



日粮中裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼幼鱼脂肪酸组成、FAD、ELO 基因表达及脂质代谢的影响

邢君霞, 吉红*, 李汉东, 肖芬芬, 袁想通

(西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 摄食含有裂殖壶藻硬脂油日粮的草鱼可能通过节省 DHA 合成所需的能量和促进脂解作用供应能量以减少蛋白质分解的共同作用下, 刺激蛋白质沉积, 获得比摄食鱼油更好的生长效果。为探究草鱼日粮中应用富含 DHA 的裂殖壶藻硬脂油后是否需要配伍 EPA 及其可能机制, 实验配制 5 组等氮等能日粮饲养草鱼 [(22.70 g±0.80) g]49 d, 分别以鱼油 (F-O); 藻油硬脂 (S-O); 藻油硬脂 (DHA): EPA=3:2(SE1-O); 藻油硬脂 (DHA): EPA=1:1(SE2-O); EPA(E-O) 提供 5 组饲料中的 0.52% n-3 长链多不饱和脂肪酸 (LC PUFA)。结果显示: ① 增重率 (WG)、特定生长率 (SGR) 及饲料系数 (FCR) 在各组间均无差异; ② S-O 组肌肉粗蛋白含量显著高于 E-O 组; ③ S-O 组肌肉 DHA 含量显著高于 F-O 组、SE1-O 组和 E-O 组; ④ 动脉粥样硬化指数在各组间无显著差异, SE2-O 组血栓形成指数显著高于 F-O 组, S-O 组和 SE2-O 组胆固醇血症指数显著低于 F-O 组; ⑤ E-O 组的腹腔脂肪细胞显著大于 F-O 组和 SE1-O 组, 且甘油三酯水解酶 (ATGL) 和肉碱棕榈酰转移酶 (CPT1) 转录水平显著下调; 肌肉中的脂肪酸去饱和酶 (FAD) 转录水平在 E-O 组显著高于 S-O 组, 脂肪酸延长酶 (ELO) 转录水平在 S-O 组显著下调。研究表明, 裂殖壶藻油单独或配伍 EPA 使用对草鱼生长、n-3 LC PUFA 含量及脂肪组织水解无显著影响。仅以 EPA 为 n-3 LC PUFA 来源时, 会减弱脂肪组织的水解并降低肌肉粗蛋白的含量。日粮中高水平的 DHA 会减弱机体合成 LC PUFA 的能力。相对于 EPA, 草鱼可能更需要 DHA, 生产中可以单独使用裂殖壶藻油, 而无需配伍 EPA。

关键词: 草鱼; 裂殖壶藻; EPA; 长链多不饱和脂肪酸

中图分类号: S 963

文献标志码: A

裂殖壶藻 (*Schizochytrium* sp.) 属真菌门 (Eumycophyta) 卵菌纲 (Oomycetes) 水霉目 (Saprolegniales) 破囊壶菌科 (Thraustochytriaceae), 是一类单细胞、球形的海洋真菌, 也称裂壶藻和裂殖壶菌^[1]。裂殖壶藻含有大量的脂质, 约占细胞干质量的 55%~75%, 且多为不饱和脂肪酸, DHA

占比 49%^[2-3]。裂殖壶藻约含水分 1.49%、灰分 9.79%、蛋白质 15.49%、碳水化合物 29.26%, 含有丰富的 Mg、Ca、Na、Fe 等元素, 还富含油脂、色素、角鲨烯等活性物质。裂殖壶藻的人工培养不受季节的影响, 具有对环境无污染、异养方式下培养生长速度快、营养成分稳定等诸多优

收稿日期: 2020-09-25 修回日期: 2021-01-31

资助项目: 蓝色粮仓科技创新重大专项 (2019YFD0900200)

第一作者: 邢君霞 (照片), 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: 1625396735@qq.com

通信作者: 吉红, E-mail: jihong@nwsuaf.edu.cn



点^[2]。从裂殖壶藻中提取精炼藻油的过程中, 产生了硬脂和蜡脂等 2 种工业副产品。

目前关于裂殖壶藻对鱼类生长及脂合成调控的研究主要集中在海水鱼中, 而淡水鱼相关研究鲜有报道。裂殖壶藻中含有高水平的 DHA, 但缺乏 EPA, 有研究指出, 以裂殖壶藻作为油脂源时, 这 2 种脂肪酸的不平衡是造成水产动物生长受阻的一个潜在原因, 例如, 利用裂殖壶藻粉和隐甲藻 (*Cryptocodinium*) 替代饲料中的鱼油而不替代乌贼粉时, 金头鲷 (*Sparus aurata*) 的成活率、生长性能和饲料利用率均未受到显著影响, 然而在替代全部脂肪源时其成活率和生长则均呈下降的趋势^[4]; 用裂殖壶藻粉替代 50% 的鱼油时没有影响海鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 的生长, 但完全替代鱼油时会阻碍海鲈生长^[5]。DHA 和 EPA 在调节鱼类生长性能、生存、脂质代谢、繁殖和免疫功能等方面具有重要的作用^[6-7], 已有大量研究表明 DHA 和 EPA 的比例对大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)^[8]、黄鳢 (*Epinephelus coioides*)^[9]、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)^[10] 和大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[11] 等的生长和脂质代谢有重要作用, 且最适 DHA 和 EPA 比例具有物种特异性^[12]。在草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 方面, 研究表明, 饲料 DHA/EPA 比率在 4.93~0.21 对草鱼幼鱼的生长、脂质蓄积和抗氧化状态没有显著性影响^[13]。

草鱼是我国产量最高的淡水养殖品种, 2019 年产量达到 5 533 083 t, 占全国淡水养殖产量的 18.36%^[14]。当前, 草鱼生产中大量投喂配合饲料, 青饲料的投喂减少, 高能量摄入的养殖模式虽然提高了草鱼的生长速度, 但易造成营养性脂肪肝和脂质代谢紊乱的情况, 影响了商品鱼的品质和养殖效果^[15]。一般认为, 草鱼幼鱼必需脂肪酸为 1% 亚油酸 LA 和 0.5%~1.0% 亚麻酸 α -LNA 或者 0.5% n-3 长链多不饱和脂肪酸 (LC PUFA)^[16]。吉红等^[17] 认为 n-3 LC PUFA 可抑制草鱼肝脏脏脂质过度沉积和脂合成酶活力及降低 LPL 表达丰度^[18], 对草鱼最适 n-3 LC PUFA 水平的研究表明, 草鱼日粮中添加 0.52% n-3 LC PUFA 可促进草鱼生长, 调控体脂在组织间分配, 提高脂质利用能力^[19]。

在鱼油鱼粉价格高昂且资源短缺的情况下, 将富含 LC PUFA 的微藻工业副产品资源充分利用在水产饲料中显得极为重要。本实验室在以

裂殖壶藻油替代鱼油的前期研究中发现, 裂殖壶藻硬脂能促进草鱼的生长、促进脂质水解并调节脂质的再分配和利用等^[20], 本实验在此基础上, 将裂殖壶藻硬脂配伍外源性 EPA 应用于草鱼日粮中, 进一步探究裂殖壶藻油是否能在草鱼饲料中作为 n-3 LC PUFA 的唯一来源, 是否有必要配伍 EPA 使用, 并探究饲料中 DHA 和 EPA 对草鱼肌肉合成 n-3 LC PUFA 机制的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验用饲料

配置 5 组等氮等能日粮, 主要油源有精炼鱼油 (DHA : EPA=2 : 3; 江苏省无锡市迅达有限责任公司), 裂殖壶藻硬脂 (下文简称为藻油; 含 39.72% DHA, 8.9% EPA) 由山东省临沂市友康生物科技有限公司提供, 精炼 EPA 购自江苏省无锡市迅达有限责任公司。根据本实验室前期研究结果, 设置日粮 n-3 LC PUFA 水平为 0.52%^[19], 分别以鱼油 (F-O); 藻油 (S-O); 藻油 DHA : EPA=2 : 3 (SE1-O); 藻油 DHA : EPA=1 : 1 (SE2-O); EPA (E-O) 提供饲料中的 0.52% n-3 LC PUFA, 5 组日粮 n-3 LC PUFA 的实测值均为 0.50%。所有原料粉碎混匀, 加入油搓匀后加入 70% 的水, 用焙烙机制成直径 2 mm 的颗粒, 放置于室温阴凉处通风干燥 24 h, 在 -20 °C 保存待用。饲料配方和常规成分如表 1 所示, 饲料脂肪酸组成如表 2 所示。

