



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111434339 B

(45) 授权公告日 2022.10.14

(21) 申请号 201910027253.0

A23K 20/163 (2016.01)

(22) 申请日 2019.01.11

A23K 20/20 (2016.01)

A61K 31/722 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111434339 A

(43) 申请公布日 2020.07.21

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院

地址 518057 广东省深圳市南山区高新园  
南区粤兴一道18号香港理工大学学  
研大楼205室

(56) 对比文件

CN 1415310 A, 2003.05.07

CN 106720918 A, 2017.05.31

CN 107412280 A, 2017.12.01

CN 103876159 A, 2014.06.25

翟晓娜.“壳聚糖纳米硒体系的制备及其物  
化特性和生物活性的研究”.《中国优秀博硕士学  
位论文全文数据库(博士) 工程科技I辑》.2017,  
(第07期),

Zhang C. Y. 等.Synthesis,  
characterization, and controlled release  
of seleniumnanoparticles stabilized by  
chitosan of different molecular weights.  
《Carbohydrate Polymers》.2015,第134卷

李宝春.“纳米硒在动物生产中应用”.《安徽  
科技学院学报》.2007,第21卷(第2期),

(72) 发明人 夏凡 郭颖轩 黄家兴 陆家谦  
张兆滔

审查员 魏秀丽

(74) 专利代理机构 深圳中一专利商标事务所  
44237

专利代理师 高星

权利要求书1页 说明书9页 附图5页

(51) Int. Cl.

A61K 33/04 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

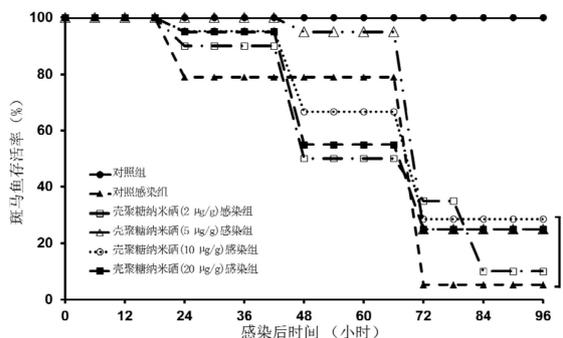
A23K 50/80 (2016.01)

(54) 发明名称

有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶及  
制备、保存和应用

(57) 摘要

本发明涉及纳米硒水溶胶技术领域,尤其涉  
及一种有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶  
及制备、保存和应用。该有免疫增强功效的壳聚  
糖纳米水溶胶含有以下浓度的组分:纳米硒  
0.5mmol/L~5.0mmol/L;功能化的壳聚糖  
100.0mg/L~1000.0mg/L。该有免疫增强功效的  
壳聚糖纳米硒水溶胶具有免疫活性,且可提高鱼  
类等水产生物肌肉组织中硒含量,将其加入水产  
生物饲料中作为水产免疫增强剂时,可为水产养  
殖病害防治提供一种更加有效的方案。



1. 一种有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的制备方法,包括以下步骤:

(1) . 在 $20^{\circ}\text{C}$ ,  $101.325\text{kPa}$ 下,取质量浓度为 $3000\text{mg/L}$ 的功能化的壳聚糖水溶液 $10\text{mL}$ 分别加入装有 $5\text{mL}$ 双蒸水的 $25\text{mL}$ 容量瓶中,容量瓶编号为3#,其中功能化的壳聚糖为采用柠檬酸处理的壳聚糖,功能化的壳聚糖的平均分子量为 $200000\text{Da}$ ;

(2) . 向上述编号为3#的 $25\text{mL}$ 容量瓶中加入浓度为 $60\text{mmol/L}$ 的亚硒酸钠溶液 $2.5\text{mL}$ ,轻轻摇匀,使之充分混合,得到混合溶液;

(3) . 向(2)的混合溶液中滴加浓度为 $320\text{mmol/L}$ 的维生素C溶液 $3.29\text{mL}$ ,边滴加边轻轻摇匀,滴加完毕,加水定容至 $25\text{mL}$ ,静置,待红色不再加深,然后透析 $24\text{h}$ ,即可得到产物,所述透析的截留分子量为 $8000$ 。

2. 由权利要求1所述的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的制备方法获得的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶。

3. 由权利要求1所述的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的制备方法获得的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的保存方法,其特征在于,于 $0\sim 10^{\circ}\text{C}$ 的环境中保存,保存期为 $30\sim 60$ 天。

4. 一种水产免疫增强剂,其特征在于,该水产免疫增强剂中含有有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶,所述有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶为由权利要求1所述的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的制备方法获得的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶。

## 有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶及制备、保存和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及纳米硒水溶胶技术领域,尤其涉及一种有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶及制备、保存和应用。

### 背景技术

[0002] 中国是世界最大的水产品生产国,每年直接产生的经济价值约为9000亿元人民币。但近年来频频爆发的水产养殖疾病影响了水产品的健康状况,并且造成巨大的经济损失。仅在2012年,我国由于水产养殖疾病造成的经济损失就达到36亿元(中国渔业统计年鉴,2013)。常见的水产养殖病菌如鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和红嘴病的耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)等导致的水产疾病,每年都会给水产养殖业带来巨大的经济损失。为防治水产疾病以及提高水产生物的免疫功能,免疫增强剂这些年来备受关注。因此,本着预防为主,治疗为辅的原则,防治水产养殖疾病需要在疾病爆发前,提高水产品的免疫力,用水产养殖生物的自生免疫力来抵抗外来病原的入侵。

