

文章编号: 1000-0615(2019)10-2209-09

DOI: 10.11964/jfc.20190811919

发酵饲料对中华绒螯蟹幼蟹生长、抗氧化、免疫和蛋白代谢的影响

许晨远¹, 迟 骋¹, 郑肖川¹, 刘佳岱¹, 张彩燕¹, 刘文斌^{1*},
刘艳玲², 闫亚楠², 黄 健², 王 胜²

(1. 南京农业大学动物科技学院, 江苏省水产动物营养重点实验室,
动物科学类国家级实验教学示范中心, 江苏 南京 210095;
2. 南京宝辉生物饲料有限公司, 江苏 南京 211113)

摘要: 为研究发酵饲料配伍配合饲料投喂对中华绒螯蟹幼蟹生长性能、抗氧化、免疫机能和代谢的影响, 实验分别制备了5组饲料: 对照组以幼蟹配合饲料为基础饲料(F0), 各实验组在配合饲料基础上额外添加日投喂量5%、10%、15%和20%发酵饲料, 并依次命名为F5、F10、F15和F20。150只均重无显著差异的中华绒螯蟹随机分5组, 每组设3个重复, 每重复10只蟹, 分别饲喂对应组饲料, 每天饱食投喂1次, 养殖周期59 d。在养殖结束后采集血淋巴和肝胰腺以测定抗氧化指标、免疫指标和蛋白代谢酶活性。结果发现, 额外投喂发酵饲料后, 各组幼蟹的增重率和特定生长率均较对照组显著升高。随着额外投喂发酵饲料量的增加, 血淋巴中过氧化氢酶含量先上升后下降, 其中F5、F10和F15组较对照组显著升高。各处理组酸性磷酸酶活性高于对照组, 但差异不显著。各组总蛋白和球蛋白含量随着发酵饲料额外投喂量提高呈现先升高后降低的趋势, 但是各组间差异不显著。此外, 额外添加日投喂量20%比例以下的发酵饲料, 可以提升肝胰腺中胰蛋白酶、胃蛋白酶、谷草转氨酶、谷丙转氨酶活性。研究表明, 额外投喂发酵饲料可以促进中华绒螯蟹幼蟹的生长, 还可以提高其抗氧化能力、免疫机能和蛋白代谢能力。

关键词: 中华绒螯蟹; 发酵饲料; 生长; 抗氧化; 免疫; 蛋白代谢

中图分类号: S 963

文献标志码: A

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国重要的经济型蟹类之一, 主要分布于渤海、黄海和东海沿岸各省市。因为中华绒螯蟹味道鲜美, 营养丰富, 深受广大消费者喜爱, 使其市场需求量与日俱增, 养殖业得以蓬勃发展。2016年我国中华绒螯蟹的养殖产量就已达到了81万t^[1], 也因此产生了巨大的饲料资源需求。然而我国优质饲料原料缺乏, 长期存在一定饲料安全性等问题, 制约了我国水产养殖业的持续稳定发展。采用创新技术, 利用新型饲料资源, 提高可持

续性, 扩大养殖效益已成为了当务之急^[2]。

生物发酵饲料是指利用一些特种功能性微生物与常规的饲料原料及辅料混合后发酵, 最终制成的含有一定量活性益生菌的、安全无污染的饲料^[3]。生物发酵饲料原料来源广泛, 成本低廉, 同时具备抗营养因子低、易于消化吸收、促进动物生长、增强动物免疫能力等众多优点, 完全符合当前我国养殖业绿色发展的需求^[4]。目前众多科研工作者也对发酵饲料在水产养殖中的应用展开了研究。李小梅等^[5]使用发酵

收稿日期: 2019-08-23 修回日期: 2019-10-04

资助项目: 江苏省农业科技自主创新项目(CX(19)1006); 江苏省现代渔业产业技术体系专项(JFRS-01); 江苏省渔业科技重点项目(D2018-4); 国家自然科学基金(31802347); 中央高校基本科研业务费专项(KJQN201937); 南京宝辉生物饲料有限公司项目

通信作者: 刘文斌, E-mail: wbliu@njau.edu.cn

豆粕替代鱼粉投喂凡纳滨对虾(*Litopenaeus vanmei*), Dossou等^[6]在饲料中使用发酵菜籽粕代替部分鱼粉饲喂真鲷(*Pagrus major*)均观察到增重率显著提高, 饵料系数下降。但是, 关于发酵饲料在中华绒螯蟹上的研究仍然较少且不够深入全面, 使得发酵饲料在中华绒螯蟹饲料中使用缺乏足够的参考。

