



## 豆粕对乌鳢肠道菌群组成及微生物氨基酸代谢酶活性的影响

朱锦裕<sup>1</sup>, 韩 蓓<sup>1</sup>, 卜弘毅<sup>2</sup>, 胡俊涛<sup>1</sup>,  
张 鑫<sup>1</sup>, 刘令军<sup>1</sup>, 苗淑彦<sup>1\*</sup>

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225000;

2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214128)

**摘要:** 为研究豆粕替代鱼粉对乌鳢生长、肠道菌群组成和微生物相关氨基酸代谢酶活性的影响, 分别用豆粕替代0、25%、50%和75%的鱼粉配制4组等氮等能的饲料饲喂初始体质量为(8.65±0.25) g的幼鱼(分别命名为G1、G2、G3和G4组), 养殖实验在室内纤维玻璃钢桶中进行, 实验周期为21 d。结果显示, 各组间幼鱼成活率无显著性差异; G4组乌鳢幼鱼的生长性能显著低于G1和G2组, 而G3组幼鱼生长性能与其余3组差异不显著。厚壁菌门在G1和G2组乌鳢肠道中的比例显著高于G3组, 且在G4组中的比例最低; 变形菌门在G1和G2组中的比例显著低于G3和G4组; G4组中乳球菌属、杆菌属、假单胞菌属、链球菌属、芽孢杆菌属和不动杆菌属的比例显著低于其余3组。另外, G4组幼鱼肠道微生物谷丙转氨酶、腺苷脱氨酶活性显著高于其余3组, 而G1组乳酸脱氢酶的活性最高。研究表明, 豆粕替代鱼粉除了对乌鳢幼鱼的生长产生影响外, 也显著影响了肠道微生物组成及微生物相关氨基酸代谢酶的活性, 本研究结果对于从微生态角度进一步理解豆粕在乌鳢配合饲料中的应用提供了理论依据和参考。

**关键词:** 乌鳢; 豆粕; 肠道菌群组成; 微生物氨基酸代谢酶

中图分类号: S 963.3

文献标志码: A

所有脊椎动物肠道内都栖息着大量的微生物, 虽然这些微生物自身的生长和繁殖需要消耗来自宿主食物中的营养和能量, 但肠道微生物也能够分泌多种不同的酶类, 包括糖酶、磷酸酶、脂肪酶以及蛋白酶等, 从而协助动物对营养物质进行消化和吸收<sup>[1-2]</sup>。同时, 动物肠道内微生物组成易受食物成分的影响<sup>[3]</sup>。例如, Gajardo等<sup>[4]</sup>研究发现, 鱼粉、鸡肉粉、豆粕和谷朊粉等不同的饲料蛋白源显著影响了大西洋鲑(*Salmo salar*)肠道中变形菌纲和拟杆菌纲的比例; Parma等<sup>[5]</sup>发现, 随着饲料中豆粕替代鱼粉比例的增加(0~30%), 金头鲷(*Sparus aurata*)肠道内蓝细菌和乳杆菌科的比例显著上升。

在鱼粉蛋白源替代的相关研究中发现, 豆

粕中含有的抗营养因子会影响鱼类对植物蛋白的吸收, 并显著影响鱼类消化道中蛋白酶的活性<sup>[6]</sup>。例如, 钱曦等<sup>[7]</sup>研究发现, 随着饲料中豆粕添加量的增加, 翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)肠道蛋白酶活性显著降低, 而淀粉酶和脂肪酶活性显著升高。但随着饲料中豆粕添加量的增加, 花鲈(*Lateolabrax japonicus*)肠道中蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性均显著降低<sup>[8]</sup>。动物蛋白质营养的实质是氨基酸营养, 而转氨基和脱氨基作用是氨基酸代谢的主要途径, 因此, 相关转氨酶和脱氨酶在氨基酸代谢过程中发挥着重要作用<sup>[9]</sup>。孙瑞健等<sup>[10]</sup>使用不同蛋白质水平的饲料投喂大黄鱼(*Larimichthys crocea*), 结果显示随着蛋白质水平的上升, 肝脏谷丙转氨酶和谷草转

收稿日期: 2018-12-18 修回日期: 2019-03-09

资助项目: 国家自然科学基金(31402306); 中国博士后基金(2017M621846)

通信作者: 苗淑彦, E-mail: shuyanmiao@126.com

氨酶活性显著升高;张莉莉等<sup>[11]</sup>在饲料中添加磷虾水解物投喂大菱鲂(*Scophthalmus maximus*),结果发现,随着饲料中磷虾水解物含量的增加,大菱鲂肝脏谷丙转氨酶和谷草转氨酶活性均显著增强。但目前,饲料原料对鱼类肠道微生物相关氨基酸代谢酶活性影响的研究较为缺乏。

乌鳢(*Channa argus*)广泛分布于我国南北水域,是我国常见的肉食性鱼类,具有较高的营养价值和较大的养殖潜力。苗淑彦等<sup>[12]</sup>通过实验室培养的方式从乌鳢肠道内分离出21株好氧和兼性厌氧产蛋白酶菌株,并发现这些菌株的产蛋白酶活性受不同饲料蛋白源的影响。本实验在前期研究的基础上,进一步研究豆粕替代鱼粉对肠道微生物组成和微生物相关氨基酸代谢酶活性的影响,为研究肠道微生物参与鱼类蛋白质的利用提供理论支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验饲料的制作

