

论著

# 发酵法 *L*-丙氨酸大鼠 90 天喂养试验研究

陈耿,徐军,陆罗定,奚清丽,俞萍,吕中明,卞倩,施伟庆

(江苏省疾病预防控制中心毒理与功能评价所,江苏 南京 210009)

**摘要:**目的 研究发酵法 *L*-丙氨酸对大鼠的亚慢性毒性和最大无作用剂量。方法 依据《食品安全性毒理学评价程序和方法》进行试验,采用 4 周龄清洁级健康离乳 SD 大鼠 96 只,雌雄各半,随机分为 4 组,分别给予发酵法 *L*-丙氨酸 0.00、1.25、2.50、5.00 g/kg BW 掺入基础饲料连续喂饲 90 d。第 45 天眼内眦静脉采血进行血常规检测;第 90 天采血测定血常规及生化指标,取肝、脾、肾、睾丸、卵巢称重并计算其脏器比,并对大脑、小脑、心、胸腺、肺、肝、肾、肾上腺、脾、胃、十二指肠、睾丸、卵巢、子宫等进行病理学检查。结果 各剂量组动物活动、生长正常,末期体重、总进食量、总食物利用率,以及脏器绝对重量、脏器比与对照组相比差异均无统计学意义( $P>0.05$ );试验中、末期血常规和血生化指标均未发现有意义的异常改变;病理学检查未见与受试物有关的病理改变。结论 发酵法 *L*-丙氨酸对雌、雄大鼠亚慢性毒性试验未观察到有害作用剂量(NOEL)分别为 5.56、4.58 g/kg BW。

**关键词:**发酵法 *L*-丙氨酸; *L*-丙氨酸; 酪蛋白; 大鼠; 亚慢性毒性; 毒理

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)04-0415-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.04.002

## A 90 day feeding study on *L*-alanine from fermentation broth in SD rats

CHEN Geng, XU Jun, LU Luo-ding, XI Qing-li, YU Ping, LYU Zhong-ming, BIAN Qian, SHI Wei-qing

(Institute of Toxicology and Functional Assessment, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Nanjing 210009, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the sub-chronic oral toxicity and maximum no observed adverse effect level (NOEL) of *L*-alanine from fermentation broth in Sprague-Dawley (SD) strain rats. **Methods** According to procedures and methods for toxicological assessment of food (2003 edition), a total of 96 4-week-age cleaning grade weanling SD rats were divided randomly into 4 groups, 12 male rats and 12 female rats in each group. Rats were fed the diet containing 0.00, 1.25, 2.50 and 5.00 g/kg BW *L*-alanine from fermentation broth for 90 consecutive days respectively. On the 45<sup>th</sup> day, blood samples collected from inner canthus veniplex were used for complete blood count. At the end of the experiment, samples of blood were collected for hematological and biochemical analysis, respectively. Livers, spleens, kidneys and testicles (ovaries) from all rats were weighed, furthermore, and the ratio of these organs to body weight was determined. The brain (including cerebrum, cerebellum and pons cerebelli), heart, thymus, lung, liver, kidneys, adrenal gland, spleen, stomach, duodenum, testicles, ovaries and uterus (horn and cervix) were removed for histopathological examinations. **Results** The growth and development of all rats in four groups generally performed well with normal growth and development. There were no significant differences between three experimental groups and the control group ( $P>0.05$ ), including the final body weight, total food intake, total food utilization, the cardinal organs/tissues' wet weight and organ coefficient. No sample-related significant changes were observed on haematology and serum biochemistry parameters at the mid or final term. Histopathological examinations showed no damage caused by *L*-alanine from fermentation broth, except for a few of the common spontaneous lesions. **Conclusion** The NOEL of male and female SD rats in oral sub-chronic toxicity study for *L*-alanine from fermentation broth were 4.58, 5.56 g/kg BW respectively.

**Key words:** *L*-alanine from fermentation broth; *L*-alanine; casein; rat; sub-chronic toxicity; toxicological

收稿日期:2016-01-12

基金项目:江苏省疾病预防控制中心“科教兴业工程”(JKRC2011012)

作者简介:陈耿 男 助理研究员 研究方向为卫生毒理学

E-mail:cheng@jscdc.cn

通信作者:施伟庆 男 助理研究员 研究方向为卫生毒理学

E-mail:304968124@qq.com

*L*-丙氨酸(*L*-alanine)又名 *L*- $\alpha$ -氨基丙酸,是人体血液中含量的最高的非必需氨基酸<sup>[1]</sup>。随着对 *L*-丙氨酸研究与开发的不断深入,其在医药、食品等行业领域的应用不断扩大<sup>[2-5]</sup>。作为一种重要的增味剂,*L*-丙氨酸已录入我国食品添加剂名录,其中国食品添加剂编码系统号(Chinese number system,

CNS)为12.006<sup>[6]</sup>,美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)也已批准L-丙氨酸为可直接用于食品的添加剂<sup>[7]</sup>。L-丙氨酸还是合成某些抗癌药物<sup>[8]</sup>及维生素B<sub>6</sub>的重要原料<sup>[5]</sup>。

