

饲料源活性肽混合物的提取及其对绵羊瘤胃微生物生长的影响

王洪荣¹ 孙桂芬² 卢德勋³ 赵秀英³ 张海鹰³

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 广东温氏集团奶业公司, 肇庆 526000;

3. 内蒙古自治区畜牧科学院, 呼和浩特 010030)

摘要: 本文探讨了用鱼粉和豆粕制备活性肽的适宜条件, 并以胃蛋白酶和胰蛋白酶分别水解鱼粉和豆粕制得的4种活性肽为氮源、可溶性碳水化合物为能源, 采用体外法研究了不同来源的肽氮对瘤胃细菌和原虫生长的影响以及对瘤胃中蛋白酶和纤维酶活性的影响。结果表明, 胃蛋白酶和胰蛋白酶分别水解鱼粉和豆粕制备活性肽的最适条件为: 温度 37℃, 时间 20 h, pH 分别为 2 和 7。来源于动物性饲料的混合肽对促进瘤胃微生物生长优于来源于植物性饲料的混合肽, 分子量小于 3 000 u 的鱼粉肽和豆粕肽对瘤胃细菌和原虫的生长有促进作用, 能提高瘤胃中蛋白酶活性, 而对纤维酶活性无作用。

关键词: 蛋白质饲料; 肽混合物; 瘤胃微生物; 蛋白酶; 纤维素酶

近年来, 人们研究发现由蛋白酶解所产生的小肽片段除了具有营养作用以外, 还具有一些特殊的生理作用。最早人们是从研究乳酪蛋白中分离出的阿片活性肽开始的。科学家进行了大量免疫活性肽方面的研究, 具有不同生物学功能的免疫活性肽相继被报道, 如抗血栓转化酶抑制肽、酪蛋白磷酸肽、抗菌肽等^[1-3]。活性肽广泛存在于生物体的各个组织器官、动物性饲料、植物性饲料和牛乳中。活性肽的生产方法主要有: 分离提取法、蛋白质水解法、化学合成法、基因重组法和酶解法。目前, 酶解法由于具有许多优点而被广泛应用于实际生产。国内外关于从饲料中提取活性肽工艺的报道较少。为此, 本试验以动物性饲料鱼粉和植物性饲料豆粕为原料, 分别用胰蛋白酶和胃蛋白酶水解提取具有免疫作用的活性肽, 并探讨分子量为 3 000 u 以下的豆粕肽和鱼粉肽对瘤胃微生物生长规律的影响, 为今后开发和利用饲料源活性肽提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 提取步骤

原料: 豆粕(山东)、鱼粉(秘鲁)

试剂: 胃蛋白酶, 胰蛋白酶(北京华美生物公

司, 活性 1: 2 500)

仪器与设备: 水浴锅; 732 强酸型阳离子交换柱; 超滤器(北京旭日仪器厂); 核-蛋检测仪(南京大学制造); 记录仪; 紫外分光光度计(UV190)

(1) 测蛋白含量: 首先测试所用豆粕和鱼粉的氨基酸(AA)和粗蛋白质(CP)含量。分别称取 1 000 g 鱼粉和 1 000 g 豆粕各 2 份, 分别放入 2 个桶中, 每桶加去离子水 7 L; 浸泡, 不断搅拌, 过夜。然后取出 10 mL 溶液, 测蛋白浓度。

(2) 加消化酶: 用 2 mol/L HCl 调整鱼粉和豆粕的 pH 达到 2 时, 分别加入 10 g 胃蛋白酶(pepsin) 和 10 g 胰蛋白酶(trypsin), 充分搅拌。

(3) 酶解: 将加入消化酶的鱼粉和豆粕溶液放入 37℃ 的水浴锅中, 消化 20 h, 其间不断搅拌, 使其充分酶解。

(4) 去残渣: 取出消化液, 20 000 r/min 离心 20 min, 弃去残渣, 保留上清液。

超滤: 将上清液过中空纤维超滤器, 截留分子量为 3 000 u 以下的小分子, 接收滤液。

过阳离子交换柱: 将滤液通过阳离子交换柱(732 柱), 然后, 用去离子水充分洗脱柱子, 再用 2 mol/L NH₃ · H₂O 洗脱。

收稿日期: 2004-08-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39860059)

作者简介: 王洪荣(1962-) 男, 汉, 内蒙古丰镇市, 教授, 博士生导师, 主要从事反刍动物氨基酸和脂肪酸营养研究。E-mail: hrwang@yzu.edu.cn

(5)冻干:将洗脱得到的肽真空条件下浓缩、冻干。制得胃蛋白酶处理鱼粉肽(P-鱼肽)、胰蛋白酶处理鱼粉肽(T-鱼肽)、胃蛋白酶处理豆粕肽(P-豆粕)和胰蛋白酶处理豆粕肽(T-豆粕)4种肽作为试验材料。

1.2 测定指标和方法

1.2.1 豆粕、鱼粉 CP 的测定:用常规的凯氏定氮法测定。

1.2.2 pH 的测定:用 25 型酸度计(上海第二分析仪器厂,甘汞电极)测定。

1.2.3 肽的测定:样品肽氮含量 = 样品酸解后总氨基酸氮含量 - 样品酸解前总游离氨基酸氮含量。

(1)总氨基酸(TAA)的测定:将经预处理的清亮肽液直接置于 6 mol/L HCl 中水解 22 h,然后减压蒸干,用 0.02 mol/L HCl 重新溶解定容后用日立 835 型氨基酸自动分析仪测定总氨基酸。