1.2 实验鱼及饲养管理

草鱼幼鱼由西北农林科技大学安康水产试验示范站提供。草鱼在水泥池 (4.75 m×1.65 m×0.80 m) 中饲喂对照组饲料暂养 28 d。饥饿 24 h 后, 挑选规格相似、健康的 216 尾幼鱼 (体质量 22.70±0.80 g) 随机分至循环水系统的缸 (225 L, $d=0.55$ m, $h=0.5$ m), 将 15 个缸随机分为 5 组, 每组 3 个重复, 每个重复 12 尾鱼, 停食 24 h 正式开始试验, 每组随机分配饲喂 5 组试验饲料 49 d。试验期间每天饱食投喂 3 次分别为 8:30, 12:30, 16:30。试验用水采用曝气后的井水, 光周期为 12 h/12 h。每日监测水质, 并记录试验鱼死亡数量等。饲喂期间水质测定结果如下: 水温 (26.50±0.70) °C; 溶解氧 (7.70±0.55) mg/L; pH 6.89±

表 1 饲料配方及营养成分(风干基础, g/kg)

Tab. 1 Formulation and proximate composition of the experimental diets (g/kg DM)

项目 items	0.50%n-3LC PUFA				
	F-O	S-O	SE1-O	SE2-O	E-O
原料 ingredients					
酪蛋白 casein	320.00	320.00	320.00	320.00	320.00
明胶 gelatin	80.00	80.00	80.00	80.00	80.00
糊精 dextrin	280.00	280.00	280.00	280.00	280.00
微晶纤维素 cellulose	199.00	199.00	199.00	199.00	199.00
猪油 lard oil	3.00	9.30	11.23	10.85	12.70
大豆油 soybean oil	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
亚麻油 linseed oil	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
精炼鱼油 refined fish oil	17.00	0.00	0.00	0.00	0.00
裂殖壶藻硬脂 stearin oil ¹	0.00	10.70	4.65	5.84	0.00
精炼 EPA refined EPA	0.00	0.00	4.12	3.31	7.30
羧甲基纤维素钠 carboxymethyl cellulose	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
混合无机盐 mineral mix ²	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00
混合维生素 vitamin mix ³	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
BHT	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
总计 total	1000	1000	1000	1000	1000
常规成分 proximate composition					
粗蛋白质/(%, N%×6.25) crude protein	35.83	35.74	35.81	35.77	35.80
粗脂肪/% crude lipid	4.85	4.86	4.85	4.84	4.86
水分/% moisture	12.10	11.82	11.90	12.30	12.05

注: 1. 裂殖壶藻硬脂油含 39.72% DHA, 8.9%DPA(%总脂肪酸); 2. 混合无机盐(毫克/100克饲料)含硫酸铝钾 0.159, 碳酸钙 18.101, 磷酸二氢钙 44.601, 氯化钴 0.07, 硫酸镁 5.216, 硫酸锰 0.007, 氯化钾 16.553, 碘化钾 0.014, 碳酸锌 0.192, 磷酸二氢钠 13.605, 硒酸钠 0.006, 硫酸铜 0.075, 柠檬酸铁 1.338; 3. 混合维生素(毫克/100克饲料)含硫酸胺 5, 核黄素 5, 维生素 A 25 00 IU, 维生素 E 40 IU, 维生素 D 3 24 00 IU, 甲萘醌 4, 盐酸吡哆醇 4, 氰钴胺 0.01, 生物素 0.6, 泛酸钙 10, 叶酸 1.5, 烟酸 20, 肌醇 200

Notes: 1. Stearin oil contained 39.72% DHA, 8.9%DPA (% of total fatty acids); 2. The mineral mix contained (g/100 g of diet): KAl(SO₄)₃ 0.159; CaCO₃ 18.101; CaH₂PO₄ 44.601; CoCl₂ 0.070; MgSO₄ 5.216; MnSO₄·H₂O 0.070; KCl 16.553; KI 0.014; ZnCO₃ 0.192; NaH₂PO₄ 13.605; Na₂SeO₃ 0.006; CuSO₄·5H₂O 0.075; Ferric citrate 1.338; 3. The vitamin mix contained (mg/100 g of diet): thiamine, 5; riboflavin, 5; vitamin A, 2500 IU; vitamin E, 40; vitamin D₃, 2400 IU; menadione, 4; pyridoxine HCl, 4; cyanocobalamin, 0.01; biotin, 0.6; calcium pantothenate, 10; folic acid, 1.5; niacin, 20; inositol, 200

0.31; 氨氮 (0.09±0.05) mg/L。

1.3 样品采集

样品采集过程严格按照西北农林科技大学动物管理委员会的要求执行, 尊重动物福利与道德规范。采样前, 草鱼饥饿 24 h 后使用 MS-222 (50 mg/L) 麻醉。每个缸的鱼都称重并测量长度。从每个缸取 2 尾鱼在 -20 °C 保存。取 5 尾鱼解剖并称重内脏、肾脏、肝脏、脾脏以及腹腔

脂肪组织, 并测量肠的长度。特定生长率 (SGR)、增重率 (WG)、饲料转化率 (FCR)、内脏指数 (VSI)、肥满度 (CF)、肾指数 (KI)、肝体比 (HSI)、脾脏指数 (SI)、腹腔脂肪指数 (IPFI) 以及肠体指数 (RIW) 根据以下的公式计算得出。然后肝脏、IPF、肠和肌肉储存在 -20 °C, 将其中 2 尾鱼的脂肪组织样品固定在 4% 多聚甲醛溶液中用于组织学观察。另取 5 尾鱼解剖后将肝脏、脂肪和肌肉保存在 -80 °C 用于组织基因表达测定。

表 2 日粮脂肪酸组成 (% 总脂肪酸)

Tab. 2 Fatty acid composition of the experimental diets (% of total fatty acids)

脂肪酸 fatty acids	组别 group				
	F-O	S-O	SE1-O	SE2-O	E-O
C14:0	0.17	0.17	0.49	0.47	0.48
C16:0	11.03	18.91	13.93	14.67	10.53
C18:0	6.57	6.19	6.87	6.83	8.83
SFA	17.78	25.27	21.29	21.96	19.84
C16:1n-7	1.24	0.42	0.50	0.50	0.61
C18:1n-9	24.74	19.34	23.58	23.43	25.33
C20:1n-9	0.59	0.34	0.36	0.35	0.20
MUFA	26.58	20.10	24.44	24.28	26.14
C18:2n-6	22.67	22.54	22.49	22.51	22.41
C20:4n-6	0.78	0.29	0.10	0.09	0.58
n-6PUFA	23.45	22.83	22.59	22.61	22.99
C18:3n-3	20.56	20.15	19.18	19.33	19.31
C20:5n-3	6.71	0.21	6.34	5.35	11.03
C22:5n-3	0.59	2.20	1.08	1.18	0.00
C22:6n-3	4.32	9.23	4.18	5.29	0.68
DHA+EPA	11.03	9.44	10.52	10.63	11.71
DHA/EPA	0.64	43.95	0.66	0.99	0.06
n-3PUFA	32.19	31.79	30.78	31.15	31.03
n-3LC PUFA	11.63	11.64	11.59	11.82	11.71
n-3/n-6	1.37	1.39	1.36	1.38	1.35

注: SFA, 饱和脂肪酸; MUFA, 单不饱和脂肪酸; PUFA, 多不饱和脂肪酸; LC-PUFA, 长链多不饱和脂肪酸, 下同

Notes: SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; LC-PUFA, long chain polyunsaturated fatty acids; the same below

特定生长率 (specific growth rate, SGR, %/d) = $[\ln(\text{鱼末均重}) - \ln(\text{鱼初均重})] / \text{实验天数} \times 100\%$;

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

饲料转化率 (feed conversion ratio, FCR, %) = $\text{投饲总量} / \text{体增重}$;

内脏指数 (viscerosomatic index, VSI, %) = $\text{内脏重} / \text{鱼体质量} \times 100\%$;

饱满度 (condition factor, CF, g/cm^3) = $\text{体质量} / \text{体长}^3 \times 100$;

肾指数 (kidney index, KI, %) = $\text{肾脏重} / \text{鱼体质量} \times 100\%$;

肝体比 (hepatosomatic index, HSI, %) = $\text{肝脏重} / \text{鱼体质量} \times 100\%$;

脾脏指数 (spleen index, SI, %) = $\text{脾脏重} / \text{鱼体质量} \times 100\%$;