实验饲料以脱脂鱼粉和豆粕为主要蛋白源,分别用豆粕替代0、25%、50%和75%的鱼粉,按照乌鳢营养需求配制4组等氮等能的饲料,分别命名为D1、D2、D3和D4,饲料配方及组成见表1,饲料制作及保存方法参照苗淑彦等<sup>[12]</sup>。

### 1.2 饲养管理

实验用的乌鳢幼鱼由扬州市某特种养殖场提供,为当年培育的同一批健康种苗。所有幼鱼在扬州大学室内水循环水泥池(2 m × 2 m × 0.6 m)中驯化2周,并饱食投喂蛋白质含量为45%的商品饲料,养殖水温为24.5~28.5 °C。养殖实验开始前,停喂24 h。选择360条大小均匀、体质量为(8.65±0.25) g且健康、有活力的幼鱼,随机分为4组,分别投喂饲料D1、D2、D3和D4,依次命名为G1、G2、G3和G4组,每组设3个重复,每个纤维玻璃钢桶(300 L)为1个重复,放养密度为30尾/桶。实验期间每日饱食投喂,日投喂量为体质量的3%~6%,投喂时间为每日08:00和17:00,每日上午投喂前用虹吸法去除残饵和粪便以保持水质优良,养殖水温为25.5~28.5 °C,溶解氧>5 mg/L,养殖时间为21 d。

### 1.3 样品采集及指标测定

养殖实验结束后,用MS 222(250 mg/kg,

Sigma)麻醉幼鱼以减少应激。逐尾鱼称重(g),计算增重率(WGR)和特定生长率(SGR);计数每桶的鱼尾数,计算成活率(SR)。

计算公式如下:

$$\text{增重率}(\text{weight gain rate, WGR, \%}) = (W_t - W_0) / W_0 \times 100\%$$

$$\text{特定生长率}(\text{specific growth rate, SGR, \%}/\text{d}) = (\ln \bar{W}_t - \ln \bar{W}_0) / t \times 100\%$$

$$\text{成活率}(\text{survival rate, SR, \%}) = N_t / N_0 \times 100\%$$

式中, $W_0$ 为实验初始各组鱼体质量(g), $W_t$ 为实验终末各组鱼体质量(g), $\bar{W}_0$ 为实验初始各组鱼平均体质量(g), $\bar{W}_t$ 为实验终末各组鱼平均体质量(g), $t$ 为实验天数(d), $N_0$ 为实验初始各组鱼尾数, $N_t$ 为实验终末各组鱼尾数。

每桶随机采集20尾鱼,在无菌操作台中取出肠道部分。用无菌镊子挤出内容物后,将肠道剪开并用塑料刮板刮取肠道黏膜,将每尾鱼的肠道内容物和肠道黏膜样品混合存放于1.5 mL无菌Eppendorf管中并置于液氮中保存,待测菌群组成和微生物相关氨基酸代谢酶活性。

饲料粗成分的测定方法参照AOAC<sup>[13]</sup>,饲料水分采用105 °C烘干恒重法测定;粗蛋白采用微量凯氏定氮法(8400, FOSS Analytical AB, Hogan, Sweden)测定;粗脂肪采用索氏抽提法测定;粗灰分采用550 °C高温灼烧法测定。

肠道微生物菌群组成测定方法参照Miao等<sup>[14]</sup>,样品测定数量为3尾/桶。方法简述如下:对微生物V3-V4区16S rDNA基因进行扩增和测序,PCR引物:515F:(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTA A-3')和806 R:(5'-GGACTACHVGGGTWTC TAAT-3')。纯化后的扩增产物在中国华大基因公司通过Illumina MiSeq平台进行paired-end PE250测序;使用FLASH v1.2.11软件对原始序列(250 bp)进行双向读取后,使用USEARCH GLOBAL软件按97%相似度对16S rDNA操作分类学单元(OTUs)进行合并筛选;最后,利用Project Classifier v.2.2对OTU代表性序列进行聚类分析(门、纲、目、科、属和种)。本研究中,在进行比对的465 611个序列中,有95.9%(446 639)的序列与参考序列的同源性超过97%。

肠道微生物提取方法参照邓欢等<sup>[15]</sup>方法,样品数量为17尾/桶。提取方法简述如下:将解冻的肠道样品置于无菌离心管中,加入生理盐水后用高速匀浆器(宁波新芝)匀浆,匀浆后于

表1 实验饲料组成及常规营养水平(干物质基础)

Tab. 1 Ingredients and proximate compositions of the experimental diets (dry matter basis)