L-丙氨酸的制备方法主要有化学合成法、蛋白水解提取法、发酵法和酶法<sup>[9]</sup>。目前批准的作为食品添加剂使用的L-丙氨酸仅适用于经酶法生产制得的L-丙氨酸<sup>[10]</sup>。酶法转化是利用L-天冬氨酸-β-脱羧酶或者德阿昆哈假单胞菌(*Pseudomonas dacunhae*)悬液,以L-天冬氨酸为底物脱羧生产L-丙氨酸<sup>[11-12]</sup>。该生产过程成本高,其底物L-天冬氨酸是由富马酸经天冬氨酸酶催化合成的,而富马酸是经石油炼制生产的,不符合当前绿色、环保、健康的发展理念。而利用基因工程手段构建的大肠埃希菌(*Escherichia coli*)以葡萄糖和氨水为主要原料经厌氧发酵生产L-丙氨酸,具有原料廉价易得、产品收率高、成本低的特点,具有广阔的市场前景<sup>[13-15]</sup>。本研究旨在以规范的毒理学试验方法为手段,对发酵法L-丙氨酸进行亚慢性毒性研究,从而评估以发酵法制备的L-丙氨酸是否安全或是否存在毒副作用,为更好地开发利用发酵法L-丙氨酸提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 受试物

发酵法L-丙氨酸,无色至白色结晶性粉末,由安徽华恒生物科技股份有限公司提供,纯度>99.0%(w%),生产批号:AA0213082301。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

ADVIA® 2120 五分类血液分析仪(德国SIEMENS), AU640 全自动生化分析仪(日本OLYMPUS), PANNORAMIC MIDI 数字病理扫描分析仪(匈牙利3DHISTECH), TP1020 自动脱水机、EG1160 石蜡包埋机、AUTO STAINER XL5010 自动染色机、RM2245 半自动石蜡切片机均购自德国LEICA, 电子天平。

全套血液学分析试剂均为SIEMENS ADVIA® 2120 配套检测试剂。生化试剂由北京中生试剂公司和宁波美康生物科技有限公司提供。酪蛋白(上海蓝季科技发展有限公司, 产品批号:140710)。

#### 1.1.3 试验动物

4周龄健康离乳SD大鼠,清洁级,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,生产许可证号:SCXK(沪)2012-0002号;饲养于江苏省疾病预防控制中心 SPF 级屏障环境实验动物设施,使用许可证号:SYXK(苏)2012-0037号。自然采光,12 h 明暗交

替,温度20~24℃,相对湿度60%~70%。饲料为全价营养灭菌鼠饲料,购自苏州双狮实验动物饲料科技有限公司,合格证号:苏饲审(2009)05032。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组

动物适应性饲养3 d后,选用健康SD大鼠96只,按体质量随机分为4组,即1个对照组和低、中、高3个剂量组,每组24只,雌雄各半,体质量68~85 g。

#### 1.2.2 受试物剂量选择及给予方式

受试物设3个剂量组,该受试物成人推荐剂量为每天1 g/人,成人体质量按60 kg计,即0.016 7 g/kg BW,以推荐剂量的300倍,即5.00 g/kg BW作为高剂量组,下设2.50、1.25 g/kg BW 2个剂量组(分别相当于推荐剂量的150、75倍)。按大鼠每日以体质量8%的摄食量计算,将发酵法L-丙氨酸掺入基础饲料,分别称取4 375 g受试物+875 g酪蛋白、2 188 g受试物+438 g酪蛋白和1 094 g受试物+219 g酪蛋白拌入基础鼠饲料至70 kg,各剂量组发酵法L-丙氨酸(酪蛋白)占饲料比重(w%)分别为:6.25%(1.25%)、3.12%(0.62%)、1.56%(0.31%),作为受试物高、中、低3个剂量组的饲料,对照组给予同批次基础饲料。动物单笼饲养,无菌水自由饮用,连续观察90 d。

#### 1.2.3 考察指标

一般观察:观察动物的一般表现、行为、中毒体征等,试验期间观察1次/d。每周称量1次动物体质量和2次食物摄入量,计算每周食物摄入量、每周及总食物利用率;计算各剂量组受试物实际摄入量(g/kg BW)<sup>[16]</sup>。

血液学测定:试验中期(45 d)和末期(90 d)采血进行血液学测定,包括血红蛋白(HGB)、红细胞计数(RBC)、血小板(PLT)、白细胞计数(WBC)及中性粒细胞(NE)、淋巴细胞(LY)、单核细胞(MO)、嗜酸性粒细胞(EO)、嗜碱性粒细胞(BA)的比例等。

血液生化测定:试验末期(90 d),动物禁食16 h后采血进行血生化测定,包括谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、血糖(GLU)、总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)等。

脏器比:取肝、脾、肾、睾丸、卵巢等脏器称重并计算脏器比(脏器比=脏器重量/空腹体质量×100%)。

组织病理学检查:12%福尔马林溶液固定大脑、小脑、心、胸腺、肺、肝、肾、肾上腺、脾、胃、十二指肠、睾丸、卵巢、子宫等脏器,石蜡包埋、HE染

色,阅片。

1.3 统计学分析

采用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件进行统计学分析,组织病理学检查结果用卡方检验和四格表确切概率法分析,其他试验数据均以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。正态分布数据采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 的 Dunnett-*t* 检验,若方差不齐,采用 Kruskal-Wallis 秩和检验分析,以  $\alpha = 0.05$  为显著性水平。

2 结果

2.1 动物一般状况、生长状况、进食量及食物利用率

试验期间各组动物毛发、活动、摄食、饮水、排便等一般状况未见明显异常,动物无死亡。由图 1、2 可见,雌性大鼠 1.25 g/kg BW 剂量组第 2 周和第 3 周体质量略低于对照组且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),但与同期对照组体质量差别小于 10%,并且之后体质量恢复,不具有生物学意义或毒理学意义<sup>[17]</sup>。由表 1、2 和 3 可见,与对照组比较,雌性大鼠 1.25 g/kg BW 剂量组第 2 周和第 3 周进食量减少且差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),2.50 g/kg BW 剂量组第 13 周进食量和食物利用率升高且差异有统计学意义 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ); 雄性大鼠 5.00 g/kg BW 剂量组第 4 周进食量降低且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),1.25 g/kg BW 剂量组第