腹腔脂肪指数 (intraperitoneal fat index, IPFI, %) = $\text{腹腔脂肪量} / \text{鱼体质量} \times 100\%$;

肠体指数 (relative intestine weight, RIW, %) = $\text{肠重} / \text{鱼体质量} \times 100\%$ 。

1.4 常规成分分析

饲料、组织和全鱼的常规成分按照 AOAC 所述方法测定^[21]。其中, 水分用 150 °C 恒温干燥法测定, 粗蛋白质 (N%×6.25) 含量使用凯氏定氮法测定, 粗脂肪含量用索氏抽提法, 粗灰分含量使用马弗炉 550 °C 灰化 12 h 测定。

1.5 脂肪酸组成及脂肪酸健康指数分析

用氯仿-甲醇提取肌肉、肝脏和日粮中的脂质^[22], 脂肪酸甲酯是用 0.4 mol/L KOH-甲醇制备^[23], 再加 2 mL 去离子水, 待分层后提取上层溶液在气象色谱仪 (安捷伦 7820a, 安捷伦科技, 美国) 上进行测定。每种脂肪酸与已知标品 (47015-U, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA) 进行比对鉴别。实验结果按面积归一化法计算不同脂肪酸含量, 以总脂肪酸的百分比的形式呈现。脂肪酸健康指数按照下述方法计算。

动脉粥样硬化指数 (atherogenicity index, AI) 和血栓形成指数 (thrombogenicity index, TI) 是根据 Ulbricht 等^[24] 所述方法计算:

$$AI = [C12: 0 + (4 \times C14: 0) + C16: 0] / (n-3 \text{ PUFA} + n-6 \text{ PUFA} + \text{MUFA});$$

$$TI = (C14: 0 + C16: 0 + C18: 0) / [(0.5 \times \text{MUFA}) + (0.5 \times n-6 \text{ PUFA}) + (3 \times n-3 \text{ PUFA}) + (n-3 \text{ PUFA} / n-6 \text{ PUFA})]$$

胆固醇血症指数 (hypocholesterolemic/hypercholesterolemic FA ratio, h/H) 是根据 Santos-Silva 等^[25] 所述方法计算:

$$h/H = (C18: 1n-9 + C18: 2n-6 + C20: 4n-6 + C18: 3n-3 + C20: 5n-3 + C22: 5n-3 + C22: 6n-3) / (C14: 0 + C16: 0)$$

表 3 实时定量 PCR 引物序列

Tab. 3 Primers used in real-time quantitative PCR.

基因 genes	登录序号 accession number	上游 forward (5'-3')	下游 reverse (5'-3')
PPAR α	FJ623265	CGCTGAGGTTTCGATATTT	ACGTCACCTGGTCATTTAAG
HSL	HQ446238	TGGAACGTTACTGAGTCTGG	AAGCGCACGTTGACTGG
ATGL	HQ845211	TCGTGCAAGCGTGTATATG	GCTCGTACTGAGGCAAATTA
CPT1	JF728839	GCATCCATGACACGTTTATTC	GAAGTTTCTTCTCTCGTCTC
FAD	FJ641974	GCAGTTCTACGGTGTGTTT	CAGTCTTGGTGTCTCATAGT
ELO	HQ637463	GCTTCTGCTGGACAACACTAC	GCGTCAGGAAGAGGTTATATG
β -actin	DQ211096	GACCTGACTGACTACCTCAT	CGAAGTCAAGAGCCACATAG

注: PPAR α . 过氧化物酶体增殖活化受体; ATGL. 甘油三酯水解酶; CPT-1. 肉碱棕榈酰转移酶1; HSL. 激素敏感性脂肪酶; FAD. 脂肪酸去饱和酶; ELO. 脂肪酸延长酶

Notes: PPAR α . α peroxisome proliferator-activated receptor- α ; ATGL. adipose TAG lipase; CPT-1. 1 carnitine palmitoyltransferase 1; HSL. hormone sensitive lipase; FAD. fatty acid desaturase; ELO. fatty acid elongase

1.6 组织学观察

石蜡切片的制作按照 Liu 等^[26]所述的方法进行, 并使用苏木精和伊红染色, 脂肪组织石蜡切片由西安依科生物科技有限公司制作。观察组织学样品用正置显微镜 (Leica biosystems, Germany) 拍照。使用 Photoshop (Adobe, San Jose, USA) 对每个图像的平均脂肪细胞大小进行定量, 计算每个组 5 个不重复的图像平均值^[27]。

1.7 甘油三酯含量测定

肝脏组织的甘油三酯含量采用南京建成生物工程研究所试剂盒检测。

1.8 基因表达分析

RNA 提取、浓度测定、反转录和 RT-qPCR 均按前述方法进行^[28], 采用 CFX96 实时定量 PCR 检测系统。qPCR 反应体系为, 初始激活步骤为 95 °C 3 min, 随后为 38 个循环的 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 最后为 65 °C 5 s。PCR 反应后采用扩增曲线获得目的基因与管家基因的 β -actin 的 CT 值, 计算它们之间 CT 值的差值记为 ΔC_t , 根据公式 $2^{-\Delta C_t}$ 计算各组目的基因的表达量^[29-30]。基因引物序列见表 3, 由陕西省杨凌奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

1.9 数据分析

数据均采用平均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 用 SPSS 18.0 软件 (Chicago, IL, USA) 对数据进行单因素方差分析、Duncan 氏多重比较检验组间

的差异。

2 结果

2.1 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼生长性能及生物学性状的影响

各组间 SGR、FCR、CF、HSI、SI、IPFI 差异不显著 ($P>0.05$)。S-O 组的 KI 显著低于 F-O 组 ($P<0.05$)。SE2-O 组 VSI 显著低于 F-O 组 ($P<0.05$)。S-O 组及 SE2-O 组肠指数显著低于 F-O 组 ($P<0.05$) (表 4)。

2.2 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼常规成分的影响

全鱼水分、粗脂肪及灰分, 肌肉中粗脂肪含量和肝脏甘油三酯含量在各组间无显著差异 ($P>0.05$)。SE2-O 组的肌肉水分含量显著低于 F-O 组、S-O 组和 E-O 组 ($P<0.05$)。E-O 组肌肉粗蛋白显著低于 S-O 组 ($P<0.05$) (表 5)。

2.3 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼肌肉和肝脏脂肪酸组成及肌肉脂肪酸健康指数的影响

裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼肌肉及肝脏脂肪酸组成的影响 在肌肉中, C18:2n-6, MUFA, n-6PUFA, n-3PUFA, n-3 LC PUFA 及 n-3/n-6 在各组间均无显著差异 ($P>0.05$), SE2-O 组的 SFA 显著高于 F-O 组 ($P<0.05$)。E-O 组的 EPA 含量显著高于其他 3 组含藻油的组别 ($P<0.05$) (表 6)。S-O 组 DHA 含量显著高于 F-O 组、

表 4 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼生长性能及生物学性状的影响

Tab. 4 Effects of *Schizochytrium* sp. oil combined with exogenous EPA on growth performance and biological parameters of grass carp

项目 items	组别 group				
	F-O	S-O	SE1-O	SE2-O	E-O
末重/g FBW	30.35±1.74	31.03±1.81	31.02±1.35	30.69±0.46	29.84±1.58
增重率/% WG	37.97±7.88	41.06±8.23	41.02±6.16	39.51±2.10	35.63±7.17
特定生长率/(%/d) SGR	0.65±0.12	0.70±0.12	0.70±0.09	0.68±0.03	0.62±0.11
饲料转化率/% FCR	2.86±0.62	2.74±0.58	2.63±0.50	2.98±0.31	2.84±0.52
肥满度/(g/cm ³) CF	2.00±0.08	1.93±0.05	1.91±0.04	1.95±0.02	1.93±0.03
肝体比/% HSI	3.11±0.12	3.27±0.16	3.08±0.24	3.05±0.11	2.96±0.31
内脏指数/% VSI	16.79±0.49 ^a	15.84±0.41 ^{ab}	16.20±0.78 ^{ab}	15.62±0.67 ^b	16.01±0.51 ^{ab}
脾脏指数/% SI	0.12±0.01 ^a	0.08±0.01 ^b	0.11±0.02 ^{ab}	0.09±0.01 ^{ab}	0.11±0.02 ^{ab}
肾脏指数/% KI	0.31±0.02	0.28±0.04	0.28±0.01	0.27±0.03	0.31±0.03
肠体指数/% RIW	3.06±0.42 ^a	2.42±0.15 ^b	2.64±0.36 ^{ab}	2.49±0.09 ^b	2.90±0.19 ^{ab}
脂肪指数/% IPFI	1.24±0.02	1.33±0.06	1.33±0.21	1.36±0.13	1.35±0.14

