

文章编号: 1000-0615(2019)04-1104-12

DOI: 10.11964/jfc.20180411243

## 饲料中添加大豆皂甙对大菱鲆幼鱼生长和肠道健康的影响

余桂娟<sup>1</sup>, 杨沛<sup>1</sup>, 戴济鸿<sup>1</sup>, 欧伟豪<sup>1</sup>, 陈枳初<sup>1</sup>,  
艾庆辉<sup>1</sup>, 张文兵<sup>1</sup>, 张彦娇<sup>1,2\*</sup>, 麦康森<sup>1,2</sup>

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室,  
农业农村部水产动物营养与饲料重点实验室, 山东青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 山东青岛 266235)

**摘要:** 为研究大豆皂甙对大菱鲆幼鱼生长性能、消化酶活性、肠道组织结构完整性和肠道菌群结构的影响, 在以鱼粉为蛋白源的基础饲料中分别添加0%和0.3%的大豆皂甙, 配制成鱼粉组和大豆皂甙组2种等氮等脂的实验饲料来投喂体质量为(4.63±0.01)g的大菱鲆进行12周的摄食生长实验。结果显示, 饲料中添加0.3%的大豆皂甙对大菱鲆的生长性能没有产生显著影响, 但显著降低了胃蛋白酶及肠淀粉酶活性; 2组实验中大菱鲆肠道组织形态无明显差异, 但大豆皂甙组肠道紧密连接蛋白的基因表达量显著降低。肠道菌群分析结果显示, 大菱鲆肠道中相对丰度最高的门和属分别为变形菌门和盐单胞菌属。LEfSe和MetaStat分析显示, 饲料中添加大豆皂甙后显著提高了大菱鲆肠道内优势菌(变形菌门及希瓦氏菌属), 皂甙水解相关的肠道微生物(鞘脂单胞菌属、普氏菌属、栖瘤胃普雷沃菌以及普通拟杆菌)及潜在致病菌(莫氏杆菌属和发光杆菌属)的相对丰度, 同时显著降低了*Caenimonas*、*Niastella*和条件致病菌罗尔斯通菌属的相对丰度。研究表明, 0.3%大豆皂甙抑制了大菱鲆消化酶活性及肠道紧密连接蛋白的基因表达, 且引起了大菱鲆肠道菌群结构的显著改变。因此, 大豆皂甙对鱼类肠道健康尤其是肠道菌群的影响不容忽视, 值得进一步研究。

**关键词:** 大菱鲆; 大豆皂甙; 生长; 消化酶; 肠道组织结构; 肠道菌群

**中图分类号:** S 963.73

**文献标志码:** A

豆粕作为一种理想的植物蛋白源已经被广泛应用于水产饲料行业。然而, 由于豆粕替代鱼粉超过一定剂量后对肉食性鱼类的生长及部分生理功能起到抑制作用, 尤其是会诱发肠炎<sup>[1]</sup>, 因此, 豆粕在肉食性鱼类饲料中的应用受到限制。而影响鱼类对豆粕利用的一个重要原因是豆粕中含有多种抗营养因子<sup>[2]</sup>。大豆皂甙是一种热稳定的抗营养因子, 在豆粕中的含量为0.43%~0.67%<sup>[3]</sup>。饲料中添加大豆皂甙会抑制鱼类生长, 并造成肠道损伤, 且已在多种鱼类中得到证实<sup>[4-5]</sup>, 然而大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)上相关研究还

未涉及。此外, 研究表明大豆皂甙是引发鲑鳟鱼类豆粕诱发性肠炎的重要因素之一; 其主要通过影响大西洋鲑(*Salmo salar*)后肠紧密连接蛋白的表达来破坏肠道黏膜屏障, 改变肠道上皮细胞通透性, 从而引发肠道炎症反应<sup>[6]</sup>。肠道上皮细胞间的紧密连接结构在维持肠道结构完整性上起至关重要的作用。医学研究中认为紧密连接结构完整性的破坏是引起炎症性肠道疾病的主要原因<sup>[7]</sup>。肠道紧密连接结构由一系列紧密连接蛋白包括跨膜蛋白Occludin、Tricellulin、Claudin家族、JAM黏附连接分子和Zonula occludens

收稿日期: 2018-04-11 修回日期: 2018-05-23

资助项目: 国家自然科学基金(41576137); 农业产业技术体系专项(CARS-47-G10)

通信作者: 张彦娇, E-mail: yanjiaozhang@ouc.edu.cn

(ZOs)等组成, 它们在维持肠道上皮细胞旁转运, 控制肠道通透性方面发挥重要作用<sup>[8]</sup>。

肠道菌群稳态是肠道健康的重要组成部分。健康状况下, 肠道菌群在宿主的生物学过程发挥一系列的促进作用, 如帮助消化、促进黏膜系统的发育及作为一种保护屏障抵御疾病等<sup>[9]</sup>。肠道菌群可以产生一系列消化酶, 如淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶和蛋白酶, 在代谢外源性物质方面发挥重要作用。肠道菌群失调与机体各种疾病如炎症肠炎(IBD)、代谢疾病、I型糖尿病、过敏症、哮喘及神经病学和心血管疾病等的发生密切相关<sup>[10]</sup>。食物和养殖环境可以显著影响鱼类肠道菌群组成。鱼类肠道菌群在饲喂豆粕后发生了显著变化, 研究表明, 其在豆粕诱发的肠道炎症中扮演重要角色<sup>[11]</sup>。豆粕中的抗营养因子如大豆球蛋白<sup>[12]</sup>和水苏糖<sup>[13]</sup>等可以显著改变大菱鲆肠道部分菌群的相对丰度, 但关于大豆皂甙对水产动物肠道菌群影响的研究却鲜有涉及。

大菱鲆是典型的肉食性鱼类, 具有生长快、肉质鲜美和经济价值高等优点, 是我国重要的海水养殖鱼类。研究表明, 饲料中添加45%及以上豆粕能够引起大菱鲆幼鱼肠道组织损伤并降低生长<sup>[14]</sup>; 在此背景下, 本研究通过在饲料中添加一定剂量的大豆皂甙, 研究其对大菱鲆生长、消化酶活性、肠道组织形态、肠道紧密连接蛋白基因表达以及肠道菌群结构的影响, 以探究大豆皂甙的营养抗性, 为植物蛋白在肉食性鱼类中的应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 饲料原料与配方

以鱼粉为主要蛋白源, 鱼油和大豆卵磷脂为主要脂肪源, 配制成44%粗蛋白和8%粗脂肪的2种等氮等脂的基础饲料。在基础饲料中添加0和0.3%的大豆皂甙(华北制药集团有限责任公司, 纯度为85%)(表1), 分别命名为FM和SA 0.3。

配制饲料前, 饲料原料经粉碎机粉碎后过80目筛, 混合均匀后加入鱼油和大豆卵磷脂(先溶解大豆卵磷脂于鱼油中), 手工将油脂颗粒搓散, 再于混合机中混合均匀, 最后加入约30%蒸馏水形成硬团, 于F(II)-26螺杆压机(华南理工大学, 广州)中制成3.0 mm的颗粒状饲料, 在50 °C烘箱中干燥8 h, 置于-20 °C冰箱保存备用。