13 周食物利用率升高且差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),上述差异同时期各组之间无剂量-反应关系。各剂量组雌、雄大鼠其余各观察点的进食量和食物利用率与对照组相比,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),且雌、雄大鼠总进食量及总食物利用率差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),故不认为这些改变具有不良生物学意义。

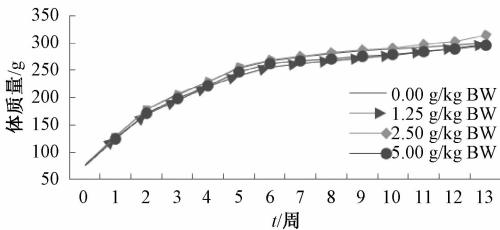


图 1 发酵法 *L*-丙氨酸对雌性 SD 大鼠生长曲线的影响  
Figure 1 Effect of *L*-alanine from fermentation broth on the growth curve of female rats

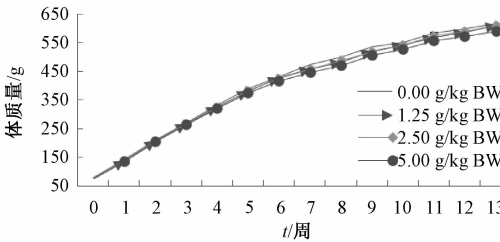


图 2 发酵法 *L*-丙氨酸对雄性 SD 大鼠生长曲线的影响  
Figure 2 Effect of *L*-alanine from fermentation broth on the growth curve of male rats

表 1 发酵法 *L*-丙氨酸对大鼠每周进食量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12, g$ )

Table 1 Effect of <i>L</i> -alanine from fermentation broth on weekly food intake in rats		喂养时间/周						
分组		1	2	3	4	5	6	7
雌性	对照组 (0 g/kg BW)	118 ± 6	153 ± 9	154 ± 11	152 ± 15	156 ± 14	153 ± 18	151 ± 20
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	110 ± 8	140 ± 10 **	139 ± 10 **	146 ± 13	147 ± 11	151 ± 17	147 ± 23
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	114 ± 7	151 ± 10	152 ± 7	151 ± 9	157 ± 13	155 ± 12	156 ± 15
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	117 ± 11	145 ± 12	149 ± 11	147 ± 9	157 ± 18	156 ± 15	150 ± 20
雄性	对照组 (0 g/kg BW)	124 ± 6	171 ± 7	194 ± 8	207 ± 4	220 ± 9	223 ± 8	217 ± 14
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	123 ± 6	171 ± 9	188 ± 11	201 ± 9	210 ± 17	217 ± 20	210 ± 14
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	118 ± 6	169 ± 7	190 ± 9	201 ± 10	212 ± 16	215 ± 20	213 ± 18
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	121 ± 7	164 ± 8	184 ± 11	196 ± 9 *	205 ± 15	207 ± 14	207 ± 18
		喂养时间/周						
分组		8	9	10	11	12	13	
雌性	对照组 (0 g/kg BW)	136 ± 17	140 ± 16	126 ± 19	141 ± 21	138 ± 20	131 ± 11	
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	134 ± 17	131 ± 15	127 ± 29	137 ± 18	130 ± 19	141 ± 17	
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	141 ± 21	138 ± 16	139 ± 16	138 ± 15	136 ± 17	155 ± 16 **	
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	139 ± 19	146 ± 20	143 ± 22	135 ± 20	147 ± 16	141 ± 19	
雄性	对照组 (0 g/kg BW)	225 ± 12	221 ± 13	234 ± 11	233 ± 14	226 ± 14	200 ± 22	
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	230 ± 6	226 ± 17	228 ± 12	217 ± 15	213 ± 11	213 ± 16	
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	229 ± 14	220 ± 20	232 ± 19	223 ± 20	213 ± 22	212 ± 14	
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	217 ± 16	216 ± 18	223 ± 16	223 ± 23	210 ± 16	205 ± 15	

注:与对照组比较,\*为  $P < 0.05$ ,\*\*为  $P < 0.01$

2.2 血液学检测结果

由表 4、5 可见,与对照组比较,喂养中期 1.25

g/kg BW 剂量组和喂养末期 2.50 g/kg BW 剂量组雌性大鼠 HGB 降低且差异有统计学意义 ( $P <$

表2 发酵法 *L*-丙氨酸对大鼠每周食物利用率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12, \%$ )

Table 2 Effect of *L*-alanine from fermentation broth on weekly food utilization in rats

