



## 低鱼粉饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾生长性能和抗胁迫机能的影响

姜德田<sup>1</sup>, 汪毅<sup>1</sup>, 黄旭雄<sup>1,2,3\*</sup>, 王伟隆<sup>1,2,3</sup>, 张圣鑫<sup>4</sup>

- (1. 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;  
2. 上海海洋大学, 上海市水产养殖工程技术研究中心, 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. 泰州福益生物科技股份有限公司, 江苏泰州 225300)

**摘要:** 为研究在养殖过程中降低鱼粉用量的同时保持凡纳滨对虾良好的生长性能和抗逆能力, 实验在含10%鱼粉的基础饲料中, 分别添加酶解豆粕(PSM) 0%(A)、2.5%(B)、3.5%(C)、4.5%(D)、5.5%(E)制成5组等氮等能饲料, 分别投喂初始体质量为(0.45±0.02) g的凡纳滨对虾幼虾8周, 检测对虾生长性能及抗胁迫机能。结果显示, 8周养殖实验结束后, 各实验组对虾的终末体质量为14.65~15.38 g/尾, 各组间对虾终末均重、成活率和饲料系数指标均无显著性差异; A组对虾肌肉粗蛋白质含量显著低于其他各实验组; C组、D组和E组对虾肌肉粗脂肪含量显著高于A组; 各组间灰分和水分均无显著性差异; D组和E组对虾肝胰腺蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、血清溶菌酶和血清总超氧化物歧化酶活性(T-SOD)均显著高于A组; A组对虾血清丙二醛(MDA)含量显著高于D组和E组。人工急性感染高剂量副溶血性弧菌的胁迫实验中, A组对虾在弧菌感染48和60 h时的累积死亡率均显著高于D组对虾同期的累积死亡率; 低剂量副溶血性弧菌人工急性感染后, 在凡纳滨对虾鳃组织中检测Toll受体、免疫缺陷(IMD)和溶菌酶3种免疫相关基因的表达量, 结果显示, 对虾Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量最大峰值分别出现在添加酶解豆粕的C组、B组和D组, 峰值出现时刻分别为感染后24、42和24 h。研究表明, 含10%鱼粉的饲料中添加0%~5.5%酶解豆粕对凡纳滨对虾的生长性能改善效果不显著, 酶解豆粕会显著提高凡纳滨对虾肌肉粗蛋白质含量和粗脂肪含量; 显著降低对虾血清丙二醛含量; 同时也会显著改变凡纳滨对虾对弧菌的抵抗力及其免疫相关基因的时空表达, 酶解豆粕添加量达到4.5%时可使养殖的凡纳滨对虾获得最佳的抗弧菌能力。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 酶解豆粕; 生长性能; 抗胁迫机能

中图分类号: S 963.3

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)因其具有生长速度快, 盐度适应广等优点, 成为我国养殖产量最高的经济虾类。凡纳滨对虾对饲料中蛋白质的需求量通常为35%~42%<sup>[1-3]</sup>, 其中鱼粉一直是对虾饲料中重要的蛋白质来源, 也是影

响饲料配方成本的重要因素。实际生产中鱼粉用量一般不低于20%, 饲料中鱼粉用量的降低, 会造成对虾生长缓慢、抗病力降低等问题<sup>[4-5]</sup>。但是随着资源和环境压力的增大, 降低偏肉食性水产动物饲料配方中鱼粉的用量, 以豆粕等

收稿日期: 2019-05-18 修回日期: 2019-07-03

资助项目: 中国-东盟海上合作基金项目(DF)

通信作者: 黄旭雄, E-mail: xxhuang@shou.edu.cn

植物蛋白部分替代鱼粉是当前水产动物营养饲料研究的重要内容<sup>[6-7]</sup>。然而水产动物饲料配方中过量使用豆粕通常会因植酸等抗营养因子的存在而影响饲料的适口性、养殖动物的消化机能、生长性能和抗胁迫机能<sup>[8-12]</sup>。有研究发现,南方鲇(*Silurus meridionalis*)对蛋白质、脂肪和能量的消化率随着大豆蛋白对鱼粉替代率的提高而逐步下降,当替代量达到65%时,其消化率显著低于其余各组<sup>[13]</sup>。饲料中豆粕蛋白替代鱼粉蛋白的水平超过40%时,会显著降低军曹鱼(*Rachycentron canadum*)的生长和饲料利用率<sup>[14]</sup>。目前通过发酵或酶解方式是去除豆粕中抗营养因子、提高配方中豆粕使用量的重要措施<sup>[15-16]</sup>。通过酶解技术得到的大豆多肽,相比于普通豆粕具有营养全面、易消化吸收等诸多特性<sup>[17]</sup>,尤其是在抗氧化<sup>[18]</sup>、调节非特异性免疫等方面<sup>[19]</sup>具有很好的效果。对舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)饲料中鱼粉替代的研究表明,普通去皮豆粕可以替代饲料中25%的鱼粉,而经酶解处理的豆粕则能够替代50%的鱼粉<sup>[20]</sup>。

本实验拟在含10%鱼粉的基础饲料中,设计5个梯度的酶解豆粕添加量,制成5组等氮等能的实验饲料分别饲养凡纳滨对虾幼虾,以此评估低鱼粉饲料中使用酶解豆粕对凡纳滨对虾生长、体组成、消化能力、抗胁迫能力以及免疫基因表达等方面的影响,以期为低鱼粉饲料中酶解豆粕的合理使用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 饲料的制备

本实验所用酶解豆粕由江苏泰州福益生物科技股份有限公司提供,通过蛋白酶和非淀粉多糖酶定位酶解普通豆粕,所得酶解豆粕粗蛋白含量为48%±1%,肽分子量分布由江南大学分析测试中心检测(GB/T 22492-2008)(表1)。实验所用普通豆粕粗蛋白含量为46%±1%,普通豆粕中肽分子量范围<1 000的比例一般在50%左右<sup>[21-22]</sup>。

制作5种不同酶解豆粕添加量的等氮等能饲料(表2)。所有原料经破碎后,过80目筛网,按照饲料配方比例称重并采用四分法逐级扩散混匀,依次加入油脂和水搓匀,经绞肉机挤压并制粒,90℃熟化20 min,于阴凉通风处晾干,将成品饲料破碎成适合养殖期间各生长阶段对虾采食的饲料粒径,-20℃冰箱保存。

<http://www.scxuebao.cn>

表1 酶解豆粕肽分子量分布

Tab. 1 Molecular weight distribution of peptides from proteolytic soybean meal

分子量范围 molecular weight range	百分比/% percentage
>5 000	10.21
3 000~5 000	4.43
2 000~3 000	4.22
1 000~2 000	8.32
500~1 000	11.49
180~500	16.63
<180	44.71

### 1.2 养殖管理

实验用凡纳滨对虾虾苗购自上海联旺水产科技有限公司(养殖水体盐度为5),虾苗暂养于水泥池内,逐步淡化,直至水体盐度降至0。淡化期间,投喂商品虾片,虾苗暂养30 d,挑选规格整齐、健康的对虾1 000尾,平均分成5组,每组设4个重复,初始均重为(0.45±0.02) g,随机分配到同一水泥池(5.0 m×11.0 m×1.2 m)中的20个网箱(1.0 m×1.0 m×1.2 m)内,每个网箱内投放50尾幼虾。每日投喂4次,分别在5:30、10:30、16:30和22:30等4个时间点投喂,日投喂量约占虾体质量的5%~8%,并根据天气、摄食情况以及生长阶段进行调整。养殖实验持续8周,养殖期间每周换水2次,进水经200目滤水袋过滤,水体透明度维持在20~40 cm。养殖期间保持连续充气,水体溶氧量控制在6 mg/L以上,pH为7.8~8.5,氨氮浓度低于0.2 mg/L,水温为(30±2)℃,水体盐度为0。

