

水解单宁对暗纹东方鲀摄食偏好、消化代谢和抗氧化能力的效应

姚静婷^{1,2,3}, 孔纯^{1,2,3}, 华雪铭^{1,2,3*}, 税春⁴, 施永海⁴

(1. 上海海洋大学, 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

4. 上海市水产研究所, 上海 200433)

摘要: 为了解菜粕替代鱼粉后单宁的作用, 配制4组等氮等能饲料饲喂初重(39.84±3.09) g的暗纹东方鲀8周。以含43%鱼粉的实用基础饲料T0为对照; 另设置3个不同的鱼粉用量组, 用酪蛋白平衡蛋白质含量, 并添加0.25%(T1)、0.75%(T2)和1.25%(T3)的水解单宁, 使酪蛋白: 水解单宁≈菜粕中蛋白含量: 菜粕中单宁含量=16.8: 1。结果显示, 随饲料中水解单宁添加量的增加, 增重率呈上升趋势, 饲料系数显著下降; 肌肉粗脂肪含量T2组显著高于T0及T1组, 对照组氨基酸水平显著高于其他组。肝脏抗氧化指标中, T0组过氧化氢酶(CAT)活力显著低于其他组, 总抗氧化能力(T-AOC)则显著高于其他组, T3组丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性显著高于其他组。血清抗氧化指标中, 3个单宁组MDA含量均显著高于对照组, 过氧化氢酶(CAT)活力显著下降。随饲料中水解单宁添加量的增加, 血清谷丙转氨酶(ALT)活性先升后降, 与肝脏中趋势一致; T1组白蛋白(ALB)含量高于T0及T3组, 显著高于T2组, T1组总蛋白(TP)含量高于T0组, 显著高于T2及T3组。T1及T2组肠道淀粉酶活性显著高于T0组, 胃和肠道中的蛋白酶活性随水解单宁添加量的增加显著上升, 胃脂肪酶活性显著下降。T3组苦味受体T2R1表达量在舌尖和肠道均显著高于对照组; 肝脏热休克蛋白HSP70表达量T0组显著高于T3; 摄食偏好实验中, 驯化前暗纹东方鲀摄食偏好随水解单宁添加量的增加显著下降, 驯化8周后, 4组实验鱼对T2饲料的偏好程度均显著高于T0, T0饲料高于T1和T3组。研究表明, 添加1.25%及以下水解单宁对暗纹东方鲀生长无负面影响, 一定程度上对饲料有节约作用; 添加水解单宁会改变鱼体对蛋白质、脂肪和糖类的消化及蛋白质合成代谢, 添加量在1.25%时会损伤抗氧化能力和抗应激能力; 用含有水解单宁的饲料驯化暗纹东方鲀可显著提高其对水解单宁添加量为0.75%的饲料的偏好程度, 并提高对苦味的接受能力。

关键词: 暗纹东方鲀; 水解单宁; 摄食偏好; 蛋白质代谢; 抗氧化

中图分类号: S 963.73

文献标志码: A

暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)是一种杂食偏肉食性洄游鱼类, 为我国特有河豚物种, 味道鲜美、营养丰富。在目前的养殖生产中, 多以鳗鱼或甲鱼料混合冰鲜杂鱼进行投喂, 对其可

持续发展以及病害防治留下了较大隐患, 因此配合饲料的研发尤为重要。

鱼粉和豆粕是水产养殖中的优质蛋白源, 但鱼粉资源减少, 不利于养殖业可持续发展; 就

收稿日期: 2018-12-17 修回日期: 2019-04-03

资助项目: 农业部淡水水产种质资源重点实验室开放课题

通信作者: 华雪铭, E-mail: xmhua@shou.edu.cn

目前国际形势看来,大豆的行情也不够稳定。油菜是我国第一大油料作物,菜粕为油菜籽榨油后的副产物,营养价值高,粗蛋白含量在40%左右,除赖氨酸外其余氨基酸比较齐全,还富含维生素和矿物盐,是一种价廉易得的优质饲料蛋白。但菜粕也存在一些弊端,对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[1]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[2]、银鲫(*Carassius gibelio*)^[3]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[4]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[5]等的研究发现,饲料中菜粕过量时,会抑制水产动物的生长、免疫及消化生理等机能,这通常归因于菜粕中的抗营养因子,如硫代葡萄糖甙、植酸、单宁、芥酸等。目前硫代葡萄糖甙和芥酸的问题已经通过培育新品种双低菜粕得到了解决,但与普通菜粕相比,许多双低菜粕中的单宁含量却是增加了一倍以上^[6]。

单宁是一种分布广泛的植物多酚,一般分为水解单宁和缩合单宁,具有多种生物活性。缩合单宁是由羟基黄烷-3-醇(其衍生物为儿茶素类)和羟基黄烷-3,4-二醇为单元构成的聚合物,相对分子质量较大,不容易被水解,具有抗氧化性^[6-7]。多聚缩合单宁(超过三个单体)无法被机体吸收,但可在酸、碱或酶的条件下氧化,脱水缩合成高分子沉淀,排出体外或留在胃肠道中与蛋白质结合,具有较强的抗营养吸收作用^[8]。水解单宁由没食子酸酯或含糖基的鞣酸及其衍生物组成,相对分子质量为500~3 000,结构多样,分子中含有邻位酚羟基,易被氧化,是一种优良的供氢体,对自由基具有清除作用^[7-8]。水解单宁还具有很强的极性,可与蛋白质分子形成不溶性复合物,也可与金属离子结合降低其消化吸收率^[9]。单宁对畜禽动物的影响较为复杂。在肉仔鸡饲料中添加0.2%栗木单宁可以提高日增重和日采食量,减少饲料中氮损失^[10]。0.2%水解单宁可增强家兔肠道消化酶活性,促进营养物质的消化吸收^[11]。在公鸡饲料中加入2.5%水解单宁,生长率与蛋白质效率降低,肝脏蛋白酶活性升高^[12]。单宁在水产动物中的研究还极其有限且多偏向于负面,有研究发现,在饲料中添加2%水解单宁,对南亚野鲮(*Labeo rohita*)幼鱼的生长无不利影响,但使其血液中白细胞、血浆蛋白、白蛋白和球蛋白含量升高^[13];在欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)饲料中添加2%的水解单宁则显著

降低其摄食与生长^[14];向鲤(*Cyprinus carpio*)腹部注射10 mg/kg体质量的单宁水溶液会显著降低抗氧化酶活力^[15]。因此,水产饲料中菜粕过量所造成的负面效应可能部分由单宁引起。当外界环境对机体产生压力时,机体会产生抗应激反应。热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一组结构非常保守的特殊蛋白质,它能够快速调节应激过程中细胞的机能,保护细胞免受损伤。而HSP70则是其中最保守也是最重要的一类蛋白质,受到环境胁迫后能够大量表达,因此可用来判断鱼类的生理状态^[16]。

在草鱼味觉受体的研究中,饲喂浮游动物的草鱼的T1R1及T1R3的基因表达量高于混合饲料喂浮萍和浮游动物的草鱼,说明饲料能够影响鱼类味觉基因表达^[17]。单宁具有明显苦味,当动物摄入苦味物质时,会刺激口腔中苦味受体T2Rs的表达,通过一系列信号转导反应,使动物表现出厌恶摄食的行为,降低摄食率,这一般认为是其抵御有毒物质的一种防御行为^[18]。然而,前期研究表明,水产动物的摄食行为可通过驯化改变,用含有40%豆粕的饲料对虹鳟进行投喂,摄食量显著降低,但经过7天的驯化,摄食量回复至正常水平^[19]。因此,本实验推测暗纹东方鲀对单宁苦味的接受能力也可通过驯化提高。

