(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116671577 A
(43)申请公布日 2023.09.01

(21)申请号 202310723680.9

(22)申请日 2023.06.16

(71)申请人 武汉市农业科学院
地址 430070 湖北省武汉市洪山区青菱乡张家湾特1号

(72)发明人 张立强 何弯弯 王湛昌 魏朝辉 邓平 刘鹿忆 易沭远 唐永国 丁桂珍

(74)专利代理机构 武汉同誉知识产权代理有限公司 42320
专利代理师 于福

(51)Int.Cl.
A23K 10/37(2016.01)
A23K 50/80(2016.01)
B01D 11/02(2006.01)

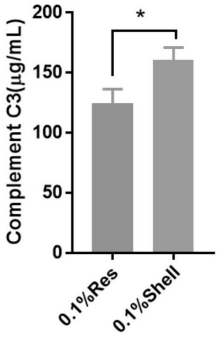
权利要求书1页 说明书9页 附图6页

(54)发明名称

一种提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂及其应用

(57)摘要

本发明属于饲料添加剂技术领域，尤其涉及一种提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂及其应用。饲料添加剂的提取方法包括以下步骤：S1、粉碎牡丹籽壳，加入30-70％乙醇溶液，在料液比1:10-50、温度30-70℃条件下超声提取10-30min;S2，将提取液装入到HPD100大孔吸附树脂中，用3-8倍柱体积的30-70％乙醇溶液洗脱，收集洗脱液，减压浓缩，得到饲料添加剂。本发明以牡丹籽壳作为原料、通过醇提和大孔树脂纯化得到饲料添加剂，其芪类含量丰富，有效组分多，功效丰富，添加至饲料中喂养鱼类时能有效提高鱼类抗氧化能力和非特异性免疫力，大大增强养殖动物的抗病能力，在动物养殖生产实践中具有良好的应用前景。



CN 116671577 A

1.一种提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂,其特征在于,所述饲料添加剂的提取方法包括以下步骤:

S1、称取一定量粉碎牡丹籽壳,加入30-70%乙醇溶液,在料液比1:10-50、温度30-70℃条件下超声提取10-30min;

S2,将步骤S1中的提取液装入到HPD100大孔吸附树脂中,用3-8倍柱体积的30-70%乙醇溶液洗脱,收集洗脱液,减压浓缩,得到饲料添加剂。

2.根据权利要求1所述的提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂,其特征在于,步骤S1中,加入40-60%乙醇溶液,在料液比1:20-40、温度50-70℃条件下超声提取25-30min。

3.根据权利要求2所述的提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂,其特征在于,步骤S1中,加入50%乙醇溶液,在料液比1:20、温度70℃条件下超声提取30min。

4.根据权利要求1所述的提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂,其特征在于,步骤S1中,超声提取时超声波功率为2200-3500W。

5.根据权利要求1所述的提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂,其特征在于,步骤S2中,所述提取液的芪类化合物浓度为0.2-0.3mg/mL,上样量为柱体积的40-60%。

6.根据权利要求1所述的提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂,其特征在于,步骤S2中,用5倍柱体积的60%乙醇溶液洗脱。

7.如权利要求1-6任一项所述的提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂在制备鱼类饲料中的应用。

8.根据权利要求7所述的提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂在制备鱼类饲料中的应用,其特征在于,所述饲料添加剂的添加量占所述饲料质量的0.1%-1%。

9.根据权利要求7所述的提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂,其特征在于,所述鱼类包括鲫鱼。

一种提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及饲料添加剂技术领域，特别涉及一种提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂及其应用。

背景技术

[0002] 关于抗生素和激素类化学合成药品的不合理使用所造成的动物产品药物残留、病原菌耐药性及环境污染等问题，严重制约着我国水产养殖业的绿色可持续发展。近年来饲料业发展突飞猛进，绿色环保无抗饲料添加剂的研发及使用引起广泛关注。饲料添加剂具有改善饲料的适口性，提高动物生产性能，促进动物生长发育，提高畜产品质量，增强机体抗病力，利于饲料加工、运输及储藏等作用。

[0003] 为促进养殖鱼类快速生长，养殖户常常会过度投喂饲料，或者采用高蛋白、高油脂、高能量的饲料，但应用三高饲料会导致鱼类氧化应激损伤、免疫力低下等，进而引起病害频发、死亡率增加和生长减缓等不利局面的发生。添加抗氧化剂类饲料添加剂可以一定程度上解决饲料的氧化问题。目前，抗氧化剂的来源主要有两种途径：一种是合成抗氧化剂，另一种是天然抗氧化剂。合成抗氧化剂具有较大的毒副作用，研究证明，各种植物、中草药的提取物是较好的抗氧化剂，天然抗氧化剂具有改善机体营养代谢、增强免疫功能、提高生产性能、预防疾病、改良畜产品品质、减少动物源性食品污染等作用。

[0004] 目前，已经从多种天然植物中提取出了多种抗氧化剂，如从桑树中提取白藜芦醇，马齿苋中提取总黄酮等，一方面前述物质的提取成本较高，另一方面前述抗氧剂虽具有良好的抗氧化能力，但对提高鱼类免疫力的效果差强人意，因此，开发应用效果确实、功能多样、毒副作用小且成本低廉天然抗氧化剂具有广阔的应用前景。

[0005] 牡丹籽壳是牡丹籽油生产过程中的副产物，作为一种重要的天然产物资源牡丹籽壳并没有得到合理的开发利用，大量废弃造成了环境污染和资源浪费。对牡丹籽壳的开发利用，将其作为一种优良的鱼类添加剂进行应用，可以变废为宝，实现多赢局面。

发明内容

[0006] 针对现有技术中的上述问题，本发明提供了一种提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂及其应用，通过以牡丹籽壳作为原料、通过醇提和大孔树脂纯化得到的饲料添加剂，能有效提高鱼类抗氧化能力和非特异性免疫力，在动物养殖生产实践中具有良好的应用前景。

