

doi: 10.7541/2018.088

发酵豆粕替代鱼粉和豆粕对罗氏沼虾生长、血清生化及免疫基因表达的影响

杨景丰^{1,2,3} 华雪铭^{1,2,3} 郭子好⁴ 刘 韬^{1,2,3} 孔 纯^{1,2,3}
冯 悦^{1,2,3} 王 刚^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学农业部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 4. 上海源耀生物股份有限公司, 上海 201306)

摘要: 为研究发酵豆粕在罗氏沼虾饲料中的适宜用量及替代后可能造成的影响, 以含有30%鱼粉和18%豆粕的饲料为基础饲料(T0组), 分别用2% (T2组)、5% (T5组)、8% (T8组)、15% (T15组)的发酵豆粕等蛋白替代基础饲料中的鱼粉和豆粕(2:1), 共配制5种等氮等能的实验饲料。选用初始均重为(0.17±0.02) g的罗氏沼虾在室内水泥池网箱中进行为期64d的养殖实验。结果显示, 发酵豆粕对鱼粉和豆粕的替代量影响罗氏沼虾的生长、血清生化及免疫基因表达。随着发酵豆粕添加量的增加, 增重率和特定增长率呈先升后降的趋势, 都以T8组最高。血清中丙二醛含量、超氧化物歧化酶活力随发酵豆粕添加量的增加均呈先升后降的趋势, 各替代组丙二醛含量均显著高于对照组($P<0.05$); 血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶活性和总蛋白含量呈先下降后上升的趋势, 且替代组不同程度低于对照组; T15组*Toll*受体、*NF-κB*、*HSP70*转录水平表达量显著高于其他各组($P<0.05$)。以上结果表明用不同水平的发酵豆粕替代鱼粉和豆粕, 显著影响罗氏沼虾的生长性能、抗氧化能力及免疫机能; 在实验条件下, 罗氏沼虾饲料中的发酵豆粕最佳使用量为8%。

关键词: 罗氏沼虾; 鱼粉; 豆粕; 发酵豆粕; 血清生化; 免疫基因

中图分类号: S966.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2018)04-0719-09

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)又称马来西亚大虾、淡水长臂大虾, 具有生长快、食性广、肉质营养成分好、养殖周期短、体质强壮、抗病能力强等优点, 有淡水虾王之称, 是世界淡水虾类养殖的主要品种之一。近几年, 对虾病毒性流行病频发, 对虾养殖区域效益下降, 促使罗氏沼虾养殖业在国内得到迅速发展, 以广州、上海、浙江、江苏一带较为出名, 其产量占到全国罗氏沼虾养殖总产量的80%, 为整个行业作出了巨大贡献^[1]。然而, 受世界渔业资源状况的影响, 鱼粉价格的飙升使罗氏沼虾配合饲料的成本大幅提高。寻找利用优质蛋白源替代鱼粉, 减小对鱼粉的依赖, 在不影响生长的前提下降低饲料的价格, 实现水产养殖可持续发展, 将在较长时间内成为水产饲料业的研

究热点。

豆粕是饲料工业应用最为广泛的植物性蛋白源, 蛋白含量高, 相较于其他植物性蛋白源豆粕的营养成分比较齐全且均衡, 更符合多数动物的营养需求^[2,3]。研究发现, 豆粕替代鱼粉的效果因水产动物的种类而存在差异, 但趋势均是超过适宜的替代比例后, 会对动物产生负面效果。这通常是由于豆粕中的氨基酸不平衡, 尤其蛋氨酸和赖氨酸是第一限制性氨基酸^[4]及替代后败风味物质逐渐增多所产生的适口性问题^[5,6]降低了豆粕的利用率。此外还与豆粕中含有的大豆抗原蛋白、胰蛋白酶抑制剂、凝集素等许多抗营养因子相关, 如诱发肠道病变, 影响对营养物质的吸收利用, 产生拮抗作用抑制动物的摄食^[7-10], 最终限制了水产动物的生长。

收稿日期: 2017-08-21; **修订日期:** 2018-02-19

基金项目: 上海市科委高校能力建设项目(14320502000); 农业部淡水水产种质资源重点实验室开放课题资助 [Supported by Shanghai Science and Technology Committee (14320502000); Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources]

作者简介: 杨景丰(1991—), 男, 河北沧州人; 硕士研究生; 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: 1014299589@qq.com

通信作者: 华雪铭(1974—), 女, 副教授, 硕士生导师; 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: xmhua@shou.edu.cn