[0003] 免疫增强剂是一种通过利用相关化学试剂、细菌及其成分、多糖、动物或植物提取物、营养因子、细胞因子作为原料,刺激免疫系统增强,从而对抗多种养殖病菌。在水产养殖应用中,多糖是比较常用的免疫增强剂,如从甲壳类动物中提取的壳聚糖(Chitosan)被应用在多种水产养殖增强实验中,显现出相关免疫功效,如减少病菌感染,提高溶菌酶活力,增强旁路补体系统等。壳聚糖,又称脱乙酰甲壳素,由几丁质经过脱乙酰作用得到。壳聚糖是阳离子聚合物,是自然界中少见的天然带正电荷的高分子聚合物,由于其来源丰富、价格低廉且在食品、化工领域均有广泛的用途而倍受关注。此外,壳聚糖因其分子结构上有丰富的亲水性羟基(-OH)和氨基(-NH<sub>2</sub>)基团,使其具有良好的组织相容性,生物可降解。因此,壳聚糖常用于吸附、包埋活性成分来提高成分的利用率,特别是在纳米材料合成上具有良好的可控性。

[0004] 硒是人体必需的十五种微量元素之一,能提高牲畜免疫力。如今全球约有40多个国家或地区存在缺硒的问题,我国也有多个缺硒或低硒地区。硒是一种强抗氧化成分,能够有效的保护机体对抗氧化压力,有助于提高免疫系统及其淋巴细胞的分裂和分化。近年来,利用纳米技术获得的纳米硒,因其生物利用度高、毒性低和生物活性显著而成为新的研究热点。在鱼类饲料中添加纳米硒后,养殖投药量减少,鱼类抗病力增强,且肉质改善。

[0005] 国内外关于水产养殖免疫增强剂的研究,都只集中在评估单一材料的功效,几乎没有研究同时使用两种或以上的材料。最理想的免疫增强剂应该具有对水产生物有营养价值,能激发广泛的抗菌非特异性免疫反应,掺入食物和水后稳定性高,并与其它药物兼容,产品价格便宜,且对人体有营养价值。现在水产养殖业中,一般使用化学药品增强鱼类免疫力,但后果导致化学药物残留和潜在毒性等食品安全问题。相反,硒是动物和人类必需的微量元素,壳聚糖也是传统的水产免疫增强剂,使用两种传统免疫增强材料能够提高

宿主的免疫功能，减少水产养殖中抗生素和化学药品的使用和残留，并且为我国国民缺硒问题提供营养补充。目前纳米硒的制备方法通常为还原法，具体是利用硒的含氧酸盐或氧化物通过各种还原反应制得纳米硒，并同时使用修饰剂或调控剂对粒径和形貌进行修饰调控。但是，现有的各种纳米硒的制备方法中，很少有考虑其应用需求，不能有效的提高纳米单质硒的生物活性，尤其是不能提高机体的免疫力，也就是常规方法获得的产物并不是功能化的纳米硒。

## 发明内容

[0006] 针对水产养殖业现有的水产疾病防控缺乏有效的免疫增强剂的问题，本发明提供一种有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶及制备方法。

[0007] 另一方面，本发明还提供上述有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的保存方法。

[0008] 以及上述有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶作为水产免疫增强剂的应用。

[0009] 为达到上述发明目的，本发明采用的技术方案如下：

[0010] 一种有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶，含有如下浓度的组分：

[0011] 纳米硒0.5mmol/L~5.0mmol/L；

[0012] 功能化的壳聚糖100.0mg/L~1000.0mg/L。

[0013] 相应地，上述有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的制备方法，包括以下步骤：

[0014] 步骤S01.向功能化的壳聚糖水溶液中加入含硒离子和/或亚硒离子的溶液，获得混合溶液；

[0015] 步骤S02.向步骤S01获得的混合溶液中加入还原剂溶液，混合使其发生还原反应，获得反应产物；

[0016] 步骤S03.对步骤S02获得的反应产物进行定容、透析处理，获得有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶。

[0017] 相应地，所述有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的保存方法，是在0~10℃的环境中保存，保存期为30~60天。

[0018] 以及，相应地，一种水产免疫增强剂，其含有如上所述的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶。

[0019] 本发明的有益效果为：

[0020] 相对于现有技术，本发明提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶，借助了壳聚糖中的多羟基结构能对纳米硒发挥很强的物理吸附作用，避免纳米硒进一步聚集沉淀，同时有效地对纳米硒表面进行修饰，以实现纳米硒粒径的调控，并使得纳米硒在水溶胶中保持稳定，同时，以壳聚糖作为纳米硒的功能化分子，与纳米硒生理功效相互协同促进，共同发挥免疫功能增强活性。

[0021] 本发明提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的制备方法，只需常温常压下，以功能化的壳聚糖、含有亚硒离子和/或硒离子的溶液结合还原剂即可成功制备具有生物活性尤其是免疫增强活性的纳米硒水溶液。此方法不需要添加其他任何模板剂，避免了在实际应用中可能产生的不良效果。因此，本方法制备步骤简单、制备条件简易、工艺

简便可行、能够进行大规模生产的特点。

[0022] 本发明提供的壳聚糖纳米硒水溶胶的保存方法,在0~10℃下可以保存 30~60天而不发生沉聚,并且粒径变化小,有利于大规模制备并保存。

[0023] 本发明提供的水产免疫增强剂,由于其含有上述的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶,使得水产免疫增强剂同时含有壳聚糖与纳米硒,两者的生理功能相互促进,发挥协同免疫增强功能,将其与水产饲料混合使用可以提高水产生物的免疫力还能提高水产生物的硒含量。这是由于壳聚糖作用于宿主的非特异性免疫系统,加之纳米硒调节特异性免疫及机体抗氧化作用。另外,壳聚糖分子链上具有亲水性的羟基(-OH)和带有正价键的氨基(-NH<sub>2</sub>)基团。壳聚糖在鱼类肠道中的吸收通过黏膜黏附机制,通过离子相互作用,使得带有正价键的壳聚糖和鱼类肠道黏膜中带有负价键的唾液酸残基结合,使其具有良好的组织相容性,生物可利用率高。增强纳米硒与免疫细胞的亲和力,提高免疫细胞对纳米硒的摄取量,进而达到减少用药剂量,提高水产生物非特异性免疫功能、特异性免疫功能的整体免疫增强效果,为水产养殖业生产和发展提供了一种更加行之有效的方案。