表1 实验饲料配方和主要营养成分(干重)

原料 ingredients	FM	SA 0.3	%
鱼粉 fish meal <sup>1</sup>	67.00	67.00	
$\alpha$ -淀粉 $\alpha$ -starch <sup>1</sup>	16.00	16.00	
鲱鱼油 herring oil <sup>1</sup>	3.50	3.50	
大豆卵磷脂 soybean lecithin	0.50	0.50	
氯化胆碱 choline chloride	0.30	0.30	
维生素预混物 vitamin premix <sup>2</sup>	1.00	1.00	
矿物质预混物 mineral premix <sup>3</sup>	0.50	0.50	
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.50	0.50	
Vc磷酸酯 Vc phosphate	0.10	0.10	
三氧化二钇 yttrium oxide	0.10	0.10	
大豆皂甙 soyasaponins <sup>4</sup>	0	0.30	
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	10.50	10.20	
<b>饲料成分分析(干重)</b> <b>nutrient composition (dry matter)</b>			
粗蛋白 crude protein	43.78	44.27	
粗脂肪 crude lipid	8.49	8.31	
灰分 ash	17.34	16.95	

注: 1. 鱼粉、 $\alpha$ -淀粉和鲱鱼油均购于青岛七好营养科技有限公司, 其中鱼粉中粗蛋白74%, 粗脂肪9.7%; 2. 维生素混合物(mg/kg diet)中维生素B<sub>1</sub> 25 mg, 核黄素45 mg, 维生素B<sub>6</sub>(盐酸吡哆醇) 20 mg, 维生素B<sub>12</sub> 10 mg, 维生素K<sub>3</sub> 10 mg, 肌醇800 mg, 维生素B<sub>3</sub>(泛酸) 60 mg, 烟酸200 mg, 叶酸20 mg, 生物素(2%) 60 mg, 维生素A 32 mg, 维生素D<sub>3</sub> 5 mg, 维生素E 240 mg, 乙氧基喹林 3 mg, 维生素C 2 000 mg, 微晶纤维素6 470 mg; 3. 矿物质预混料(mg/kg diet)中MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 200 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 10 mg, FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 80 mg, ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 50 mg, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 45 mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1%) 50 mg, Ca(IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(1%) 60 mg, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>(1%) 20 mg, 沸石粉3 485 mg; 4. 大豆皂甙中的大豆皂甙(85%)、大豆蛋白(8.23%)、大豆低聚糖(4.75%)、水分(1.21%)以及矿物质和异黄酮(0.81%)

Notes: 1. fish meal,  $\alpha$ -starch and herring oil purchased from Qingdao Great Seven CO., LTD., (Qingdao, China), fish meal containing crude protein 74%, crude lipid 9.7%; 2. vitamin premix (mg/kg diet), VB<sub>1</sub>, 25 mg, VB<sub>2</sub> 45 mg, VB<sub>6</sub> 20 mg, VB<sub>12</sub> 10 mg, VK<sub>3</sub>, 10 mg, inositol, 800 mg, VB<sub>3</sub> 60 mg, nicotinic acid 200 mg, folic acid 20 mg, biotin 60 mg, VA 32 mg, VD<sub>3</sub> 5 mg, VE 240 mg, ethoxyquinoline 3 mg, VC phosphate 2 000 mg, microcrystalline cellulose 6 470 mg; 3. mineral premix (mg/kg diet), MgSO<sub>4</sub> 1 200 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 10 mg, FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 80 mg, ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 50 mg, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 45 mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1%) 50 mg, Ca(IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (1%)60 mg, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (1%) 20 mg, zeolite powder 3 485 mg; 4. soyasaponins containing 85% soybean saponins, 8.23% soybean proteins, 4.75% soybean oligosaccharidese, 1.21% moistur, 0.81% minerals and isoflavones); FM. basic feed, SA 0.3. 0.3% soyasaponins feed; the same below

## 1.2 饲养管理及样品采集

实验用大菱鲆幼鱼为当年人工培育的同一批苗种, 购于山东莱州大菱鲆养殖场, 实验在室内循环养殖系统中进行。实验前, 幼鱼用商业饲料(青岛七好营养科技有限公司)暂养2周以适应养殖环境。正式养殖实验开始前, 将实验鱼禁食24 h后, 选择大小均匀、体格健壮的幼鱼[初始平均体质量(4.63±0.01) g], 随机分配于6个养殖桶中(200 L/桶, 每桶30尾, 2个实验处理组, 每组3个重复), 每天表观饱食投喂2次(8:00, 18:30), 投喂结束后30 min吸出残饵和粪便, 养殖周期12周。养殖期间水温15~19 °C, 盐度24~26, 溶解氧保持大于7 mg/L。

养殖结束后, 禁食24 h取样。每桶随机取4尾鱼, 保存于-20 °C, 用于体组成分析。每桶随机取4尾鱼, 取后肠去除内容物, 用生理盐水洗净, 放入波恩氏液中固定24 h后, 转移至70%酒精中长期保持, 用于组织学分析。每桶随机取3尾鱼, 测量其体质量、体长、内脏团质量及肝脏质量, 用以计算肥满度、脏体比和肝体比; 取后肠液氮速冻, 随后保存在-80 °C超低温冰箱用于分析基因表达; 每桶随机取5尾鱼, 解剖出胃和肠道, 液氮速冻, 随后保存在-80 °C超低温冰箱中, 用于消化酶活性分析。为研究肠道菌群, 每桶随机取3尾鱼, 用70%酒精的棉球擦拭鱼体表面, 在酒精灯周围用无菌解剖工具解剖鱼体, 取出后肠(去除幽门盲囊和盲肠)转移到2 mL无菌离心管中, 液氮速冻, 保存于-80 °C超低温冰箱中。

## 1.3 鱼体组成和饲料组成分析

采用AOAC法<sup>[15]</sup>分析鱼体和饲料常规组成。水分含量测定采用105 °C烘干恒重法(24 h); 粗蛋白的测定为凯氏定氮法, 采用2300型蛋白质自动分析仪(FOSS, 丹麦)分析; 粗脂肪的测定采用36680型粗脂肪抽提仪(BUCHI公司, 瑞士), 用索氏抽提法分析粗脂肪含量; 灰分测定采用箱式电阻炉550 °C灼烧法(16 h)。

## 1.4 消化酶活性分析

胃蛋白酶活性分析参考Anson<sup>[16]</sup>的方法, 并做部分改进。使用牛血红蛋白(Sigma公司, 美国)作为反应底物, 用福林试剂(AppliChem公司, 德国)测定反应产物。

肠淀粉酶和胃淀粉酶活性测定参考Hidalgo等<sup>[17]</sup>报道的淀粉酶活性测定方法, 并在其基础上做部分改进。使用淀粉(Sigma公司, 美国)作为实验反应底物。