在实际的养殖生产中,用菜粕替代部分鱼粉后,同时表现为鱼粉用量的减少及单宁在內的抗营养因子含量的增加,因此,采用在基础饲料中仅添加单宁的方法尚不能较好地体现菜粕替代部分鱼粉后因鱼粉下降引起的生物学效应。为此,本实验拟初步探究在饲料中鱼粉用量下降的情况下,水解单宁对暗纹东方鲀摄食偏好、消化代谢、肝脏损伤及抗氧化能力的影响,为菜粕的高效利用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 实验设计与饲料

实验共设置4组等氮等能饲料(表1)。以鱼粉、豆粕及酪蛋白作为主要蛋白源,以鱼粉含量为43%的基础组T0为对照,鱼粉用量减少时,用酪蛋白平衡蛋白质含量,并添加0%(T0)、0.25%(T1)、0.75%(T2)和1.25%(T3)的水解单宁,使酪蛋白:水解单宁≈菜粕中蛋白含量:菜粕中单宁含量=16.8:1,同时添加赖氨酸、蛋氨酸和苏氨酸

表1 实验饲料配方与营养组成(%干物质基础)

Tab. 1 Ingredients and proximate composition of experimental diets (% dry basis)

	T0	T1	T2	T3
原料/% ingredients				
鱼粉 fish meal	43.00	37.00	25.50	13.60
酪蛋白 casein	0.00	4.20	12.60	21.00
豆粕 soybean meal	15.00	15.00	15.00	15.00
肉粉 meat meal	2.00	2.00	2.00	2.00
血粉 blood meal	3.00	3.00	3.00	3.00
α -淀粉粉 α -starch	25.00	25.00	25.00	25.00
玉米蛋白粉 corn gluten meal	1.50	1.50	1.50	1.50
鱼油 fish oil	3.00	3.50	4.50	5.40
水解单宁 ¹ hydrolysable tannins	0.00	0.25	0.75	1.25
羧甲基纤维素钠 sodium carboxymethylcellulose	2.30	2.95	0.75	0.05
氯化胆碱 choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50
复合多维 ² compound vitamins	0.50	0.50	0.50	0.50
复合多矿 ³ compound minerals	1.00	1.00	1.00	1.00
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.00	0.00	3.50	6.00
赖氨酸 lysine	0.00	0.20	0.30	0.40
蛋氨酸 methionine	0.00	0.10	0.30	0.40
苏氨酸 threonine	0.00	0.10	0.10	0.20
硫代甜菜碱 DMPT	0.20	0.20	0.20	0.20
乌贼膏 squid ointment	3.00	3.00	3.00	3.00
营养水平/% nutrient levels				
粗蛋白 crude protein	42.89	42.96	42.93	42.67
粗脂肪 crude fat	7.79	7.78	7.79	7.68
粗灰分 crude ash	14.50	11.50	10.50	10.50
总能(MJ/kg) gross energy	18.70	18.71	18.70	18.58

注: 1. 水解单宁购于武汉佰兴生物, 有效物质含量99%(人工合成)2. 复合维生素预混料(g/kg饲料干物质): 维生素A, 6 000 IU; 维生素D3, 2 000 IU; 维生素C, 400 mg; 维生素E, 50 mg; 维生素K3, 5 mg; 维生素B1, 15 mg; 维生素B2, 15 mg; 维生素B3, 15 mg; 维生素B6, 6 mg; 维生素B12, 0.03 mg; 维生素H, 0.2 mg; 叶酸, 3 mg; 肌醇, 200 mg。3. 复合矿物质预混料(g/kg饲料干物质): I, 0.4 mg; Cu, 4 mg; Zn, 80 mg; Fe, 150 mg; Mn, 20 mg; Mg, 100 mg; Co, 0.1 mg; Se, 0.1 mg

Notes: 1. Hydrolysable tannins was bought from Wuhan Baixing Bio-Technique Co. Ltd., effective substance content is 99%. 2. vitamin premix (mg or IU/kg diet): VA, 6 000 IU; VD 3, 2 000 IU; VC, 400 mg; VE, 50 mg; VK 3, 5 mg; VB 1, 15 mg; VB 2, 15 mg; VB 3, 30 mg; VB 5, 35 mg; VB 6, 6 mg; VB 12, 0.03 mg; biotin, 0.2 mg; folicacid, 3 mg; inositol, 200 mg. 3. mineral premix (mg/kg diet): I, 0.4 mg; Cu, 4 mg; Zn, 80 mg; Fe, 150 mg; Mn, 20 mg; Mg, 100 mg; Co, 0.1 mg; Se, 0.1 mg

调节氨基酸平衡。

按照配方设计, 除油脂外的其余饲料原料粉碎, 过60目筛网, 均匀混合, 制备成粉状料。每次投喂前按表1配方加油加水, 制成圆饼状。用以上4组饲料饲养暗纹东方鲀8周, 每组4个重复, 每个重复45尾鱼。

1.2 实验动物与饲养管理

实验所用暗纹东方鲀初始体质量为(39.84±3.09) g, 购于上海市水产研究所。养殖实验在位于上海市浦东新区惠南镇滨海新区的上海海洋大学滨海养殖基地进行。每个养殖池为10 m³, 用网箱均分为4个养殖单元, 使用4个养殖池, 共

16个养殖单元,消毒后冲洗使用,随机分为4组。实验鱼用鳊鱼商品饲料驯化一周,正常摄食后开始正式实验。实验期间,每天表观饱食投喂2次(8:30和16:30),每次投喂量为体质量的1.0%~1.5%粉状料,粉状料根据配方添加鱼油,按粉状料:水(W/V)=1:0.7加水,搅拌成团后,制备成圆饼状,置于饵料台投喂。实验期间养殖用水为过滤池塘水,养殖池水深70~80 cm,温度24~32 °C;不定期吸污换水,24 h连续充气;溶解氧(DO)质量浓度>5 mg/L,铵态氮(NH₄⁺-N)质量浓度<0.6 mg/L。

1.3 样品采集与测定

样品采集 养殖实验结束前禁食24 h,取网箱内所有暗纹东方鲀,计数称重,计算成活率、增重率和饲料系数。

每网箱取5尾实验鱼,丁香酚(100×10⁻⁶)麻醉后,取侧线以上两侧肌肉,并取完整肝脏,吸干表面水分后称重,计算肝体比。

每网箱取10尾实验鱼,丁香酚(100×10⁻⁶)麻醉后,迅速剪开腹部,暴露心脏抽血。将血液放入1.5 mL离心管中,静置4 h,3 000 r/min离心10 min,上清液即为血清,-20 °C保存待测。从中选4尾鱼,取肝脏、胃和全肠,-20 °C保存,用于测定生化指标和消化酶活性。

每网箱取3尾鱼,每组共12尾。用丁香酚(100×10⁻⁶)快速麻醉,无菌条件下,取出每尾鱼的肝脏、舌尖和后肠,迅速置于液氮后转移至-80 °C冰箱保存备用。每组以3尾鱼合并为一个平行样本,每组做3个重复,用于测定暗纹东方鲀不同组织T2R1和HSP70基因转录相对表达量。

生长性能及形体指标测定

成活率(survival rate, SR, %)=100%×N_t/N₀;

增重率(weight gain rate, WGR, %)=100%×(W_t-W₀)/W₀;

饲料系数(feed coefficient ratio, FCR)=总投饵量/(终末总重-初始总重+死亡总重);

