

葡萄糖氧化酶制剂对食用霉变玉米面小鼠的影响

崔亚利¹ 赵艳姣¹ 孙海云¹ 陈宝江² 李同洲²

(1. 河北农业大学 动物医学院 河北 保定 071001; 2. 河北农业大学 动物科技学院, 河北 保定 071001)

中图分类号: S865.1; S513 文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2015)09-0143-04

DOI:10.13881/j.cnki.hljxmsy.2015.1587

关键词: 葡萄糖氧化酶; 霉变玉米面; 小鼠; 日增重; 肠道微生物; 肝脏

摘要: 为了研究葡萄糖氧化酶(GOD)缓解霉变日粮对小鼠日增重、肠道菌群变化和肝脏结构与功能的影响,试验将75只18~22g KM小鼠随机分为5组,对照组饲喂基础日粮,试验组分别饲喂添加30%发霉玉米面+0、0.1%、0.3%、0.5% GOD的日粮,试验期为60d。结果表明:饲喂40d后,0.3% GOD能极显著增加小鼠日增重($P < 0.01$);饲喂60d后,0.3% GOD极显著降低了小鼠肠道中大肠杆菌数($P < 0.01$)极显著增加了乳酸杆菌数($P < 0.01$)。不同浓度的GOD均能显著提高肝脏谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性($P < 0.01$)显著降低丙二醛(MDA)含量($P < 0.01$)其中添加0.3% GOD效果较好,随着饲养时间的延长,小鼠肝脏病理组织结构和所测肝脏各指标有所改善;但试验期对各指标没有明显影响。说明GOD通过改善小鼠肝脏抗氧化能力,影响肠道大肠杆菌、乳酸杆菌数,缓解霉变饲料对小鼠生长造成的影响。

Effect of glucose oxidase preparation on mice fed with moldy maize flour

CUI Ya-li¹, ZHAO Yan-jiao¹, SUN Hai-yun¹, CHEN Bao-jiang², LI Tong-zhou²

(1. College of Veterinary Medicine, Agricultural University of Hebei, Baoding 070001, China;

2. College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 070001, China)

Key words: glucose oxidase; moldy maize flour; daily gain; intestinal microorganism; liver

Abstract: To study glucose oxidase (GOD) to relieve the effect of moldy diets on daily gain, changes in intestinal flora, and hepatic structure and function in mice, 75 Kunming (KM) mice with body weight between 18 and 22 g, were randomly divided into 5 groups. The control group was fed a basic diet, and the experimental groups were the diets added with 30% mouldy maize flour and 0%, 0.1%, 0.3%, and 0.5% GOD, respectively. The experiments lasted for 60 d. The results showed that addition of 0.3% GOD could significantly increase ($P < 0.01$) daily gain of mice after feeding 40 days. The addition of 0.3% GOD could extremely significantly decrease ($P < 0.01$) the numbers of *Escherichia coli* and extremely significantly increase ($P < 0.01$) the numbers of lactic acid bacilli after feeding 60 d. Different concentrations of GOD could significantly improve ($P < 0.01$) the activity of liver glutathione peroxidase (GSH-Px), total superoxide dismutase (T-SOD) and catalase (CAT), and could significantly decrease ($P < 0.01$) the content of malondialdehyde (MDA). Thereinto, the effect of addition of 0.3% GOD was better. The histopathological structure and the tested indexes of liver in mice were improved with the extension of feeding time, but the trial period had no significant effect on the indexes. The result indicates that GOD can affect the numbers of *Escherichia coli* and lactic acid bacilli through improving the antioxidant capacity of liver in mice, thereby relieving the effect of mouldy feed on the growth of mice.

