

低鱼粉饲料中添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾非特异性免疫力和抗氧化能力的影响*

李晓丽 王 玲 宋 凯 鲁康乐 张春晓^① 袁香丽

(集美大学农业部东海海水健康养殖重点实验室 厦门市饲料检测与安全评价重点实验室 厦门 361021)

摘要 以鱼粉水平为 30%的饲料为高鱼粉饲料对照组,以豆粕替代高鱼粉饲料中 50%鱼粉形成低鱼粉基础饲料,低鱼粉基础饲料添加 0、0.5%、1.0%、1.5%和 2.0%低分子水解鱼蛋白,配制 6 种实验饲料,对初始体重为(0.44±0.02) g 的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)幼虾进行 48 d 的养殖实验。实验结束后采集样品,测定肝胰腺酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力和丙二醛(MDA)含量,并分析肠道先天免疫缺陷基因(IMD)、对虾素 3a 分子(Penaiedin 3a)、溶菌酶(LZM)和 Crustin 相关免疫基因的表达量,以探讨低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾非特异性免疫力和抗氧化能力的影响。结果显示,在低鱼粉饲料中添加适宜水平的低分子水解鱼蛋白能够显著提高对虾肝胰腺 T-SOD、AKP 和 ACP 的活力,降低 MDA 的含量;且 1.5%低分子水解鱼蛋白能增加 IMD、Penaiedin 3a、LZM 和 Crustin 基因表达量。综上,凡纳滨对虾非特异免疫力和抗氧化能力的降低可能是影响植物蛋白源替代鱼粉的关键原因之一,而在饲料中补充 1.0%–1.5%的低分子水解鱼蛋白可有效提高凡纳滨对虾抗病相关基因的表达量,增强其非特异免疫力和抗氧化能力。

关键词 凡纳滨对虾; 鱼粉替代; 水解鱼蛋白; 非特异免疫; 抗病基因

中图分类号 S963.71 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)06-0085-07

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)俗称南美白对虾,是目前世界养殖产量最高的三大虾种之一,具有抗逆性强、营养要求低、生长速度快、含肉量大等优点(储霞玲等, 2008)。然而,在集约化养殖过程中,密度高、水交换差及环境不稳定等因素,往往引起虾体的应激反应,使其抗氧化能力受损、免疫力下降,导致疾病频发、生长缓慢。各种水产药物的广泛应用引发了社会对养殖对虾食品安全的忧虑,通过营养调控来提高凡纳滨对虾的抗氧化和免疫能力进而提高虾的产量和品质已成为研究的热点。

低分子水解鱼蛋白是一类富含低分子蛋白的寡肽,比高分子物质更易被肠道上皮细胞吸收。林启存

等(2010)研究证明,由 2–6 个氨基酸组成的小肽具有重要的生物学活性,作为促进生长、增强免疫力的营养性添加剂广泛用于畜禽养殖。研究表明,在饲料中添加水解鱼蛋白能提高鱼类的生长、免疫力和对病原的抵抗力(Liang *et al*, 2006; Tang *et al*, 2008; Khosravi *et al*, 2015; 牟玉超等, 2016)。Nazeer 等(2012)也证实从红牙鱼(*Otolithes ruber*)肌肉中提取和制备的水解鱼蛋白在体内外均具有抗氧化活性。

近年来,由于海洋渔业资源的减少和水产养殖的快速发展,导致鱼粉的供应量锐减,而需求量猛增,鱼粉价格飙升,使得养殖成本明显增加,给饲料生产企业和养殖业带来了巨大压力和挑战。因此,亟需寻

* 农业部公益性行业专项子项目(201303053)和福建省中青年教育科研项目(JA15284)共同资助[This work was supported by Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (201303053), and Young and Middle-Aged Teachers Education Scientific Research Project of Fujian Province (JA15284)]. 李晓丽, E-mail: 1529194059@qq.com

