

岳东, 解培培, 卢静怡, 等. 固态发酵生产 α -酮戊二酸及其对小鼠生长、肠道结构和免疫机能的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(2): 1-9.
YUE Dong, XIE Peipei, LU Jingyi, et al. Effects of α -ketoglutaric acid produced by solid fermentation on mouse growth, intestinal structure and immune function[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(2): 1-9.

固态发酵生产 α -酮戊二酸及其对小鼠生长、肠道结构和免疫机能的影响

岳 东¹, 解培培¹, 卢静怡¹, 梁冰清², 方心灵³, 朱晓彤¹,
高 萍¹, 江青艳¹, 潘木水⁴, 束 刚¹

(1 广东省动物营养调控重点实验室/华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642;

2 广东温氏大华农生物科技有限公司, 广东 云浮 527400; 3 广东科贸职业学院

动物科技学院, 广东 广州 510430; 4 广东省农业科学院 蚕业与农产品加工研究所, 广东 广州 510610)

摘要:【目的】筛选固态发酵制备 α -酮戊二酸的菌株, 研究发酵产物对动物生长、肠道结构和免疫机能的影响。【方法】对 9 种菌株 (包括乳酸菌、酵母菌和曲霉菌 *Aspergillus* 等) 进行发酵, 检测发酵物中 α -酮戊二酸含量。发酵过程中添加琥珀酸, 研究其对 α -酮戊二酸产出率的影响。随后, 选用 16 只 4 周龄 C57/BL 小鼠, 随机分为 2 组, 分别在普通日粮中添加质量分数为 5% 的普通发酵物和 5% 的富含 α -酮戊二酸发酵物饲喂 4 周, 分析动物采食和生长、肠道结构以及单核-巨噬细胞的吞噬功能和血象。【结果】酵母菌固态发酵产生了微量的 α -酮戊二酸, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 产生了约 60 $\mu\text{g/g}$ 的 α -酮戊二酸, 其余菌株均未检测到 α -酮戊二酸。枯草芽孢杆菌固态发酵时添加琥珀酸可促进 α -酮戊二酸累积, 最高产出率达到 0.3%。添加质量分数为 5% 的靶向 α -酮戊二酸发酵产物稍微降低了小鼠体质量和体质量增加 ($P>0.05$), 显著增加小鼠的比目鱼肌质量 ($P<0.05$), 显著降低小鼠的褐色脂肪质量 ($P<0.05$)。发酵产物对小鼠回肠和空肠的绒毛长度和隐窝深度无显著影响。血象和免疫学指标表明, 富含 α -酮戊二酸发酵产物能显著降低中性粒细胞百分比, 提高淋巴细胞百分比, 增加红细胞血红蛋白质量浓度。发酵产物显著增加小鼠单核-巨噬细胞的吞噬功能 ($P<0.05$)。【结论】枯草芽孢杆菌在固态发酵过程中添加琥珀酸可使 α -酮戊二酸累积, 日粮添加富含 α -酮戊二酸发酵物能显著增加小鼠肌肉质量, 降低脂肪质量, 并能显著提高小鼠的免疫机能。

关键词: 小鼠; α -酮戊二酸; 枯草芽孢杆菌; 固态发酵; 代谢调控; 琥珀酸
中图分类号: S816.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)02-0001-09

Effects of α -ketoglutaric acid produced by solid fermentation on mouse growth, intestinal structure and immune function

YUE Dong¹, XIE Peipei¹, LU Jingyi¹, LIANG Bingqing², FANG Xinling³, ZHU Xiaotong¹,
GAO Ping¹, JIANG Qingyan¹, PAN Mushui⁴, SHU Gang¹

(1 Guangdong Provincial key Laboratory of Animal Nutrition Control/College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Guangdong Wenshi Dahuanong Biotechnology Co., Ltd., Yunfu 527400, China; 3 College of Animal Science and Technology, Guangdong Science and Technology Vocational College, Guangzhou 510430, China; 4 Institute of Sericulture and Agricultural Products Processing, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

收稿日期: 2019-05-11 网络首发时间: 2020-01-07 11:39:05
网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20200106.0923.024.html>
作者简介: 岳 东 (1994—), 男, 硕士研究生; E-mail: 416208559@qq.com; 通信作者: 潘木水 (1967—), 男, 副研究员, 硕士, E-mail: 308134456@qq.com; 束 刚 (1979—), 男, 教授, 博士, E-mail: shugang@scau.edu.cn
基金项目: 广东省重点领域研发计划 (2019B020218001); 广东省自然科学基金 (9151064201000067); 广东省普通高校创新团队项目 (2017KCXTD002)

Abstract: 【Objective】 To screen strains for producing α -ketoglutaric acid by solid fermentation, and study the effects of fermentation products on animal growth, intestinal structure and immune function. 【Method】 Nine strains (including lactic acid bacteria, yeast and *Aspergillus*) were fermented and α -ketoglutaric acid content in the fermentation products was detected. Succinic acid was added during the fermentation to study its effect on the production rate of α -ketoglutaric acid. Subsequently, sixteen 4-week-old C57/BL mice were randomly divided into two groups, 5% normal fermented material or 5% α -ketoglutarate-rich fermented material was added to the common diet for four weeks. Animal feeding and growth, intestinal structure, and phagocytosis and blood picture of monocyte-macrophages were analyzed. 【Result】 The solid fermentation of yeast produced a trace amount of α -ketoglutaric acid, *Bacillus subtilis* produced about 60 $\mu\text{g/g}$ α -ketoglutaric acid, and α -ketoglutaric acid was not detected using other strains. The addition of succinic acid to the solid fermentation of *Bacillus subtilis* promoted the accumulation of α -ketoglutaric acid with the maximum production rate of 0.3%. Dietary supplementation of 5% targeted α -ketoglutarate fermentation product slightly reduced body weight and body weight gain of mice($P>0.05$), significantly increased the soleus muscle weight of mice ($P<0.05$), and significantly reduced brown fat weight in mice ($P<0.05$). The fermentation product had no significant effect on the villus length and crypt depth of mouse ileum and jejunum. Blood and immunological indicators revealed that α -ketoglutarate-rich fermentation product significantly reduced the percentage of neutrophils, increased the percentage of lymphocyte, and increased the content of red blood cell hemoglobin. Moreover, the fermentation product also significantly increased the phagocytic function of mouse monocyte-macrophages ($P<0.05$). 【Conclusion】 The addition of succinic acid can promote accumulation of α -ketoglutaric acid in the solid fermentation process of *Bacillus subtilis*. Adding α -ketoglutarate-rich fermentation in the diet can significantly increase the muscle weight, decrease the fat weight of mice, and significantly improve the immune function of mice.