### 1.3 样品采集

生长性能测定 养殖8周,停止投喂24 h后,逐个网箱称重、计数。每个网箱随机取凡纳滨对虾8尾,用1 mL一次性无菌注射器于对虾围心腔处取血淋巴后置于1.5 mL离心管中,放置于冰盒保存;在托盘上快速解剖对虾,取肝胰腺和肌肉于冰盒保存,并随机取3尾对虾的鳃迅速置于盛有RNA保存液(北京天根公司)的1.5 mL的离心管中,血淋巴经4℃、10 000 r/min离心10 min取上清液,所有样品于-80℃冰箱保存。各类生长指标计算方法如下:

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

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

表 2 实验饲料组成及营养水平(干物质)  
Tab. 2 Compositions and nutrient levels of the experimental diets (dry matter)

项目 items	A (0% PSM)	B (2.5% PSM)	C (3.5% PSM)	D (4.5% PSM)	E (5.5% PSM)
<b>原料 ingredients</b>					
秘鲁鱼粉 brown fish meal	10	10	10	10	10
肉粉 meat meal	4	4	4	4	4
玉米蛋白粉 corn protein meal	5	5	5	5	5
豆粕 soybean meal	30	27.5	26.5	25.5	24.5
花生粕 peanut meal	8	8	8	8	8
面粉 flour	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7
血粉 spray dried blood powder	3	3	3	3	3
鱿鱼膏 squid paste	2	2	2	2	2
酶解豆粕 proteolytic soybean meal <sup>1</sup>	0	2.5	3.5	4.5	5.5
啤酒酵母 beer yeast	3	3	3	3	3
鱼油 fish oil	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
卵磷脂 lecithin	2	2	2	2	2
氯化胆碱 choline chloride	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
虾多矿 mineral premix <sup>2</sup>	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
虾多维 vitamin premix <sup>3</sup>	1	1	1	1	1
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2	2	2	2	2
合计 total	100	100	100	100	100
<b>营养组成 nutritional compositions</b>					
粗蛋白质 crude protein	39.66	39.59	39.21	39.54	39.44
粗脂肪 crude lipid	12.77	13.10	12.36	12.47	12.91
水分 moisture	11.63	11.55	11.68	12.08	11.84
灰分 ash	7.58	7.69	7.67	7.41	7.75

注: 1. 酶解豆粕: 由泰州福益生物科技股份有限公司提供; 2. 每千克矿物盐预混料中含有: Ca(CaCl<sub>2</sub>) 10.5 g, K(KCl) 90 g, Mg(MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) 12 g, Fe(FeSO<sub>4</sub>) 1.0 g, Cu(CuSO<sub>4</sub>) 3.0 g, Zn(ZnSO<sub>4</sub>) 10 g, Mn(MnSO<sub>4</sub>) 3.8 g, Co(CoCl<sub>2</sub>) 0.8 g, Se(Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) 20 mg; 3. 每千克维生素预混料中含有: VA 8 000 000 IU, VD 2 000 000 IU, VE 50 g, VK 10 g, VB<sub>1</sub> 5 g, VB<sub>2</sub> 15 g, VB<sub>6</sub> 8 g, VB<sub>12</sub> 0.02 g, 烟酰胺 40 g, D-泛酸钙 25 g, 叶酸 2.5 g, 生物素 0.08 g, 肌醇 100 g

Notes: 1. proteolytic soybean meal: provided by Taizhou Full Yield Biotechnology Co., Ltd; 2. Contained the following per kg of mineral premix: Ca(CaCl<sub>2</sub>) 10.5 g, K(KCl) 90 g, Mg(MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) 12 g, Fe(FeSO<sub>4</sub>) 1.0 g, Cu(CuSO<sub>4</sub>) 3.0 g, Zn(ZnSO<sub>4</sub>) 10 g, Mn(MnSO<sub>4</sub>) 3.8 g, Co(CoCl<sub>2</sub>) 0.8 g, Se(Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) 20 mg; 3. Contained the following per kg of vitamin premix: VA 8 000 000 IU, VD 2 000 000 IU, VE 50 g, VK 10 g, VB<sub>1</sub> 5 g, VB<sub>2</sub> 15 g, VB<sub>6</sub> 8 g, VB<sub>12</sub> 0.02 g, nicotinamide 40 g, calcium D-pantothenate 25 g, folic acid 2.5 g, biotin 0.08 g, inositol 100 g

饲料系数(feed conversion ratio, FCR)= $W_f/(W_t - W_0)$

特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d)= $(\ln W_t/N_t - \ln W_0/N_0)/t \times 100\%$

式中,  $N_t$ 为终末尾数,  $N_0$ 为初始尾数,  $W_f$ 为每个网箱所投饲料总重(g);  $W_t$ 和 $W_0$ 分别为实验结束和开始时每个网箱虾总重(g);  $t$ 为实验天数(d)。

高浓度副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)人工急性感染实验 实验所用副溶血性弧菌

菌株取自上海海洋大学病原库。8周实验结束后, 每组随机捞取30尾对虾, 分3个平行, 置于15个网箱(50 cm×30 cm×80 cm)中, 每个网箱10尾。菌种需经虾体活化后于硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(TCBS)分离培养, 预实验需注射活化菌液于同规格虾体中, 观察96 h内凡纳滨对虾的死亡情况, 筛选出最适半致死浓度。根据预实验结果, 每尾虾腹部注射35 μL  $6.25 \times 10^7$  CFU/mL经活化培养后分离的副溶血性弧菌菌液,

对照组取同规格对虾注射无菌生理盐水。实验期间持续曝气,水温控制在(30±1)°C。注射菌液后连续观察网箱中各饲料组对虾的死亡情况,在24、36、48、72、84和96 h时分别统计各网箱的累积死亡率。

#### 低浓度副溶血性弧菌人工急性感染实验

8周实验结束后,每组随机捞取75尾凡纳滨对虾,分成3个平行,放置于15个(50 cm×30 cm×80 cm)网箱中,根据预实验的结果,活菌液用4%甲醛溶液灭活1 h,4 °C、3 000 r/min离心10 min,取底部离心物用生理盐水反复冲洗、离心。每尾虾腹部注射25 μL 1.25×10<sup>6</sup> CFU/mL经灭活的副溶血性弧菌菌液,对照组取同规格的对虾注射无菌生理盐水。养殖水体温度为(30±1)°C,水体盐度为0,24 h持续曝气。分别在0、6、12、18、24、30、36、42和48 h从每个网箱取3尾对虾,采集鳃组织并分别存放于装有RNA保存液(北京天根公司)的离心管中,-80 °C保存,用于测定鳃组织中免疫相关基因的相对表达量。

#### 1.4 样品检测分析

##### 饲料及凡纳滨对虾肌肉常规检测分析

饲料和肌肉中的水分含量采用105 °C烘箱干燥恒重法检测(GB/T 6435—2014);粗脂肪采用氯仿-甲醇法检测(GB/T 6433—2006);灰分采用550 °C马弗炉灼烧法检测(GB/T 6438—2007);粗蛋白质采用凯氏定氮仪(Kjeltec™ 2300,瑞典)检测(GB/T 6432—2018)。

**血清及肝胰腺生化指标** 对虾肝胰腺用冰浴匀浆处理,稀释成相应的组织匀浆液,匀浆液于3 000 r/min、4 °C条件下离心10 min,取上清液。肝胰腺蛋白酶活性采用Folin-酚法、脂肪

酶活性采用对硝基苯酚法<sup>[23]</sup>、淀粉酶活性采用淀粉-碘比色法(南京建成试剂盒)。离心后的血清经生理盐水稀释后,按照试剂盒说明书(南京建成生物工程研究所)测定各抗氧化指标。

**低浓度副溶血性弧菌感染后凡纳滨对虾免疫相关基因表达量检测** 按照Trizol试剂盒(TaKaRa)说明书从对虾鳃组织中提取总RNA。用NanoDrop2000超微量分光光度计测定其OD<sub>260nm</sub>和OD<sub>280nm</sub>比值,并用1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA完整性。将提取的总RNA用TaKaRa公司PrimeScript®RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒反转录为cDNA,-20 °C保存。

参照凡纳滨对虾Toll受体mRNA(GenBank: DQ923424.1)、溶菌酶 mRNA(GenBank: AY170126.2)、IMD mRNA (GenBank: FJ592176.1)和β-actin基因(GenBank:AF300705)设计荧光定量引物,所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表3)。