有研究证明, 饲料经过芽孢杆菌发酵后, 其中含有了高活性的蛋白酶和一定抗氧化能力的活性肽^[7]; 乳酸杆菌加入饲料中可以抑制有害细菌的生长, 同时, 饲料经过乳酸杆菌发酵后可以改善适口性^[8]; 利用酵母菌发酵饲料, 除了可以提高动物对干物质和中性洗涤纤维的消化率外, 还可以有效促进动物生长, 提高动物免疫力^[9]。因此, 本实验采用的发酵饲料是选用玉米、豆粕等饲料原料作为发酵底物, 接种芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌等活性益生菌, 采用好氧、厌氧的深度发酵技术, 经过严格发酵过程管控, 获得丰富的代谢产物和有益菌组成。研究其在配合饲料基础上额外配伍不同量发酵饲料, 投喂中华绒螯蟹幼蟹, 从生长表现、抗氧化能力、免疫能力和蛋白代谢等多方面入手, 探讨发酵饲料对中华绒螯蟹幼蟹生长性能和生理生化指标的影响, 以期发酵饲料在中华绒螯蟹饲料中的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

实验所用的发酵饲料由南京宝辉生物饲料有限公司提供, 该发酵饲料采用玉米、豆粕等饲料原料作为发酵底物, 接种芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌等活性益生菌种, 采用多菌种多底物好氧+厌氧深度发酵技术制备。经测定, 其主要营养指标如下: 粗蛋白(以干物质计)≥ 23.0%; 粗脂肪(以干物质计)≥ 2%; 粗纤维(以干物质计)≤ 6%; 粗灰分(以湿品计)≤ 5.0%; 酸溶蛋白(占百分比)≥ 25.0%; 总酸(以乳酸含量计, 以湿品计)≥ 3.0%; pH值≤ 4.5; 水分含量(占百分比)≤ 45.0%。

幼蟹配合饲料购自江苏海普瑞饲料有限公司, 配合饲料营养组成见表1。对照组仅投喂配合饲料, 命名为F0; 此外, 设置四组试验组, 每组在日投喂量基础上额外配伍日投喂量5%、10%、15%和20%的发酵饲料, 并将各试验组依次命名为F5, F10, F15, F20。

表1 配合饲料营养组成

Tab. 1 Proximate composition of compound feed

项目	items	配合饲料/%	compound feed
水分	moisture	12.0	
粗蛋白质	crude protein	40.0	
粗脂肪	crude lipid	7.0	
粗灰分	ash	8.0	
无氮浸出物	nitrogen free extract	33.0	

1.2 实验蟹与养殖管理

实验用中华绒螯蟹选自南京市浦口区的一个养殖池塘中, 养殖试验在南京市浦口区星甸镇南京农业大学水产试验基地的室外白皮桶中进行。在饲养试验开始之前, 幼蟹要暂养在白皮桶中2周, 以适应白皮桶的养殖环境和饲料投喂的养殖模式。实验共使用了150只大小均一, 体质健康, 螯足健全的幼蟹, 平均初始体质量(1.01±0.16) g, 将他们按雌雄比例1:1随机分为5组, 每组设置3个重复, 每个重复为10只中华绒螯蟹, 养殖于15个白皮桶中(2×1.2×0.5 m, 长:宽:高)。每个白皮桶中设置8根PVC管和适量的水葫芦, 以供幼蟹躲避, 防止相互残杀。在整个实验期间, 白皮桶中持续充气, 定期换水1/3, 保持水温(24±5) °C、pH 8.0~8.6和溶解氧5 mg/L。

正式养殖实验持续了59 d, 幼蟹完成2次脱壳。在饲养过程中, 每天喂食一次(17:00), 饱食投喂。投喂饲料的量根据天气和饲养环境进行适当的调整, 确保在投喂3 h后不留下饵料。每天观察各组蟹的摄食、残饵、死亡情况, 做好详细记录以备分析。

实验保证所有有关于中华绒螯蟹活体实验的协议都遵守南京农业大学爱护与使用实验动物的道德指导。本研究由南京农业大学动物保护与利用委员会批准(许可证号: SYXK (Su) 2017-0007)。

1.3 样品采集与分析测定

样品采集 采样前, 所有中华绒螯蟹幼蟹饥饿处理48 h, 依次测量每只幼蟹的体质量, 用来计算增重率(WGR)和特定生长率(SGR)。然后从每个白皮桶中随机选择3只中华绒螯蟹进行取样。每只蟹抽取等量血淋巴用于指标测定。血淋巴抽取后立刻在4 °C下3 500 r/min离心10

min,接着立刻吸取上层清液装入离心管中保存于-20℃,用于后期抗氧化和免疫酶活性的测定。最后在无菌环境下完全采集了幼蟹的肝胰腺并称重,全部装入冻存管中保存于-20℃,用于后期蛋白代谢酶活性的测定。