① 通讯作者: 张春晓, 副教授, E-mail: cxzhang@jmu.edu.cn

收稿日期: 2016-06-02, 收修改稿日期: 2016-08-03

找替代鱼粉的蛋白资源或技术方案。植物蛋白源因价格低廉且供应稳定,备受研究者关注。但目前的研究表明,饲料中含有较高的植物蛋白会导致水产动物生长缓慢、饲料利用率差、免疫力下降等(Francis *et al.*, 2001; Opstvedt *et al.*, 2003)。其原因,一方面是植物蛋白含抗营养因子、缺乏某些小分子物质,影响了鱼类健康(Rahman *et al.*, 2010; Bulbul *et al.*, 2015; Chiu *et al.*, 2016),另一个可能的重要因素是植物蛋白在消化过程中低分子肽的释放量和比例与鱼粉明显不同(Aksnes *et al.*, 2006),影响了动物对蛋白质的吸收。本研究在高豆粕饲料中添加不同水平的小分子水解鱼蛋白,研究其对凡纳滨对虾抗氧化以及相关免疫基因的影响,为对虾配合饲料替代蛋白源研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 低分子水解鱼蛋白制备

将新鲜的沙丁鱼(*Sardina melanostictus*)清洗干净,经组织捣碎机(Retsch GM200)捣碎成糜浆。将糜浆按1:4的比例加入双蒸水,并用1.2 mol/L的NaOH调至pH为7.5。然后按糜浆重量的0.4%加入木瓜蛋白酶(80万U/g)和胰酶(4000 U/g)(江苏南宁庞博生物工程有限公司)(比例为3:1),在恒温磁力搅拌水浴锅里55℃水解8 h。反应结束后,95℃灭活15 min,反应液5000 r/min离心40 min,酶解液经200、1000 Da超滤膜堆装置(世达膜-001A)进行超滤,制成小肽滤液。滤液在真空冷冻干燥机中浓缩冻干、备用。制备的低分子水解鱼蛋白产品采用高效液相色谱仪(HPLC)测得水解鱼蛋白组分(郑珂珂等, 2011)(表1)。

1.2 实验饲料

以鱼粉和豆粕为主要蛋白源,鱼油、豆油和大豆磷脂为脂肪源,小麦面粉为主要糖源,并补充无机盐和和维生素等配制基础饲料。以30%鱼粉饲料为高鱼粉对照组,以植物蛋白替代高鱼粉饲料中50%的鱼粉蛋白配制低鱼粉基础饲料,向低鱼粉基础饲料中分别添加0、0.5%、1.0%、1.5%和2.0%低分子水解鱼蛋白,共配制成6种实验饲料(表2)。

各种实验饲料原料经粉碎,过80目筛网,按配比称量后逐级混合均匀,然后加入适量的水揉匀,经双螺杆制粒机(CD4×1TS 多功能催化剂成形机)加工

成1.5 mm×2 mm的颗粒状饲料,并在60℃烘干至饲料水分含量约12%,于-20℃冰箱保存备用。

1.3 实验对虾及饲养管理

实验所用凡纳滨对虾购于福建省漳州市正大集团育苗场。养殖实验在集美大学水产实验场中进行。正式实验前,凡纳滨对虾暂养于2个1000 L的水族箱中,以实验低鱼粉基础饲料投喂2周,待其适应实验饲料后,禁食24 h,然后选择健康、体重为(0.44±0.02) g的幼虾,随机放入24个实验桶(约120 L水体)中,每桶放养30尾虾。正式实验期间,每种饲料投喂4个养殖桶,且每天饱食投喂3次(08:00、14:00和18:00),实验持续48 d。实验期间,每天清除残饵和粪便,记录摄食量和对虾健康状况。实验用水为经砂滤后的天然海水,盐度为20-23,养殖全程不间断充气。实验期间水温为25-28℃,pH为7.9-8.2,溶解氧约为6 mg/L。每天排污1次,每次换水占总水量约10%。

实验结束时,将实验虾禁食24 h,以丁香油(1:10000)麻醉。分别从每桶随机抽取10尾实验虾,经麻醉后取肝胰腺和肠道于液氮速冻,放入-80℃冰箱保存。

1.4 样品分析与测定方法

1.4.1 常规成分分析 采用凯氏定氮法测定饲料粗蛋白含量;采用索氏抽提法,以乙醚为抽提剂测定饲料粗脂肪含量;将饲料样品在烘箱里烘(105℃)6 h后测得样品水分含量。

1.4.2 非特异免疫和抗氧化指标测定 丙二醛(MDA)含量,总超氧化物歧化酶(T-SOD)、碱性磷酸酶(AKP)和酸性磷酸酶(ACP)的酶活力均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定。