采用RT-PCR仪(Bio-rad公司)按照SYBR®Premix Ex Taq™ (TliRNaseHPlus)试剂盒(TaKaRa公司)说明书进行荧光定量PCR(RT-PCR)检测,RT-PCR程序为95 °C、30 s预变性;95 °C、10 s,60 °C、30 s,共39个循环;反应完成后温度由65 °C上升到90 °C,测定溶解曲线检测反应特异性。结果采用相对表达量的形式,根据2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>算法法进行计算。

#### 1.5 数据处理和统计分析

实验结果用平均数±标准差(mean±SD)的方式表示,数据使用SPSS 25.0分析软件中的单因素方差分析(One-Way ANOVA)和Duncan氏多重比较法进行差异显著性分析,P<0.05则表示为差异显著。

表3 凡纳滨对虾β-actin内参、Toll受体、IMD、溶菌酶mRNA引物序列

Tab. 3 Primer pairs for β-actin, Toll receptor, IMD, Lysozyme mRNA for *L.vannamei*

引物 primer	引物序列 primer sequence(5'-3')	GenBank 登录号	GenBank accession number
β-actin mRNA-F	CGCGACCTCACAGACTACCT		AF300705
β-actin mRNA-R	CTCGTAGGACTTCTCCAGCG		
Toll receptor 1 mRNA-F	TGGTGCTTTCGTCAAACCTTC		DQ923424
Toll receptor 1 mRNA-R	AACCTGGCCATACACAATGA		
IMD mRNA-F	ATCGAGGAACGAGACAAGGT		FJ592176
IMD mRNA-R	CGTACACTCGGTCGACATTC		
Lysozyme mRNA-F	CGACCTCGATCAGTACATGG		AY170126
Lysozyme mRNA-R	GTAACCCTGGTGACAAGCCT		

## 2 结果

### 2.1 饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾生长性能的影响

8周养殖实验结束后, 各实验组凡纳滨对虾成活率均在97%以上; 各组对虾终末均重为14.65~15.38 g/尾; 饲料系数呈现出先下降后升高的趋势, A组最高; 特定生长率呈现出先升高后下降的趋势, 最低组为A组; 各组间均无显著性差异( $P>0.05$ )(表4)。

### 2.2 饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾肌肉常规组成的影响

凡纳滨对虾肌肉中粗蛋白质含量, A组显著低于其他各实验组( $P<0.05$ ), E组最高; 对虾肌肉中粗脂肪含量随着酶解豆粕添加量的增加, 整体呈现升高的趋势, A组显著低于C组、D组和E组( $P<0.05$ ); 对虾肌肉中灰分和水分含量各组间无显著性差异( $P>0.05$ )(表5)。

### 2.3 饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾肝胰腺消化酶的影响

对虾肝胰腺中蛋白酶活性随饲料中酶解豆粕添加量的增加呈升高的趋势, D组和E组显著高于A组和B组( $P<0.05$ ); B组、D组和E组对虾的淀粉酶活性显著高于A组( $P<0.05$ ); 对虾的脂肪酶活性随饲料中酶解豆粕添加量的增加整体呈

现出升高的趋势, D组和E组显著高于A组( $P<0.05$ )(表6)。

### 2.4 饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾血清溶菌酶和抗氧化能力的影响

随饲料中酶解豆粕添加量的增多, 各组凡纳滨对虾血清溶菌酶活性呈先升后降的变化趋势, A组最低, D组最高且显著高于其他各组( $P<0.05$ ); 血清中T-SOD活性随饲料中酶解豆粕添加量的增多而增高, E组最高, 且显著高于其他各组( $P<0.05$ ); 血清丙二醛含量随饲料中酶解豆粕添加量的增多呈现先降后升的变化趋势, A组最高, 且显著高于其他各组( $P<0.05$ )(表7)。

### 2.5 饲料中添加酶解豆粕对感染高剂量副溶血性弧菌的凡纳滨对虾成活率的影响

在对虾腹部注射 $35 \mu\text{L } 6.25 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$ 经活化培养后分离的副溶血性弧菌, 各组对虾96 h内的累积死亡率显示, A组对虾在各个时间点的累积死亡率均高于其他各组, D组对虾在各个时间点的累积死亡率均低于其他各组, 且在48和60 h时显著低于A组( $P<0.05$ )(图1)。

### 2.6 饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾急性感染副溶血性弧菌后免疫相关基因表达量的影响

凡纳滨对虾人工急性感染副溶血性弧菌后对虾Toll受体mRNA表达量最大峰值出现在24 h、C组, A组于42 h出现峰值, B组、C组和E组峰值

表4 饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾生长性能的影响

Tab. 4 Effect of dietary proteolytic soybean meal on the growth performances of *L.vannamei*

项目 item	A组 (0% PSM)	B组 (2.5% PSM)	C组 (3.5% PSM)	D组 (4.5% PSM)	E组 (5.5% PSM)
终末均重/g final weight	14.65±0.67	14.78±0.48	15.38±0.14	15.35±0.20	15.22±0.74
成活率/% survival rate	99.33±1.16	99.33±1.16	98.00±2.00	98.67±2.31	97.33±3.06
饲料系数 feed conversion ratio	1.44±0.09	1.37±0.03	1.37±0.03	1.34±0.03	1.38±0.09
特定生长率(%/d) specific growth rate	6.22±0.08	6.24±0.06	6.31±0.02	6.30±0.02	6.29±0.09

表5 饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾肌肉常规组成的影响

Tab. 5 Effect of dietary proteolytic soybean meal on the muscular composition of *L.vannamei*

项目 item	A组 (0% PSM)	B组 (2.5% PSM)	C组 (3.5% PSM)	D组 (4.5% PSM)	E组 (5.5% PSM)
水分 moisture	78.69±1.57	78.27±1.05	76.56±2.59	77.50±0.34	75.97±0.74
粗蛋白质 crude protein	18.68±0.08 <sup>a</sup>	19.08±0.06 <sup>b</sup>	20.63±0.11 <sup>d</sup>	19.88±0.06 <sup>c</sup>	21.19±0.06 <sup>c</sup>
粗脂肪 crude lipid	1.07±0.01 <sup>a</sup>	1.14±0.06 <sup>ab</sup>	1.28±0.13 <sup>bc</sup>	1.24±0.05 <sup>bc</sup>	1.35±0.07 <sup>c</sup>
灰分 ash	1.30±0.08	1.31±0.10	1.33±0.07	1.27±0.03	1.42±0.08

注: 同一行不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同

Notes: values with different lowercase letters in the same line mean significant differences ( $P<0.05$ ), the same below

表 6 饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾肝胰腺消化酶的影响

Tab. 6 Effect of dietary proteolytic soybean meal on digestive enzymes in hepatopancreas of *L. vannamei*

项目 item	A组 (0% PSM)	B组 (2.5% PSM)	C组 (3.5% PSM)	D组 (4.5% PSM)	E组 (5.5% PSM)
蛋白酶活性/(U/mg protein) protease activity	176.82±0.82 <sup>a</sup>	174.05±4.97 <sup>a</sup>	180.59±7.22 <sup>abc</sup>	183.96±1.02 <sup>bc</sup>	187.09±2.71 <sup>c</sup>
淀粉酶活性/(U/mg protein) amylase activity	14.05±1.32 <sup>a</sup>	15.99±0.40 <sup>bc</sup>	15.60±0.59 <sup>ab</sup>	17.79±1.07 <sup>c</sup>	17.28±0.82 <sup>bc</sup>
脂肪酶活性/(U/g protein) lipase activity	61.42±2.88 <sup>a</sup>	68.35±1.60 <sup>ab</sup>	69.27±7.84 <sup>ab</sup>	76.66±9.22 <sup>b</sup>	75.74±4.00 <sup>b</sup>

表 7 饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾血清溶菌酶和抗氧化能力的影响

Tab. 7 Effect of dietary proteolytic soybean meal on serum lysozyme and antioxidant capacity of *L. vannamei*

