饲料中水解鱼蛋白对中国对虾非特异免疫的影响

滕玉清[1,2] 梁萌青[1*] 王正丽[2] 刘 宁[1] 王新星[1] 常 青[1] 郑珂珂[1]

([1] 中国水产科学研究院黄海水产研究所,青岛 266071)

([2] 青岛农业大学,266109)

摘 要 在中国对虾基础饲料中用水解鱼蛋白替代 0%、5%、10%和 15%鱼粉蛋白,制成饲料投喂中国对虾 30d,实验结束取样测定对虾生长指标并进行血细胞记数,以肝胰脏中的酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、溶菌酶、超氧化物歧化酶活性和血清中的酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、溶菌酶、超氧化物歧化酶、过氧化物酶、一氧化氮合酶活性为非特异免疫指标,探讨水解鱼蛋白作为免疫增强剂对中国对虾非特异性免疫效应的影响。结果表明,5%水解鱼蛋白替代鱼粉蛋白组对虾肝胰脏中酸性磷酸酶活性为 0.54 U/g prot,显著高于对照组和其他替代组($P<0.05$);血液中总的血细胞数量最多,血清的酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和溶菌酶活性均显著高于对照组和其他替代组($P<0.05$),并且特定生长率最高。说明水解鱼蛋白作为免疫增强剂对中国对虾的非特异性免疫功能具有明显的增强作用。

关键词 中国对虾 水解鱼蛋白 非特异性免疫 生长

中图分类号 S963 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2011)05-0084-08

Effects of fish protein hydrolysate in the diet on the non-specific immune response of *Penaeus chinensis*

TENG Yu-qing[1,2] LIANG Meng-qing[1*] WANG Zheng-li[2] LIU Ning
WANG Xin-xing CHANG Qing[2] ZHENG Ke-ke[2]

([1] Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

([2] Qingdao Agriculture University, 266109)

ABSTRACT The effect of fish protein hydrolysate(FPH) was examined as an immuno-enhancer on the non-specific immune response of *Penaeus chinensis*. *P. chinensis* were fed with 0%, 5%, 10%, and 15% FPH replacing fish meal protein for 30 days. Samples were collected at the end of the experiment. The results showed that the acid phosphatase activity in the hepatopancreas of *P. chinensis* fed diet with 5% FPH replacing fish meal protein was significantly higher than that of other groups ($P<0.05$), and total haemocyte count of this treatment was significantly higher ($P<0.05$) than those of other treatments. The activities of acid phosphatase, alkaline phosphatase and lysozyme in the serum of *P. chinensis* fed with 5% FPH replacing fish meal protein were significantly higher ($P<0.05$) than those of other groups. Moreover, the group of 5% FPH replacing fish meal protein resulted in a significant SGR increase($P<0.05$).

国际合作专项(2008DFA31720)、公益性(农业)行业专项(200803012)和农业部"948"项目(2010-S11)共同资助

* 通讯作者。E-mail:liangmq@ysfri.ac.cn,Tel:(0532)85822914

收稿日期:2011-01-30;接受日期:2011-03-31

作者简介:滕玉清 (1984-),男,硕士研究生,主要从事水产动物营养与饲料研究。E-mail:doudouyuan7@163.com

In conclusion, fish protein hydrolysate could significantly improve the non-specific immune response of *P. chinensis*.

KEY WORDS *Penaeus chinensis*　Fish protein hydrolysate　Non-specific immune　Growth

中国对虾 *Penaeus chinensis* 是我国最重要的虾类养殖品种之一,然而自 1993 年全国养殖对虾因感染对虾白斑综合征病毒(WSSV),发生大规模暴发性流行病以来,对虾养殖业遭受了毁灭性的打击(Wang *et al*. 1998; Shi *et al*. 1998),这与养殖环境的不断恶化、抗生素的滥用、不合理的高密度养殖、养殖动物的种质资源受到破坏等诸多因素有直接关系。尽管目前采用药物预防和治疗对虾疾病的相关研究较为深入,这些方法虽然在一定程度上短期奏效,但是随之而来的负面效应也是显而易见的。