(2)酶解前后测蛋白的公式:蛋白浓度比 = $A_{205} / (27 + 12(A_{280} / A_{205}))$

(3)水解度(DH)的测定公式: $DH = AN / TN$

AN:水解物中的氨基氮;TN:整个底物的总氮量

1.2.4 蛋白酶解率(%) = 酶解前后蛋白浓度差 / 酶解前蛋白浓度 × 100

1.2.5 超滤柱的处理:首先用 4% HCl 洗涤,再用蒸馏水洗涤,最后用 4% NaOH 洗,如此反复三次即可。

1.2.6 阳离子交换剂的预处理:用之前,用 10% NaCl 溶液浸泡过夜,然后装柱即可。

1.2.7 阳离子交换柱的处理:首先用 4% HCl 洗涤,再用蒸馏水洗涤,最后用 4% NaOH 洗,如此反复 3 次即可。

1.3 试验动物及日粮

选取 5 只体况良好,体重(40 ± 2) kg 的内蒙古半细毛羯羊,安装永久性瘤胃瘘管。试验羊日粮配制参照中国美利奴羊饲养标准,即能量维持需要(M)为 450 kJ/kgW^{0.75};蛋白质维持需要为 350 mg N/kg W^{0.75}。每日代谢能供给量为 1.2 M,蛋白质为 1.85 M。基础日粮组成和营养水平见表 1。精粗比为 4:6。试验羊单笼饲养,每日于 7:00 和 16:00 饲喂。

1.4 体外试验设计:

采用单因子设计。用 P-鱼肽、T-鱼肽、P-豆粕、

表 1 试验羊基础日粮的组成与营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of basal diets (air-dry basis, %)

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	26.4
豆粕 Soybean meal	9.5
石粉 Limestone	0.4
骨粉 Bone meal	0.4
食盐 NaCl	0.5
预混料 Premix	0.3
青干草 Hay	62.5
合计 Total	100.0
营养水平 Nutrient levels	
干物质 DM	89.8
代谢能 ME(MJ/Kg)	8.1
粗蛋白质 CP	10.8
瘤胃降解蛋白 RDP/CP	66.4
钙 Ca	0.8
磷 P	0.4

预混料含 The premix provided following for a kg of diet: FeSO₄ · 7H₂O 31 200 mg; CuSO₄ · 5H₂O 1 500 mg; ZnSO₄ · 7H₂O 17 500 mg; MnSO₄ · 5H₂O 7 800 mg; 碘钙粉 含 1% KI (powder of I and Ca, containing of 1% KI) 17 000 mg; Na₂SeO₃ 4.3 mg; CoCl₂ · 6H₂O 1 030 mg; VA 54 000 000 IU; VD₃ 10 800 000 IU; VE 1 800 IU; VK₃ 35 g; VB₁ 2 g; VB₂ 15 g; VB₁₂ 0.03 g; VB₅ 35 g; 泛酸钙 Calcium pantothenate 25 g; 叶酸 Folic acid 0.5 g; 抗氧化剂 Antioxidant 0.2 g.

和 T-豆粕 4 种肽作为试验材料。对每种肽设计 3 个肽氮添加水平,分别为 0.144、14 和 16 g/L 培养液;各肽氮添加处理组(试验组)均设 1 组仅添加游离氨基酸作为对照组。对照组添加的游离氨基酸在组成和数量上与肽氮添加处理组游离氨基酸(即肽所含游离氨基酸,不包括肽结合氨基酸)完全相同,各肽或游离氨基酸氮添加处理均按淀粉:氨基氮为 4.5:1 的比例添加淀粉作为能源。采样时间点为培养后 0、2、4、6、8、10 和 12 h。在不同来源的肽对培养液中纤维分解酶活性的影响试验中,在 14 g/L 的肽氮添加水平下设肽组、游离氨基酸组(FAA 组)和对照组(NH₄Cl)。

1.4.1 人工瘤胃设计

人工瘤胃系自行设计。温度控制和蠕动模拟借助恒温水浴摇床,其水浴温度和振荡速率可调;玻璃培养瓶容积约 150 mL,其上安装有带塑料管的橡皮塞用于密封培养瓶;塑料管上带有可打开和关闭的塑料三通以保证厌氧发酵环境;塑料三通与玻璃注射器(可计量容积为 30 mL)相连。注射器在每次使用之前须洗净、烘干,然后用少量液体石蜡涂在

活塞筒的四周,以防漏气,而且可尽量减少气体产生过程中活塞向上移动的阻力。

1.4.2 缓冲液的配备

缓冲试剂和常量元素溶液(A液):称取 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 382.51 mg、 KH_2PO_4 292 mg、 $(NH_4)_2SO_4$ 480 mg、NaCl 200 mg、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 100 mg 和 Na_2CO_3 4 000 mg。将上述试剂混和后加入蒸馏水定容至 1 000 mL。持续通入 CO_2 直到溶液清亮为止,该溶液在使用前 1 天配制待用。

Pfennigs 微量元素溶液(B液):准确称取 Na_2EDTA 500 mg、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 200 mg、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 200 mg、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg、 H_3BO_3 30 mg、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 20 mg、 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 mg、 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 2 mg 和 $NaMoO_4$ 3 mg。将上述试剂混和后加蒸馏水定容至 1 000 mL。盖严瓶口,置于冰箱备用。

还原剂溶液(C液)称取 25 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ 置于 100 mL 容量瓶中,加 80 mL 蒸馏水溶解后定容至 100 mL,盖严瓶口,置于冰箱备用。

缓冲液配制:准确量取 988 mL A 液、10 mL B 液,并于培养前 1 h 加入 2 mL C 液,充分混合,然后将其分装于培养瓶内(每个瓶加 40 mL),持续通入 CO_2 气体直至澄清,盖上安装有塑料三通的橡皮塞,置于恒温水浴中预热 39℃ 待用。

瘤胃液的采集和培养液的配制:在晨饲(6:00) 2 h 后,从 5 只绵羊瘤胃内上下左右不同位点采集足量瘤胃液,灌入经预热达 39℃ 并通有 CO_2 的保温瓶中,灌满后立即盖严瓶口,迅速带回实验室,经 4 层纱布过滤后持续充入 CO_2 气体 5 min,按瘤胃液:缓冲液为 1:2 的比例充分混和后,配制成培养液,并快速分装至每个培养瓶。将培养瓶和注射器连接好,打开振荡开关,开始培养。