Key words: mouse; α -ketoglutaric acid; *Bacillus subtilis*; solid fermentation; metabolic regulation; succinic acid

α -酮戊二酸是三羧酸循环中的中心物质，是机体内重要的代谢中间产物，在机体的免疫调节^[1]、肠道健康^[2]、蛋白质合成^[3]、骨骼发育^[4]、延缓衰老^[5]和抗癌^[6]等方面发挥着重要作用。目前 α -酮戊二酸主要通过化学合成法生产^[7]，但过程复杂和有毒化学试剂的污染等问题严重制约了化学合成方法大规模生产 α -酮戊二酸。微生物发酵法生产 α -酮戊二酸作为代替化学合成的方法已经相对比较成熟。但目前微生物发酵法生产 α -酮戊二酸全部是采用液体发酵^[8]，而采用固态发酵模式生产 α -酮戊二酸的相关研究鲜见报道。

固态发酵饲料是近年来生物饲料产业新兴领域之一^[9]。与普通饲料相比，发酵饲料不仅能消除抗营养因子，发挥预消化功能，而且在发酵过程中能产生大量的酶、有机酸以及各种代谢中间产物。但目前关于发酵饲料代谢产物种类和功能的研究报道较少，也鲜有针对特定代谢中间产物的靶向发酵菌种和工艺探索。因此，本文将 α -酮戊二酸的生物发酵和发酵饲料有机结合，重点对常规固态发酵菌株 (包括乳酸菌、酵母菌和曲霉菌 *Aspergillus* 等) 进行了筛选，并采用代谢物调控的方法对固态

发酵过程中 α -酮戊二酸的累积量进行研究。最后，通过日粮中添加发酵物，验证其对动物生长、免疫功能和肠道健康的调控作用。本文是对固态发酵法生产 α -酮戊二酸的积极探索，同时也为靶向代谢中间产物发酵饲料的生产应用提供一定参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株由广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所提供。豆粕、麸皮和玉米粉购自广东华红饲料科技有限公司。4 周龄 C57/BL 小鼠购于广东省医学实验中心。试验仪器有霉菌培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司, MJ-250-II 型); 液相色谱仪 (美国安捷伦科技公司, 1290 型); 清醒小动物体成分分析仪 (上海纽迈科技有限公司, MesoQMR23-060H 型); 高压蒸汽灭菌锅 (日本 HIRAYAMA 公司, HVE-50 型); 超净工作台 (中国苏州净化集团安泰公司, SW-CJ-1F 型)。

1.2 发酵菌液的制备

将保藏的菌种嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* MIA、嗜酸乳杆菌 HSY、粪肠球菌 *Enteroc-*

occus faecalis、植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*、乳酸菌接种到装有 50 mL MRS 肉汤培养基的 250 mL 三角瓶中, 置于 37 °C 条件下培养 3 d。将保藏的菌种酵母菌、黑曲霉 *Aspergillus niger*、木霉菌 *Trichoderma* spp. 接种到装有 50 mL 麦芽汁培养基的 250 mL 三角瓶中, 将枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 的菌种接种到装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 置于全温振荡器 (30 °C、170 r/min) 中培养 24 h, 使得菌数为 20×10^8 /mL。

1.3 发酵方法

将灭菌后的豆粕、玉米粉、麸皮按 3:6:1 的质量比准确称取 30 g 于烧杯中, 加入 30 mL 灭菌水 (含体积分数为 5% 的发酵菌液) 并搅拌均匀, 然后铺入平皿中, 其中嗜酸乳杆菌 MIA、嗜酸乳杆菌 HSY、粪肠球菌、植物乳杆菌、乳酸菌发酵的平皿用封口膜封闭, 进行厌氧发酵。酵母菌、黑曲霉、木霉菌、枯草芽孢杆菌发酵的平皿不封闭, 进行有氧发酵。将所有平皿置于霉菌培养箱中, 于 37 °C 条件下发酵 72 h, 每组 3 个重复。在添加琥珀酸时, 将其加入到灭菌水中, pH 调至 7。发酵结束后, 取发酵料 10 g 用于检测 pH 和代谢物的含量。

1.4 代谢产物的测定

代谢产物的提取: 称取 0.2 g 未烘干发酵物料置于离心管中, 进行超声破除, 然后使用滤纸过滤, 将滤液用乙醇沉淀蛋白后, 取上清液 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 ValueLab 针式过滤器过滤后进行分析; 流动相的配制: 准确称取 5 g 磷酸氢二铵, 用蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL, 用磷酸调节 pH 至 2.5。用 0.22 μ m 微孔过滤膜进行真空超滤, 然后用超声波脱气; 标准溶液的配制: 精确称取一定量的苹果酸、 α -酮戊二酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸的标准品用超纯水配制成终质量浓度分别为 1.2 mg/mL、240 μ g/mL、10 mg/mL、1.5 mg/mL 和 5 μ g/mL 的有机酸标准混合液, 然后用 ValueLab 针式过滤器过滤; 上机检测: 使用安捷伦色谱柱 SB-Aq C₁₈ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m), 以 5 g/L (NH₄)₂HPO₄-H₃PO₄ (pH2.5) 缓冲液作为流动相, 流动相流速为 0.8 mL/min, 柱温 30 °C, 紫外检测波长为 214 nm。

1.5 动物试验设计

饲养试验选用 4 周龄雄性小鼠 16 只, 按体重 (18 g 左右) 相近原则随机分为 2 组: 对照组添加质量分数为 5% 的普通发酵物 (枯草芽孢杆菌正常发酵, 不做任何处理), 试验组添加质量分数为 5% 的富含 α -酮戊二酸发酵物 (枯草芽孢杆菌发酵