生长指标及计算方法 蟹生长相关指标:增重率(WGR)、特定生长率(SGR)、存活率(SR)、肝体比(HSI)的计算公式如下:

$$\text{增重率(WGR, \%)} = (W_1 - W_0) / W_0 \times 100\%$$

$$\text{特定生长率(SGR, \%)} = (\ln W_1 - \ln W_0) / t \times 100\%$$

$$\text{存活率(SR, \%)} = N_1 / N_0 \times 100\%$$

$$\text{肝体比(HSI, \%)} = W_2 / W_3 \times 100\%$$

式中, W_0 为蟹的初始体质量(g), W_1 为终末体质量(g), t 为养殖的天数(d), N_0 为实验开始时蟹的数量(只), N_1 为实验结束时蟹的数量(只), W_2 为肝胰腺的质量(g), W_3 为相应蟹的体质量(g)。

血淋巴抗氧化指标测定 各酶活测定采用南京建成科技有限公司提供的试剂盒。脂质过氧化物(LPO)的测定方法是在45℃温度下,一共反应60 min,一分子LPO会和两分子的显色剂反应,最终产生了稳定的生色团,它在568 nm下有最大吸收峰,使用标准曲线公式计算吸光度值得到检测物中LPO的含量;过氧化氢酶(CAT)的测定方法为钼酸铵可迅速中止CAT分解过氧化氢的反应,加入钼酸铵后,未反应的过氧化氢与钼酸铵反应产生淡黄色的络合物,然后在405nm处测定吸光度的变化量,就可以计算出CAT的活力;总抗氧化能力(T-AOC)的测定方法是根据抗氧化物存在时,ABTS生成ABTS⁺的过程会被抑制,只需要测定405 nm处ABTS⁺的吸光度值就能计算出样品的总抗氧化能力(T-AOC)。

血淋巴免疫指标测定 血淋巴中的酸性磷酸酶活性、总蛋白含量和白蛋白含量的测定均使用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒。酸性磷酸酶(ACP)的测定是根据ACP能将磷酸苯二钠分解为游离酚和磷酸,酚在碱性溶液中可以和4-氨基安替吡啉反应,最后被铁氰化钾氧化,生成了红色的醌衍生物,根据红色的深浅就能测定ACP酶活性的高低;总蛋白含量的测定是利用在碱性条件下,蛋白能将Cu²⁺还原,而Cu与BCA试剂反应形成了紫色络合物,在562 nm有最大吸收峰,吸光度值和浓度成正比关系,因此只需要测吸光度即可进而计算出待测蛋白的浓度;白蛋白采用溴甲酚绿比色法。球蛋白

含量=总蛋白-白蛋白,白球比=白蛋白/球蛋白×100%。

肝胰腺蛋白代谢酶活性测定 测定胰蛋白酶、胃蛋白酶、Na⁺, K⁺-ATP酶、谷草转氨酶和谷丙转氨酶的试剂盒均购自南京建成科技有限公司。为测定肝胰腺中的胰蛋白酶、胃蛋白酶、Na⁺, K⁺-ATP酶、谷草转氨酶和谷丙转氨酶的活性,需要首先取样品在9倍体积的生理盐水中匀浆,然后在离心机上,4℃条件下,5 000 r/min离心15 min,最后取出中层清液用于酶活性的测定。

肝胰腺中胰蛋白酶活性的测定的原理是利用胰蛋白酶能催化水解精氨酸乙酯的酯链,并在253 nm处提升了吸光度。酶的活性大小可以依据吸光度的前后变化来计算。

肝胰腺中胃蛋白酶活性的测定的原理是利用胃蛋白酶将底物蛋白质水解为含酚的氨基酸,然后根据含酚氨基酸可以还原酚试剂得到蓝色物质的原理,采用比色法测定胃蛋白酶活性的高低。

肝胰腺中Na⁺, K⁺-ATP酶活性测定的原理是ATP酶可以分解ATP形成ADP和无机磷,只需要测定产生的无机磷的含量就可以得出ATP酶活性的高低。

肝胰腺中谷草转氨酶和谷丙转氨酶的活性测定采用赖氏法^[10]。

1.4 数据统计与分析

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析,第一步采用单因素方差分析方法(One-Way ANOVA),然后进行Tukey氏检验法进行多重比较以分析所有数据的差异性。实验数据统计时均以平均数±标准误的形式表示,且数据都保留2位小数。若组间比较之后, $P < 0.05$,则认为有显著性差异。

2 结果

2.1 发酵饲料配伍配合饲料投喂对中华绒螯蟹幼蟹生长的影响

在日投喂量基础上额外投喂20%比例以下的发酵饲料后,各组增重率和特定生长率均随着额外投喂比例的增加,呈现先升高后降低的趋势,并且各处理组均较对照组显著升高($P < 0.05$) (表2)。