项目 item	A组 (0% PSM)	B组 (2.5% PSM)	C组 (3.5% PSM)	D组 (4.5% PSM)	E组 (5.5% PSM)
溶菌酶/(U/mL) lysozyme activity	48.19±12.05 <sup>a</sup>	76.31±18.40 <sup>a</sup>	72.29±12.05 <sup>a</sup>	144.58±12.05 <sup>c</sup>	108.43±24.10 <sup>b</sup>
总超氧化物歧化酶活性/(U/mL) T-SOD activity	383.26±1.97 <sup>a</sup>	391.87±3.25 <sup>b</sup>	394.89±1.97 <sup>b</sup>	398.33±7.89 <sup>b</sup>	407.37±3.25 <sup>c</sup>
丙二醛/(nmol/mL) MDA content	83.52±3.53 <sup>c</sup>	71.30±3.53 <sup>bc</sup>	73.33±6.11 <sup>bc</sup>	48.89±6.11 <sup>a</sup>	65.19±12.72 <sup>b</sup>

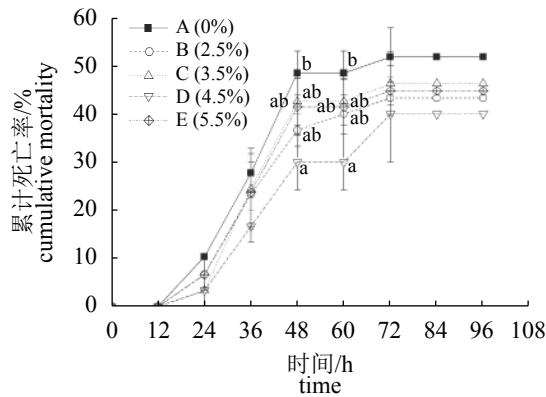


图 1 饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾急性感染副溶血性弧菌后累积死亡率的影响

Fig. 1 Effect of proteolytic soybean meal on cumulative mortality of *L. vannamei* for 8 weeks and experienced *V. parahaemolyticus* challenge

均大于A组 ( $P < 0.05$ ) (表 8)。对虾 *IMD* mRNA 表达量最大峰值出现在 42 h、B 组，饲料中添加酶解豆粕的各实验组峰值均大于 A 组，其中在 18 h 时对 *IMD* mRNA 表达量影响最显著 ( $P < 0.05$ ) (表 9)。对虾溶菌酶 mRNA 表达量最大峰值出现在 24 h、D 组，其中 D 组和 E 组峰值均大于 A 组，饲料中添加酶解豆粕在 12 h 时对溶菌酶 mRNA 表达量影响最显著 ( $P < 0.05$ ) (表 10)。

### 3 讨论

#### 3.1 饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾生长性能的影响

研究发现，相对于完整的蛋白质，动物的

肠道组织细胞对肽具有更高的吸收效率<sup>[24]</sup>。经测定，实验所用酶解豆粕中相对分子量 < 1 000 的肽含量占 72.83%。通过对蛋白水解产物的研究表明，去除蛋白水解物中的小分子，会降低饲料的利用率，从而发现蛋白水解所产生的小分子复合物对于水生动物的生长至关重要<sup>[25]</sup>。有研究表明，分子量为 1 000~3 000 的水解大豆肽能够有效促进真鲷 (*Pagrus major*) 和牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 的生长<sup>[26]</sup>。本实验结果显示，随着酶解豆粕添加量的增加，虽然对虾的终末均重和特定增长率都有一定的增长趋势，饲料系数也有一定程度的降低，但是添加 5.5% 以内的酶解豆粕对凡纳滨对虾生长性能的改善效果并不显著，分析原因可能与饲料中小分子肽的总含量较少有部分关系。有研究表明，饲料中大豆多肽添加量低于 20% 时，对牙鲆幼鱼的生长性能和饲料效率并没有产生显著的影响<sup>[27]</sup>。不同饼粕蛋白酶解产物中肽的种类和分子组成不同，对异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 产生的营养效果也不同，饲料中小分子肽比例越大，饲养的鱼类生产性能表现效果越好<sup>[28]</sup>。

随着酶解豆粕添加量的增加，凡纳滨对虾肌肉中粗蛋白含量相较于对照组均有显著的提高。一方面可能与饲料中普通豆粕含量的降低有部分关系，有研究表明，水生动物的总蛋白水平会随着饲料中豆粕含量的增加而降低<sup>[29-30]</sup>；另一方面可能是酶解豆粕对凡纳滨对虾的蛋白质沉积具有促进作用，相较于大豆蛋白，动物体对大豆肽的吸收更加高效且迅速，减少了动

表 8 凡纳滨对虾感染副溶血性弧菌后鳃组织中不同时刻的 *Toll*受体 mRNA 表达量Tab. 8 *Toll* receptor mRNA expression levels in gill of *L. vannamei* which experienced *V. parahaemolyticus* challenge at different time

时间/h time	A (0% PSM)	B (2.5% PSM)	C (3.5% PSM)	D (4.5% PSM)	E (5.5% PSM)
0	0.95±0.10 <sup>mc</sup>	0.85±0.03 <sup>mbc</sup>	0.65±0.07 <sup>ma</sup>	1.10±0.06 <sup>md</sup>	0.81±0.09 <sup>mb</sup>
6	7.39±0.26 <sup>yd</sup>	4.78±0.22 <sup>xc</sup>	1.05±0.10 <sup>mnab</sup>	1.16±0.06 <sup>mb</sup>	0.81±0.07 <sup>ma</sup>
12	5.71±0.42 <sup>xb</sup>	9.04±0.54 <sup>zc</sup>	9.97±0.67 <sup>xd</sup>	2.02±0.16 <sup>na</sup>	8.61±0.49 <sup>zc</sup>
18	5.45±0.36 <sup>xd</sup>	2.70±0.21 <sup>nb</sup>	1.10±0.07 <sup>mna</sup>	3.60±0.15 <sup>wc</sup>	1.20±0.16 <sup>ma</sup>
24	6.86±0.55 <sup>yc</sup>	2.71±0.36 <sup>na</sup>	11.69±0.73 <sup>yd</sup>	5.89±0.72 <sup>yb</sup>	6.98±0.25 <sup>zc</sup>
30	1.86±0.11 <sup>nb</sup>	5.73±0.20 <sup>yc</sup>	1.53±0.04 <sup>na</sup>	1.33±0.25 <sup>ma</sup>	7.97±0.19 <sup>yd</sup>
36	4.20±0.79 <sup>wc</sup>	3.58±0.27 <sup>wc</sup>	0.83±0.12 <sup>mna</sup>	6.46±0.56 <sup>yd</sup>	2.07±0.11 <sup>nb</sup>
42	8.56±0.59 <sup>zc</sup>	6.27±0.57 <sup>yb</sup>	5.95±0.86 <sup>wb</sup>	5.34±0.34 <sup>ab</sup>	4.44±0.42 <sup>wa</sup>
48	1.55±0.27 <sup>mnb</sup>	1.21±0.06 <sup>mab</sup>	0.88±0.19 <sup>mna</sup>	1.18±0.06 <sup>mab</sup>	1.65±0.44 <sup>nb</sup>

注: 上标不同字母a,b,c,d表示同一时刻不同组间的差异显著( $P<0.05$ ), 上标不同字母m,n,w,x,y,z表示同一组内不同时刻差异显著( $P<0.05$ ), 下同  
Notes: Data in the same column with different letters(a,b,c,d)were significantly different among the different groups or levels at the same time ( $P<0.05$ ). data in the same line with different lowercase (m,n,w,x,y,z)were significantly different among the different time in the same group or levels( $P<0.05$ ), the same below

表 9 凡纳滨对虾感染副溶血性弧菌后鳃组织中不同时刻的 *IMD* mRNA 表达量Tab. 9 *IMD* mRNA expression in gill of *L. vannamei* which experienced *V. parahaemolyticus* challenge at different time