1.4.3 RNA提取和实时荧光定量PCR 用全自动研磨仪将50-100 mg肠道组织研磨至无大血块,用Trizol(Invitrogen, 美国)提取总RNA。用氯仿抽提,异丙醇沉淀RNA,再用75%的乙醇洗涤2次,最后用无菌水溶解RNA。用NanoDrop 2000分光光度计检测RNA纯度和浓度。用1.5%的琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。以Thermo Scientific Revert Aid First-Strand Synthesis System(Invitrogen, 美国)试剂盒合成cDNA。

实时荧光定量PCR采用20 μl体系:上下游引物

表1 低分子水解鱼蛋白的分子量分布
Tab.1 Molecular weight of low-molecular-weight fish hydrolysate

分子量 Molecular weight (Da)	<200	200-500	500-1000	1000-1500	1500-2000	>2000
含量 Content (%)	24.10	68.71	4.02	2.92	0.25	0.00

表 2 实验饲料配方及营养组成(以干物质为基础%)

Tab.2 Formulation and the proximate chemical composition of the experimental diets (Dry-matter basis %)

原料 Ingredients	HFM	LFM0	LFM0.5	LFM1.0	LFM1.5	LFM2.0
鱼粉 Fish meal	30.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
豆粕 Soybean meal	25.00	47.00	47.00	47.00	47.00	47.00
鱿鱼膏 Squid visceral paste	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
虾粉 Shrimp meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
低分子水解鱼蛋白 Low-molecular-weight fish hydrolysate	0.00	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00
小麦粉 Wheat flour	31.00	22.30	21.80	21.30	20.80	20.30
鱼油 Fish oil	1.00	2.20	2.20	2.20	2.20	2.20
大豆油 Soybean oil	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
大豆磷脂 Soybean lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
氯化胆碱 Choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
磷酸二氢钙 Monocalcium phosphate	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
矿物质混合物 Mineral premix ^a	0.05	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
维生素混合物 Vitamin premix	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
维生素 C 磷酸酯 L-ascorbate-2-phosphate	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
防霉剂 Mold inhibitor	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
海藻酸钠 Sodium alginate	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
氨基酸混合物 Amino acid mixture ^b	0.00	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
乙氧喹啉 Ethoxyquin	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
主要成分 Proximate composition						
水分 Moisture	12.97	13.46	11.78	11.35	11.26	12.27
粗蛋白 Crude protein	44.44	44.49	43.68	45.74	45.37	45.56
粗脂肪 Crude lipid	7.59	7.56	7.55	7.55	7.54	7.54

注: a: 以占每千克饲料重为标准, 含有 Mg 233.3 mg、Zn 92.8 mg、Se 40 mg、I 20 mg、Mn 220.1 mg 和 Cu 128 mg; b: 以占总氨基酸量的百分比为标准, 赖氨酸占 50%、蛋氨酸 30%、苏氨酸 20%。所有氨基酸为晶体氨基酸

Notes: a: Provided per kg of feed, Magnesium 233.3 mg, Zinc 92.8 mg, Selenium 40 mg, Iodine 20 mg, Manganese 220.1 mg, and Copper 128 mg; b: Provided as percentage of total amino acids, Lysine 50%, Methionine 30%, Threonine 20%. All amino acids were crystal amino acids

各 1 μ l, 稀释的 cDNA 模板溶液 9 μ l, AceQ[®] qPCR SYBR[®] Master 混合物 10 μ l。程序为 95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 共 40 个循环。基因表达结果采用相对表达量的形式, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。凡纳滨对虾免疫基因、内参基因 β -actin 引物序列参考张盛静等(2015)(表 3)。

1.4.4 统计方法 采用 SPSS 17.0 对所得数据进行方差分析, 若差异达显著性水平 $P < 0.05$, 则进行 Duncan 氏多重比较。

2 结果

2.1 饲料添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾肝胰腺非特异免疫和抗氧化指标的影响

饲料中添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾肝胰腺非特异性免疫和抗氧化指标的影响见表 4。由表 4 可

