activity in hepatopancreas and intestines in Jian carp (n=9, x±s, U/g)							
时间	脏器	项目	试验组别				
			Experimental groups				
Time (d)	Organ	Items	I	II	III	IV	V
30	肝胰脏	蛋白酶活力	91.64±3.96 ^a	92.01±3.54 ^a	92.00±1.14 ^a	88.37±2.58 ^b	85.44±5.06 ^c
		淀粉酶活力	85.18±1.37 ^{bc}	87.04±0.81 ^a	85.79±1.22 ^b	84.56±0.96 ^c	81.07±1.81 ^d
60	肠道	蛋白酶活力	271.04±7.34 ^{ab}	279.93±2.37 ^a	276.86±4.28 ^a	265.12±7.57 ^{bc}	256.65±5.49 ^c
		淀粉酶活力	59.63±2.65 ^a	59.72±4.53 ^a	57.25±4.68 ^b	58.07±3.62 ^b	50.53±2.75 ^b
	肝胰脏	蛋白酶活力	105.91±4.07 ^c	109.35±2.02 ^a	108.31±6.60 ^b	108.44±5.22 ^b	103.53±5.26 ^d
		淀粉酶活力	103.67±1.46 ^c	106.77±2.50 ^a	105.41±2.19 ^b	99.72±2.76 ^d	96.58±1.88 ^c
	肠道	蛋白酶活力	427.43±8.60 ^{bc}	447.04±8.07 ^a	433.18±5.96 ^b	411.53±10.75 ^d	341.79±10.21 ^e
		淀粉酶活力	63.96±4.01 ^b	66.49±3.21 ^a	64.04±4.22 ^b	62.83±1.77 ^c	60.49±5.17 ^d

注：同行肩注不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)，相同者差异不显著($P>0.05$)。
Note: In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with same small letter superscripts mean not significant difference ($P>0.05$).

表 5 A7 株菌粉对建鲤肌肉粗蛋白和粗脂肪含量的影响					
Table 5 The effect of A7 on the contents of crude protein and crude fat in Jian carp (n=3, x±s, CFU/g)					
营养成分 Nutritional compositions (%)	试验组别 Experimental groups				
	I	II	III	IV	V
粗蛋白 Crude protein	18.08±0.22 ^a	18.26±0.29 ^a	18.14±0.32 ^a	18.06±0.29 ^a	17.83±0.26 ^b
粗脂肪 Crude fat	5.83±0.55 ^{bc}	5.76±0.38 ^c	5.87±0.48 ^b	5.84±0.23 ^{bc}	5.97±0.28 ^a

注：同行肩注不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)，相同者差异不显著($P>0.05$)。
Note: In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with same small letter superscripts mean not significant difference ($P>0.05$).

3 讨论

3.1 降解豆粕菌株的筛选

细菌的多样性以及不同区域气温和水环境等因素的影响，导致了细菌的变异和功能的改变。因此，为保证临床生产菌株发挥最大效益，不断筛选适应新环境且能产生有效生物学功能的菌株愈发凸显其重要性。在长期生物进化过程中，菌种与宿主形成了供体与受体的关系^[17]，正是由于这种宿主特异性，直接从鱼体肠道内容物中筛选出高效降解饵料蛋白的菌株是寻找适合水产应用菌株的捷径。豆粕是动物重要的植物性蛋白源，粗蛋白含量高达 43%–48%，被广泛用于饲料产业中，但由于存在多种抗营养因子，极大地限制了应用^[18]。利用细菌发酵，将豆粕中的大分子蛋白降解成易吸收的小分子肽类，可极大地提高饵料蛋白的营养水平。本实验使用 5%牛奶平板和 2%淀粉平板对分离菌株进行初筛，最终筛选出一株对饵料蛋白具有强效降解作用的 A7 菌株。豆粕固体发酵的极差分析结果显示，各影响因素的主次顺序相同，其中时间对蛋白水解度和平均肽链长度影响最大，温度影响最小。虽最佳发酵组合间存在微小差异，但考虑到 A7 菌株最终是用于水产养殖中，因此临床饲喂试验中选用发酵豆粕的最优组合为温度 28℃、接种 5%、料水比 1.0:1.2 和发酵时间 72 h。

