

# 产蛋白酶益生菌 Y2-2 和 Y1-13 对牙鲆幼鱼生长促进作用的研究

王福强<sup>1</sup> 李 坤<sup>2</sup> 邵占涛<sup>1</sup> 陈 营<sup>3</sup> 冯于明<sup>4</sup>

(1. 大连水产学院 农业部海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 大连大学 医学院, 辽宁 大连 116022; 3. 烟台大学 化学生物理工学院, 山东 烟台 264005; 4. 中国农业大学 动物科技学院, 北京 100083)

**摘要:** 分别用含  $1.6 \times 10^9 \sim 2.0 \times 10^9$  个/kg 的产蛋白酶益生菌 Y2-2, Y1-13, Y2-2 和 Y1-13 的混合菌剂及枯草芽孢杆菌饲料投喂 4 月龄的牙鲆幼鱼 30 d, 检测的结果 (1) 体质量增长实验中, Y2-2 组体质量增长最大, 为  $19.16 \text{ g} \pm 0.38 \text{ g}$  ( $P < 0.05$ ), 体质量增长率最高为 153.16%; Y1-13 组与对照组差异不显著; (2) 在盲囊和小肠后段, Y2-2 组蛋白酶活性分别为  $81.52 \text{ U} \pm 3.10 \text{ U}$  ( $P < 0.05$ ) 和  $63.20 \text{ U} \pm 5.99 \text{ U}$  ( $P < 0.05$ ), 酶活性增加率分别为 10.8% 和 21.1%; 在小肠前段和后段, Y2-2 组脂肪酶活性分别为  $255.06 \text{ U} \pm 18.84 \text{ U}$  ( $P < 0.05$ ) 和  $243.30 \text{ U} \pm 15.00 \text{ U}$  ( $P < 0.05$ ), 酶活性增加率为 27.8% 和 28.2%; 在小肠前段, 枯草芽孢杆菌组淀粉酶活性为  $23.49 \text{ U} \pm 0.96 \text{ U}$  ( $P < 0.05$ ), 酶活性增加率为 12.8%; (3) Y2-2 组的肠道产蛋白酶菌数最高为  $6.87 \pm 0.37$  ( $P < 0.05$ ), 增加 52.5 倍; Y1-13 组的乳酸菌数最高为  $3.74 \pm 0.36$  ( $P < 0.05$ ), 增加 7.6 倍, 其次为混合菌剂组; Y1-13 组有抑制弧菌作用, 弧菌量降为  $3.91 \pm 0.37$  ( $P < 0.05$ ), 抑制率为 89%; 实验组的肠道好养性异养菌数均与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

**关键词:** 产蛋白酶菌; 牙鲆幼鱼; 促进作用

中图分类号: Q556; S963; S965.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)01-0029-05

牙鲆 [*Parlichthys olivaceus* (T. & S.)] 是鲽形目鱼类, 属暖温性底层鱼类。由于其生长快、肉质好、繁殖力强, 是中国重要的海水经济鱼种。然而, 在牙鲆幼鱼生长期间, 由于鱼苗消化道发育尚不完全、酶分泌量不足, 是造成死亡率较高的重要原因之一。为降低死亡率, 养殖业采取种种措施, 其中用添加产酶益生菌、拮抗致病菌益生菌, 已起到防病、促生长的作用。国内外多有报道, 但在淡水养殖中较多, 对海水养殖的研究较少报道。

作者以牙鲆幼鱼为研究对象, 用分离的产蛋白酶益生菌 Y2-2 和 Y1-13 和常用的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 分别添加到饲料中, 投喂于牙鲆幼鱼, 研究牙鲆幼鱼的生长、消化道酶活力和肠道菌群的变化, 从而为产蛋白酶益生菌 Y2-2 和 Y1-13 在牙鲆养殖中的直接应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用鱼及分组

从大连太平洋养殖公司购得个体健康、体质量约 12 g、4 月龄的牙鲆幼鱼, 在大连水产学院海水养殖室暂养 1 周后随机分为 5 组: 对照组、Y2-2 组、Y1-13 组、Y2-2 + Y1-13 的混合菌剂组和枯草芽孢杆菌组。每组 3 个平行重复, 每个重复 20 尾鱼, 饲养水箱为  $0.12 \text{ m}^3$ , 装有循环控温系统, 饲养水温  $17 \sim 20$  °C, 为期 30 d。

收稿日期: 2004-07-30; 修回日期: 2004-09-28

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目 (200102067)