玉米在畜禽日粮中占有较高比例,在小鼠饲料中

也占到25%左右。玉米保管不当很容易发霉,产生黄曲霉毒素、赤霉烯酮及呕吐毒素等,危害动物的生长、生产和繁殖,降低动物的免疫力。葡萄糖氧化酶(GOD)在动物体内发挥着重要作用。饲料中添加一定量的GOD,可以抑制蛋鸡盲肠内大肠杆菌的增殖,并对乳酸菌的生长和繁殖有促进作用^[1]。能降低肉鸡空肠、回肠pH值,具有明显抑制大肠杆菌生长、促进盲肠中乳酸杆菌和双歧杆菌增殖的作用^[2]。饲料霉变是困扰饲料业和畜牧业的一个全球性难题。目

收稿日期:2014-09-21;修回日期:2015-01-13

基金项目“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD39B01);河北省现代农业产业技术体系生猪产业创新团队建设猪营养和饲料项目;石家庄科技研究与发展计划项目(08150322A)

作者简介:崔亚利(1970-),女,副教授,博士,研究方向为基础兽医学, cuiyalidk@hebau.edu.cn.

通信作者:陈宝江(1971-),男,教授,博士,研究方向为动物营养学, chenbaojiang@vip.sina.com.

前关于 GOD 的研究多集中在对畜禽生产性能、肠道微生物和血清生化指标的影响方面,对霉变日粮中添加 GOD 制剂缓解慢性中毒的研究较少。试验在 KM 小鼠饲料中添加发霉玉米面和不同浓度 GOD 制剂,研究 GOD 对小鼠日增重、肠道微生物、肝脏结构和抗氧化功能的影响,为 GOD 缓解霉变玉米导致畜禽慢性中毒提供一定的理论依据,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 试验动物和饲料

小鼠 4 周龄左右雄性清洁级 KM 昆明鼠 [试验动物生产许可证号为 SCXK(京) 2011-0012] 75 只,体重为 18~22 g,购自北京大学医学部;小鼠粉状维持饲料和小鼠生长繁殖颗粒料,购自北京科澳协力饲料有限公司。

1.2 发霉玉米面的制作和检测

1.2.1 霉变玉米面的制备 恒温培养箱温度设定为 $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、湿度为 80%~85%,以利于霉菌生长。将盛有玉米面的灭菌搪瓷盘置于培养箱内,每日观察温湿度和玉米面的发霉程度。

1.2.2 霉菌培养和霉变玉米面检测 取霉变 7 d 左右的玉米面,采用高盐察氏培养基进行培养。经测定,发霉玉米面黄曲霉毒素 B_1 含量为 $225.9 \mu\text{g}/\text{kg}$,呕吐毒素含量为 $1\,023.10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

1.2.3 小鼠颗粒饲料的制作 根据试验设计,在小鼠粉状维持料中加入相应比例的 GOD 制剂和霉变玉米面,加水搅拌。水与料的比例大概为 1:2,待混合料能握成团但稍微一握还能松散时比较适宜。使用塑料漏斗制成柱状颗粒料, 50°C 烘干 5~6 h。

1.3 GOD 制剂、培养基

GOD 制剂,保定鲜尔康生物工程有限责任公司生产,以麸皮作为载体;培养基,购自青岛高科园海博生物技术有限公司。

1.4 试验设计和饲养管理

小鼠常规饲养 7 d 后开始试验,试验期为 60 d。小鼠随机分为 5 组,试验分组情况见表 1。添加 30% 发霉玉米面饲料中黄曲霉毒素 B_1 含量为 $67.77 \mu\text{g}/\text{kg}$,呕吐毒素含量为 $306.93 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。饲养在温度为 $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$ 、相对湿度为 55%、自然光照的环境中。

表 1 分组情况

组别	饲料
A 组	自制基础颗粒料(基础料)
B 组	70% 基础料 + 30% 发霉玉米面
C 组	69.9% 基础料 + 30% 发霉玉米面 + 0.1% GOD 制剂
D 组	69.7% 基础料 + 30% 发霉玉米面 + 0.3% GOD 制剂
E 组	69.5% 基础料 + 30% 发霉玉米面 + 0.5% GOD 制剂