菌体蛋白的测定 凯氏定氮法。

原虫的计数:采瘤胃液 15 mL,用双层纱布滤去大块残渣,再取滤液 1 mL,加入 MFS 液 4 mL (MFS 35% 的福尔玛林 100 mL,NaCl 8.0 g,甲基绿 0.6 g 和蒸馏水 900 mL)混匀进行染色半小时,用吸管(管口大于 1.0 mL)将混匀的样品稀释液连续不断地充满血球计数室,盖上盖玻片,在光学显微镜下镜检。每个样品取 10 个视眼。每个视眼取 10 个方格,最后取平均数。

计算方法:原虫数/mL = $X/S \times D \times 2 \times 1\,000$

X:所观察的所有方格中原虫的总数;S:计数的方格数;D:稀释倍数

瘤胃蛋白酶活性的测定:取 2 mL 磷酸缓冲液(pH 7.6,含 1% 的酪蛋白),37℃ 预温 5 min,加入 0.1 mL 离心的瘤胃上清液(空白管加入 0.1 mL 的生理盐水),37℃ 水浴平衡 10 min,立即加入 2 mL 10% 的三氯乙酸终止反应,离心 20 min (4 500 r/min),取上清液于 275 nm 下测定酪氨酸的吸光度 A_x (空白记为 A_0)。

酶液中羧基甲基纤维素酶(carboxymethyl cellulase,CMCase)活性的测定:参考 Groleau 等^[4]推荐的程序。

CMCase 活性的计算:CMCase 活性表示为,以 D-葡萄糖(G)为标准,每 g 干物质每 min 释放葡萄糖的 μmol 数,单位为 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 。

2 结果

2.1 豆粕、鱼粉的 AA、CP 的测定

试验中所用鱼粉的 CP 含量为 61%,总氨基酸(TAA)含量为 41.864 mg/100 mgDM;豆粕的 CP 含量为 46.52%,总氨基酸(TAA)含量为 40.330 mg/100 mgDM。

2.2 酶解前后鱼粉、豆粕的酶解率

测定结果见表 2。由表 2 可知,酶解后,蛋白酶解率分别为 T-豆肽 56.95%;P-鱼肽 57%;P-豆肽:60%;T-鱼肽 57%。蛋白酶解率越高,则原有蛋白质分子的剩余量越少,水解越彻底。郭本恒^[5]报道,原有蛋白质分子的剩余量是衡量水解产品是否达到产品要求的较重要的指标。本试验中,用 UV-190 紫外分光光度计测蛋白质浓度,考虑到机器性能的限制,认为所测的酶解率已很高。

由表 3 结果可知,酶解后水解度(AN/TN)分别为:P-豆肽:70.68%;P-鱼肽:53.77%;T-豆肽:41.59%;T-鱼肽 55.08%。郭本恒^[5]和郭清泉^[6]认为,AN/TN 大于 50%,属于高水解度。AN/TN 越高,水解越充分。本试验中,只有 T-豆肽组(41.59%)小于 50%,其他三组均大于 50%。

由表 4 可知,最后得到的肽混合物的氨基酸组成 P-豆肽的总氨基酸(TAA)、游离氨基酸(FAA)和肽结合氨基酸(PAA)含量分别为:74.43、18.09 和 56.34 mg;P-鱼肽的 TAA、FAA 和 PAA 的含量为:56.09、28.90 和 27.19 mg;T-豆肽的 TAA、FAA 和 PAA 的含量为:58.14、23.84 和 34.30 mg;T-鱼肽的 TAA、FAA 和 PAA 的含量为:44.87、22.39 和 22.48 mg。四种肽混合物中 TAA 占 50% 左右,对豆粕来说,其他成分可

能是未去掉的可溶性物质和部分酶类,对鱼粉而言,混合物中 TAA 含量最高(74.43 mg),肽结合氨基酸可能还包括非氨基酸。胃蛋白酶处理豆粕得到的肽含量也最高(56.34 mg)。

表 2 酶解前后蛋白质浓度及酶解率

Table 2 Concentration of protein and enzymatic hydrolysis ratio before and after adding enzyme

项目 Items	A280	A205	A280/205	蛋白质浓度(%)	酶解率(%)
				Protein concentration	Enzymatic hydrolysis ratio
豆粕(加酶前) Soybean meal(before adding enzyme)	2.98	2.42	1.23	0.013	-
鱼粉(加酶前) Fish meal(before adding enzyme)	2.97	2.04	1.46	0.010	-
T-豆肽 T-soybean meal(treated with trypsin)	2.91	1.48	1.97	0.0056	56.95
P-豆肽 P-soybean meal(treated with pepsin)	2.89	1.42	2.04	0.0052	60.00
T-鱼肽 T-fish meal(treated with trypsin)	2.91	1.30	2.24	0.0043	57.00
P-鱼肽 P-fish meal(treated with pepsin)	2.90	1.29	2.25	0.0043	57.00

表 3 豆粕和鱼粉酶解后的水解度

Table 3 The DH of soybean and fish meal hydrolyated by proteinase

项目 Items	豆粕 Soybean meal			鱼粉 Fish meal		
	AN	TN	AN/TN(%)	AN	TN	AN/TN(%)
T-处理组 Trypsin treatment	6.09	14.64	41.59	5.20	9.44	55.08
P-处理组 Pepsin treatment	8.80	12.45	70.68	7.92	11.01	53.77

表 4 P-豆肽、P-鱼肽、T-豆肽和 T-鱼肽游离氨基酸和肽结合氨基酸含量

Table 4 The total peptide-bound and free amino acids content in soybean and fish meal treated with pepsin and trypsin respectively (mg/100 mgDM)