幼蟹的存活率随着发酵饲料额外投喂量增多,而呈逐渐下降的趋势,但是各处理组较对

表 2 不同饲料对中华绒螯蟹幼蟹生长的影响

Tab. 2 Effects of different feeds on the growth performance of *E. sinensis*

项目 items	分组 treatment groups				
	F0	F5	F10	F15	F20
初始体质量/g initial weight	1.00±0.08 ^a	1.01±0.06 ^a	1.01±0.06 ^a	1.01±0.07 ^a	1.01±0.06 ^a
终末体质量/g final weight	4.06±0.37 ^a	8.38±0.75 ^b	8.72±1.05 ^b	8.69±0.78 ^b	8.05±1.60 ^{ab}
增重率/% weight gain rate	306.33±36.63 ^a	737.50±74.98 ^b	772.33±105.46 ^b	769.33±77.72 ^b	705.33±159.56 ^b
特定生长率/(%/d) specific growth rate	2.27±0.16 ^a	3.50±0.16 ^b	3.50±0.21 ^b	3.58±0.15 ^b	3.01±0.39 ^{ab}
存活率/% survival rate	86.67±6.67 ^a	76.67±8.82 ^a	70.00±5.77 ^a	73.33±3.33 ^a	66.67±12.02 ^a
肝胰腺指数/% hepatosomatic index	8.06±1.32 ^a	8.90±0.25 ^a	8.19±0.34 ^a	7.59±0.44 ^a	8.69±0.33 ^a

注: 数据为6次重复的平均值±标准误。同一行内不同上标的均值有显著性差异($P \leq 0.05$),下同

Notes: Data are mean values ± SEM of six replicates. Means in the same row with different super scripts are significantly different ($P \leq 0.05$), the same below

对照组差异不显著($P > 0.05$)。

此外, 各组间肝胰腺指数差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 发酵饲料配伍配合饲料投喂对中华绒螯蟹幼蟹抗氧化能力的影响

根随着额外投喂发酵饲料量的增加, 幼蟹血淋巴中脂质过氧化物含量升高, 但各处理组都低于对照组, 且各组间数值差异不显著($P > 0.05$)(表3)。

血淋巴中过氧化氢酶含量随着额外投喂发酵饲料量的增加呈现先升高后降低的趋势, 但都高于对照组, 并且在额外投喂10%发酵饲料时达到最大值, 其中F5、F10和F15组较对照组显著升高($P < 0.05$)。

各组间血淋巴中总抗氧化能力随着额外投喂发酵饲料量的增加, 呈现先升高后降低的趋势, 并且在F10组达到最大, 各处理组较对照组没有显著差异($P > 0.05$)。

2.3 发酵饲料配伍配合饲料投喂对中华绒螯蟹幼蟹非特异性免疫能力的影响

各处理组幼蟹血淋巴中酸性磷酸酶活性均高于对照组, 但是差异不显著($P > 0.05$)(表4)。

随着发酵饲料额外投喂量的提高, 各组幼蟹血淋巴中总蛋白、白蛋白和球蛋白含量均呈现先升高后降低的趋势, 但是各处理组较对照组差异不显著($P > 0.05$)。

随发酵饲料额外投喂量的增加, 各组白球比先降低后升高, 且各处理组较对照组无显著差异($P > 0.05$)。

2.4 发酵饲料配伍配合饲料投喂对中华绒螯蟹幼蟹蛋白代谢酶活性的影响

在日投喂量基础上额外投喂20%比例以下的发酵饲料, 幼蟹肝胰腺中胰蛋白酶和胃蛋白酶的活性随着投喂量的增加, 呈现逐渐下降的趋势, 但都高于对照组, 其中F5组、F10组、F15组肝胰腺中胰蛋白酶活性较对照组显著升高($P < 0.05$), F5组胃蛋白酶活性较对照组显著升高($P < 0.05$), 其他处理组较对照组无显著差异($P > 0.05$)(表5)。

随着发酵饲料投喂量增多, 肝胰腺中谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性逐渐下降, 但都高于对照组, 其中F5组谷草转氨酶活性较对照组显著升高($P < 0.05$), F5、F10组谷丙转氨酶活性较对

表 3 不同饲料对中华绒螯蟹幼蟹抗氧化能力的影响

Tab. 3 Effects of different feeds on the antioxidant capabilities of *E. sinensis*

项目 items	分组 treatment groups				
	F0	F5	F10	F15	F20
脂质过氧化物($\mu\text{mol/L}$) lipid peroxide	21.97±8.75 ^a	16.14±6.43 ^a	18.78±13.91 ^a	19.91±4.05 ^a	20.00±5.53 ^a
过氧化氢酶活性/(U/mg) CAT activity	27.28±1.27 ^a	36.10±1.13 ^b	38.30±1.48 ^b	37.82±2.74 ^b	33.54±2.27 ^{ab}
总抗氧化能力/(U/mg) T-AOC capacity	1.06±0.03 ^a	1.14±0.05 ^a	1.17±0.03 ^a	1.10±0.03 ^a	1.07±0.04 ^a