作者简介: 王福强 (1968-), 男, 山东烟台人, 大连水产学院讲师, 硕士, 主要从事水产营养学研究, 电话: 0411-4201348, E-mail: wangfuqiang2@163.com

## 1.2 试验菌剂制备

所用产蛋白酶益生菌 Y2-2 和 Y1-13 为本实验室从健康牙鲆肠道中分离的产蛋白酶的芽孢杆菌；枯草芽孢杆菌来自大连水产学院生理实验室。

活化扩种用海水琼脂液体培养基<sup>[1]</sup>：细菌在 30 ℃ 振荡培养 24 h 后，于 4 ℃ 以 4 000 r/min 离心 15 min。细菌团用 0.85% 的九盐溶液<sup>[1]</sup>冲洗，于 4 ℃ 中保存备用。

## 1.3 试验饲料

基础饲料配方：白鱼粉 63.8%、豆粕 12%、小麦面粉 8.5%、酵母 2.5%、虾皮 5%、精制鱼油 6%、褐藻胶 1%、牙鲆专用预混料 1.2%、粗蛋白 51.8%、粗脂肪 8.5%、钙 2.6%、磷 2.0%、赖氨酸 3.6%、蛋氨酸 1.1%。试验组分别添加了菌数为  $1.6 \times 10^9 \sim 2.0 \times 10^9$  个/kg 的 Y2-2, Y1-13, Y1-13+Y2-2 (1:1) 和枯草芽孢杆菌，日投喂量为牙鲆体质量的 5%~10%，分 2 次投喂。

各种原料分别粉碎，过 60 目筛，充分混合，加入维生素和矿物质后采用逐级混合，加菌液和适量水，用小型制粒机制成粒径 2 mm 的湿颗粒饲料 40 ℃ 烘至半干，-20 ℃ 冷冻保存。

## 1.4 肠道菌群检测

在试验第 0, 15 和 30 天时，分别随机从 5 组中各取 3 尾鱼。将鱼体表面消毒，牙鲆通过去掉头部的的方法宰杀，无菌的方法打开肠道。将消化道与其它组织及器官分离并剪下。取小肠，用无菌生理盐水冲洗 3 次，分别置于匀浆器中称质量，分别加入 10 倍于该质量的无菌生理盐水并匀浆。用滴种法接种于酪蛋白培养基<sup>[2]</sup>、海水琼脂培养基、LBS 培养基<sup>[1]</sup>和 TCBS 琼脂培养基<sup>[2]</sup>，接种后将平板于 28 ℃ 培养 24 h (乳酸菌培养 3 d)，记录 4 种培养基上菌落的数量，用  $N$  表示，单位为 cfu/g，并用  $\lg N$  处理。

## 1.5 消化道酶活性的测定

### 1.5.1 粗酶液制备

第 30 天每组各取 3 尾鱼测定酶活性。将活的牙鲆鱼置于预先准备好的冰盘上解剖，从鱼的肛门处剪开，使其内脏暴露，拉出整个消化道，截取胃至肛门前 2~3 mm 之间的消化道，分别剪取胃、幽门盲囊，将肠的非膨胀部分一分为二，分为小肠前段、小肠后段。具体作法如下：每克组织加入灭菌的 10 mL pH 7.5 的磷酸缓冲液，在冰浴中匀浆。匀浆液于 4 ℃ 静置 1 h，取上清液部分，于 4 ℃，以 4 000 r/min 离心 30 min，取上清液测定酶活性。

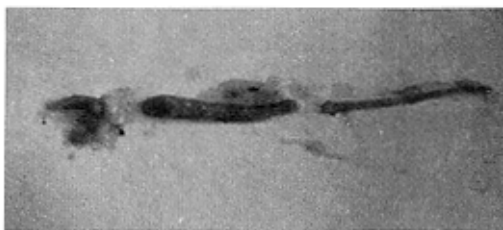


图 1 牙鲆幼鱼的幽门盲囊、小肠前段、小肠后段

Fig. 1 The diverticulum pyloricum, foregut and hindgut of flounder juveniles

### 1.5.2 蛋白酶活性的测定

参照中山大学 Folin-酚法<sup>[3]</sup>进行，用上海分析仪器有限公司生产的 7230 型分光光度计测定。蛋白酶活力单位定义为：在 pH 值 7.5 (测胃蛋白酶 pH 2.5)，底物酪蛋白浓度为 5 g/L，37 ℃ 条件下，保温 15 min，以每克组织蛋白酶每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸为一个活力单位，用 U 表示。