知, 凡纳滨对虾 T-SOD 的活力在低分子肽添加组(LFM0.5、LFM1.0、LFM1.5 和 LFM2.0)显著高于低鱼粉基础组(LFM0)($P < 0.05$), 而在低分子水解鱼蛋白添加组中, LFM1.0 组的活力最高, 显著高于其他组, 但与高鱼粉组(HFM)差异不显著($P > 0.05$)。当低分子水解鱼蛋白的添加量高于 1.0%时, T-SOD 的活力显著降低($P < 0.05$)。对虾肝胰腺 MDA 含量在 LFM0 组最高, 但与 HFM 和 LFM0.5 组差异不显著($P > 0.05$), 当低分子肽的添加量在 1.0%–2.0%之间时, MDA 含量显著低于其他组($P < 0.05$)。对虾肝胰腺 AKP 活力在 LFM1.0 组最高, 显著高于 HFM、LFM0 和 LFM2.0 组($P < 0.05$), 其中 HFM、LFM1.5 和 LFM2.0 组活力差异不显著。对虾肝胰腺 ACP 活力在 LFM1.0 组最高, 与 LFM0.5 组差异不显著($P > 0.05$), 但显著高于 HFM 和 LFM0 组($P < 0.05$), 当低分子水解鱼蛋白的添加量高于 1.0%时, ACP 活力显著降低。

表 3 凡纳滨对虾非特异免疫基因引物(张盛静等, 2015)
Tab.3 Primers for genes of nonspecific immunity of *L.vannamei*(Zhang *et al*, 2015)

基因 Gene	正向引物 Forward primer(5'-3')	反向引物 Reverse primer(5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
IMD	ATACATCCTGCCGTTGCCGA	CCGAGATGGGTTCCTTGTT	60
Penaiedin 3a	CACCCTTCGTGAGACCTTTG	AATATCCCTTTCCCACGTGAC	60
LZM	TGTTCCGATCTGATGTCC	GCTGTTGTAAGCCACCC	60
Crustin	GAGGGTCAAGCCTACTGCTG	ACTTATCGAGGCCAGCACAC	60
β-actin	GAGCAACACGGAGTTCGTTGT	CATCACCAACTGGGACGACATGGA	60

表 4 饲料添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾肝胰腺非特异免疫和抗氧化指标的影响
Tab.4 Effects of dietary low-molecular-weight fish hydrolysate on nonspecific immunity and antioxidant indices of *L.vannamei* hepatopancreas

指标 Indices	HFM	LFM0	LFM0.5	LFM1.0	LFM1.5	LFM2.0
总超氧化物歧化酶 T-SOD (U/mg prot)	5.47±0.35 ^{ab}	3.19±0.09 ^d	4.51±0.00 ^c	5.93±0.13 ^a	5.12±0.15 ^b	4.47±0.31 ^c
丙二醛 MDA (nmol/mg)	1.93±0.07 ^{bc}	2.09±0.05 ^c	2.04±0.10 ^c	1.67±0.08 ^a	1.70±0.06 ^a	1.82±0.03 ^{ab}
碱性磷酸酶 AKP (U/g prot)	234.16±1.13 ^b	265.26±14.75 ^b	323.92±8.91 ^a	344.08±4.31 ^a	333.52±23.81 ^a	245.05±21.12 ^b
酸性磷酸酶 ACP (U/g prot)	348.24±30.72 ^d	406.19±3.58 ^{cd}	532.65±12.63 ^{ab}	578.35±24.23 ^a	461.94±21.16 ^{bc}	349.05±41.60 ^d

注: 不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: Different letters denoted significant differences ($P<0.05$)

2.2 凡纳滨对虾肠道 IMD、Penaiedin 3a、LZM 和 Crustin mRNA 的相对表达量

凡纳滨对虾肠道 IMD mRNA 的相对表达量在 LFM1.5 组最高, 显著高于 LFM2.0 组的表达量($P<0.05$), 其他各组的表达量差异不显著($P>0.05$)(图 1)。对虾肠道 Penaiedin 3a mRNA 的相对表达量在 LFM1.0 组最高, 显著高于 LFM2.0 组($P<0.05$), 其他各组间差异不显著($P>0.05$)(图 1)。对虾肠道 LZM mRNA 的相对表达量在低鱼粉基础组(LFM0)和低分子肽添加最高组(LFM2.0)最低, 但各组间差异不显著($P>0.05$)(图 1)。LFM1.0 和 LFM1.5 组对虾肠道 Crustin mRNA 的相对表达量显著高于 LFM0 组($P<0.05$), 其他各组间差异不显著($P>0.05$)(图 1)。