表 4 不同饲料对中华绒螯蟹幼蟹非特异性免疫能力的影响

Tab. 4 Effects of different feeds on the non-specific immunity of *E. sinensis*

项目 items	分组 treatment groups				
	F0	F5	F10	F15	F20
酸性磷酸酶活性/(金氏单位/100 mL) acid phosphatase activity	5.24±0.22 ^a	5.60±0.04 ^a	5.69±0.11 ^a	5.60±0.15 ^a	5.56±0.33 ^a
总蛋白含量/(g/L) total protein content	28.54±5.77 ^a	31.35±2.89 ^a	41.27±6.11 ^a	31.13±6.17 ^a	30.77±2.05 ^a
白蛋白含量/(g/L) Albumin content	1.34±0.11 ^a	1.60±0.18 ^a	1.68±0.44 ^a	1.60±0.11 ^a	1.51±0.07 ^a
球蛋白含量/(g/L) globulin content	27.20±5.67 ^a	29.75±2.80 ^a	39.59±5.67 ^a	29.53±6.06 ^a	29.26±2.04 ^a
白球比/% albumin to globulin ratio	5.32±0.91 ^a	5.42±0.65 ^a	4.11±0.51 ^a	5.79±0.93 ^a	5.21±0.37 ^a

表 5 不同饲料对中华绒螯蟹幼蟹蛋白代谢酶活性的影响

Tab. 5 Effects of different diets on protein metabolism enzyme activities of *E. sinensis*

项目 items	分组 treatment groups				
	F0	F5	F10	F15	F20
胰蛋白酶活性/(U/mg) trypsin activity	150.28±3.45 ^a	299.05±16.25 ^b	272.65±22.92 ^b	262.89±16.57 ^b	171.20±10.29 ^a
胃蛋白酶活性/(U/mg) pepsin activity	10.36±1.30 ^a	20.46±2.62 ^b	15.13±0.44 ^{ab}	16.04±1.19 ^{ab}	14.23±2.02 ^{ab}
谷草转氨酶活性/(U/g) GOT activity	6.14±2.15 ^a	13.34±1.25 ^b	9.05±1.47 ^{ab}	8.18±1.23 ^{ab}	6.45±1.35 ^{ab}
谷丙转氨酶活性/(U/g) GPT activity	2.24±0.52 ^a	6.98±0.59 ^b	6.72±1.07 ^b	4.51±0.71 ^{ab}	2.93±0.29 ^a

照组显著升高($P<0.05$), 其他处理组谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性则较对照组差异不显著($P>0.05$)(表5)。

3 讨论

3.1 发酵饲料配伍配合饲料投喂对中华绒螯蟹幼蟹生长的影响

发酵饲料是以微生物、复合酶为生物饲料发酵剂菌种, 将饲料原料转化为微生物菌体蛋白、生物活性小肽类氨基酸、微生物活性益生菌、复合酶制剂为一体生物发酵饲料。

本实验结果表明, 发酵饲料配伍配合饲料投喂, 可以显著提升中华绒螯蟹幼蟹的增重率和特定生长率, 并且在额外投喂10%发酵饲料时, 生长性能达到最好, 表明发酵饲料配伍配合饲料投喂能够促进中华绒螯蟹幼蟹的生长。

研究已经发现, 饲料经过发酵后, 经历了一系列的生物化学反应, 一部分大分子的纤维素和蛋白质被分解成小分子, 易于动物的消化吸收, 从而提高了饲料中有机质和蛋白质的消化率^[11]。此外, 饲料经过大量的益生菌发酵后, 拥有了特殊的酸香味和良好的适口性, 可刺激

动物的食欲, 增加其采食量^[12]。因此, 发酵饲料配伍配合饲料投喂, 对中华绒螯蟹幼蟹的促生长作用主要是因为发酵饲料有更好的消化利用率、诱食作用和良好的适口性。

3.2 发酵饲料配伍配合饲料投喂对中华绒螯蟹幼蟹抗氧化能力的影响

在动物体内, 抗氧化防御体系主要通过抗氧化酶和还原性物质来消除细胞代谢过程中产生的氧自由基, 避免其对动物机体造成氧化损伤^[13], 是水生动物应对应激和胁迫的重要生理机制, 关系到水生动物的健康状态。

脂质过氧化物是机体中的活性氧与生物膜磷脂中的多聚不饱和脂肪酸反应的产物, 在氧化应激时, 其含量会大幅升高, 它们能与细胞中的大分子物质如蛋白质和DNA作用, 进而引起细胞的氧化损伤, 其含量的高低反映了动物体内脂质过氧化物的水平^[14]。本实验中随着发酵饲料额外投喂量的增加, 幼蟹血淋巴中的脂质过氧化物含量先降低后升高, 并且都低于对照组, 说明发酵饲料的投喂减少了中华绒螯蟹体内的膜脂质过氧化产物, 降低了过氧化水平。