3.2 提高饵料蛋白利用率和促生长及促消化作用

Rengpipat 等 (1998–2000)^[4,19]、Balcazar 等

(2007)^[20]、Kumar 等(2006)^[21]和 Aly 等(2008)^[6]报道，饲料中添加芽孢杆菌制剂能促进动物生长。本实验结果显示，饵料中添加 0.5%、1.0%和 1.5% A7 株菌粉均能促进建鲤生长，其中添加量为 1.0%的 A7 株菌粉效果最佳，建鲤增重率和蛋白利用率分别比空白对照组和产品组对照组提高 69.07%、48.55%和 46.93%、26.54%，饵料系数较空白对照组和产品组对照组分别降低 0.76 和 0.42 ($P<0.05$)(表 3)。潘康成等(1997)^[11]报道，鲤鱼饲料中添加 1%地衣芽孢杆菌，鲤鱼增重率较对照组提高了 11.80%，饵料系数降低了 0.24，本实验结果明显优于潘康成等的报道。由此可见，优良菌株的选育是极为重要的。枯草芽孢杆菌能大量分泌蛋白酶，促使饵料蛋白降解为小分子肽类，尤其对不易被降解的蛋白具有更显著的效果，因而提高了饵料蛋白的利用率。周小秋等(2001)^[22]认为，大量添加芽孢杆菌会在鱼肠道中产生过量的外源蛋白酶和淀粉酶，抑制鱼体内源酶的活性，降低内源酶对营养物质的分解作用，影响营养物质的消化利用。据管越强等(2010)^[23]报道，当饲料中枯草芽孢杆菌的添加量达 5.0 g/kg 时，中华鳖增重率反而略低于对照组。我们研究发现，当 A7 株菌粉的添加量达到 1.5%时，建鲤的增重率出现下降，比添加量为 1.0%的低 19.54%。作为外源细菌添加剂对动物的促生长作用是有一定量度的^[24-25]，原因可能是过量添加外源菌体对鱼体自身消化酶系产生了抑制作用，并

且过多的外源菌体会干扰鱼体肠道正常菌群的平衡,同时也会因外源菌消耗大量营养物质而导致饵料蛋白在转化为菌体蛋白过程中产生损耗。本试验使用的市售产品活菌数高于 A7 株菌粉 10 倍,但临床效果却远不及 A7 株菌粉,与试验 II 组相比,鱼体增重率低 27.13%,蛋白利用率低 0.43%,饵料系数高 0.42,并且在投喂饵料 30 d 及 60 d 时鱼体肝胰脏和肠道蛋白酶活性也显著低于 II 组($P<0.05$)。因此,优良菌株的筛选、菌株的活性和添加量在益生菌制剂使用中是非常重要的。此外,各试验组建鲤肝胰脏和肠道的蛋白酶及淀粉酶活力均高于空白对照组^[26-28],这与 Bhaskar 等(2007)^[29]和 Liu 等(2010)^[30]报道的添加枯草芽孢杆菌可显著提高鱼虾肠道消化酶的活性一致。

3.3 对鱼肌肉蛋白和脂肪含量的影响

鱼类肌肉是主要食用部位,其必需氨基酸模式与人体需要极为接近,营养价值高。鱼肉蛋白质生物价为 83%,高于牛肉、猪肉和羊肉,并且,人体对鱼肉蛋白质的消化吸收率高达 94%。实验发现,饵料中添加 A7 株菌粉能增加鱼肌肉中粗蛋白含量和降低粗脂肪含量,对改善鱼肉品质有一定的作用($P<0.05$)。该结果与仇明等(2010)^[31]添加枯草芽孢杆菌使斑点叉尾鮰粗蛋白含量增加,粗脂肪含量降低的结果相一致。除鱼类研究外,枯草芽孢杆菌在虾类也取得类似结果^[32]。试验发现,菌粉添加量对肌肉含量影响也存在一个最适量,1% A7 株菌粉的添加量的效果最好。添加量为 0.5%和 1.5%的试验组粗蛋白含量均略低于添加量为 1%的试验组($P>0.05$),而脂肪含量偏高,其中 1.5%添加量与 1%添加量间达到差异显著水平($P<0.05$)。

本研究表明,A7 菌株是一株适宜在水产上应用的益生菌添加剂菌种。饵料中添加 1% 的 A7 株菌粉效果最佳,能显著提高鱼的增重率,饵料蛋白利用率,提高和改善肝胰脏和肠道的蛋白酶及淀粉酶活力,并增加鱼肌肉中粗蛋白含量和降低粗脂肪含量,对改善鱼肉的品质有一定的作用。我们认为,