项目 items	实验组			
	D1	D2	D3	D4
<b>原料% ingredients</b>				
脱脂鱼粉 defatted fishmeal	60.00	45.00	30.00	15.00
豆粕 soybean meal	0.00	22.00	47.00	70.00
小麦粉 wheat flour	19.30	19.30	12.44	4.44
麸皮 wheat bran	10.14	3.14	0.00	0.00
鱼油 fish oil	4.00	4.00	4.00	4.00
维生素预混料 vitamin premix <sup>a</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50
矿物质预混料 mineral premix <sup>a</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.50	1.50	1.50	1.50
氯化胆碱(95%) choline chlorine (95%)	1.00	1.00	1.00	1.00
大豆卵磷脂 soybean lecithin	2.00	2.00	2.00	2.00
海藻酸钠 sodium alginate	1.00	1.00	1.00	1.00
乙氧喹 ethoxyquin	0.03	0.03	0.03	0.03
维生素C vitamin C	0.03	0.03	0.03	0.03
<b>营养水平 nutrient levels</b>				
粗蛋白/% crude protein	45.31	45.50	45.15	44.97
粗脂肪/% crude lipid	9.15	9.10	9.07	9.17
灰分/% ash	12.87	12.85	12.75	12.79
无氮浸出物/% NFE <sup>b</sup>	32.67	32.55	33.03	33.07
总能/(kJ/g) gross energy <sup>c</sup>	19.93	19.93	19.92	19.93

注: a. 维生素混合物(mg/kg 饲料): 维生素A 32 mg, 维生素D 5 mg, 维生素E 240 mg, 维生素K 10 mg, 维生素B<sub>1</sub> 25 mg, 维生素B<sub>2</sub> 45 mg, 烟酸 200 mg, 维生素B<sub>6</sub> 20 mg, 生物素 60 mg, 肌醇 800 mg, 泛酸钙 60 mg, 叶酸 20 mg, 维生素B<sub>12</sub> 10 mg, 维生素C 2 000 mg, 微晶纤维素 1 473 mg。矿物质预混物(mg/kg 饲料): 五水硫酸铜 10 mg, 亚硒酸钠 20 mg, 一水硫酸锰 45 mg, 六水氯化钴(1%) 50 mg, 一水硫酸锌 50 mg, 碘酸钙(1%) 60 mg, 一水硫酸亚铁 80 mg, 七水硫酸镁 1 200 mg, 沸石粉 3 485 mg。b. 无氮浸出物(NFE)=干物质-(粗脂肪+粗灰分+粗蛋白)。c. 总能(kJ/g)=23.64%×粗蛋白+39.54%×粗脂肪+17.15%×碳水化合物

Notes: a. vitamin premix (mg/kg diet): vitamin A 32 mg, vitamin D 5 mg, vitamin E 240 mg, vitamin K 10 mg, vitamin B<sub>1</sub> 25 mg, vitamin B<sub>2</sub> 45 mg, nicotinic acid 200 mg, vitamin B<sub>6</sub> 20 mg, biotin 60 mg, inositol 800 mg, calcium pantothenate 60 mg, folic acid 20 mg, vitamin B<sub>12</sub> 10 mg, vitamin C 2 000 mg, microcrystalline cellulose 1 473 mg. mineral premix (mg/kg diet): CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 10 mg, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 20 mg, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 45 mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1%) 50 mg, ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 50 mg, Ca(IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(1%) 60 mg, FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 80 mg, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 200 mg, zeolite powder 3 485 mg. b. nitrogen free extracts (NFE) = dry matter - (crude lipid + crude ash + crude protein). c. gross energy (kJ/g) = 23.64 % × crude protein + 39.54 % × crude lipid + 17.15 % × carbohydrate

10 000 r/min、4 °C条件下离心5 min, 弃去上清液; 加入分离缓冲液(0.85 g NaCl溶于1 000 mL双蒸水, 溶解后加1 mL吐温80, 121 °C高压灭菌20 min, 冷却后4 °C预冷), 振荡1 min后于1 500 r/min、4 °C条件下离心, 重复3次后将菌体沉淀于-80 °C保存, 待测微生物胞内相关氨基酸代谢酶活性。

微生物相关氨基酸代谢酶活性测定参考唐志如等<sup>[16]</sup>方法, 简述如下: 将微生物沉淀加入预

冷的生理盐水, 涡旋振荡仪剧烈振荡1 min后置于冰上冷却, 重复3次, 于10 000 r/min、4 °C条件下离心5 min, 弃去上清液, 并用生理盐水稀释至OD<sub>600 nm</sub>=0.8, 制备菌悬液, 并于10 000 r/min、4 °C条件下离心5 min, 弃去上清液后, 再加入一定体积的生理盐水, 用高通量组织研磨器(宁波新芝)于70 Hz下处理20 s, 反复3次, 充分破碎细胞; 将破碎液于4 °C、16 000×g条件下离心15 min, 移取上清液至已灭菌的离心管中, 置于冰上待

用。谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, GPT)、腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)、乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)的活性均采用试剂盒(南京建成生物科技有限公司)测定, 具体方法按试剂盒说明书操作。

#### 1.4 数据处理与分析方法

采用EXCEL 2003和SPSS 20.0软件(SPSS Inc., Michigan Avenue, Chicago, IL, USA)进行统计分析, 数据采用平均值±标准差(means ± SD)的形式表示, 显著水平为 $P < 0.05$ , 当差异显著时采用