在这些抗营养因子当中,热稳定性的大豆抗原蛋白含量最高并且是大豆的主要营养成分,在仔猪(*Sus*)^[11]、建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)^[12]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[13]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[14]等动物上已有研究表明其能够诱导肠黏膜损伤和肠绒毛畸形,同时激活机体特异性和非特异性免疫,如特异性IgE介导的I型过敏反应、上调Toll受体和NF- κ B等相关免疫基因表达量、增加免疫细胞数量和增加相关酶活力参与宿主防御异物的免疫反应;机体损伤、氧化应激等作用后导致细胞发生热休克反应,使得过多的内源性氨基酸用于参与这些反应,从而导致生长性能下降。研究表明,豆粕经微生物发酵可以大大降低大豆抗原蛋白的含量,同时,蛋白质分解产生的多种小肽和游离氨基酸更易被动物吸收,并具有较好的适口性^[15]。这就为提高豆粕的利用率,进一步增加鱼粉的替代水平,降低饲料价格提供了契机,对绿色健康高效养殖具有着重要的意义。有关发酵豆粕替代鱼粉的研究,实验动物以鱼类^[16-18]和凡纳滨对虾^[19]为主,结果证实发酵豆粕替代鱼粉的效果优于普通豆粕,对动物健康影响较小。在罗氏沼虾上,董云伟等^[20]利用42%豆粕替代鱼粉,使鱼粉含量从62.5%降至31.2%时不会对其生长造成不良影响,而应用发酵豆粕降低饲料中抗营养因子的同时能否进一步替代鱼粉,以及对罗氏沼虾影响的研究未见报道。

本研究以罗氏沼虾为研究对象,用发酵豆粕替代饲料中鱼粉和豆粕,以降低饲料中大豆抗原蛋白的含量,同时补充晶体氨基酸以满足实验虾的营养需求,探讨发酵豆粕替代鱼粉和豆粕对罗氏沼虾生长性能、抗氧化能力及免疫机能的影响,旨在了解发酵豆粕在罗氏沼虾饲料中的适宜用量及对鱼粉和豆粕的适宜替代量,为发酵豆粕的合理利用和罗氏沼虾饲料的配方优化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

首先根据罗氏沼虾的营养需求,以秘鲁鱼粉、肉粉、豆粕、玉米蛋白粉、花生粕为蛋白源,配制基础饲料作为对照组(T0);再分别用2%(T2)、5%(T5)、8%(T8)、15%(T15)的发酵豆粕替代基础饲料中的鱼粉和豆粕(2:1),共配制出5种等氮等能的实验饲料(表1)。将各种饲料原料粉碎,过80目筛,按配方称重用逐级扩大法混合均匀,添加鱼油和适量水用绞肉机加工成直径1.5 mm的条状物,90℃熟化20min,避光晾干后破碎成实验虾可摄食的大小,

装自封袋室温保存备用。

1.2 饲养管理

养殖实验在上海海洋大学滨海养殖基地进行,罗氏沼虾苗购自上海市水产研究所,预先用漂白粉将暂养池和实验池消毒,冲洗干净。虾苗暂养30d,待幼虾规格达到(0.17±0.02) g时,挑选规格整齐、健康无病的实验虾,分到规格为2 m×1.5 m×1 m的网箱中,共5组,每组设置4个重复,每个重复放养60尾虾。实验开始前用对照组饲料驯养5—7d,待虾能正常摄食且无死亡后开始实验。每天投喂4次(6:00、10:00、16:00、21:30),以早晚投喂为主,日投喂量为罗氏沼虾体重的3%—5%,达表现饱食。实验为期64d,实验期间24h充气,溶解氧≥6 mg/L,不定期吸污换水,进水均用200目筛网过滤,水温为26—30℃,氨氮≤0.3 mg/L, pH 7.8—8.3。

1.3 样品采集和指标测定

养殖实验结束后,停食24h,逐个网箱称重、计数。然后从每个网箱随机取虾12尾,先用1 mL注射器于围心腔处取血淋巴于1.5 mL离心管中;取肝胰腺和鳃放入无菌离心管中,并在液氮中短暂保存;最后将所有样品置于-80℃保存用于后续检测分析。

生长性能测定 成活率(Survival rate, SR, %)=实验结束时虾尾数/实验初始时虾尾数×100

增重率(Weight gain rate, WGR, %)=(终末平均体重-初始平均体重)/初始平均体重×100

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)=(ln终末平均体重-ln初始平均体重)×100/实验周期

饲料系数(Feed conversion ratio, FCR)=平均摄食量/(终末平均体重-初始平均体重)

血清抗氧化和生化指标测定 血淋巴经4℃、10000 r/min离心20min取血清,-20℃保存待测。血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)采用南京建成生物工程有限公司试剂盒检测,谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)用迈瑞全自动生化分析仪测定。

基因表达的荧光定量PCR(qRT-PCR)分析 取-80℃冰箱中保存的各待测组织样本,参照Trizol(Invitrogen)操作说明书提取总RNA。提取的总RNA用紫外分光光度计测量RNA浓度, RNA浓度高于100 ng/μL, OD₂₆₀/OD₂₈₀约为1.8—2.0,则认为RNA可用。用反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)将RNA反转录为cDNA,并保存在-20℃用于qRT-PCR分析。

采用在线Primer3设计Toll受体、HSP70、NF- κ B基因qRT-PCR所用引物,引物序列见表2。反应体积为20 μL,包括:10 μL的Goldstar PCR Master

表 1 饲料组成和营养水平(% , 风干样品)
Tab. 1 Composition and nutrient levels of diets (% , air dry basis)