过氧化氢酶广泛存在于动物体各组织中,

其主要功能是催化细胞内的过氧化氢分解,防止其氧化造成细胞损伤^[15]。徐奕晴等^[16]发现提高饲料中生物发酵饲料的含量,中华绒螯蟹幼蟹的肝胰腺中过氧化氢酶含量先上升后下降。本实验中,幼蟹血淋巴中过氧化氢酶活性随发酵饲料额外投喂量的增多,呈现先上升后下降的趋势,并均高于对照组,表明发酵饲料的投喂可以有效促进中华绒螯蟹幼蟹抗氧化能力的提高,并且在额外投喂10%时取得最好的促进效果。

总抗氧化能力常被用作衡量动物体内抗氧化系统能力的综合指标,它的高低可以反映机体对抗外来刺激的能力和代谢体内自由基的状态^[17]。正常的情况下,动物在新陈代谢的过程中,氧自由基不断生成,又不断被消除,处在动态平衡中。本实验中测得各组幼蟹血清中的总抗氧化能力无显著差异,表明蟹体内氧自由基的生成和及时清除均处于合理的动态平衡中。

3.3 发酵饲料配伍配合饲料投喂对中华绒螯蟹幼蟹非特异性免疫能力的影响

研究已经证明,虾、蟹等甲壳动物不具有特异性免疫,它们主要依靠血淋巴中的免疫相关酶、免疫因子和酚氧化酶原激活系统等进行免疫,称为非特异性免疫。血淋巴中酸性磷酸酶是溶酶体的重要组成部分,具有吞噬细胞杀菌的作用,能够消除外来物,进行机体的防御^[18]。陈昌福等^[19]采用免疫多糖对凡纳滨对虾进行腹腔注射后,发现其肝胰腺中的酸性磷酸酶活性提高,表明了体内免疫系统的激活。因此酸性磷酸酶活性可被用来评判甲壳动物的免疫能力。本实验中观察到随着发酵饲料额外投喂量的增加,酸性磷酸酶活性呈现先升高后降低,但都高于对照组的现像,可以认为发酵饲料可以提升幼蟹免疫能力,并且在10%额外投喂时达到最好效果。

血淋巴中的总蛋白的含量除了能够反映动物体内蛋白代谢和营养吸收的水平,它同时也与机体的免疫有密切的关联。血淋巴中的球蛋白主要参与动物机体的体液免疫,因此其含量的升高可以反映机体的免疫力提高^[20]。研究表明,饲料经益生菌发酵后投喂仔猪,其血清中的总蛋白以及球蛋白含量均提高^[21]。在本实验中,发酵饲料配合基础饲料投喂后幼蟹血淋巴中总蛋白和球蛋白含量均较对照组升高,说明

发酵饲料对幼蟹的健康生长有正向促进作用,并且可以提高幼蟹的免疫能力。

3.4 发酵饲料配伍配合饲料投喂对中华绒螯蟹幼蟹蛋白代谢酶活的影响

蛋白酶的主要作用是催化蛋白质的水解,而谷草转氨酶和谷丙转氨酶是肝脏中最重要的氨基转移酶,与机体的氨基酸代谢密切相关^[22]。大量研究已经证明,肝胰腺中蛋白酶活性和转氨酶活性的升高,说明了动物体内蛋白质的吸收和氨基酸的代谢更为旺盛,表明动物体对饲料中的蛋白质利用率升高^[23]。

Ketnawa等^[24]模拟了猪体外消化发酵大豆的试验,发现豆粕经过发酵后改善了蛋白质的消化率。一方面在多菌种混合发酵饲料的过程中,菌种会产生大量蛋白酶,随饲料进入动物体后促进动物的消化吸收^[25];另一方面饲料经过发酵后,其中的大分子蛋白质被分解为小分子的肽类,而抗营养因子如胰蛋白酶抑制因子、植物凝集素、植酸等则大部分被去除,有利于动物的蛋白吸收^[26]。

本实验中,随着发酵饲料额外投喂量的增加,幼蟹肝胰腺中胰蛋白酶、胃蛋白酶、谷草转氨酶、谷丙转氨酶活性均呈现先升高后降低的趋势,并且都高于对照组,表明了发酵饲料的额外投喂可以有效促进幼蟹的蛋白质和氨基酸的代谢,最终促进了中华绒螯蟹幼蟹的生长发育。