注: 数据表示为平均值±标准差。同行上标不同表示差异显著($P<0.05$), 下表同

Notes: Values are means ± SD, of three replicates. Values in the same line with different superscript letters are significantly different($P<0.05$), the same below

表 5 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼常规成分的影响

Tab. 5 Effects of *Schizochytrium* sp. oil combined with exogenous EPA on proximate composition of grass carp

项目 items	组别 group				
	F-O	S-O	SE1-O	SE2-O	E-O
肝脏 hepatopancreas					
甘油三酯/(mmol/g prot) triglyceride	0.30±0.05	0.25±0.03	0.31±0.05	0.30±0.07	0.30±0.06
肌肉 muscle					
水分/% moisture	79.36±0.48 ^a	79.40±0.27 ^a	79.09±0.66 ^{ab}	78.55±0.35 ^b	79.41±0.87 ^a
粗蛋白质/% crude protein	20.78±0.28 ^{ab}	21.13±0.29 ^a	20.82±0.29 ^{ab}	20.57±0.35 ^{ab}	20.26±0.25 ^b
粗脂肪/% crude lipid	1.61±0.39	1.54±0.20	1.66±0.92	1.90±0.46	1.93±0.72
全鱼 whole body					
水分/% moisture	75.37±1.30	75.52±0.85	74.02±0.42	75.10±1.21	72.68±1.14
粗脂肪/% crude lipid	6.49±0.35	6.39±0.41	6.52±0.50	6.50±0.44	7.07±0.15
灰分/% ash	3.15±0.31	2.93±0.37	2.65±0.24	2.90±0.11	3.04±0.20

SE1-O 组和 E-O 组 ($P<0.05$), SE2-O 组和 E-O 组 C18:3n-3 显著低于 F-O 组 ($P<0.05$)。在肝脏中, SFA 在 SE1-O 组和 E-O 组显著高于其他组, 而 MUFA 显著低于其他组 ($P<0.05$)。S-O 组的 n-

3PUFA 显著高于其他组 ($P<0.05$), C18:3n-3, n-3 LC PUFA 在各组间无显著差异 ($P>0.05$)(表 7)。

裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼肌肉脂肪酸健康指数的影响 动脉粥样硬化指数

表 6 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼肌肉脂肪酸组成的影响

Tab. 6 Effects of *Schizochytrium* sp. oil combined with exogenous EPA on the fatty acid composition of muscle in grass carp (% of total fatty acids)

脂肪酸 fatty acids	肌肉 muscle					%
	F-O	S-O	SE1-O	SE2-O	E-O	
C14:0	1.47±0.68	1.76±0.26	1.58±0.29	1.32±0.73	1.79±0.29	
C16:0	24.15±1.53 ^b	25.43±1.23 ^{ab}	24.71±1.31 ^{ab}	25.82±0.33 ^a	24.42±0.64 ^{ab}	
C18:0	9.02±1.00	10.30±0.69	9.35±1.09	9.68±0.74	9.89±0.76	
SFA	34.63±1.87 ^b	37.48±1.76 ^{ab}	35.65±2.39 ^{ab}	36.81±1.40 ^a	36.10±0.96 ^{ab}	
C16:1n-7	5.49±0.68	5.00±0.65	5.61±0.65	6.01±0.45	5.10±0.74	
C18:1n-9	26.69±2.40 ^{ab}	24.05±1.95 ^b	27.32±2.70 ^a	25.87±1.31 ^{ab}	26.48±1.80 ^{ab}	
C20:1n-9	0.08±0.07	0.14±0.03	0.09±0.12	0.07±0.07	0.06±0.08	
MUFA	32.26±3.11	29.20±2.53	33.02±3.39	31.95±1.57	31.65±2.40	
C18:2n-6	9.99±0.58	9.14±0.52	9.24±0.93	9.56±0.51	9.89±0.56	
C20:4n-6	1.09±0.30	1.04±0.56	0.74±0.41	1.11±0.22	1.08±0.35	
n-6PUFA	11.08±0.85	10.18±0.79	9.98±1.17	10.67±0.71	10.97±0.66	
C18:3n-3	3.37±0.44 ^a	2.63±0.56 ^{abc}	3.14±0.83 ^{ab}	2.21±0.35 ^c	2.45±0.37 ^{bc}	
C20:5n-3	4.74±0.27 ^{ab}	3.79±0.93 ^b	4.24±1.27 ^b	3.85±0.32 ^b	5.57±0.97 ^a	
C22:5n-3	2.25±0.47 ^b	3.14±0.86 ^a	2.55±0.48 ^{ab}	2.69±0.16 ^{ab}	2.21±0.27 ^b	
C22:6n-3	11.66±1.18 ^b	13.59±1.64 ^a	11.42±1.50 ^b	11.81±1.19 ^{ab}	11.05±0.73 ^b	
DHA+EPA	16.41±1.36	17.38±2.16	15.65±2.62	15.66±1.07	16.62±1.16	
DHA/EPA	2.46±0.20 ^{bc}	3.73±0.95 ^a	2.80±0.53 ^{bc}	3.09±0.53 ^{ab}	2.03±0.34 ^c	
n-3PUFA	22.03±1.38	23.14±1.79	21.34±2.31	20.56±0.98	21.28±1.59	
n-3LC PUFA	18.66±1.82	20.52±2.35	18.20±3.09	18.35±1.22	18.83±1.37	
n-3/n-6	2.00±0.23	2.29±0.33	2.17±0.45	1.93±0.16	1.94±0.10	

AI 在各组间无差异 ($P>0.05$)。SE2-O 组血栓形成指数 TI 显著高于 F-O 组 ($P<0.05$)，与其他组无差异 ($P>0.05$)。胆固醇血脂指数 h/H 在 S-O 组和 SE2-O 组显著低于 F-O 组 ($P<0.05$) (表 8)。

2.4 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼脂肪细胞形态学的影响

腹腔脂肪组织中脂肪细胞的大小如图 1-a 所示。F-O 组脂肪细胞显著小于 E-O 组 ($P<0.05$)，但与其他组没有差异 ($P>0.05$) (图 1-b)。

2.5 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼脂肪组织代谢相关基因及肌肉 FAD, ELO 基因表达的影响

在腹腔脂肪组织中，与 F-O 和 S-O 相比，E-

O 组的 ATGL 和 CPT1 mRNA 水平显著下调 ($P<0.05$)；HSL 和 PPAR α 在各组间无显著性差异 ($P>0.05$) (图 2-a)。在肌肉组织中，E-O 组 FAD mRNA 水平显著高于 S-O 组 ($P<0.05$)，ELO mRNA 水平在 S-O 组显著下调 ($P<0.05$) (图 2-b)。

3 讨论

3.1 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼生长、常规成分的影响

本研究中，生长性能在各组间无显著性差异，裂殖壶藻油可以完全替代鱼油单独作为草鱼日粮中的 n-3 LC PUFA 来源，无需外源添加 EPA。在以微藻替代鱼油的研究发现，富含 DHA 的裂殖壶藻粉对星斑川鲈 (*Platichthys ste-*

表 7 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼肝脏脂肪酸组成的影响
Tab. 7 Effects of *Schizochytrium* sp. oil combined with exogenous EPA on the fatty acid composition of hepatopancreas in grass carp (% of total fatty acids)