项目Item	饲料Diet				
	T0	T2	T5	T8	T15
秘鲁鱼粉Peru fish meal	30.00	28.80	27.00	25.50	21.50
玉米蛋白粉Corn gluten meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
豆粕Soybean meal	18.00	17.64	17.10	16.65	15.45
发酵豆粕Fermented soybean meal	0.00	2.00	5.00	8.00	15.00
花生粕Peanut meal	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
肉粉Meat meal	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
面粉Wheat flour	25.10	24.66	24.00	22.95	20.80
复合多矿 ¹ Mineral premix	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
复合多维 ² Vitamin premix	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
乌贼膏Squid meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
鱼油Fish oil	1.20	1.20	1.20	1.20	1.40
磷脂粉Phospholipid meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
蛋氨酸Met	0.30	0.30	0.30	0.30	0.35
赖氨酸Lys	0.70	0.70	0.70	0.70	0.80
苏氨酸Thr	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
合计Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平Nutrient levels					
粗蛋白Crude protein	43.29	43.26	43.23	43.38	43.40
粗脂肪Crude fat	7.07	7.02	6.94	6.88	6.89
粗灰分Ash	9.12	9.03	9.04	8.97	8.90
水分Moisture	10.73	11.31	10.85	10.37	11.40
蛋氨酸Met	1.11	1.10	1.08	1.07	1.09
赖氨酸Lys	3.20	3.19	3.16	3.15	3.21
苏氨酸Thr	1.77	1.77	1.77	1.78	1.77

注: 1. 每千克矿物质预混料含有 mineral premix content per kg: Ca 10.5 g, K 90 g, Mg 12 g, Fe 1.0 g, Cu 3.0 g, Zn 10 g, Mn 3.8 g, Co 0.8 g, Se 20 mg; 2. 每千克维生素预混料含有 vitamin premix content per kg: VA 8000000 IU, VD 2000000 IU, VE 50 g, VK 10 g, VB₁ 5 g, VB₂ 15 g, VB₆ 8 g, VB₁₂ 0.02 g, 烟酰胺nicotinamide 40 g, D-泛酸钙calcium D-pantothenate 25 g, 叶酸folic acid 2.5 g, 生物素biotin 0.08 g, 肌醇inositol 100 g

表 2 qRT-PCR引物序列
Tab. 2 Primers sequence for qRT-PCR

引物名称 Primer name	GenBank 登录号 GenBank accession No.	引物序列 Primer sequence (5'—3')	引物类型 Primer type
Toll receptor	JF895474.1	TCTACGACCGCAACGAGC	Forward
		CGGAGTGGGAGTGAACAG	Reverse
HSP70	HG001455.1	CTCTGCCCAAGCAAGTAT	Forward
		GAATCTGTGCCTTATCCA	Reverse
NF- κ B	KR827675.1	GTGGCTCACTTACGACTC	Forward
		AAGGTCCATACTCTTTGC	Reverse
β -actin	AF221096.1	GTGCGTGACATCAAGGAA	Forward
		TTGTAGGTGGTCTCGTGAAT	Reverse

Mix (2 \times), 上、下游引物各0.6 μ L, 0.4 μ L的Rox, 2 μ L模板, 6.4 μ L ddH₂O。PCR反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10s; 58 $^{\circ}$ C 退火 32s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 32s, 共40个循环。溶解曲线分析: 95 $^{\circ}$ C, 15S; 60 $^{\circ}$ C, 1min; 95 $^{\circ}$ C, 30s; 60 $^{\circ}$ C, 15s。以罗氏沼虾 β -肌动蛋白

为内参, 对得到的各样品循环数(*Ct*)值进行均一化处理, 以对照组(T0组)mRNA为基准, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 比较*Ct*值方法对目的基因相对表达水平进行分析。

1.4 数据处理与统计分析

实验结果用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)的方式

表示,采用SPSS 18.0对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),影响显著时用Duncan氏法进行多重比较, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 生长性能

发酵豆粕替代鱼粉和豆粕对罗氏沼虾生长性能的影响见表3,结果表明各组存活率、饲料系数均无显著性差异($P>0.05$)。实验组罗氏沼虾增重率和特定生长率都呈先上升后下降的变化趋势,以T8组最高,T5、T8组与对照组没有显著性差异($P>0.05$),T2、T15组显著低于对照组($P<0.05$)。

2.2 血清抗氧化和生化指标

血清抗氧化指标(表4)显示,实验组SOD活性和MDA含量随发酵豆粕添加量的增加先升高后降低,T5、T8组SOD活性显著高于对照组($P<0.05$),T15组显著低于对照组($P<0.05$),而实验组MDA含量均显著高于对照组($P<0.05$),且T5组含量最高。

由罗氏沼虾血清生化指标(表5)可知,随发酵

豆粕添加量的增加AST和ALT活性呈先降低后升高趋势,并且除T2组的AST活性外其他各实验组的AST和ALT活性均显著低于对照组($P<0.05$);血清ALB含量在各组间无显著性差异($P>0.05$),T5、T8两组TP含量显著低于对照组($P<0.05$)。

2.3 Toll受体、NF- κ B和HSP70转录水平相对表达量

饲料中发酵豆粕替代鱼粉和豆粕显著影响罗氏沼虾Toll受体、NF- κ B和HSP70转录水平相对表达量(图1—3),其中T15组鳃Toll受体、NF- κ B转录水平相对表达量显著高于其他各组($P<0.05$),而T0、T2、T8组之间无显著性差异($P>0.05$);从肝胰腺HSP70转录水平相对表达量可以看出,T2、T8组显著低于T0组($P<0.05$),而T15组显著高于T0($P<0.05$)。

