



## 宠物级鸡肉粉替代鱼粉的饲料中补充苏氨酸对大口黑鲈生长性能、糖脂代谢和免疫的影响

许钰珏<sup>1</sup>, 王文强<sup>1</sup>, 杨鹏<sup>1</sup>, 何超群<sup>1</sup>, 覃雅雯<sup>1</sup>, 宋飞<sup>1,2\*</sup>

(1. 华南师范大学生命科学学院, 现代水产养殖科学与工程研究院, 广东省水产健康安全养殖重点实验室, 广东 广州 510631;  
2. 南方海洋科学与工程广东省实验室, 广东 珠海 519000)

**摘要:** 为研究饲料中不同苏氨酸水平对大口黑鲈生长性能、糖脂代谢、免疫及宠物级鸡肉粉利用率的影响, 实验采用初始体质量为 (4.16±0.06) g 的大口黑鲈作为研究对象, 设计 3 种等氮等脂的饲料: 苏氨酸对照组 (TC, 65.0% 鱼粉), 低水平苏氨酸组 (LT, 65.0% 宠物级鸡肉粉添加除苏氨酸以外的必需氨基酸含量至 TC 水平组) 和苏氨酸添加组 (TS, LT 组添加苏氨酸含量至 TC 水平组), 养殖实验开展 8 周。结果显示, 与对照组相比, LT 处理组饲料显著降低了大口黑鲈的生长性能、饲料效率和鱼体营养物质组成, 饲料中添加苏氨酸可在一定程度上改善宠物级鸡肉粉完全替代鱼粉后导致的生长性能受限、饲料效率低下和鱼体营养物质组成降低等问题。宠物级鸡肉粉完全替代鱼粉还显著降低了血浆中营养成分和多种游离氨基酸的含量, 饲料中添加晶体苏氨酸能够显著提高血浆中游离氨基酸的水平, 使之与对照组间无显著性差异。mRNA 水平上, 饲料中添加苏氨酸可显著改善鸡肉粉完全替代鱼粉引起的肝脏中糖脂合成代谢抑制和分解代谢加剧的现象, 同时添加苏氨酸也可显著降低细胞炎症因子的 mRNA 的表达水平。研究表明, 饲料中适量苏氨酸的添加可在一定程度上提高大口黑鲈的生长性能、促进脂肪合成和抑制脂肪分解, 并增强其免疫机能。

**关键词:** 大口黑鲈; 苏氨酸; 宠物级鸡肉粉; 生长性能; 中间代谢

**中图分类号:** S 963.32

**文献标志码:** A

寻求适宜的非鱼粉蛋白源替代鱼粉仍然是水产养殖业至今面临的重要营养学课题。过去的几十年, 水产动物研究学者就这一问题开展了大量的探究工作, 研究发现宠物级鸡肉粉由于其具有蛋白质含量高、消化吸收率高及适口性好等特点, 成为替代鱼粉的优质蛋白源<sup>[1-3]</sup>。然而, 在对肉食性鱼类的研究中发现, 高比例

宠物级鸡肉粉替代鱼粉后显著降低了水产动物的生长性能和饲料利用效率, 究其原因, 发现与鱼粉相比, 宠物级鸡肉粉缺乏必需氨基酸是造成这一现象的重要原因之一<sup>[4]</sup>。因此, 在饲料中合理补充必需氨基酸, 提高非鱼粉蛋白源的利用效率成为解决鱼粉替代问题的重要途径之一。

苏氨酸 (threonine, Thr) 是哺乳动物以及鱼

收稿日期: 2020-11-21 修回日期: 2020-12-29

资助项目: 广东省应用基础研究 (2019A1515110606); 南方海洋科学与工程广东实验室 (珠海) 创新项目; 华南师范大学青年教师培育基金 (19KJ03)

第一作者: 许钰珏 (照片), 从事水产动物营养学研究, E-mail: 1104499062@qq.com

通信作者: 宋飞, E-mail: songfei@m.scnu.edu.cn



体自身不能合成的必需氨基酸,也是许多饲料原料的第二、第三限制性氨基酸<sup>[5]</sup>。苏氨酸不仅可以作为底物直接参与蛋白质的合成,还可以作为营养分子参与机体生长发育、免疫机能和代谢等过程的调控。Zhao等<sup>[6]</sup>的研究发现,饲料中苏氨酸水平可显著提高杂交鲈 [*Pelteobagrus vachelli* (♀)×*Leiocassis longirostris* (♂)] 垂体生长激素 (GH) 和肝脏胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 的表达,从而促进生长性能。Dong等<sup>[7-8]</sup>研究表明,苏氨酸缺乏会降低草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 幼鱼的抗病能力,并损伤鱼鳃和肠道的免疫和生理屏障。在对哺乳动物的研究中发现,日粮中苏氨酸缺乏或过量都会降低机体组织中蛋白质的合成,进而影响机体的生长发育<sup>[9]</sup>,鱼类中的研究也得到了同样的结果<sup>[10]</sup>。因此,适量苏氨酸的摄入是鱼类正常生长发育的重要保障。