## 1.5 组织学分析

按照组织切片的常规步骤制作组织切片, 组织切片机切片, 厚度为5 μm; H.E染色法染色, 中性树胶封片。用Nikon eclipse Ti-S型号显微镜(Nikon, 日本)观察肠道组织学结构并拍照记录。

## 1.6 实时荧光定量PCR (qRT-PCR)

肠道总RNA提取参照Trizol试剂盒说明书(TaKaRa, 日本)。使用Nano-Drop<sup>®</sup>ND-1000 spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, 美国)测定提取的RNA浓度, 用1.2%琼脂糖凝胶检测RNA质量。提取的总RNA用Prime Script<sup>™</sup>反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)将上述提取到的RNA样品反转成cDNA。用DEPC水进行8倍稀释后置于-20 °C保存备用。

登录NCBI数据库, 搜索大菱鲆*Claudin-7*、*Claudin-4*、*Tricellulin*、*Occludin*及内参基因*β-actin*, 按照定量引物的设计原则使用Primer Premier 5软件设计特异性引物(表2), 并于生工生物工程(上海)股份有限公司合成。qRT-PCR实验使用实时定量PCR仪(Eppendorf, Germany)进行, 实验体系为2×SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (TaKaRa, 日本)12.5 μL, cDNA (100 ng/μL)1 μL, dH<sub>2</sub>O 10.5 μL, 引物F(10 μmol/L) 0.5 μL; 引物R (10 μmol/L) 0.5 μL。基本反应程序为95 °C预变性2 min; 95 °C变性10 s, 58 °C退火10 s, 72 °C延伸20 s, 35个循环。使用2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup>方法计算目的基因的相对表达量。

## 1.7 肠道微生物DNA的提取、扩增和测序

肠道微生物DNA提取步骤参照QIAamp DNA Stool Mini Kit说明书(Qiagen, 德国)。提取DNA的质量和浓度分别通过1.2%的琼脂糖凝胶电泳和NanoDrop ND-2000超微量分光光度计进行检测(Thermo Scientific), 检测合格后使用带Barcode的引物(515F和806R), 采用Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs, 英国)对16S *rRNA*基因V4区进行扩增: 98 °C预变性1 min; 98 °C变性10 s, 50 °C退火30 s, 72 °C延伸60 s, 30个循环; 72 °C终延伸5 min; 4 °C保存。PCR产物使用2%浓度的琼脂糖凝胶电泳进行检测,



表2 qRT-PCR简并引物

Tab. 2 Primers used for qRT-PCR analysis

基因 genes	引物序列(5'-3') sequences of primers (5'-3')	退火温度/°C annealing temperature	登录号 accession no.
<i>Claudin-7</i>	F: CTCCATCCTGCAGCTCAACA R: GGTGCACITTCATCCCATGC	58	MF370858
<i>Claudin-4</i>	F: ATGTGGAGTGTGTCGGCTT R: AGACCTTGCACTGCATCTG	58	MF370857
<i>Tricellulin</i>	F: GCCTACATCCACAAAGACAACG R: TCATTCCAGCACTAATACAATCAC	58	KU238183.1
<i>Occludin</i>	F: ACTGGCATTCTTCATCGC R: GGTACAGATTCTGGCACATC	58	KU238182.1
<i>β-actin</i>	F: CGTGCGTGACATCAAGGAG R: AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	58	AY008305.1

目的条带使用Qiagen公司提供的胶回收试剂盒回收产物(Qiagen, 德国)。使用TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit建库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经过Qubit和qRT-PCR定量, 合格后于天津诺禾致源生物信息科技有限公司使用HiSeq2500 PE250进行上机测序。

### 1.8 肠道菌群数据分析

使用QIIME pipeline (v.1.7.0), 根据样品均一化处理数据, 分析菌群Alpha多样性(Chao1 index、ACE、Shannon index和Simpson index)和Beta多样性(PCA和PCoA), 并使用R软件(v.2.15.3)绘制稀释曲线, 使用*t*检验方法分析Alpha多样性指数组间差异。使用LEfSe软件分析(默认设置LDA Score的筛选值为4)获得不同处理组之间相对丰度具有统计学差异的Bionarker物种。Metastats分析使用R软件(v.2.15.3), 检测组间的permutation test, 得到不同分类水平的物种在不同处理组之间相对丰度的差异性统计结果。

### 1.9 数据计算与统计

存活率(survival rate, *SR*, %)=实验结束时鱼尾数/实验开始鱼尾数×100%

增重率(weight gain rate, *WGR*, %)=(鱼体终末体质量-鱼体初始体质量)/鱼体初始体质量×100%

特定生长率(specific growth rate, *SGR*, %/d)=(ln鱼体终末体质量-ln鱼体初始体质量)/饲养天数×100%

摄食率(feed intake, *FI*, %/d)=平均摄食饲料量/[(鱼体初始体质量+鱼体终末体质量)/2]/饲养天数×100%

饲料效率(feed efficiency, *FE*, %)=鱼体增重/平均摄食饲料量×100%

肥满度(condition factor, *CF*, g/cm<sup>3</sup>)=平均体质量/平均体长<sup>3</sup>

量/平均体长<sup>3</sup>

肝体比(hepatosomatic index, *HSI*, %)=肝脏质量/鱼体质量×100%

脏体比(viscerasomatic index, *VSI*, %)=内脏质量/鱼体质量×100%

实验所得数据采用SPSS 22.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), *P*<0.05表示差异显著; 统计结果以平均值±标准误(mean±SE)的形式表示。

## 2 结果

### 2.1 饲料中添加0.3%大豆皂甙对大菱鲆生长性能的影响

饲料中添加0.3%的大豆皂甙对大菱鲆幼鱼的各项生长指标均无显著性影响(表3)。

### 2.2 饲料中添加0.3%大豆皂甙对大菱鲆体成分的影响

饲料中添加0.3%大豆皂甙显著增加了鱼体粗脂肪含量(*P*<0.05), 降低了鱼体灰分含量(*P*<0.05), 而对鱼体的水分及粗蛋白含量无显著影响(表4)。

### 2.3 饲料中添加0.3%大豆皂甙对大菱鲆消化酶活性的影响

饲料中添加0.3%的大豆皂甙显著抑制了大菱鲆幼鱼的胃蛋白酶和肠淀粉酶活性(*P*<0.05), 而对胃淀粉酶活性无显著影响(表5)。

### 2.4 饲料中添加0.3%大豆皂甙对大菱鲆肠道组织形态的影响

与鱼粉组相比, 饲料中添加0.3%大豆皂甙并没有影响大菱鲆后肠组织结构完整性。肠道上皮细胞核均位于细胞基部且排列整齐, 杯状细胞数量无明显变化; 固有层均未出现增宽、炎性细胞浸润现象(图1)。

表3 饲料中添加0.3%的大豆皂甙对大菱鲆幼鱼生长性能的影响

Tab. 3 Effects of dietary 0.3% soyasaponins on the growth performance of juvenile *S. maximus*