蛋白质效率(protein efficiency ratio, PER, %)=100%×(终末总重-初始总重)/(总投饵量×饲料蛋白质含量);

摄食率(feed rate, FR, %)=完投饵量×100%/[饲养时间×(终末总重+初始总重)/2];

肝体比(liver somatic index, LSI, %)=100%×W_l/W_t;
式中, N_t(尾)和N₀(尾)分别为实验末期和初期暗纹东方鲀的存活数, W_t(g)、W₀(g)分别为实验末

期和初期的平均体质量, W_l(g)为完整肝脏重量。

肌肉常规营养测定 肌肉经冷冻干燥法测量水分后,-20 °C保存待测常规营养成分;粗蛋白用凯氏定氮仪测定(GB/T 6432-94);粗脂肪用三氯甲烷-甲醇法测定^[20];粗灰分按GB/T 6438-92方法测定;肌肉氨基酸以6 mol/L盐酸于真空状态下110 °C水解24 h后采用氨基酸分析仪(Model S7130, Syknm)测定(GB/T 18246-2000)。

肝脏和血清抗氧化指标测定 在肝脏组织加入生理盐水进行匀浆(W/V=1:9),3 000 r/min离心10 min,取上清液,24 h内完成测定。血清过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和总抗氧化能力(T-AOC),肝脏过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)均采用南京建成生物工程有限公司试剂盒检测。

肝脏和血清生化分析指标测定 同上方法分别获得血清与肝脏匀浆液,测定肝脏谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST),血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总蛋白(TP)和白蛋白(ALB),均采用南京建成生物工程有限公司试剂盒检测。

消化酶活性分析 消化道组织加入生理盐水(W/V=1:9)进行匀浆,3 000 r/min离心10 min,取上清液,淀粉酶和脂肪酶用南京建成生物工程有限公司试剂盒检测,蛋白酶使用国标法(GB/T 23527-2009)检测。

肝脏HSP70、舌尖及后肠苦味受体T2R1的转录表达 取-80 °C冰箱中保存的T0和T3组肝脏、舌尖及后肠样本,Trizol(Invitrogen)法提取总RNA, RNA质量浓度高于100 ng/μL, OD₂₆₀/OD₂₈₀约为1.8~2.0。

实时荧光定量PCR分析基因表达,选择β-actin作为内参基因,根据暗纹东方鲀β-actin基因(GenBank: EU871643.1)、HSP70基因(GenBank: FJ429326.1)、T2R1基因(GenBank: EU272034.1)的cDNA序列保守区域,使用Primer 5.0软件设计荧光定量引物(表2);引物均由江苏金唯智公司合成。

按照RT-PCR试剂盒说明书SuperReal SYBRGreen (TianGen, FP205),用ABI7500进行荧光定量PCR,使用Goldstar PCR Master Mix(2×)试剂10 μL,引物1.2 μL, ROX0.4 μL, cDNA2 μL, dH₂O 6.4 μL。PCR反应体系:95 °C, 15 min; (95 °C, 10 s; 55 °C, 32 s; 72 °C, 32 s)40个循环。熔解曲线分析中:

表2 实时荧光定量qPCR所用引物

Tab. 2 Primers for qPCR

引物名称 primer name	GenBank登录号 GenBank accession No.	引物序列 primer sequence (5'-3')	引物类型 primer type
HSP70	FJ429326.1	CTCAATACAAGGGCTCG	Forward
		TGGATCTTTGGGATACGG	Reverse
T2R1	EU272034.1	CGTGAGTGCACAGAAAT	Forward
		CAGCGTGAGGAAGCAGATAA	Reverse
β -actin	EU871643.1	TCCTGACAGAGCGTGGGT	Forward
		TCTCGTTGCCGATGGTGA	Reverse

95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min; 95 °C, 30 s; 60 °C, 15 s, 其中, 从60 °C到95 °C的升温过程中每0.3 °C采集一次荧光信号。每个反应做3个复孔, 每个样本同时进行目标基因与内参基因(β -actin)的反应, 每板做一个平衡样, 以平衡板间误差。

每个复孔以 β -actin为参照基因。基因表达结果采用相对表达量的形式, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。

摄食偏好 以暂养鱼作为驯化前组, 取15尾重量与实验鱼相近的暗纹东方鲀, 随即分成3个重复移入小网箱(30 cm×80 cm×80 cm), 每个重复5尾鱼。在表1饲料配方的基础上, 将T0、T1、T2和T3组饲料分别添加等量(100 mg/kg)不同种类的稀土元素(氧化钐、氧化镧、氧化铈和氧化铈)作为指示剂后, 分别加油加水制备成圆饼状; 每一种饲料等量称取后混合, 供实验鱼自由选择, 饱食投喂, 投喂后15 min收集残饵, 1 h后收集粪便, -20 °C保存, 测定粪便中不同稀土元素的含量, 根据饲料和粪便中稀土元素的含量判断其对不同饲料的喜好程度^[21]。

饲料60~70 °C烘干至恒重, 粪便采用冷冻干燥法至恒重。预处理后使用ICPMS 7700型电感耦合等离子体质谱仪(安捷伦, 美国)对样品中的稀土元素进行定量测定。

假设投喂暗纹东方鲀的饲料由*i*种饲料等量混合组成, 并且第*i*种饲料中稀土元素的含量占饲料中稀土元素总含量的比例为 d_i/d_t , 如果第*i*种粪便中稀土元素的含量占粪中稀土元素总量的比例为 f_i/f_t , 则可将摄食偏好指数用以下公式表示^[21]:

$$\gamma = \frac{f_i/f_t}{d_i/d_t}$$

式中, f_i 为粪中第*i*种稀土元素含量, f_t 为粪中*i*种

稀土元素总含量, d_i 为饲料中第*i*种稀土元素含量, d_t 为饲料中*i*种稀土元素总含量; γ 值越大表示越喜好该种饲料。

驯化后的摄食偏好: 用T0、T1、T2和T3组饲料饲养8周后的暗纹东方鲀作为驯化后的实验鱼, 即8周养殖实验结束后, 在余下的实验鱼中每组随机选取15尾, 分成3个重复移入的小网箱中, 每个小网箱5尾。按照摄食偏好操作方法判断暗纹东方鲀分别用4种不同的饲料驯化8周后对不同饲料的喜好程度。

1.4 数据处理

实验数据以平均数±标准差(mean ± SD)形式表示。利用SPSS 17.0软件对数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 影响显著时再进行Duncan氏多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。苦味受体T₂R₁及HSP70在两组间的比较则使用*t*检验, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 饲料中水解单宁对暗纹东方鲀生长的影响

结果显示, 各组成活率、增重率、摄食率、蛋白质效率及肝体比均无显著差异($P > 0.05$)(表3)。T0和T1组的饲料系数显著高于T2组, T2组显著高于T3组($P < 0.05$)。

2.2 饲料中水解单宁对暗纹东方鲀肌肉组成的影响

随着饲料中水解单宁的添加水平从0增加到1.25%, 暗纹东方鲀肌肉的水分及粗蛋白质含量无显著性差异($P > 0.05$, 表4), T0组粗灰分含量显著高于T1、T2组, T2组粗脂肪含量显著高于T0

表 3 水解单宁对暗纹东方鲀生长性能的影响

Tab. 3 Effect of different supplemental hydrolysable tannin levels on growth performance of obscure puffer