[0007] 为实现上述目的，本发明具体通过以下技术方案实现：

[0008] 本发明第一方面提供了一种提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂，所述饲料添加剂以牡丹籽壳作为原料、通过醇提和大孔树脂纯化得到，所述饲料添加剂的提取方法包括以下步骤：

[0009] S1、称取一定量粉碎牡丹籽壳，加入30-70％乙醇溶液，在料液比1:10-50、温度30-70℃条件下超声提取10-30min；

[0010] S2，将步骤S1中的提取液装入到HPD100大孔吸附树脂中，用3-8倍柱体积的30-70％乙醇溶液洗脱，收集洗脱液，减压浓缩，得到饲料添加剂。

[0011] 进一步地，步骤S1中，加入40-60％乙醇溶液，在料液比1:20-40、温度50-70℃条件下超声提取25-30min。

[0012] 更进一步地，步骤S1中，加入50％乙醇溶液，在料液比1:20、温度70℃条件下超声提取30min。

[0013] 进一步地，步骤S1中，超声提取时超声波功率为2200-3500W。

[0014] 进一步地，步骤S2中，所述提取液的芪类化合物浓度为0.2-0.3mg/mL，上样量为柱体积的40-60％。

[0015] 进一步地，步骤S2中，用5倍柱体积的60％乙醇溶液洗脱。

[0016] 本发明第二方面提供了如上所述的提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂在制备鱼类饲料中的应用。

[0017] 进一步地，所述饲料添加剂的添加量占所述饲料质量的0.1％-1％。

[0018] 进一步地，所述鱼类包括鲫鱼。

[0019] 本发明的优点及积极效果为：

[0020] 1、本发明以牡丹籽壳作为原料、通过醇提和大孔树脂纯化得到饲料添加剂，饲料添加剂中芪类含量丰富，有效组分较多，功效丰富，添加至饲料中喂养鱼类时能有效提高鱼类肝脏的抗氧化能力，抑制脂质过养化反应，并能有效提高鱼类的非特异性免疫力，大大增强养殖动物的抗病能力，促进其健康的生长，在动物养殖生产实践中具有良好的应用前景。

[0021] 2、本发明的饲料添加剂提取工艺简单，操作便捷，适宜进行工业化生产。

附图说明

[0022] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案，下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单的介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0023] 图1为本发明实施例不同乙醇浓度对牡丹籽壳提取物中总芪类化合物得率的影响；

[0024] 图2为本发明实施例不同提取温度对牡丹籽壳提取物中总芪类化合物得率的影响；

[0025] 图3为本发明实施例不同料液比对牡丹籽壳提取物中总芪类化合物得率的影响；

[0026] 图4为本发明实施例不同超声时间对牡丹籽壳提取物中总芪类化合物得率的影响；

[0027] 图5为本发明实施例添加不同质量牡丹籽壳提取物后对鲫鱼血清补体C3含量的影响；

[0028] 图6为本发明实施例添加不同质量牡丹籽壳提取物后对鲫鱼血清溶菌酶含量的影响；

[0029] 图7为本发明实施例添加不同质量牡丹籽壳提取物后对鲫鱼肝脏过氧化氢酶含量的影响；

[0030] 图8为本发明实施例添加不同质量牡丹籽壳提取物后对肝脏丙二醛含量的影响；

[0031] 图9为本发明实施例添加不同质量牡丹籽壳提取物后对鲫鱼肝脏组织的影响，其中图A-D分别为对照组、添加1％牡丹籽壳提取物、添加0.5％牡丹籽壳提取物、添加0.1％牡丹籽壳提取物后对鲫鱼肝脏组织的影响，图中红色箭头指示红细胞，黑色箭头指示炎症细胞，蓝色箭头指示肝血窦，棕色箭头指示少量色素沉积；

[0032] 图10为本发明实施例分别添加0.1％的白藜芦醇和牡丹籽壳提取物后对鲫鱼血清补体C3含量的影响，图中，Res代表白藜芦醇，Shell代表牡丹籽壳提取物；

[0033] 图11为本发明实施例分别添加0.1％的白藜芦醇和牡丹籽壳提取物对鲫鱼血清溶菌酶含量的影响，图中，Res代表白藜芦醇，Shell代表牡丹籽壳提取物；

[0034] 图12为本发明实施例分别添加0.1％的白藜芦醇和牡丹籽壳提取物对鲫鱼肝脏过氧化氢酶含量的影响，图中，Res代表白藜芦醇，Shell代表牡丹籽壳提取物；

[0035] 图13为本发明实施例分别添加0.1％的白藜芦醇和牡丹籽壳提取物后对肝脏丙二醛含量的影响，图中，Res代表白藜芦醇，Shell代表牡丹籽壳提取物。

具体实施方式

[0036] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合实施例对本发明进行进一步详细说明。此处所描述的实施例仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[0037] 根据本发明包含的信息，对于本领域技术人员来说可以轻而易举地对本发明的精确描述进行各种改变，而不会偏离所附权利要求的精神和范围。应该理解，本发明的范围不局限于所限定的过程、性质或组分，因为这些实施方案以及其他的描述仅仅是为了示意性说明本发明的特定方面。实际上，本领域或相关领域的技术人员明显能够对本发明实施方式作出的各种改变都涵盖在所附权利要求的范围内。

[0038] 为了更好地理解本发明而不是限制本发明的范围，在本发明中所用的表示用量、百分比的所有数字、以及其他数值，在所有情况下都应理解为以词语“大约”所修饰。因此，除非特别说明，否则在说明书和所附权利要求书中所列出的数字参数都是近似值，其可能会根据试图获得的理想性质的不同而加以改变。各个数字参数至少应被看作是根据所报告的有效数字和通过常规的四舍五入方法而获得的。另外，术语“包括”、“包含”、“含有”、“具有”等类似词语的含义是非限制性的，即可加入不影响结果的其它步骤和其它成分。