免疫增强剂适合于免疫预防而不是发病后治疗的特点为对虾疾病控制开拓了新方法(兰　萍等　2008)。国内关于水解鱼蛋白作为免疫增强物质用来提高对虾非特异性免疫功能及抗病力的研究尚未见报道。国外学者曾用水解鱼蛋白做免疫增强剂投喂南美白对虾和黑虎虾可增强其抗病力(Franz *et al*. 2008)。本研究从营养和免疫学角度出发,探讨水解鱼蛋白作为免疫增强物质对中国对虾成体的非特异免疫的影响,以期为更深入了解中国对虾免疫防御机制和水解鱼蛋白的应用提供依据。

1　材料与方法

1.1　水解鱼蛋白粉的制取

水解鱼蛋白利用鳕鱼下脚料由蛋白酶和风味酶制备而成(靳　挺等　2008;袁永俊等　2002)。

1.2　实验饲料

采用单因子浓度梯度法,在基础饲料中用水解鱼蛋白粉分别替代 0%(对照)、5%、10%、15 %的鱼粉蛋白,以鱼粉和豆粕为主要蛋白源,鱼油为主要脂肪源配制成基础饲料(表 1),用逐级扩大混合的方法与饲料原料混合,经螺杆挤条机挤压出直径分别为 1.5 mm 的饲料,60 ℃烘干后,剪切成 3 mm 长的颗粒贮存于－20 ℃冰箱中待用。

1.3　实验管理

中国对虾购自山东海阳黄海水产有限公司,挑选个体大小均匀的健康中国对虾 500 尾(体重 11.23±0.15g,体长 9.6±0.3cm),在消毒水循环系统中暂养 10 d,并用实验对照饲料饱食投喂,使其适应饲料及环境,10 d 后随机分到 12 个缸里进行饲养,每个缸 30 尾并设立对照组,每个替代组设 3 个平行。实验自 2009 年 8 月 3 日～9 月 2 日。

实验开始时按对虾体重的 5%～10%进行投喂,然后根据每天各缸对虾的摄食情况进行适当调整。每天投喂 4 次,投喂时间为:6∶00、11∶00、18∶00 和 23∶00,各时间点投喂量占日总投量的比例分别为 30%、20%、30%和 20%。饲养期间连续充气,水温 24～28℃,盐度 24～26,pH 7.8～8.2,溶解氧不低于 6.5 mg/L。每日换水 1 次,日换水量为 1/3。

1.4　对虾样品的采集、分析与计算

1.4.1　生长指标测定

实验开始测定初始体重,实验结束测末体重,并计算相对增重率和特定生长率。

相对增重率(%)=[(W_t－W_0)/试验初体重]×100

特定生长率(%/day)(SGR)=100×(LnW_t－LnW_0)/t

式中,W_0和 W_t分别为初始体重和终末体重,t 为实验天数。

表 1 实验饲料配方及成分分析

Table 1 Composition of the experimental diet (%)

组分 Component	对照组 Control	5%替代组 5%FPH substitute	10%替代组 10%FPH substitute	15%替代组 15%FPH substitute
鱼粉 Fish meal	40	38	36	34
豆粕 Soybean meal	20	20	20	20
水解丝蛋白 FPH	0	1.4	3.0	4.4
高筋粉 Wheat flour	23.5	24.1	24.5	25.1
胆碱 Choline chloride	0.5	0.5	0.5	0.5
虾粉 Shrimp meal	10	10	10	10
鱼油 Fish oil	1	1	1	1
磷脂 Phospholipids	1.5	1.5	1.5	1.5
复合维生素 Vitamin premix	1	1	1	1
复合矿物质 Mineral premix	1	1	1	1
磷酸二氢钙 $Ca(H_2PO_4)_2$	1.5	1.5	1.5	1.5
成分分析 Proximate composition				
蛋白质 Protein	37.11	37.96	38.41	38.52
脂肪 Lipid	5.33	5.52	5.53	5.52
灰分 Ash	21.54	21.55	22.01	22.08

注：复合维生素(mg/kg or g/kg 饲料)：硫胺素，25 mg；核黄素，45 mg；盐酸吡哆醇，20 mg；维生素 B_{12}，0.1 mg；维生素 K_3，10 mg；肌醇，800 mg；泛酸，60 mg；烟酸，200 mg；叶酸，20 mg；生物素，1.20 mg；维生素 A，32 mg；维生素 D，5 mg；维生素 E，120 mg；次粉 18.67 g。复合矿物质(mg/kg or g/kg 饲料)：氟化钠，2 mg；碘化钾，0.8 mg；氯化钴，50 mg；硫酸铜，10 mg；硫酸铁，80 mg；硫酸锌，50 mg；硫酸镁，1 200 mg；磷酸二氢钙，3 000 mg；氯化纳，100 mg；沸石粉，15.51 g