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 俗称“加州鲈”,1983年引入广东省,因其具有生长速率快、抗病性强、肉质鲜美、耐运输等优势成为我国重要的经济鱼类,也成为了近年来产量增速较快的物种之一<sup>[11]</sup>。然而,前期大口黑鲈的池塘养殖生产主要以投喂冰鲜鱼为主,饵料利用率极低,且水体污染严重<sup>[12]</sup>。因此,高效配合饲料的开发与优化势在必行。利用氨基酸微平衡技术提高宠物级鸡肉粉在大口黑鲈饲料中的利用率成为解决大口黑鲈营养学产业问题的重要途径之一。本实验旨在研究饲料中宠物级鸡肉粉完全替代鱼粉后苏氨酸添加与否对大口黑鲈饲料利用效率及机体生长、代谢和免疫的影响,以期阐明苏氨酸调控大口黑鲈机体生长代谢的机制,为宠物级鸡肉粉在大口黑鲈饲料产业中的高效利用提供新思路,也为替代蛋白源在水产饲料中的开发与利用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料

本实验饲料以鱼粉和宠物级鸡肉粉为主要蛋白源 (其必需氨基酸组成见表1),鱼油和大豆卵磷脂为主要脂肪源,配制3种含不同水平苏氨酸的等氮 (粗蛋白约54.7%) 等脂 (粗脂肪约12.6%) 饲料 (表2)。其中,苏氨酸对照组 (TC) 包含65%鱼粉;低水平苏氨酸组 (LT) 使用宠物级鸡肉粉完全替代鱼粉,补充除苏氨酸以外的所有必需氨基酸 (EAA) 至鱼粉组水平;苏氨酸添加

组 (TS) 为LT组饲料补充苏氨酸至TC组水平。饲料原料经320 μm筛网筛选后逐一加入搅拌机中混合,并加入油脂和适量的水后混合均匀。使用制粒机 (华南理工大学F-26,中国广州) 将混合物制成颗粒。饲料颗粒在45℃下干燥至水分含量为10%左右,储存在-20℃冰箱中待用。检测3种饲料氨基酸组成 (表3)。

表1 饲料中鱼粉和宠物级鸡肉粉的必需氨基酸组成 (干重)

必需氨基酸 essential amino acids	原料 ingredient	
	鱼粉 fish meal	宠物级鸡肉粉 poultry by-product meal
赖氨酸 Lys	5.38	3.88
蛋氨酸 Met	1.91	1.26
亮氨酸 Leu	4.88	4.33
苏氨酸 Thr	2.88	2.45
异亮氨酸 Ile	2.89	2.46
缬氨酸 Val	3.30	2.93
苯丙氨酸 Phe	2.78	2.55

### 1.2 实验用鱼和实验条件

实验所用的大口黑鲈购自广州市增城渔场,在华南师范大学水产养殖中心进行养殖实验。实验开始前,使用TC饲料每天投喂2次 (8:00和17:00) 至表观饱腹,持续2周,使鱼逐渐适应实验环境。实验开始前,将所有鱼禁食24h后进行称重,获得初始体质量。将初始体质量为(4.16±0.02)g的大口黑鲈随机放入300L水族箱中,每缸喂养30尾,每个处理设置4个重复。每天2次 (7:00和17:00) 投喂大口黑鲈直至明显饱腹,记录每天投喂量及水温,持续8周。养殖实验使用室内循环水养殖系统,实验期间水温维持在24℃,溶解氧含量为6.0~7.0 mg/L, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N为68~100 μg/L。

### 1.3 样品采集与生长指标测定

实验开始时,随机挑选20尾全鱼,用100 mg/L 丁香酚 (上海医药有限公司,中国上海) 进行麻醉后取样,获得初始鱼的体成分组成。饲养8周后,所有大口黑鲈禁食24h,首先对所有鱼称重计数,然后每缸随机抽取4条鱼用麻醉剂进行麻