3 讨论

3.1 饲料中添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾非特异免疫力和抗氧化能力的影响

蛋白水解物具有抗氧化、降血压、调节脂肪代谢以及增强免疫等多种生物学功能, 这主要依赖于其所含的生物活性肽(王新星等, 2012; Bui *et al*, 2014)。通过刺激淋巴细胞的增殖、增强自然杀伤细胞的活性和调节抗体合成和细胞因子也证实水解鱼蛋白具有免疫刺激和抗菌的作用(Fitzgerald *et al*, 2006; Hartmann

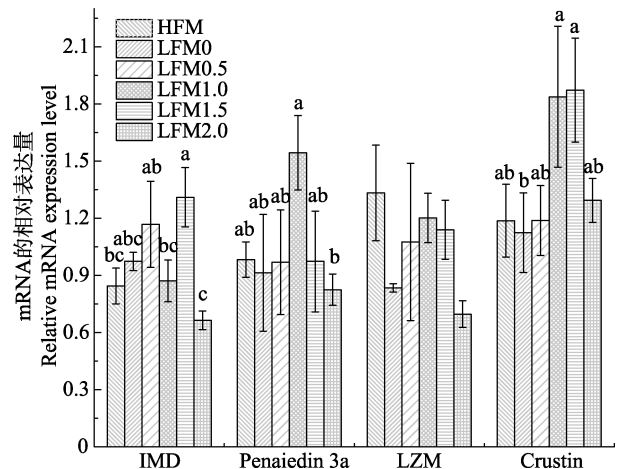


图 1 凡纳滨对虾肠道 IMD、Penaiedin 3a、LZM 和 Crustin mRNA 的相对表达量

Fig.1 Relative expression of IMD, Penaiedin 3a, LZM and Crustin mRNA in the intestine of *L.vannamei*

不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Different letters denoted significant differences ($P<0.05$)

et al, 2007)。在饲料中添加水解鱼蛋白能够提高鱼类 SOD 等抗氧化酶的活力以及溶菌酶、呼吸爆发、血清补体、免疫球蛋白等为标志的非特异免疫力(Liang *et al*, 2006; Tang *et al*, 2008; Khosravi *et al*, 2015)。本研究发现, 在饲料中添加低分子水解鱼蛋白可显著提高凡纳滨对虾肝胰腺中 T-SOD 的活力, 并且 LFM1.0

组与 HFM 组 T-SOD 的活力差异不显著。T-SOD 是一种抗氧化酶,在清除自由基、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)。Nazeer 等(2012)制备并分析了红牙鱼肌肉的水解鱼蛋白,发现体内外的抗氧化性与氨基酸序列 Lys-Thr-Phe-Cys-Gly-Arg-His (861.6 Da)有关。滕玉清等(2011)认为,水解鱼蛋白分解生成的某些游离氨基酸可能是 SOD 的催化酶,可使 SOD 酶活性升高,清除对虾体内过多的自由基,平衡代谢,提高免疫力。由于生物有机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基,后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物,如醛基(MDA)、酮基、羟基和羰基等,这些产物能引起细胞损伤,甚至凋亡。因而组织 MDA 的含量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞损伤的程度。本研究结果显示,当低分子肽的添加水平在 1.0%–2.0%时,能显著降低对虾肝胰腺中 MDA 的含量。综上所述,在饲料中添加低分子水解鱼蛋白能清除对虾肝胰腺过多的自由基,提高抗氧化能力。