本实验中,在配合饲料投喂的基础上,额外投喂日投喂量20%以下的发酵饲料,中华绒螯蟹幼蟹生长性能显著升高,抗氧化和免疫能力加强,蛋白酶和转氨酶活性提升,并且对生长、抗氧化和免疫能力的促进作用均在10%额外投喂量时达到最理想效果。本研究结果表明,发酵饲料的额外投喂对中华绒螯蟹的生长、抗氧化、免疫和蛋白代谢各方面均有益处,并且最适宜额外投喂量为10%。

参考文献:

- [1] Luo R J, Jiang T, Chen X B, *et al.* Determination of geographic origin of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) using integrated stable isotope and multi-element analyses[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 1-7.
- [2] Gachango F G, Ekmann K S, Frørup J, *et al.* Use of pig

- by-products (bristles and hooves) as alternative protein raw material in fish feed: A feasibility study[J]. *Aquaculture*, 2017, 479: 265-272.
- [3] Koo B, Kim J W, Nyachoti C M. Nutrient and energy digestibility, and microbial metabolites in weaned pigs fed diets containing *Lactobacillus*-fermented wheat[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2018, 241: 27-37.
- [4] Canibe N, Jensen B B. Fermented liquid feed—Microbial and nutritional aspects and impact on enteric diseases in pigs[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2012, 173(1-2): 17-40.
- [5] 李小梅, 张家学. 不同发酵豆粕产品替代鱼粉对凡纳滨对虾生长影响的研究[J]. *饲料工业*, 2012, 33(12): 10-13.
- Li X M, Zhang J X. Study on effects of substitution of different fermentative soybean meal for fish meal in feeds on growth of *L. vannamei*[J]. *Feed Industry*, 2012, 33(12): 10-13(in Chinese).
- [6] Dossou S, Koshio S, Ishikawa M, *et al.* Growth performance, blood health, antioxidant status and immune response in red sea bream (*Pagrus major*) fed *Aspergillus oryzae* fermented rapeseed meal (RM-Koji)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 75: 253-262.
- [7] Degering C, Eggert T, Puls M, *et al.* Optimization of protease secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by screening of homologous and heterologous signal peptides[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(19): 6370-6376.
- [8] Zhou C S, Hu J L, Ma H L, *et al.* Antioxidant peptides from corn gluten meal: orthogonal design evaluation[J]. *Food Chemistry*, 2015, 187: 270-278.
- [9] Plata F P, Mendoza M G D, Bárcena-Gama J R, *et al.* Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1994, 49(3-4): 203-210.
- [10] Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases[J]. *American Journal of Clinical Pathology*, 1957, 28(1): 56-63.
- [11] Canibe N, Jensen B B. Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance[J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81(8): 2019-2031.
- [12] 程慧慧, 蒋广震, 郑肖川, 等. 五种诱食剂对中华绒螯蟹诱食效果的研究[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(2): 395-401.
- Cheng H H, Jiang G Z, Zheng X C, *et al.* Effects of five attractants on Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(2): 395-401(in Chinese).
- [13] Jung S J, Choi Y J, Kim N N, *et al.* Effects of melatonin injection or green-wavelength LED light on the antioxidant system in goldfish (*Carassius auratus*) during thermal stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 52: 157-166.
- [14] 刘井波, 彭双清. 脂质过氧化作用与线粒体损伤[J]. *中国预防医学杂志*, 2005, 6(2): 167-170.
- Liu J B, Peng S Q. Lipid peroxidation and mitochondrial damage[J]. *China Preventive Medicine*, 2005, 6(2): 167-170(in Chinese).
- [15] Lledias F, Rangel P, Hansberg W. Oxidation of catalase by singlet oxygen[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(17): 10630-10637.
- [16] 徐奕晴, 祝向阳, 颜培实. 生物发酵饲料对中华绒螯蟹幼蟹生长、饲料利用及抗氧化酶活性的影响[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(7): 237-240.
- Xu Y Q, Zhu X Y, Yan P S. Effects of biofermented feed on growth, feed utilization and antioxidant enzyme activity of juvenile mitten crabs[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2014, 42(7): 237-240(in Chinese).
- [17] 郭婷. 铬暴露对草鱼的氧化损伤及抗氧化能力的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- Guo T. Effect of chromium on oxidative damage and antioxidant capacity of *Ctenopharyngodon idellus*[D]. Chongqing: Southwest University, 2013 (in Chinese).
- [18] 邵明瑜. 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)淋巴器官和造血组织的细胞学和组织化学及外源物质对其作用的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- Shao M Y. Cytology and histochemistry of lymphoid organ and haematopoietic tissue, and effect of foreign materials on their function in *Fenneropenaeus chinensis*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004 (in Chinese).
- [19] 陈昌福, 姚娟, 陈萱, 等. 免疫多糖对南美白对虾免疫相关酶的激活作用[J]. *华中农业大学学报*, 2004, 23(5): 551-554.