表 2 实验饲料组成(干重)  
Tab. 2 Composition of experimental diets (dry weight) %

项目 items	饲料 diets		
	TC	TS	LT
<b>原料 ingredients</b>			
鱼粉 fish meal	65.00	0.00	0.00
宠物级鸡肉粉 poultry by-product meal	0.00	65.00	65.00
低筋麦粉 wheat meal	5.00	5.00	5.00
谷朊粉 wheat gluten meal	12.00	12.00	12.00
鱼油 fish oil	4.50	1.50	1.50
大豆卵磷脂 soybean lecithin	1.50	1.50	1.50
氨基酸混合物 AA mixture <sup>1</sup>	0.00	2.79	2.79
L-苏氨酸 L-threonine	0.00	0.22	0.00
丙氨酸 alanine	3.01	0.00	0.22
磷酸一钙 monocalcium phosphate	1.50	1.50	1.50
VC+VE (1 : 1)	0.10	0.10	0.10
氯化胆碱 choline chloride	0.60	0.60	0.60
多维 vitamin premix <sup>2</sup>	0.50	0.50	0.50
多矿 mineral premix <sup>3</sup>	1.50	1.50	1.50
抗氧化剂 antioxidant	0.05	0.05	0.05
防霉剂 mould inhibitor	0.10	0.10	0.10
纤维素 cellulose	4.64	7.64	7.64
<b>营养成分 nutritional ingredient</b>			
干物质 dry matter	89.54	89.91	89.41
粗蛋白质 crude protein	54.49	54.82	54.49
粗脂肪 crude lipid	12.13	12.74	12.88
灰分 ash	15.81	15.83	15.39

注: 鱼粉为蛋白质67.09%, 粗脂肪9.47%; 宠物级鸡肉粉为粗蛋白质66.10%, 粗脂肪12.06%。1. 氨基酸混合物(%)为L-组氨酸0.55, L-异亮氨酸0.22, L-亮氨酸0.26, L-赖氨酸0.84, L-蛋氨酸0.37, L-苯丙氨酸0.10, L-色氨酸0.02, L-缬氨酸0.17, L-酪氨酸0.14, L-牛磺酸0.13。2. 维生素混合物 (mg/kg)为维生素A 16 000 IU, 维生素B<sub>1</sub> 17.80, 维生素B<sub>2</sub> 48.00, 维生素B<sub>6</sub> 29.52, 维生素B<sub>12</sub> 0.24, 维生素C 800, 维生素D<sub>3</sub> 8 000 IU, 维生素E 160, 维生素K<sub>3</sub> 14.72, 烟酰胺 79.20, 叶酸6.40, 泛酸钙73.60, 生物素0.64, 肌醇320, 左旋肉碱 100。3. 矿物质混合物 (mg/kg): Co (COCl<sub>2</sub>) 0.24, Cu (CuSO<sub>4</sub>) 2.00, Se (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) 0.18, Mn (MnSO<sub>4</sub>) 6.20, Fe (FeSO<sub>4</sub>) 21.10, Zn (ZnSO<sub>4</sub>) 34.40, I (Ca (IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) 1.63, Mg (MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) 52.70

Notes: fishmeal is protein 67.09%, crude lipid 9.47%; poultry by-product meal (pet foodgrade) is crude protein 66.10%, crude lipid 12.06%. 1. AA mixture (%) are L-histidine 0.55, L-isoleucine 0.22, L-leucine 0.26, L-lysine 0.84, L-methionine 0.37, L-phenylalanine 0.10, L-tryptophan 0.02, L-valine 0.17, L-tyrosine 0.14, L-tyrosine 0.13. 2. vitamin Premix (mg/kg diet) are vitamin A 16 000 IU, vitamin B<sub>1</sub> 17.80, vitamin B<sub>2</sub> 48.00, vitamin B<sub>6</sub> 29.52, vitamin B<sub>12</sub> 0.24, vitamin C 800, vitamin D<sub>3</sub> 8 000 IU, vitamin E 160, vitamin K<sub>3</sub> 14.72, niacinamide 79.20, folic acid 6.40, calcium-pantothenate 73.60, biotin 0.64, inositol 320, L-carnitine 100. 3. mineral premix (mg/kg diet) are Co (COCl<sub>2</sub>) 0.24, Cu (CuSO<sub>4</sub>) 2.00, Se (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) 0.18, Mn (MnSO<sub>4</sub>) 6.20, Fe (FeSO<sub>4</sub>) 21.10, Zn (ZnSO<sub>4</sub>) 34.40, I (Ca (IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) 1.63, Mg (MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) 52.70