3 讨论

近几年,关于发酵豆粕在水产动物饲料中的应用研究逐年上升。同豆粕相比,其主要优点是抗营

表3 发酵豆粕替代鱼粉和豆粕对罗氏沼虾生长性能的影响

Tab. 3 Effects of replacement of FM and SBM by FSBM on growth indices of *Macrobrachium rosenbergii*

组别Group	成活率SR (%)	增重率WGR (%)	特定生长率SGR (%/d)	饲料系数FCR
T0	90.00±3.33	2290.58±60.58 ^c	4.90±0.03 ^b	1.12±0.13
T2	93.34±6.67	2050.53±45.27 ^{ab}	4.78±0.02 ^a	1.18±0.05
T5	95.83±6.51	2195.30±169.19 ^{bc}	4.89±0.11 ^b	1.21±0.21
T8	87.50±0.83	2299.44±38.34 ^c	4.96±0.02 ^b	1.17±0.04
T15	89.17±1.67	2024.71±4.71 ^a	4.78±0.01 ^a	1.33±0.09

注:同列数据肩标相同或无小写字母表示差异不显著($P>0.05$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);下表同

Note: Values with the same small letter superscripts or none letter superscripts in the same row mean no significant difference ($P>0.05$), while different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same applies below

表4 发酵豆粕替代鱼粉和豆粕对罗氏沼虾血清抗氧化指标的影响

Tab. 4 Effects of replacement of FM and SBM by FSBM on antioxidant indices in serum of *Macrobrachium rosenbergii*

组别Group	超氧化物歧化酶SOD (U/mL)	丙二醛MDA (nmol/mL)
T0	343.45±7.09 ^b	40.63±0.31 ^a
T2	357.62±12.70 ^b	90.61±0.86 ^c
T5	399.58±13.28 ^c	98.21±2.34 ^d
T8	399.91±9.08 ^c	94.05±1.06 ^c
T15	312.24±10.36 ^a	78.09±1.85 ^b

表5 发酵豆粕替代鱼粉和豆粕对罗氏沼虾血清生化指标的影响

Tab. 5 Effects of replacement of FM and SBM by FSBM on biochemical indices in serum of *Macrobrachium rosenbergii*

组别Group	谷草转氨酶AST (U/L)	谷丙转氨酶ALT (U/L)	白蛋白ALB (g/L)	总蛋白TP (g/L)
T0	74.95±3.11 ^c	68.55±7.01 ^c	11.75±0.21	100.05±1.48 ^b
T2	67.60±1.20 ^c	42.23±1.10 ^b	12.13±1.31	97.55±6.01 ^b
T5	54.33±1.59 ^b	37.58±2.15 ^b	11.93±0.57	88.40±2.34 ^a
T8	12.10±0.99 ^a	29.30±3.84 ^a	13.00±1.56	88.78±1.78 ^a
T15	49.42±6.78 ^b	37.53±4.48 ^b	12.63±2.55	94.98±3.06 ^{ab}

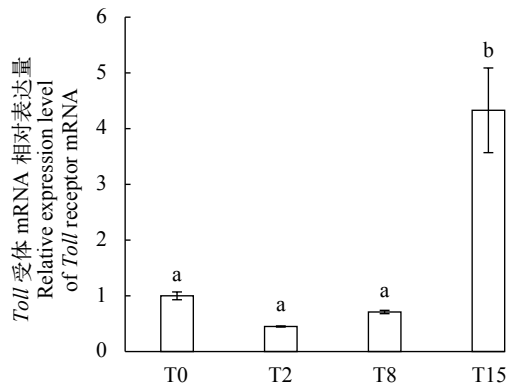


图1 不同饲料组罗氏沼虾Toll受体mRNA在鳃中的相对表达量
Fig. 1 Toll receptor mRNA expression levels in gills of shrimp fed with different diets

图中相同或无小写字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); 下图同

Values with the same small letter superscripts or none superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same applies below

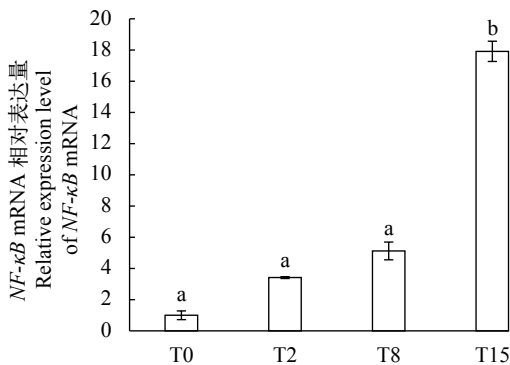


图2 不同饲料组罗氏沼虾NF-κB mRNA在鳃中的相对表达量
Fig. 2 NF-κB mRNA expression levels in gills of shrimp fed with different diets