AKP 和 ACP 是巨噬细胞溶酶体的标志酶,在对虾免疫体系中是衡量机体免疫机能和健康状况的重要指标,这两种酶能催化磷酸单脂水解,在酸性和碱性条件下水解磷酸苯二钠,释放酚和磷酸,在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢(刘树青等,1999)。低鱼粉饲料 1.0%水解物添加组(LFM1.0)中,对虾肝胰腺 AKP 和 ACP 的活力显著高于高鱼粉组(HFM)、低鱼粉基础组(LFM0)和 2.0%水解鱼蛋白添加组(LFM2.0),但与 LFM0.5、LFM1.5 组差异不显著。这表明,在饲料中添加适量的低分子水解鱼蛋白能提高 AKP 和 ACP 的活力,而高水平添加则会降低 AKP 和 ACP 的活力。滕玉清等(2011)在对中国明对虾(*Penaeus chinensis*)的研究中也发现,添加 10%水解鱼蛋白会降低 ACP 和 AKP 的活力,这说明饲料中过高的水解蛋白可能会抑制 ACP 和 AKP 的活力。

3.2 饲料中添加低分子水解鱼蛋白对凡纳滨对虾免疫基因的影响

生物机体利用免疫系统来抵抗病原体的入侵。先天性免疫是无脊椎动物防御致病因子的重要防线(Iwanaga *et al*, 2005)。一系列免疫因子,如对虾素 3a 分子(Penaiedin 3a)、溶菌酶(LZM)和甲壳素(Crustin)等在体液免疫中发挥重要作用,与凡纳滨对虾抗感染能力的强弱密切相关。在无脊椎动物中,肠道先天免疫缺陷基因 *IMD* 编码一种免疫缺陷蛋白 *IMD*,当机体受到病原菌入侵时,*IMD* 蛋白将特定异物入侵的信

号由细胞外向细胞内传递,并引起细胞产生一系列级联反应,形成免疫效应因子(如抗菌肽)(Li *et al*, 2013)。本研究表明,在对虾饲料中添加低分子水解鱼蛋白会影响 *IMD*、Penaiedin 3a 和 *Crustin* 基因的表达量,但 *LZM* 基因表达量在各实验组间差异不显著。在低鱼粉饲料中低分子水解鱼蛋白的添加量为 1.5%时,能显著提高对虾肠道 *IMD* mRNA 的相对表达量,但添加量达到 2.0%时,*IMD* mRNA 的相对表达量却显著降低。这表明,低鱼粉饲料中添加适宜水平的低分子水解鱼蛋白能刺激 *IMD* mRNA 的表达,添加量过高反而会抑制表达。对虾素分子只存在于对虾类中发挥抗菌功能(Li *et al*, 2010)。本研究中,饲料中添加 1.0%的低分子水解鱼蛋白组的 Penaiedin 3a mRNA 相对表达量最高,而添加 2.0%的低分子水解鱼蛋白组的 Penaiedin 3a mRNA 相对表达量最低,这说明适宜的低分子水解鱼蛋白添加量可提高凡纳滨对虾免疫力,而高水平添加会造成免疫抑制。

溶菌酶广泛分布于对虾体内,能破坏革兰氏阳性菌细胞壁中的肽聚糖层,从而使机体能够抵御病原微生物的入侵(张士瑾等,2014)。张盛静等(2015)以副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)对凡纳滨对虾攻毒,发现饲料益生菌添加组对虾 *LZM* mRNA 的相对表达量显著高于未添加组。在本研究中,各实验组 *LZM* mRNA 的相对表达量没有显著差异,然而与低鱼粉基础组(LFM0)相比,高鱼粉组 *LZM* mRNA 的相对表达量较高,且当低分子水解鱼蛋白的添加量在 0.5%–1.5%时,对虾肠道 *LZM* mRNA 的相对表达量也有升高趋势。说明高豆粕替代鱼粉可能会造成对虾肠道溶菌酶活力降低,而添加适量的低分子水解鱼蛋白可能在一定程度上提高肠道溶菌酶活力。*Crustin* 被称为甲壳动物阳离子,富含半胱氨酸抗菌肽,具有蛋白酶抑制和抗菌活性。在低鱼粉饲料中添加 1.0%–1.5%的低分子水解鱼蛋白,能显著提高 *Crustin* mRNA 的相对表达量,并且显著高于低鱼粉组(LFM0)。这表明,在低鱼粉饲料中添加适宜水平的低分子水解鱼蛋白可能会提高凡纳滨对虾肠道的抗菌能力。以上结果显示,在本研究饲料处理条件下,凡纳滨对虾肠道各免疫基因表达的变化趋势存在较大差异,各免疫基因对低分子水解蛋白的刺激存在不同的反应,低分子水解蛋白对凡纳滨对虾免疫力的影响可能存在多种途径。