[0039] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更为明显易懂，下面结合附图对本发明的具体实施例做详细说明。

[0040] 牡丹籽壳中含有一种非黄酮类的多酚化合物白藜芦醇，近年来国内外学者对其药理作用进行分析发现，白藜芦醇具有抗氧化、抗菌消炎、抗白血病、降脂和提高机体免疫力等功能。研究表明，添加1.08％的白藜芦醇能有效改善高脂胁迫团头鲂的机体应激状态，提高团头鲂的抗病力，但其激发免疫反应尤其是非特异性免疫力的能力有待提高。此外，纯化白藜芦醇的提取成本较高，限制了其在水产养殖中的广泛应用。

[0041] 基于此，本发明实施例提供了一种提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂，所述饲料添加剂以牡丹籽壳作为原料、通过醇提和大孔树脂纯化得到，具体包括以下步骤：

[0042] S1、称取一定量粉碎牡丹籽壳，加入30-70％乙醇溶液，在料液比1:10-50、温度30-70℃条件下超声提取10-30min；

[0043] S2,将步骤S1中的提取液装入到HPD100大孔吸附树脂中,用3-8倍柱体积的30-70%乙醇溶液洗脱,收集洗脱液,减压浓缩,得到总芪类化合物,即为本发明的饲料添加剂。

[0044] 本发明以经济鱼种-鲫鱼为研究对象,将饲料添加剂与饲料混合喂食鲫鱼,通过测定血清及肝脏中酶学相关指标,发现饲料中添加一定量的饲料添加剂后能有效提高肝脏的抗氧化能力,抑制脂质过养化反应,并能有效提高鲫鱼的非特异性免疫力,添加至饲料中可大大增强养殖动物的抗病能力,促进其健康的生长。相比添加同等量的白藜芦醇,本发明制备得到的饲料添加剂对补体C3含量的促进作用显著高于白藜芦醇,具有更优异的激活鱼类免疫力的作用。此外,考虑提取成本问题,提取等量的白藜芦醇的成本要远高于本发明的牡丹籽壳提取物且提取工艺更复杂,同时牡丹籽壳提取物芪类含量丰富,包括白藜芦醇、白皮杉醇、viniferin、suffruticosol A-C、suffruticosol D、gnetin H、ampelopsin E等,有效组分较多,功效更丰富,在动物养殖生产实践中具有良好的应用前景。

[0045] 本发明通过比较大孔吸附树脂HPD100、HPD400、HPD600、D101、AB-8和DM130的吸附与解吸性能,选用HPD100大孔吸附树脂进行纯化,采用该树脂具有最高的芪类化合物得率,且抗氧化和免疫激活性能更优。

[0046] 优选地,步骤S1中,加入40-60%乙醇溶液,在料液比1:20-40、温度50-70℃条件下超声提取25-30min。更优选地,加入50%乙醇溶液,在料液比1:20、温度70℃条件下超声提取30min,在此条件下总芪类化合物得率最高,每克牡丹籽壳干物质中可以提取出1.06mg的总芪类化合物。

[0047] 其中,上述所述的超声提取时超声波功率为2200-3500W,优选为2800W。

[0048] 可选地,步骤S2中,所述提取液的芪类化合物浓度为0.2-0.3mg/mL,上样量为柱体积的40-60%。在一些具体地实施方式中,所述芪类化合物浓度为0.25mg/mL,上样量为柱体积的52%,示例性地,当HPD100大孔吸附树脂柱体积为500mL时,上样量为260mL。

[0049] 优选地,步骤S2中,用5倍柱体积的60%乙醇溶液洗脱。示例性地,当HPD100大孔吸附树脂柱体积为500mL时,洗脱液为3000mL。

[0050] 本发明另一实施例提供了如上所述的提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂在制备鱼类饲料中的应用。

[0051] 所述提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂在制备鱼类饲料中的应用与如上所述的提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂相对于现有技术的优势相同,在此不再赘述。

[0052] 可以理解的是,饲料添加剂的使用量越高,抗氧化能力越强,对鱼类作用越明显,但使用量高于一定程度时,显著增加了饲料的成本,且对补体含量的增加呈现不利影响,因此,在较佳的实施方式中,所述饲料添加剂的添加量占所述饲料质量的0.1%-1%(wt),即,每100g饲料包含0.1g至1g上述所述的饲料添加剂。此时,既不显著增加成本,又能有效提高水产动物的抗氧化应激能力和非特异性免疫力。

[0053] 可选地,所述鱼类包括鲫鱼。

[0054] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照制造厂商所建议的条件。

[0055] 实施例1饲料添加剂的提取及提取条件优化

[0056] 一种提高鱼类非特异性免疫力的饲料添加剂的提取方法,具体包括以下步骤:

[0057] S1、称取一定量粉碎牡丹籽壳,加入30-70%乙醇溶液,在料液比1:10-50、温度30-

70℃条件下超声提取10-30min；

[0058] S2，采用湿法上样，调整步骤S1中提取液的芪类化合物浓度为0.25mg/mL，将260mL提取液装入到HPD100大孔吸附树脂中，其中HPD100大孔吸附树脂径高比为1:5，装柱体积500mL，上样后用5倍柱体积即3000mL的60％乙醇溶液洗脱，收集洗脱液，减压浓缩，得到总芪类化合物，即为本发明的饲料添加剂。