### 1.5.3 脂肪酶活性的测定

参照中山大学<sup>[3]</sup>和倪寿文等<sup>[4]</sup>方法。用聚乙烯醇橄榄油乳化液水解法。脂肪酶活性定义为在 pH 7.5 时，37 ℃ 保温 60 min，以每克组织蛋白酶每分钟催化聚乙烯醇橄榄油产生 1 μmol 脂肪酸为 1 个脂肪酶活性单位 U。

### 1.5.4 淀粉酶的测定

参照上海市医学化检所碘-淀粉显色法<sup>[5]</sup>。淀粉酶活性定义为在 pH 7.0 时，37 ℃ 条件下，保温 15 min 内，以每克组织蛋白酶每分钟完全水解 10 mg 可溶性淀粉为 1 个淀粉酶活性单位 U。

## 1.6 数据处理

采用配对  $t$  检验，利用 SPSS10.5 处理，表示方法为均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )。

## 2 结果和讨论

### 2.1 对牙鲆体质量增长的影响

在体质量增长实验中，Y2-2 组体质量增长最大为  $19.16 \text{ g} \pm 0.38 \text{ g}$  ( $P < 0.05$ )，体质量增长率为 153.16%；混合菌剂组体质量增加为  $18.47 \text{ g} \pm 0.70 \text{ g}$  ( $P < 0.05$ )，体质量增长率为 148.28%；枯草芽孢杆菌组体质量增加为  $19.08 \text{ g} \pm 0.84 \text{ g}$ ，体质量增长率为 151.98%；Y1-13 组与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。在成活率上，实验组与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ )，但略有提高的趋势，见表 1。

表1 产蛋白酶益生菌对牙鲆幼鱼体质量增加的影响 ( $n = 60, \bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Effect of protease-producing bacteria on body weight of flounder juveniles ( $n = 60, \bar{x} \pm s$ )

组别	始质量		末质量		体质量增加量 (g)	体质量增长率 (%)	成活率 (%)
	(g)	(g)	(g)	(g)			
对照组	12.40 ± 0.57	29.24 ± 0.99	16.84 ± 0.44	135.81	85.00 ± 5.00		
Y2-2	12.51 ± 0.68	31.67 ± 1.03	19.16 ± 0.38*	153.16	86.67 ± 2.89		
Y1-13	12.64 ± 0.37	30.28 ± 0.86	17.64 ± 0.52	139.56	88.33 ± 5.77		
Y2-2 + Y1-13	12.46 ± 0.49	30.93 ± 1.10	18.47 ± 0.70*	148.24	90.00 ± 10.00		
枯草芽孢杆菌	12.62 ± 0.70	31.80 ± 1.56	19.08 ± 0.84*	151.98	88.33 ± 7.64		

注: \*  $P < 0.05$ 。

## 2.2 对牙鲆消化道酶活性的影响

### 2.2.1 对牙鲆消化道蛋白酶活性的影响

枯草芽孢杆菌组在盲囊、小肠前段和小肠后段活性均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 增加率分别为 12.8%, 17% 和 22.1%; Y2-2 组在盲囊和小肠后段活性均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 增加率分别为

10.8%,

21.1%; Y1-13 组和混合菌剂组在消化道活性与对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ )。实验发现, 牙鲆对蛋白质的消化主要发生在消化道前部, 其活性呈现从消化道前向后依次递减的现象, 与倪寿文等<sup>[4]</sup>的观点一致。还发现, 在消化道后部实验组蛋白酶活性增加率

表2 产蛋白酶益生菌对牙鲆幼鱼消化道蛋白酶活性的影响 ( $n = 60, \bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Effect of protease-producing bacteria on protease activity in digest tract of flounder juveniles ( $n = 60, \bar{x} \pm s$ )

组别	酶活性(U)				酶活性增长率(%)			
	胃	盲囊	小肠前段	小肠后段	胃	盲囊	小肠前段	小肠后段
对照组	78.36 ± 4.77	73.59 ± 3.65	60.08 ± 4.56	52.17 ± 5.64	-	-	-	-
Y2-2	82.27 ± 5.07	81.52 ± 3.10*	67.95 ± 5.47	63.20 ± 5.99*	-	10.8	-	21.1
Y1-13	81.37 ± 5.38	74.11 ± 2.84	65.79 ± 5.32	52.83 ± 3.69	-	-	-	-
Y2-2 + Y1-13	81.76 ± 4.46	74.95 ± 3.03	67.01 ± 5.56	60.11 ± 2.53	-	-	-	-
枯草芽孢杆菌	83.74 ± 2.86	82.99 ± 4.13*	70.31 ± 6.00*	63.72 ± 3.67*	-	12.8	17.0	22.1