生长指标 growth indicators	FM	SA 0.3
初始体质量/g initial weight	4.60±0.06	4.63±0.02
终末体质量/g final weight	23.57±2.42	26.29±1.14
存活率/% survival rate	100±0	100±0
增重率/% weight gain rate	4.08±0.68	4.68±0.27
特定生长率/(%/d) specific growth rate	1.92±0.17	2.07±0.06
饲料效率/% feed efficiency	1.11±0.09	1.19±0.06
摄食率/(%/d) feed intake	1.19±0.06	1.40±0.05
肥满度/(g/cm <sup>3</sup> ) condition factor	1.81±0.28	1.98±0.14
肝体比/% hepatosomatic index	0.85±0.25	0.98±0.23
脏体比/% viscerasomatic index	4.45±0.38	4.61±0.53

表4 饲料中添加0.3%的大豆皂甙对大菱鲆幼鱼体成分的影响

Tab. 4 Effects of dietary 0.3% soyasaponins on whole body composition of juvenile *S. maximus*

体成分/% body composition	FM	SA 0.3
水分/% moisture	76.10±0.23	76.00±0.26
粗蛋白/% crude protein	15.86±0.19	15.84±0.30
粗脂肪/% crude lipid	4.45±0.14	4.67±0.20*
灰分/% ash	3.78±0.17	3.49±0.14*

注：“\*”表示有显著性差异( $P<0.05$ )；下同

Notes: “\*” means significant difference ( $P<0.05$ ); the same below

## 2.5 饲料中添加0.3%大豆皂甙对大菱鲆幼鱼肠道紧密连接蛋白相关基因表达的影响

饲料中添加0.3%的大豆皂甙对大菱鲆幼鱼肠道紧密连接蛋白 *Claudin-7*、*Claudin-4*、*Tricellulin* 的基因表达量均无显著性影响，但显著降低了 *Occudin* 的基因表达量 ( $P<0.05$ ) (图2)。

## 2.6 饲料中添加0.3%大豆皂甙对肠道菌群的影响

经过拼接、过滤和裁剪，2处理组共获得320 995条 clean reads，平均每个样品53 499条。将上述序列与Green Gene数据库比对，6个样品共

表5 饲料中添加0.3%的大豆皂甙对大菱鲆幼鱼消化酶活性的影响

Tab. 5 Effects of dietary 0.3% soyasaponins on digestive enzyme activities of

消化酶活性 digestive enzyme activity	FM	SA 0.3
胃蛋白酶 pepsin	49.76±2.86	28.55±3.38*
胃淀粉酶 stomach amylase	0.36±0.15	0.41±0.26
肠淀粉酶 intestinal amylase	0.27±0.02	0.08±0.02*

产生9 852个OTUs，其中FM组共产生5 394个OTUs，SA 0.3组共产生4 458个OTUs。

本实验中，大菱鲆肠道微生物在门水平上的主要类群为变形菌门(Proteobacteria)，厚壁菌门(Firmicute)和放线菌门(Actionobacteria)；属水平上，盐单胞菌属(*Halomonas*)和希瓦氏菌属(*Shewanella*)为丰度最高的属(图3)。饲料中添加0.3%大豆皂甙对大菱鲆肠道菌群 $\alpha$ -多样性无显著影响(表6)。PCA (principal component analysis)分析显示SA 0.3组肠道菌群出现了明显的食物聚类(图4)。

LEfSe分析显示，饲料中添加0.3%大豆皂甙影响了大菱鲆肠道菌群不同分类学水平上物种的相对丰度；变形菌门，杆菌纲(Bacilli)，芽胞杆菌目(Bacillales)，芽胞杆菌科(Bacillaceae)的相对丰度在SA 0.3组中显著增加( $P<0.05$ ) (图5)。

MetaStat分析显示，饲料中添加0.3%大豆皂甙显著增加了希瓦氏菌属、鞘氨酸单胞菌属(*Sphingomonas*)、副球菌属(*Paracoccus*)、普氏菌属(*Prevotella*)、栖瘤胃普雷沃氏菌(*P. ruminicola*)和普通拟杆菌(*Bacteroides vulgatus*)以及潜在致病菌莫拉氏杆菌属(*Moraxella*)和发光杆菌属(*Photobacterium*)的相对丰度；显著降低了 *Caenimonas*、*Niastella* 和罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)的相对丰度 ( $P<0.05$ ) (图6)。

## 3 讨论

在本实验中，饲料中添加0.3%的大豆皂甙对大菱鲆的生长性能，包括增重率、摄食率和饲料利用效率均没有产生显著影响。Chen等<sup>[4]</sup>研究表明大豆皂甙对鱼类生长的影响与养殖周期及其含量密切相关；用含0.32%的大豆皂甙的饲料饲养牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 28 d后，牙鲆的摄食和生长受到显著抑制，而56 d时鱼体生长

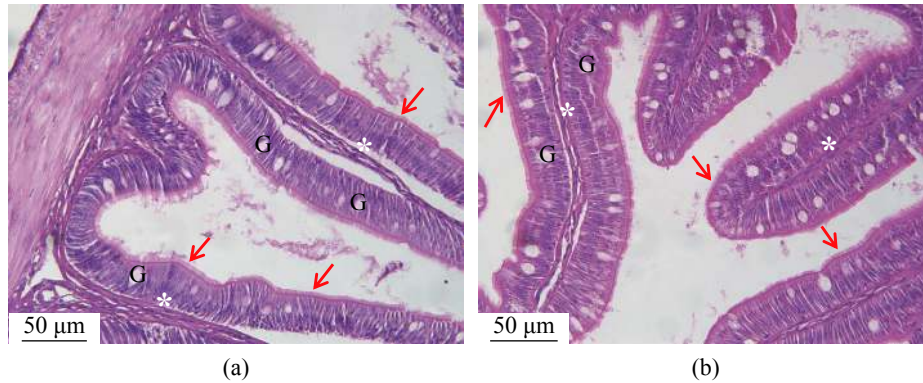


图1 大菱鲃幼鱼后肠组织结构图

(a)和(b)分别对应对照组和大豆皂甙组大菱鲃肠道组织切片; 红色箭头示肠道上皮细胞微绒毛; “\*”示肠道绒毛固有层; “G”示杯状细胞

Fig. 1 Distal histological sections of juvenile *S. maximus*

(a) and (b) represented the distal histological section of control and SA 0.3 group respectively; red arrows showed the microvilli of intestine epithelium cells; “\*” showed the lamina propria within the intestinal folds; “G” showed the goblet cell

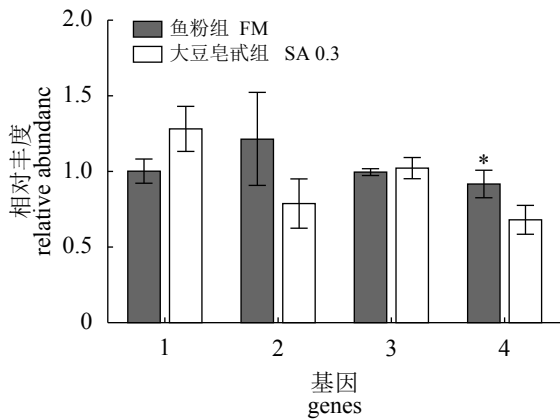


图2 饲料中添加0.3%的大豆皂甙对大菱鲃幼鱼后肠紧密连接蛋白相关基因表达的影响

“\*”表示有显著性差异( $P<0.05$ ); 下同

Fig. 2 Effects of dietary 0.3% soyasaponins on genes expression of intestinal tight junction-related proteins in the distal intestine of juvenile *S. maximus*