指标 indicator	T0	T1	T2	T3
成活率/% SR	99.44±1.11	99.26±1.28	98.89±2.22	96.30±1.28
增重率/% WGR	48.29±2.75	51.67±4.74	53.60±0.30	53.99±1.84
饲料系数 FCR	2.48±0.08 ^a	2.41±0.17 ^a	2.15±0.05 ^b	1.95±0.03 ^c
蛋白质效率/% PER	0.95±0.08	1.04±0.04	1.06±0.03	0.99±0.11
摄食率/% FR	1.48±0.04	1.48±0.08	1.50±0.09	1.46±0.05
肝体比/% LSI	14.97±1.42	15.18±1.40	14.37±1.77	15.38±1.22

注: 同行数据不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

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

和T1组($P<0.05$); T0组肌肉中必需氨基酸、非必需氨基酸和总氨基酸含量均显著高于其他组($P<0.05$, 表5)。

2.3 饲料中水解单宁对暗纹东方鲀抗氧化能力的影响

肝脏抗氧化指标中, T0组CAT活力显著低于其他组($P<0.05$), T-AOC则显著高于其他组($P<0.05$), T3组SOD活力和MDA含量均显著高于其他组($P<0.05$) (表6)。

血清抗氧化指标中, 随水解单宁添加量的增加, CAT活力显著降低($P<0.05$), T0组MDA含量显著低于其他组($P<0.05$), SOD各组活性则无显著性差异($P>0.05$) (表7)。

2.4 饲料中水解单宁对暗纹东方鲀肝脏和血清生化的影响

饲料中单宁含量显著影响肝脏转氨酶活性。随水解单宁添加量的增加, AST活性高于对照组或与对照组无显著差异; T1与T2组ALT活性显著高于T0和T3组($P<0.05$) (表8)。

血清生化指标中, 各实验组AST活性无显著性差异($P>0.05$), 单宁组中, ALT活性随水解单宁添加量的增加而显著下降($P<0.05$), T1组ALB含量高于T0及T3组($P>0.05$), 且显著高于T2组($P<0.05$)。T1组TP含量高于T0组($P>0.05$), 且显著高于T2及T3组($P<0.05$) (表9)。

2.5 饲料中水解单宁对暗纹东方鲀消化酶活性的影响

添加水解单宁不超过0.75%可增强暗纹东方鲀的肠淀粉酶活性($P<0.05$); 胃淀粉酶活性则无显著差异($P>0.05$); 添加水解单宁使胃蛋白酶和肠蛋白酶活性显著增强($P<0.05$), 胃脂肪酶活性显著降低($P<0.05$) (表10)。

2.6 饲料中水解单宁对暗纹东方鲀抗应激能力和苦味受体表达的影响

HSP70在肝脏表达中, T0组显著高于T3组($P<0.05$) (图1); 苦味受体T2R1基因在舌尖和后肠的相对表达量均为T3组显著高于T0组($P<0.01$) (图2, 图3)。

表 4 水解单宁对暗纹东方鲀肌肉组成的影响(%干重)

Tab. 4 Effect of different supplemental hydrolysable tannin levels on muscle composition of obscure puffer (% dry basis)

指标 indicator	T0	T1	T2	T3
水分/% moisture	79.04±0.40	79.04±1.58	78.59±0.56	78.48±1.61
粗灰分/% crude ash	6.07±0.07 ^a	5.54±0.02 ^b	5.60±0.12 ^b	5.77±0.19 ^{ab}
粗脂肪/% crude lipid	1.46±0.31 ^b	1.17±0.24 ^b	2.33±0.67 ^a	1.96±0.36 ^{ab}
粗蛋白/% crude protein	89.47±1.86	87.95±0.36	88.86±1.47	87.92±1.09

注: 同行数据不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

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

表 5 水解单宁对肌肉氨基酸组成的影响(%干重)

氨基酸 AA	T0	T1	T2	T3
Lys	5.21±0.27 ^a	4.00±0.06 ^b	3.85±0.22 ^b	3.80±0.34 ^b
Thr	2.78±0.58	2.31±0.11	2.22±0.14	2.15±0.32
Val	1.82±0.42	1.63±0.14	1.55±0.17	1.45±0.31
Met	1.41±0.01 ^a	1.08±0.16 ^b	0.96±0.03 ^b	0.99±0.09 ^b
Ile	1.55±0.36	1.43±0.14	1.36±0.17	1.25±0.31
Leu	4.06±0.77 ^a	3.37±0.14 ^{ab}	3.26±0.20 ^{ab}	3.18±0.42 ^b
Phe	2.12±0.40	1.82±0.10	1.77±0.12	1.71±0.20
His	2.39±0.31 ^a	1.74±0.07 ^b	1.74±0.07 ^b	1.85±0.14 ^b
Arg	3.29±0.71 ^a	2.63±0.09 ^b	2.49±0.14 ^b	2.45±0.29 ^b
TEAA	19.42±3.55 ^a	16.00±0.32 ^b	15.35±0.72 ^b	15.04±1.73 ^b
Pro	2.24±0.51 ^a	1.66±0.08 ^b	1.59±0.06 ^b	1.58±0.13 ^b
Ser	3.18±0.61 ^a	2.58±0.06 ^b	2.51±0.09 ^b	2.54±0.20 ^b
Glu	9.60±1.80 ^a	7.78±0.24 ^b	7.50±0.35 ^b	7.46±0.78 ^b
Gly	2.81±0.67 ^a	2.21±0.08 ^b	2.13±0.09 ^b	2.15±0.06 ^b
Ala	3.28±0.64 ^a	2.62±0.06 ^b	2.55±0.09 ^b	2.57±0.17 ^b
Cys	0.45±0.06 ^a	0.36±0.01 ^b	0.34±0.01 ^b	0.33±0.04 ^b
Tyr	1.86±0.32 ^a	1.50±0.02 ^b	1.44±0.04 ^b	1.43±0.12 ^b
Asp	4.89±0.00	4.35±0.02	4.19±0.15	4.23±0.34
TNEAA*	25.98±1.31 ^a	23.01±0.47 ^b	22.25±0.86 ^b	22.29±1.83 ^b
TAA*	75.70±3.42 ^a	67.52±1.34 ^b	65.16±2.52 ^b	65.29±5.37 ^b

注: TEAA: 总必需氨基酸; TNEAA: 总非必需氨基酸; TAA: 总氨基酸; 色氨酸被酸破坏, 未计入其中。同行数据上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Notes: TEAA. total essential amino acid; TNEAA. total nonessential amino acid; TAA. total amino acid; tryptophan was destroyed and not counted. In the same row, values with different superscripts mean significant difference ($P<0.05$)

2.7 饲料中单宁对暗纹东方鲀摄食偏好的影响

随着水解单宁添加量增加, 未经驯化的暗纹东方鲀对饲料的摄食偏好指数显著下降。但经过8周的养殖驯化后, 各实验组呈现相同的摄食趋势: 对T3组饲料的摄食偏好降低, 对T2组则显著升高, 呈现出最高的摄食偏好指数(表11)。

3 讨论

3.1 水解单宁对暗纹东方鲀生长性能的影响

单宁对动物生长的作用因动物种类、单宁结构和用量而异, 荷斯坦奶牛饲料中添加0~0.6%的缩合单宁, 其增重率和饲料能量利用率显著增高^[22]; 断奶仔猪饲料中添加125、250、500和1 000 mg/kg