1.5 测定项目

1.5.1 体重的测定 分别在饲喂发霉饲料的第 1, 20, 40, 60 天给小鼠称重。

1.5.2 样品的采集 在试验第 40, 60 天,各组随机选取 5 只小鼠,禁食 12 h 后颈椎脱臼法处死。取右叶肝脏同一部位两份,一份置于 10% 中性福尔马林溶液保存以备病理组织形态学检测;另一份置于 1.5 mL 离心管中,于 -80°C 冰箱保存,用于制备 10% 肝脏匀浆。刮取肠道(空肠、回肠和结肠)食糜混合物置于 1.5 mL 离心管中, -20°C 冰冻保存。

1.5.3 肝脏抗氧化能力的测定 将玻璃匀浆管置于冰水混合物中制备 10% 肝脏组织匀浆。肝脏中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性、丙二醛(MDA)和过氧化氢酶(CAT)含量用南京建成生物工程研究所的试剂盒采用紫外分光光度计测定。

1.5.4 肝脏病理组织形态学测定 样品制成 5~6 μm 常规石蜡切片,HE 染色,在显微镜下观察。

1.5.5 肠道微生物的测定 从 -20°C 保存柜中取出食糜,快速称取 0.2~0.3 g 放入试管内,用灭菌生理盐水 10 倍稀释,涡旋混合仪混合 1~2 min,逐级稀释,取预期梯度及左右各两个梯度的稀释液 0.1 mL,在培养基上涂布接种,每个梯度设 2 个重复,选取菌落数在 5~100 个之间的平皿进行计数。大肠杆菌采用麦康凯琼脂空气中 37°C 培养 18 h,乳酸杆菌用乳酸杆菌选择性琼脂厌氧环境 37°C 培养 24 h,观察,计数。

1.6 数据的统计分析

试验数据采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析,并用 LSD 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 小鼠日增重测定结果(见表 2)

时间/d	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
20	0.42 \pm 0.08	0.33 \pm 0.04	0.35 \pm 0.07	0.40 \pm 0.08	0.36 \pm 0.05
40	0.16 ^B \pm 0.08	0.09 ^B \pm 0.03	0.13 ^B \pm 0.04	0.27 ^A \pm 0.04	0.17 ^B \pm 0.03
60	0.28 ^A \pm 0.08	0.13 ^B \pm 0.04	0.14 ^B \pm 0.04	0.24 ^A \pm 0.05	0.21 ^A \pm 0.04

注:同行数据肩标字母不同表示差异极显著($P < 0.01$),相同表示差异不显著($P > 0.05$)。

由表 2 可知:饲喂至 20 天,添加 3 种不同浓度的 GOD 对小鼠日增重的影响差异不显著($P > 0.05$);随着时间的延长,饲喂到 40 天,添加 0.3% GOD 的 D 组与其他各组比较日增重极显著增加($P < 0.01$);饲喂至 60 天,添加 0.3% GOD 的 D 组与 B、C 组比较日增重极显著增加($P < 0.01$),与 A 组和 E 组比较差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 小鼠肠道微生物含量测定结果(见表 3)

表3 小鼠肠道微生物含量测定结果 $\log \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$

项目	时间/d	A组	B组	C组	D组	E组
大肠杆菌	40	5.13 ^{Bb} ± 0.21	7.23 ^A ± 0.28	6.50 ^{ABa} ± 0.40	5.83 ^B ± 0.58	6.11 ^B ± 0.70
	60	5.06 ^C ± 0.28	7.92 ^A ± 0.51	6.21 ^B ± 0.51	5.44 ^{BC} ± 0.48	5.76 ^{BC} ± 0.54
乳酸杆菌	40	9.13 ^{Aa} ± 0.21	7.76 ^{Bb} ± 0.61	8.12 ^{Bb} ± 0.42	8.33 ^{ABb} ± 0.61	8.12 ^{Bb} ± 0.38
	60	9.55 ^{Aa} ± 0.31	7.18 ^C ± 0.42	8.48 ^{ABb} ± 0.38	9.15 ^{ABab} ± 0.32	8.33 ^{ABb} ± 0.41

注:同行数据肩标大写字母完全不同表示差异极显著($P < 0.01$),小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)。