过程中添加质量分数为 1% 的琥珀酸), 试验过程中, 小鼠自由采食。

1.6 小鼠吞噬细胞吞噬能力的测定

用水将印度墨汁稀释 4 倍, 然后按小鼠体质量, 每 10 g 体质量尾静脉注射 0.1 mL 稀释后的印度墨汁, 随后分别于 2 min (t_1) 和 10 min (t_2) 进行上颌静脉采血 20 μ L, 加入到 2 mL 1 g/L 的 Na₂CO₃ 溶液中, 振荡混匀, 在 680 nm 测量光密度, t_1 和 t_2 血液样品的光密度分别用 $D_{680\text{ nm}}$ 和 $D'_{680\text{ nm}}$ 表示。随后处死小鼠, 称取肝脏和脾脏质量, 计算各组小鼠碳廓清指数 (K) 和吞噬指数 (α)。

$$K = \frac{\lg D_{680\text{ nm}} - \lg D'_{680\text{ nm}}}{t_2 - t_1},$$
$$\alpha = \frac{\sqrt[3]{K} \times \text{体质量}}{\text{肝脏质量} + \text{脾脏质量}}^{\circ}$$

1.7 HE 染色

剪取 2~3 cm 肠道组织放入体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液中固定, 固定 24~36 h, 脱水后进行石蜡包埋。用平推切片机切成 5 μ m 切片, 贴片于载玻片上, 置于烘片机上烘干。配置 HE 染色所需试剂于染缸中。HE 染色步骤: 切片放入二甲苯溶液中脱蜡 2 次, 每次 15 min; 随后放入无水乙醇浸泡 2 次, 每次 15 min, 然后依次放入体积比为 95%、85%、75% 的乙醇溶液中各浸泡 5 min; 流水冲洗 10 min, 苏木精染色 2 min, 迅速流水冲洗 10 min, 盐酸反蓝数秒后流水冲洗 10 min; 伊红 (用体积比为 70% 的乙醇溶液将伊红溶解) 染色 3 min, 无水乙醇浸泡 2 次, 每次 5 min, 二甲苯溶液浸泡透片 2 次, 每次 5 min, 中性树脂胶加盖玻片封片晾干。

1.8 小鼠血象的测定

对小鼠禁食禁水 12 h, 次日上午从每个处理组随机取 6 只小鼠, 眼眶采血, 保存于 EDTA 抗凝管中, 暂时存放于 4 °C 冰箱中, 当日送广东省医学实验动物中心检测血象。

2 结果与分析

2.1 固态发酵生产 α -酮戊二酸的菌株筛选

采用液相色谱对 α -酮戊二酸进行定量检测 (图 1A), α -酮戊二酸质量浓度与峰面积的线性回归方程相关系数为 0.999 8, 说明 α -酮戊二酸的浓度与峰面积呈良好的线性关系 (图 1B)。对 9 种菌株发酵物检测发现, 在固态发酵模式下, 酵母菌可以产生微量约 13 μ g/g 的 α -酮戊二酸, 枯草芽孢杆菌可以产生约 60 μ g/g 的 α -酮戊二酸, 其余菌株未检测到 α -酮戊二酸。故后续选择枯草芽孢杆菌作为发酵菌株 (图 2)。

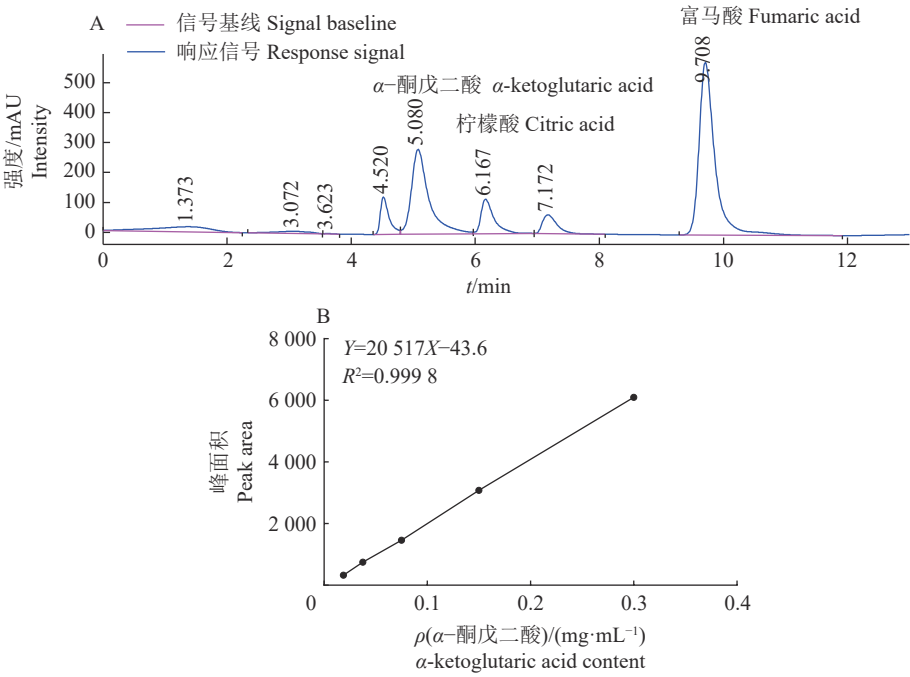


图 1 α -酮戊二酸标准品峰图 (A) 及质量浓度与峰面积线性关系 (B)

Fig. 1 The standard peak plot (A) of α -ketoglutarate and linear relationship between mass concentration and peak area (B)