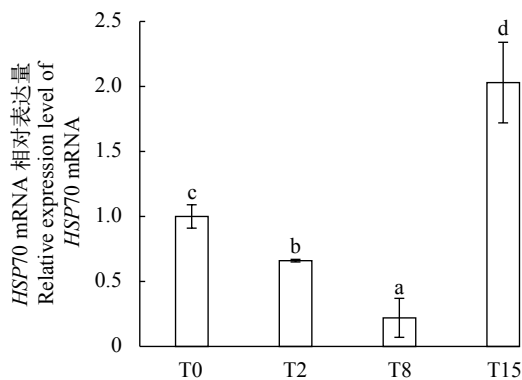


图3 不同饲料组罗氏沼虾HSP70 mRNA在肝胰腺中的相对表达量

Fig. 3 HSP70 mRNA expression levels in hepatopancreas of shrimp fed with different diets

养因子含量低、小肽和未知促生长因子增加、适口性好。因此,在鱼粉替代研究的热潮中,发酵豆粕表现出比豆粕更好的替代效果。然而,发酵豆粕在降低饲料中抗营养因子的同时能否进一步替代鱼粉,及替代后对罗氏沼虾影响的研究未见报道。本研究以发酵豆粕作为鱼粉和豆粕的替代源,旨在了解发酵豆粕在罗氏沼虾饲料中的适宜用量及替代后可能造成的影响。

3.1 发酵豆粕替代鱼粉和豆粕对罗氏沼虾生长的影响

本实验的结果显示,随着发酵豆粕添加量的上升实验组罗氏沼虾的生长呈现先上升后下降趋势,以T8组最高。这说明饲料中的发酵豆粕可替代15%的鱼粉和7.5%豆粕,即发酵豆粕添加量为8%时,不会对罗氏沼虾的生长产生负面影响。这可能是因为在本实验中发酵豆粕替代鱼粉的同时也替代了部分豆粕,与原料豆粕相比,发酵豆粕具有较高的营养价值和较高的可利用性,同时降低了饲料中大豆抗原蛋白的含量,适口性较好;同时在饲料中添加了适量的晶体氨基酸(蛋氨酸、赖氨酸、苏氨酸)以消除限制性氨基酸的影响,这就使鱼粉被替代所产生的负面影响大大减小。当发酵豆粕含量较低时其优势可能不被体现,随着其用量升高,罗氏沼虾的生长产生上升的趋势,当其用量达8%时生长性能与对照组相当,一方面可能由于发酵豆粕本身的高营养等优势产生了促生长作用^[21, 22],另一方面可能为豆粕和发酵豆粕处于一个最适的比例,各种营养素,甚至连抗营养因子间的联合效应都处于对机体最有益的状态,从而消除了单一抗营养因子如大豆抗原蛋白过多所带来的负面影响^[23, 24]。而当添加15%发酵豆粕时,与以往的研究结果相似,即当超过最适替代比例后,动物的增重率、特定生长率都显著低于对照组。其原因可能与鱼粉用量的减少在一定程度上降低了饲料的适口性成为主导因素有关,同时高水平的发酵豆粕替代鱼粉同样会导致肠道受损^[25],改变肠道味觉受体的表达,进而影响对饲料的味觉感知和摄取,以致生长受阻^[26]。

3.2 发酵豆粕替代鱼粉和豆粕时罗氏沼虾肝胰腺的健康与蛋白代谢状况

为了实现饲料蛋白源品质的综合评价,动物的健康状况是不容忽视的要素。虾类的肝胰腺兼具胰脏、肠道和肝脏的功能,承担合成和分泌消化酶、吸收已消化营养素,并进行营养素的代谢等功能。谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)是主要存在于肝脏细胞中的氨基转氨酶,在正常情况下血

清中含量较低。当肝脏发生损伤或病变时,细胞膜通透性增加或细胞坏死导致AST和ALT大量游离到血液,所以血清中AST和ALT活性变化被用作肝脏损伤的指标^[27, 28]。由AST和ALT的结果可以看出,在一定范围内随着发酵豆粕含量的上升,肝胰腺受损害程度降低,这可能与大豆抗原蛋白的降低有关。在陈晓明^[29]的研究中,随着饲料中大豆抗原蛋白含量的降低,凡纳滨对虾血清AST和ALT含量下降,并且在肝胰腺组织形态学中也发现,肝脏细胞空泡化的现象减少。这就表明,降低饲料中大豆抗原蛋白含量更有益于肝胰腺健康。

总蛋白(TP)在肝脏中合成,由白蛋白和球蛋白组成。白蛋白(ALB)作为营养物质载体,主要用于修补组织,维持细胞营养和血液渗透压,其含量变化与机体生长密切相关^[30, 31];球蛋白来源于浆细胞的分泌,用来抵抗外来异物。有研究认为,植物蛋白源替代鱼粉可能会影响动物蛋白质的代谢,替代比例的增加会阻碍蛋白质周转代谢朝有利的方向进行,此时过多的氨基酸被氧化分解,引起血清TP含量的下降^[32, 33]。在本研究中,发酵豆粕替代不同比例鱼粉和豆粕对罗氏沼虾血清ALB含量无显著影响。这就表明饲料中发酵豆粕含量对于生长的蛋白质合成无不利影响。当肝胰腺受损时,细胞内的AST和ALT会释放到血清中,造成血清AST、ALT和总蛋白的升高。在本实验中,当发酵豆粕添加水平在0—8%时,血清TP含量与血清AST和ALT含量变化一致,且替代组均不同程度低于对照组,也说明发酵豆粕的使用更有利于罗氏沼虾肝胰腺的健康。