表4 小鼠肝脏抗氧化能力测定结果

项目	试验期/d	A组	B组	C组	D组	E组
GSH - Px/ 酶活力单位	40	907.48 ^{bc} ± 241.43	700.58 ^a ± 41.44	801.89 ^b ± 34.25	921.53 ^c ± 42.52	911.68 ^c ± 44.66
T - SOD/ ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	40	284.68 ^B ± 110.50	172.46 ^{Ac} ± 30.16	186.18 ^{Abc} ± 41.41	229.63 ^{Bab} ± 14.17	233.39 ^{Ba} ± 21.93
MDA/ ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)	40	2.34 ^B ± 0.88	3.64 ^A ± 0.50	2.96 ^B ± 0.54	2.49 ^B ± 0.47	2.67 ^B ± 0.46
CAT/ ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	40	110.24 ^B ± 36.44	78.55 ^{Aa} ± 8.44	86.67 ^{Ab} ± 6.21	90.60 ^{Ab} ± 1.68	94.19 ^B ± 9.80
	60	115.64 ^B ± 28.15	80.03 ^{Aa} ± 9.04	86.22 ^{Ab} ± 2.91	93.49 ^{Ab} ± 8.61	92.88 ^{Ab} ± 8.43

注:同行数据肩标大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$),小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)。

由表4可见:饲喂霉变饲料后,与A组比较,B组小鼠肝脏中GSH - Px、T - SOD和CAT活性显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),MDA含量极显著升高($P < 0.01$)。饲喂40天,与B组比较,C、D、E组GSH - Px活性均有不同程度的升高,差异显著($P < 0.05$);与B组比较,D组和E组T - SOD活性极显著升高($P < 0.01$);与B组比较,C、D、E组MDA极显著降低($P < 0.01$);与B组比较,C、D、E组CAT活性显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。饲喂60天,与B组比较,C、D、E组GSH - Px活性均极显著升高($P < 0.01$);与B组比较,D组和E组T - SOD活性极显著升高($P < 0.01$);与B组比较,C、D、E组MDA含量显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与B组比较,C、D、E组CAT活性显著升高($P < 0.05$)。随着饲养时间的延长,所测肝脏各指标有所改善。

2.4 肝脏组织形态学观察(见294页彩图1)

饲料中添加霉变玉米面的B组切片在光镜下可见肝细胞紊乱,中央静脉和窦状隙中有淤血,肝细胞内出现空泡;有些肝细胞体积缩小,胞核大小不等,甚至胞核消失。添加GOD的C、D、E组肝脏的损伤得到不同程度的缓解,肝细胞索排列较整齐,肝细胞结构基本正常,有些肝细胞内可见少量空泡。

3 讨论

3.1 GOD对小鼠日增重的影响

霉变饲料能造成动物多方面的危害已成为共识,不同动物对黄曲霉毒素 B_1 (AFB₁)的敏感性不同,兔的敏感性最强,其他动物依次为幼鸭、猪、狗、豚鼠、绵

羊、小鼠、鸡和大鼠^[3]。雏鸡饲喂含黄曲霉毒素含量不是很高的霉玉米,临床上虽无典型中毒表现,但是会使机体免疫机能下降,生长发育受阻,体重增长显著减慢,并且参差不齐,饲料报酬率降低^[4]。45日龄KM小鼠饲喂自制霉变玉米饼4周后,小鼠体重都有不同程度的下降,而且影响小鼠的免疫功能,造成T、B淋巴细胞数改变^[5]。本试验结果表明,0.3% GOD较长时间的使用,对提高小鼠日增重效果较好,能显著改善霉变玉米面对小鼠日增重造成的不良效果。GOD能够有效改善霉菌中毒对小鼠消化系统产生的直接毒害作用,促进营养物质吸收。

2.3 小鼠肝脏抗氧化能力测定结果(见表4)