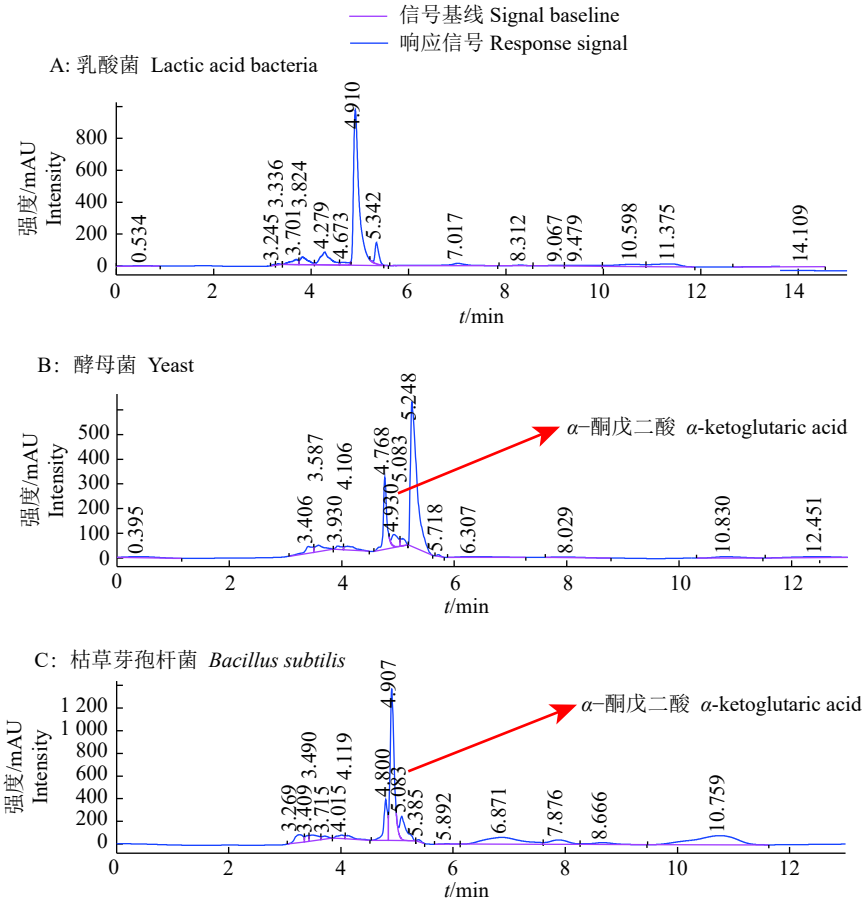


图 2 不同菌株固态发酵产物色谱峰图

Fig. 2 Chromatographic peaks of products from different strains in solid fermentation

2.2 琥珀酸对枯草芽孢杆菌固态发酵产生 α -酮戊二酸的影响

筛选出枯草芽孢杆菌后, 进一步通过代谢物

(琥珀酸) 调控其发酵过程, 使枯草芽孢杆菌在固态发酵模式中过量积累 α -酮戊二酸。结果发现, 随着琥珀酸添加量的增高, 枯草芽孢杆菌发酵累积的

α -酮戊二酸含量逐渐上升, 但当添加琥珀酸的质量分数达到 0.8% 以上, α -酮戊二酸含量达到平稳。添加质量分数为 1.0% 的琥珀酸时, α -酮戊二酸的产出率可以达到 0.3%(w)(图 3、图 4)。

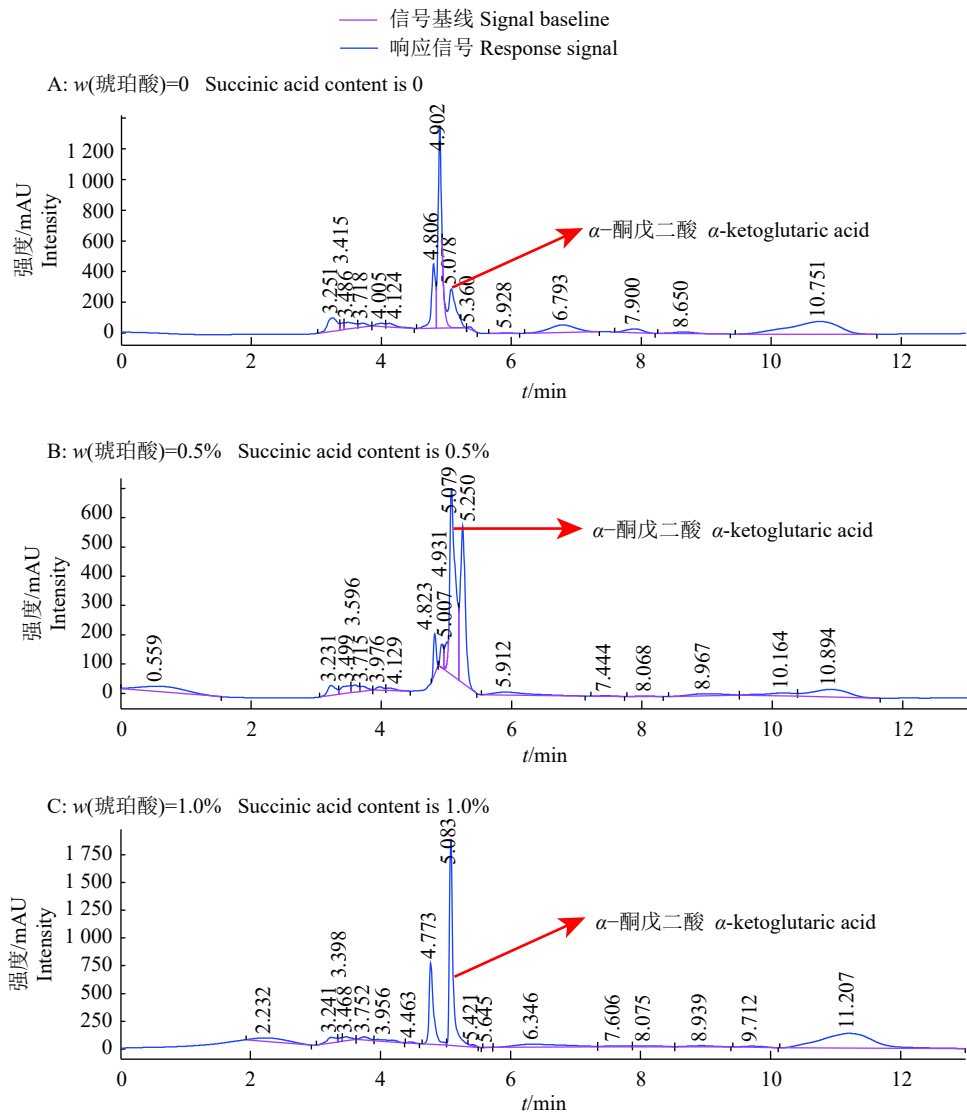


图 3 枯草芽孢杆菌固态发酵添加不同含量琥珀酸的发酵产物色谱峰图

Fig. 3 Chromatographic peaks of fermentation products from *Bacillus subtilis* in solid fermentation with addition of different contents of succinic acid

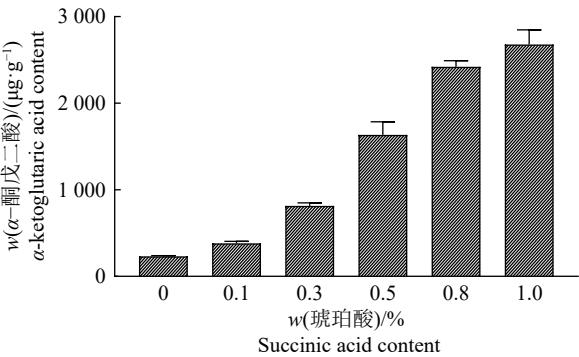


图 4 琥珀酸对枯草芽孢杆菌固态发酵生产 α -酮戊二酸的影响

Fig. 4 Effect of succinic acid on production of α -ketoglutaric acid by *Bacillus subtilis* in solid fermentation