1. *Claudin-7*, 2. *Claudin-4*, 3. *Tricellulin*, 4. *Occludin*; “\*” means significant difference ( $P<0.05$ ); the same below

及摄食率与对照组并没有显著差异, 但当饲料中大豆皂甙含量增加到0.64%时, 牙鲆的生长速率显著降低, 表明大豆皂甙对鱼体的不良影响可被长时间的养殖所缓解, 但超过一定剂量会对鱼体造成不可逆损伤。异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 中的研究也表明, 高剂量的大豆皂甙 (0.72%) 会对异育银鲫的生长造成不可逆的抑制作用<sup>[18]</sup>。此外, 基础饲料中的主要蛋白源对大豆皂甙的抗营养作用也会产生不同的影响。研究表明, 在以鱼粉为主要蛋白源的饲料中添

加0.2%大豆皂甙, 大西洋鲑的生长性能及对营养物质(蛋白质和脂质)的消化情况与对照组无显著差异<sup>[19]</sup>。而在含植物蛋白源饲料中添加0.2%大豆皂甙, 大西洋鲑对脂质及氨基酸的消化普遍受到影响<sup>[20]</sup>。本实验的基础饲料配方是以鱼粉为主要蛋白源, 鱼粉中含有的一些诱食因子或生物活性因子会在一定程度上降低大豆皂甙带来的负面影响。此外, 实验鱼的种类、发育阶段以及养殖时间等也都会产生影响。

鱼类的生长与鱼体对营养物质的消化吸收功能密切相关, 因此, 进行消化酶活性的研究可以预测和评估鱼体对饲料中蛋白等营养物质的消化吸收能力。尽管有研究表明养殖鱼类对皂甙有一定的耐受程度, 饲料中添加量小于0.1%的皂甙一般不会影响养殖鱼类的正常生长<sup>[21]</sup>。但是大豆皂甙具有抑制多种酶活性的功效<sup>[21]</sup>。米海峰<sup>[22]</sup>的研究显示, 牙鲆胰蛋白酶、肠道胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和肠道胰凝乳蛋白酶活性随着饲料中大豆皂甙添加量(0.1%、0.4%及0.8%)的增加显著降低。Francis等<sup>[2]</sup>研究表明, 皂甙能抑制糜蛋白酶和胆碱脂酶活性, 影响动物对蛋白质的消化与利用。与前述实验结果相似, 在饲料中添加0.3%大豆皂甙显著降低了大菱鲃胃蛋白酶和肠淀粉酶的活性, 说明添加0.3%大豆皂甙影响了大菱鲃对营养物质的消化; 然而在12周的养殖周期内大菱鲃的生长没有显著降低, 这可能与鱼的种类和养殖时间有关。

大豆皂甙能够降低体内过氧化脂质的生成, 减少体内脂肪含量, 具有降脂效果<sup>[18]</sup>。陈伟<sup>[23]</sup>

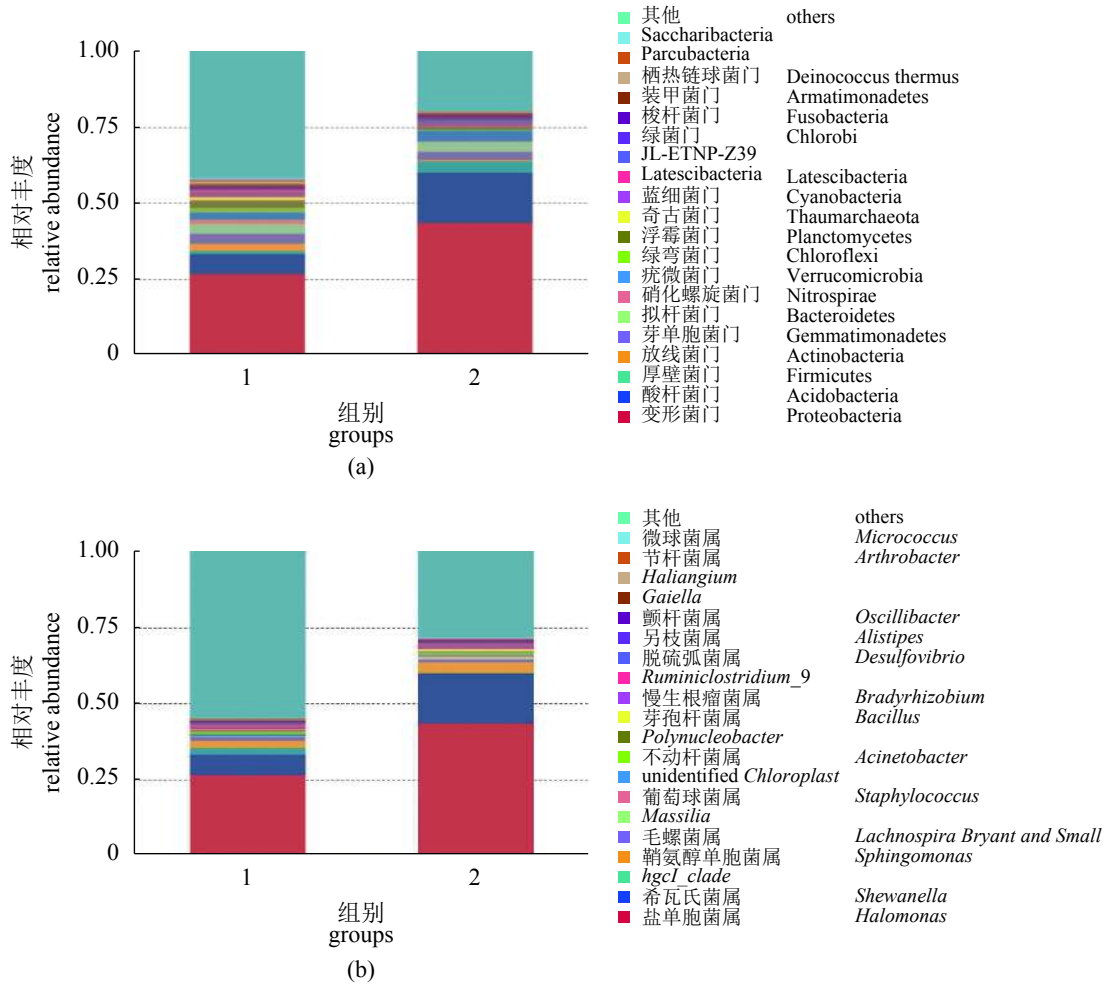


图 3 各处理组大菱鲂幼鱼后肠肠道菌群在门(a)和属(b)水平上Top 20

Fig. 3 Top 20 phyla (a) and genera (b) of microbial community in juvenile *S. mouximus* distal intestine of each treatment group