由表3可知:与A组比较,B组小鼠肠道内大肠杆菌数极显著增加($P < 0.01$),乳酸杆菌数极显著降低($P < 0.01$);与B组比较,添加0.3%(D组)和0.5%(E组)GOD均能够极显著降低肠道大肠杆菌数量($P < 0.01$)。饲喂40天,与B组比较,添加GOD的C、D、E组对乳酸杆菌数没有显著影响($P > 0.05$);但随着时间的延长,饲喂到60天,C、D、E组肠道乳酸杆菌数均极显著增加($P < 0.01$)。

3.2 GOD对肠道微生物的影响

据报道,在父母代蛋种鸡育成料中添加鲜尔康(葡萄糖氧化酶),对由大肠杆菌等引起的肠道腹泻有明显的预防作用,对大肠杆菌病有明显的预防及治疗作用^[6]。由于GOD催化葡萄糖酸的生成,提供了胃肠道的酸性环境。诸多研究表明,酸性条件可以抑制大肠杆菌等有害菌的生长繁殖,有利于乳酸菌的生长繁殖。添加磷酸型酸化剂A和乳酸型酸化剂B对体外培养的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门菌都有明显抑制作用;不同比例的富马酸和乳酸使肠道大肠杆菌数明显减少^[7]。本试验结果表明,饲喂霉变饲料后添加GOD能显著减少小鼠肠道内大肠杆菌数,大肠杆菌数与GOD的添加量没有明显的剂量依赖关系;添加0.3% GOD提高乳酸菌数量的效果较好,而且随着饲喂时间的延长,效果更好。

3.3 葡萄糖氧化酶对肝脏抗氧化能力的影响

长期饲喂黄曲霉毒素污染的日粮能诱发动植物慢性中毒。肝脏是黄曲霉毒素主要的靶器官^[8],氧化损伤是霉菌毒素危害动物健康的主要病理学基础。肝脏内有一套较完善的抗氧化防御系统,主要包括 SOD、GSH - Px、CAT 和 MDA。研究表明,含霉变玉米饲料能显著提高仔猪肝脏 MDA 含量,有增加 GSH - Px 活力的趋势^[9]。在饲料中添加 0.1 mg/kg 黄曲霉毒素抑制生长育肥猪肝脏抗氧化能力,导致 SOD、GSH - Px 活性显著降低^[10]。霉菌毒素污染的玉米添加到 3 周龄 ICR 小鼠日粮中,饲喂 4 周后,肝脏中 SOD、CAT 没有发生变化,GSH - Px、MDA 活性升高^[11]。本试验结果表明,饲喂霉变玉米面能显著降低小鼠肝脏 T - SOD、GSH - Px 和 CAT 活性,提高 MDA 含量,与上述报道不完全一致,可能是本试验饲喂霉变饲料时间较长所致。含霉变玉米面饲料中添加不同浓度的 GOD,能使小鼠肝脏 T - SOD、GSH - Px 和 CAT 活性升高,MDA 含量降低,从而改善肝脏的抗氧化能力,0.3% 和 0.5% GOD 添加量之间没有太大差异。随着饲喂时间的延长,各项检测指标没有明显差异。

3.4 葡萄糖氧化酶对肝脏结构的影响

霉变玉米能使仔猪肝脏小叶间结缔组织呈局部性增生病变,肝细胞轻度萎缩,并伴发轻度的颗粒变性,肝小叶交界处肝细胞发生严重的颗粒变性和空泡变性,甚至出现肝细胞质溶解、消失,细胞核固缩或消失。可能是因为黄曲霉毒素污染的日粮能改变肝脏凋亡基因的表达^[11]。本试验中,添加霉变玉米面使小鼠肝脏发生了明显的细胞变性、淤血等病理变化,与已有的报道一致;添加 GOD 后,能不同程度地缓解肝脏的病变程度,肝脏组织结构基本恢复正常。

4 结论

1) 在含 30% 霉变玉米面的日粮中添加 0.3% GOD 能够降低小鼠肠道内大肠杆菌数,提高乳酸杆菌数,使小鼠日增重增加,改善肝脏的组织结构并提

高抗氧化能力。

2) 葡萄糖氧化酶能够有效缓解霉变饲料对小鼠造成的慢性毒性影响。

参考文献:

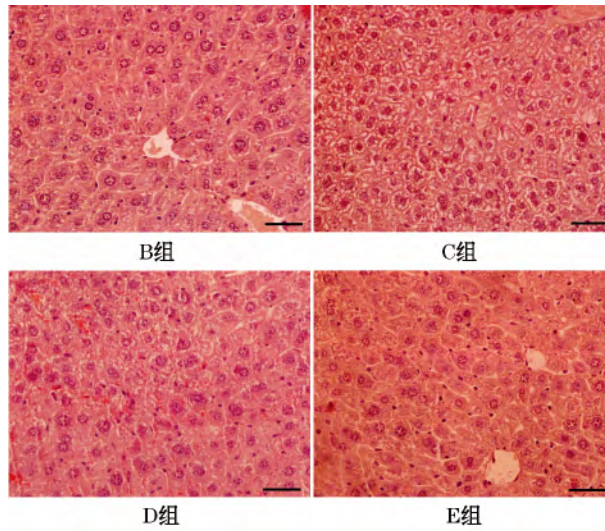
- [1] 宋海彬,赵国先,李娜,等.葡萄糖氧化酶及其在畜牧生产中的应用[J].饲料与畜牧,2008(7):37-39.
- [2] 赵国先,宋海彬,马可为,等.葡萄糖氧化酶制剂对肉鸡肠道 pH 及盲肠微生物的影响[J].河北农业大学学报,2009,32(4):83-87.
- [3] YUNUS AW, RAZZAZI - FAZELI E, BOHM J. Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues [J]. *Toxins*, 2011, 3(12): 566-590.
- [4] 张磊.霉玉米饲喂雏鸡试验[J].安徽农业科学,2007,35(11):3255-3257.
- [5] 王凯,杨丽梅,霍星华,等.霉玉米对小鼠体重和外周血淋巴细胞数量的影响[J].动物医学进展,2006,27(3):81-84.
- [6] 李焰.鲜尔康在肉鸡饲养中替代抗生素的效果试验[J].中国畜牧业通讯,2005(10):70-71.
- [7] FRANCO L D, FONDEVILA M, LOBERA M B, et al. Effect of combinations of organic acids in weaned pig diets on microbial species of digestive tract contents and their response on digestibility [J]. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2005, 89(3/4/5/6): 88-93.
- [8] TIEMANN U, DANICKE S. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review [J]. *Food Addit Contam*, 2007, 24(3): 306-314.
- [9] 张玲,陈代文,雷晓娅,等.自然霉变玉米及添加甘露寡糖对断奶仔猪肝脏结构与功能的影响[J].中国畜牧杂志,2012,48(11):36-41.
- [10] 史莹华,许梓荣,王成章.黄曲霉毒素对猪生长性能及免疫和抗氧化指标的影响[J].中国兽医学报,2007,27(5):733-736.
- [11] HOU Y H, ZHAO Y Y, XIONG B, et al. Mycotoxin-containing diet causes oxidative stress in the mouse [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):60374.
- [12] RUSTEMEYER S M, LAMBERSON W R, LEDOUX D R, et al. Effects of dietary aflatoxin on the hepatic expression of apoptosis genes in growing barrows in growing barrows [J]. *J Anim Sci*, 2011, 89(4): 916-925.

(010)

• 饲草与饲料 •

葡萄糖氧化酶制剂对食用霉变玉米面小鼠的影响

(作者崔亚利等,正文见第143~146页)



注: A 组肝脏组织结构基本正常; B 组肝细胞索紊乱, 肝细胞内出现空泡; C 组肝脏窦状隙中可见淤血; D 组肝脏组织结构基本正常, 有些肝细胞核缩小甚至消失(标尺示 10 μm)

图1 饲喂 60 d 后小鼠肝脏组织切片

• 饲草与饲料 •

齐齐哈尔市居住区绿地土壤理化性质分析

(作者于宁等,正文见第153~156页)



图1 取样地点分布