2.3 日粮添加富含 α -酮戊二酸发酵物对小鼠生长的影响

与对照组相比, 日粮添加质量分数为 5% 的富含 α -酮戊二酸发酵物有降低小鼠体质量和体质量增加的趋势 (图 5)。

由图可知, 与对照组相比, 日粮添加质量分数为 5% 的富含 α -酮戊二酸发酵物能显著增加小鼠的肌肉含量 (图 6A) 及比目鱼肌指数 (图 6C), 显著降低小鼠的褐色脂肪指数 (图 6D), 对其他肌肉、脂肪指数无显著影响 (图 6B、6E、6F)。

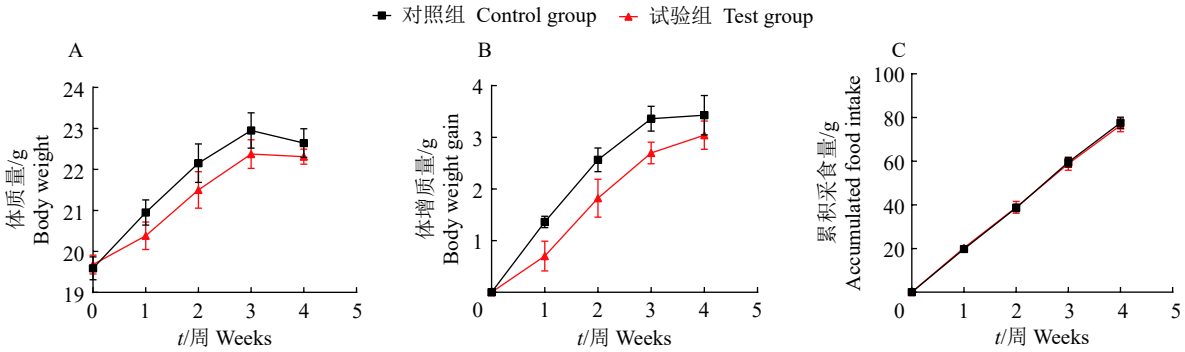
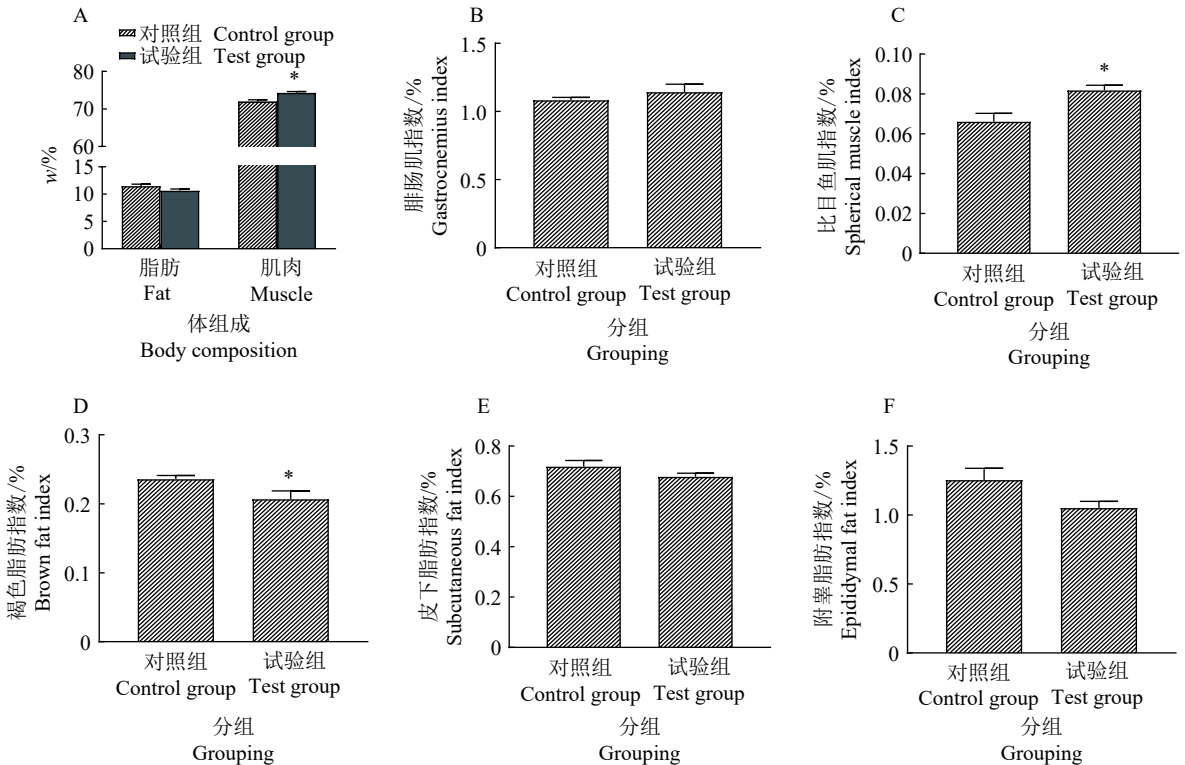


图 5 不同发酵物对小鼠生长的影响

Fig. 5 Effects of different ferments on the growth of mice



“*”表示与对照组差异显著 ($P<0.05$, t 检验)

“*” indicates significant difference from the control group ($P<0.05$, t test)

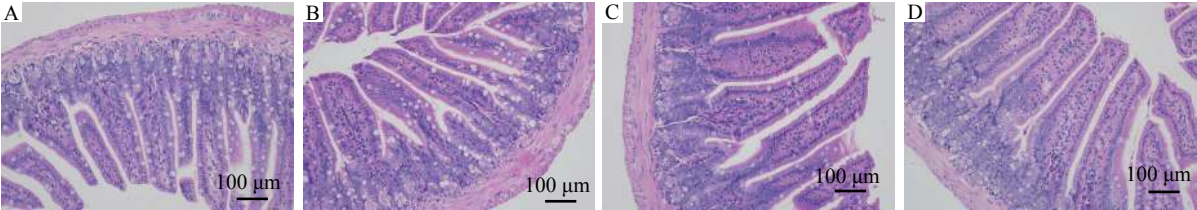
图 6 不同发酵物对小鼠体组成的影响

Fig. 6 Effects of different ferments on the body composition of mice

2.4 日粮添加富含 α -酮戊二酸发酵物对小鼠肠道形态的影响

含 α -酮戊二酸发酵物对小鼠回肠和空肠的绒毛长度与隐窝深度无显著影响 (图 7、图 8)。

与对照组相比,日粮添加质量分数为 5% 的富



A 和 B 分别是对照组和试验组的回肠, C 和 D 分别是对照组和试验组的空肠

A and B are ileums of control group and test group respectively, C and D are jejunums of control group and test group respectively