时间/h time	A (0% PSM)	B (2.5% PSM)	C (3.5% PSM)	D (4.5% PSM)	E (5.5% PSM)
0	1.00±0.05 <sup>mab</sup>	0.98±0.12 <sup>mab</sup>	0.96±0.06 <sup>ma</sup>	1.12±0.08 <sup>mb</sup>	1.29±0.04 <sup>mc</sup>
6	3.84±0.33 <sup>wb</sup>	4.14±0.65 <sup>nwb</sup>	2.45±0.16 <sup>na</sup>	3.57±0.45 <sup>wb</sup>	4.74±0.27 <sup>zc</sup>
12	3.53±0.12 <sup>wa</sup>	3.89±0.23 <sup>nwa</sup>	5.31±0.55 <sup>yb</sup>	5.03±0.10 <sup>xb</sup>	3.71±0.18 <sup>wa</sup>
18	2.61±0.47 <sup>na</sup>	3.75±0.61 <sup>nwb</sup>	4.56±0.02 <sup>xc</sup>	3.47±0.36 <sup>wb</sup>	3.90±0.47 <sup>wbc</sup>
24	5.85±0.14 <sup>yb</sup>	4.54±0.42 <sup>wa</sup>	5.08±0.58 <sup>ya</sup>	7.44±0.34 <sup>yc</sup>	7.69±0.37 <sup>zc</sup>
30	5.34±0.29 <sup>xd</sup>	3.51±0.24 <sup>nb</sup>	4.93±0.27 <sup>xycd</sup>	4.53±0.73 <sup>xc</sup>	2.63±0.15 <sup>na</sup>
36	2.83±0.14 <sup>na</sup>	5.43±0.47 <sup>xd</sup>	3.87±0.15 <sup>wb</sup>	4.80±0.35 <sup>xc</sup>	2.30±0.25 <sup>na</sup>
42	5.44±0.09 <sup>xb</sup>	9.98±0.56 <sup>yc</sup>	6.09±0.34 <sup>zb</sup>	2.26±0.38 <sup>na</sup>	5.47±0.17 <sup>yb</sup>
48	1.01±0.14 <sup>m</sup>	1.10±0.11 <sup>m</sup>	1.07±0.04 <sup>m</sup>	1.09±0.15 <sup>m</sup>	1.24±0.20 <sup>m</sup>

物在吸收过程中的能量消耗, 从而促进了动物体内蛋白质的沉积<sup>[31]</sup>。研究发现, 建鲤(*Cyprinus carpio* var. *Jian*)饲料中的鱼粉或植物蛋白被等量蛋白肽替代后, 可促进鱼体粗蛋白质沉积, 并降低了内脏重量, 优化了建鲤形体指标<sup>[32]</sup>。而且随着饲料中豆粕含量的增加, 非淀粉多糖对水生动物的影响也会更加明显。非淀粉多糖在体外和体内均可降低脂肪酶等的活性, 影响水生动物对外源脂肪的吸收转运<sup>[12]</sup>, 而此次实验中各实验组粗脂肪含量随酶解豆粕使用量的增加呈现显著上升的趋势, 分析原因可能是本实验所用酶解豆粕是用蛋白酶和非淀粉多糖酶复合酶

解, 一定程度上降低了豆粕中所含的非淀粉多糖阻碍对虾对外源脂肪吸收转运的不利影响。各组对虾肌肉水分和灰分没有显著性差异, 说明此次实验中酶解豆粕并未对肌肉中其他成分产生影响。

酶解豆粕添加量达到4.5%以上时对对虾的蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性均有显著提高, 这也与以往的许多研究报道相吻合<sup>[33-34]</sup>。豆粕过量替代鱼粉会对鲤(*Cyprinus carpio*)肠道产生损伤同时也会降低肝胰脏蛋白酶的活性<sup>[9]</sup>。从尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)体内也检测到, 豆粕对消化蛋白酶具有很高的抑制作用<sup>[35]</sup>。而对虾对

表 10 凡纳滨对虾感染副溶血性弧菌后鳃组织中不同时刻溶菌酶 mRNA 表达量

Tab. 10 Lysozyme mRNA expression in gill of *L. vannamei* which experienced *V. parahaemolyticus* challenge at different time

时间/h time	A (0% PSM)	B (2.5% PSM)	C (3.5% PSM)	D (4.5% PSM)	E (5.5% PSM)
0	1.03±0.10 <sup>ma</sup>	0.89±0.11 <sup>ma</sup>	1.44±0.10 <sup>mb</sup>	1.25±0.12 <sup>mb</sup>	1.42±0.08 <sup>mb</sup>
6	4.05±0.10 <sup>zc</sup>	2.33±0.28 <sup>xb</sup>	2.65±0.11 <sup>mb</sup>	2.40±0.23 <sup>mb</sup>	1.76±0.12 <sup>ma</sup>
12	2.06±0.07 <sup>mwa</sup>	3.70±0.15 <sup>zd</sup>	2.85±0.14 <sup>wxb</sup>	2.82±0.09 <sup>xb</sup>	3.40±0.19 <sup>vc</sup>
18	2.55±0.12 <sup>xc</sup>	1.25±0.10 <sup>mwa</sup>	3.30±0.27 <sup>zdz</sup>	2.09±0.22 <sup>nb</sup>	2.23±0.19 <sup>abc</sup>
24	3.14±0.24 <sup>yb</sup>	2.74±0.03 <sup>yab</sup>	2.36±0.04 <sup>ma</sup>	4.60±0.41 <sup>zc</sup>	4.54±0.39 <sup>xc</sup>
30	1.28±0.23 <sup>ma</sup>	1.42±0.08 <sup>wab</sup>	3.02±0.12 <sup>yc</sup>	3.70±0.13 <sup>zd</sup>	1.61±0.16 <sup>mb</sup>
36	1.76±0.10 <sup>ma</sup>	3.74±0.39 <sup>zc</sup>	1.45±0.21 <sup>ma</sup>	2.65±0.12 <sup>wxb</sup>	2.33±0.41 <sup>nb</sup>
42	2.18±0.35 <sup>wb</sup>	1.44±0.16 <sup>wa</sup>	3.50±0.29 <sup>zc</sup>	3.82±0.22 <sup>zc</sup>	2.61±0.08 <sup>nb</sup>
48	1.01±0.20 <sup>ma</sup>	0.96±0.12 <sup>mna</sup>	1.18±0.06 <sup>mab</sup>	1.41±0.17 <sup>mb</sup>	1.37±0.22 <sup>mb</sup>

食物的消化吸收能力很大程度上依赖于消化酶的活性<sup>[36-37]</sup>。豆粕中胰蛋白酶抑制因子是影响水生动物对大豆蛋白消化吸收的主要抗营养因子,动物体内胰蛋白酶会随着外部的胰蛋白酶抑制因子的进入反应形成难以被动物体消化吸收的复合物,从而失去应有的活性。通常大豆经酶处理后,消化率会得到相应的改善,这种酶处理方法在鱼类摄食前就可引发蛋白质降解<sup>[38]</sup>。有研究显示,饲料中大豆水解蛋白替代15%~70%的鱼粉时,能够显著提高星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)幼鱼的胰蛋白酶活性<sup>[39]</sup>。

### 3.2 饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾抗胁迫机能的影响

机体抗氧化能力是评价水产动物健康状况的一个重要指标。自由基是一种具有较强氧化作用的物质,当机体应激产生过多自由基时,会氧化组织从而对机体造成损伤。因此机体需要一套健全有效的抗氧化防御体系<sup>[34]</sup>来调节体内自由基含量,保持机体健康。

蛋白质水解产生的小分子肽,在机体内具有较强的抗氧化活性。研究显示,酶解大豆蛋白具有较高的还原能力、较高的乳化液抗氧化能力和较强的清除自由基能力,而其抑制β-胡萝卜素漂白的能力与合成抗氧化剂能力相当,分子量小于10 000的酶解大豆蛋白相较于普通大豆蛋白显示出更高的抗氧化活性<sup>[40]</sup>。有研究指出,从各种蛋白质水解产物中提取到的生物活性肽,可通过上调抗氧化酶活性,发挥出其潜在的抗