Notes: Vitamin premix (mg/kg or g/kg diet): thiamine 25 mg, riboflavin 45 mg, pyridoxine 20 mg, vitamin B_{12} 0.1 mg, menadione 10 mg, inositol 800 mg, pantothenate 60 mg, tocopherol acetate 200 mg, folic acid 20 mg, biotin 1.2 mg, vitamin A 32 mg, vitamin D 5 mg, vitamin E 120 mg, wheat flour 18.67g; Mineral premix (mg/kg or g/kg) diet: NaF 2 mg, KI 0.8 mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 50 mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 10 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 80 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 50 mg, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 1 200 mg, $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ 3 000 g, NaCl 100 g, Mordenzeo 15.51 g

1.4.2 对虾体常规成分分析

对虾体常规成分分析全部采用 AOAC(1995)的方法。水分采用恒温干燥法(105 ℃)；粗蛋白采用凯氏定氮法，VELP 牌 UDK142 自动蒸馏滴定仪测定(N×6.25)；粗脂肪采用索氏抽提法；粗灰分按 GB/T 5009.4-2003 测定(马弗炉 550 ℃，12 h)。

1.4.3 抗凝血和肝胰脏匀浆液的制备

抗凝血的制备参考 Smith 等(1991)的方法并作适当改进。用 1 ml 的无菌注射器按照血淋巴与抗凝剂(柠檬酸铁)1∶1 的比例，从心脏部位进行取血，离心(3 000×g，4 ℃)，取上清液测免疫指标并进行血细胞记数。取肝胰脏匀浆与生理盐水配成 1∶10 肝胰脏匀浆液测肝胰脏免疫指标。

1.4.4 血细胞记数(THC)

按 2∶1 比例将抗凝剂与血淋巴混合，制成一定稀释倍数的血细胞悬液，利用血球记数板在光学显微镜(×400)下直接计数，计算出每 ml 血淋巴中的血细胞数目。

1.4.5 过氧化物酶(POD)活性

过氧化物酶活性用南京建成试剂盒测定。利用过氧化物酶催化过氧化氢反应的原理，通过测定 420 nm 处吸光度的变化得出其酶活性。POD 活力定义：在 37 ℃条件下，每 ml 血清每分钟催化产生 1 μg 的底物酶量定义为一个酶活力单位。POD 活力(U/ml)＝($OD_{测定}$－$OD_{空白}$)/(12×比色光径)×(反应液总体积 ml/样本量 ml)/反应时间(30 min)×样本测定前稀释倍数×1 000。

1.4.6 超氧化物歧化酶(SOD)活性

超氧化物歧化酶活性使用南京建成试剂盒测定。SOD 活力定义为：每 ml 反应液中 SOD 抑制率达到 50%时所对应的 SOD 量为一个 SOD 酶活单位(U)。

SOD 活力(U/ml)=($A_{对照值}-A_{测定值}$)/$A_{对照值}$÷50%×反应体系的稀释倍数

1.4.7　一氧化氮合酶(NOS)活性的测定

一氧化氮合酶活性使用南京建成试剂盒测定。测定原理为:NOS 催化氧化 L-Arg 生成 NO,NO 随后被氧化成亚硝酸盐和硝酸盐,测定生成的亚硝酸盐和硝酸盐的含量以确定 NOS 的活性。NOS 酶活单位定义为:每 ml 每分钟生成 1 nmol NO 为一个酶活力单位(U)。TNOS 活力(U/ml)=($OD_{测定管}-OD_{空白管}$)/呈色物纳摩尔消光系数×(反应液总体积/取样量)×(1/比色光径×反应时间)/1 000。

1.4.8　酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和溶菌酶(LZM)活性测定

酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和溶菌酶活性均用南京建成试剂盒测定。酸性磷酸酶活力(U/100 ml)=$A_{测定值}$/$A_{标准值}$×酚含量×稀释倍数;碱性磷酸酶活力(U/100 ml)=$A_{测定值}$/$A_{标准值}$×酚含量×稀释倍数。