[0059] 分别通过单因素实验探讨步骤S1中乙醇溶液浓度、料液比、浸提温度和提取时间和步骤S2中大孔树脂种类对总芪类化合物得率的影响。

[0060] 其中，芪类化合物的测量方法包括以下步骤：准确称取一定量白藜芦醇标准品于容量瓶中定容，然后配置成浓度为0、2、4、6、8、10、12、14mg/L的标准品溶液。在306nm波长处测量溶液的吸光度数值，利用测得的数据绘制吸光度随浓度变化曲线，作为标准曲线。之后取牡丹籽壳粉末5g，在不同提取溶液、料液比、温度下超声提取不同时间，用旋转蒸发仪浓缩；称取提取物0.1g加入25mL 95％乙醇溶解，完全溶解后取1mL用乙醇定容至100mL，在306nm波长处测量溶液的吸光度数值，通过前述标准曲线计算总芪类化合物的含量。需要说明的是，306nm主要是芪类化合物骨架的吸收，因此芪类化合物在306nm波长下均具有吸光度的变化，可以通过该方法反映总芪类化合物的含量。

[0061] 1、乙醇浓度对提取得率的影响

[0062] 取牡丹籽壳粉末5.0g，加入提取溶液100mL，即料液比1:20，在浸提温度40℃、超声波功率2800W、超声时间20min条件下采用不同浓度乙醇进行提取，提取液经过滤后，浓缩定容至一定体积，然后按照上述方法测定总芪类化合物含量，结果如图1所示。

[0063] 从图中可以看出，随着乙醇浓度的增加，总芪类化合物提取得率逐渐升高，在提取浓度为50％时得率达到最大值，之后随着乙醇浓度的增加，提取得率反而大幅降低，因此，提取总芪类化合物时优选乙醇浓度为40-60％，更优选乙醇浓度为50％。

[0064] 2、温度对提取得率的影响

[0065] 取牡丹籽壳粉末5.0g，加入50％乙醇溶液100mL，即料液比1:20，在超声波功率2800W、超声时间40min条件下采用不同浸提温度进行提取，提取液经过滤后，浓缩定容至一定体积，然后按照上述方法测定总芪类化合物含量，结果如图2所示。

[0066] 从图中可以看出，提取得率随温度的上升而增加，在温度达到60℃时趋于最大值，之后维持稳定，因此，提取总芪类化合物时优选浸提温度为50-70℃。

[0067] 3、料液比对提取得率的影响

[0068] 取牡丹籽壳粉末5.0g，加入50％乙醇溶液，采用不同的料液比(w/v)，在浸提温度60℃、超声波功率2800W、超声时间40min条件下进行提取2次，提取液经过滤后，将2次提取液合并之后浓缩定容至一定体积，然后按照上述方法测定总芪类化合物含量，结果如图3所示。

[0069] 从图中可以看出，随着料液比的增加提取得率快速上升，在1:50时达到最大值。

[0070] 4、提取时间对提取得率的影响

[0071] 取牡丹籽壳粉末5.0g，加入50％乙醇溶液100mL，即料液比1:20，在浸提温度60℃、超声波功率2800W下超声提取不同时间，提取液经过滤后，浓缩定容至一定体积，然后按照上述方法测定总芪类化合物含量，结果如图4所示。

[0072] 从图中可以看出，随时间增加提取得率缓慢上升，当在25min时，总芪类化合物的

得率已基本到达最大，继续增大时间得率基本保持不变，说明芪类化合物已提取完全，而且时间越长，杂质溶出越多，因此选择25-30min为最佳提取时长。

[0073] 进一步采用正交实验，选取乙醇浓度(A)、浸提温度(B)，提取时间(C)和料液比(D)为考察因素，利用L_9四因素三水平正交表做正交实验。所用实验因素及水平如表1所示，正交实验的最终结果见表2。

[0074] 表1实验因素水平

[0075]

水平	（A）乙醇浓度	（B）温度	（C）时间	（D）料液比
1	30%	50℃	25min	1：20
2	50%	60℃	30min	1：30
3	70%	70℃	35min	1：40

[0076] 表2正交实验设计及结果

[0077]

实验号	A	B	C	D	浓度（mg/g）
1	1	1	1	1	1.00
2	1	2	2	2	0.90
3	1	3	3	3	0.89
4	2	1	3	2	0.98
5	2	2	1	3	0.78
6	2	3	2	1	1.06
7	3	1	2	3	0.60
8	3	2	3	1	1.02
9	3	3	1	2	0.70
K1	0.93	0.82	0.86	1.02	
K2	0.93	0.85	0.90	0.86	
K3	0.77	0.97	0.88	0.76	
R	0.16	0.14	0.04	0.16	

[0078] 从上述结果可知，在总芪类化合物的提取中影响其得率的因素顺序为:A＝D>B>C，即乙醇浓度＝料液比>提取温度>超声时间;直观分析可知，最佳提取工艺为A2B3C2D1，即50％乙醇，提取温度70℃，超声时间30min，料液比1:20。在此条件下总芪类化合物得率可达1.06mg/g。

[0079] 5、大孔树脂对提取效果的影响

[0080] 在最佳提取条件下，采用6种大孔树脂上样吸附芪类化合物，静态下的吸附与解吸性能结果见表3。

[0081] 表3 6种树脂静态下对芪类化合物的吸附与解吸性能

[0082]

树脂型号	极性	静态比吸附量 mg/g	解析率%
HPD100	非极性	17.23	88.37
D101	非极性	17.65	74.43
AB-8	弱极性	14.28	82.39
HPD400	中极性	12.34	78.05
DM130	中极性	14.61	87.67
HPD 600	极性	16.25	87.04