Turkey's检验分析组间的差异显著程度。

## 2 结果

### 2.1 豆粕替代鱼粉对乌鳢生长性能和成活率的影响

G4组乌鳢幼鱼的终末体质量、增重率和特定生长率显著低于G1和G2组( $P < 0.05$ ), 而G3组幼鱼的生长与其余3组均无显著差异( $P > 0.05$ ); 各组幼鱼的成活率均高于91%, 且各组间无显著差异( $P > 0.05$ )(表2)。

表2 豆粕替代鱼粉对乌鳢成活率和生长性能的影响

Tab. 2 Survival rate and growth performance of *C. argus* fed with different dietary soybean meal levels

	初始平均体质量/g initial body weight	终末平均体质量/g final body weight	增重率/% WGR	特定生长率/% SGR	成活率/% SR
G1	8.68 ± 0.09	16.67 ± 1.14 <sup>b</sup>	91.97 ± 5.08 <sup>b</sup>	3.10 ± 0.12 <sup>b</sup>	92.22 ± 1.11 <sup>a</sup>
G2	8.58 ± 0.06	16.60 ± 0.97 <sup>b</sup>	93.43 ± 6.84 <sup>b</sup>	3.14 ± 0.17 <sup>b</sup>	91.11 ± 1.11 <sup>a</sup>
G3	8.61 ± 0.12	14.65 ± 1.09 <sup>ab</sup>	70.11 ± 6.81 <sup>ab</sup>	2.52 ± 0.19 <sup>ab</sup>	93.33 ± 1.92 <sup>a</sup>
G4	8.66 ± 0.12	13.33 ± 1.03 <sup>a</sup>	53.96 ± 5.24 <sup>a</sup>	2.05 ± 0.16 <sup>a</sup>	92.22 ± 2.94 <sup>a</sup>

注: 同列上标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ), 下同

Notes: Column values with the different superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), the same below

### 2.2 豆粕替代鱼粉对乌鳢肠道菌群组成的影响

厚壁菌门和变形菌门是乌鳢肠道中的优势菌群, 在各组中的比例分别为52.67%~83.25%和15.97%~30.01%。其中, G1和G2组乌鳢肠道中厚壁菌门的比例显著高于G3和G4组( $P < 0.05$ ), 且G4组其比例最低( $P < 0.05$ ); 而变形菌门在G1和G2组中的比例显著低于G3和G4组( $P < 0.05$ )。另一方面, 拟杆菌门、放线菌门、疣微菌门和浮霉菌门在G4组乌鳢肠道内的比例显著高于其余3组( $P < 0.05$ )(图1)。

乳球菌属、杆菌属、假单胞菌属、链球菌属、芽孢杆菌属和不动杆菌属在G4组中的比例显著低于其余3组( $P < 0.05$ ); 鲸杆菌属在G4组中的比例显著高于其余3组( $P < 0.05$ ), G1和G2组中鲸杆菌属的比例最低( $P < 0.05$ )(图2)。

### 2.3 豆粕替代鱼粉对乌鳢肠道微生物相关氨基酸代谢酶活性的影响

饲料中添加不同含量的豆粕显著影响了乌鳢肠道微生物GPT、ADA和LDH的活性。其中, G4组肠道微生物GPT和ADA活性显著高于其余3组( $P < 0.05$ ), 而其余3组间无显著差异( $P > 0.05$ ); G3和G4组乌鳢肠道微生物LDH活性最低, G1组

最高( $P < 0.05$ )(表3)。

## 3 讨论

大豆蛋白源由于具有氨基酸组成较好、蛋白质含量高、资源丰富等优点, 被广泛用于替代鱼粉的研究和饲料生产中, 以缓解水产饲料对鱼粉资源的需求压力<sup>[17-18]</sup>。研究表明, 在饲料中添加大豆蛋白源对鱼类生长性能和成活率的影响与鱼种、生长阶段、添加量、养殖周期等因素密切相关<sup>[19]</sup>。例如, 对军曹鱼(*Rachycentron canadum*)<sup>[20]</sup>、尖吻重牙鲷(*Diplodus puntazzo*)<sup>[21]</sup>等鱼类的研究表明, 豆粕可替代饲料中40%~60%的鱼粉, 但替代鱼粉水平超过40%则显著抑制了乌苏里拟鲿(*Pseudobagrus ussuriensis*)<sup>[22]</sup>和鮠状黄姑鱼(*Nibeia miichthioides*)<sup>[23]</sup>等鱼类的生长。另一方面, 当饲料中补充适量的氨基酸后, 豆粕可替代40%~60%的鱼粉而不影响金头鲷<sup>[24]</sup>、尖吻重牙鲷<sup>[21]</sup>等鱼类的生长。本研究中, 21 d的养殖实验证明, 豆粕可以替代50%的鱼粉而不影响乌鳢的增重率和特定生长率, 但75%的替代量则显著降低了乌鳢的生长。一般来说, 水产动物对豆粕的耐受程度也与养殖周期密切相关。例如, 对克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)的研究发现,