溶菌酶测定按南京建成试剂盒步骤进行:配 2.5 μg/ml 溶菌酶标准液,0.1 ml 蒸馏水做空白,取等量样本 0.1 ml,标准管、空白管、测定管分别加 1 ml 应用菌液,混匀,37 ℃水浴 15 min,立即取出置于 0 ℃以下的冰水浴 3 min,530 nm 蒸馏水调透光度 100%,比色测定。溶菌酶含量(μg/ml)=($UT15_{测定管}-OT15_{空白管}$)/($ST15_{标准管}-OT15_{空白管}$)×2.5 μg/ml×样本测试前稀释倍数(OT15 为水浴 15 min 后的空白管透光度,UT15 为水浴 15 min 后的测定管透光度,ST15 为水浴 15 min 后的标准管透光度)。

1.4.9　血清总抗氧化能力(T-AOC)测定

总抗氧化能力按南京建成试剂盒步骤测定。定义:在 37 ℃时,每分钟每 ml 血清使反应体系的吸光度(OD)值每增加 0.01 时,为 1 个总抗氧化能力单位。T-AOC 值(U/ml)=($OD_{测定管}-OD_{对照管}$)/0.01/30×反应体系稀释倍数×样本测试前稀释倍数。

1.5　统计分析

各处理的数据进行单因素方差分析。当差异显著($P<0.05$)时,用 Duncan's 检验法进行均值间多重比较。统计分析所用的软件为 SPSS 11.5 for Windows。

2　结果

2.1　中国对虾非特异性免疫指标

2.1.1　血清非特异性免疫指标

饲料中添加水解鱼蛋白对中国对虾血清非特异性免疫力的影响见表 2。由表 2 可见,中国对虾的酸性磷酸酶活性依次为:5%替代组>15%替代组>10%替代组>对照组,5%替代组显著高于对照组和其他替代组($P<0.05$),15%替代组显著高于对照组和 10%替代组($P<0.05$);碱性磷酸酶活性高低依次为:5%替代组>15%替代组>10%替代组>对照组,5%替代组显著高于对照组和其他替代组($P<0.05$),10%和 15%替代组间无显著差异但都显著高于对照组($P<0.05$);对虾血细胞数量依次为:5%替代组>10%替代组>15%替代组>对照组,5%替代组显著高于对照组和其他替代组($P<0.05$),对照组和 10%、15%替代组无显著性差异($P>0.05$);溶菌酶活性依次为:5%替代组>15%替代组>10%替代组>对照组,5%替代组显著高于对照组和其他替代组($P<0.05$),对照组和 10%、15%替代组无显著性差异($P>0.05$);超氧化物歧化酶活性高低依次为:5%替代组>15%替代组>10%替代组>对照组,5%和 15%替代组 SOD 活性显著高于对照组和 10%替代组($P<0.05$),5%和 15%替代组之间无显著性差异($P>0.05$);过氧化物酶活性高低依次为:5%替代组>15%替代组>10%替代组>对照组,5%和 15%替代组显著高于对照组和 10%替代组($P<0.05$),5%和 15%替代组间无显著性差异($P>0.05$);一氧化氮合酶活性依次为:5%替代组>10%替代组>15%替代组>对照组,5%和 10%替代组显著高于对照组和 15%替代组($P<0.05$),5%和 10%替代组间无显著性差异($P>0.05$);各组对虾血液的总抗氧化能力并无显著提高,各个替代组间无显著差异($P>0.05$)。

2.1.2　肝胰脏非特异性免疫指标

饲料中添加水解鱼蛋白对中国对虾肝胰脏非特异性免疫指标的影响见表3。由表3可见,中国对虾肝胰脏

表 2 饲料中添加水解鱼蛋白对中国对虾血清非特异性免疫力的影响(平均值±标准误,$n=3$)

Table 2 Effects of dietary fish protein hydrolysate on non-specific immunity index of *P. chinensis* serum(Mean±S. E., $n=3$)

免疫指标 Immune parameter	对照 Control	5%替代组 5%FPH substitute	10%替代组 10%FPH substitute	15%替代组 15%FPH substitute
酸性磷酸酶 ACP(U/ml)	1.65±0.05^{a}	2.60±0.06^{c}	1.83±0.17^{a}	2.22±0.13^{b}
碱性磷酸酶 AKP(U/ml)	0.29±0.06^{a}	0.85±0.02^{c}	0.58±0.06^{b}	0.64±0.08^{b}
血细胞记数 Total haemocyte count(10^{7}个)	1.6±0.83^{a}	2.3±1.4^{b}	1.9±0.81^{a}	1.7±0.75^{a}
溶菌酶 LZM(U/ml)	6.03±0.33^{a}	8.81±0.37^{b}	6.19±0.13^{a}	6.46±0.57^{a}
超氧化物歧化酶 SOD(U/ml)	64.72±2.89^{a}	91.45±1.20^{c}	80.27±1.22^{b}	90.51±1.22^{c}
总抗氧化能力 T-AOC(U/ml)	5.51±2.09^{a}	3.91±0.52^{a}	4.60±0.29^{a}	6.37±1.74^{a}
过氧化物酶 POD(U/ml)	31.70±0.56^{a}	38.70±1.98^{b}	34.30±1.10^{ab}	38.30±1.13^{b}
一氧化氮合酶 NOS(U/ml)	36.75±0.35^{a}	45.19±0.99^{b}	43.62±1.55^{b}	39.69±0.77^{a}