氨基酸 Amino acid	P-豆肽 Soybean meal treated with pepsin			P-鱼肽 Fish meal treated with pepsin			T-豆肽 Soybean meal treated with trypsin			T-鱼肽 Fish meal treated with trypsin		
	TAA	FAA	PAA	TAA	FAA	PAA	TAA	FAA	PAA	TAA	FAA	PAA
	天冬氨酸 Asp	8.14	0	8.14	3.08	0.37	2.71	4.84	0	4.84	2.00	0
苏氨酸 Thr	2.36	1.04	1.31	1.81	0.34	1.47	1.68	0.71	0.97	0.51	0.03	0.48
丝氨酸 Ser	3.39	0.51	2.88	2.79	0.69	2.10	2.06	0.37	1.69	0.51	0.03	0.48
谷氨酸 Glu	12.89	2.14	10.75	6.50	2.19	4.31	9.07	2.16	6.91	2.31	0.09	2.22
甘氨酸 Gly	2.94	0.23	2.71	4.06	1.14	2.91	2.92	0.58	2.34	2.27	0.09	2.18
丙氨酸 Ala	4.41	0.60	3.81	5.73	3.72	2.01	4.04	2.31	1.73	2.54	0.61	1.93
胱氨酸 Cys	1.44	0.59	0.86	0.97	0.59	0.38	2.11	1.41	0.70	1.07	0.77	0.30
缬氨酸 Val	4.82	0.51	4.31	3.21	1.68	1.53	3.20	1.83	1.37	1.64	0.89	0.76
蛋氨酸 Met	0.53	0.50	0.03	1.00	0.66	0.34	0.48	0.20	0.28	3.77	0.13	3.63
异亮氨酸 Ile	3.28	0.17	3.11	2.78	0.93	1.84	2.80	1.53	1.27	1.57	0.96	0.61
亮氨酸 Leu	7.44	1.16	6.28	4.53	2.38	2.15	5.39	3.70	1.69	2.01	1.31	0.70
酪氨酸 Tyr	3.91	2.01	1.90	2.11	1.33	0.78	1.01	0.65	0.36	3.89	0.24	3.64
苯丙氨酸 Phe	6.89	5.17	1.72	3.10	2.68	0.42	7.07	4.33	2.73	2.30	2.06	0.24
赖氨酸 Lys	3.82	0.20	3.62	3.78	1.26	2.52	7.00	3.06	3.94	15.14	13.27	1.88
组氨酸 His	1.70	0.27	1.43	8.48	5.13	3.34	2.09	0.53	1.56	2.09	1.52	0.57
精氨酸 Arg	6.93	3.04	3.89	2.17	0.48	1.69	2.39	0.47	1.92	1.24	0.39	0.86
总和 Σ	74.43	18.09	56.34	56.09	28.90	27.19	58.14	23.84	34.30	44.87	22.39	22.48

本试验中豆粕的处理效果优于鱼粉。这可能与鱼粉品质有关。小肽和游离氨基酸的释放量及比例与蛋白质的品质有关,蛋白质品质高,小肽的释放量多,反之,则少。总体来看,胃蛋白酶处理豆粕和鱼粉的效果优于胰蛋白酶,可能因为经胰蛋白酶处理后,得到的肽段大于 3 000 u,经过超滤柱后,大肽段被除去,而用胃蛋白酶处理后,得到的小分子肽片段

较多。

2.3 不同肽氮水平对培养液中菌体蛋白氮产量的影响

从表 5 可以看出,培养液中肽氮含量越高,细菌生长速度越快,菌体蛋白氮(MCP)产量增加。从总的趋势来看,在培养的 6~8 小时之前,培养淀粉含量丰富,非结构性碳水化合物(NSC)细菌生长快,菌

体蛋白氮产量显著增加 ($P < 0.05$)。培养后期,随着培养液中淀粉和氨基氮的大量降解,细菌繁殖速

率增加缓慢,菌体蛋白氮处于平稳期,该结果提示:瘤胃细菌生长需要肽。

表5 不同P-鱼肽和T-鱼肽氮水平对培养液中菌体蛋白氮产量的影响

Table 5 Effects of peptide-N levels of fish meal treated with pepsin and trypsin respectively on bacterial protein-N production in the incubation (mg/100 mL)