## 附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅为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。

[0025] 图1是本发明实施例1提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的粒径分布图;

[0026] 图2是本发明实施例1提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的TEM形貌图;

[0027] 图3是本发明实施例1提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的TEM形貌图;

[0028] 图4是本发明实施例1提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的TEM形貌图以及硒原子层的间距;

[0029] 图5是本发明实施例1提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的EDX元素分析图;

[0030] 图6是本发明实施例1提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的主要功能基团比较图;

[0031] 图7是本发明实施例2提供的不同浓度的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶与饲料混合后并投喂给斑马鱼,斑马鱼摄食后肌肉组织中硒含量图;

[0032] 图8是本发明实施例2提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶混入饲料中制成含不同浓度的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的饲料并投喂给斑马鱼后抗嗜水气单胞菌感染斑马鱼存活率情况的统计图;

[0033] 图9是本发明实施例3提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶制成不同浓度的饲料并投喂给斑马鱼后,斑马鱼血清溶菌酶活性实验(非特异性免疫反应)的统计图;

[0034] 图10是本发明实施例3提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶制成不同

浓度的饲料并投喂给斑马鱼后,斑马鱼淋巴细胞增殖实验(特异性免疫反应)的统计图。

### 具体实施方式

[0035] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结果附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0036] 本发明提供一种有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶。

[0037] 该壳聚糖纳米硒水溶胶含有以下浓度的组分:

[0038] 纳米硒 0.5mmol/L~5.0mmol/L;

[0039] 功能化的壳聚糖 100.0mg/L~1000.0mg/L。

[0040] 在任一实施例中,功能化的壳聚糖指的是壳聚糖溶解于有机酸后得到的壳聚糖,将壳聚糖溶于有机酸后可以提高壳聚糖的水溶性,从而使得壳聚糖在形成水溶胶前以水溶液的形式存在。

[0041] 本发明提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶,以具有免疫调节作用的功能化的壳聚糖作为纳米硒的功能化分子,采用壳聚糖的非特异性免疫增强功效和纳米硒的特异性细胞免疫调节功能相互协调促进,共同发挥强力的免疫效果,为水产养殖业生产和病害防治提供了一种很好的方案。

[0042] 本发明的壳聚糖纳米硒水溶胶的粒径为50nm~150nm,粒径分布均匀,分散性良好,在0~10℃中保存30~60天不发生沉聚。

[0043] 相应地,在提供有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的基础上,本发明还进一步提供该有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的制备方法。

[0044] 在一实施例中,该有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的制备方法,包括以下步骤:

[0045] 步骤S01向功能化的壳聚糖水溶液中加入含硒离子和/或亚硒离子的溶液,获得混合溶液;

[0046] 步骤S02.向步骤S01获得的混合溶液中滴加还原剂溶液,混合使其发生还原反应,获得反应产物;

[0047] 步骤S03.对步骤S02获得的反应产物进行定容、透析处理,获得有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶。

[0048] 在任一实施例中,壳聚糖通过有机酸溶液溶解,得到功能化的壳聚糖,且功能化的壳聚糖水溶性变得比壳聚糖更为良好,以功能化壳聚糖水溶液的形式存在。

[0049] 上述的有机酸溶液可以是柠檬酸溶液、醋酸溶液中的任一种,并且所述有机酸为食用级有机酸,以确保获得的壳聚糖纳米硒水溶胶可作为水产生物的免疫增强剂。

[0050] 在还原反应过程中,功能化的壳聚糖与硒离子的投料比例为,功能化的壳聚糖(按克计):硒离子(按摩尔计)=20~2000(g):1(mol),或者功能化的壳聚糖(按克计):亚硒离子(按摩尔计)=20~2000(g):1(mol);或者功能化的壳聚糖(按克计):硒离子和亚硒离子的混合摩尔量=20~2000(g):1(mol)。在该投料比例下,功能化的壳聚糖能够与硒离子和/或亚硒离子形成物料分布均匀的水溶胶状态。

[0051] 作为优选地,本发明还原反应过程中控制功能化的壳聚糖水溶液的浓度在

120mg/L~1200mg/L范围内,在该浓度下,可以确保透析处理后获得的壳聚糖 纳米硒水溶胶中,功能化的壳聚糖的浓度达到100.0mg/L~1000.0mg/L。在该浓度下,制备得到的壳聚糖纳米硒水溶胶其平均粒径能保持在大约100nm左右,在30~60日内粒径变化不大,仍然维持在50~150nm之间,表现出良好的稳定性。

[0052] 在任一优选实施例中,含硒离子的溶液、或含亚硒离子的溶液、或同时含 硒离子和亚硒离子的混合溶液的浓度为0.6mmol/L~6.0mmol/L。在该浓度下,制备得到的壳聚糖纳米硒水溶胶其平均粒径能保持在大约100nm左右,在30~60日内,其粒径基本维持在50~150nm,粒径变化不大,均一性良好,并且 呈现出良好的稳定性。

[0053] 含硒离子的溶液可以采用硒酸盐进行配制,而含亚硒离子的溶液可以采用 二氧化硒和/或亚硒酸盐进行配制。

[0054] 进一步地,亚硒酸盐中亚硒酸钠是保健食品的成分,安全性比较高,因此 采用亚硒酸钠为溶质进行配制。

[0055] 在任一实施例中,还原剂溶液的浓度为2.4mmol/L~42.0mmol/L。

[0056] 作为优选地,由于维生素C是食品工业中常用的还原剂,不仅还原活性高, 而且安全性高,因此,可作为还原剂的首选。

[0057] 在上述还原反应中,当为含硒离子的溶液与还原剂进行混合发生还原反应 时,按照硒离子与还原剂的摩尔比为1:4~1:7的比例投入含硒离子的溶液和还 原剂,以确保还原剂稍微过量,将硒离子充分还原成纳米硒;当投入的原料为 含亚硒离子的溶液与还原剂时,按照亚硒离子与还原剂的摩尔比为1:4~1:7的 比例投入含亚硒离子的溶液和还原剂,以确保还原剂稍微过量,将亚硒离子充 分还原成纳米硒;而当投入的原料为同时含亚硒离子和硒离子的溶液与还原剂 时,投入的硒离子和亚硒离子总的摩尔量与还原剂的摩尔量 之比为1:4~1:7,确 保硒离子和亚硒离子完全被还原成纳米硒。