1. FM, 2. SA 0.3

表 6 大菱鲂幼鱼后肠菌群α-多样性指数统计表

Tab. 6 Alpha diversity index of microbial community in distal intestine of juvenile *S. mouximus*

组别 groups	菌群丰富度 richness estimates		菌群多样性 diversity estimates	
	Chao1	ACE	Shannon index	Simpson index
FM	1 989±445	2 011±443	6.85±1.43	0.88±0.06
SA 0.3	1 563±258	1 619±257	4.77±0.30	0.78±0.02

的研究表明饲料中添加0.32%大豆皂甙却显著降低了牙鲈鱼体的粗脂肪含量；大西洋鲑中的研究也表明大豆皂甙具有降胆固醇效果<sup>[24]</sup>。但异育银鲫中的研究发现饲料中添加大豆皂甙对鱼体粗脂肪含量并没有显著影响<sup>[18]</sup>。而在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 饲料中添加300 mg/kg皂树皂甙却显著增加了肌肉中脂肪含量<sup>[25]</sup>。Chavali等<sup>[26]</sup>提到皂甙可能会增加小鼠 (*Mus musculus*) 体外脾

细胞胆固醇的从头合成。在本实验中，饲料中添加0.3%大豆皂甙显著提高了鱼体粗脂肪含量，其原因是否与大豆皂甙促进了胆固醇的从头合成有关，值得进一步研究。

肠道组织切片结果显示，饲料中添加0.3%大豆皂甙对大菱鲂肠道组织没有造成明显的损伤；但肠道紧密连接蛋白Occludin的基因表达量在大豆皂甙添加组显著下降。紧密连接结构是



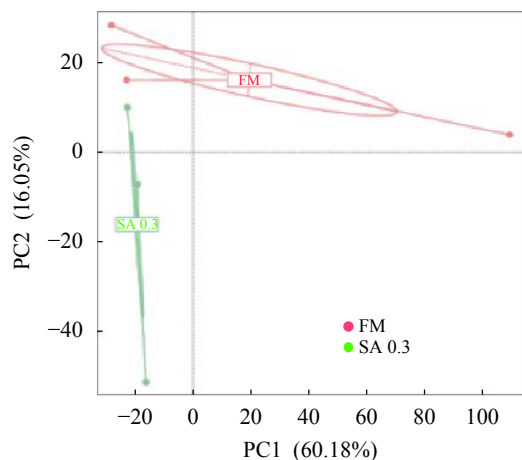


图 4 大菱鲂幼鱼后肠肠道菌群PCA分析

基于OTUs绘制的PCA主成分分析图, 红色代表鱼粉组, 绿色代表大豆皂甙组

Fig. 4 PCA analysis of distal intestine microbiota of juvenile *S. maximus*

PCA (principal component analysis) based on OTUs, red label denotes FM diet, green denotes SA 0.3 diet

一种动态的、多蛋白复合物, 作为一种选择性/半渗透性的细胞间屏障可以控制肠道屏障通透性。而Occludin是紧密连接复合物中的主要部分<sup>[27]</sup>。大西洋鲑中的研究表明, 大豆皂甙可以通

过增加后肠上皮细胞的通透性来破坏肠道完整性<sup>[28]</sup>。本实验中大菱鲂后肠紧密连接蛋白Occludin的基因表达量在0.3%大豆皂甙组显著下降, 表明0.3%的大豆皂甙对大菱鲂肠道通透性可能具有一定的破坏作用。

本实验中, 大菱鲂的肠道优势菌在门水平上主要为变形菌门、厚壁菌门和放线菌门, 在属水平上主要为盐单胞菌属和希瓦氏菌属, 这与之前在大菱鲂中的研究结果相似<sup>[12]</sup>。饲料中添加0.3%的大豆皂甙后大菱鲂肠道的优势菌组成发生了显著变化, 变形菌门和希瓦氏菌属的相对丰度显著提高, 而且出现了明显的食物聚类现象, 可见饲料中添加0.3%的大豆皂甙改变了大菱鲂肠道菌群的整体结构。此外, 饲料中添加0.3%的大豆皂甙还显著增加了变形菌门中鞘脂单胞菌属, 厚壁菌门的杆菌纲、芽胞杆菌目和芽胞杆菌科, 拟杆菌门的普氏菌属、栖瘤胃普雷沃菌以及普通拟杆菌的丰度。研究发现鞘脂单胞菌属具有产 $\beta$ -葡萄糖甙酶的能力<sup>[29]</sup>、厚壁菌门的杆菌纲中也含有大量产 $\beta$ -葡萄糖甙酶的细菌、拟杆菌属细菌也具有产糖甙酶和 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶活性<sup>[30]</sup>, 而肠道细菌产生的糖苷酶<sup>[31]</sup>和葡萄糖醛酸酶<sup>[32]</sup>可参与大豆皂甙的水解。还有研究发现, 拟

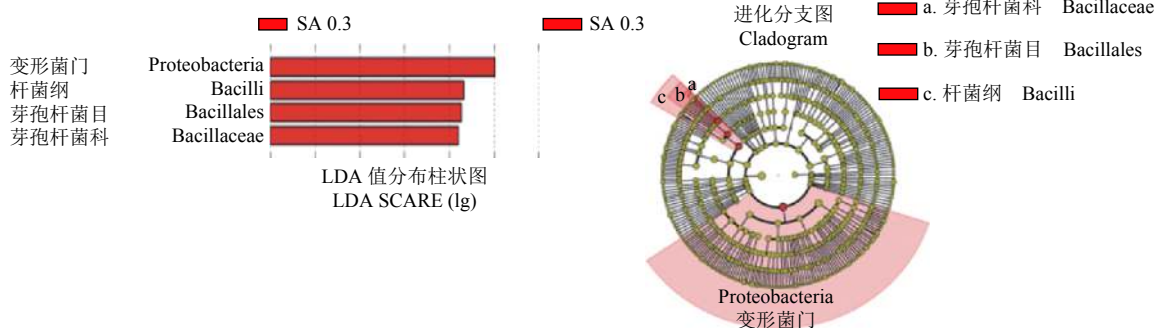


图 5 大菱鲂幼鱼后肠肠道菌群结构LEfSe分析

LDA值分布柱状图(左)展示了LDA Score大于设定值(默认设置为4)的物种, 即组间具有统计学差异的物种; 柱状图的长度代表差异物种的影响大小(即为LDA Score); 进化分支图(右)由内至外辐射的圆圈代表了由门至属(或种)的分类级别; 在不同分类级别上的每一个小圆圈代表该水平下的一个分类, 小圆圈直径大小与相对丰度大小呈正比; 着色原则: 无显著差异的物种统一着色为黄色, 差异物种Biomarker跟随组进行着色, 红色节点表示在红色组别中起到重要作用的微生物类群, 绿色节点表示在绿色组别中起到重要作用的微生物类群; 图中英文字母表示的物种名称在右侧图例中进行展示