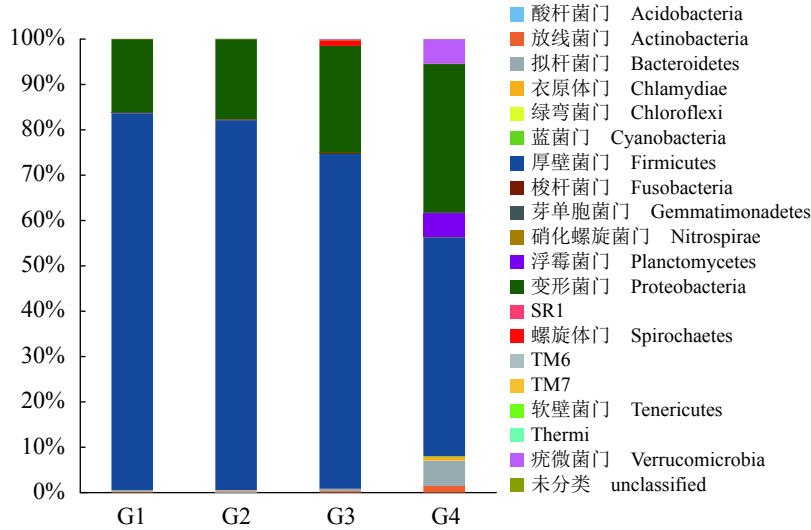


图 1 乌鳢肠道微生物在门水平上的平均相对丰度

Fig. 1 The average relative abundance at the phylum level in the intestine microbiota of *C. argus*

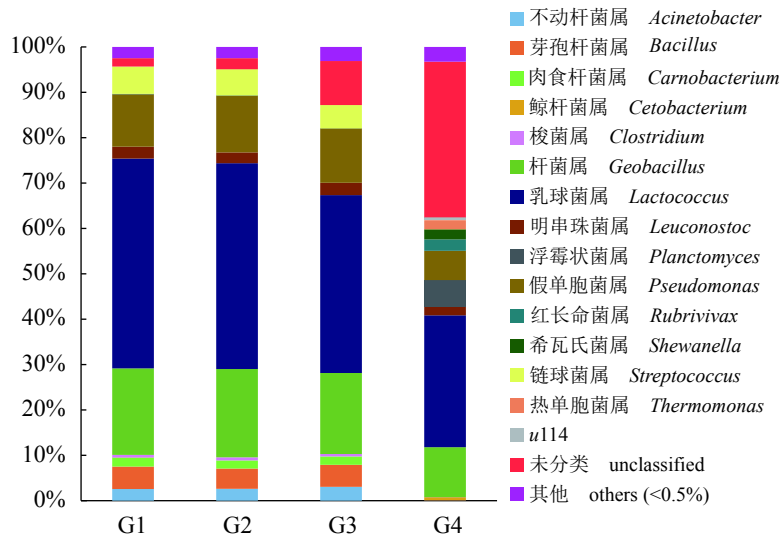


图 2 乌鳢肠道微生物在属水平上的平均相对丰度

Fig. 2 The average relative abundance at the genus level in the intestine microbiota of *C. argus*

表 3 日粮中不同豆粕水平对乌鳢肠道微生物谷丙转氨酶、腺苷脱氨酶和乳酸脱氢酶活性的影响

Tab. 3 Effects of different soybean meal levels on the activities of GPT, ADA and LDH in the intestinal microorganisms of *C. argus*

	谷丙转氨酶/ (U/g prot) GPT	腺苷脱氨酶/ (U/mg prot) ADA	乳酸脱氢酶/ (U/g prot) LDH
G1	19.61 ± 0.75 <sup>a</sup>	13.89 ± 0.70 <sup>a</sup>	32.54 ± 1.63 <sup>c</sup>
G2	18.67 ± 1.22 <sup>a</sup>	16.10 ± 0.36 <sup>c</sup>	27.28 ± 0.83 <sup>b</sup>
G3	17.69 ± 1.27 <sup>a</sup>	15.46 ± 0.83 <sup>a</sup>	16.24 ± 1.16 <sup>a</sup>
G4	20.88 ± 1.30 <sup>b</sup>	19.67 ± 1.53 <sup>b</sup>	13.98 ± 1.39 <sup>a</sup>

当豆粕替代0~45%的鱼粉时，克氏原螯虾在20日内的生长未受影响，但自第40日开始，0~25%替代组克氏原螯虾的生长显著高于其他组<sup>[25]</sup>。

鱼类消化道黏膜表面附着着一个复杂的、动态的微生物群体，菌群数量基本固定在每克10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>个细菌的范围内<sup>[26]</sup>。研究表明，宿主肠道微生物的组成、代谢过程和代谢产物受食物中蛋白质来源和含量的显著影响<sup>[27-28]</sup>。随着饲料中豆粕添加量的增加，乌鳢厚壁菌门比例显著降低，变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、疣微菌门和浮霉菌门的比例显著升高；同时，乳球菌属、杆菌属、假单胞菌属、链球菌属、芽孢杆

菌属和不动杆菌属的比例显著降低。Reveco等<sup>[29]</sup>用含20%豆粕的饲料投喂大西洋鲑, 其肠道中厚壁菌门的比例较鱼粉组显著上升。Desai等<sup>[30]</sup>研究也发现, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)在摄食含30%豆粕的饲料8周后, 其肠道中厚壁菌门与变形菌门的比例显著上升; 但Bruce等<sup>[31]</sup>发现, 摄食鱼粉组和豆粕组饲料的虹鳟消化道内厚壁菌门的含量未出现显著变化。豆粕替代鱼粉对鱼类肠道微生物组成的影响也与实验周期、豆粕添加量、豆粕特征和养殖环境等因素有关<sup>[32]</sup>。