氧化作用<sup>[41]</sup>。饲料中利用大豆蛋白水解物替代鱼粉的实验表明,当替代量达到15%~100%时会显著增强星斑川鲷幼鱼的SOD活性,替代量达到30%~100%时,实验组MDA含量显著低于对照组<sup>[39]</sup>。本实验结果显示,低鱼粉饲料中酶解豆粕含量对凡纳滨对虾血清溶菌酶、T-SOD活性和MDA含量具有显著影响。已有研究表明,利用食品级猪胰腺蛋白水解制剂(Corolase PP)酶解豆粕,通过ABTS和ORAC方法检测大豆肽水解物的抗氧化活性,结果显示酶解大豆得到的大豆肽具有较高的抗氧化活性<sup>[42]</sup>。在饲料中添加水解蛋白产物,会促使牙鲆体内溶菌酶和SOD活性显著增加<sup>[43]</sup>。酶解大豆蛋白得到的大豆多肽可提高对动物机体内自由基的清除能力,在调节机体免疫功能、抗氧化和促进矿物元素吸收等方面也发挥着重要作用<sup>[44-47]</sup>。相较于普通大豆蛋白,大豆肽增加了清除自由基能力,提高了机体总抗氧化活性和还原能力<sup>[48]</sup>。

凡纳滨对虾的免疫机能主要是依靠非特异性免疫起作用,而活体攻毒是指在一定剂量致病菌的攻击下直观反映机体综合免疫机能的实验手段<sup>[49]</sup>。通过研究副溶血性弧菌对凡纳滨对虾生理生化指标的影响表明,副溶血性弧菌的感染会破坏虾体的免疫系统,导致免疫机能损坏<sup>[50]</sup>。有研究表明,在饲料中添加5%~15%的水解蛋白,对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)的非特异性免疫反应有所改善<sup>[51]</sup>。在低鱼粉饲料中添加蛋白水解物饲喂牙鲆幼鱼的实验中发现,饲料中添加蛋白水解产物能提高鱼体的先天免疫能力<sup>[41]</sup>。本实验



结果显示,随着感染时间的增加,饲料中添加酶解豆粕对凡纳滨对虾免疫力的改善效果明显,对照组在各时间点累积死亡率均比其他实验组同期累积死亡率高。已有研究报道,在大豆水解物中可分离鉴定出抗菌肽,其对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和副溶血性弧菌的生长有抑制作用,可提高对虾的存活率<sup>[52]</sup>。通过同源序列比对发现,大豆肽中含有一种能够刺激巨噬细胞和多核白细胞吞噬作用的物质,通过刺激细胞吞噬作用,提高动物机体的免疫力<sup>[53]</sup>。

营养控制是调节非特异性免疫反应并提高抗病性的有效方法<sup>[54-55]</sup>。*Toll*受体在介导虾体启动天然免疫并释放免疫因子的机制中起着关键作用。当对虾受病原菌入侵时,*Toll*受体将异物入侵的信号从胞外传递到胞内,并引起胞内信号级联反应,介导细胞启动先天免疫反应<sup>[56-58]</sup>。*IMD*通路是一个重要免疫识别信号传导通路,革兰氏阴性细菌和杆状阳性细菌能通过跨膜蛋白*PGRP-LC*激活*IMD*信号途径并诱导细胞产生免疫效应因子<sup>[59]</sup>。溶菌酶作为机体非特异性免疫级联反应的终端效应因子,除了能溶解细菌细胞壁外,溶解细胞壁时释放的肽聚糖片段还能诱导各种抗菌蛋白包括溶菌酶的合成与分泌<sup>[60]</sup>。对虾进行弧菌实验时,机体免疫基因表达水平平均升高,*Toll*受体mRNA的表达水平在一定程度上可以反映对虾对入侵病原识别的灵敏性,而机体清除异物后恢复至正常状态的过程,在一定程度上反映了机体的免疫平衡性,提高机体免疫的灵敏性和平衡性是提高机体免疫力的根本途径<sup>[61]</sup>。此次实验结果显示,对照组*Toll*受体mRNA表达量峰值出现时间最晚,一定程度上可以反映饲料中添加酶解豆粕有助于提高凡纳滨对虾对入侵病原识别的灵敏性。各基因表达量最大峰值均出现在添加酶解豆粕的实验组,表明酶解豆粕对凡纳滨对虾免疫基因应答具有明显的促进效果。目前的研究表明,营养水平会在一定程度上影响机体免疫的效果,同时免疫的效果也决定着机体对营养素的需求。蛋白质水平<sup>[62]</sup>、维生素水平<sup>[63]</sup>、微量元素水平<sup>[64]</sup>、饲料能量水平<sup>[65]</sup>及免疫多糖<sup>[66]</sup>等都会影响对虾的免疫机能和抗菌能力。有报道显示,饲料中混合褐藻多糖喂食斑节对虾(*Penaeus monodon*)15 d后,可显著提高斑节对虾对白斑综合征病毒(WSSV)的抗病能力<sup>[67]</sup>。饲料中添加富含核苷酸的酵母提取物使

日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)淋巴器官中溶菌酶基因表达量升高,并增强其抗菌能力<sup>[68]</sup>。研究表明,中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)饲料中添加2% VC能上调鳃组织中*Toll*受体和*NF- $\kappa$ B*这2个免疫基因的表达量,适量的VC能提高中国明对虾的免疫应答能力<sup>[69]</sup>。

## 4 结论

综上所述,含10%鱼粉的饲料中,酶解豆粕添加量在5.5%以内对凡纳滨对虾生长性能的改善效果不显著。添加量达到5.5%时对凡纳滨对虾肌肉中粗蛋白和粗脂肪的改善效果最好。添加量达到4.5%时对凡纳滨对虾消化酶活性、对虾机体抗氧化能力和抗弧菌感染能力的改善效果最好。

## 参考文献:

- [1] Smith L L, Lee P G, Lawrence A L, et al. Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: effects of dietary protein level and protein source[J]. *Aquaculture*, 1985, 46(2): 85-96.
- [2] Cuzon G, Lawrence A, Gaxiola G, et al. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds[J]. *Aquaculture*, 2004, 235(1-4): 513-551.
- [3] Tacon A G J, Metian M. Fishing for aquaculture: non-food use of small pelagic forage fish-A global perspective[J]. *Reviews in Fisheries Science*, 2009, 17(3): 305-317.
- [4] 李军亮,杨奇慧,谭北平,等.低鱼粉饲料添加枯草芽孢杆菌对凡纳滨对虾幼虾生长性能、非特异性免疫力及抗病力的影响[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(5): 2212-2221.  
Li J L, Yang Q H, Tan B P, et al. Effects of bacillus subtilis supplemented in low fish meal diets on growth performance, non-specific immunity and disease resistance of juvenile *Litopenaeus vannamei*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(5): 2212-2221(in Chinese).
- [5] 王武刚,罗词兴,黄旭雄,等.酵母提取物替代鱼粉对凡纳滨对虾免疫抗菌机能和溶菌酶mRNA及*Toll*受体mRNA表达的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(6): 1003-1010.  
Wang W G, Luo C X, Huang X X, et al. The effect of replacement of fish meal by yeast extract on the immunity, vibrio-resistant ability, lysozyme mRNA and *Toll* receptor mRNA expressions of the shrimp *Litopen-*