注:同一列数据右上角不同字母代表有显著差异($P<0.05$)

Note: Values in the same column with different superscript are significantly different ($P<0.05$)

酸性磷酸酶活性大小依次为:5%替代组>10%替代组>15%替代组>对照组,5%替代组显著高于对照组和其他替代组($P<0.05$),其他组间无显著性差异($P>0.05$);肝胰脏碱性磷酸酶活性依次为:5%替代组>10%替代组>15%替代组>对照组,5%和 15%替代组显著高于对照组和 10%替代组($P<0.05$),5%和 15%替代组间无显著性差异($P>0.05$)。肝胰脏溶菌酶活性依次为:15%替代组>5%替代组>10%替代组>对照组,15%替代组显著高于其他组,5%和 10%替代组显著高于对照组($P<0.05$),5%和 10%替代组间无显著性差异($P>0.05$)。饲料中添加水解鱼蛋白对中国对虾肝胰脏超氧化物歧化酶活性无显著影响($P>0.05$)。

表 3 饲料中添加水解鱼蛋白对中国对虾肝胰脏非特异性免疫指标的影响(平均值±标准误,$n=3$)

Table 3 Effects of dietary fish protein hydrolysate on non-specific immunity index of *P. chinensis* hepatopancreas (Mean±S. E., $n=3$)

免疫指标 Immune parameter	对照组 Control	5%替代组 5%FPH substitute	10%替代组 10%FPH substitute	15%替代组 15%FPH substitute
酸性磷酸酶 ACP(U/g prot)	0.15±0.02^{a}	0.54±0.09^{b}	0.29±0.02^{a}	0.27±0.01^{a}
碱性磷酸酶 AKP(U/g prot)	0.22±0.01^{a}	0.54±0.03^{c}	0.34±0.03^{b}	0.48±0.02^{c}
超氧化物歧化酶 SOD(U/ml)	1.43±0.07^{a}	1.66±0.07^{a}	1.64±0.10^{a}	1.40±0.08^{a}
溶菌酶 LZM(U/ml)	7.43±0.67^{a}	12.49±0.36^{b}	11.30±0.27^{b}	14.86±0.31^{c}

注:同一列数据右上角不同字母代表有显著差异($P<0.05$)

Note: Values in the same column with different superscript are significantly different ($P<0.05$)

2.2 生长性能和对虾体成分

饲料中添加水解鱼蛋白对中国对虾生长的影响见表 4。由表 4 可见,当饲料中水解鱼蛋白的替代水平为 5%时,中国对虾的特定生长率为 0.71%/day,显著高于对照组和其他替代组($P<0.05$),存活率和增重率均显著高于对照组和其他替代组($P<0.05$)。

表 4 饲料中添加水解鱼蛋白对中国对虾生长的影响(平均值±标准误,$n=3$)

Table 4 Effects of dietary fish protein hydrolysate on growth performance of *P. chinensis* (Mean±S. E., $n=3$)

生长指标 Growth performance	对照 Control	5%替代组 5%FPH substitute	10%替代组 10%FPH substitute	15%替代组 15%FPH substitute
实验初始体重 Initial body weight (g)	11.85±0.19^{a}	11.88±0.13^{a}	12.54±0.30^{a}	11.82±0.43^{a}
实验末体重 Final body weight (g)	12.58±0.31^{a}	14.72±0.50^{b}	13.26±0.27^{a}	12.45±0.49^{a}
增重率 Weight gain rate(%)	6.13± 1.56^{a}	23.87±3.22^{b}	5.77± 0.37^{a}	5.31± 0.35^{a}
特定生长率 Specific growth rate (%/day)	0.20± 0.05^{a}	0.71±0.09^{b}	0.19±0.01^{a}	0.17±0.01^{a}
存活率 Survival rate(%)	66.67±3.33^{a}	91.11±1.92^{c}	75.56±1.92^{b}	74.44±5.09^{b}