[0058] 上述步骤S02后,还可以进一步包括对获得的反应产物进行定容、透析处 理,形成最终的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶。

[0059] 具体地,定容后,应当等待产物出现的红色不再加深,然后再进行透析, 一般透析时间为24h及以上。

[0060] 在任一优选实施例中,选择在15℃~35℃,1个标准大气压的环境中制备, 以保证反应外界环境稳定。此外,不仅制备条件节能环保,而且安全性高,有 利于进行大规模生 产。

[0061] 本发明提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的制备方法,只需常 温常 压,以功能化的壳聚糖、含硒离子/亚硒离子的溶液结合还原剂即可成功制 备,并且得到的 有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶具有良好的生物活性。

[0062] 该方法成功制备的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶,具体是凭借功 能化的壳聚糖固有的多羟基结构,对纳米硒发挥很强的物理吸附作用,很好的 调控纳米硒的粒 径,并稳定纳米硒,避免纳米硒进一步发生聚集沉淀;同时, 此方法不需要添加其他任何模 板剂,避免了在实际应用中可能产生的不良效果。因此,本方法具有制备步骤简单、制备条 件简易、工艺简便可行、能够进行大 规模生产的特点。

[0063] 相应地,在提供该有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的制备方法的基 础上, 本发明还进一步提供了该有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的保存 方法。具体是将

得到的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶置于0~10℃的环境中保藏,其保藏时间为30~60天。

[0064] 在任一实施例中,本发明提供的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶不仅具有生物免疫活性,而且可提高鱼类肌肉组织中硒的含量,为食用者提供可靠安全的可食用硒源,因此,本发明还进一步提供一种水产免疫增强剂。

[0065] 该水产免疫增强剂中含有有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶,所述有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶为本发明上述提到的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶,且其在水产免疫增强剂中的质量含量为1.0%~100%。

[0066] 该水产免疫增强剂用于水产生物上时,可以通过混入水产养殖饲料中,混合均匀后给水产生物投喂。摄食了含有该水产免疫增强剂的水产生物,免疫力提高,可用于提高鱼类等水产生物在水产养殖过程中被常见病菌感染下的存活率,并且体内的硒含量同样提高。

[0067] 当本发明的水产免疫增强剂用于增强水产生物免疫功能和水产养殖病害防治领域时,分别通过功能化的壳聚糖作用于宿主的非特异性免疫系统,加之纳米硒调节特异性免疫及机体抗氧化作用。这是由于对壳聚糖进行功能化后,壳聚糖在弱酸性水溶液中,以电解质的形式存在,即有机酸中的质子与壳聚糖上的氨基作用形成铵盐,破坏壳聚糖分子间的氢键从而溶解在水中。纳米硒被壳聚糖中的多羟基结构进行物理吸附,从而防止聚集沉淀。有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶中,功能化的壳聚糖分子链上除了有亲水性的羟基(-OH)还含有质子化的氨基,从而带有正电荷,可以在鱼类肠道吸收中通过黏膜黏附的机制,通过离子相互作用使得带有正价键的壳聚糖和鱼类肠道黏膜中带有负价键的唾液酸残基结合,使其具有良好的组织相容性,生物可利用率高。而纳米硒具有调节特异性免疫系统的功效,并提高机体的抗氧化作用。

[0068] 为了更好的说明本发明提供的壳聚糖纳米硒水溶胶及制备方法和应用技术,下面通过实施例做进一步的举例说明。

[0069] 实施例1

[0070] 一种有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的制备方法,包括以下步骤:

[0071] (1). 在20℃,101.325kPa下,取质量浓度为3000mg/L的功能化的壳聚糖水溶液1.0mL、2.0mL、10mL分别加入装有5mL双蒸水的25mL容量瓶(容量瓶编号为1#、2#、3#)中,其中功能化的壳聚糖为采用柠檬酸处理的壳聚糖,功能化的壳聚糖的平均分子量为200000Da;

[0072] (2). 向上述编号为1#、2#、3#的25mL容量瓶中分别加入浓度为60mmol/L的亚硒酸钠溶液0.25mL、1.0mL、2.5mL,轻轻摇匀,使之充分混合,得到混合溶液;

[0073] (3). 向(2)的混合溶液中滴加浓度为320mmol/L的维生素C溶液0.19mL、1.0mL、3.29mL,边滴加边轻轻摇匀,滴加完毕,加水定容至25mL,静置,待红色不再加深,然后透析(截留分子量8000)24h,即可得到产物。经硝化ICP方法测定硒含量,可知获得的产物中,纳米硒浓度约为0.5~5.0mmol/L,壳聚糖浓度为100.0mg/L~1000.0mg/L。

[0074] 将获得的产物置于0℃~10℃环境中,产物以水溶胶的形态存在。

[0075] 采用检测仪器,对实施例1获得的产物进行表征,测试主要包括以下内容:

[0076] 用Nanosight NS3000颗粒跟踪分析仪(Malvern)测定产物中的纳米粒子平均粒

径、SD(标准偏差)及粒径分布详见图1。

[0077] 用JEM-2010型高解像投射电子显微镜(JEOL)表征实施例1的产物形貌,详见图2、3、4。

[0078] 用JEM-2010型高解像投射电子显微镜(JEOL)和EX-250型光能源扩散分析仪(Horiba)表征实施例1产物的EDX元素分析图,结果详见图5。

[0079] 用Equinox55型傅里叶变换红外光谱仪(Bruker)表征及比较实施例1产物与壳聚糖的主要功能基团,结果详见图6。

[0080] 表1实施例1获得的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒颗粒的平均粒径和标准偏差