- aeus vannamei*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21(6): 1003-1010(in Chinese).
- [6] Lim C, Dominy W. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*)[J]. *Aquaculture*, 1990, 87(1): 53-63.
- [7] 刘韬, 黄旭雄, 苏美英, 等. 发酵豆粕替代鱼粉对凡纳滨对虾生长、免疫相关酶及免疫相关基因表达的影响[J]. 水产学报, 2018, 42(9): 1417-1427.
- Liu T, Huang X X, Su M Y, *et al.* Effects of fermented soybean meal replacing fish meal on the growth performance, immune-related enzymes and gene expression of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(9): 1417-1427(in Chinese).
- [8] Kaushik S J, Cravedi J P, Lalles J P, *et al.* Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Aquaculture*, 1995, 133(3-4): 257-274.
- [9] Escaffre A M, Infante J Z, Cahu C L, *et al.* Nutritional value of soy protein concentrate for larvae of common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities[J]. *Aquaculture*, 1997, 153(1-2): 63-80.
- [10] Arachchige H S, Qiu X, Stein H H, *et al.* Evaluation of soybean meal from different sources as an ingredient in practical diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture Research*, 2019, 50(4): 1230-1247.
- [11] Francis G, Makkar H P, 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.
- [12] Medaka A. Expanding the Utilization of Sustainable Plant Products in Aquafeeds[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 38(6): 551-579.
- [13] Ai Q H, Xie X J. Effects of dietary soybean protein levels on energy budget of the southern catfish, *Silurus meridionalis*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2005, 141(4): 461-469.
- [14] Chou R L, Her B Y, Su M S, *et al.* Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*[J]. *Aquaculture*, 2004, 229(1-4): 325-333.
- [15] Karr-Lilienthal L K, Kadzere C T, Grieshop C M, *et al.* Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: a review[J]. *Livestock Production Science*, 2005, 97(1): 1-12.
- [16] Saleh F, Ohtsuka A, Tanaka T, *et al.* Effect of enzymes of microbial origin on in vitro digestibilities of dry matter and crude protein in soybean meal[J]. *Animal Science Journal*, 2003, 74(1): 23-29.
- [17] Badger T M, Ronis M J J, Hakkak R, *et al.* The health consequences of early soy consumption[J]. *The Journal of Nutrition*, 2002, 132(3): 559S-565S.
- [18] 陈美珍, 余杰, 郭慧敏. 大豆分离蛋白酶解物清除羟自由基作用的研究[J]. *食品科学*, 2002, 23(1): 43-47.
- Chen M Z, Yu J, Guo H M. Study on the scavenging activity on hydroxyl radical of Enzymic hydrolysates of soy protein isolates[J]. *Food Science*, 2002, 23(1): 43-47(in Chinese).
- [19] Pokorný J. Natural antioxidants for food use[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1991, 2(91): 223-227.
- [20] Tibaldi E, Hakim Y, Uni Z, *et al.* Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(1): 182-193.
- [21] 叶倩. 发酵豆粕深度酶解生产低分子大豆多肽[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- Ye Q. Preparation of small peptide by hydrolyzing fermented liquid of soybean meal[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [22] 李学丽, 王际英, 宋志东, 等. 两种豆粕部分替代鱼粉在珍珠龙胆石斑鱼幼鱼饲料中的研究[J]. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(5): 716-725.
- Li X L, Wang J Y, Song Z D, *et al.* Research on partial replacement of fishmeal by two kinds of soybean meal in the feed of juvenile ♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(5): 716-725.
- [23] 尚宪明. 南极大磷虾脂肪酶提取纯化及其酶学性质研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Shang X M. Studies on purification enzyme characterization of lipases from Antarctic krill[D]. Qingdao: Ocean China Water Science Association sponsored by China Society of Fisheries

- University of China, 2014 (in Chinese).
- [24] Tonheim S K, Espe M, Hamre K, *et al.* Pre-hydrolysis improves utilisation of dietary protein in the larval teleost Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 321(1): 19-34.
- [25] Aksnes A, Hope B, Høstmark Ø, *et al.* Inclusion of size fractionated fish hydrolysate in high plant protein diets for Atlantic cod, *Gadus morhua*[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(3): 1102-1110.
- [26] Teshima S I, Koshio S, Ishikawa M, *et al.* Effects of protein and lipid sources on the growth and survival of red sea bream *Pagrus major* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* receiving micro-bound diets during larval and early juvenile stage[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2004, 10(4): 279-287.
- [27] Mamauag R E P, Koshio S, Ishikawa M, *et al.* Soy peptide inclusion levels influence the growth performance, proteolytic enzyme activities, blood biochemical parameters and body composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Aquaculture*, 2011, 321(3-4): 252-258.
- [28] 刘文斌, 詹玉春, 王恬. 四种饼粕酶解蛋白对异育银鲫的营养作用研究[J]. *中国粮油学报*, 2007, 22(5): 108-112.
- Liu W B, Zhan Y C, Wang T. Nutritional value of plant protein hydrolysates for allognogeuetic crucian carp[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2007, 22(5): 108-112(in Chinese).
- [29] Takagi S, Shimeno S, Hosokawa H, *et al.* Effect of lysine and methionine supplementation to a soy protein concentrate diet for red sea bream *Pagrus major*[J]. *Fisheries Science*, 2001, 67(6): 1088-1096.
- [30] Ye J D, Liu X H, Wang Z J, *et al.* Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance and biochemical indices of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Aquaculture International*, 2011, 19(1): 143-153.
- [31] 陆丞, 应朝阳, 郑斌, 等. 植物肽的生理功能及其在饲料中的应用研究进展[J]. *中国饲料*, 2015(12): 30-32, 36.
- Lu Z, Ying Z Y, Zheng B, *et al.* Research advance of physiological functions and applications in feed of plant peptides[J]. *China Feed*, 2015(12): 30-32, 36(in Chinese).
- [32] 夏薇, 刘文斌, 乔秋实, 等. 棉粕酶解蛋白肽对建鲤生产性能和生化指标的影响[J]. *淡水渔业*, 2016, 42(1): 46-51.
- Xia W, Liu W B, Qiao Q S, *et al.* Effects of cottonseed meal hydrolysate on growth performance and biochemical indices of *Cyprinus carpio* var. *Jian*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2016, 42(1): 46-51(in Chinese).
- [33] 冯健, 高玲, 刘永坚, 等. 草鱼日粮中虾蛋白肽对幼龄草鱼生长性能的影响[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2004, 43(2): 100-103.
- Feng J, Gao L, Liu Y J, *et al.* The effect of small peptides from shrimp waste in diet on growth performance of grass carps *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2004, 43(2): 100-103(in Chinese).
- [34] Mourente G, Díaz-Salvago E, Bell J G, *et al.* Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E[J]. *Aquaculture*, 2002, 214(1-4): 343-361.
- [35] López F J M, Díaz I M, López M D, *et al.* Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 122(3): 327-332.
- [36] Toro M, García-Carreño F L, Córdova-Murueta J H. Comparison of digestive proteinases in three penaeids[J]. *Aquaculture*, 2011, 317(1-4): 99-106.
- [37] Lemos D, Ezquerro J M, Garcia-Carreño F L. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility[J]. *Aquaculture*, 2000, 186(1-2): 89-105.
- [38] Berge G M, Storebakken T. Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry[J]. *Aquaculture*, 1996, 145(1-4): 205-212.
- [39] Song Z D, Li H Y, Wang J Y, *et al.* Effects of fishmeal replacement with soy protein hydrolysates on growth performance, blood biochemistry, gastrointestinal digestion and muscle composition of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*)[J]. *Aquaculture*, 2014, 426-427(1): 96-104.
- [40] Moure A, Domínguez H, Parajó J C. Antioxidant proper-