[0083] 从表3可知，HPD100树脂的静态比吸附量和解析率都较高，能回收更多的总芪类。综合考虑，本试验选择HPD100树脂进行纯化。

[0084] 实施例2饲料添加剂对鱼类非特异性免疫力的影响

[0085] 1、试验材料

[0086] 本实验对象鲫鱼来自武汉市农业集团蔡甸基地渔场。

[0087] 饲料以商用膨化饲料(购自购自厦门嘉盛饲料有限公司0号鲫鱼配合饲料)为原料，使用粉碎机(DF-35，温岭市林大机械有限公司)进行粉碎，随后过20目筛网，再选取颗粒均匀的、无结块的粒质饲料经双螺旋制粒机(SLR-45，中国水产科学院渔业机械研究所)挤压成粒径1.5mm的颗粒饲料，60℃烘干2h，制成沉性饲料，冷却后室温保存。使用预糊化淀粉将饲料添加剂与饲料进行混合，具体步骤如下：分别称取100g饲料、2g预糊化淀粉放入塑料皿中，上下颠倒摇匀，随后加入相应的添加剂(添加量和分组如表4所示)，再次摇匀，然后拿取喷壶，边翻滚边喷水，均匀的喷洒在饲料上，使得饲料与饲料添加剂在预糊化淀粉的作用在粘合在一起，最后放入烘箱，42℃进行烘干，几个小时后进行翻匀一次，直至水分完全烘干，饲料完全变硬，进行喂食。以不添加饲料添加剂(采用清水替代)作为对照组。

[0088] 表4实验分组设计

[0089]

实验组	处理类型
对照	清水（空白对照）
牡丹籽壳提取物（饲料添加剂）	1%（占饲料百分比）
	0.5%（占饲料百分比）
	0.1%（占饲料百分比）

[0090] 牡丹籽壳提取物(饲料添加剂)具体制备过程包括：称取一定量粉碎牡丹籽壳，加入50％乙醇水溶液，在料液比1:20、温度70℃条件下提取30min，得到提取液；之后采用HPD100大孔树脂进行纯化，采用湿法上样，调整提取液的芪类化合物浓度为0.25mg/mL，将260mL提取液装入到HPD100大孔吸附树脂中，其中HPD100大孔吸附树脂径高比为1:5，装柱体积500mL，上样后用5倍柱体积即3000mL的60％乙醇溶液洗脱，收集洗脱液，减压浓缩，得到总芪类化合物，包括白藜芦醇、白皮杉醇、viniferin、suffruticosol A-C、suffruticosol D、gnetin H、ampelopsin E等，即为本发明的饲料添加剂。

[0091] 2、试验方法

[0092] 选取70尾规格均匀，表观健康活波的鱼放入各个实验缸(体积102L)，每缸5条，设

计实验分组(见表1),然后进行喂食实验。喂食方法采用武汉市农科院水产科学研究所中心实验室养殖系统进行鲫鱼喂食实验,每3天换一次水,采取自然光照,水温15℃左右,每日投喂2次(9:00和17:00),采取饱食投喂策略。喂食约2月左右进行取样,取样前,禁食12h。

[0093] 3、对鲫鱼非特异性免疫力影响的指标测定

[0094] 3.1、血清酶学指标测定

[0095] 每个处理组中随机挑取3尾鲫鱼,使用1mL注射器在尾部进行静脉采血。采取的血样在室温静置2h后转入4℃冰箱静置过夜。次日,4℃、3500rpm离心5min,收集血液上清,置于-80℃保存。按照试剂盒步骤,采用免疫浊度法测定血清补体C3含量,采用比浊法测定血清溶菌酶(LZM)活性。

[0096] 3.2、肝脏酶学指标测定

[0097] 每个处理组中随机挑取3尾鲫鱼,用剪刀沿着体测线处剪开,取适量肝脏组织立即置于1.5mL离心管,于液氮中进行速冻,2h后转入-80℃冰箱进行保存。按照试剂盒的步骤,采用钼酸铵法测定肝脏过氧化氢酶(CAT)活性,再用TBA(Thibabituric Acid,硫代巴比妥酸)法测定肝脏丙二醛(MDA)含量。

[0098] 3.3、肝脏病理学观察

[0099] 每个处理组中随机挑取3尾鲫鱼,用剪刀沿着体测线处剪开,取出小块肝脏组织立即置于4%多聚甲醛,室温固定24h以上。随后,从固定液中取出肝脏组织,在通风橱中使用手术刀进行修整,放入脱水盒中。组织块经梯度酒精-二甲苯脱水、石蜡包埋后切成4μm薄片。载玻片捞起薄片后置于60℃烘箱烘干。切片经二甲苯-梯度酒精-水洗涤后,苏木素染细胞核、伊红染细胞质,最后将切片经梯度酒精-二甲苯脱水和透明,中性树胶封片。使用Pannoramic midi型全自动数字切片扫描系统拍摄肝脏组织,放大20倍进行肝脏组织观察。

[0100] 采用GraphPad Prism7和SPSS19.0软件进行图表绘制和数据分析,组间比较采用独立样本t检验,***代表P<0.001,**代表P<0.01,*代表P<0.05,数据处理结果分别见图5-8。图5-8分别为添加不同质量饲料添加剂后对鲫鱼血清补体C3、血清溶菌酶(LZM)、肝脏过氧化氢酶(CAT)和肝脏丙二醛(MDA)含量的影响。

[0101] 从图5-8中可以看出,与对照组相比,在饲料中添加1%、0.5%、0.1%的牡丹籽壳提取物喂食约2个月后,补体C3含量有所增加但增加不显著,LZM酶和CAT酶的活性出现显著性的增高,当喂食浓度为0.5%时,LZM酶的活性最高,当喂食浓度为1%时,CAT酶的活性最高。MDA含量随着喂食浓度增加呈现显著性的下降。