容量瓶编号	1#	2#	3#
壳聚糖纳米硒颗粒平均粒径(nm)	112	117	101
标准偏差(SD)	27	32	19

[0082] 从图1和表1可知,当加功能化的壳聚糖水溶液获得的产物中,Nanosight NS3000颗粒跟踪分析仪(Malvern)测定平均粒径为100nm左右,说明功能化的壳聚糖对硒离子具有很好的包裹作用,生成的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒颗粒粒径范围在85-149nm之间,功能化的壳聚糖多糖对纳米硒粒径具有很好的调控作用,SD值均较小,表明纳米硒粒径分布较窄。

[0083] 从图2、3、4可知,实施例1产物的分散性好,产物为球形纳米硒,硒原子层的间距为 $4.33\text{\AA}$  (SD=0.06 nm)。

[0084] 从图5可知,获得的产物,主要元素为硒元素。

[0085] 从图6可知,壳聚糖(Chitosan)和壳聚糖纳米硒(CTS-SeNP)对比可得,其羟基(-OH)的伸缩振动由 $3456.13\text{cm}^{-1}$ 移动至 $3417.92\text{cm}^{-1}$ ,吸收峰的蓝移,说明功能化的壳聚糖通过羟基结合到纳米硒的表面。功能化的壳聚糖与纳米硒的结合,其一有利于提高纳米硒的稳定性;其二提高纳米硒的生物相容性。

[0086] 综上可知,采用功能化的壳聚糖、亚硒酸钠及维生素C进行反应获得的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶,具体是借助了功能化的壳聚糖中多糖部分的多羟基结构,对纳米硒发挥很强的物理吸附作用,避免纳米硒进一步聚集沉淀,同时有效地对纳米硒表面进行修饰,以实现纳米硒的粒径调控,并使壳聚糖纳米硒水溶胶保持稳定。

[0087] 实施例2

[0088] 一种有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的制备方法和作为水产免疫增强剂的应用,其制备方法包括以下步骤:

[0089] (1). 在 $20^{\circ}\text{C}$ ,  $101.325\text{kPa}$ 下,取质量浓度为 $3000\text{mg/L}$ 的功能化的壳聚糖水溶液 $2.0\text{mL}$ ,加入装有 $5\text{mL}$ 双蒸水的 $25\text{mL}$ 容量瓶中,所述功能化的壳聚糖为将壳聚糖与柠檬酸进行混合,使得壳聚糖水溶性提高,功能化的壳聚糖平均分子量为 $200000\text{Da}$ ;

[0090] (2). 向上述 $25\text{mL}$ 的容量瓶中加入浓度为 $60\text{mmol/L}$ 的亚硒酸钠溶液 $1.0\text{mL}$ ,轻轻摇匀,使之充分混合,得到混合溶液;

[0091] (3). 向(2)的混合溶液中滴加浓度为 $320\text{mmol/L}$ 的维生素C溶液 $1.0\text{mL}$ ,边滴加边轻轻摇匀,滴加完毕,加水定容至 $25\text{mL}$ ,静置,待红色不再加深,然后透析(截留分子量 $8000$ ) $24\text{h}$ ,即可得到产物,经硝化ICP方法测定硒含量,可知获得的产物中,纳米硒浓度约

为2.35mmol/L,功能化的壳聚糖的浓度为 240mg/L,可见该产物为有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶。

[0092] 有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶作为水产免疫增强剂的应用,具体 是将其加入到水产饲料中并投喂给水产生物。

[0093] 其加入和使用方法如下:

[0094] 将(3)中制备好的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶,按照不同浓度分 别添加到饲料中,得到含有0 $\mu$ g/g、2 $\mu$ g/g、5 $\mu$ g/g、10 $\mu$ g/g、20 $\mu$ g/g的有免疫增 强功效的壳聚糖纳 米硒水溶胶的饲料。

[0095] 用ICP-MS(Agilent 7500)电感耦合等离子体质谱测定摄食不同浓度的有免 疫增 强功效的壳聚糖纳米硒的斑马鱼肌肉组织的硒含量变化,详见图7。

[0096] 对产物进行水产养殖疾病病源攻毒实验,使用含有不同浓度的有免疫增强 功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的饲料(0 $\mu$ g/g、2 $\mu$ g/g、5 $\mu$ g/g、10 $\mu$ g/g、20 $\mu$ g/g)喂食 斑马鱼9天后, 用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)进行斑马鱼的皮下攻毒 实验,96h后观察其免疫 增强情况,结果详见图8。

[0097] 从图7可知,有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶可以有效的为鱼类提 供硒元 素,在不同浓度作用下,可以相应的提高鱼类肌肉组织中的硒含量,同 时为食用者提供可 靠安全的可食用硒源。

[0098] 从图8可知,包含了有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的饲料可以很 好的抑 制嗜水性单胞菌感染斑马鱼,斑马鱼存活率与添加有免疫增强功效的壳 聚糖纳米硒的饲 料浓度出现了剂量效应,鱼类饲料中添加5-20 $\mu$ g/g的壳聚糖纳 米硒作为水产免疫增强剂 能提高鱼类的免疫功能,并且在有效控制成本的条件 下,帮助鱼类抵抗病菌感染。

[0099] 实施例3

[0100] 一种有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的制备方法和作为水产免疫增 强剂 的应用,其制备方法包括以下步骤:

[0101] (1).在20 $^{\circ}$ C,101.325kPa下,取质量浓度为3000mg/L的壳聚糖多糖水溶液 2.0mL 加入装有5mL双蒸水的25mL容量瓶中;

[0102] (2).向上述25mL的容量瓶中加入浓度为60mmol/L的亚硒酸钠溶液1.0mL, 轻轻摇 匀,使之充分混合,得到混合溶液;