注: \*  $P < 0.05$ 。

显著提高 ( $P < 0.05$ ), 这与试验组菌为产碱性蛋白酶菌一致<sup>[6]</sup>; 还发现, 在胃中实验组蛋白酶活性与对照组均无显著差别, 这与试验组菌株在胃酸性环境中活性较弱有关(见表2)。

### 2.2.2 对牙鲆消化道脂肪酶活性的影响

在小肠前段和后段, 只有 Y2-2 组脂肪酶活性均显著高于对照组, 酶活性分别为 255.06 U ± 18.84 U

( $P < 0.05$ ) 和 243.30 U ± 15.00 U ( $P < 0.05$ ), 增加率为 27.8% 和 28.2%, 其他各组间差异不显著。在胃和盲囊各组间差异不显著。实验发现, 肠道脂肪酶活性较胃中的高, 与王宏田等的结论一致<sup>[7]</sup>。另外, Y2-2 可能有较高的产脂肪酶活性, 有待于进一步验证。

### 2.2.3 对牙鲆消化道淀粉酶活性的影响

仅在小肠前段, 枯草芽孢杆菌消化道淀粉酶活性

表3 产蛋白酶益生菌对牙鲆幼鱼消化道脂肪酶活性的影响 ( $n = 60, \bar{x} \pm s$ )

Tab.3 Effect of protease-producing bacteria on lipase activity in digest tract of flounder juveniles ( $n = 60, \bar{x} \pm s$ )

组别	酶活性(U)				酶活性增长率(%)			
	胃	盲囊	小肠前段	小肠后段	胃	盲囊	小肠前段	小肠后段
对照组	136.95 ± 28.89	180 ± 20.6	199.62 ± 21.29	189.76 ± 14.68	-	-	-	-
Y2-2	161.42 ± 33.75	196.95 ± 11.91	255.06 ± 18.84*	243.30 ± 15.00*	-	-	27.8	28.2
Y1-13	140.71 ± 24.16	191.23 ± 14.57	236.82 ± 43.33	227.38 ± 33.46	-	-	-	-
Y2-2 + Y1-13	162.42 ± 25.69	191.28 ± 18.62	227.67 ± 32.31	221.07 ± 16.81	-	-	-	-
枯草芽孢杆菌	163.59 ± 25.8	198.07 ± 17.2	238.92 ± 28.7	230.69 ± 29.35	-	-	-	-

注: \*  $P < 0.05$ 。

比对照组显著增加 ( $P < 0.05$ ), 其活性为  $23.49 \pm 0.96 U$  ( $P < 0.05$ ), 增加率为 12.8%, 在消化道其他部位, 其余各组与对照组差异均不显著 ( $P > 0.05$ )(表 4)。

表 4 产蛋白酶益生菌对牙鲆幼鱼消化道淀粉酶活性的影响 ( $n = 60, \bar{x} \pm s$ )

Tab.4 Effect of protease-producing bacteria on amylase activity in digest tract of flounder juveniles ( $n = 60, \bar{x} \pm s$ )

组别	酶活性 (U)				酶活性增长率 (%)			
	胃	盲囊	小肠前段	小肠后段	胃	盲囊	小肠前段	小肠后段
对照组	$18.74 \pm 1.56$	$12.50 \pm 1.57$	$20.82 \pm 1.38$	$8.64 \pm 1.56$	-	-	-	-
Y2-2	$18.71 \pm 1.77$	$13.27 \pm 1.58$	$22.52 \pm 1.45$	$8.97 \pm 0.96$	-	-	12.8	-
Y1-13	$18.38 \pm 1.95$	$12.92 \pm 0.90$	$21.58 \pm 0.97$	$9.00 \pm 1.12$	-	-	-	-
Y2-2+Y1-13	$18.55 \pm 0.62$	$12.61 \pm 1.45$	$1.68 \pm 2.17$	$8.80 \pm 1.82$	-	-	-	-
枯草芽孢杆菌	$19.33 \pm 1.04$	$3.30 \pm 0.97$	$23.49 \pm 0.96^*$	$9.76 \pm 1.07$	-	-	-	-