3.3 发酵豆粕替代鱼粉和豆粕时罗氏沼虾抗氧化能力及免疫基因表达的变化

罗氏沼虾作为无脊椎动物,其免疫应答比较原始,没有特异性免疫,主要依靠先天的体液免疫来抵抗病原微生物。营养和免疫作为生物机体的两个重要生理代谢活动,相互之间存在密切的影响。一方面,营养水平会影响机体的免疫机能发挥。另一方面,机体免疫机能的发挥也会影响机体对营养素的需求水平^[34]。

从生化指标来说,氧自由基参与生物机体正常的生理生化反应包括细胞免疫中的呼吸暴发现象,过量的氧自由基则会产生过氧化物(如MDA)损害细胞,需要通过酶促系统和非酶促系统的抗氧化作用维持平衡^[35-37]。在酶促系统中SOD和CAT发挥着主要的作用,SOD可以催化超氧阴离子发生歧化反应,产生 H_2O_2 和 O_2 , H_2O_2 进而被CAT分解。因此SOD是机体免疫系统中重要的免疫相关因子,可用

于辅助评价机体非特异性免疫机能^[38]。在本研究中实验组的SOD活性和MDA含量都呈相同的变化趋势,且各替代组MDA含量都不同程度地高于对照组,说明发酵豆粕替代鱼粉和豆粕造成了机体不同程度的氧化应激,且通过增加抗氧化酶的合成来抵抗氧化应激的适应性调节能力相对有限,这从T15组中MDA含量显著高于对照组而SOD活性显著低于对照组的推断,由此对虾体造成的损伤可能成为生长受阻的重要原因。

另一方面,从免疫基因表达水平来说,*HSP70*(诱导性)是热休克蛋白家族中重要的一员,被称为主要热休克蛋白,在几乎所有生物的应激细胞中常被高度诱导,具有保护机体和细胞的功能^[39]。除高温诱导外,许多损伤因素、应急刺激(如缺氧、重金属离子、病毒感染、DNA损伤、自由基)作用后,都可以导致细胞发生热休克反应。在本研究中,*HSP70*基因转录水平相对表达量在发酵豆粕含量为15%时达到最大值并且显著高于其他各组,表明发酵豆粕过量替代鱼粉和豆粕时会增加机体的受应激程度,同该组表现出最大的氧化应激相吻合。而低水平发酵豆粕替代鱼粉和豆粕后的罗氏沼虾*HSP70*基因转录水平相对表达量有降低的趋势,结合抗氧化指标和AST、ALT结果,表明此时未对机体产生明显的胁迫,即适当水平的发酵豆粕更有利于罗氏沼虾肝胰腺健康。

而虾类*Toll*受体能识别微生物并将异物入侵的信号从胞外传递到胞内,从而引起胞内信号级联反应,通过下游的信号通路激活*NF- κ B*,进入细胞核调节抗菌肽等免疫因子基因的表达,从而启动先天免疫^[40],同时在炎症反应、细胞凋亡和生长发育方面发挥重要的作用^[41]。本研究结果显示,用2%—8%的发酵豆粕同时替代鱼粉不会改变罗氏沼虾对模式识别受体的免疫反应,但当发酵豆粕用量达到15%时罗氏沼虾*Toll*受体和*NF- κ B*基因相对表达量大幅提升,说明该替代水平足以引起机体对异物识别能力的变化,并可能最终导致免疫机能的变化、多项生理功能的减弱以及生长性能的下降。

4 结论

在一定范围内发酵豆粕替代鱼粉和豆粕,降低饲料中抗营养因子的含量,不会使罗氏沼虾的生长受到影响,更有利于保护罗氏沼虾肝胰腺的健康,但过量添加时会增加机体受应激程度,使生长受阻。在本实验条件下,综合考虑生长、免疫和健康,罗氏沼虾饲料中添加8%发酵豆粕替代鱼粉和豆粕达到最佳效果。

参考文献:

- [1] Yang G L, Chen X F, Wang J Y, *et al.* Social and economical factors of sustained growth of *Macrobrachium rosenbergii* industry in mainland China [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University*, 2011, **30**(5): 450—457 [杨国梁, 陈雪峰, 王军毅, 等. 罗氏沼虾产业在中国持续增长的经济与社会原因分析. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2011, **30**(5): 450—457]
- [2] Wang Q J, Zhang X, Deng J M, *et al.* Research progress on soybean meal substitute for fish meal in fish feed [J]. *Agriculture and Technology*, 2012, **32**(1): 33—34 [王秋举, 张曦, 邓君明, 等. 豆粕替代鱼粉在鱼类饲料中的研究进展. 农业与技术, 2012, **32**(1): 33—34]
- [3] Friedman M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, **44**(1): 6—29
- [4] Hasan M R, Macintosh D J, Jauncey K. Evaluation of some plant ingredients as dietary protein sources for common carp (*Cyprinus carpio* L) fry [J]. *Aquaculture*, 1997, **151**(1-4): 55—70
- [5] Bureau D P, Harris A M, Cho C Y. The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 1998, **161**(1-4): 27—43
- [6] Gomes E F, Rema P, Kaushik S J. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance [J]. *Aquaculture*, 1995, **130**(2-3): 177—186
- [7] Krogdahl A, Bakkemkellep A M, Roed K H, *et al.* Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: effects on disease resistance (*furunculosis*), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2015, **6**(2): 77—84
- [8] Ringø E, Sperstad S, Myklebust R, *et al.* Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L): The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal [J]. *Aquaculture*, 2006, **261**(3): 829—841
- [9] Francis G, Makkar H P S, Becker K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish [J]. *Aquaculture*, 2001, **199**(3): 197—227
- [10] Heikkinen J, Vielma J, Kemilainen O, *et al.* Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 2006, **261**(1): 259—268
- [11] Yue H, Zhan Z F, Guo P F, *et al.* Soybean beta -conglycinin-induced gut hypersensitivity reaction in a piglet model [J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2009, **63**(3): 188—202
- [12] Zhang J X. The effects of soybean protein source on growth performance and intestinal immune of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var Jian) [D]. Sichuan Agricultural University. 2003 [张锦秀. 大豆蛋白源对幼建鲤肠道免疫功能的影响. 四川农业大学. 2003]
- [13] Baeverfjord G, Krogdahl A. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, **19**(5): 375—387
- [14] Chen X M, Hua X M, Zhu W X, *et al.* Effects of soybean allergic proteins on growth, digestion and non-specific immune of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Acta Zoonutrientia Sinica*, 2015, **27**(7): 2115—2127 [陈晓明, 华雪铭, 朱伟星, 等. 大豆抗原蛋白对南美白对虾生长、消化及非特异性免疫的影响. 动物营养学报, 2015, **27**(7): 2115—2127]
- [15] Ouoba L I I, Cantor M D, Diawara B, *et al.* Degradation of African locust bean oil by *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* isolated from soumbala, a fermented African locust bean condiment [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **167**: 273—281
- [16] Ilham I, Fotedar R. Growth, enzymatic glutathione peroxidase activity and biochemical status of juvenile barramundi (*Lates calcarifer*) fed dietary fermented soybean meal and organic selenium [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, **43**(3): 775—790
- [17] Lv Y Y, Chang Q, Chen S Q, *et al.* The effects of dietary fermented soybean meal on the growth and digestive ability of spotted halibut, *Verasper variegatus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(1): 10—18 [吕云云, 常青, 陈四清, 等. 发酵豆粕对圆斑星鲈生长及消化能力的影响. 水生生物学报, 2016, **40**(1): 10—18]
- [18] Liang X F, Hu L, Dong Y C, *et al.* Substitution of fish meal by fermented soybean meal affects the growth performance and flesh quality of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) [J]. *Animal Feed Science & Technology*, 2017, **229**: 1—12
- [19] Leng X J, Wang W L, Li X Q. Experiment on Feeding *Penaeus Vannamei* boones with fermented soybean meal as partial substitute for fish meal [J]. *Cereal & Feed Industry*, 2007, **2007**(3): 40—41 [冷向军, 王文龙, 李小勤. 发酵豆粕部分替代鱼粉对凡纳滨对虾的影响. 粮食与饲料工业, 2007, **2007**(3): 40—41]
- [20] Dong Y W, Niu C J. Effect of dietary protein sources on