[0102] 补体C3是补体激活过程中起关键性作用的一种成分,不论是经典激活途径还是替代激活途径,均需在C3被激活之后,才能推进后续补体成分的连锁反应。在本发明中发现喂食牡丹籽壳提取物对补体C3的含量没有显著性影响。LZM是广泛存在于鱼类各种的体液、血清和巨噬细胞的一种水解酶,是生物机体内重要的的非特异性免疫因子,有抗感染、增强抗生素效力、抗肿瘤和抗病毒等作用,是鱼生理防御水平的一种重要标志,可以体现病原菌及其他环境因素对鱼体健康的影响。血清及免疫器官组织的溶菌酶活性提高,其免疫力也相应提高。处理组中溶菌酶(LZM)活性均显著性高于对照组,这表明饲料中添加牡丹籽壳提取物能有效提高鲫鱼中LZM活性,从而有效地提高鲫鱼的免疫力。过氧化氢酶(CAT)又称触酶,是重要的抗氧化酶,可催化过氧化氢生成水和氧气,所以CAT活力的变化在一定程度上能反映出机体在胁迫环境下的抗氧化系统的变化。MDA则是过氧化脂质降解产物,可导致机体细

胞的损伤,其含量可反映机体内脂质过氧化程度和肝脏损伤指标。处理组中CAT酶活性显著性提高,同时MDA的含量呈现显著性下降的趋势,这表明饲料中添加牡丹籽壳提取物后能有效提高肝脏的抗氧化能力,抑制脂质过养化反应。前述结果中C3含量没有显著性变化,然而LZM及CAT酶的活性显著性提高,这说明牡丹籽壳提取物的作用方式没有显著性影响C3途径,而是主要作用于与LZM和CAT的代谢过程。

[0103] 将处理组和对照组鱼的肝脏组织进行切片观察,结果见图9。对照组中组织结构基本正常,肝实质内可见有少量炎症细胞,如黑色箭头所示;细胞较为密集,形成网状,肝细胞呈多角状;可见有少量色素沉积,如棕色箭头所示(图A)。饲喂1%、0.5%、0.1%质量占比的牡丹籽壳提取物(如图B-D所示)组织结构基本正常,红色箭头所示为肝血窦;肝细胞间质内有少量炎症浸润,如黑色箭头所示;未见肝细胞坏死变性;部分肝细胞核消失;可见有少量分泌蛋白,如橙色箭头所示;可见有少量脂肪空泡浸润,如黄色箭头所示。比较处理组和对照组的肝脏组织病理切片发现,与对照组相比,添加牡丹籽壳提取物后对肝脏组织的正常形态无显著性影响,说明本发明的饲料添加剂的毒副作用小,生物安全性高。

[0104] 进一步比较喂食0.1%的白藜芦醇和牡丹籽壳提取物后对鲫鱼血清酶活及肝脏的影响,结果见图10-13。图10-13分别为添加0.1%的白藜芦醇和本发明饲料添加剂(牡丹籽壳提取物)后对鲫鱼血清补体C3、血清溶菌酶(LZM)、肝脏过氧化氢酶(CAT)和肝脏丙二醛(MDA)含量的影响,图中,Res代表白藜芦醇,Shell代表牡丹籽壳提取物。

[0105] 从图中可以看出,喂食这两种添加剂后鲫鱼血液中LZM酶活性及肝脏中的MDA含量变化无显著性差别。而喂食含有0.1%的牡丹籽壳提取物的鲫鱼体内补体C3含量要高于喂食0.1%的白藜芦醇组而CAT酶活性却显著性下降,能有效提高鲫鱼的非特异性免疫力。考虑提取成本问题,提取0.1%的白藜芦醇的成本要远高于0.1%的牡丹籽壳提取物且提取工艺更复杂,同时牡丹籽壳提取物芪类含量丰富,有效组分较多,更适合在生产实践中应用。

[0106] 总的来说,饲料中添加0.1%-1%牡丹籽壳提取物能有效提高鲫鱼的LZM及CAT酶的活性,同时降低MDA的含量,使得鲫鱼机体抗氧化能力及非特异性免疫力得到有效提升。