- ties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(2): 447-456.
- [41] Khosravi S, Bui H T D, Herault M, *et al.* Supplementation of protein hydrolysates to a low-fishmeal diet improves growth and health status of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2018, 49(5): 897-911.
- [42] Coscueta E R, Amorim M M, Voss G B, *et al.* Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis[J]. *Food Chemistry*, 2016, 198(1): 36-44.
- [43] Khosravi S, Bui H T D, Rahimnejad S, *et al.* Effect of dietary hydrolysate supplementation on growth performance, non-specific immune response and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) challenged with *Edwardsiella tarda*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2015, 21(3): 321-331.
- [44] 江霞, 徐铭. 小肽对动物免疫功能的影响[J]. *甘肃畜牧兽医*, 2011, 41(2): 32-35.  
Jiang X, Xu M. Effect of small peptides on immune function of animal[J]. *Gansu Animal and Veterinary Sciences*, 2011, 41(2): 32-35(in Chinese).
- [45] Sarmadi B H, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review[J]. *Peptides*, 2010, 31(10): 1949-1956.
- [46] 许培玉, 周洪琪. 小肽制品对南美白对虾生长及非特异性免疫力的影响[J]. *中国饲料*, 2004(17): 13-15.  
Xu P Y, Zhou H Q. Effect of small peptides on the growth and nonspecific immunity of *Penaeus vannamei*[J]. *China Feed*, 2004(17): 13-15(in Chinese).
- [47] 朱选, 曹俊明, 赵红霞, 等. 饲料中添加谷胱甘肽对草鱼组织中谷胱甘肽沉积和抗氧化能力的影响[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(1): 160-166.  
Zhu X, Cao J M, Zhao H X, *et al.* Effects of dietary glutathione on tissue glutathione retention and anti-oxidative activities in juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(1): 160-166(in Chinese).
- [48] Sanjukta S, Rai A K, Muhammed A, *et al.* Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 14: 650-658.
- [49] 黄旭雄, 周洪琪. 甲壳动物免疫机能的衡量指标及科学评价[J]. *海洋科学*, 2007, 31(7): 90-96.  
Huang X X, Zhou H Q. The parameters reflecting immune state of crustacea and its scientific evaluation[J]. *Marine Sciences*, 2007, 31(7): 90-96(in Chinese).
- [50] 翟秀梅, 王斌, 毛连菊, 等. 副溶血弧菌对南美白对虾生理生化指标的影响[J]. *上海水产大学学报*, 2007, 16(2): 162-168.  
Zhai X M, Wang B, Mao L J, *et al.* The effects of physiological and biochemical index for *Penaeus vannamei* infected with *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2007, 16(2): 162-168(in Chinese).
- [51] Liang M Q, Wang J L, Chang Q, *et al.* Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828)[J]. *Aquaculture Research*, 2006, 37(1): 102-106.
- [52] Cheng A C, Lin H L, Shiu Y L, *et al.* Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal and its use for preventing *Vibrio* infection in shrimp aquaculture[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 270-279.
- [53] Yoshikawa M, Kishi K, Takahashi M, *et al.* Immunostimulating peptide derived from soybean protein[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1993, 685(1): 375-376.
- [54] Oliva-Teles A. Nutrition and health of aquaculture fish[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2012, 35(2): 83-108.
- [55] Magnadottir B. Immunological control of fish diseases[J]. *Marine Biotechnology*, 2010, 12(4): 361-379.
- [56] Hashimoto C, Hudson K L, Anderson K V. The *Toll* gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein[J]. *Cell*, 1988, 52(2): 269-279.
- [57] Ligoxygakis P, Pelte N, Hoffmann J A, *et al.* Activation of *Drosophila Toll* during fungal infection by a blood serine protease[J]. *Science*, 2002, 297(5578): 114-116.
- [58] Kumar H, Kawai T, Akira S. *Toll*-like receptors and innate immunity[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 388(4): 621-625.
- [59] Li F H, Xiang J H. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp[J]. *Fish & Shellfish*  
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Immunology, 2013, 34(4): 973-980.
- [60] Dunn P E, Dai W, Kanost M R, *et al.* Soluble peptidoglycan fragments stimulate antibacterial protein synthesis by fat body from larvae of *Manduca sexta*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1985, 9(3): 559-568.
- [61] 黄旭雄, 罗词兴, 郭腾飞, 等. 对虾Toll受体及其在虾类营养免疫评价中的应用[J]. *水产学报*, 2012, 36(6): 930-936.
- Huang X X, Luo C X, Guo T F, *et al.* Toll receptor in prawn and its application in nutrition-immunity assessing on prawn[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(6): 930-936(in Chinese).
- [62] Pascual C, Zenteno E, Cuzon G, *et al.* *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary proteins[J]. *Aquaculture*, 2004, 239(1-4): 375-395.
- [63] Lee M H, Shiau S Y. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(2): 119-129.
- [64] Lee M H, Shiau S Y. Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 13(4): 259-270.
- [65] Pascual C, Arena L, Cuzon G, *et al.* Effect of a size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels[J]. *Aquaculture*, 2004, 230(1-4): 405-416.
- [66] 刘岩, 江晓路, 吕青, 等. 聚甘露糖醛酸对中国对虾免疫相关酶活性和溶菌溶血活性的影响[J]. *水产学报*, 2000, 24(6): 549-553.
- Liu Y, Jiang X L, Lv Q, *et al.* Effects of mannuronate polysaccharide on enzymes of *Penaeus chinensis* related with immune and hemolysis[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(6): 549-553(in Chinese).
- [67] Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K, *et al.* Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp[J]. *Aquaculture*, 2004, 233(1-4): 23-30.
- [68] Biswas G, Korenaga H, Nagamine R, *et al.* Immune stimulant effects of a nucleotide-rich baker's yeast extract in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*[J]. *Aquaculture*, 2012, 366-367: 40-45.
- [69] 冯伟, 李健, 李吉涛, 等. Vc对中国对虾非特异免疫因子及TLR/NF- $\kappa$ B表达量的影响[J]. *水产学报*, 2011, 35(2): 200-207.
- Feng W, Li J, Li J T, *et al.* Effects of supplemental different level Vc on survival and non-specific immunity of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(2): 200-207(in Chinese).

## Effect of proteolytic soybean meal in low-fish-meal-diet on growth performance and stress resistance of *Litopenaeus vannamei*

JIANG Detian<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>1</sup>, HUANG Xuxiong<sup>1,2,3\*</sup>, WANG Weilong<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Shengxin<sup>4</sup>

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

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

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

4. Taizhou Full Yield Biotechnology Co., Ltd. Taizhou 225300, China)

**Abstract:** In order to explore how to reduce the amount of fish meal while maintaining the good growth performance and stress resistance of *Litopenaeus vannamei*, in this study, the basic diet containing 10% fish meal was added with 0% (A), 2.5% (B), 3.5% (C), 4.5% (D) and 5.5% (E) of proteolytic soybean meal (PSM) to produce five groups of isonitrogenous isoenergetic feed. *L.vannamei* juveniles with initial body weight of (0.45±0.02) g were fed for 8 weeks. Then the growth performance and stress resistance of *L.vannamei* were assessed. The results showed that the final body weight of shrimps in each experimental group ranged from 14.65 to 15.38 g/individual after 8-week culture experiment, and there were no significant differences in weight gain, survival rate and feed coefficient among the groups. The crude protein content of shrimp muscle in group A was significantly lower than those in other experimental groups. The crude fat contents of shrimp muscle in group C, D and E were significantly higher than that in group A. There was no significant differences in ash and moisture content among other groups. The activities of hepatopancreas protease, hepatopancreas amylase, hepatopancreas lipase, serum lysozyme and serum T-SOD in shrimp fed D and E diets were significantly higher than that in group A. The serum MDA content in group A was significantly higher than those in other groups. In the stress test of artificial acute infection with high dose *Vibrio Parahaemolyticus*, the cumulative mortality of shrimp in group A at 48 h and 60 h post *Vibrio* infection was significantly higher than that in group D. The expression levels of *Toll* receptor, immune deficiency (*IMD*) and Lysozyme were detected in shrimp gill tissues after artificial acute infection with low dose *V.parahaemolyticus*. The results showed that the peak values of *Toll* receptor, *IMD* and Lysozyme mRNA expression appeared in group C at 24 h post infection, group B at 42 h post infection and group D at 24 h post infection, respectively. To sum up: in the feed containing 10% fish meal, the effect of proteolytic soybean meal less than 5.5% on the growth performance of *L.vannamei* is not significant. The dietary proteolytic soybean meal could significantly increase the crude protein content and crude fat content in muscle and decrease the MDA content in shrimp serum. Under the experimental conditions, the dietary proteolytic soybean meal significantly changes the resistance of *L.vannamei* to *Vibrio* and the temporal and spatial expression of immune-related genes. Using 4.5% proteolytic soybean meal in feed containing 10% fish meal can obtain the best anti-*Vibrio* ability of cultured *L.vannamei*.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; proteolytic soybean meal; growth performance; stress resistance

**Corresponding author:** HUANG Xuxiong. E-mail: xxhuang@shou.edu.cn

**Funding projects:** China-ASEAN Maritime Cooperation Fund “China-ASEAN Center for Research and Promotion of Marine Aquaculture Technology” (DF)