- growth and activities of digestive enzymes of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. *Journal of Beijing Normal University (Natural Sciences)*, 2000, **36**(2): 260—263 [董云伟, 牛翠娟. 豆粕替代鱼粉对罗氏沼虾生长和消化酶活性的影响. 北京师范大学学报(自然科学版), 2000, **36**(2): 260—263]
- [21] Kiers J L, Meijer J C, Nout M J R, *et al.* Effect of fermented soya beans on diarrhoea and feed efficiency in weaned piglets [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **95**(3): 545—552
- [22] Liu X, Feng J, Xu Z, *et al.* The effects of fermented soybean meal on growth performance and immune characteristics in weaned piglets [J]. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 2007, **31**(5): 341—345
- [23] Hardy R W, Gatlin D M, Bureau D P, *et al.* Nutrient Requirements of Fish and Shrimp [M]. National Research Council (NRC). 2011, 242
- [24] Fish B C, Thompson L U. Lectin-tannin interactions and their influence on pancreatic amylase activity and starch digestibility [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1991, **39**(4): S91—S92
- [25] Song W X. Partial replacement of fish meal by fermented soybean meal in diets for juvenile black sea bream, *Sparus macrocephalus* [D]. Zhejiang University. 2009 [宋文新. 黑鲷幼鱼饲料中发酵豆粕部分替代鱼粉的研究. 浙江大学. 2009]
- [26] Kong C. Study on feeding regulation and intestinal health response of obscure puffer (*Takifugu fasciatus*) to soybean antigen protein [D]. Shanghai Ocean University. 2017 [孔纯. 暗纹东方鲀对大豆抗原蛋白的摄食调节与肠道健康响应研究. 上海海洋大学. 2017]
- [27] Yao Z N, Chen Y C, Guan X T. Effect of Chinese herb compounds on activities of transaminase in serum and antioxidant in erythrocyte of *Cyprinus carpio* L [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, **41**(8): 75—80 [孟兆娜, 陈玉春, 管雪婷, 等. 复方中草药对镜鲤(*Cyprinus carpio* L)血清转氨酶及红细胞抗氧化酶活性的影响. 东北农业大学学报, 2010, **41**(8): 75—80]
- [28] Richard J S, Carl B S, James T G. Corticoid stress responses to handling and temperature in *Salmonids* [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1977, **106**(3): 213—218
- [29] Cheng X M. Effect of fish meal replacement by fermented soybean meal on physiology of feeding and the resistance to ammonia stress of *Litopenaeus vannamei* [D]. Shanghai Ocean University. 2015 [陈晓明. 发酵豆粕替代鱼粉对凡纳对虾摄食生理和抗氨氮应激的影响. 上海海洋大学. 2015]
- [30] Djangmah J S. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius) [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 1970, **32**(4): 709—718
- [31] Yildirim M, Lim C, Wan P J, *et al.* Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypolacetic acid [J]. *Aquaculture*, 2003, **219**(1): 751—768
- [32] Zhao J. Study on utilization of several animal and plant protein sources for juvenile cobia, *Rachycentron canadum* [D]. Guangdong Ocean University. 2011 [赵娟. 军曹鱼(*Rachycentron canadum*)对几种动植物蛋白源的利用研究. 广东海洋大学. 2011]
- [33] Liu X H, Ye J D, Wang Z J, *et al.* Partial replacement of fish meal by soybean in diets for juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, **34**(3): 450—458 [刘襄河, 叶继丹, 王子甲, 等. 饲料中豆粕替代鱼粉比例对牙鲆生长性能及生化指标的影响. 水产学报, 2010, **34**(3): 450—458]
- [34] Huang X X, Luo C X, Guo T F, *et al.* Toll receptor in prawn and its application in nutrition-immunity assessing on prawn [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, **36**(6): 930—936 [黄旭雄, 罗词兴, 郭腾飞, 等. 对虾Toll受体及其在虾类营养免疫评价中的应用. 水产学报, 2012, **36**(6): 930—936]
- [35] Sturve J, Almroth B C, Förlin L. Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent [J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2008, **70**(3): 446—452
- [36] Bai S C, Kyeongjun L, Wilson R P. Different levels of dietary DL- α -tocopheryl acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* [J]. *Aquaculture*, 1998, **161**(1): 405—414
- [37] Han H J, Kim D H, Lee D C, *et al.* Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* to olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2006, **29**(10): 601—609
- [38] Liu X L, Yu W Y. A review on immune factors of crustaceans [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(4): 418—421 [刘雪兰, 余为一. 甲壳动物免疫因子的研究进展. 水生生物学报, 2003, **27**(4): 418—421]
- [39] Asea A, Kraeft S K, Kurt-Jones E A, *et al.* HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine [J]. *Nature Medicine*, 2000, **6**(4): 435—442
- [40] Gay N J, Keith F J. Toll and IL-1 receptor [J]. *Nature*, 1991, **351**(6325): 355—356
- [41] May M J, Ghosh S. NF- κ B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses [J]. *Immunology Today*, 1998, **16**: 225—260

THE REPLACEMENT OF FISH MEAL AND SOYBEAN MEAL TO FERMENTED SOYBEAN MEAL AND ITS EFFECTS ON THE GROWTH PERFORMANCE, SERUM BIOCHEMICAL INDICES, AND IMMUNE GENE EXPRESSION IN GIANT RIVER PRAWN, *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*

YANG Jing-Feng^{1,2,3}, HUA Xue-Ming^{1,2,3}, GUO Zi-Hao⁴, LIU Tao^{1,2,3}, KONG Chun^{1,2,3},
FENG Yue^{1,2,3} and WANG Gang^{1,2,3}

(1. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition (CREEFN) of the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Shanghai Yuanyao Biotechnology Co. Ltd, Shanghai 201306, China)

Abstract: An experiment was conducted to investigate the effects of replacing fish meal (FM) and soybean meal (SBM) by fermented soybean meal (FSBM) on growth performance, serum biochemical indices, and immune genes in giant river prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and to find a suitable proportion of FSBM to replace FM in diets. Five isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated for giant river prawn, among which a basal diet (T0) containing 30% FM and 18% SBM was treated as the control group, and the FM and SBM (2:1) in the basal diets replaced by 2% (T2), 5% (T5), 8% (T8) and 15% (T15) of FSBM respectively were treated as experimental diets. Giant river prawns with initial average body weight of (0.17±0.02) g were cultured for 64 days in indoor net cages at a cement tank. Results showed that with increasing FSBM supplemental level, the growth rate and specific growth rate increased firstly and then decreased, and the highest value was found in group T8. Serum superoxide dismutase activity and malondialdehyde content firstly increased and then decreased. MDA of all experimental groups was higher than that of the control group. Serum aspartate transaminase, alanine aminotransferase activity and total protein content had decreasing trend followed by an increasing trend, and the values in all experimental groups were lower than the control group. Gills Toll receptor mRNA and NF-κB mRNA expression levels and hepatopancreas heat shock protein mRNA relative expression levels in group T15 were the highest among all groups. All these results indicated that the replacement of FM and SBM with FSBM would affect growth, antioxidant ability and immunity, and the optimum amount of FSBM was 8% in the diets in this experiment.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; Soybean meal; Fermented soybean meal; Fish meal; Serum biochemical indices; Immune genes