[0107] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

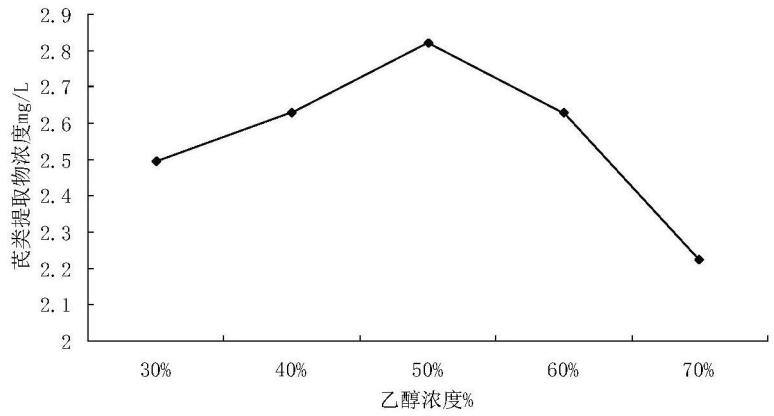

2.9
2.8
2.7
2.6
2.5
2.4
2.3
2.2
2.1
2
芪类提取物浓度mg/L
30%
40%
50%
60%
70%
乙醇浓度%

图1

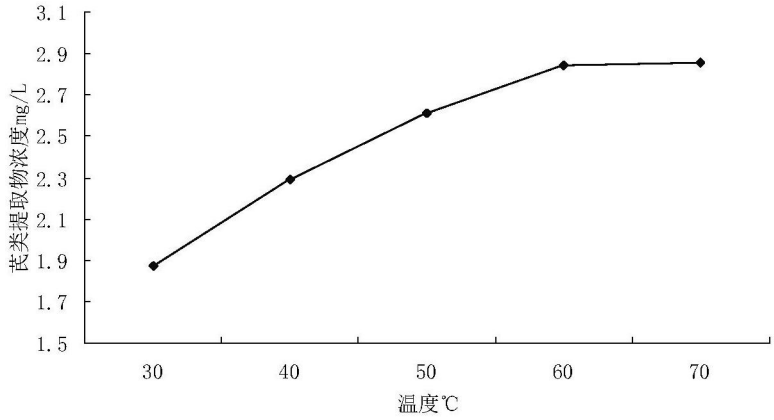

3.1
2.9
2.7
2.5
2.3
2.1
1.9
1.7
1.5
芪类提取物浓度mg/L
30
40
50
60
70
温度℃

图2

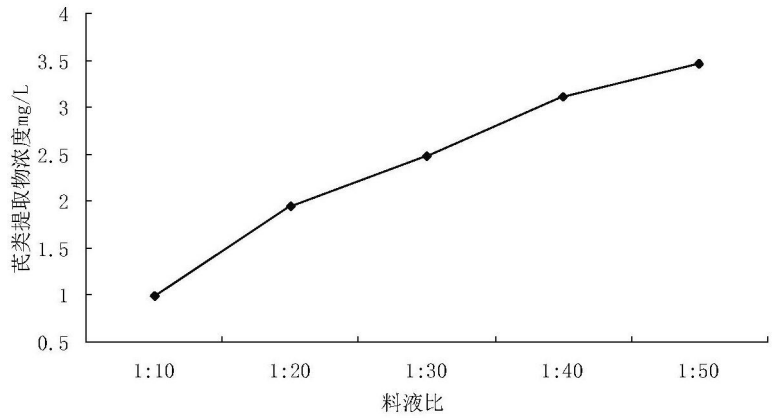

4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
芪类提取物浓度mg/L
1:10
1:20
1:30
1:40
1:50
料液比