分组		喂养时间/周						
		1	2	3	4	5	6	7
雌性	对照组 (0 g/kg BW)	44.4 ± 2.2	32.0 ± 4.9	17.9 ± 3.9	14.8 ± 3.1	15.8 ± 4.4	8.1 ± 4.7	5.1 ± 3.8
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	43.5 ± 3.8	30.8 ± 2.2	19.2 ± 5.8	16.2 ± 4.1	14.5 ± 4.0	9.6 ± 4.6	5.4 ± 5.2
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	45.5 ± 4.1	33.6 ± 3.7	17.7 ± 4.2	15.9 ± 4.7	16.6 ± 5.6	9.2 ± 4.3	4.5 ± 3.3
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	41.5 ± 5.3	32.7 ± 5.3	18.5 ± 3.1	16.2 ± 3.5	16.3 ± 6.1	9.4 ± 6.4	3.1 ± 3.3
雄性	对照组 (0 g/kg BW)	50.7 ± 2.6	40.6 ± 1.1	31.2 ± 2.8	29.9 ± 2.6	25.4 ± 3.5	20.0 ± 2.3	18.9 ± 4.0
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	51.1 ± 2.5	40.3 ± 1.6	31.8 ± 2.2	29.7 ± 2.9	25.1 ± 2.2	21.5 ± 1.8	15.3 ± 3.6
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	52.8 ± 3.6	40.5 ± 2.7	32.3 ± 1.9	28.1 ± 3.3	27.6 ± 4.2	19.2 ± 4.3	15.3 ± 5.4
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	49.4 ± 3.9	40.8 ± 1.4	32.4 ± 2.3	30.3 ± 3.1	24.9 ± 2.1	21.3 ± 2.5	14.3 ± 5.6
分组		喂养时间/周						
		8	9	10	11	12	13	
雌性	对照组 (0 g/kg BW)	4.5 ± 3.2	3.3 ± 1.7	3.0 ± 2.4	2.6 ± 2.2	3.2 ± 2.0	3.6 ± 3.2	
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	3.9 ± 3.1	2.9 ± 1.6	4.6 ± 3.2	5.6 ± 4.4	4.8 ± 3.3	5.6 ± 4.1	
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	4.3 ± 3.4	2.8 ± 2.0	3.5 ± 2.2	4.3 ± 2.9	3.4 ± 2.9	8.2 ± 3.9 *	
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	2.5 ± 1.9	3.2 ± 3.3	2.2 ± 1.1	3.8 ± 1.9	4.2 ± 3.6	5.0 ± 3.6	
雄性	对照组 (0 g/kg BW)	11.7 ± 2.6	15.7 ± 3.2	7.2 ± 3.2	13.5 ± 2.8	7.2 ± 3.3	7.9 ± 3.5	
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	10.0 ± 2.0	16.7 ± 2.1	10.0 ± 2.2	12.2 ± 4.2	7.4 ± 2.9	12.2 ± 3.2 **	
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	12.9 ± 3.1	13.5 ± 3.6	9.8 ± 3.0	14.8 ± 4.5	7.1 ± 3.4	10.4 ± 4.3	
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	11.2 ± 4.3	15.4 ± 4.3	9.5 ± 2.5	13.6 ± 4.1	7.3 ± 2.9	9.4 ± 1.7	

注:与对照组比较, \* 为  $P < 0.05$ , \*\* 为  $P < 0.01$

表3 大鼠总增重、总进食量、总食物利用率和实际摄取剂量 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 3 Total gain in body weight, total food intake, total food utilization and actual intake dose in rats

分组		总增重 /g	总进食 /g	总食物利用率 /%	实际摄取剂量 /(g/kg BW)
雌性	对照组 (0 g/kg BW)	224.3 ± 20.9	1849.8 ± 150.6	12.12 ± 0.74	—
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	220.6 ± 22.7	1780.4 ± 131.2	12.38 ± 0.79	1.34 ± 0.06
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	240.0 ± 28.8	1882.7 ± 104.7	12.71 ± 0.94	2.69 ± 0.09
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	221.2 ± 19.0	1870.3 ± 173.7	11.92 ± 1.47	5.56 ± 0.59
雄性	对照组 (0 g/kg BW)	538.1 ± 29.2	2694.3 ± 86.6	19.97 ± 0.76	—
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	535.5 ± 20.3	2646.3 ± 114.5	20.25 ± 0.57	1.15 ± 0.04
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	536.2 ± 58.0	2646.5 ± 158.2	20.22 ± 1.15	2.29 ± 0.07
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	514.8 ± 52.5	2577.0 ± 152.5	19.96 ± 1.40	4.58 ± 0.24

注:—为未摄取

表4 发酵法 *L*-丙氨酸 90 d 喂养试验中期大鼠血液学结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 4 Hematology values of rats at the mid-term in 90-day feeding study of *L*-alanine from fermentation broth

分组		血红蛋白 /(g/L)	红细胞计数 /( $\times 10^{12}$ /L)	血小板 /( $\times 10^9$ /L)	白细胞计数 /( $\times 10^9$ /L)
雌性	对照组 (0 g/kg BW)	135 ± 5	7.31 ± 0.38	1098 ± 105	7.63 ± 1.86
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	127 ± 7 **	7.02 ± 0.51	1016 ± 190	8.03 ± 1.08
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	130 ± 6	7.06 ± 0.30	1031 ± 117	8.51 ± 2.22
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	131 ± 7	7.09 ± 0.46	1028 ± 143	7.16 ± 1.55
雄性	对照组 (0 g/kg BW)	135 ± 7	7.12 ± 0.39	967 ± 127	10.45 ± 2.36
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	138 ± 7	7.44 ± 0.38	1008 ± 182	10.50 ± 1.39
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	141 ± 8	7.40 ± 0.50	1047 ± 193	11.44 ± 2.02
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	142 ± 8	7.58 ± 0.45	988 ± 171	10.21 ± 1.83
分组		中性粒细胞/%	淋巴细胞/%	单核细胞/%	嗜酸性粒细胞/% 嗜碱性粒细胞/%
雌性	对照组 (0 g/kg BW)	8.1 ± 2.0	86.7 ± 2.1	2.1 ± 0.7	2.2 ± 0.5 0.2 ± 0.1
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	11.1 ± 7.1	83.6 ± 7.5	2.3 ± 0.6	2.1 ± 0.6 0.2 ± 0.1
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	9.1 ± 4.9	85.1 ± 5.2	2.2 ± 0.5	2.5 ± 0.9 0.3 ± 0.1
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	7.9 ± 2.1	86.7 ± 2.2	1.9 ± 0.6	2.6 ± 0.9 0.2 ± 0.1
雄性	对照组 (0 g/kg BW)	10.0 ± 3.2	85.0 ± 3.6	2.2 ± 0.5	1.9 ± 0.7 0.3 ± 0.1
	低剂量组 (1.25 g/kg BW)	10.6 ± 2.1	84.5 ± 2.5	1.9 ± 0.7	2.1 ± 1.1 0.2 ± 0.0
	中剂量组 (2.50 g/kg BW)	11.7 ± 2.3	83.6 ± 2.4	1.9 ± 0.7	2.0 ± 0.8 0.3 ± 0.1
	高剂量组 (5.00 g/kg BW)	11.6 ± 2.7	83.5 ± 3.1	1.9 ± 0.8	2.2 ± 1.0 0.2 ± 0.0