到目前为止, 对哺乳类动物以及水生动物消化道微生物的研究仍不够全面, 但可以肯定的是, 消化道微生物与宿主的营养代谢、免疫系统发育和疾病抵抗力密切相关<sup>[33-34]</sup>。在人、猪和小鼠等动物中的研究表明, 不同的肠道微生物能够代谢和合成不同种类的氨基酸, 从而影响宿主肠道内的氨基酸组成和宿主对氨基酸的利用效率<sup>[35]</sup>。例如, 动物体肠道中的厚壁菌门主要代谢亮氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和谷氨酰胺等<sup>[36-37]</sup>, 而变形菌门则主要代谢精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸和赖氨酸<sup>[38-39]</sup>等。事实上, 氨基酸在动物体内主要通过转氨酶和脱氨基进行氨基酸的代谢和转化<sup>[9]</sup>。其中, 转氨酶主要负责催化 $\alpha$ -氨基到 $\alpha$ -酮基的转移, 从而把谷氨酸转化为丙氨酸; 脱氢酶则通过联合脱氨基作用, 将氨基酸转化为丙酮酸, 从而参与氨基酸的分解代谢。在本研究的3种氨基酸代谢酶中, 腺苷脱氨酶能够特异性地催化腺苷进行脱氨基反应, 谷丙转氨酶和乳酸脱氢酶是氨基酸代谢的2种关键酶, 主要负责催化谷氨酸和丙酮酸之间的转氨作用, 其活性大小能够反映氨基酸代谢的强弱<sup>[40]</sup>。各组乌鳢肠道微生物谷丙转氨酶、腺苷脱氨酶和乳酸脱氢酶的活性具有显著差异, 说明饲料中不同的豆粕含量显著影响了肠道微生物分解代谢氨基酸的能力。例如, G4组乌鳢肠道微生物谷丙转氨酶和腺苷脱氨酶活性显著高于其他各组, 说明高豆粕组微生物转氨酶作用和脱氨基作用更加活跃。然而, 随着饲料中豆粕含量的增加, 乌鳢肠道微生物乳酸脱氢酶活性显著下降, 说明乌鳢肠道微生物对氨基酸的脱氢作用减弱, 丙酮酸合成受到抑制。微生物氨基酸代谢酶活性的不同主要与肠道菌群组成密切相关, 进一步分离鉴定乌鳢肠道微生物种类, 并研究微生物菌株对营

养物质的代谢特性是深入研究乌鳢肠道微生物对饲料原料代谢的基础, 同时也能为深入了解肠道微生物的功能提供理论支持。

#### 参考文献:

- [1] Ramirez R F, Dixon B A, *et al.* Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*)[J]. *Aquaculture*, 2003, 227(1-4): 417-426.
- [2] Bashiardes S, Godneva A, Elinav E, *et al.* Towards utilization of the human genome and microbiome for personalized nutrition[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 51: 57-63.
- [3] Scott K P, Gratz S W, Sheridan P O, *et al.* The influence of diet on the gut microbiota[J]. *Pharmacological Research*, 2013, 69(1): 52-60.
- [4] Gajardo K, Jaramillo-Torres A, Kortner T M, *et al.* Alternative protein sources in the diet modulate microbiota and functionality in the distal intestine of atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(5): e02615-16.
- [5] Parma L, Candela M, Soverini M, *et al.* Next-generation sequencing characterization of the gut bacterial community of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed low fishmeal based diets with increasing soybean meal levels[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2016, 222: 204-216.
- [6] 陈思琦, 程镇燕, 安贸麟, 等. 豆粕替代鱼粉并添加精氨酸对点带石斑鱼消化酶活性和肠道组织结构的影响[J]. *中国饲料*, 2019(1): 57-64.  
Chen S Q, Cheng Z Y, An M L, *et al.* Effect of dietary soybean meal replacing fish meal and supplemented with arginine on digestion and intestinal structure of grouper in *Epinephelus malabaricus*[J]. *China Feed*, 2019(1): 57-64(in Chinese).
- [7] 钱曦, 王桂芹, 周洪琪, 等. 饲料蛋白水平及豆粕替代鱼粉比例对翘嘴红鲌消化酶活性的影响[J]. *动物营养学报*, 2007, 19(2): 182-187.  
Qian X, Wang G Q, Zhou H Q, *et al.* Effect of dietary protein on the activities of digestive enzymes of topmouth culter (*Erythroculter ilishaeformis* Bleeker)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2007, 19(2): 182-187(in Chinese).