图3

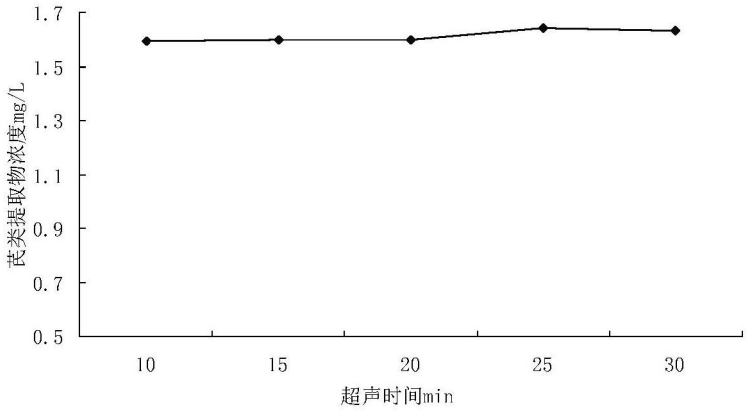

1.7
1.5
1.3
1.1
0.9
0.7
0.5
芪类提取物浓度mg/L
10
15
20
25
30
超声时间min

图4

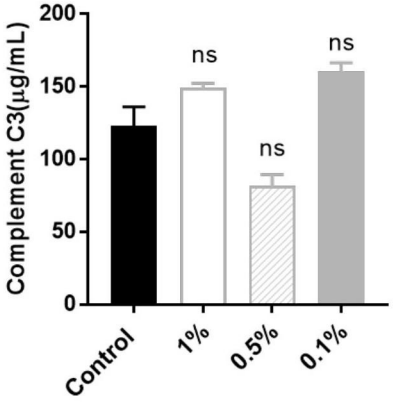

200
150
100
50
0
Complement C3(μg/mL)
ns
ns
ns
Control
1%
0.5%
0.1%

图5

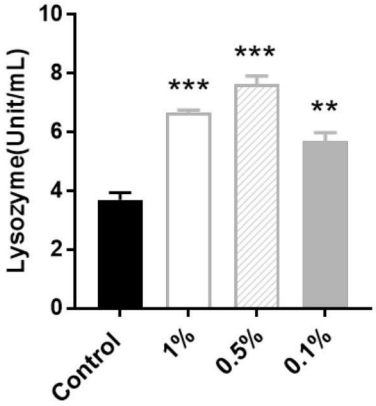

10
8
6
4
2
0
Lysozyme(Unit/mL)
***
***
**
Control
1%
0.5%
0.1%

图6

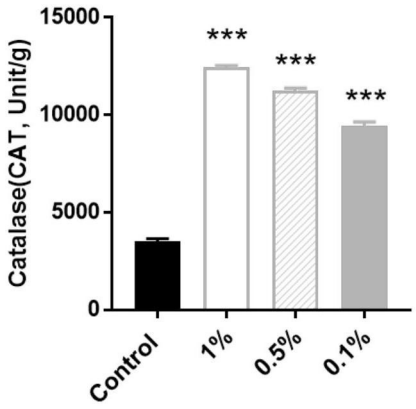

15000
10000
5000
0
Catalase(CAT, Unit/g)
***
***
***
Control
1%
0.5%
0.1%

图7

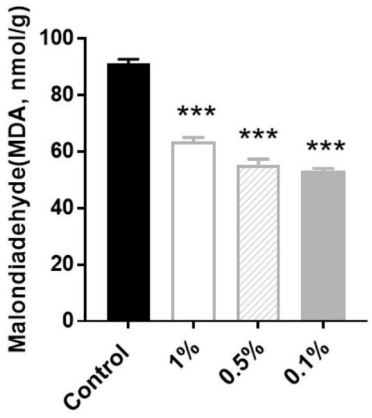

100
80
60
40
20
0
Malondiadehyde(MDA, nmol/g)
***
***
***
Control
1%
0.5%
0.1%

图8

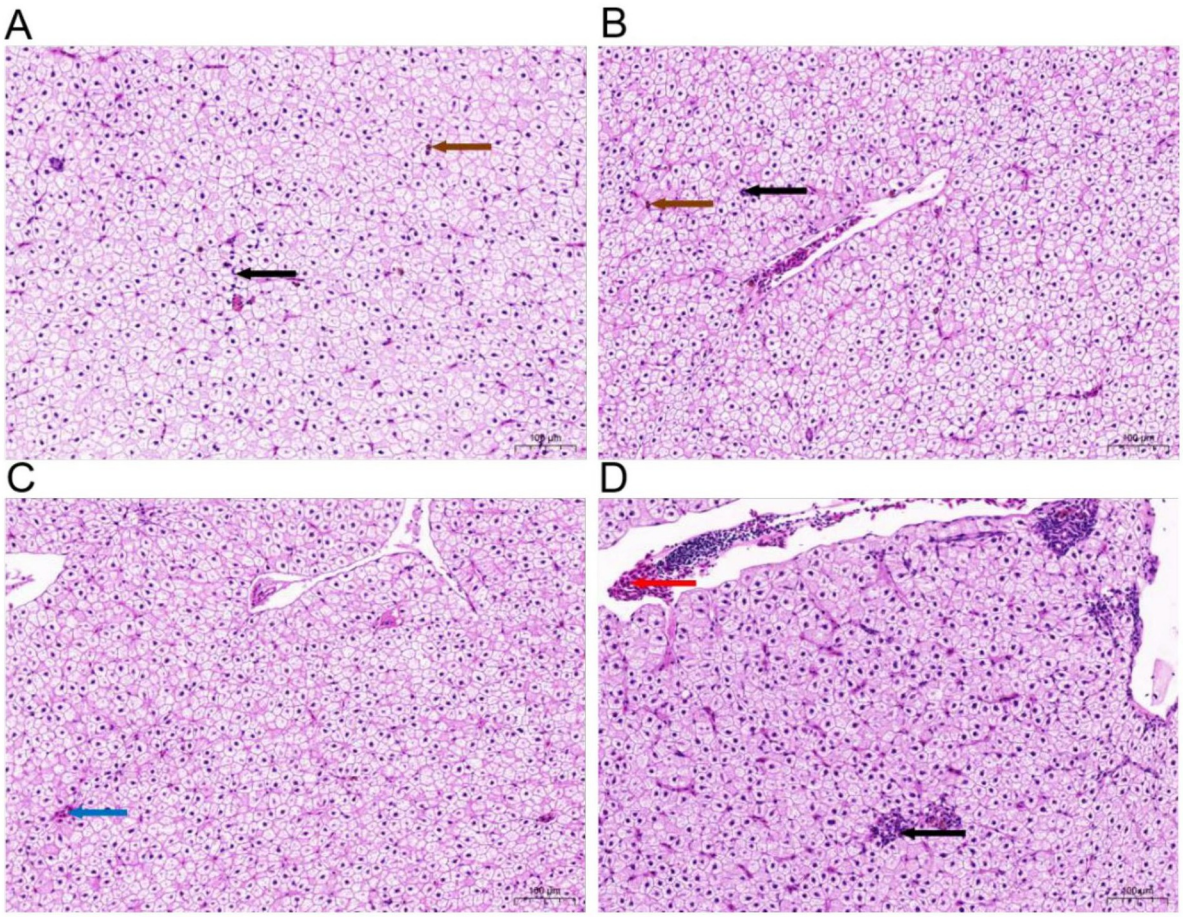


图9

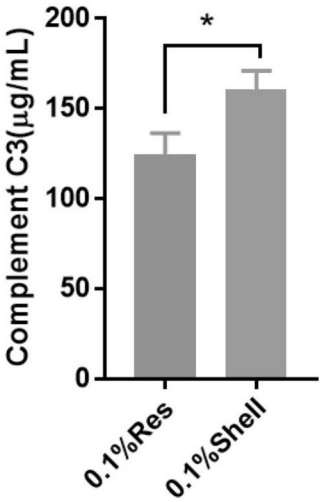


图10

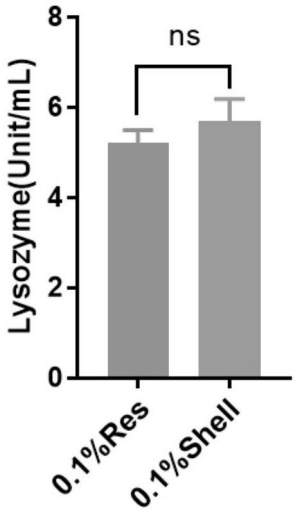

ns
Lysozyme(Unit/mL)
8
6
4
2
0
0.1%Res
0.1%Shell

图11

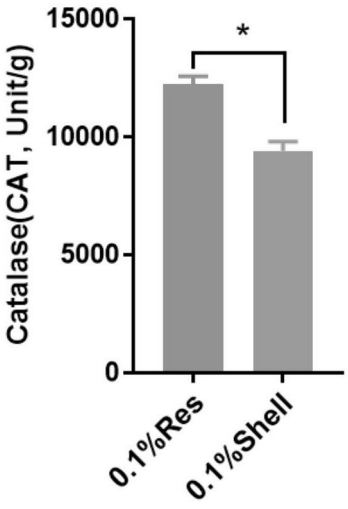

*
Catalase(CAT, Unit/g)
15000
10000
5000
0
0.1%Res
0.1%Shell

图12

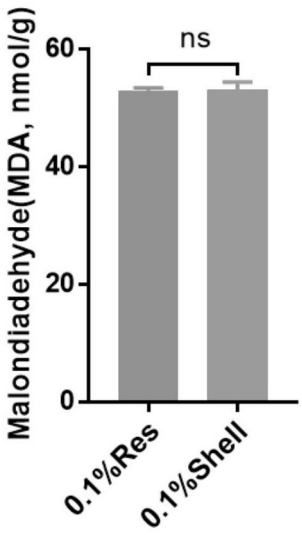


图13