脂肪酸 fatty acids	肝脏 hepatopancreas				
	F-O	S-O	SE1-O	SE2-O	E-O
C14:0	2.35±0.10	2.12±0.31	2.33±0.26	2.43±0.14	2.31±0.31
C16:0	25.93±1.29 ^b	26.27±0.58 ^b	28.80±0.59 ^a	28.95±0.95 ^a	27.64±0.07 ^a
C18:0	7.27±0.70 ^{bc}	7.61±2.10 ^{bc}	9.52±0.27 ^b	5.84±1.36 ^c	14.08±2.77 ^a
SFA	35.56±1.99 ^c	36.20±2.22 ^c	40.65±0.71 ^b	37.22±0.77 ^c	44.03±2.49 ^a
C16:1n-7	10.99±0.60	10.61±1.23	10.36±1.06	11.22±0.64	10.65±0.45
C18:1n-9	45.07±0.83 ^a	44.41±2.14 ^a	41.13±1.15 ^b	45.88±1.18 ^a	39.33±1.71 ^b
C20:1n-9	1.19±0.41 ^a	1.24±0.38 ^a	1.05±0.27 ^{ab}	0.62±0.06 ^b	0.64±0.26 ^b
MUFA	57.25±0.47 ^a	56.06±2.09 ^a	52.53±0.70 ^b	57.72±0.71 ^a	50.61±1.71 ^b
C18:2n-6	3.32±1.06 ^a	3.35±0.74 ^a	2.81±0.64 ^{ab}	1.63±0.12 ^b	1.79±0.52 ^b
C20:4n-6	0.10±0.03	0.12±0.03	0.12±0.02	0.09±0.01	0.09±0.04
n-6PUFA	3.42±1.04 ^a	3.46±0.76 ^a	2.93±0.66 ^{ab}	1.72±0.11 ^c	1.88±0.56 ^{bc}
C18:3n-3	1.90±0.33	1.85±0.31	2.05±0.29	1.71±0.47	2.01±0.07
C20:5n-3	0.45±0.09 ^a	0.24±0.07 ^c	0.39±0.06 ^{ab}	0.24±0.02 ^c	0.30±0.08 ^{bc}
C22:5n-3	0.17±0.07 ^b	0.42±0.18 ^a	0.29±0.07 ^{ab}	0.27±0.04 ^{ab}	0.15±0.03 ^b
C22:6n-3	1.25±0.18 ^{ab}	1.76±0.64 ^a	1.41±0.27 ^{ab}	1.13±0.18 ^{ab}	1.02±0.27 ^b
DHA+EPA	1.70±0.25 ^{ab}	2.00±0.70 ^a	1.79±0.21 ^{ab}	1.36±0.19 ^{ab}	1.32±0.35 ^b
DHA/EPA	2.83±0.48	7.27±0.84	3.77±1.27	4.72±0.43	3.43±0.26
n-3PUFA	3.77±0.64 ^c	4.28±0.90 ^a	4.14±0.50 ^{bc}	3.34±0.41 ^b	3.48±0.39 ^{bc}
n-3LC PUFA	1.87±0.31	2.07±0.44	2.08±0.27	1.63±0.23	1.47±0.38
n-3/n-6	1.15±0.27 ^b	1.27±0.31 ^b	1.49±0.49 ^{ab}	1.95±0.29 ^a	1.94±0.49 ^a

表 8 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼肌肉中脂肪酸健康指数的影响

Tab. 8 Effects of *Schizochytrium* sp. oil combined with exogenous EPA on health index of fatty acid in muscle of grass carp

项目 items	F-O	S-O	SE1-O	SE2-O	E-O
动脉粥样硬化指数 AI	0.46±0.01	0.52±0.04	0.48±0.05	0.49±0.05	0.49±0.02
血栓形成指数 TI	0.39±0.02 ^b	0.41±0.02 ^{ab}	0.41±0.02 ^{ab}	0.43±0.02 ^a	0.42±0.02 ^{ab}
胆固醇血症指数 h/H	2.34±0.12 ^a	2.12±0.15 ^b	2.24±0.20 ^{ab}	2.11±0.11 ^b	2.24±0.09 ^{ab}

注: AI, 动脉粥样硬化指数; TI, 血栓形成指数; h/H, 胆固醇血症指数

Notes: AI, atherogenicity index; TI, thrombogenicity index; h/H, hypocholesterolemic/hypercholesterolemic FA ratio

llatus) 幼鱼的生长显著优于裂殖壶藻粉+富含 EPA 的微拟球藻粉混合组和微拟球藻粉组, 且与鱼油组的生长无显著差异^[31]。裂殖壶藻能有效提高鱼类的生长性能可能与它含有丰富的 DHA

有关^[32]。关于星斑川鲷 DHA 和 EPA 比例的研究中发现, DHA 对星斑川鲷幼鱼生长性能的促进作用优于 EPA^[33]。Trushenski 等^[34] 也认为 DHA 就可以满足军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 生长。

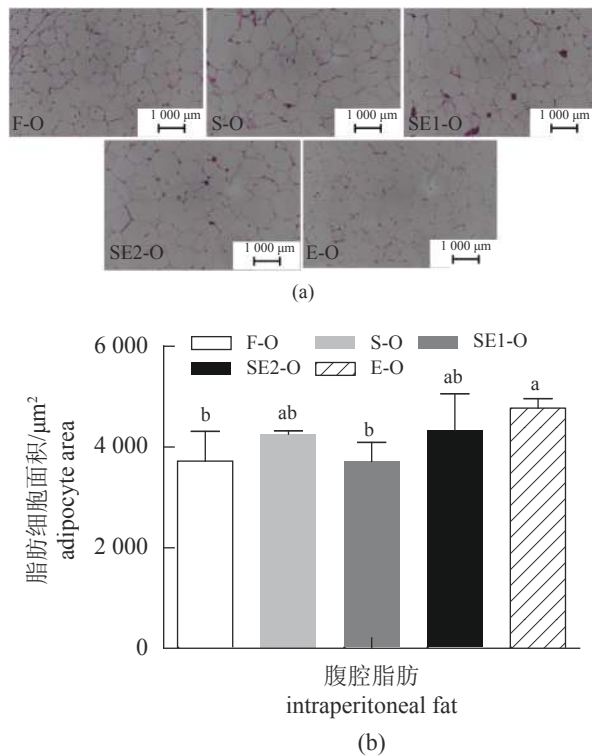


图1 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对脂肪细胞形态学的影响比较

(a) 腹腔脂肪细胞形态(苏木精-伊红染色)。(b) 实验鱼脂肪细胞大小。所有数据以平均值±标准差显示。组间不同字母表示差异显著($P<0.05$)，下同

Fig. 1 Effects of *Schizochytrium* sp. oil combined with exogenous EPA on the lipid accumulation of intraperitoneal fat in juvenile grass carp

(a) Morphology of intraperitoneal fat (haematoxylin-eosin staining, original magnification 200×). (b) Adipocyte size in experimental fish. Values are means±SD, of three replicates. Values with unlike letters are significantly different between groups ($P<0.05$), the same below

还有研究表明，高 DHA 组的实验鱼生长最快，成活率最高^[35-36]。有学者指出，DHA 比 EPA 更能促进大部分鱼类的生长，过高的 EPA 含量和过低的 DHA 含量都会对仔稚鱼的神经功能产生消极的影响，DHA 可能发挥着更为关键的作用^[37,16]。本研究中 E-O 组的肌肉粗蛋白含量显著低于 S-O 组可能与上述原因相关。另外，由于日粮中仅以 EPA 为 LC PUFA 的来源时，减弱脂肪组织的水解能力和游离脂肪酸的 β 氧化能力，从而减弱了脂肪在组织间的分配能力和供能利用，导致 E-O 组肌肉组织的粗蛋白质含量显著降低。此外，脾脏是水产动物的主要免疫器官，脾指数可以反映免疫器官的生长发育状态^[38]，脾指数在 S-O 组显著低于 F-O 组，表明鱼油在促进脾等

免疫器官生长发育方面比裂殖壶藻油更具有优势。S-O 组及 SE1-O 组的肠指数显著低于 F-O 组，可能与鱼油的消化率低于微藻有关^[39]，推测鱼油可能加重了肠道的消化吸收负担。

3.2 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼肌肉及肝脏脂肪酸组成及肌肉 FAD, ELO 基因表达的影响

生物体对 LC PUFA 的需求量与其 LC PUFA 合成能力、食物及环境因子等因素有关^[40-41]。淡水硬骨鱼类可以将 C_{18} PUFA 转化成 LC PUFA，而海水鱼类不具有该能力或该能力很弱^[42]。研究表明草鱼机体可能具有比其他杂食性淡水鱼更强的 LC PUFA 合成能力^[43]。脂肪酸去饱和酶(FAD)作为 LC PUFA 合成过程中的限速酶发挥作用，脂肪酸延长酶(ELO)则参与不饱和脂肪酸碳链的延长，FAD 和 ELO 在 LC PUFA 的合成中起着关键作用，FAD 和 ELO 的活性和底物特异性在不同鱼类之间的差异比较大^[44-45]。富含 C_{18} PUFA 的植物油促进 LC PUFA 合成关键酶的转录，而富含 LC PUFA 的鱼油则起抑制作用^[46]。但调控 LC PUFA 合成的机制尚不清楚，推测与植物油缺乏鱼油富含的 n-3 LC PUFA 有关，减少了对 LC PUFA 合成以及相关酶基因的表达和酶活性的反馈抑制^[47]。