项目 Items	肽氮水平 PEP-N level (g/L)	FAA 氮水平 FAA-N level (mg/L)	培养时间 Culture time (h)					
			2	4	6	8	10	12
P-鱼肽 Fish meal treated with pepsin	0.144	12.62	6.75 ^{ab}	11.37 ^{ab}	20.91 ^a	15.52 ^{ab}	7.88 ^{ab}	4.69 ^b
	0	12.62	5.17 ^{bc}	6.07 ^{bc}	13.49 ^a	11.80 ^{ab}	7.40 ^{abc}	4.02 ^c
	14	1226.49	6.86 ^d	20.07 ^c	25.79 ^c	47.98 ^a	37.02 ^b	36.47 ^b
	0	1226.49	1.75 ^b	5.10 ^{ab}	6.71 ^a	7.11 ^a	9.60 ^a	8.23 ^a
	16	1401.71	15.17 ^d	42.05 ^c	46.37 ^c	79.75 ^a	59.28 ^b	58.59 ^b
	0	1401.71	5.70 ^b	6.47 ^b	7.57 ^b	13.98 ^a	5.36 ^b	4.29 ^b
T-鱼肽 Fish meal treated with trypsin	0.144	23.31	4.30 ^c	5.62 ^{bc}	5.47 ^{bc}	5.39 ^{bc}	9.93 ^a	8.62 ^{ab}
	0	23.31	3.23 ^b	3.23 ^b	5.39 ^{ab}	5.39 ^{ab}	8.56 ^a	8.92 ^a
	14	2266.62	7.54 ^c	15.09 ^b	21.99 ^a	22.64 ^a	20.48 ^a	17.10 ^b
	0	2266.62	8.62 ^{ab}	5.39 ^b	6.91 ^{ab}	9.70 ^a	5.39 ^b	5.38 ^b
	16	2590.42	9.70 ^c	23.71 ^b	47.42 ^a	47.91 ^a	49.57 ^a	48.38 ^a
	0	2590.42	4.31 ^b	11.86 ^a	8.62 ^a	3.23 ^b	3.23 ^b	3.24 ^b
P-豆肽 Soybean meal treated with pepsin	0.144	1.05	3.35 ^a	4.31 ^a	4.64 ^a	2.16 ^b	1.62 ^b	2.01 ^b
	0	1.05	1.24 ^b	3.61 ^{ab}	6.15 ^a	1.08 ^b	2.16 ^{ab}	1.08 ^b
	14	102.45	4.03 ^c	9.40 ^a	6.72 ^b	4.03 ^c	2.69 ^c	2.68 ^c
	0	102.45	1.34 ^d	5.38 ^a	4.03 ^b	2.69 ^c	1.34 ^d	1.34 ^d
	16	117.09	7.55 ^c	7.54 ^c	21.56 ^b	36.66 ^a	7.55 ^c	11.85 ^c
	0	117.09	6.47 ^b	5.39 ^b	5.39 ^b	10.80 ^a	3.23 ^c	2.94 ^c
T-豆肽 Soybean meal treated with trypsin	0.144	5.44	1.07 ^b	1.62 ^b	1.37 ^b	10.28 ^a	8.23 ^a	7.60 ^a
	0	5.44	1.84 ^b	1.08 ^b	1.38 ^b	7.54 ^a	3.43 ^b	3.75 ^b
	14	529.04	5.01 ^{bc}	9.55 ^b	16.17 ^a	7.55 ^{bc}	4.33 ^{bc}	2.16 ^c
	0	529.04	2.86 ^{ab}	3.05 ^{ab}	4.32 ^a	2.15 ^{ab}	3.25 ^{ab}	1.08 ^b
	16	604.62	8.05 ^f	14.21 ^c	73.80 ^a	45.62 ^b	34.89 ^c	28.05 ^d
	0	604.62	5.37 ^b	8.05 ^b	16.11 ^a	10.05 ^b	9.40 ^b	8.04 ^b

同行肩注不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

Values with different small letter superscripts in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). The same as below.

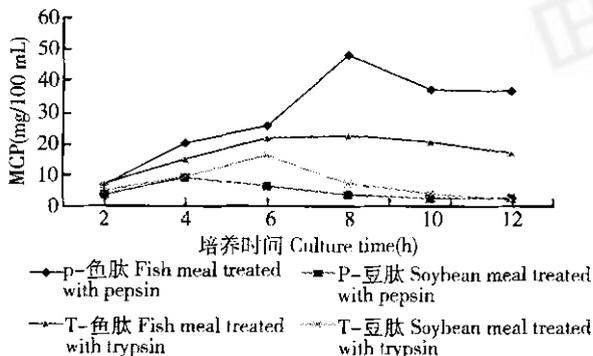


图1 添加14 g不同来源的肽氮对培养液中菌体蛋白氮产量的影响

Fig. 1 The effect of adding 14 g of peptides-N with different resource on bacterial protein production in the incubation

本试验中选取了3个梯度,0.144、14和16 gN/L。添加量为14 gN/L时,在培养后的2到4(6、8)h,菌体蛋白氮产量增加,随后,从表观上来看,虽有下降,但差异并不显著。8h后,细菌生长基本处于停滞状态,菌体蛋白不再增加。Russell^[7]研究发现,当批次培养液添加15 g/L肽时,培养后6h内细菌快速增殖,菌体蛋白氮产量线性上升;但此后10h细菌基本上处于停滞状态,菌体蛋白氮不再增加,至24h后,菌体蛋白产量反而下降,与本试验结果一致。后来,Chen等^[8]利用批次培养也发现了同样的现象。在本试验中,培养时间为12h,在6(8)到12h内,菌体蛋白氮不再增加。这可能是由于培养初期碳源和氮源充足,细菌充分利用,生长繁殖加快,菌体蛋白氮产量显著上升;培养中期,碳源和氮源耗尽,细菌能源丧失,生长受到抑制。出现自

溶现象是菌体蛋白氮产量升势缓慢、甚至显著下降的主要原因。与此一致,程茂基^[9]利用豆粕肽和玉米肽纯培养时发现,在培养初期(0~6 h)菌体蛋白氮产量增加,6 h之后,细菌繁殖速率增加缓慢。李琍等^[10]研究发现:在纯培养时,肽对糖和淀粉发酵的促进作用持续时间短,对于葡萄糖,肽仅在2~8 h提高微生物合成量,对于木糖和淀粉,肽在4~12 h提高微生物合成量。

从表5可以看出:肽添加处理组的菌体蛋白氮产量高于其对照组。鉴于二者的培养环境完全相同,对此,可能的解释为(1)肽添加处理组提供的氨基氮要远高于其对照组;(2)肽能够完整地细菌整合为菌体蛋白质。在纯培养时,肽存在时细菌生长较好。氨基酸的形式对细菌生长非常重要,Wright^[11]研究表明:与FAA相比,细菌能够更有效地利用肽的碳架,肽转变为蛋白质的效率更高。由图

1可知,添加不同来源的肽-N时,P鱼肽的菌体蛋白氮产量最高,其次为T鱼肽、T豆肽和P豆肽。该结果表明:肽的来源、结构可能影响细菌对肽的摄取,进而影响肽对细菌生长繁殖的促进作用。

2.4 不同肽氮对培养液中原虫生长的影响

由表6得知,随着肽氮添加水平的升高,原虫数增加。与游离氨基酸相比,瘤胃原虫更优先摄取利用肽。在培养初期(6~8 h之前),培养液底物含量丰富,营养源充足,原虫数呈增加的趋势,随后,由于培养液中营养源逐渐消耗,碳源和氮源不充足,原虫生长受到抑制。P-鱼肽在6 h原虫数达到最高,随后呈下降趋势,原虫生长处于平稳期。P-豆肽在8 h原虫数达到最高,随后,原虫数下降。由此可见:肽可能是瘤胃中原虫生长的营养源之一,能刺激原虫生长。