综上所述,在饲料中添加 1.0%–1.5%的低分子水解鱼蛋白能够提高凡纳滨对虾抗氧化能力,增强其非特异性免疫能力。

参 考 文 献

- Aksnes A, Hope B, Jönsson E, *et al.* Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. *Aquaculture*, 2006, 261(1): 305–317
- Bui HTD, Khosravi S, Fournier V, *et al.* Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. *Aquaculture*, 2014, 418–419(1): 11–16
- Bulbul M, Koshio S, Ishikawa M, *et al.* Growth performance of juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* (Bate) fed diets replacing fishmeal with soybean meal. *Aquaculture Research*, 2015, 46(3): 572–580
- Chiu ST, Wong SL, Shiu YL, *et al.* Using a fermented mixture of soybean meal and earthworm meal to replace fish meal in the diet of white shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, 2016, 47(11): 3489–3500
- Cu XL, Cao JM, Zhao HX, *et al.* Effects of dietary selenium and glutathione on growth, feed coefficient and body composition of *Penaeus vannamei*. *Feed Industry*, 2008, 29(12): 28–31 [储霞玲, 曹俊明, 赵红霞, 等. 饲料中添加硒和谷胱甘肽对凡纳滨对虾生长、饲料系数和体成分的影响. *饲料工业*, 2008, 29(12): 28–31]
- Fitzgerald RJ, Murray BA. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 2006, 59(2): 118–125
- Francis G, Makkar HPS, Becker K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 2001, 199(3–4): 197–227
- Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(2): 163–169
- Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 38(2): 128–150
- Khosravi S, Bui HTD, Rahimnejad S, *et al.* Effect of dietary hydrolysate supplementation on growth performance, non-specific immune response and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture Nutrition*, 2015, 21(3): 321–331
- Li CY, Song YL. Proline-rich domain of penaeidin molecule exhibits autocrine feature by attracting penaeidin-positive granulocytes toward the wound-induced inflammatory site. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(6): 1044–1052
- Li FH, Xian JH. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(4): 973–980
- Liang MQ, Wang JL, Chang Q, *et al.* Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828). *Aquaculture Research*, 2006, 37(1): 102–106
- Lin QC, Fang CF, Zhong GF, *et al.* Effect of dietary small peptides on growth and non-specific immunity of *Penaeus vannamei* larvae. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2010, 22(5): 590–595 [林启存, 方长富, 钟国防, 等. 小肽对凡纳滨对虾幼体生长性能及非特异性免疫能力的影响. *浙江农业学报*, 2010, 22(5): 590–595]
- Liu SQ, Jiang XL, Mou HJ, *et al.* Effects of immunopolysaccharide on LSZ, ALP, ACP and POD activities of *Penaeus chinensis* serum. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, 30(3): 278–83 [刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 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*, 1999, 30(3): 278–283]
- Mu YC, Liang MQ, Zheng KK, *et al.* Effects of small molecule weight fish protein hydrolysate in high plant protein diets on the expression of liver IGF-I receptor and the growth of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 49–57 [牟玉超, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 高植物蛋白饲料中不同水平低分子水解鱼蛋白对大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 幼鱼生长及肝脏 IGF-I 受体表达的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 49–57]
- Nazeer RA, Kumar NSS, Ganesh RJ, *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. *Peptides*, 2012, 35(2): 261–268
- Opstvedt J, Aksnes A, Hope B, *et al.* Efficiency of feed utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with increasing substitution of fish meal with vegetable proteins. *Aquaculture*, 2003, 221(1–4): 365–379
- Rahman SHA, Razek FAA, Goda AS, *et al.* Partial substitution of dietary fish meal with soybean meal for speckled shrimp, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius, 1798) (Decapoda: Penaeidae) juvenile. *Aquaculture Research*, 2010, 41(9): e299–e306
- Tang HG, Wu TX, Zhao ZY, *et al.* Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). *Journal of Zhejiang University Science B*, 2008, 9(9): 684–690
- Teng YQ, Liang MQ, Wang ZL, *et al.* Effects of fish protein hydrolysate in the diet on the non-specific immune response of *Penaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(5): 84–91 [滕玉清, 梁萌青, 王正丽, 等. 饲料中水解鱼蛋白对中国对虾非特异免疫的影响. *渔业科学进展*, 2011, 32(5): 84–91]
- Wang XX, Wei YL, Liang MQ. Fish protein hydrolysates: Properties and applications. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(9): 1636–1642 [王新星, 卫培良, 梁萌青. 鱼蛋白水解物的特性及其应用. *动物营养学报*, 2012, 24(9): 1636–1642]
- Zhang M, Wang L, Guo ZY, *et al.* Effect of lipopolysaccharide and *Vibrio anguillarum* on the activities of phosphatase, superoxide dismutase and the content of hemocyanin in the serum of *Fenneropenaeus chinensis*. *Marine Sciences*, 2004,