注: \*  $P < 0.05$

### 2.3 对牙鲆幼鱼肠道菌群的影响

投喂益生菌后第 15 天、第 30 天, 实验组牙鲆幼鱼肠道产蛋白酶菌数均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

在第 30 天, Y2-2 组产蛋白酶菌数达到最高, 为  $6.87 \pm 0.37$  ( $P < 0.05$ ), 增加 52.5 倍, 各实验组之间没有显著的差异 ( $P > 0.05$ ) (图 2a)。

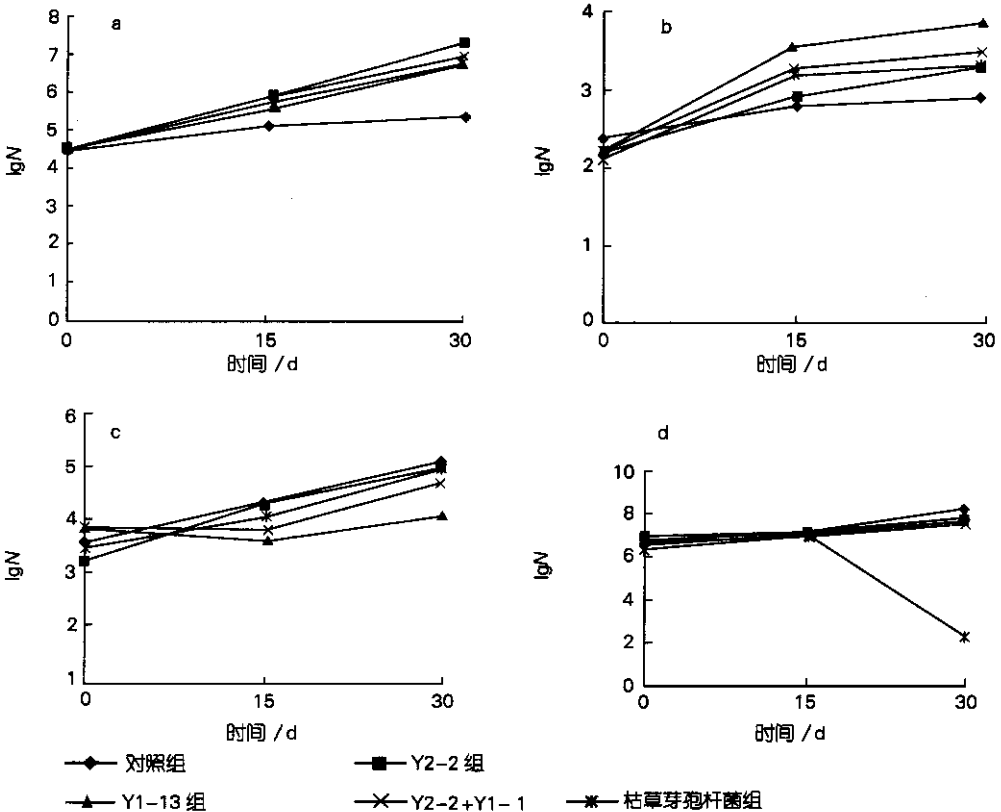


图 2 牙鲆幼鱼肠道菌群菌数变化

Fig. 2 Bacteria counts in digest tract of gut of flounder juveniles during 30 days of feeding with probiotics  
 a 益生菌对肠道产蛋白酶菌数的影响; b 益生菌对肠道中乳酸菌菌数的影响; c 益生菌对肠道弧菌菌数的影响  
 a Protease-producing bacteria counts in digest tract of gut during 30 days of feeding with probiotics; b Lactobacillus counts in digest tract of gut during 30 days of feeding with probiotics; c *Vibrio* spp. counts in digest tract of gut during 30 days of feeding with probiotics

投喂益生菌后第 15 天、第 30 天, Y1-13 组和混合菌剂组的肠道乳酸菌数量均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。在第 30 天, Y1-13 组乳酸菌数达到最高, 为  $3.74 \pm 0.36 (P < 0.05)$  增加 7.6 倍 (见图 2b)。

投喂益生菌后第 30 天, Y1-13 组弧菌数降低到  $3.91 \pm 0.37 (P < 0.05)$ , 抑制率为 89%。其他组与对照组没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (见图 2c)。实验表明, Y1-13 能有效抑制肠道弧菌的数量, 这也与 Y1-13 在体外对弧菌的抑制效果一致<sup>[8]</sup>。

投喂益生菌后, 各组牙鲆幼鱼肠道的好养性异养菌数均与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 但在不同时期, 各组牙鲆幼鱼肠道的异养菌数具有相当程度的增加 (见图 2d)。