水解单宁, 其平均日增重和饲料转化率显著降低^[23]; 而在对公鸡的研究中, 饲料利用率不受饲料中栗木单宁含量的影响^[24]。相近物种中, 由于单宁来源、实验环境或饲料的不同, 其作用也存在较大差异^[25-26]。本实验结果表明, 随水解单宁含量增加, 实验鱼存活率、摄食率、增重率、蛋白质效率均无显著变化, 饲料系数则显著降低, 说明在饲料中添加0.25%~1.25%的水解单宁对暗纹东方鲀的生长无不利影响, 并具有提高饲料转化效率的效果, 与实验观察现象一致。在实验过程中发现, 对照组暗纹东方鲀饱食后继续摄食、尔后再吐食, 而各单宁组暗纹东方鲀可能受单宁味苦影响, 饱食后则不再咬食饲料, 从而减少溶失, 降低饲料系数。

表 6 水解单宁对暗纹东方鲀肝脏抗氧化指标的影响

Tab. 6 Effect of different supplemental hydrolysable tannin levels on antioxidant indices in liver of obscure puffer

指标 indicator	过氧化氢酶/(U/mg prot) CAT	超氧化物歧化酶/(U/mg prot) SOD	丙二醛/(nmol/mg prot) MDA	总抗氧化能力/T-AOC (U/mg prot)
T0	14.72±0.12 ^a	18.20±1.52 ^a	5.68±0.30 ^a	0.25±0.04 ^a
T1	35.49±4.60 ^d	16.47±1.55 ^a	6.80±0.94 ^a	0.18±0.02 ^b
T2	21.74±2.31 ^b	15.95±1.88 ^a	6.66±1.29 ^a	0.16±0.03 ^b
T3	28.63±3.04 ^c	28.30±1.37 ^b	9.95±0.73 ^b	0.16±0.02 ^b

注：同列数据上标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

Notes: In the same column, values with different superscripts mean significant difference (P<0.05)

表 7 水解单宁对暗纹东方鲀血清抗氧化指标的影响

Tab. 7 Effect of different supplemental hydrolysable tannin levels on antioxidant indices in serum of obscure puffer

指标 indicator	过氧化氢酶/ (U/mg prot) CAT	超氧化物歧化酶/ (U/mg prot) SOD	丙二醛/ (nmol/mg prot) MDA
T0	10.30±1.10 ^c	494.50±8.08	12.73±0.09 ^a
T1	7.32±1.36 ^b	494.34±35.80	18.47±3.00 ^b
T2	7.57±0.35 ^b	498.28±16.76	16.67±1.44 ^b
T3	3.55±0.55 ^a	520.19±15.18	19.85±1.11 ^b

注：同列数据上标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

Notes: In the same column, values with different superscripts mean significant difference (P<0.05)

表 8 水解单宁对暗纹东方鲀肝脏生化指标的影响

Tab. 8 Effect of different supplemental hydrolysable tannin levels on liver biochemical indices of obscure puffer

指标 indicator	谷草转氨酶/(U/mg prot) AST	谷丙转氨酶/(U/mg prot) ALT
T0	632.25±59.34 ^a	31.82±3.68 ^a
T1	824.77±25.07 ^b	44.46±3.23 ^b
T2	556.49±31.75 ^a	47.42±2.65 ^b
T3	936.80±74.06 ^c	34.20±3.74 ^a

注：同列数据上标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

Notes: In the same column, values with different superscripts mean significant difference (P<0.05)

表 9 水解单宁对暗纹东方鲀血清生化指标的影响

Tab. 9 Effect of different supplemental hydrolysable tannin levels on serum biochemical indices of obscure puffer

指标 indicator	谷草转氨酶/(U/L) AST	谷丙转氨酶/(U/L) ALT	白蛋白/(g/L) ALB	总蛋白/(g/L) TP
T0	10.87±2.02	3.80±0.58 ^b	13.05±0.48 ^{bc}	42.27±1.78 ^{ab}
T1	10.83±2.88	5.29±0.68 ^c	13.50±0.61 ^c	43.28±2.64 ^b
T2	11.86±1.80	3.35±0.63 ^{ab}	11.55±0.79 ^a	37.74±3.62 ^a
T3	10.61±0.97	2.47±0.38 ^a	12.48±0.47 ^{ab}	38.00±2.59 ^a

注：同列数据上标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

Notes: In the same column, values with different superscripts mean significant difference (P<0.05)

表 10 水解单宁对暗纹东方鲀消化酶活性

Tab. 10 Effect of different supplemental hydrolysable tannin levels on digestive enzyme of obscure puffer

指标 indicator	淀粉酶/(U/g prot) amylase		蛋白酶/(U/g prot) protease		胃脂肪酶/(U/gprot) lipase
	胃	全肠	胃	全肠	
	T0	0.96±0.16	0.89±0.05 ^a	56.47±0.12 ^a	337.34±11.34 ^a
T1	1.30±0.30	1.13±0.02 ^c	79.25±0.10 ^b	457.27±8.12 ^b	252.04±16.75 ^b
T2	1.20±0.11	0.94±0.03 ^b	90.31±0.03 ^b	495.05±10.38 ^c	222.09±21.14 ^b
T3	1.17±0.38	0.83±0.04 ^a	124.82±0.04 ^c	481.33±13.87 ^c	171.73±18.12 ^a

注：同列数据上标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

Notes: In the same column, values with different superscripts mean significant difference (P<0.05)

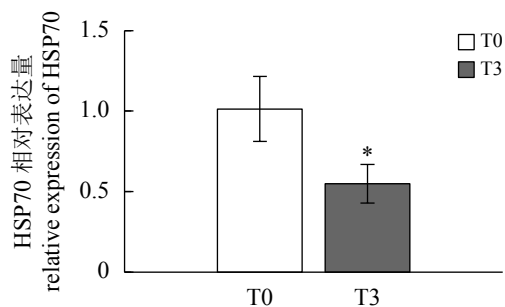


图1 T0和T3组HSP70基因在肝脏中的相对表达量

“*”表明T0与T3组之间存在显著差异 ($P < 0.05$)

Fig. 1 Relative expression of HSP70 in liver in T0 and T3 groups

“*” indicates a significant ($P < 0.05$) difference between T0 and T3 groups

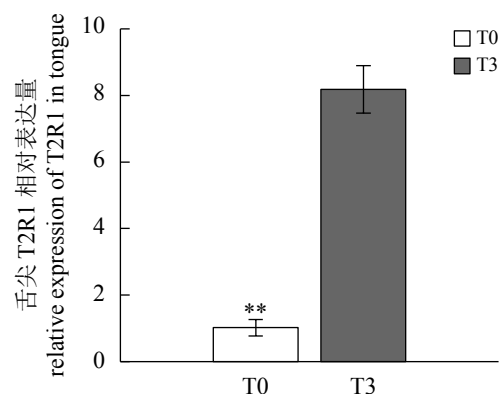


图2 T0和T3组T2R1基因在舌尖的相对表达量

“***”表明T0与T3组之间存在极显著差异

Fig. 2 Expression of T2R1 in tongue in T0 and T3 groups

“***” indicates an extremely significant ($P < 0.01$) difference between T0 and T3 groups

3.2 水解单宁对暗纹东方鲀摄食的影响

单宁是一种广泛存在于自然界, 具有明显涩味的植物次生代谢物, 一般具有抑制动物摄

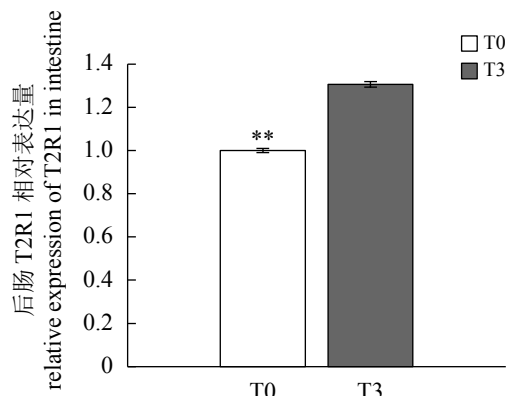


图3 T0和T3组T2R1基因在后肠的相对表达量

“***”表明T0与T3组之间存在极显著差异

Fig. 3 Expression of T2R1 in distal intestine in T0 and T3 groups

“***” indicates an extremely significant ($P < 0.01$) difference between T0 and T3 groups