在本研究中，FAD mRNA 水平在 E-O 组显著高于 S-O 组，S-O 组的 ELO mRNA 水平显著低于 F-O 组，SE2-O 组和 E-O 组，表明在本实验中各组日粮含有等量的亚麻酸的情况下，日粮中等量但不同组成的 n-3 LC PUFA 会影响 FAD 和 ELO 的活性，推测仅以 DHA 为日粮中 LC PUFA 为来源会减弱 FAD 及 ELO 的活性，即日粮中高水平 DHA 可能会减弱机体合成 LC PUFA 的能力，这可能是因为在 S-O 组日粮中富含 DHA，自身不需要再合成大量 DHA，因此对草鱼去饱和酶及延长酶活性形成了反馈抑制。同样，Thomassen 等^[48]以菜籽油和鱼油为对照组，菜籽油+EPA 和菜籽油+EPA+DHA 为处理组，得出大西洋鲑在 LC PUFA 合成过程中的去饱和及延长反应受 DHA 抑制，而不是 EPA，Betancor 等^[49]在大西洋鲑的研究中也得出了同样的结论。在黄鳝的研究中表明高含量的 DHA 会抑制 FAD 基因的表达^[9]，在黑鲷的研究中也发现，随着 DHA/EPA 比例的升高，延长酶和去饱和酶下调^[10]。在本研究中，

FAD、ELO 基因表达及脂质代谢的影响

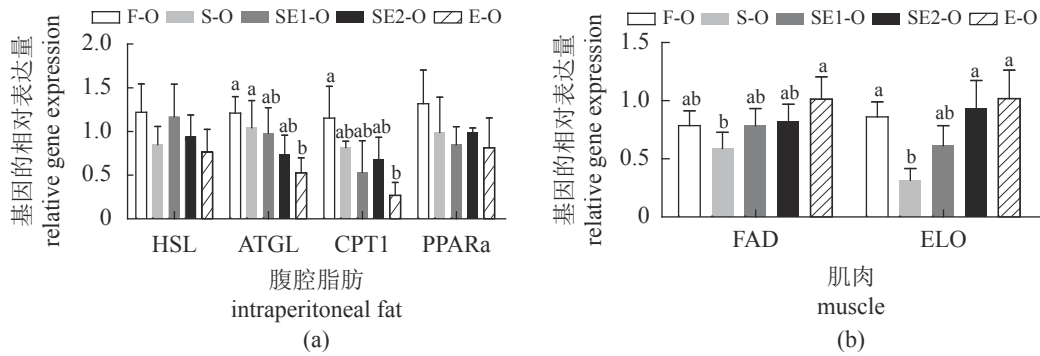


图 2 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼脂肪组织脂代谢相关基因 (a) 及肌肉 FAD, ELO 基因 (b) 表达的影响

结果以平均值±标准差表示, 以 β-actin 为管家基因。

Fig. 2 Effects of *Schizochytrium* sp. oil combined with exogenous EPA on the lipid-metabolism-related gene expression of the intraperitoneal fat (a) and FAD, ELO gene expression of muscle in juvenile grass carp (b)

Values are means±SD, of three replicates. Gene expression was normalized to β-actin

随着日粮中 EPA 含量的增加, 肌肉 FAD 和 ELO 表达水平也随之上调, 这与肌肉中亚麻酸在日粮中含有 EPA 的组中有下降趋势的结果基本一致。这也解释了在 E-O 组的日粮中虽不含 DHA, 但肌肉和肝脏中却积累了高于 EPA 2 倍含量的 DHA, 这一现象的原因可能是机体通过激活 FAD 和 ELO 的活性从而由内源性途径合成了 DHA。也有研究指出, 亚麻酸在鱼体内用于 β 氧化以及合成 LC PUFA^[50-51], 推测当亚麻酸合成 LC PUFA 的过程被抑制时, 亚麻酸便倾向于 β 氧化。因此, 草鱼体内亚麻酸的分配和去路有待进一步研究。从肌肉及肝脏各组脂肪酸组成的对比来看, 推测草鱼有选择性保留具有调节膜流动性作用的 DHA 的机制, 而 EPA 则易于被氧化供能, 这在罗非鱼中也有相关报道^[52-53], 另一方面 EPA 可能作为底物转化为 DHA, 由此看来草鱼对 DHA 的需求量要高于 EPA。在 DHA/EPA 比例的研究中也指出, DHA 比 EPA 更加高效, 鱼可选择性的消耗 EPA 而保留 DHA^[54]。另外, E-O 组的肌肉 EPA 含量最高, 这与 E-O 组的日粮中高含量的 EPA 来源有关, n-3 LC PUFA 含量在肌肉及肝脏均无显著性差异, 说明在藻油中添加 EPA 没有起到更进一步提高肌肉品质的作用。

3.3 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼肌肉脂肪酸健康指数的影响

摄食大量的饱和脂肪酸 (SFA) 会使人体血液胆固醇含量上升, 从而导致心血管疾病^[55]。因

此, 为人类提供含优质脂肪酸的食物很关键。具有低比例的 AI 和 TI, 高比例的 h/H 的脂质更加适合人类食用^[56]。SE2-O 组 TI 显著高于 F-O 组, S-O 组的 h/H 显著低于 F-O 组。S-O 组的肌肉脂肪酸健康指数次于 F-O 组, 添加 EPA 后, h/H 在 SE2-O 组和 E-O 组虽有上升的趋势, 但 SE2-O 组和 E-O 组的 h/H 及 TI 均与 S-O 组无显著差异。对 AI, TI, h/H 的分析说明, 在藻油中添加 EPA 未能有效改善肌肉脂肪酸健康指数。肌肉脂肪酸组成反映日粮脂肪酸组成, 分析日粮脂肪酸组成可知, 添加 EPA 后, 日粮中 SFA 比例随着 C16:0 比例下降, MUFA 比例虽升高, 但在肌肉中 MUFA 和 n-3PUFA 的含量没有得到改善, 这可能是添加 EPA 后肌肉脂肪酸健康指数没有明显改善的原因, 同时也与裂殖壶藻油本身含有高比例的 SFA 和低比例的 MUFA 有关, 裂殖壶藻油中 C16:0 和 DHA 含量高, 而其他种类的脂肪酸含量微乎其微, 不如鱼油的脂肪酸种类丰富。本研究中的 AI 和 TI 的指数与鲤 (*Cyprinus carpio*)^[57] 和南方大口鲶 (*Silurus meridionalis*)^[58] 等多种鱼类的指数较为接近, 且远远优于乳制品和家畜动物脂质的相关指数^[24], 表明草鱼摄食含有藻油的日粮时, 其肌肉脂质的质量与摄食鱼油的草鱼相近, 对人体健康是有益。

3.4 裂殖壶藻油配伍外源性 EPA 对草鱼脂肪细胞形态学及脂代谢相关基因的影响

脂解由 ATGL、HSL 和 MGL 等一系列酶调

控,在 ATGL 的催化下,甘油三酯转变成甘油二酯, HSL 催化甘油二酯转变为单酰基甘油, MGL 催化单酰基甘油生成甘油^[59]。β 氧化相关的酶类参与组织中脂肪酸的氧化分解供能过程, HSL 与脂肪酸 β 氧化密切相关, 是脂肪动员的主要限速酶, ATGL 是脂质水解的限速酶^[60], CPT1 被认为是 β 氧化的限速酶^[59]。研究表明黑鲷摄食含有 EPA 和 DHA 的日粮均能减小脂肪细胞大小^[61]。在本研究中, E-O 组的脂肪细胞大小显著高于 F-O 组和 SE1-O 组, 这与脂肪水解基因 ATGL 在 E-O 组显著下调有关。在日粮中均含有 0.52% n-3 LC PUFA 的情况下, 相比于其他各组, 日粮中仅以 EPA 为 LC PUFA 的来源时, 可能会减弱脂肪组织的水解能力和游离脂肪酸的 β 氧化能力, 从而减弱脂肪在组织间的分配能力和供能利用, 这也是 E-O 组肌肉组织的粗蛋白质含量显著降低的原因之一。此外, 裂殖壶藻油配伍 EPA 对脂肪的水解能力没有产生影响。