- [8] Li Y, Ai Q H, Mai K S, *et al.* Comparison of high - protein soybean meal and commercial soybean meal partly replacing fish meal on the activities of digestive enzymes and aminotransferases in juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier, 1828)[J]. *Aquaculture Research*, 2014, 45(6): 1051-1060.
- [9] Berge G E, Sveier H, Lied E. Nutrition of Atlantic salmon (*Salmo salar*); the requirement and metabolic effect of lysine[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1998, 120(3): 477-485.
- [10] 孙瑞健, 张文兵, 徐玮, 等. 饲料蛋白质水平与投喂频率对大黄鱼生长、体组成及蛋白质代谢的影响[J]. *水生生物学报*, 2014, 23(10): 29-32.
- Sun R J, Zhang W B, Xu W, *et al.* Effects of dietary protein level and feeding frequency on the growth performance, body composition and protein metabolism of juvenile large yellow croakers, *Pseudosciaena crocea* R.[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 23(10): 29-32(in Chinese).
- [11] 张莉莉, 梁萌青, 徐后国, 等. 饲料中添加磷虾水解物对大菱鲆幼鱼生长性能、体组成及相关酶活性的影响[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(3): 497-505.
- Zhang L L, Liang M Q, Xu H G, *et al.* Effects of dietary krill hydrolysates on growth performance, body composition and related enzyme activities of Juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(3): 497-505(in Chinese).
- [12] 苗淑彦, 朱锦裕, 赵臣泽, 等. 豆粕替代鱼粉对乌鳢肠道内产蛋白酶好氧菌组成及产蛋白酶能力的影响[J]. *动物营养学报*, 2017, 29(11): 4076-4084.
- Miao S Y, Zhu J Y, Zhao C Z, *et al.* Effects of replacement of fish meal by soybean meal on composition and protease-producing activity of protease-producing aerobic bacteria in intestinal tract of *Channa argus*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(11): 4076-4084(in Chinese).
- [13] AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International[M]. 16th ed. Arlington, VA: AOAC International, 1995.
- [14] Miao S Y, Zhao C Z, Zhu J Y, *et al.* Dietary soybean meal affects intestinal homeostasis by altering the microbiota, morphology and inflammatory cytokine gene expression in northern snakehead[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 113.
- [15] 邓欢, 唐志如, 孙志洪, 等. 一种猪胃肠道内容物及粪便微生物总量的分离方法: 中国, CN104178549A[P]. 2014-12-03.
- Deng H, Tang Z R, Sun Z H, *et al.* A method for the separation of the contents of the gastrointestinal tract and the total amount of microorganisms in the feces of pigs: CN, CN104178549A[P]. 2014-12-03 (in Chinese).
- [16] 唐志如, 邓欢, 孙志洪, 等. 一种快速定量检测氨基酸脱羧酶的比色方法: 中国, CN104374768A[P]. 2015-02-15.
- Tang Z R, Deng H, Sun Z H, *et al.* A colorimetric method for the rapid quantitative determination of amino acid decarboxylase was developed: CN, CN104374768A[P]. 2015-02-15 (in Chinese).
- [17] 段晶, 王婧瑶, 吴莉芳, 等. 大豆蛋白源替代鱼粉蛋白对鱼类生长、消化及肠道组织的影响[J]. *大豆科学*, 2018, 37(3): 477-482.
- Duan J, Wang J Y, Wu L F, *et al.* Effects of replacement of fish meal protein with soybean protein on growth, digestion and intestinal tissue of fish[J]. *Soybean Science*, 2018, 37(3): 477-482(in Chinese).
- [18] 何娇娇, 王萍, 冯建, 等. 发酵豆粕对大黄鱼生长、肠道结构及肠道微生物菌群的研究[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(5): 919-928.
- He J J, Wang P, Feng J, *et al.* Effects of fermented soybean meal on the growth and intestinal histology and microbiota of juvenile large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(5): 919-928(in Chinese).
- [19] Zhou Z, Ringø E, Olsen R E, *et al.* Dietary effects of soybean products on gut microbiota and immunity of aquatic animals: a review[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2018, 24(1): 644-665.
- [20] Chou R L, Her B Y, Su M S, *et al.* Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*[J]. *Aquaculture*, 2004, 229(1-4): 325-333.
- [21] Hernández M D, Martínez F J, Jover M, *et al.* Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*) diet[J]. *Aquaculture*, 2007, 263(1-4): 159-167.
- [22] 王裕玉, 周歧存, 卜宪勇, 等. 饲料中不同含量豆粕对中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 乌苏里拟鲮生长、体成分及表观消化率的影响[J]. *水生生物学报*, 2016, 40(4): 681-689.
- Wang Y Y, Zhou Q C, Bu X Y, *et al.* Effects of replacing fish meal with soybean meal on growth performance, body composition and apparent digestibility coefficients of *Pseudobagrus ussuriensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(4): 681-689(in Chinese).
- [23] Wang Y, Kong L J, Li C, *et al.* Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and carcass composition of cuneate drum (*Nibea miichthioides*)[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(4): 1307-1313.
- [24] Venou B, Alexis M N, Fountoulaki E, *et al.* Effects of extrusion and inclusion level of soybean meal on diet digestibility, performance and nutrient utilization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(1): 343-356.
- [25] Fuertes J B, Celada J D, Carral J M, *et al.* Effects of dietary protein and different levels of replacement of fish meal by soybean meal in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae) from the onset of exogenous feeding[J]. *Aquaculture*, 2012, 364-365: 338-344.
- [26] Gómez G D, Balcázar J L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2008, 52(2): 145-154.
- [27] Beaumont M, Portune K J, Steuer N, *et al.* Quantity and source of dietary protein influence metabolite production by gut microbiota and rectal mucosa gene expression: a randomized, parallel, double-blind trial in overweight humans[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2017, 106(4): 1005-1019.
- [28] Mu C L, Yang Y X, Luo Z, *et al.* Temporal microbiota changes of high-protein diet intake in a rat model[J]. *Anaerobe*, 2017, 47: 218-225.
- [29] Reveco F E, Øverland M, Romarheim O H, *et al.* Intestinal bacterial community structure differs between healthy and inflamed intestines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Aquaculture*, 2014, 420-421: 262-269.
- [30] Desai A, Links M G, Collins S A, *et al.* Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquaculture*, 2012, 350-353: 134-142.
- [31] Bruce T J, Neiger R D, Brown M L. Gut histology, immunology and the intestinal microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed process variants of soybean meal[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(1): 492-504.
- [32] Merrifield D L, Olsen R E, Myklebust R, *et al.* Dietary effect of soybean (*Glycine max*) products on gut histology and microbiota of fish[M]//El-Shemy H. Soybean and Nutrition. Rijeka: InTech, 2011.
- [33] Flint H J, Scott K P, Louis P, *et al.* The role of the gut microbiota in nutrition and health[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2012, 9(10): 577-589.
- [34] Moriya T, Satomi Y, Murata S, *et al.* Effect of gut microbiota on host whole metabolome[J]. *Metabolomics*, 2017, 13(9): 101.
- [35] Dai Z L, Wu G Y, Zhu W Y. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2011, 16: 1768-1786.
- [36] Guccione E, Leon-Kempis M D L, Pearson B M, *et al.* Amino acid-dependent growth of *Campylobacter jejuni*: Key roles for aspartase (AspA) under microaerobic and oxygen-limited conditions and identification of AspB (Cj0762), essential for growth on glutamate[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 69(1): 77-93.
- [37] Kararli T T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals[J]. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 1995, 16(5): 351-380.
- [38] Smith E A, Macfarlane G T. Enumeration of amino acid fermenting bacteria in the human large intestine: effects of pH and starch on peptide metabolism and dissimilation of amino acids[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 25(4): 355-368.
- [39] Bouhnik Y, Alain S, Attar A, *et al.* Bacterial populations contaminating the upper gut in patients with small intestinal bacterial overgrowth syndrome[J]. *American Journal of Gastroenterology*, 1999, 94(5): 1327-1331.
- [40] 王桂芹, 李子平, 牛小天, 等. 饲料能量和维生素B<sub>6</sub>对乌鳢生长和蛋白质代谢酶活性的影响[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2011, 50(4): 96-99, 105.
- Wang G Q, Li Z P, Niu X T, *et al.* Effect of dietary energy and vitamin B<sub>6</sub> on growth and enzyme of protein