图 7 显微观察饲喂不同发酵物小鼠的肠道形态

Fig. 7 Intestinal morphology of mice fed different ferments under microscope

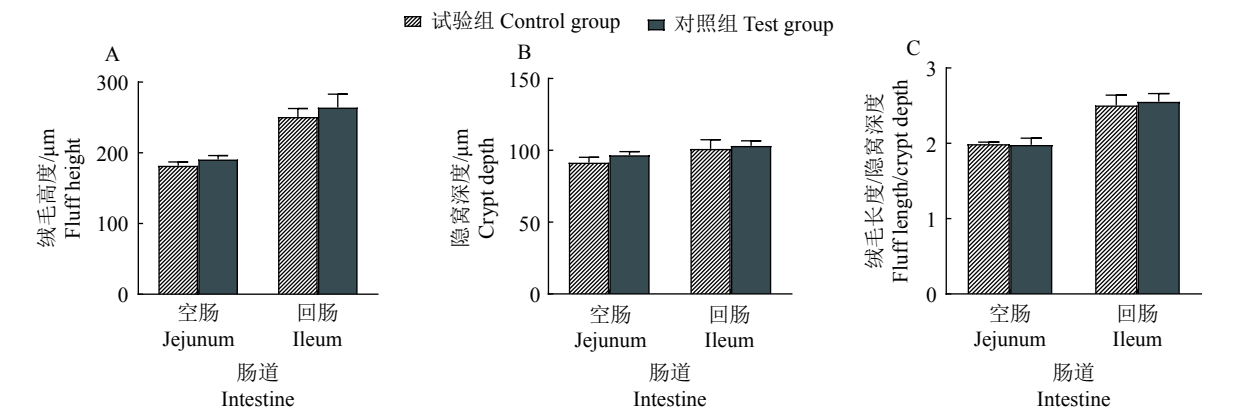


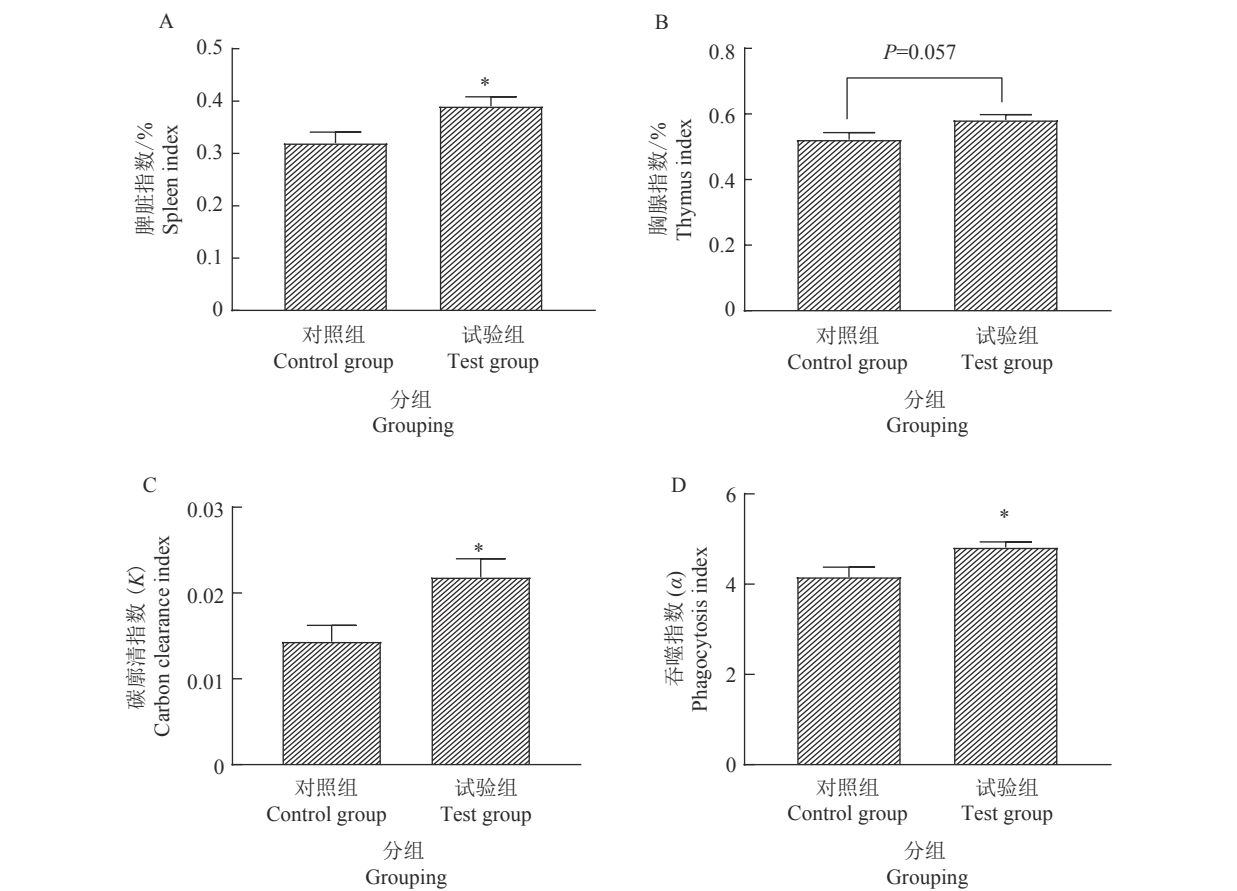
图 8 不同发酵物对小鼠肠道形态的影响

Fig. 8 Effects of different ferments on intestinal morphology of mice

2.5 日粮添加富含 α -酮戊二酸发酵物对小鼠免疫机能的影响

脾脏和胸腺是免疫系统中重要的免疫器官。与对照组相比，日粮添加质量分数为 5% 的富含 α -酮

戊二酸发酵物能显著增加小鼠脾脏指数 (图 9A)，有增加胸腺指数的趋势 (图 9B)，能显著增加小鼠单核-巨噬细胞的吞噬功能 (图 9C、9D)。



“*” 表示与对照组差异显著 ($P<0.05$, t 检验)