注:同一列数据右上角不同字母代表有显著差异($P<0.05$)

Note: Values in the same column with different superscript are significantly different ($P<0.05$)

表 5 为饲料中添加水解鱼蛋白对中国对虾虾体常规成分的影响。由表 5 可见,饲料中添加水解鱼蛋白对中国对虾虾体水分、粗脂肪、粗灰分含量没有显著影响($P>0.05$)。5%替代组粗蛋白含量为 75.86%,显著高于对照组和其他替代组($P<0.05$)。

表 5　饲料中添加水解鱼蛋白对中国对虾虾体常规成分的影响(平均值±标准误,$n=3$)

Table 5　Effects of dietary fish protein hydrolysate on body composition of *P. chinensis* (Means±S. E., $n=3$) (%)

虾体成分 Body composition	对照 Control	5%替代组 5%FPH substitute	10%替代组 10%FPH substitute	15%替代组 15%FPH substitute
水分　Moisture	76.64±0.62[a]	76.71±0.19[a]	75.34±0.22[a]	76.45±0.10[a]
粗蛋白 Crude protein	71.23±0.36[a]	75.86±0.23[c]	73.91±0.50[b]	71.95±0.48[a]
粗脂肪 Crude lipid	6.88±0.87[a]	6.47±0.68[a]	6.97±0.38[a]	6.63±0.14[a]
粗灰分 Crude ash	14.95±0.43[a]	15.59±0.23[a]	13.88±0.31[a]	14.76±0.55[a]

注:同一列数据右上角不同字母代表有显著差异($P<0.05$)

Note: Values in the same column with different superscript are significantly different ($P<0.05$)

3　讨论

3.1　饲料中添加水解鱼蛋白对中国对虾非特异性免疫的影响

中国对虾主要依靠非特异性免疫来提高自身的抗病力,其体液不具有免疫球蛋白(魏克强等　2004)。许多体液免疫因子在甲壳类动物机体的免疫防御反应中具有十分重要的作用,这些因子包括天然形成和诱导产生的各种生物活性分子,主要有血淋巴中各种抗菌因子、抗病毒因子、凝集素、溶血素、超氧化物歧化酶、溶菌酶,以及由血细胞释放的酚氧化酶原激活系统等(陈国福等　2004)。血细胞数量变化与许多因子相关,并在一定程度上反应了对虾的健康状态(姚翠鸾等　2006)。中国对虾不同的发育时期、蜕皮、生殖状况、营养水平、疾病、环境因子都会影响血细胞数量(Cheng *et al*.　2001;Silva *et al*.　2000;Sung *et al*.　2000;Le Moullac *et al*.　2000)。本实验水解鱼蛋白替代量为 5%时,对虾血细胞数量最多,为 2.3×10^7 个/ml,显著高于对照组的 1.6×10^7 个/ml($P<0.05$)。血细胞数量的增加可能是由于免疫刺激引起的造血组织中血细胞的释放(Soderhall *et al*.　2003),推测本实验水解鱼蛋白分解产生游离氨基酸刺激对虾造血组织释放更多血细胞。姚翠鸾(2004)曾经做过给中国对虾注射海带多糖会引起对虾血细胞总数增加,对虾免疫力也得到相应提高,其结果与本实验一致。

在对虾免疫体系中酸性磷酸酶和碱性磷酸酶是衡量机体免疫机能和健康状况的重要指标,是巨噬细胞溶酶体的标志酶,能催化磷酸单酯水解,在酸性或碱性条件下水解磷酸苯二钠,释出酚和磷酸,在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢(刘树青等　1999)。本实验 5%替代组对虾肝胰脏酸性磷酸酶活性显著高于对照组和其他替代组,血清中的酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性显著高于对照组、10%和 15%替代组($P<0.05$)。酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性变化趋势类似于陈国福等(2007)在饲料中添加 A3a-肽聚糖投喂凡纳滨对虾实验,60 d 时在饲料中添加浓度 0.05 %肽聚糖时,对虾血清碱性磷酸酶活性最高,而添加高浓度 0.1 %的肽聚糖时,对虾血清碱性磷酸酶活性反而下降,添加较低浓度 0.01 %肽聚糖时碱性磷酸酶的活性最低。分析本实验过量添加水解鱼蛋白反而会导致血液酸性磷酸酶、碱性磷酸酶活性下降的原因,可能是过高的水解蛋白会水解产生出某种与巨噬细胞溶酶体酶拮抗的物质,从而导致其活性下降。