注:与对照组比较, \*\* 为  $P < 0.01$

表 5 发酵法 *L*-丙氨酸 90 d 喂养试验末期大鼠血液学结果( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 5 Hematology values of rats at the final term in 90-day feeding study of <i>L</i> -alanine from fermentation broth					
分组		血红蛋白 /(g/L)	红细胞计数 /( $\times 10^{12}$ /L)	血小板 /( $\times 10^9$ /L)	白细胞计数 /( $\times 10^9$ /L)
雌性	对照组(0 g/kg BW)	141 ± 6	7.94 ± 0.43	988 ± 98	6.98 ± 1.59
	低剂量组(1.25 g/kg BW)	138 ± 8	8.12 ± 0.68	1003 ± 160	8.45 ± 1.43
	中剂量组(2.50 g/kg BW)	134 ± 4 *	7.86 ± 0.32	980 ± 181	6.51 ± 1.44
	高剂量组(5.00 g/kg BW)	141 ± 6	7.96 ± 0.31	839 ± 151	6.51 ± 1.83
雄性	对照组(0 g/kg BW)	141 ± 8	8.30 ± 0.47	1055 ± 133	10.83 ± 1.79
	低剂量组(1.25 g/kg BW)	145 ± 3	8.85 ± 0.26 *	1002 ± 202	11.55 ± 1.86
	中剂量组(2.50 g/kg BW)	141 ± 8	8.25 ± 0.51	1033 ± 141	12.35 ± 1.18
	高剂量组(5.00 g/kg BW)	142 ± 8	8.55 ± 0.49	1014 ± 106	11.51 ± 1.31
分组		中性粒细胞/%	淋巴细胞/%	单核细胞/%	嗜酸性粒细胞/% 嗜碱性粒细胞/%
雌性	对照组(0 g/kg BW)	17.9 ± 4.1	74.8 ± 4.4	3.7 ± 0.7	2.5 ± 0.5 0.1 ± 0.1
	低剂量组(1.25 g/kg BW)	19.7 ± 3.1	74.6 ± 3.0	2.7 ± 0.8 **	2.0 ± 0.9 0.2 ± 0.1
	中剂量组(2.50 g/kg BW)	19.5 ± 3.4	73.1 ± 4.1	3.6 ± 0.6	2.7 ± 0.6 0.2 ± 0.1
	高剂量组(5.00 g/kg BW)	20.1 ± 4.7	73.2 ± 4.9	3.5 ± 0.7	2.5 ± 0.9 0.2 ± 0.1
雄性	对照组(0 g/kg BW)	19.3 ± 3.4	72.9 ± 3.5	3.8 ± 0.5	2.8 ± 0.6 0.2 ± 0.1
	低剂量组(1.25 g/kg BW)	20.3 ± 4.0	72.3 ± 4.7	3.5 ± 0.6	2.6 ± 1.0 0.2 ± 0.1
	中剂量组(2.50 g/kg BW)	20.7 ± 3.2	72.4 ± 3.0	3.2 ± 0.8	2.3 ± 0.5 0.2 ± 0.1
	高剂量组(5.00 g/kg BW)	21.7 ± 3.6	71.5 ± 3.4	3.3 ± 0.9	2.2 ± 0.6 0.2 ± 0.1

注:与对照组比较,\*为  $P < 0.05$ ,\*\*为  $P < 0.01$

0.01,  $P < 0.05$ ); 喂养末期 1.25 g/kg BW 剂量组雄性大鼠 RBC 升高且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 雌性大鼠 MO 的比例降低且差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),但同时期各组之间无剂量-反应关系,且喂养中期和喂养末期各组雌、雄大鼠 HGB、RBC、PLT、WBC 及 NE、LY、MO、EO、BA 的数值均在本实验室历史正常值范围内,未提示具有不良生物学意义。

2.3 血液生化检测结果

由表 6 可见,与对照组比较,雌性大鼠 1.25、2.50 g/kg BW 剂量组 TG 降低、BUN 升高且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 雄性大鼠

1.25 g/kg BW 剂量组 ALB、BUN、CRE 和 TP 升高, TG 降低,1.25、5.00 g/kg BW 剂量组 ALT 升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),但这些指标仍均在本实验室历史正常值范围内;雌性 2.50、5.00 g/kg BW 剂量组及雄性 1.25、2.50、5.00 g/kg BW 剂量组大鼠 TC 升高且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),且超出本实验室历史正常值范围(雌鼠:1.20 ~ 3.00 mmol/L;雄鼠:1.24 ~ 2.24 mmol/L),可能与受试物剂量组饲料中额外添加的酪蛋白有关<sup>[18-23]</sup>。上述指标变化相互之间无关联性,且无剂量-反应关系,各剂量组其余多项