食的作用^[27]。因此, 暗纹东方鲀在驯化前对含有单宁的饲料偏好系数较低。然而, 由于进化过程中动植物之间往往会形成相互协调制约的动态关系^[28], 部分动物对单宁也产生了适应性, 牛羊等草食性偶蹄动物可通过唾液腺分泌富含脯氨酸的蛋白质与饲料中的单宁结合, 改善其适口性以提高摄食率, 同时单宁还通过刺激肾上腺素分泌以提高淀粉酶相关基因的表达, 促使单宁与唾液淀粉酶结合防止单宁进入消化道后与饲料蛋白质结合降低消化率^[29, 40]。本实验中, 经过8周驯化, 4组暗纹东方鲀对T2组饲料的偏好指数均显著提高, 推测是由于食物的可选择性降低, 部分生理机能产生适应性变化, 导致摄食行为改变, 最终调整饲料摄入量以确保基本的营养需求, 推测与味觉受体表达、神经及激素调节有关^[30]。

单宁是苦味物质中第一个对苦味受体产生

表11 驯化前后不同组别暗纹东方鲀对不同实用饲料的摄食偏好指数

Tab. 11 Feeding preference index of obscure puffer with different practical diets groups before and after domestication

项目 item	驯化前 before domestication	驯化后T0 T0 after domestication	驯化后T1 T1 after domestication	驯化后T2 T2 after domestication	驯化后T3 T3 after domestication
T0饲料	1.28±0.00 ^d	1.23±0.01 ^c	1.22±0.01 ^c	1.20±0.03 ^c	1.21±0.01 ^c
T1饲料	1.02±0.01 ^c	0.96±0.06 ^b	0.89±0.07 ^b	0.89±0.07 ^b	0.84±0.05 ^b
T2饲料	0.93±0.01 ^b	1.39±0.04 ^d	1.51±0.07 ^d	1.55±0.03 ^d	1.53±0.03 ^d
T3饲料	0.79±0.01 ^a	0.56±0.03 ^a	0.54±0.11 ^a	0.52±0.01 ^a	0.57±0.02 ^a

注: 同列数据上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

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

高效应的天然激动剂,可以使苦味受体的表达增加^[31]。脊椎动物中,食物中的苦味物质对动物苦味受体的数量有着决定性作用,若经常与苦味物质接触,则苦味受体基因表达量增加,其对苦味的探测能力增强^[32-33]。本实验中,经过驯化,T3组实验鱼的苦味受体表达量显著高于对照组,说明暗纹东方鲀对苦味的敏感程度增加。结合摄食偏好结果,当饲料中单宁含量为0.75%(T2组)时,本实验中暗纹东方鲀可能达到了营养需求和味觉偏好的最佳平衡。

3.3 水解单宁对暗纹东方鲀消化及代谢的影响

体外实验中,单宁与消化酶结合会改变酶的空间结构,从而抑制其活性^[34]。但许多研究表明,饲料单宁可有效提高动物体内消化酶活性,这可能与生物体内复杂多变的环境有关,且单宁对消化酶的作用还取决于单宁本身的结构、消化酶的种类以及实验的对象。肉兔日粮中添加1.0%栗木单宁,可以显著提高淀粉酶和胰蛋白酶活性^[35];公鸡饲料中添加2.5%水解单宁,生长率与蛋白质效率降低,肝脏蛋白酶活性升高^[12];肉仔鸡饲料中添加1.5 g/kg水解单宁,前期对生长有显著抑制作用,但经过一段时间的适应,对生长与饲料效率均有促进作用,且肠道中的淀粉酶、胰蛋白酶及脂肪酶活性均显著提高^[36]。多酚类化合物对脂肪酶活性则多有抑制作用^[37-38]。在饲料中添加2.5%水解单宁,小鼠消化道脂肪酶活性显著降低^[39]。本实验结果与上述研究结论相似,即水解单宁组暗纹东方鲀消化道淀粉酶及蛋白酶显著升高,胃脂肪酶活性则显著降低。淀粉酶活性显著升高可能是由于单宁刺激交感神经通路促进淀粉酶相关基因的表达。对小鼠饲喂高含量单宁的饲料,小鼠唾液中蛋白浓度显著高于不添加单宁的对照组,淀粉酶含量也显著上升,这被认为是抑制单宁生物活性的一种方式^[40]。脂肪酶活性降低,可能是由于单宁和脂肪酶之间的结合强度较大,因此优先与脂肪酶结合所致^[39]。消化酶活性的不同表明单宁对不同营养物质消化降解的复杂性。

鱼类对糖的利用能力较低,以蛋白质和脂肪为主要能量来源。在小鼠饲料中添加2.5%单宁,蛋白质表观消化率显著下降^[39];在对棕色田鼠和小鼠的研究中,随单宁含量升高,相对日食量和蛋白质消化率均显著下降^[41]。肝脏转氨酶活力

一定程度上反映了蛋白质的合成能力,血清总蛋白可用于机体营养状态的监测,在营养不良的情况下,血清白蛋白含量明显下降^[42]。本实验中,肌肉蛋白质各组无显著差异,水解单宁组肝脏谷丙及谷草转氨酶活性等于或高于对照组,肌肉EAA及TAA水平则显著低于对照组,但水解单宁0.75%和1.25%组血清总蛋白和白蛋白含量降低,说明单宁添加量达到0.75%时易造成机体的营养不良。有研究表明,单宁酸与蛋白质结合时,在跨膜运输过程中会导致膜蛋白变性失活,降低蛋白质及其分解产物的吸收,影响内源性蛋白质的合成^[43-44]。单宁还具有抗菌性,抑制微生物发酵,降低食物中蛋白质及氨基酸的可利用性,甚至影响动物肾脏和肝脏的功能,导致动物内源氮损失^[45]。在本实验中,胃肠蛋白酶活性及肝脏转氨酶活性的增强,或许是在营养不良状态下提高机体蛋白质消化吸收和内源合成能力的一种补偿性调节机制。

3.4 水解单宁对暗纹东方鲀肝脏健康及抗氧化的影响

体外实验显示,单宁有较强的抗氧化活性,一般能有效清除多种自由基^[7,46],在低密度脂蛋白的氧化体系中加入单宁,可以抑制其脂质过氧化产物的生成,防止超SOD及谷胱甘肽转移酶活性降低^[47]。然而单宁浓度较高时,其抗氧化性极有可能转变为促氧化性,通过增加细胞内游离铁离子和亚铁离子水平,产生超氧阴离子自由基,引起脂质过氧化,甚至与DNA链结合使其断裂^[48]。用高单宁含量的饲料饲喂布式田鼠时,其肝脏CAT及谷胱甘肽过氧化物酶活性显著升高,推测是由于单宁水解产物之一没食子酸在体内快速氧化生成大量过氧化氢,从而诱导抗氧化酶活性增加^[49-50]。SOD和CAT是动物体内清除自由基的重要抗氧化酶,当动物受到胁迫时,抗氧化酶活性升高以降低活性自由基的伤害,但若损伤进一步加剧,酶活性则会回落甚至被抑制,导致膜脂质过氧化产物MDA增加。