中国对虾血液中的溶菌酶是吞噬细胞杀菌的物质基础,当吞噬细胞对异物颗粒进行吞噬和包囊后,细胞内的溶酶体会与异物进行融合,发生脱颗粒现象,外来入侵的微生物可以被其中的溶菌酶等直接杀死(李　光等　2007)。本实验 5%替代组中国对虾血清溶菌酶活性为 8.81 U/ml,显著高于对照组和其他替代组($P<0.05$)。Liang 等(2006)曾在饲料中添加不同浓度水解鱼蛋白投喂鲈鱼,发现饲料中添加 15%水解鱼蛋白可以显著增强鲈鱼血液中溶菌酶活性,过高或者过低的添加水解鱼蛋白对鲈鱼血清溶菌酶活性与对照组都无显著

性差异，这与本实验中过高添加 10%、15%水解鱼蛋白对虾血液溶菌酶活性无显著影响的结果一致。

另外本研究还发现，用水解鱼蛋白替代鱼粉蛋白可显著提高中国对虾血清中超氧化物歧化酶的活性。超氧化物歧化酶是一种抗氧化酶，具有清除自由基的功能，在防御机体衰老及防止生物分子损伤等方面具有极为重要的作用(张 明等 2004)。水解鱼蛋白水解过程中的游离氨基酸和小肽的组成和含量会影响水解产物抗氧化活性。Wu 等(2003)采用自溶法和外加蛋白酶 N 水解鲭，发现鲭水解产物具有显著的抗氧化性(抑制亚油酸自氧化、清除 DPPH、还原力)，且其抗氧化性与肽的数量呈良好的相关关系。本实验分析，水解鱼蛋白水解过程中的某些游离氨基酸可能是 SOD 的催化酶，催化超氧化物歧化酶活性升高，清除对虾体内过多的自由基，平衡代谢，提高免疫。江晓路等(1999)曾用 2%海藻多糖和北虫草多糖等具有生物活性的多糖类物质投喂中国对虾，中国对虾血清中超氧化物歧化酶活性显著高于对照组($P<0.05$)，其超氧化物歧化酶活性变化与本实验结果一致。此外，替代组的过氧化物酶和一氧化氮合酶显著高于对照组($P<0.05$)，对细胞生理代谢过程中产生的活性氧具有清除作用，从而提高机体的解毒免疫功能和防病抗病能力。

本实验发现饲料 5%水解鱼蛋白替代鱼粉，可显著提高对虾的非特异性免疫指标，由于本实验周期为 30 d，是否会产生“免疫疲劳”现象有待进一步探讨。

3.2 饲料中添加水解鱼蛋白对中国对虾生长的影响

本研究的结果表明，当水解鱼蛋白(FPH)替代量为 5%时，中国对虾的特定生长率显著高于对照组和其他替代组($P<0.05$)，当 FPH 替代量为 10%和 15%时，中国对虾的特定生长率与对照组无显著性差异($P>0.05$)，说明饲料中添加高浓度水解鱼蛋白并未促进中国对虾的生长，适宜浓度的水解鱼蛋白才能促进中国对虾的生长。这与近期国内外的一些研究结果类似。Franz 等(2008)曾在南美白对虾和黑虎虾饲料中添加水解鱼蛋白产生很好的诱食效果，增重率得到显著提高。柳旭东等(2010)研究发现，饲料中添加 20%水解鱼蛋白时，半滑舌鳎稚鱼的特定生长率(2.84%/d)显著高于对照组、40%和 60%蛋白替代组。这主要是因为水解鱼蛋白的主要成分是寡肽，寡肽在水解过程中释放的某些游离氨基酸具有良好的诱食效果，能够显著提高氨基酸的吸收速率，对氨基酸或其残基的吸收有促进作用(王佳丽等 2003)。

4 小结

当饲料中以 5%水解鱼蛋白替代鱼粉蛋白时，中国对虾肝胰脏中酸性磷酸酶活性显著高于对照组、10%和 15%替代组，血液中总的血细胞数量、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和溶菌酶活性显著高于其他组($P<0.05$)；超氧化物歧化酶、过氧化物酶和一氧化氮合酶活性在添加水解鱼蛋白组中得到显著增高($P<0.05$)。综合本实验，中国对虾的生长情况和肝胰脏、血清的非特异免疫指标变化情况，5%水解鱼蛋白为最佳替代量。