28(7): 22–25 [张明, 王雷, 郭振宇, 等. 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, 2004, 28(7): 22–25]

Zhang SC, Xu N. Advance in study of animal lysozymes. Periodical of Ocean University of China, 2014, 44(6): 46–51 [张士瑾, 许娜. 动物型溶菌酶研究新进展. 中国海洋大学学报, 2014, 44(6): 46–51]

Zhang SJ, Song XL, Zhao XJ, *et al.* Effects of adding probiotics to the feed on anti-infection and five kinds of immune gene expression of *Litopenaeus vannamei*. Journal of Fisheries of

China, 2015, 39(6): 899–907 [张盛静, 宋晓玲, 赵小金, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾抗感染和 5 种免疫基因表达的影响. 水产学报, 2015, 39(6): 899–907]

Zheng KK, Liang MQ, Yao HB, *et al.* Inclusion of size-fractionated fish protein hydrolysate in high plant protein diets for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(5): 829–834 [郑珂珂, 梁萌青, 姚宏波, 等. 在高植物蛋白饲料中添加水解鱼蛋白对牙鲆幼鱼的影响. 水生生物学报, 2011, 35(5): 829–834]

(编辑 马瑾艳)

Effects of Dietary Low-Molecular-Weight Fish Hydrolysate (LWFH) on Nonspecific Immunity and Antioxidant Capacity of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

LI Xiaoli, WANG Ling, SONG Kai, LU Kangle, ZHANG Chunxiao^①, YUAN Xiangli

(The Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Xiamen Key Laboratory for Feed Quality Testing and Safety Evaluation, Jimei University, Xiamen 361021)

Abstract In this study we investigated effects of low-molecular-weight fish hydrosate (LWFH) on nonspecific immune and antioxidant capacity in the hepatopancreas and the expression of some immunity-related genes in the digestive tract of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). A diet containing 30% of fishmeal was regarded as a high fishmeal diet (HFM), and a diet containing soybean meal that substitutes 50% of the fishmeal in HFM was considered as a low fishmeal basal diet (LFM). Five LFM diets were formulated by adding LWFH at incremental levels (0, 0.5%, 1.0%, 1.5% and 2.0%) to LFM, which were designated as LFM0, LFM0.5, LFM1.0, LFM1.5, and LFM2.0, respectively. The experimental diets were fed to *L. vannamei* of (0.44±0.02) g in a water recirculation system for 48 days. The nonspecific immunity and antioxidant indices, and the activities of acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), total superoxide dismutase (T-SOD) and the content of malonaldehyde (MDA) in the hepatopancreas were measured to determine the effects of dietary LWFH. We studied the expression of immunity-related genes including IMD, Penaiedin 3a, LZM and Crustin using qRT-PCR. The results suggested that a certain amount of LWFH could significantly improve the activities of ACP, AKP and T-SOD while reducing the content of MDA in the hepatopancreas. Moreover, the relative expression of IMD, Penaiedin 3a, LZM and Crustin were up-regulated in the LFM1.5 group. Therefore, the plant proteins may not be an ideal substitute because they may reduce the nonspecific immunity and antioxidant capacity of *L. vannamei*. Our results also suggested that 1.0%–1.5% LWFH added in LFM might increase the expression of the disease resistance related genes and enhance nonspecific immunity and antioxidant capacity.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Replacement of fishmeal; Fish hydrolysate; Nonspecific immunity; Resistance gene

① Corresponding author: ZHANG Chunxiao, E-mail: cxzhang@jmu.edu.cn