表 6 发酵法 *L*-丙氨酸 90 d 喂养试验末期大鼠血清生化结果( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 6 Serum biochemical parameters of rats at the final term in 90-day feeding study of <i>L</i> -alanine from fermentation broth					
分组		谷丙转氨酶 /(U/L)	谷草转氨酶 /(U/L)	尿素氮 /(mmol/L)	肌酐 /( $\mu$ mol/L)
雌性	对照组(0 g/kg BW)	47.9 ± 13.6	154.1 ± 24.3	5.72 ± 0.55	36.1 ± 3.3
	低剂量组(1.25 g/kg BW)	56.0 ± 15.5	159.6 ± 30.3	6.75 ± 0.42 **	38.9 ± 3.4
	中剂量组(2.50 g/kg BW)	56.1 ± 14.9	162.7 ± 40.5	6.72 ± 0.52 **	36.9 ± 3.0
	高剂量组(5.00 g/kg BW)	40.2 ± 7.0	149.2 ± 16.0	5.66 ± 0.68	35.2 ± 3.4
雄性	对照组(0 g/kg BW)	40.5 ± 10.8	139.7 ± 22.1	5.46 ± 0.64	31.2 ± 1.9
	低剂量组(1.25 g/kg BW)	56.8 ± 7.2 **	140.6 ± 36.1	6.36 ± 0.81 *	36.0 ± 6.7 *
	中剂量组(2.50 g/kg BW)	50.0 ± 17.8	145.2 ± 36.3	5.20 ± 0.88	31.4 ± 2.2
	高剂量组(5.00 g/kg BW)	53.0 ± 8.7 *	153.0 ± 26.8	5.84 ± 1.04	32.7 ± 4.7
分组		总胆固醇 /(mmol/L)	甘油三酯 /(mmol/L)	血糖 /(mmol/L)	总蛋白 /(g/L) 白蛋白 /(g/L)
雌性	对照组(0 g/kg BW)	2.05 ± 0.50	1.46 ± 0.59	6.20 ± 0.67	73.5 ± 7.2 38.8 ± 4.0
	低剂量组(1.25 g/kg BW)	2.74 ± 0.65	0.73 ± 0.26 *	5.69 ± 0.74	76.7 ± 5.0 38.2 ± 2.3
	中剂量组(2.50 g/kg BW)	3.46 ± 1.04 **	0.87 ± 0.25 *	5.87 ± 0.62	78.5 ± 6.6 41.0 ± 3.1
	高剂量组(5.00 g/kg BW)	2.85 ± 0.68 *	1.38 ± 0.72	6.35 ± 0.64	73.1 ± 5.9 39.0 ± 3.6
雄性	对照组(0 g/kg BW)	1.89 ± 0.23	1.83 ± 0.68	7.18 ± 0.54	60.7 ± 2.0 30.5 ± 1.0
	低剂量组(1.25 g/kg BW)	2.76 ± 0.35 **	0.96 ± 0.37 **	7.34 ± 0.48	65.6 ± 3.4 ** 31.6 ± 1.3 *
	中剂量组(2.50 g/kg BW)	2.38 ± 0.29 **	1.93 ± 0.59	7.63 ± 0.70	60.7 ± 1.0 30.4 ± 0.7
	高剂量组(5.00 g/kg BW)	2.51 ± 0.36 **	1.36 ± 0.54	6.85 ± 0.41	62.8 ± 3.4 30.9 ± 1.2

注:与对照组比较,\*为  $P < 0.05$ ,\*\*为  $P < 0.01$

生化指标值与对照组比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ),结合脏器重量、脏器比等指标及组织病理学结果,认为这些改变与受试物无关。

2.4 大体及组织学检查结果

2.4.1 大体剖检

表 7 发酵法 *L*-丙氨酸 90 d 喂养试验大鼠主要脏器湿重和脏器比( $\bar{x}\pm s,n=12$ )

Table 7 Cardinal organs' wet weight and organ coefficient of rats in 90-day feeding study of <i>L</i> -alanine from fermentation broth						
分组		空腹体质量/g	肝脏/g	脾脏/g	肾脏/g	睾丸(卵巢)/g
雌性	对照组(0 g/kg BW)	283.8±21.2	9.05±1.35	0.55±0.09	1.98±0.13	0.13±0.04
	低剂量组(1.25 g/kg BW)	282.8±25.3	8.54±1.04	0.48±0.12	1.83±0.20	0.12±0.03
	中剂量组(2.50 g/kg BW)	304.1±25.7	9.69±1.23	0.51±0.06	1.98±0.21	0.14±0.03
	高剂量组(5.00 g/kg BW)	281.3±17.8	9.12±0.87	0.49±0.07	1.97±0.09	0.13±0.03
雄性	对照组(0 g/kg BW)	592.2±29.0	16.86±1.44	1.03±0.16	3.63±0.31	3.75±0.22
	低剂量组(1.25 g/kg BW)	595.3±19.6	16.22±0.95	0.91±0.09	3.45±0.27	3.77±0.20
	中剂量组(2.50 g/kg BW)	594.1±55.9	17.24±2.24	0.96±0.13	3.53±0.28	3.71±0.24
	高剂量组(5.00 g/kg BW)	573.9±51.2	15.85±1.72	0.89±0.15	3.57±0.38	3.84±0.31
分组		肝体比/%	脾体比/%	肾体比/%	睾丸(卵巢)体比/%	
雌性	对照组(0 g/kg BW)	3.19±0.47	0.19±0.03	0.70±0.07	0.05±0.01	
	低剂量组(1.25 g/kg BW)	3.02±0.28	0.17±0.04	0.65±0.05	0.04±0.01	
	中剂量组(2.50 g/kg BW)	3.18±0.28	0.17±0.02	0.65±0.06	0.04±0.01	
	高剂量组(5.00 g/kg BW)	3.24±0.26	0.17±0.02	0.70±0.04	0.05±0.01	
雄性	对照组(0 g/kg BW)	2.85±0.20	0.17±0.03	0.61±0.03	0.63±0.04	
	低剂量组(1.25 g/kg BW)	2.72±0.13	0.15±0.02	0.58±0.05	0.63±0.04	
	中剂量组(2.50 g/kg BW)	2.90±0.14	0.16±0.02	0.60±0.03	0.63±0.05	
	高剂量组(5.00 g/kg BW)	2.76±0.20	0.15±0.03	0.62±0.07	0.67±0.08	