“*” indicates significant difference from the control group ($P<0.05$, t test)

图 9 不同发酵物对小鼠免疫器官指数的影响

Fig. 9 Effects of different fermentation products on immune organ indexes in mice

进一步检测小鼠血象发现，日粮添加质量分数为 5% 的富含 α -酮戊二酸发酵物能显著降低小鼠血液中性粒细胞百分率，显著提高小鼠血液中淋

巴细胞百分率和红细胞平均血红蛋白质量浓度 (表 1)。

表 1 不同发酵物产物对小鼠血常规的影响

Table 1 Effects of different fermentation products on blood routine in mice

检测项目 Test item	对照组 Control group	试验组 ¹⁾ Test group
白细胞总数/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$) White blood cell count	7.442 $\pm$ 1.343	7.642 $\pm$ 0.805
嗜碱性粒细胞百分率/% Percentage of basophils	0.600 $\pm$ 0.167	0.480 $\pm$ 0.160
嗜酸性粒细胞百分率/% Percentage of eosinophils	1.820 $\pm$ 0.397	1.560 $\pm$ 0.320
中性粒细胞百分率/% Percentage of neutrophils	24.320 $\pm$ 0.694	22.240 $\pm$ 0.599*
淋巴细胞百分率/% Percentage of lymphocytes	73.240 $\pm$ 0.869	75.700 $\pm$ 0.827*
单核细胞百分率/% Percentage of monocytes	1.912 $\pm$ 0.084	1.940 $\pm$ 0.062
红细胞计数/($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$) Red blood cell count	9.758 $\pm$ 0.569	9.514 $\pm$ 0.218
ρ (血红蛋白)/($g \cdot L^{-1}$) Hemoglobin content	142.000 $\pm$ 5.967	141.000 $\pm$ 3.033
红细胞平均体积/fL Mean corpuscular volume	51.780 $\pm$ 1.314	51.200 $\pm$ 0.593
红细胞平均血红蛋白质量/pg Mean erythrocyte hemoglobin mass	14.580 $\pm$ 0.293	14.840 $\pm$ 0.206
红细胞平均血红蛋白质量浓度/($g \cdot L^{-1}$) Mean erythrocyte hemoglobin content	281.800 $\pm$ 3.763	289.600 $\pm$ 3.382*
红细胞分布宽度/% Red blood cell distribution width	16.340 $\pm$ 1.848	15.620 $\pm$ 0.487
红细胞压积/% Hematocrit	50.460 $\pm$ 2.098	48.680 $\pm$ 1.225
血小板计数/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$) Platelet count	936.000 $\pm$ 113.680	960.400 $\pm$ 100.661
平均血小板体积/fL Mean platelet volume	6.000 $\pm$ 0.141	6.080 $\pm$ 0.133
血小板分布宽度/% Platelet distribution width	15.200 $\pm$ 0.110	15.140 $\pm$ 0.102
血小板比积/% Platelet specific volume	0.561 $\pm$ 0.067	0.586 $\pm$ 0.063

1) “*” 表示与对照组差异显著($P<0.05$, t 检验)
1) “*” indicates significant difference from the control group ($P<0.05$, t test)

3 讨论与结论

3.1 琥珀酸对枯草芽孢杆菌发酵过程中 α -酮戊二酸累积的影响

微生物代谢过程中,代谢酶失活、维生素辅酶缺失或碳氮比例失衡均可以造成特定代谢底物的累积。硫胺素是丙酮酸脱氢酶和 α -酮戊二酸脱氢酶的辅因子,因此硫胺素是菌株积累 α -酮戊二酸的关键因素^[10]。当硫胺素缺乏时,丙酮酸脱氢酶和 α -酮戊二酸脱氢酶的活力就受到了限制,从细胞外流入三羧酸循环中的碳源物质只能部分氧化成丙酮酸和 α -酮戊二酸,从而过量积累三羧酸循环中间代谢产物^[11]。此外,还有研究通过控制环境中的碳氮比使 α -酮戊二酸得到累积。最早研究发现,在培养基中碳源、氮源含量比例为 40:1~400:1 时,原核微生物可以利用 100 g/L 葡萄糖积累 16~17 g/L α -酮戊二酸^[12]。随后也有研究表明,不同的碳氮比会对发酵产物的累积和种类有着重要的影响,过量的碳源和限量的氮源(C:N=40:1~400:1)会使 α -酮戊二酸过量累积,低浓度的 (NH₄)₂SO₄ 会使菌体的生长受到限制,此时发酵产物主要是柠檬酸而不是 α -酮戊二酸。提高 (NH₄)₂SO₄ 浓度以后,此时主要的发酵产物变化为 α -酮戊二酸,同时柠檬酸的产量受到限制^[11]。但上述调控措施主要应用于液体发酵,关于固态发酵提高 α -酮戊二酸的技术方

案尚不明确。本研究发现,在固态发酵过程中,添加琥珀酸可以使 α -酮戊二酸得到累积。随着琥珀酸添加量的增加, α -酮戊二酸的产出率逐渐增加,最多可达 0.3%。产出率相比液体发酵还有一定的差距,这可能也和高剂量琥珀酸具有一定的抑菌活性有关。而且,我们在发酵产物中没有检测到琥珀酸。这提示外源添加的琥珀酸或已经被菌株彻底代谢利用。

3.2 靶向 α -酮戊二酸固态发酵物对小鼠肠道健康的影响

在生产中,有诸多因素(如早期断奶、感染和炎症等)可导致肠道损伤和功能障碍,肠道的不健康会造成动物腹泻、生长缓慢、甚至死亡,导致大量的经济损失^[13-14]。有研究表明,通过营养调节可以改善动物的肠道损伤^[15]。而谷氨酸和谷氨酰胺(α -酮戊二酸的代谢产物)是动物正常采食条件下肠黏膜细胞的主要能量来源,据报道称外源添加 α -酮戊二酸可以在许多动物组织中转化为谷氨酸和谷氨酰胺^[16]。此外, α -酮戊二酸氧化提供的大量 ATP 能调节小肠中的细胞氧化代谢, α -酮戊二酸还可通过肠细胞中的支链氨基酸转氨酶促进支链氨基酸的分解代谢。有大量研究发现,日粮中添加 α -酮戊二酸可改善被内毒素攻击仔猪的小肠黏膜形态和功能^[17-18]。肠道绒毛高与隐窝深度的比值升高可增强动物的消化吸收功能,提高动物的生长性能。饲喂 α -酮戊