[0103] (3).向(2)的混合溶液中滴加浓度为320mo1/L的维生素C溶液1.0mL,边滴 加边轻 轻摇匀,滴加完毕,加水定容至25mL,静置,待红色不再加深,然后 透析(截留分子量8000) 24h,即可得到产物,经硝化ICP方法测定硒含量,可知 获得的产物中,纳米硒浓度约为 2.35mmol/L,功能化的壳聚糖的浓度为 240mg/L,可见该产物为有免疫增强功效的壳聚糖 纳米硒水溶胶。

[0104] 有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶作为水产免疫增强剂的应用,具体 是将其加入到水产饲料中并投喂给水产生物。

[0105] 其加入和使用方法如下:

[0106] 将(3)中制备好的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶按照不同浓度分 别添 加到饲料中,得到含有0 $\mu$ g/g、2 $\mu$ g/g、5 $\mu$ g/g、10 $\mu$ g/g、20 $\mu$ g/g的有免疫增 强功效的壳聚糖纳 米硒水溶胶的饲料。

[0107] 对产物进行血清溶菌酶活性实验(非特异性免疫反应)和淋巴细胞增殖实验(特异性免疫反应),分别使用添加了不同浓度的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的饲料(0 $\mu\text{g/g}$ 、2 $\mu\text{g/g}$ 、5 $\mu\text{g/g}$ 、10 $\mu\text{g/g}$ 、20 $\mu\text{g/g}$ )喂食斑马鱼9天后,取斑马鱼血清进行溶菌酶活性实验,脾脏细胞进行淋巴细胞增殖实验,详见图9、图10。

[0108] 从图9可知,添加了有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的饲料可以很好的提高斑马鱼血清溶菌酶的活性,并且血清溶菌酶活性与添加的有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的浓度出现了剂量效应,根据图9可以考虑在将有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶作为水产免疫增强剂时,其添加浓度为5~20 $\mu\text{g/g}$ 。

[0109] 从图10可知,添加了有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶的饲料可以很好的提高斑马鱼T淋巴细胞的增殖能力,并且在有免疫增强功效的壳聚糖纳米硒水溶胶添加的浓度为5~20 $\mu\text{g/g}$ 时,T淋巴细胞的增殖能力相对于其他浓度更优。