表6 不同P-鱼肽和P-豆肽氮水平对培养液中原虫的影响

Table 6 Effects of peptide-N levels of fish meal and soybean meal treated with pepsin on protozoal count in the incubation (×10⁴/mL)

项目 Items	肽氮水平 PEP-N level (g/L)	FAA 氮水平 FAA-N level (mg/L)	培养时间 Culture time (h)					
			2	4	6	8	10	12
P-鱼肽 Fish meal treated with pepsin	0.144	12.62	0.58 ^b	0.64 ^b	1.00 ^{ab}	0.86 ^b	0.83 ^b	0.53 ^b
	0	12.62	0.19 ^b	0.76 ^a	0.55 ^{ab}	0.29 ^b	0.48 ^{ab}	0.14 ^b
	14	1 226.49	1.54 ^a	1.41 ^a	1.64 ^a	1.64 ^a	0.69 ^b	0.62 ^b
	0	1 226.49	0.73 ^{ab}	0.79 ^{ab}	0.91 ^a	0.56 ^{ab}	0.43 ^b	0.36 ^b
P-豆肽 Soybean meal treated with pepsin	0.144	1.05	0.52 ^b	0.44 ^b	0.62 ^{ab}	1.06 ^a	0.55 ^b	0.48 ^b
	0	1.05	0.21 ^b	0.33 ^{ab}	0.45 ^{ab}	0.24 ^b	0.26 ^{ab}	0.25 ^{ab}
	14	102.45	0.68 ^b	0.55 ^b	1.07 ^b	1.69 ^a	1.21 ^{ab}	1.03 ^b
	0	102.45	0.83 ^a	0.65 ^{ab}	0.50 ^{ab}	0.67 ^a	0.29 ^b	0.23 ^b

表7 不同P-鱼肽和P-豆肽水平对培养液中蛋白酶活性的影响

Table 7 Effects of peptide-N levels of fish meal and soybean meal treated with pepsin on protease activity in the incubation (unit/(min * mL))

项目 Items	肽氮水平 PEP-N level (g/L)	FAA 氮水平 FAA-N level (mg/L)	培养时间 Culture time (h)					
			2	4	6	8	10	12
P-鱼肽 Fish meal treated with pepsin	0.144	12.62	0.56 ^{ab}	0.34 ^b	1.13 ^a	0.65 ^{ab}	0.61 ^{ab}	0.61 ^{ab}
	0	12.62	0.30 ^b	0.27 ^b	1.00 ^a	0.65 ^{ab}	0.21 ^b	0.13 ^b
	14	1 226.49	2.38	2.01	2.14	1.80	2.08	1.58
	0	1 226.49	0.67 ^a	0.38 ^{ab}	0.47 ^{ab}	0.55 ^{ab}	0.81 ^a	0.03 ^b
P-豆肽 Soybean meal treated with pepsin	0.144	1.05	1.52 ^a	0.78 ^b	0.84 ^b	1.94 ^a	2.02 ^a	0.44 ^b
	0	1.05	0.58 ^a	0.55 ^a	0.49 ^{ab}	0.51 ^{ab}	0.39 ^b	0.18 ^c
	14	102.45	0.81 ^{ab}	1.07 ^{ab}	2.3 ^a	2.18 ^a	2.96 ^a	0.37 ^b
	0	102.45	0.03 ^c	0.06 ^c	0.46 ^b	1.40 ^a	0.71 ^b	0.14 ^c

2.5 不同肽氮对培养液中蛋白酶活的影响

由表7可知:P-鱼肽组中,随着肽-N水平的提高,蛋白酶活性增加,在培养后的6 h内,酶活呈线性增加,在第6 h酶活达到最高,随后逐渐下降;P-豆肽组中,在10 h酶活达到最高,第12 h酶活下降,与10 h相比,差异显著($P < 0.05$)。

2.6 不同来源的肽对培养液中纤维分解酶活性的影响

在另一个试验中,比较不同来源的肽、氨基酸以及无机铵盐对培养液中纤维分解酶活性的影响见图2和图3。

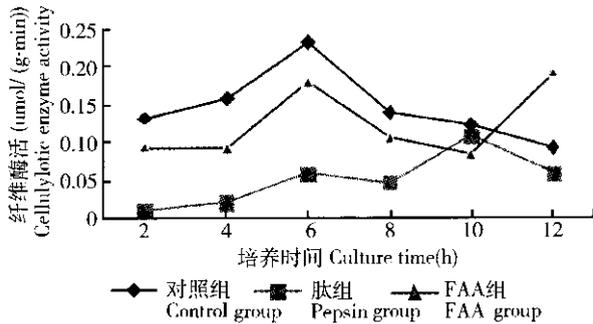


图2 14 g N/L P-鱼肽对培养液中纤维酶活性的影响
Fig. 2 Effects of adding 14 g peptide-N of fish meal treated with pepsin on cellulolytic enzyme in the incubation

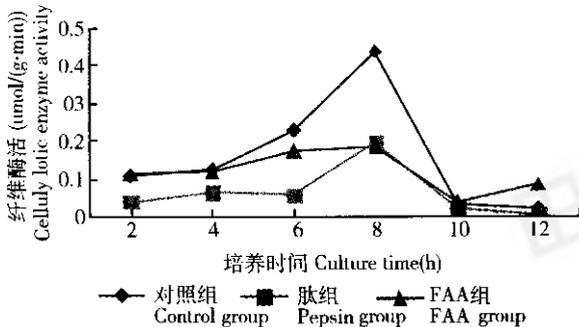


图3 14 g N/L P-豆肽对培养液中纤维酶活性的影响
Fig. 3 Effects of adding 14 g peptide-N of soybean meal treated with pepsin on cellulolytic enzyme in the incubation