metabolism in *Channa argus*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2011, 50(4): 96-99, 105(in Chinese).

## Effects of dietary soybean meal on the intestinal microbiota and metabolic enzymes activities of microbial amino acids of *Channa argus*

ZHU Jinyu<sup>1</sup>, HAN Bei<sup>1</sup>, BU Hongyi<sup>2</sup>, HU Juntao<sup>1</sup>,  
ZHANG Xin<sup>1</sup>, LIU Lingjun<sup>1</sup>, MIAO Shuyan<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology of Yangzhou University, Yangzhou 225000, China;

2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214128, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the effect of soybean meal on the growth, intestinal microbiota composition and metabolic enzymatic activities of microbial amino acid of *Channa argus*. Four isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated with soybean meal by replacing 0, 25%, 50% and 75% fish meal (G1, G2, G3 and G4, respectively). The fish of (8.65±0.25) g was hand-fed daily to satiation twice in cylindrical fiberglass tanks for 21 days. Results showed that no significant difference in survival rate was found among four groups. The growth performance of *C. argus* in G4 was significantly lower than those in G1 and G2, while the difference was not statistically significant between G3 and other three groups. The proportion of Firmicutes in the intestine of fish in G1 and G2 was significantly higher than that in G3, and the lowest was found in G4. The proportion of Proteobacteria in G1 and G2 was significantly lower than those in G3 and G4. The proportion of *Lactococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Laseczka* and *Acinetobacter* in G4 was significantly lower than those in the other three groups. Additionally, the activities of glutamic-pyruvic transaminase and adenosine deaminase were the the highest in G4, while the activity of lactic dehydrogenase was the the highest in G1. All results indicated that, except for the effect on the growth of *C. argus*, dietary soybean meal significantly induced the changes in the intestinal microbiota composition and the activity of the microbial amino acid metabolic enzymes, which may provide theoretical basis for further understanding the application of soybean meal in the formulated diets of *C. argus*.

**Key words:** *Channa argus*; soybean meal; intestinal microbiota composition; microbial amino acid metabolic enzymes

**Corresponding author:** MIAO Shuyan. E-mail: shuyanmiao@126.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31402306); China Postdoctoral Science Foundation (2017M621846)