4 结论

综上所述, 单独使用裂殖壶藻油和裂殖壶藻油配伍 EPA 对草鱼的生长性能、n-3 LC PUFA 含量及脂肪组织的水解没有显著性影响。相对于 EPA, 草鱼可能更需要 DHA。本实验结果认为, 草鱼生产中可以单独使用裂殖壶藻油, 而无需配伍 EPA。

参考文献 (References):

- [1] Nakahara T, Yokochi T, Higashihara T, *et al.* Production of docosahexaenoic and docosapentaenoic acids by *Schizochytrium* sp. isolated from Yap Islands[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1996, 73(11): 1421-1426.
- [2] 宋泽, 彭雍博, 宋悦凡, 等. 裂殖壶菌营养成分及其多糖特征分析[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(2): 247-251.
Song Z, Peng Y B, Song Y F, *et al.* Analysis of nutrient composition and polysaccharide characteristics of fungus *Schizochytrium* sp.[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(2): 247-251(in Chinese).
- [3] Ren L L, Ji X J, Huang H, *et al.* Development of a step-wise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(5): 1649-1656.
- [4] Ganuza E, Benítez-Santana T, Atalah E, *et al.* *Cryptocodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets[J]. *Aquaculture*, 2008, 277(1-2): 109-116.
- [5] 潘瑜, 陈效儒, 马霞, 等. 裂殖壶菌替代鱼油对海鲈生长和抗氧化能力的影响[J]. 饲料工业, 2016, 37(4): 24-27.
Pan Y, Chen X R, Ma X, *et al.* Effects of replacement of fish oil by *Schizochytrium* on growth performance and antioxidant ability in blood serum of sea bass[J]. *Feed Industry*, 2016, 37(4): 24-27(in Chinese).
- [6] Zuo R T, Ai Q H, Mai K S, *et al.* Effects of dietary docosahexaenoic to eicosapentaenoic acid ratio (DHA/EPA) on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*)[J]. *Aquaculture*, 2012, 334-337: 101-109.
- [7] Izquierdo M S, Arakawa T, Takeuchi T, *et al.* Effect of n-3 HUFA levels in *Artemia* on growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Aquaculture*, 1992, 105(1): 73-82.
- [8] Yadav A K, Rossi Jr W, Habte-Tsion H M, *et al.* Impacts of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) level and ratio on the growth, fatty acids composition and hepatic-antioxidant status of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Aquaculture*, 2020, 529: 735683.
- [9] 朱长生. EPA、DHA 对黄鳝生长、繁殖性能及 FAD、FAE 基因表达的影响 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2012.
Zhu C S. The effects of EPA and DHA on the growth, reproductive performance and FAD, FAE MRANs expression in rice field eel (*Monopterus albus*)[D]. Jiangxi Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [10] Jin M, Monroig Ó, Lu Y, *et al.* Dietary dha/epa ratio affected tissue fatty acid profiles, antioxidant capacity, hematological characteristics and expression of lipid-related genes but not growth in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*)[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0176216.
- [11] Bou M, Berge G M, Baevefjord G, *et al.* Requirements of n-3 very long-chain PUFA in Atlantic salmon (*Salmo* 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- salar* L): Effects of different dietary levels of EPA and DHA on fish performance and tissue composition and integrity[J]. *British Journal of Nutrition*, 2017, 117(1): 30-47.
- [12] Sargent J, Bell G, Mcevoy L, *et al.* Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish[J]. *Aquaculture*, 1999, 177(1-4): 191-199.
- [13] 吉红, 李杰, 程小飞, 等. 饲料DHA/EPA比率对草鱼稚鱼生长、脂质蓄积及抗氧化系统的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(8): 56-62.
Ji H, Li J, Cheng X F, *et al.* Dietary effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on growth, lipid accumulation and antioxidation system in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Journal of Northwest A& F University (Natural Science Edition)*, 2011, 39(8): 56-62(in Chinese).
- [14] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
The China Society of Fisheries, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. *China Fishery Statistical Yearbook*[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020 (in Chinese).
- [15] 杜震宇. 养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1628-1638.
Du Z Y. Causes of fatty liver in farmed fish: a review and new perspectives[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1628-1638.
- [16] Takeuchi T, Watanabe K, Yong W Y. Essential fatty acids of grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991, 57(3): 467-473.
- [17] 曹俊明, 田丽霞, 陈竹, 等. 饲料中不同脂肪酸对草鱼生长和组织营养成分组成的影响[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 1996, 24(S1): 149-154.
Cao J M, Tian L X, Chen Z, *et al.* Effect of dietary fatty acids on growth and tissue chemical composition of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science)*, 1996, 24(S1): 149-154(in Chinese).
- [18] 吉红, 曹艳姿, 刘品, 等. 饲料中HUFA影响草鱼脂质代谢的研究[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(5): 881-889.
Ji H, Cao Y Z, Liu P, *et al.* Effect of dietary HUFA on the lipid metabolism in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(5): 881-889(in Chinese).
- [19] Ji H, Li J, Liu P, *et al.* Regulation of growth performance and lipid metabolism by dietary n-3 highly unsaturated fatty acids in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 159(1): 49-56.
- [20] Xing J X, Xiao F F, Luo X L, *et al.* Effect of dietary *Schizochytrium* sp. oil as an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid source on growth performance, lipid metabolism and antioxidant status in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): A comparative study with fish oil[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(11): 4551-4564.
- [21] AOAC. Official Methods of Analysis 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists[M]. Washington DC: AOAC, 1995.
- [22] Folch J, Lees M, Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226(1): 497-509.
- [23] Tian J J, Ji H, Oku H, *et al.* Effects of dietary arachidonic acid (ARA) on lipid metabolism and health status of juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Aquaculture*, 2014, 430: 57-65.
- [24] Ulbricht T L V, Southgate D A T. Coronary heart disease: seven dietary factors[J]. *The Lancet*, 1991, 338(8773): 985-992.
- [25] Santos-Silva J, Bessa R J B, Santos-Silva F. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs: II. fatty acid composition of meat[J]. *Livestock Production Science*, 2002, 77(2-3): 187-194.
- [26] Liu P, Ji H, Li C, *et al.* Ontogenetic development of adipose tissue in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(4): 867-878.
- [27] Osman O S, Selway J L, Kępczyńska M A, *et al.* A novel automated image analysis method for accurate adipocyte quantification[J]. *Adipocyte*, 2013, 2(3): 160-164.
- [28] Shi X C, Jin A, Sun J, *et al.* α -lipoic acid ameliorates n-3

- highly-unsaturated fatty acids induced lipid peroxidation via regulating antioxidant defenses in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 359-367.
- [29] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [30] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45.
- [31] 张燕, 乔洪金, 李宝山, 等. 微藻粉替代鱼油对星斑川鲷幼鱼生长、体组成和生理指标的影响[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1223-1233.
- Zhang Y, Qiao H J, Li B S, *et al.* Effects of replacing fish oil with microalgae meals on growth performance, tissue proximate composition, and biochemical indices in juvenile starry flounder, *Platichthys stellatus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(6): 1223-1233(in Chinese).
- [32] 吕小义, 尹佳, 付杰, 等. 裂壶藻营养特性及其积累DHA的研究[J]. *食品工业*, 2016, 37(1): 222-225.
- Lü X Y, Yin J, Fu J, *et al.* Study on nutrient characteristics of *Schizochytrium* and accumulation of DHA[J]. *The Food Industry*, 2016, 37(1): 222-225(in Chinese).
- [33] Ma J J, Wang J Y, Zhang D R, *et al.* Estimation of optimum docosahexaenoic to eicosapentaenoic acid ratio (DHA/EPA) for juvenile starry flounder, *Platichthys stellatus*[J]. *Aquaculture*, 2014, 433: 105-114.
- [34] Trushenski J, Schwarz M, Bergman A, *et al.* DHA is essential, EPA appears largely expendable, in meeting the n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid requirements of juvenile cobia *Rachycentron canadum*[J]. *Aquaculture*, 2012, 326-329: 81-89.
- [35] Copeman L A, Parrish C C, Brown J A, *et al.* Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment[J]. *Aquaculture*, 2002, 210(1-4): 285-304.
- [36] Gapasin R S J, Duray M N. Effects of DHA-enriched live food on growth, survival and incidence of opercular deformities in milkfish (*Chanos chanos*)[J]. *Aquaculture*, 2001, 193(1-2): 49-63.
- [37] Lee S M. Review of the lipid and essential fatty acid requirements of rockfish (*Sebastes schlegelii*)[J]. *Aquaculture Research*, 2001, 32(S1): 8-17.
- [38] 吴康, 黄晓声, 金洁南, 等. 饲喂蚕豆对草鱼抗氧化能力及免疫机能的影响[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(2): 250-258.
- Wu K, Huang X S, Jin J N, *et al.* Effects of feeding with faba bean (*Vicia faba*) on the antioxidant capability and immune functions of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(2): 250-258(in Chinese).
- [39] Sarker P K, Gamble M M, Kelson S, *et al.* Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2016, 22(1): 109-119.
- [40] Sargent J, Mcevoy L, Estevez A, *et al.* Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions[J]. *Aquaculture*, 1999, 179(1-4): 217-229.
- [41] 梁旭方. 日本鳗鲡人工育苗及仔鱼饲料研究[J]. *水产科学*, 2005, 24(4): 24-26.
- Liang X F. The artificial propagation and larva rearing in Japanese eel (*Anguilla japonica*)[J]. *Fisheries Science*, 2005, 24(4): 24-26(in Chinese).
- [42] Tocher D R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(5): 717-732.
- [43] 杜嵇华, 梁旭方, 程佳齐, 等. 草鱼脂肪酸去饱和酶和延长酶基因cDNA全序列的克隆与分析[J]. *暨南大学学报(自然科学版)*, 2011, 32(5): 513-520.
- Du J H, Liang X F, Cheng J Q, *et al.* Molecular cloning and analyzing of fatty acid desaturase and elongase genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Journal of Jinan University (Natural Science)*, 2011, 32(5): 513-520(in Chinese).
- [44] Du Z Y, Clouet P, Huang L M, *et al.* Utilization of different dietary lipid sources at high level in herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): mechanism related to hepatic fatty acid oxidation[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2008, 14(1): 77-92.
- [45] Beamish F W H, Medland T E. Protein sparing effects in large rainbow trout, *Salmo gairdneri*[J]. *Aquaculture*, 1986, 55(1): 35-42.