由图2和图3可知:P-鱼肽和P-豆肽组的纤维酶活性均比对照组和FAA组低。说明肽和氨基酸对培养液中纤维酶活没有提高的作用。

3 讨论

活性肽的生产方法有许多,如酸、碱提取法、化

学合成法、基因重组法、酶解法等。目前最常用的是酶解法,因该法生产的产品安全性极高,生产条件温和,可定位生产特定的肽,而且高效,对蛋白质营养价值破坏小,无异味,为活性肽生产和制备提供了一种简便适用的方法。所用到的酶有许多,如胰蛋白酶、胃蛋白酶、无花果蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和微生物酶等。酶法生产活性肽的主要流程为:选择原料蛋白—预处理—酶解—分离—精制—成品。本试验即属于酶解法生产活性肽,所用的酶是胃蛋白酶和胰蛋白酶。在本试验中,由于条件所限,只做到了分离。

酶解过程中主要通过水解参数来控制水解程度。水解参数主要有温度、水解时间、pH和AN/TN的比率。本试验中,胰蛋白酶和胃蛋白酶水解温度、时间、pH的选择比较适宜:温度为37℃,pH分别为2和7;时间为20 h。AN/TN与水解温度、水解时间、水解PH均有关。在生产营养蛋白水解物时,在分离这一步中超滤法被广泛应用,因为超滤可除去不溶性的底物和剩余的酶类而使水解物得以净化,同时除去所有高分子肽类。本试验中,首先将酶解物在2 000 r/min下离心,除去不溶性的底物,然后将溶液通过分子量为3 000 u以下的超滤柱,进一步纯化,将分子量为3 000 u以上的高分子肽和剩余的酶类以及可溶性物质全部除去。超滤之后,将所得溶液通过强酸性阳离子交换树脂除去糖类。本研究为活性肽生产和制备提供了一种简便适用的方法。

肽刺激细菌生长可能存在适度的问题。研究表明,培养液中肽浓度过高会抑制细菌生长。Chen等^[8]以肽为氮源批次培养细菌*Peptostreptococcus*时发现,当培养液中氨基氮低于15 g/L时,菌体蛋白氮随氨基氮含量的增加而线性提高;一旦培养液中氨基氮高于15 g/L,细菌生长开始受到抑制,菌体蛋白氮产量下降。在本试验中,当添加0.144 g N/L时,菌体蛋白氮产量线性增加,6 h后,表观来看,产量下降,但差异不显著($P > 0.05$)。可能是添加肽浓度低于抑菌浓度。在添加16 g N/L时,在6或8 h微生物蛋白产量达到最大,随后,微生物蛋白产量下降,与最大值相比,P-鱼肽组、P-豆肽组、T-鱼肽组和T-豆肽组变化趋势有所不同,可能添加16 g N/L时,有抑制细菌生长的作用。

在本试验条件下,培养液中细菌、原虫生长及蛋白酶活随时间的变化规律基本相似。并得出肽促进细菌和原虫的生长和增殖的结论。肽和氨基酸是瘤

胃微生物生长的潜在营养源。瘤胃微生物对肽的代谢要快于游离氨基酸。Cruz^[12]研究发现,体内灌注肽、FAA后,与对照组相比,微生物的总量有所提高,但差异不显著;对原虫而言,从总趋势来看,肽添加处理的原虫数和蛋白酶活性均比FAA处理组高。二者培养环境完全相同,由此可见原虫能够更有效的利用肽作为自身的营养源。

瘤胃微生物中细菌、原虫和真菌均具有降解蛋白质的能力,其中细菌是分解蛋白质的主要微生物,但是细菌只能降解可溶性蛋白质,而部分原虫不但能降解可溶性蛋白质,同时也能分解不溶性蛋白颗粒(如鱼粉、菜籽饼等)。瘤胃中原虫占瘤胃微生物总量的40%~80%,真菌占整个瘤胃微生物总量的8%。原虫和真菌有竞争作用,原虫增加,会抑制真菌的生长。本试验中,细菌、原虫均增加,可能抑制真菌生长,虽然真菌能分泌蛋白酶,但其含量较少。所以从总体来看,培养液中的蛋白酶活性增加。

在瘤胃内,细菌在纤维消化中占主导地位,主要的纤维分解菌有:产琥珀酸拟杆菌、黄色瘤胃球菌和白色瘤胃球菌,这些分解菌产生纤维素分解酶。瘤胃真菌在纤维物质消化中主要起打破纤维细胞壁结构的作用,但由于在瘤胃中的含量很少,因此其纤维素总的消化效力很低^[10]。原虫分泌的酶能降解纤维物质,但这种降解也不是主要的。根据康乃尔模型,瘤胃细菌分为两大类,结构性碳水化合物分解菌和非结构性碳水化合物分解菌,前者以氨为氮源,后者以氨、FAA和肽为氮源。纤维素分解菌属于结构性碳水化合物分解菌。Russell等^[13]认为,肽一方面为非结构性碳水化合物分解菌提供发酵可能必需的氨基氮,另一方面由于结构性碳水化合物分解菌不能以肽和氨基酸为氮源,所以为结构性碳水化合物分解菌提供支链VFA,由此缩短细菌分裂周期,加快细菌繁殖速度,促进细菌的生长。本试验培养液中缺乏纤维素,尽管支链氨基酸和能量丰富,结构性碳水化合物分解菌生长仍然可能受到抑制,所以纤维酶活没有升高,菌体蛋白氮产量增加也可能不是源于结构性碳水化合物分解菌的加速生长。这与程茂基^[9]的结果一致。