结果说明, 本实验室分离的产蛋白酶菌株 Y2-2、Y1-13 单独使用和联合使用都能促进牙鲆幼鱼消化道酶活性增加、体质量增加、肠道益生菌生长和拮抗弧菌生长的作用, 使鱼苗提前脱离幼鱼期, 提高鱼苗的成活率, 具有较高的应用价值。

参考文献:

[1] Olsson C, Westerdahl A, Conway P L, *et al.* Intestinal

- colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and dab (*Limanda limanda*) - associated bacteria with inhibition effects against *Vibrio anguillarum* [J]. *Appl Environ Micro*, 1992, **58**(3): 551-556.
- [2] 王秀茹. 预防医学微生物学与检验技术 (第 1 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 1136-1140.
- [3] 中山大学生物系生化微生物学教研室. 生化技术导论 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1979. 53-54.
- [4] 倪寿文, 桂远明, 刘焕亮. 草鲤鲢鳙和尼罗罗非鱼肝胆脏肠道蛋白酶活性的比较研究 [J]. *动物学报*, 1992, **39**(2): 160-168.
- [5] 上海市医学化检所. 临床生化检验 (上册) [M]. 上海: 上海科技出版社, 1979. 366-368.
- [6] 陈营, 王福强, 李绪全. 三株芽孢杆菌生长与蛋白酶活性的研究 [J]. *淡水渔业*, 2004, **34**(3): 19-21.
- [7] 王宏田, 张培军. 牙鲆体内消化酶活性的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2004, **33**(5): 472-476.
- [8] 陈营, 王福强, 王凡. 牙鲆肠道内弧菌拮抗菌的分离与筛选 [J]. *海洋科学*, 2003, **27**(3): 43-46.

## Growth promotion by proteinase-produced-bacteria from gastrointestinal tract of flounder to flounder juveniles

WANG Fu-qiang<sup>1</sup>, LI Kun<sup>2</sup>, SHAO Zhan-tao<sup>1</sup>, CHEN Ying<sup>3</sup>, GUO Yu-ming<sup>4</sup>

(1. Dalian Fisheries College, Liaoning Province, Dalian 116023, China; 2. Medical College, Dalian University, Dalian 116023, China; 3. College of Chemistry & Biology, Yantai University, Shandong Province, Yantai 264005, China; 4. College of Animal Science, China Agricultura University, Beijing 100083, China)

Received: Jul., 30, 2004

Key words: bacteria produced proteinase; flounder juveniles; growth promotion

**Abstract:** To increase the production of founder juveniles, we raised flounder juveniles of four-months-old for 30 days with basal feed mixed by proteinase-produced bacteria Y2-2, Y1-13, Y2-2+Y1-1 and *Bacillus subtilis*. The paper reported growth weight, intestinal bacteria and digestive enzyme activity in digestive tract on flounder juveniles. The results showed that (1) the Y2-2 group had the most weight increase, which was  $19.16 \text{ g} \pm 0.38 \text{ g} (P < 0.05)$  by 153.16% increasing. (2) the digestive protease activity of Y2-2 group were  $81.52 \text{ U} \pm 3.10 \text{ U} (P < 0.05)$  and  $63.20 \text{ U} \pm 5.99 \text{ U} (P < 0.05)$  at diverticulum pyloricum and hindgut, and its increase rate was 10.8% and 21.1% respectively. The lipase activity of the Y2-2 group was  $255.06 \text{ U} \pm 18.84 \text{ U} (P < 0.05)$  and  $243.30 \text{ U} \pm 15.00 \text{ U} (P < 0.05)$  at foregut and hindgut, its increase rate were 27.8% and 28.2% respectively. The amylase activity of *Bacillus subtilis* group was  $23.49 \text{ U} \pm 0.96 \text{ U} (P < 0.05)$  at foregut, and its increase rate was 12.8%. (3) the number of proteinase-produced bacteria on digestive tract of Y2-2 group was the most, which was  $6.87 \pm 0.37 (P < 0.05)$ , and increased 52.5 times; the number of *Lactobacillus* on digestive tract was the most, which was  $3.74 \pm 0.36 (P < 0.05)$ , and increased 7.6 times; the number of *Vibrio* spp. on digestive tract of Y1-13 group dropped to  $3.91 \pm 0.37 (P < 0.05)$ , the inhibitory rate was 89%; total bacteria counts slightly increased. (本文编辑: 刘珊珊)