- [46] Zheng X Z, Tocher D R, Dickson C A, *et al.* Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Aquaculture*, 2004, 236(1-4): 467-483.
- [47] Tocher D R, Bell J G, Dick J R, *et al.* Effects of dietary vegetable oil on Atlantic salmon hepatocyte fatty acid desaturation and liver fatty acid compositions[J]. *Lipids*, 2003, 38(7): 723-732.
- [48] Thomassen M S, Rein D, Berge G M, *et al.* High dietary EPA does not inhibit $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed rapeseed oil diets[J]. *Aquaculture*, 2012, 360-361: 78-85.
- [49] Betancor M B, Sprague M, Sayanova O, *et al.* Evaluation of a high-EPA oil from transgenic *Camelina sativa* in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effects on tissue fatty acid composition, histology and gene expression[J]. *Aquaculture*, 2015, 444: 1-12.
- [50] Bell M V, Dick J R. Distribution of 22 : 6n-3 newly synthesized from 18 : 3n-3 into glycerolipid classes from tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Lipids*, 2005, 40(7): 703-708.
- [51] Tocher D R, Fonseca-Madrigal J, Bell J G, *et al.* Effects of diets containing linseed oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 26(2): 157-170.
- [52] Sarker P K, Kapuscinski A R, Lanois A J, *et al.* Towards sustainable aquafeeds: Complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0156684.
- [53] Karapanagiotidis I T, Bell M V, Little D C, *et al.* Replacement of dietary fish oils by alpha-linolenic acid-rich oils lowers omega 3 content in tilapia flesh[J]. *Lipids*, 2007, 42(6): 547-559.
- [54] Lei C X, Ji H, Zhang J L, *et al.* Effects of dietary DHA/EPA ratios on fatty acid composition, lipid metabolism-related enzyme activity, and gene expression of juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2016, 47(2): 287-296.
- [55] Baggio S R, Bragagnolo N. Cholesterol oxide, cholesterol, total lipid and fatty acid contents in processed meat products during storage[J]. *Lwt - Food Science and Technology*, 2006, 39(5): 513-520.
- [56] 王丽宏, 吉红, 胡家, 等. 匙吻鲟、杂交鲟和鳙肌肉品质的比较研究[J]. *食品科学*, 2014, 35(1): 62-68.
Wang L H, Ji H, Hu J, *et al.* Comparative study on muscle quality of cultured *Polyodon spahula*, hybrid sturgeon and *Aristichthys nobilis*[J]. *Food Science*, 2014, 35(1): 62-68(in Chinese).
- [57] Klobukowski J, Skibniewska K A, Janowicz K, *et al.* Selected parameters of nutritional and pro-health value in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) muscle tissue[J]. *Journal of Food Quality*, 2018, 2018: 6082164.
- [58] 张凤枰, 宋军, 张瑞, 等. 养殖南方大口鲶肌肉营养成分分析和品质评价[J]. *食品科学*, 2012, 33(17): 274-278.
Zhang F P, Song J, Zhang R, *et al.* Evaluation of nutritional composition and quality of farmed *Silurus meridionalis* Chen muscle[J]. *Food Science*, 2012, 33(17): 274-278(in Chinese).
- [59] 雷彩霞. EPA 及其前体 ALA 对草鱼脂肪蓄积的调控作用及机制分析 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2017.
Lei C X. Effects and mechanism of EPA and its precursor ALA on lipid accumulation of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2017 (in Chinese).
- [60] Lass A, Zimmermann R, Oberer M, *et al.* Lipolysis - A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores[J]. *Progress in Lipid Research*, 2011, 50(1): 14-27.
- [61] Om A D, Ji H, Umino T, *et al.* Dietary effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on lipid metabolism in black sea bream[J]. *Fisheries Science*, 2003, 69(6): 1182-1193.

Effects of *Schizochytrium* sp. oil combined with exogenous EPA on fatty acid composition, FAD and ELO gene expression and lipid metabolism of juvenile *Ctenopharyngodon idella*

XING Junxia, JI Hong*, LI Handong, XIAO Fenfen, YUAN Xiangtong

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) dietary *Schizochytrium* sp. stearin oil may show better growth performance than dietary fish oil by saving energy required for de novo synthesis of DHA, promoting lipolysis energy supply and inhibiting protein catabolism. The purpose of this study was to investigate whether DHA-rich *Schizochytrium* sp. stearin oil needs to be compatible with EPA and its possible mechanism. Equipped with five groups of iso-nitrogen and isoenergetic diets and fed grass carp (22.70 g±0.80 g) for 49 d. The 0.52% n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid (LC PUFA) of the diets were provided with fish oil (F-O); Sc stearin oil (S-O); stearin oil (DHA) : EPA = 3 : 2 (SE1-O); stearin oil (DHA) : EPA = 1 : 1 (SE2-O); EPA (E-O), respectively. The results showed: 1) There was no difference in the weight gain rate (WG), specific growth rate (SGR) and feed conversion ratio (FCR) among all the groups; 2) The content of crude protein in muscle of S-O group was significantly higher than those of E-O group; 3) the content of DHA in muscle of S-O group was significantly higher than that of F-O group, SE1-O group and E-O group; 4) there was no significant difference in atherogenicity index among the groups, the thrombogenicity index of SE2-O group was significantly higher than that of F-O group, the hypocholesterolemic/ Hypercholesterolemic ratio in S-O group and SE2-O group was markedly lower than those in F-O group; 5) the adipose size of intraperitoneal fat in E-O group was notably higher than those in F-O group and SE1-O group, the adipose TAG lipase(ATGL)and carnitine palmitoyltransferase 1(CPT1) mRNA levels in E-O group were apparently down-regulated; in muscle, the fatty acid desaturase (FAD)mRNA level was markedly higher in E-O group than that in S-O group, the fatty acid elongase(ELO)mRNA level was obviously down-regulated in S-O group. Studies have shown that the use of Sc oil alone or in combination with EPA had no significant effect on growth, n-3LC PUFA content and lipid hydrolysis of adipose tissue of grass carp. When EPA was the sole source of n-3LC PUFA, the lipid hydrolysis of adipose tissue was reduced and the content of crude protein in muscle was reduced. High level of DHA in the diet would weaken the body's ability to synthesize LC PUFA. Compared to EPA, grass carp may need DHA more, and the Sc oil could be used alone in the feed of grass carp without combination with EPA.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *Schizochytrium* sp.; EPA; long-chain polyunsaturated fatty acids

Corresponding author: JI Hong. E-mail: jihong@nwsuaf.edu.cn

Funding project: Blue Granary Technology Innovation Project (2019YFD0900200).