二酸固态发酵物后, 对小鼠的回肠和空肠进行了 HE 染色, 结果显示, 饲喂 4 周 α -酮戊二酸固态发酵物, 对小鼠回肠和空肠的绒毛长度与隐窝深度无显著影响。分析其原因可能是固态发酵物所含成分复杂, 可能已经存在改善肠道健康的其他代谢物或游离氨基酸。

3.3 靶向 α -酮戊二酸固态发酵物对小鼠免疫机能的影响

机体免疫防御受到体内各种生理因素的调节, 最近有研究指出, 三羧酸循环代谢产物在控制单核细胞或巨噬细胞的表型和效应功能中发挥着重要作用, 而特定的巨噬细胞活化或极化状态在功能上决定了对每种代谢物的相对利用。三羧酸循环代谢产物中的 α -酮戊二酸是谷氨酰胺和谷氨酸的重要来源, 而谷氨酸或谷氨酰胺是巨噬细胞和中性粒细胞的重要原料^[19], 巨噬细胞和中性粒细胞参与机体早期的非特异性免疫反应, α -酮戊二酸作为谷氨酸和谷氨酰胺的前体, 对机体的免疫防御发挥着重要作用。本研究发现, 饲喂 α -酮戊二酸固态发酵物能显著增加小鼠脾脏质量, 且有增加胸腺质量的趋势, 表明 α -酮戊二酸固态发酵物有利于小鼠部分免疫器官的发育。同时小鼠的碳粒廓清试验结果表明, α -酮戊二酸固态发酵物能显著增加小鼠单核-巨噬细胞的吞噬功能。对小鼠的血常规检测也发现, 饲喂 α -酮戊二酸固态发酵物能显著降低小鼠血液中的中性粒细胞百分率, 显著提高小鼠血液中淋巴细胞百分率。综上结果表明, 饲喂 α -酮戊二酸固态发酵物能够促进小鼠免疫器官的发育, 提高小鼠巨噬细胞的吞噬功能, 进而提高小鼠的免疫防御功能。

3.4 结论

枯草芽孢杆菌在固态发酵过程中添加质量分数为 1% 的琥珀酸可使 α -酮戊二酸产出率达到 0.3%(w)。日粮添加质量分数为 5% 的富含 α -酮戊二酸发酵物能显著增加小鼠肌肉质量, 降低脂肪质量, 同时能显著提高小鼠的免疫机能, 但是对小鼠肠道形态无显著影响。

参考文献:

[1] YE H S L, LAI Y N, SHANG H F, et al. Effects of glutamine supplementation on innate immune response in rats with gut-derived sepsis[J]. *Brit J Nutr*, 2004, 91(3): 423-429.

[2] 陈家顺, 苏文璇, 符晨星, 等. α -酮戊二酸的生理功能及其在动物生产中的应用[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(10): 29-38.

[3] CHEN J, SU W, KANG B, et al. Supplementation with alpha-ketoglutarate to a low-protein diet enhances amino

acid synthesis in tissues and improves protein metabolism in the skeletal muscle of growing pigs[J]. *Amino acids*, 2018, 50(11): 1525-1537.

[4] SPENCER G J, MCGRATH C J, GENEVER P G. Current perspectives on NMDA-type glutamate signalling in bone[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(6): 1089-1104.

[5] CHIN R M, FU X, PAI M Y, et al. The metabolite alpha-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR[J]. *Nature*, 2014, 510(7505): 397-401.

[6] RAIMUNDO N, BAYSAL B E, SHADEL G S. Revisiting the TCA cycle: Signaling to tumor formation[J]. *Trends Mol Med*, 2011, 17(11): 641-649.

[7] SAUER M, PORRO D, MATTANOVICH D, et al. Microbial production of organic acids: Expanding the markets[J]. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(2): 100-108.

[8] 郭洪伟, 堵国成, 周景文, 等. 微生物发酵生产 α -酮戊二酸研究进展[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(2): 141-152.

[9] 刘艳新, 刘占英, 倪慧娟, 等. 微生物发酵饲料的研究进展与前景展望[J]. *饲料博览*, 2017(2): 15-22.

[10] MORGUNOV I G, KAMZOLOVA S V, PEREVOZNIKOVA O A, et al. Pyruvic acid production by a thiamine auxotroph of *Yarrowia lipolytica*[J]. *Process Biochem*, 2004, 39(11): 1469-1474.

[11] CHERNYAVSKAYA O G, SHISHKANOVA N V, IL'CHENKO A P, et al. Synthesis of alpha-ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 53(2): 152-158.

[12] LOCKWOOD L B, STODOLA F H. Preliminary studies on the production of alpha-ketoglutaric acid by *Pseudomonas fluorescens*[J]. *J Biol Chem*, 1946, 164(1): 81-83.

[13] LIU Y, HUANG J, HOU Y, et al. Dietary arginine supplementation alleviates intestinal mucosal disruption induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in weaned pigs[J]. *Br J Nutr*, 2008, 100(3): 552-560.

[14] BERGEN W G, WU G. Intestinal nitrogen recycling and utilization in health and disease[J]. *J Nutr*, 2009, 139(5): 821-825.

[15] FLYNN N E, BIRD J G, GUTHRIE A S. Glucocorticoid regulation of amino acid and polyamine metabolism in the small intestine[J]. *Amino acids*, 2009, 37(1): 123-129.

[16] KRISTENSEN N B, JUNGVID H, FERNANDEZ J A, et al. Absorption and metabolism of alpha-ketoglutarate in growing pigs[J]. *J Anim Physiol Ani N*, 2002, 86(7/8): 239-245.

[17] HOU Y, YAO K, WANG L, et al. Effects of alpha-ketoglutarate on energy status in the intestinal mucosa of weaned piglets chronically challenged with lipopolysaccharide[J]. *Br J Nutr*, 2011, 106(3): 357-363.

[18] HOU Y, WANG L, DING B, et al. Dietary alpha-ketoglutarate supplementation ameliorates intestinal injury in lipopolysaccharide-challenged piglets[J]. *Amino acids*, 2010, 39(2): 555-564.

[19] PARRY-BILLINGS M, EVANS J, CALDER P C, et al. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns[J]. *Lancet*, 1990, 336(8714): 523-525.