[0110] 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。

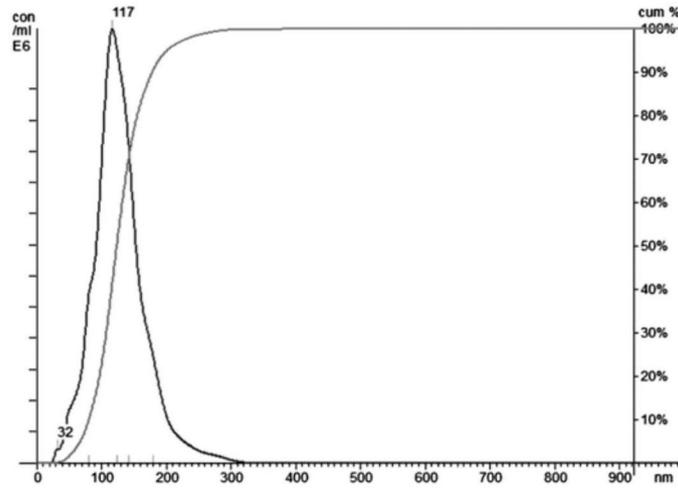


图1

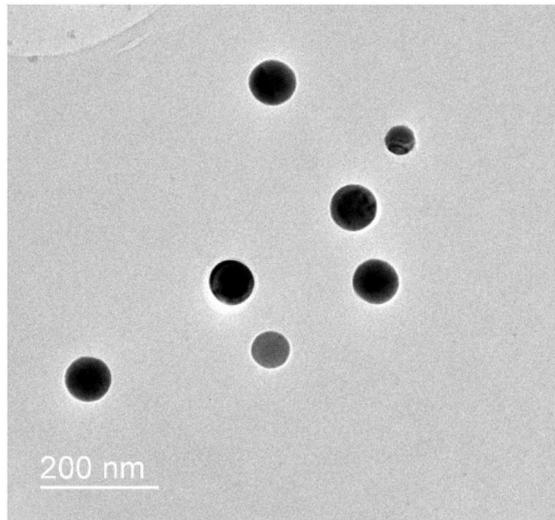


图2

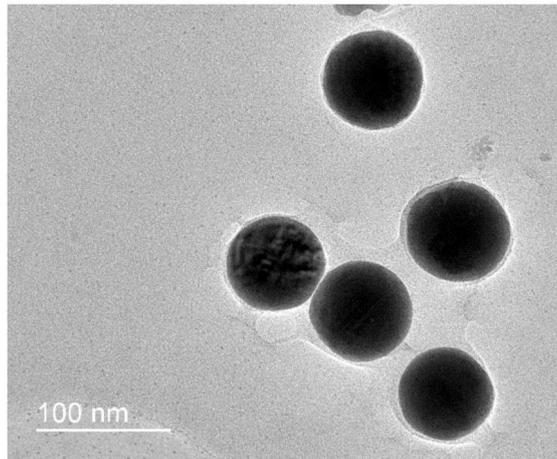


图3

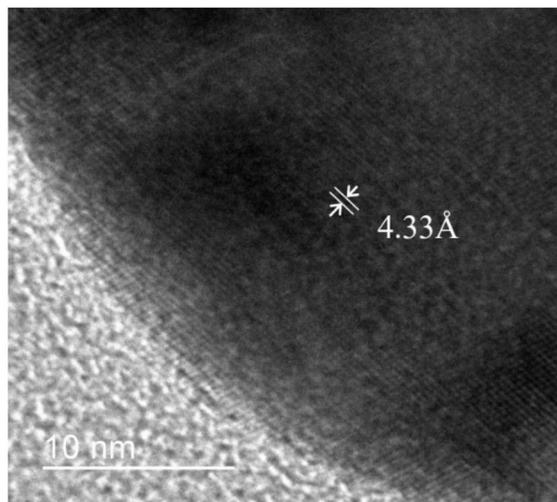


图4