Fig. 5 LEfSe analysis of microbiota in juvenile *S. maximus* distal intestine

LDA score distribution bar graph (left) showed the species whose LDA score greater than set value (the default screening value was 4), that was differentiated species; the length of the column represented the extent of the influence to specific species; cladogram (right). the identified OTUs are distributed according to phylogenetic characteristics around the circle; the dots closest to the center represent OTUs at phylum level, whereas those locating on the outermost circle stand for OTUs at genus level, and the diameter of dots is proportional to the taxon's abundance; the color of the dots and sectors indicate enrichment of the OTUs in different diets (yellow, undifferentiated species; red, SA 0.3 diet; green, FM diet); the colored sectors giving information on phylum, class, order, family, and genus are indicated by letters, which are specified on the top right corner (full name, given only for those showing significant difference between diets)



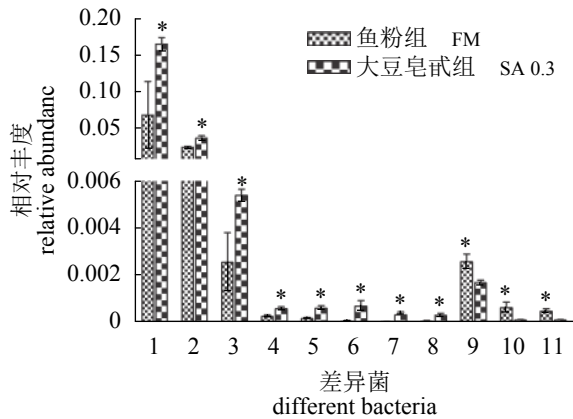


图6 大菱鲆幼鱼后肠肠道菌群MetaStat分析

1. 希瓦氏菌属, 2. 鞘氨醇单胞菌属, 3. 副球菌属, 4. 莫拉氏杆菌属, 5. 发光杆菌属, 6. 普氏菌属, 7. 栖瘤胃普雷沃氏菌, 8. 普通拟杆菌, 9. *Caenimonas*, 10. *Niastella*, 11. 罗尔斯通氏菌属

Fig. 6 MetaStat analysis of distal intestine microbial community of juvenile *S. maximus*

1. *Shewanella*, 2. *Sphingomonas*, 3. *Paracoccus*, 4. *Moraxella*, 5. *Photobacterium*, 6. *Prevotella*, 7. *P. ruminicola*, 8. *B. vulgatus*, 9. *Caenimonas*, 10. *Niastella*, 11. *Ralstonia*

杆菌门的口普雷沃氏菌(*P. oris*)具有水解皂甙类化合物的性质<sup>[33]</sup>。以上表明, 大豆皂甙很可能提高了大菱鲆肠道内与皂甙类水解有关的肠道微生物的相对丰度。在本实验中, 大豆皂甙显著降低了*Caenimonas*、*Niastella*和罗尔斯通菌属的相对丰度, 这其中罗尔斯通菌属含有多种条件致病菌, 可引起人类感染脑膜炎, 骨髓炎等<sup>[34]</sup>, 其他2种菌的相关研究还未见报道, 但已有的研究指出皂甙能抑制金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)活性<sup>[35]</sup>, 所以大豆皂甙可能通过其抑菌性来降低潜在致病菌的相对丰度。此外, 大豆皂甙还显著提高了潜在致病菌如莫氏杆菌属和发光杆菌属的丰度<sup>[36-37]</sup>。众所周知肠道共生菌中潜在致病菌与益生菌的失调会破坏肠道稳态, 诱发多种肠道疾病<sup>[38]</sup>, 而潜在致病菌的相对丰度显著变化对肠道健康存在隐患。本研究中, 0.3%大豆皂甙对大菱鲆肠道菌群结构具有显著调节作用, 其与肠道菌群结构的关系值得进一步研究。

综上所述, 饲料中添加0.3%大豆皂甙显著抑制了大菱鲆的消化酶活性, 降低了紧密连接蛋白Occludin的基因表达量, 改变了肠道菌群结构, 在抑制了一些潜在致病菌的相对丰度的同时也增加了部分潜在致病菌的相对丰度。因此, 大豆皂甙对大菱鲆肠道健康的影响不容忽视, 在

鱼类饲料中使用植物蛋白源需考虑其中皂甙的含量。

#### 参考文献:

- [1] Krogdahl Å, Bakke-McKellep A M, Baeverfjord G. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)(J). *Aquaculture Nutrition*, 2003, 9(6): 361-371.
- [2] Francis G, Makkar H P S, Becker K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish(J). *Aquaculture*, 2001, 199(3-4): 197-227.
- [3] Ireland P A, Dziedzic S Z, Kearsley M W. Saponin content of soya and some commercial soya products by means of high-performance liquid chromatography of the saponin(J). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1986, 37(7): 694-698.
- [4] Chen W, Ai Q H, Mai K S, et al. Effects of dietary soybean saponins on feed intake, growth performance, digestibility and intestinal structure in juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)(J). *Aquaculture*, 2011, 318(1-2): 95-100.
- [5] Bureau D P, Harris A M, Cho C Y. The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)(J). *Aquaculture*, 1998, 161(1-4): 27-43.
- [6] Krogdahl A, Gajardo K, Kortner T M, et al. Soy saponins induce enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)(J). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(15): 3887-3902.
- [7] Camilleri M, Madsen K, Spiller R, et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease(J). *Neurogastroenterology & Motility*, 2012, 24(6): 503-512.
- [8] Kosińska A, Andlauer W. Modulation of tight junction integrity by food components(J). *Food Research International*, 2013, 54(1): 951-960.
- [9] Ringø E, Myklebust R, Mayhew T M, et al. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry(J). *Aquaculture*, 2007, 268(1-4): 251-264.
- [10] Blumberg R, Powrie F. Microbiota, disease, and back to health: A metastable journey(J). *Science Translational*