2.4.2 组织病理学检查

对 5.00 g/kg BW 剂量组和对照组全部大鼠的大脑、小脑、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、胃、十二指肠、卵巢、子宫和睾丸进行镜检,其中大脑、小脑、心、胸腺、胃、十二指肠、子宫、睾丸等均未见明显异常,其他组织形态学改变及发生率见表 8。由表 8 可知,各类组织的病理改变程度较轻且无组间差别,考虑与试验动物质量及动物自发性病变有关,而与受试物处理无关。未对其他剂量组进行组织病理学检查。

表 8 发酵法 *L*-丙氨酸 90 d 喂养试验大鼠组织病理学检查结果( $n=12$ ,例)

Table 8 Results of rats' histopathological examinations in 90-day feeding study of <i>L</i> -alanine from fermentation broth					
组织	形态改变	对照组 (0 g/kg BW)		高剂量组 (5.00 g/kg BW)	
		雌性	雄性	雌性	雄性
肺	轻度色素沉着	0	0	1	0
肝	轻度脂肪变性	0	2	0	3
肾	极少量钙化小体	0	0	0	2
肾上腺	轻度充血	1	1	0	0
	轻度脂肪变性	0	0	1	0
脾	轻度充血	2	0	0	0
	轻度色素沉着	2	1	2	1
卵巢	轻度色素沉着	2	—	2	—

注:—为未检测

3 讨论

*L*-丙氨酸是人体内重要的生糖氨基酸,其脱去

各组大鼠大脑、小脑、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、胃、十二指肠、卵巢、子宫和睾丸组织,均未见明显异常。空腹体质量及部分脏器湿重及脏器比见表 7,与对照组比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

氨基生成丙酮酸,丙酮酸可继续转化生成葡萄糖,也可进入三羧酸循环彻底氧化生成  $\text{CO}_2$  和水,同时释放能量供生理活动所需。丙氨酸-葡萄糖循环是氨在血液中运输的主要方式之一,也是氨基酸和能量代谢的重要途径<sup>[24]</sup>。因此,*L*-丙氨酸也被作为高营养物质用于临床的复方氨基酸注射液<sup>[4]</sup>。Freudenberg 等<sup>[21]</sup>的研究表明,日粮中额外添加 4.5% *L*-丙氨酸( $w\%$ )能有效降低小鼠血浆胆固醇浓度。

酪蛋白是一种含磷钙的结合蛋白,是哺乳动物乳汁中的主要蛋白质,占蛋白质含量的 80% ~ 82%,又称干酪素。由于酪蛋白可促进肠道对胆固醇和胆汁酸的重吸收,并能通过降低羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase, HMGCoA)的活性而明显降低胆固醇转变为胆汁酸的速率,使胆固醇代谢受阻,因此酪蛋白能明显升高大鼠血液胆固醇水平<sup>[18-20]</sup>。此外,酪蛋白升高多种动物血液胆固醇含量的作用可能与其消化吸收后的某些氨基酸有关<sup>[18-21]</sup>。研究表明,甲硫氨酸(methionine)和赖氨酸(lysine)能升高新西兰大白兔血清胆固醇含量<sup>[25]</sup>,甘氨酸(glycine)、牛磺酸(taurine)和亮氨酸(leucine)能降低大鼠或小鼠血液中胆固醇含量<sup>[19,26]</sup>。酪蛋白中必需氨基酸特别是甲硫氨酸的含量明显高于大豆蛋白<sup>[27]</sup>,而大豆蛋白喂饲大鼠血清中大多数氨基酸含量较酪蛋白组

低,但甘氨酸含量则高于酪蛋白组大鼠<sup>[19,27]</sup>,这两种氨基酸在调节动物胆固醇含量方面的不同作用,可能是酪蛋白较大豆蛋白具有致高胆固醇血症的原因之一。有研究表明,酪蛋白介导的胆固醇升高效应并无剂量效应关系,而具有双向性,相比中剂量,极低剂量和极高剂量组酪蛋白喂饲大鼠血清胆固醇含量更高<sup>[26-27]</sup>。因此,较低含量的酪蛋白也可能导致血清胆固醇水平升高。