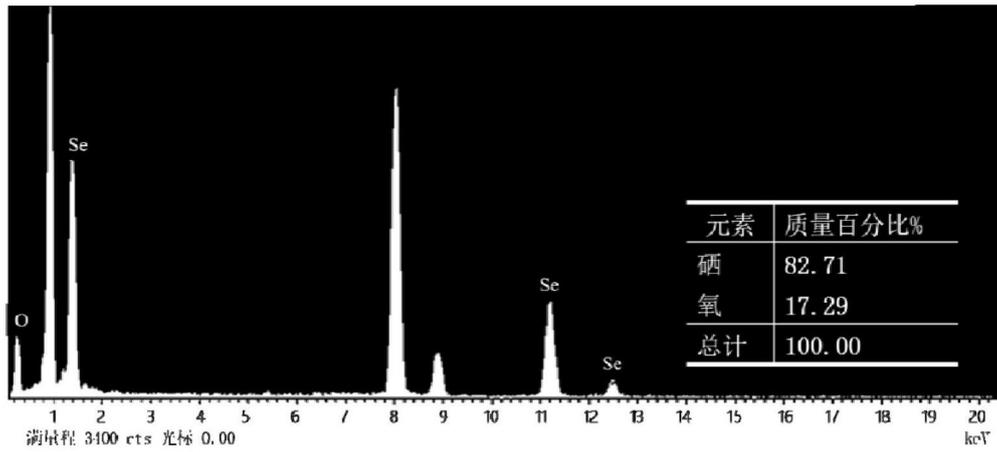


图5

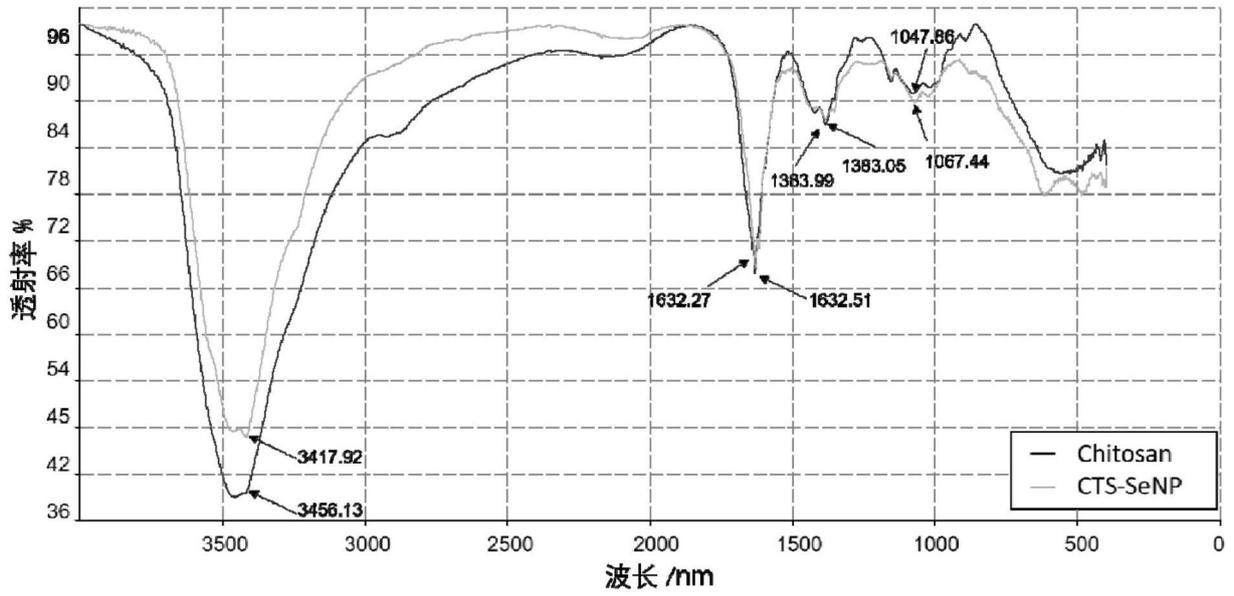


图6

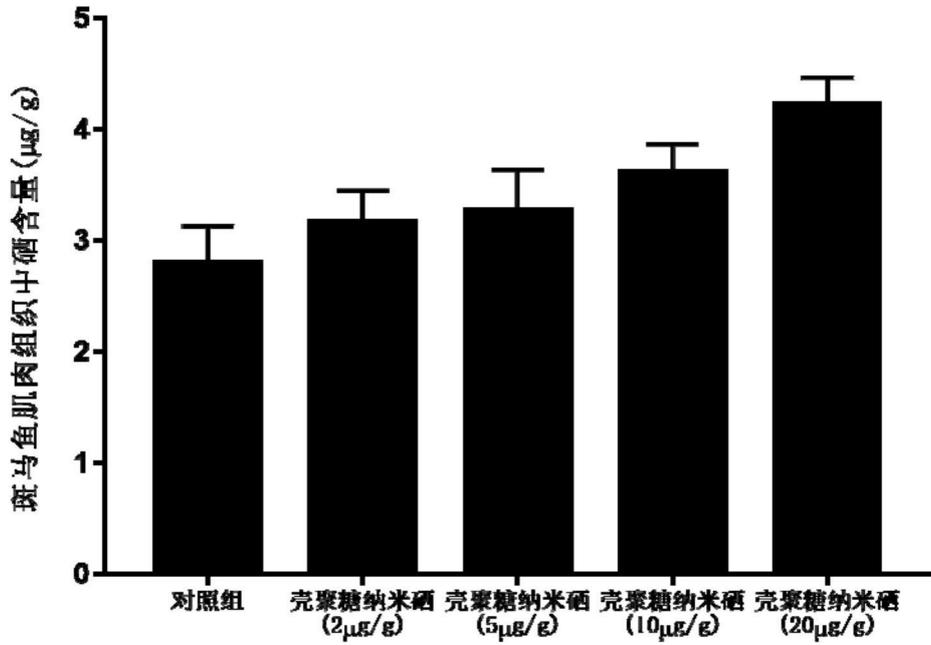


图7

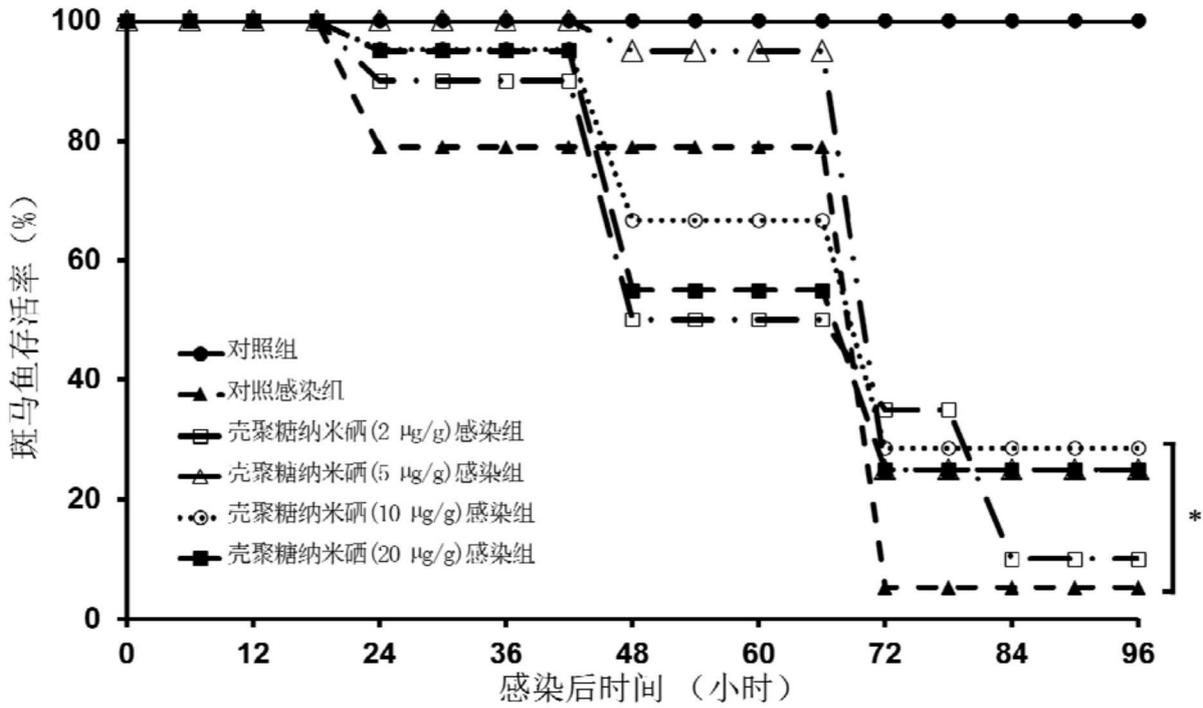


图8

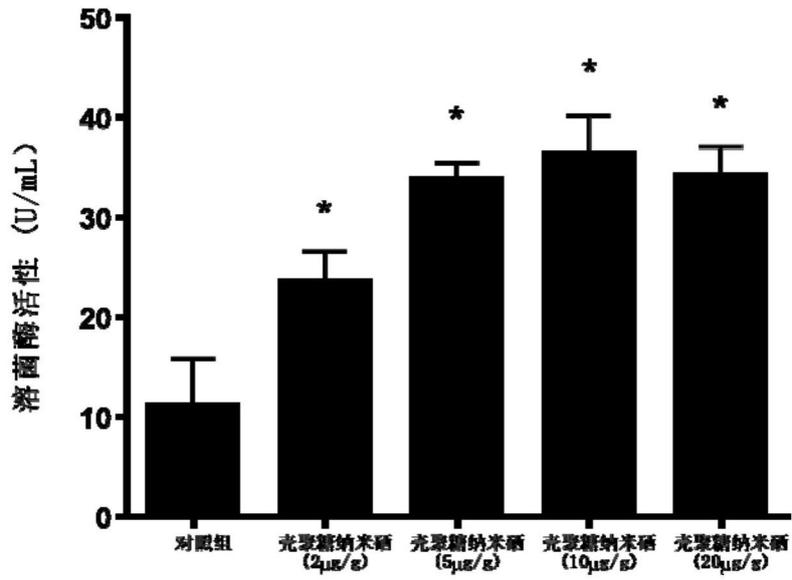


图9

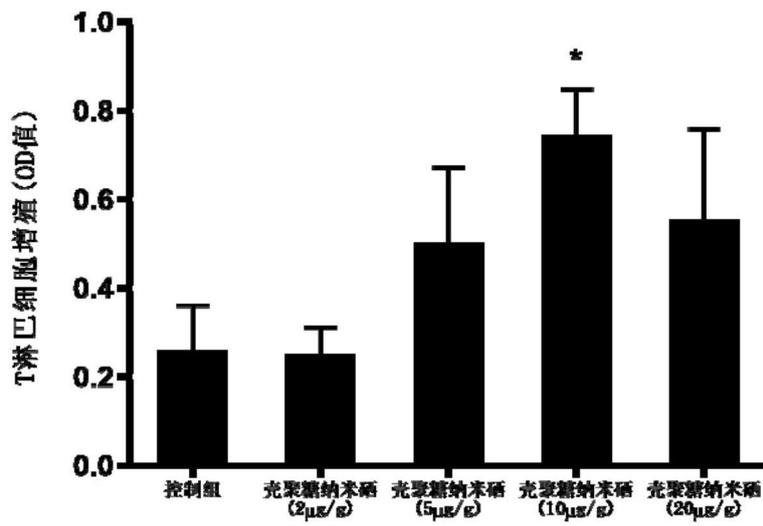


图10