本实验中,水解单宁组暗纹东方鲀肝脏及血清MDA含量均不同程度高于对照组,肝脏T-AOC则显著低于对照组,血清谷丙转氨酶活性先升后降,由此引起的脂肪氧化应激将不利于暗纹东方鲀肝脏健康的保护,水解单宁添加量达到1.25%时尤为明显。HSP70是一种用于协同免疫的蛋白

质,具有使细胞或生物体从应激状态中恢复的能力,本实验中T3组肝脏HSP70表达量显著低于对照组,血清中CAT活性显著降低,水解单宁组暗纹东方鲀肝脏SOD及CAT活性升高,说明机体虽然提高了部分抗氧化酶活性,但仍不足以产生积极的应答来应对单宁造成的刺激,这也说明饲料中水解单宁添加量达到1.25%时会损伤暗纹东方鲀的抗应激能力。

参考文献:

- [1] Yigit N O, Olmez M. Effects of cellulase addition to canola meal in tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) diets[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2011, 17(2): e494-e500.
- [2] Yuan X, Zhou Y, Liang X F, et al. Effect of dietary glutathione supplementation on the biological value of rapeseed meal to juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2015, 21(1): 73-84.
- [3] Xu W J, Jin J Y, Han D, et al. Physiological and transcriptomic responses to fishmeal-based diet and rapeseed meal-based diet in two strains of gibel carp (*Carassius gibelio*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(1): 267-286.
- [4] Zhou Q L, Habte-Tsion H M, Ge X, et al. Graded replacing fishmeal with canola meal in diets affects growth and target of rapamycin pathway gene expression of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2018, 24(1): 300-309.
- [5] Collins S A, Desai A R, Mansfield G S, et al. The effect of increasing inclusion rates of soybean, pea and canola meals and their protein concentrates on the growth of rainbow trout: concepts in diet formulation and experimental design for ingredient evaluation[J]. *Aquaculture*, 2012, 344-349: 90-99.
- [6] 徐建雄,叶陈梁,王晶.双低菜籽粕中营养成分与有毒有害物质的分析[J].*粮食与饲料工业*,2005(11):28-29. Xu J X, Ye C L, Wang J. Analysis on nutritive ingredients and deleterious substances in double-low rapeseed meal[J]. *Cereal & Feed Industry*, 2005(11): 28-29(in Chinese).
- [7] Kolečkar V, Kubikova K, Rehakova Z, et al. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health[J]. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2008, 8(5): 436-447.
- [8] Schofield P, Mbugua D M, Pell A N. Analysis of condensed tannins: a review[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2001, 91(1/2): 21-40.
- [9] 艾庆辉,苗又青,麦康森.单宁的抗营养作用与去除方法的研究进展[J].*中国海洋大学学报*,2011,41(1/2):33-40. Ai Q H, Miao Y Q, Mai K S. The anti-nutritional effects and the degradations of dietary tannins: a review[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2011, 41(1/2): 33-40(in Chinese).
- [10] Schiavone A, Guo K, Tassone S, et al. Effects of a natural extract of chestnut wood on digestibility, performance traits, and nitrogen balance of broiler chicks[J]. *Poultry Science*, 2008, 87(3): 521-527.
- [11] 陈赛娟,谷新晰,刘涛,等.单宁酸对家兔肠道形态和内源酶活性的影响[J].*饲料工业*,2015,36(9):14-16. Chen S J, Gu X X, Liu T, et al. Effect of tannic acid on intestinal morphology and endogenous enzyme activity of rabbits[J]. *Feed Industry*, 2015, 36(9): 14-16.
- [12] Marzo F, Urdaneta E, Santidrián S. Liver proteolytic activity in tannic acid-fed birds[J]. *Poultry Science*, 2002, 81(1): 92-94.
- [13] Prusty A K, Sahu N P, Pal A K, et al. Effect of dietary tannin on growth and haemato-immunological parameters of *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 136(1/2): 96-108.
- [14] Omnes M H, Le Goasduff J, Le Delliou H, et al. Effects of dietary tannin on growth, feed utilization and digestibility, and carcass composition in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.)[J]. *Aquaculture Reports*, 2017, 6: 21-27.
- [15] Varanka Z, Rojik I, Varanka I, et al. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2001, 128(3): 467-477.
- [16] 祝璟琳,王国良.鱼类HSP70的研究进展[J].*宁波大学学报(理工版)*,2007,20(4):446-450. Zhu J L, Wang G L. The research progress on HSP70 in fish species[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science and Engineering Edition)*, 2007, 20(4): 446-450(in Chinese).
- [17] 孙健.草鱼鲜味受体功能和进化的初步研究[D].武汉:华中农业大学,2014:9-17.

- Sun J. A preliminary study on function and evolution of umami taste receptors genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014: 9-17(in Chinese).
- [18] Herness M S, Gilbertson T A. Cellular mechanisms of taste transduction[J]. *Annual Review of Physiology*, 1999, 61: 873-900.
- [19] Stale R, Stale J H, Storebakken T. Adaptation to soybean meal in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Aquaculture*, 1997, 153(3): 263-272.
- [20] 王少梅, 陈少莲, 崔奕波. 用氯仿-甲醇抽提法测定鱼体脂肪含量的研究[J]. *水生生物学报*, 1993, 17(2): 193-196.
- Wang S M, Chen S L, Cui Y B. On The procedures of chloroform-methanol extraction for the determination of lipid content of fish samples[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1993, 17(2): 193-196(in Chinese).
- [21] Xue M, Xie S Q, Cui Y B. Effect of a feeding stimulant on feeding adaptation of gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch), fed diets with replacement of fish meal by meat and bone meal[J]. *Aquaculture Research*, 2004, 35(5): 473-482.
- [22] Rivera-Méndez C, Plascencia A, Torrentera N, *et al.* Effect of level and source of supplemental tannin on growth performance of steers during the late finishing phase[J]. *Journal of Applied Animal Research*, 2017, 45(1): 199-203.
- [23] Lee S H, Shinde P L, Choi J Y, *et al.* Effects of tannic acid supplementation on growth performance, blood hematology, iron status and faecal microflora in weanling pigs[J]. *Livestock Science*, 2010, 131(2/3): 281-286.
- [24] Jamroz D, Wiliczekiewicz A, Skorupińska J, *et al.* Effect of sweet chestnut tannin (SCT) on the performance, microbial status of intestine and histological characteristics of intestine wall in chickens[J]. *British Poultry Science*, 2009, 50(6): 687-699.
- [25] 李俊年, 刘季科, 陶双伦. 单宁酸对根田鼠食物摄入量 and 蛋白质消化率的效应[J]. *兽类学报*, 2003, 23(1): 52-57.
- Li J N, Liu J K, Tao S L. Effects of tannic acid on the food intake and protein digestibility of root voles[J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2003, 23(1): 52-57.
- [26] 吴晓颖. 单宁酸对布氏田鼠下丘脑弓状核食欲调控基因表达和血清瘦素水平的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2015: 46-47.
- Wu X Y. Effect of tannic acid on the expression of appetite controlling genes in the arcuate nucleus of hypothalamus and serum leptin levels of Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*)[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2015: 46-47(in Chinese).
- [27] 王亚军, 邹传山, 王若茜, 等. 3种植物次生代谢物质对舞毒蛾的杀虫活性分析[J]. *北京林业大学学报*, 2017, 39(11): 75-81.
- Wang Y J, Zou C S, Wang R X, *et al.* Insecticidal activity analysis of three plant secondary metabolites on *Lymantria dispar*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2017, 39(11): 75-81(in Chinese).
- [28] Mode C J. A mathematical model for the co-evolution of obligate parasites and their hosts[J]. *Evolution*, 1958, 12(2): 158-165.
- [29] Shimada T. Salivary proteins as a defense against dietary tannins[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2006, 32(6): 1149-1163.
- [30] Charnov E L. Optimal foraging: attack strategy of a mantid[J]. *The American Naturalist*, 1976, 110(971): 141-151.
- [31] Soares S, Kohl S, Thalmann S, *et al.* Different phenolic compounds activate distinct human bitter taste receptors[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(7): 1525-1533.
- [32] Bufe B, Hofmann T, Krautwurst D, *et al.* The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to β -glucopyranosides[J]. *Nature Genetics*, 2002, 32(3): 397-401.
- [33] Li D Y, Zhang J Z. Diet shapes the evolution of the vertebrate bitter taste receptor gene repertoire[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2014, 31(2): 303-309.
- [34] Ono K, Hasegawa K, Naiki H, *et al.* Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) : Molecular Basis of Disease*, 2004, 1690(3): 193-202.
- [35] 刘华伟. 栗树单宁的抗氧化能力及其对肉兔生产性能的影响研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010: 18-26.
- Liu H W. Study on antioxidant activity of chestnut tannins and its effect on growth performance of rabbits[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010: 18-26(in Chinese).