- Chen C F, Yao J, Chen X, *et al.* Effect of immunopolysaccharide (Yeast Cell Wall) on the enzymes related to immune in Penaeid Shrimp, *Penaeus vannamei*[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2004, 23(5): 551-554(in Chinese).
- [20] 林谦, 戴求仲, 宾石玉, 等. 益生菌与酶制剂对黄羽肉鸡血液生化指标和免疫性能影响的协同效应研究[J]. *饲料工业*, 2012, 33(14): 31-36.
- Lin Q, Dai Q Z, Bin S Y, *et al.* Study on synergistic effect of probiotics and enzyme preparation on blood biochemical indexes and immune performance of yellow feather broilers[J]. *Feed Industry*, 2012, 33(14): 31-36(in Chinese).
- [21] 刘辉, 季海峰, 张董燕, 等. 饲料添加短乳杆菌对生长猪生长性能和血清生化指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(1): 182-189.
- Liu H, Ji H F, Zhang D Y, *et al.* Effects of *Lactobacillus brevis* supplementation on growth performance, serum biochemical indices of growing pigs[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(1): 182-189(in Chinese).
- [22] Fynn-Aikins K, Hughes S G, Vandenberg G W. Protein retention and liver aminotransferase activities in Atlantic salmon fed diets containing different energy sources[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1995, 111(1): 163-170.
- [23] Duan Y H, Tan B, Li J J, *et al.* Optimal branched-chain amino acid ratio improves cell proliferation and protein metabolism of porcine enterocytes in vivo and in vitro[J]. *Nutrition*, 2018, 54: 173-181.
- [24] Ketnawa S, Ogawa Y. Evaluation of protein digestibility of fermented soybeans and changes in biochemical characteristics of digested fractions[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 52: 640-647.
- [25] Giyatmi, Irianto H E. Enzymes in fermented fish[J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2017, 80: 199-216.
- [26] Carlson D, Poulsen H D. Phytate degradation in soaked and fermented liquid feed—effect of diet, time of soaking, heat treatment, phytase activity, pH and temperature[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2003, 103(1-4): 141-154.

Effects of fermented feed on the growth performance, oxidation resistance, immune function and protein metabolism of juvenile Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*)

XU Chenyuan¹, CHI Cheng¹, ZHENG Xiaochuan¹, LIU Jiadai¹, ZHANG Caiyan¹, LIU Wenbin^{1*},
LIU Yanling², YAN Yanan², HUANG Jian², WANG Sheng²

(1. College of Animal Science and Technology, Key Laboratory of Aquatic Nutrition of Jiangsu Province,

Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Nanjing Baohui Biological Feed Co.Ltd, Nanjing 211113, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of adding extra fermented feed on the growth performance, oxidation resistance, immune function and metabolism of juvenile Chinese mitten crabs. Five experimental feeds were prepared: the commercial feed of juvenile crabs was used as the basal feed (F0), the experimental feed was made up of basal feed and extra 5% (F5), 10% (F10), 15% (F15), 20% (F20) fermented feed. 150 Chinese mitten crabs were randomly divided into 5 groups. There were 3 replicates in each group, and 10 crabs in each replicate. All the crabs were fed with the corresponding feed respectively. The feeding period was 59 days. Blood samples and hepatopancreas were collected after culture to determine the antioxidant indexes, immune indexes, and the activities of protein metabolism-related enzyme. The result showed that the weight gain rate and specific growth rate of juvenile crabs in the treatment groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The content of catalase in hemolymph first increased and then decreased with the increase of fermented feed, and those in the F5, F10 and F15 groups were significantly increased compared with the F0 ($P < 0.05$). The activity of acid phosphatase in each treatment group was higher than that in the control group, but the difference was not significant ($P > 0.05$). The content of total protein and globulin in each group first increased and then decreased with the increase of fermented feed, but the difference among groups was not significant ($P > 0.05$). In addition, the activities of trypsin, pepsin, aspartate transaminase and alanine transaminase in treatment groups were higher than those in F0. The addition of fermented feed can promote the growth performance of juvenile Chinese mitten crabs, and improve their antioxidant capacity, immune function and protein metabolic capacity.

Key words: *Eriocheir sinensis*; fermented feed; growth performance; oxidation resistance; immunity; protein metabolism

Corresponding author: LIU Wenbin. E-mail: wbliu@njau.edu.cn

Funding projects: Jiangsu Agriculture Science and Technology Innovation Fund (CX (19) 1006); Modern Fisheries Industry Technology System Project of Jiangsu Province (JFRS-01); Key Project of Jiangsu Fisheries Science and Technology (D2018-4); National Natural Science Foundation of China (31802347); Fundamental Research Funds for the Central Universities (KJQN201937); Nanjing Baohui Biological Feed Co.,Ltd.