本研究以 1.25、2.50 和 5.00 g/kg BW 剂量(相当于推荐剂量的 75、150 和 300 倍)的发酵法 *L*-丙氨酸掺入基础饲料中喂养大鼠 90 d,低、中、高 3 个剂量组发酵法 *L*-丙氨酸(酪蛋白)占饲料比重( $w/\%$ )分别为:1.56%(0.31%)、3.12%(0.62%)、6.25%(1.25%),结果显示:各组动物活动、生长正常;雌、雄大鼠低、中、高剂量组末期体重、总进食量和总食物利用率与对照组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );雌、雄大鼠各剂量组的血液学指标及除 TC 外的血清生化指标检测值均在正常波动范围内,雌性中、高剂量组及雄性低、中、高剂量组大鼠 TC 升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),认为与受试物剂量组饲料中额外添加的酪蛋白有关<sup>[18-23]</sup>,而与受试物本身无关;雌、雄大鼠各剂量组脏器绝对重量、脏器比与对照组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );高剂量组雌、雄大鼠大脑、小脑、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、胃、十二指肠、卵巢、子宫和睾丸组织病理学检查均未见与发酵法 *L*-丙氨酸明显有关的不良改变。

在本实验室试验条件下,发酵法 *L*-丙氨酸 90 d 喂养试验雌、雄大鼠实际摄入的最大未观察到有害作用剂量(NOAEI)分别为 5.56、4.58 g/kg BW(分别相当于推荐剂量的 332 和 274 倍)。此结果为合理开发应用发酵法 *L*-丙氨酸提供了科学依据。

参考文献

[ 1 ] 翁甲丰,周立东,陈振庄,等. 正常人血清游离氨基酸分析[J]. 第一军医大学学报,1983,3(4):504-506.

[ 2 ] 武汉大学生物系生化微生物工厂. 氨基酸的应用简介[J]. 武汉大学学报(自然科学版),1975,41(2):95-104.

[ 3 ] 赵建国. 氨基酸在食品工业中的应用[J]. 江苏食品与发酵,1983,11(1):18-21.

[ 4 ] 纪庆芳. 氨基酸医药应用简介[J]. 氨基酸通讯,1980,6(1):31-46.

[ 5 ] 王雪根,朱建良,欧阳平凯. *L*-丙氨酸的生产及应用[J]. 南京化工大学学报,1998,20(1):88-92.

[ 6 ] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 2760—2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S]. 北京:中国标准出版社,2014.

[ 7 ] FDA. 172;320 Food additives-amino acids[S]. 2000.

[ 8 ] 严振寰,吴自慎,桂自其. 4-羟基水杨醛丙氨酸合锌(Ⅱ)的合

成表征及其抗癌活性的初步研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),1989,23(4):528-532.

[ 9 ] 蒋光玉. *DL*-丙氨酸生产工艺的研究进展[J]. 精细与专用化学品,2011,19(7):25-27.

[10] 中华人民共和国卫生部. GB 25543—2010 食品安全国家标准 食品添加剂 *L*-丙氨酸[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

[11] 沈淑英,冯容保. *L*-丙氨酸的酶法生产[J]. 江苏食品与发酵,1981,9(1):38-44.

[12] 徐虹,王雪根,刘济瑞,等. 利用假单胞菌天冬氨酸- $\beta$ -脱羧酶高效生产 *L*-丙氨酸[J]. 南京化工学院学报,1995,17(1):1-6.

[13] ZHANG X, Jantama K, Moore J C. Production of *L*-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2007,77(2):355-366.

[14] 周丽,邓臻,崔文璟,等. 温度调节基因开关调控大肠杆菌发酵合成 *L*-丙氨酸[J]. 微生物学通报,2015,42(11):2272-2281.

[15] 蒋光玉. 发酵法生产 *L*-丙氨酸提取工艺的研究[J]. 中国食品添加剂,2011,106(3):101-106.

[16] Hayes A W. Principles and methods of toxicology [M]. New York:Raven Press,2008:1236-1237.

[17] Jacobson-Kram D, Keller K A. Toxicological testing handbook: principles, applications, and data interpretation[M]. New York: Informa Healthcare,2006:165.

[18] Koury O H, Scheede-Bergdahl C, Bergdahl A. The role of casein in the development of hypercholesterolemia [J]. J Physiol Biochem,2014,70(4):1021-1028.

[19] Blachier F, Jr A H L, Boutry C, et al. Alimentary proteins, amino acids and cholesterolemia [J]. Amino Acids, 2010, 38(1):15-22.

[20] 杨东仁,张喜忠,杨琦. 蛋白质、膳食纤维与胆固醇代谢[J]. 国外医学卫生学分册,1998,25(2):85-87.

[21] Freudenberg A, Petzke K J, Klaus S. Dietary *L*-leucine and *L*-alanine supplementation have similar acute effects in the prevention of high-fat diet-induced obesity [J]. Amino Acids, 2013,44(2):519-528.

[22] Fillios L C, Naito C, Andrus S B, et al. Variations in cardiovascular sudanophilia with changes in the dietary level of protein[J]. Am J Physiol,1958,194(2):275-279.

[23] Huffman S, Jones R J. Chronic effect of dietary protein on hypercholesterolemia in the rat[J]. Proc Soc Exp Biol Med,1956,93(3):519-522.

[24] 周爱儒,查锡良. 生物化学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2006:164-176.

[25] Kurowska E M, Carroll K K. Hypercholesterolemic responses in rabbits to selected groups of dietary essential amino acids[J]. J Nutr,1994,24(3):364-370.

[26] Katan M B, Vroomen L H, Hermus R J. Reduction of casein-induced hypercholesterolaemia and atherosclerosis in rabbits and rats by dietary glycine, arginine and alanine[J]. Atherosclerosis, 1982,43(2/3):381-391.

[27] Moundras C, Remesy C, Levrat M A, et al. Methionine deficiency in rats fed soy protein induces hypercholesterolemia and potentiates lipoprotein susceptibility to peroxidation [J]. Metabolism,1995,44(9):1146-1152.