参 考 文 献

王佳丽，丁鉴锋. 2003. 饲料中寡肽作为氮源的优势. 中国饲料，13：23～24

兰 萍，宋晓玲，张 辉. 2008. 免疫增强剂在对虾生产中的研究与应用现状. 动物医学进展，29(10)：65～68

江晓路，刘树青，张朝晖，管华诗. 1999. 多糖对中国对虾免疫功能的影响. 中国水产科学，6(1)：66～68

刘树青，江晓路，牟海津，王慧滢，管华诗. 1999. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用. 海洋与湖沼，30(3)：278～283

李 光，樊景凤，林凤翱，梁玉波. 2007. 对虾的免疫机制及其疾病免疫预防的研究进展. 水产科学，26(1)：56～60

张 明，王 雷，郭振宇，王宝杰. 2004. 脂多糖和弧菌对中国对虾血清磷酸酶、超氧化物歧化酶和血蓝蛋白的影响. 海洋科学，28(7)：22～25

陈国福，黄 倢，宋晓玲. 2004. 对虾免疫机能研究概况. 水产学报，28(2)：209～215

陈国福，宋晓玲，黄 倢，周 进，王秀华. 2007. A3α-肽聚糖对凡纳滨对虾磷酸酶及细胞内酚氧化酶活性的影响. 海洋水产研究，28(1)：61～64

姚翠鸾，王志勇，相建海. 2006. 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能. 动物学研究，27(5)：549～557

姚翠鸾. 2004. 免疫刺激后中国明对虾血液抗菌力应答及两种免疫相关因子 LYZ 和 AK 的研究. 见：中国科学院海洋研究所博士学位论文

柳旭东，梁萌青，张利民，王际英，常 青，王家林，Yannis Kotzamanis. 2010. 饲料中添加水解鱼蛋白对半滑舌鳎稚鱼生长及生理生化指标的影响. 水生生物学报，34(2)：242～249

袁永俊，高 健. 2002. 水解鱼肉蛋白的酶法制备. 食品与机械，89(3)：13～16

靳　挺,高一勇,武玉学,吴天星. 2008. 带鱼水解鱼蛋白的酶法制备及其性质研究. 食品工业科技,29(7):114～120

魏克强,许梓荣. 2004. 对虾的免疫机制及其疾病预防策略的研究. 中国兽药杂志,38(9):25～29

Cheng, W. T., and Chen, J. C. 2001. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Fish & Shellfish Immunology, 11(1): 53～63

Franz, R., and Ashish, K. 2008. Hydrolysed by-products as attractants and palatability enhancers in feeds for shrimps. International Aquafeed, 8(9-10): 26～29

Le Moullac, G., and Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune response in crustacea. Aquaculture, 191(1-3): 121～131

Liang, M. Q., Wang, J. L., Chang, Q., and Mai, K. S. 2006. Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828). Aquaculture Research, 37(1): 102～106

Shi, T., Kong, J., Bao, Z. M., Liang, X. M., Liu, P., and Wang, C. M. 1998. Study on purification and ultrastructure of a baculovirus in *Penaeus chinensis*. Acta Oceanologica Sinica, 17(4): 485～502

Silva Jr, P. I., Daffres, S., and Bulet, P. 2000. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. Biol. Chem. 275(43): 33 464～33 470

Smith, V. J., and Soderhall, K. 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Developmental & Comparative Immunology, 15(4): 251～261

Soderhall, I., Bangyeekhun, E., Mayo, S., and Soderhall, K. 2003. Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. Developmental and Comparative Immunology, 27(8): 661～672

Sung, H. H., Hwang, S. F., and Tasi, F. M. 2000. Responses of giant freshwater prawn(*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by two strains of *Aeromonas* spp. J. Invertebr. Pathol. 76(4): 278～284

Wang, J. L., Liu, C. B., Zhang, H. W., and Zhao, S. Y. 1998. Study on pathogen of explosive epidemic disease of shrimp, Ⅱ. Purifcation of pathogen. Acta Oceanologica Sinica, 17(4): 531～536

Wu, H. C., Chen, H. M., and Shiau, C. Y-Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International, 36 (9-10): 949～957