- Medicine, 2012, 4(137): 137rv7.
- [11] 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.
- [12] Li Y X, Yang P, Zhang Y J, *et al.* Effects of dietary glycinin on the growth performance, digestion, intestinal morphology and bacterial community of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L.[J]. *Aquaculture*, 2017, 479(1): 125-133.
- [13] Yang P, Hu H B, Liu Y, *et al.* Dietary stachyose altered the intestinal microbiota profile and improved the intestinal mucosal barrier function of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L.[J]. *Aquaculture*, 2018, 486(3): 98-106.
- [14] Peng M, Xu W, Ai Q H, *et al.* Effects of nucleotide supplementation on growth, immune responses and intestinal morphology in juvenile turbot fed diets with graded levels of soybean meal (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. *Aquaculture*, 2013, 392-395: 51-58.
- [15] AOAC. Official Methods of Analysis[M]. 16th ed. Washington DC: Association of Official Agricultural Chemists, 1995.
- [16] Anson M L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin[J]. *Journal of General Physiology*, 1938, 22(1): 79-89.
- [17] Hidalgo M C, Urea E, Sanz A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities[J]. *Aquaculture*, 1999, 170(3): 267-283.
- [18] 张伟. 大豆皂甙与大豆异黄酮对异育银鲫生长、生理及肠道健康的影响[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
- Zhang W. Effects of soybean saponins and soybean isoflavones on growth, physiology and intestinal health of Allogynogenetic silver crucian carp[D]. Suzhou: Soochow University, 2010(in Chinese).
- [19] Sørensen M, Penn M, El-Mowafi A, *et al.* Effect of stachyose, raffinose and soya-saponins supplementation on nutrient digestibility, digestive enzymes, gut morphology and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L)[J]. *Aquaculture*, 2011, 314(1-4): 145-152.
- [20] Chikwati E M, Venold F F, Penn M H, *et al.* Interaction of soya-saponins with plant ingredients in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L.[J]. *British Journal of Nutrition*, 2012, 107(11): 1570-1590.
- [21] Liener I E. Implications of antinutritional components in soybean foods[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1994, 34(1): 31-67.
- [22] 米海峰. 不同蛋白源和大豆抗营养因子对牙鲆蛋白消化酶的活性与基因表达的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- Mi H F. Effects of different protein sources and antinutritional factors on gene expression and activity of protein-digestive-enzyme of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008(in Chinese).
- [23] 陈伟. 抗营养因子对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)利用大豆蛋白源的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- Chen W. Effects of antinutritional factors on the utilization of soybean proteins by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009(in Chinese).
- [24] Gu M, Kortner T M, Penn M, *et al.* Effects of dietary plant meal and soya-saponin supplementation on intestinal and hepatic lipid droplet accumulation, lipoprotein and sterol metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *British Journal of Nutrition*, 2014, 111(3): 432-444.
- [25] Francis G, Makkar H P S, Becker K. Effects of *Quillaja* saponins on growth, metabolism, egg production and muscle cholesterol in individually reared Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2001, 129(2): 105-114.
- [26] Chavali S R, Francis T, Campbell J B. An *in vitro* study of immunomodulatory effects of some saponins[J]. *International Journal of Immunopharmacology*, 1987, 9(6): 675-683.
- [27] Johnson L G. Applications of imaging techniques to studies of epithelial tight junctions[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57(1): 111-121.
- [28] Knudsen D, Jutfelt F, Sundh H, *et al.* Dietary soya saponins increase gut permeability and play a key role in the onset of soyabean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *British Journal of Nutrition*, 2008, 100(1): 120-129.

- [29] Kyum K M, Lee J W, Lee K Y, *et al.* Microbial conversion of major ginsenoside Rb<sub>1</sub> to pharmaceutically active minor ginsenoside Rd[J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 43(5): 456-462.
- [30] Hu J. Characterization of soyasaponin metabolism by human gut microorganisms and bioavailability in humans[D]. Ames: Iowa State University, 2003.
- [31] Gestetner B, Birk Y, Tencer Y. Soybean saponins. Fate of ingested soybean saponins and the physiological aspect of their hemolytic activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1968, 16(6): 1031-1035.
- [32] Jang I S, Kim D H. Purification and characterization of  $\alpha$ -L-Rhamnosidase from *Bacteroides* JY-6, a human intestinal bacterium[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1996, 19(12): 1546-1549.
- [33] Hasegawa H, Sung J H, Benno Y. Role of human intestinal *Prevotella oris* in hydrolyzing ginseng saponins[J]. *Planta Medica*, 1997, 63(5): 436-440.
- [34] Ryan M R, Adley C C. *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2014, 33(3): 291-304.
- [35] Khan H, Khan M A, Abdullah. Antibacterial, antioxidant and cytotoxic studies of total saponin, alkaloid and sterols contents of decoction of Joshanda: identification of components through thin layer chromatography[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2015, 31(3): 202-208.
- [36] Osorio C R, Toranzo A E, Romalde J L, *et al.* Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S *rRNA* genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 40(3): 177-183.
- [37] Oldfield N J, Ala'Aldeen D A A. Neisseria and moraxella: meningitis; septicaemia; gonorrhoea; respiratory infections[M]//Greenwood D, Slack R, Barer M, *et al.* *Medical Microbiology* (Eighteenth Edition). 18th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2012: 256-264.
- [38] Maranduba C M, De Castro S B, de Souza G T, *et al.* Intestinal microbiota as modulators of the immune system and neuroimmune system: impact on the host health and homeostasis[J]. *Journal of Immunology Research*, 2015, 2015(1): 1-14.



## Effects of dietary soyasaponins on the growth performance and intestinal health of juvenile turbot(*Scophthalmus maximus*)

YU Guijuan<sup>1</sup>, YANG Pei<sup>1</sup>, DAI Jihong<sup>1</sup>, OU Weihao<sup>1</sup>, CHEN Zhichu<sup>1</sup>,  
AI Qinghui<sup>1</sup>, ZHANG Wenbing<sup>1</sup>, ZHANG Yanjiao<sup>1,2\*</sup>, MAI Kangsen<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feed, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;  
2. Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266235, China)

**Abstract:** A 12-week feeding trial was conducted to investigate the effects of dietary soyasaponins on the growth performance, activities of digestive enzymes, intestinal morphology and intestinal bacterial community of turbot (*Scophthalmus maximus*). Two isonitrogenous and isolipidic experimental diets (based on 67% fish meal) containing 0% and 0.3% soyasaponins were formulated. The results showed that the growth performance was not affected by dietary soyasaponins, while the activities of intestinal pepsin and amylase were significantly depressed by dietary 0.3% soyasaponins. No obvious changes of intestinal histology were observed between two groups. However the gene expression of intestinal tight junction protein occludin was significantly declined when 0.3% soyasaponins was added. The analysis of intestinal microbiota showed that Proteobacteria and *Halomonas* were the most dominant phylum and genus in *S. maximus* intestine, respectively. LEfSe and MetaStat analysis showed that the abundance of dominant bacteria (Proteobacteria and *Shewanella*) was significantly increased by dietary 0.3% soyasaponins. Meanwhile, dietary soyasaponins significantly increased the abundance of intestinal saponin-hydrolyzing bacteria. In addition, the abundance of some intestinal potential pathogenic bacteria such as *Methylobacterium*, *Moraxella* and *Photobacterium*, was increased while that of some other pathogenic bacteria such as *Ralstonia* was decreased by dietary soyasaponins. In conclusion, dietary 0.3% soyasaponins depressed the activities of digestive enzymes, and the gene expression of intestinal tight junction protein Occludin, and altered the intestinal microbiota of *S. maximus*. Thus, the effects of soyasaponins on fish intestine health, especially intestinal flora, cannot be ignored and deserve further study.

**Key words:** *Scophthalmus maximus*; soyasaponins; growth performance; digestive enzymes; intestinal morphology; intestinal microbiota

**Corresponding author:** ZHANG Yanjiao. E-mail: yanjiaozhang@ouc.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41576137); China Agricultural Research System (CARS-47-G10)