4 结 论

① 胃蛋白酶处理豆粕和鱼粉的效果优于胰蛋白酶处理效果。

② 采用胰蛋白酶和胃蛋白酶水解豆粕和鱼粉

时,最适条件为:温度37℃;pH分别为2和7;水解时间为20h。

③ 分子量小于3000u的肽对瘤胃细菌生长有促进作用,来源于动物性饲料的肽对促进瘤胃细菌的生长优于来源于植物性饲料的肽。

④ 以可溶性碳水化合物为底物时,肽提高菌体蛋白的产量优于其他氮源,同时原虫数量增加,蛋白酶活性提高,但对纤维酶活性有抑制作用。

参考文献:

- [1] Meisel H. Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 1989, 8: 363-373.
- [2] 徐丹,宗庭益. 阿片肽及其免疫调节作用. 国外医学免疫学分册, 1997, 20(1): 12-16.
- [3] 李勇竞,汪以真. 酪蛋白磷酸肽调节动物免疫功能的研究进展. *动物营养学报*, 2005, 17(3): 6-10.
- [4] Groleau D, Forsberg C W. Partial characterization of the extracellular carboxymethylcellulase activity produced by the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. *Canada of Journal Microbiol*, 1983, 29(5): 504-517.
- [5] 郭本恒. 活性肽类的加工制备技术. *杭州食品科技*, 1997, 2: 14-16.
- [6] 郭清泉. 食品中活性肽的研究. *食品与机械*, 1999, 6: 12-14.
- [7] Russell J B. Fermentation of peptides by *Bacteroides rumenicola* B₁₄. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45(3): 1566-1573.
- [8] Chen G, Sniffen C J, Russell J B. A procedure for measuring peptides in rumen fluid and evidence that peptides uptake can be a rate-limiting step in ruminal protein degradation. *Journal of Dairy Science*, 1987, 70: 1211-1219.
- [9] 程茂基. 绵羊瘤胃内寡肽的产生、降解、吸收、流通与微生物摄取规律的研究. 博士学位论文. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2000.
- [10] 李珺,丁角立. 肽对体外混合培养瘤胃微生物发酵和生长影响的研究. *畜牧兽医学报*, 2000, 2: 113-119.
- [11] Wright D G. Metabolism of peptides by rumen microorganisms. *Applied Microbiology*, 1967, 15: 547-552.
- [12] Cruz Soto. Influence of peptides, amino acids and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay and on the growth of rumen bacteria *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 1994, 49: 151-161.
- [13] Russell J B, Connor J D O, Fox D G, Van Soest P J,

Sniffen C.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets :I. Ruminant Fermentation. *Journal*

of Animal Science ,1992 ,70 3551 – 3561.

Study on Extracting Oligopeptides from Fish Meal and Soybean Meal and Their Effects on Growth of the Rumen Microbes of Sheep

WANG Hong-rong¹ SUN Gui-fen² LU De-xun³ ZHAO Xiu-ying³ ZHANG Hai-ying³

(1. College of Animal Science and Technology ,Yangzhou University ,Yangzhou 225009 ,China ;

2. Dairy Farm of Guangdong Wenshi Group ,Zhaoqing 526000 ,China ;

3. Inner Mongolian Academy of Animal Science ,Huhhot 010030 ,China)

Abstract :The procedures and the optimal conditions extracting oligopeptides from fish meal and soybean meal were determined with pepsin and trypsin treatments respectively by ultra filtration and ion exchange. In addition , effects of the oligopeptides (MW < 3 000 u) on the rumen microbial growth and the proteolytic and cellulolytic activity in the rumen of sheep have been investigated. The extracted four kinds of oligopeptides (MW < 3 000 u) were obtained from the treatments. The results showed 1)the enzymatic hydrolysis of fish meal and soybean meal was carried out at 37℃ for 20 h ; optimum pH was 2 and 7 when treated with pepsin and trypsin , respectively 2)the rumen microbial growth was promoted by oligopeptides , oligopeptides from animal feedstuff was better than that from plant feedstuff (3) fish meal oligopeptides and the soybean meal oligopeptides could stimulate the growth rates and increase the counts of bacteria and protozoa in the rumen. Fish meal oligopeptides and the soybean meal oligopeptides could promote the activity of rumen protease slightly. Otherwise , they had no effect on the cellulolytic enzyme activity. [*Chinese Journal of Animal Nutrition* , 2006 ,18(4) 252-260]

Key words :Oligopeptide ; Rumen microbes ; Protease ; Cellulolytic enzyme

Author E-mail : hrwang@ yzu. edu. cn

(编辑 张英慧)

中国畜牧兽医学会期刊编辑学分会 2007 年联合征订目录(表 2)

期刊名称	邮发代号	刊期	年定价(元)	期刊名称	邮发代号	刊期	年定价(元)
乳业科学与技术	自办发行	双月刊	40.00	家畜生态学报	52-112	双月刊	36.00
中国兽医寄生虫病	4-748	双月刊	30.00	中国牛业科学(黄牛杂志)	52-113	双月刊	48.00
上海畜牧兽医通讯	4-393	双月刊	36.00	动物医学进展	52-60	月刊	120.00
国外畜牧学-猪与禽	4-361	双月刊	36.00	畜牧兽医杂志	52-56	双月刊	42.00
现代畜牧兽医	8-75	月刊	84.00	今日畜牧兽医	18-339	月刊	60.00
养猪	8-100	双月刊	60.00	北方牧业	18-323	半月刊	76.80
兽药与饲料添加剂	28-180	双月刊	30.00	山西农业·畜牧兽医	22-317	月刊	54.00
畜牧与兽医	28-42	月刊	57.60	河南畜牧兽医	36-193	半月刊	144.00
中国养兔	28-85	双月刊	30.00	经济动物学报	自办发行	季刊	32.00
粮食与饲料工业	38-151	月刊	60.00	吉林畜牧兽医	12-75	月刊	60.00
农村实用技术与信息	38-185	月刊	22.80	中国兽医学报	12-105	月刊	60.00
肉类工业	自办发行	月刊	60.00	饲料博览	14-184	月刊	60.00