微生态制剂的应用效果不能仅仅依靠提高产品的含菌量,而应更加注重优良菌株的筛选和保持菌株在产品中的活性,这一点显得更为重要。

参 考 文 献

- [1] 朱健,王建新. 建鲤品种特征研究进展[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2004, 23(1): 52-55.
- [2] Elliott ML, Des Jardin EA, Batson WE, et al. Viability and stability of biological control agents on cotton and snapbean seeds[J]. Pest Management Science, 2001, 57(8): 695-706.
- [3] 俞勇,李会荣,李筠,等. 益生菌制剂在水产养殖中的应用[J]. 中国水产科学, 2001, 8(2): 92-96.
- [4] Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, et al. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11)[J]. Aquaculture, 2000, 191(4): 271-288.
- [5] Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, et al. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2007, 31(4): 372-382.
- [6] Aly SM, Ahmed YA, Ghareeb AA, et al. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(1/2): 128-136.
- [7] Nayak SK, Swain P, Mukherjee SC. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(4): 892-896.
- [8] Tseng DY, Ho PL, Huang SY, et al. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(2): 339-344.
- [9] Gatesoupe J. *Bacillus* sp. spore as food additive for the rotifer *Brachionus plicalis*: improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L[C]. Fish Nutrition in Practice, Biarritz France, 1991(6): 24-27.
- [10] Sun YZ, Yang HL, Ma RL, et al. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(5): 803-809.
- [11] 潘康成,何明清,刘克琳. 微生物添加剂对建鲤生长和消化酶活性的影响研究[J]. 饲料工业, 1997, 8(10): 41-42.

- [12] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 729-758.
- [13] 徐英操, 刘春红. 蛋白水解度测定方法综述[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(7): 173-176.
- [14] 董玉莲, 闻克威, 李宝才, 等. 蓝园鳊酶解物的营养成分分析[J]. 营养学报, 2003, 25(2): 178-180.
- [15] 张学英. 蛋白酶及其活力的测定[J]. 酿酒, 2008, 35(6): 100-102.
- [16] 吴莉芳, 秦贵信, 赵元, 等. 饲料中去皮豆粕替代鱼粉比例对草鱼消化酶活力的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(1): 23-27.
- [17] 高权新, 吴天星, 王进波. 肠道微生物与寄主的共生关系研究进展[J]. 动物营养学报, 2010, 22(3): 519-526.
- [18] Liener IE. Implications of antinutritional components in soybean foods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1994, 34(1): 31-67.
- [19] Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, et al. Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth[J]. Aquaculture, 1998, 167(3): 301-313.
- [20] Balcazar JL, Rojas-Luna T, Cunningham DP. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2007, 96(2): 147-150.
- [21] Kumar R, Mukherjee SC, Prasad KP, et al. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.)[J]. Aquaculture Research, 2006, 37(12): 1215-1221.
- [22] 周小秋, 邝声耀, 唐凌. 复合酶制剂在建鲤饵料中适宜添加量研究[J]. 水利渔业, 2001, 21(6): 7-8.
- [23] 管越强, 周环, 张磊, 等. 枯草芽孢杆菌对中华鳖生长性能、消化酶活性和血液生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(1): 235-240.
- [24] 刘波, 刘文斌, 王恬. 地衣芽孢杆菌对异育银鲫消化机能和生长的影响[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(4): 80-84.
- [25] 沈文英, 余东游, 李卫芬, 等. 地衣芽孢杆菌对三角帆蚌消化酶活性、免疫指标和抗氧化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2009, 21(1): 95-100.
- [26] Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA, et al. The effect of *Bacillus* spp. Bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*[J]. Aquaculture, 2006, 252(2): 516-524.
- [27] Wang YB. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2007, 269(1): 259-264.
- [28] Wang YB, Xu ZR. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities[J]. Amino Acid Science and Technology, 2006, 127(3): 283-292.
- [29] Bhaskar N, Sudeepa ES, Rashmi HN, et al. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(14): 2758-2764.
- [30] Liu KF, Chiu CH, Shiu YL, et al. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(5): 837-844.
- [31] 仇明, 王爱民, 封功能, 等. 枯草芽孢杆菌对斑点叉尾鲷生长性能及肌肉营养成分影响[J]. 粮食与饲料工业, 2010, 7: 16-19.
- [32] 林黑着, 李卓佳, 郭志勋, 等. 益生菌对凡纳滨对虾生长和全虾营养组成的影响[J]. 南方水产, 2008, 4(6): 95-100.