- [36] 陈宝江, 裴素俭, 魏忠华, 等. 单宁酸对肉仔鸡生产性能和消化道酶活性的影响研究[J]. *中国家禽*, 2012, 34(20): 26-28, 32.
Chen B J, Pei S J, Wei Z H, *et al.* Effect of tannic acid on production performance and digestive enzyme activity of broiler[J]. *China Poultry*, 2012, 34(20): 26-28, 32(in Chinese).
- [37] Sugiyama H, Akazome Y, Shoji T, *et al.* Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(14): 5906-5906.
- [38] Adisakwattana S, Moonrat J, Srichairat S, *et al.* Lipid-lowering mechanisms of grape seed extract (*Vitis vinifera* L) and its antihyperlipidemic activity[J]. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010, 4(20): 2113-2120.
- [39] Nyman M E, Björck I M. In vivo effects of phytic acid and polyphenols on the bioavailability of polysaccharides and other nutrients[J]. *Journal of Food Science*, 1989, 54(5): 1332-1335.
- [40] Da Costa G, Lamy E, Capela e Silva F, *et al.* Salivary amylase induction by tannin-enriched diets as a possible countermeasure against tannins[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2008, 34(3): 376-387.
- [41] 郭彩茹, 路纪琪. 单宁酸对棕色田鼠和小鼠食物选择、日食量和蛋白质消化率的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(11): 42-46.
Guo C R, Lu J Q. Effect of tannic acid on food selection, food intake and protein digestion rate in mandarin vole and mice[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2009, 19(11): 42-46(in Chinese).
- [42] Moro G V, Camilo R Y, Moraes G, *et al.* Dietary non-protein energy sources: growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá, *Rhamdia quelen*[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(3): 394-400.
- [43] Frazier R A, Deaville E R, Green R J, *et al.* Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 51(2): 490-495.
- [44] 何洪英. 单宁的生理活性[J]. *饮料工业*, 2001, 4(5): 19-21.
He H Y. Physiological activities of tannin[J]. *Beverage Industry*, 2001, 4(5): 19-21(in Chinese).
- [45] Shimada T, Saitoh T. Re-evaluation of the relationship between rodent populations and acorn masting: a review from the aspect of nutrients and defensive chemicals in acorns[J]. *Population Ecology*, 2006, 48(4): 341-352.
- [46] 田燕, 邹波, 董晓倩, 等. 不同聚合度柿子单宁的体内外抗氧化作用[J]. *食品科学*, 2013, 34(13): 54-60.
Tian Y, Zou B, Dong X Q, *et al.* In vitro and in vivo antioxidant activity of persimmon tannin fractions of different degrees of polymerization[J]. *Food Science*, 2013, 34(13): 54-60(in Chinese).
- [47] Pyla R, Kim T J, Silva J L, *et al.* Enhanced antimicrobial activity of starch-based film impregnated with thermally processed tannic acid, a strong antioxidant[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 137(2/3): 154-160.
- [48] Labieniec M, Gabryelak T, Falcioni G. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*[J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2003, 539(1/2): 19-28.
- [49] Gil-Longo J, González-Vázquez C. Vascular pro-oxidant effects secondary to the autoxidation of gallic acid in rat aorta[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2010, 21(4): 304-309.

Effects of supplemental hydrolysable tannin on feeding preference, nutrition digestion and antioxidant ability of obscure puffer (*Takifugu fasciatus*)

YAO Jingting^{1,2,3}, KONG Chun^{1,2,3}, HUA Xueming^{1,2,3*}, SHUI Chun⁴, SHI Yonghai⁴

(1. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition, Ministry of Agriculture Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai 200433, China)

Abstract: Total 720 *Takifugu fasciatus* (initial weight 39.84 ± 3.09 g) were fed with four isonitrogenous and isoenergetic semi-purified diets for eight weeks: control diet (T0) with hydrolysable tannin-free protein sources (containing 43% fish meal) and three experimental diets supplemented with 0.25%, 0.75%, and 1.25% hydrolysable tannin (called T1, T2, and T3, respectively). In experimental diets, crude protein content was balanced by casein when fish meal level decreased, and the ratio of casein to tannin was nearly equal to that of protein content to tannin content in rapeseed meal (16.8:1). The results showed that the weight gain rate was not influenced, while feed coefficient ratio decreased significantly with increasing tannin level; the muscle crude lipid of T2 was significantly higher than those of T0 and T1, and the amino acid level of T0 was significantly higher than other groups; for liver antioxidant index, the activity of catalase (CAT) in T0 was significantly lower than other groups, while total antioxidative capacity (T-AOC) in T0 was significantly higher than other groups, the activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malonaldehyde (MDA) in T3 was significantly higher than other groups; for serum antioxidant index, the activity of SOD showed no significant difference ($P > 0.05$), while the content of MDA in T0 was significantly lower than other groups, and the activity of catalase (CAT) decreased with increasing tannin level; for serum biochemical indices, the activity of ALT first increased, and then decreased at T2, paralleling the result of ALT in liver, the content of album (ALB) in T1 was higher than T3 ($P > 0.05$) and T1 was significantly higher than T0 and T3 groups, the total protein (TP) content of T1 was higher than T0, and T1 was significantly higher than T2 and T3; the activity of intestinal amylase in T1 and T2 groups were significantly higher than T0, the activity of protease increased with increasing tannin level in both stomach and intestine, the activity of lipase decreased in stomach; the expression of T2R1 mRNA in T3 was significantly higher than T0 both in tongue and intestine ($P < 0.01$); the expression of HSP70 mRNA in liver in T0 was significantly higher than T3. Furthermore, the preference decreased with increasing tannin level before feeding test, while after 8-week domestication, the fish preferred to diet containing 0.75% tannin in all groups. In conclusion, feeding obscure puffer with diet containing no more than 1.25% supplemental hydrolysable tannin would not decrease growth and feed coefficient ratio, while it would change the digestion of protein, lipid, carbohydrate and anabolism of protein, and when the amount of supplemental hydrolysable tannin was up to 1.25%, antioxidant ability and anti-stress ability were both damaged.

Key words: *Takifugu fasciatus*; hydrolysable tannin; feeding preference; protein metabolism; antioxidant ability

Corresponding author: HUA Xueming. E-mail: xmhua@shou.edu.cn

Funding projects: Opening Project of Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, China