表 3 饲料氨基酸组成(干重)  
Tab. 3 Amino acids compositions of experimental diets (dry weight) %

氨基酸 amino acids	饲料 diets		
	TC	TS	LT
<b>必需氨基酸 essential amino acids</b>			
苏氨酸 Thr	2.03	2.00	1.78
缬氨酸 Val	2.32	2.32	2.34
蛋氨酸 Met	1.34	1.29	1.31
异亮氨酸 Ile	1.93	1.90	1.94
亮氨酸 Leu	3.54	3.54	3.53
赖氨酸 Lys	3.46	3.30	3.31
精氨酸 Arg	2.70	3.10	3.12
苯丙氨酸 Phe	2.02	2.00	1.99
总必需氨基酸 total EAA <sup>1</sup>	19.36	19.46	19.33
<b>非必需氨基酸 non-essential amino acids</b>			
天冬氨酸 Asp	1.51	1.46	1.46
组氨酸 His	4.1	3.56	3.56
丝氨酸 Ser	1.83	1.86	1.83
谷氨酸 Glu	7.37	7.51	7.53
甘氨酸 Gly	2.86	4.44	4.49
丙氨酸 Ala	5.69	3.07	3.06
酪氨酸 Tyr	1.58	1.72	1.70
脯氨酸 Pro	2.28	3.26	3.24
总非必需氨基酸 total NEAA <sup>2</sup>	27.21	26.87	26.87
总氨基酸 total AA <sup>3</sup>	46.57	46.32	46.20

注: 1. 游离必需氨基酸总和; 2. 游离非必需氨基酸总和; 3. 游离氨基酸总和, 下同

Notes: 1. EAA (sum of free essential amino acids); 2. NEAA (sum of free non-essential amino acids); 3. TAA (sum of free amino acids), the same below

醉, 测量其体质量、体长及内脏团质量、肝脏质量, 并迅速对血液和组织(肝脏和肾脏)进行采样。血液采集采用尾静脉穿刺法, 血液样本在 3 000 ×g, 4 °C 下离心 5 min, 取上清液至新的离心管中, 放入液氮暂时保存。解剖肝脏和肾脏组织, 装入离心管中置于液氮保存。取样完毕后, 所有样品放入-80 °C 冰箱中储存待用。

#### 1.4 血浆生理生化指标测定

使用自动生化分析仪 (Sysmex 公司, CHEMIX-800, 日本神户) 对血浆中总蛋白质浓度 (TP)、甘油三酯 (TG)、胆固醇 (TCH) 的含量以及谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH) 的活性进行测定分析。

### 1.5 血浆游离氨基酸水平的测定

测定游离氨基酸 (FAA) 所用的血浆样品制备方法参照许丹丹<sup>[13]</sup>的方法。将血浆放置在 4 °C 解冻后, 取 0.4 mL 于 2 mL 离心管中, 加入 1.2 mL 10% 磺基水杨酸, 充分混匀后静置 5 min, 13 000 r/min, 4 °C 离心 15 min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 滤过后的液体转移至上样管中, 使用全自动氨基酸检测仪 (L-8900, HITACHI, Japan) 检测血浆中氨基酸含量, 色谱柱为锂离子交换柱。

### 1.6 实时定量 PCR(qRT-PCR)

肝脏和肾脏的总 RNA 使用 Trizol 法 (中国 Vazyme 生物技术有限公司) 提取, 分别使用 NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo, NanoDrop Technologies, USA) 和 1.2% 琼脂糖凝胶电泳法测定 RNA 的含量和质量。使用 DEPC 水将获得的 cDNA

模板稀释至 80 ng/μL 用于实时定量 PCR 分析。使用 Hiff® qPCR SYBR Green MasterMix (上海翊圣生物科技有限公司, 中国) 进行 qRT-PCR 反应。qRT-PCR 的热循环程序: 95 °C 3 min, 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 20 s, 40 次循环。在每次 PCR 结束后进行熔解曲线分析, 以确认这些反应中仅存在 1 种 PCR 产物。目的基因的相对表达水平使用比较  $C_t$  方法 ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法) 计算<sup>[14]</sup>, 以 TC 组的表达量作为 1。不同处理之间的 β 肌动蛋白 (β-actin) 表达量差异不显著, 作为内参基因。

利用 Primer 5.0 软件设计引物 (表 4), qRT-PCR 分析了包括糖代谢中的丙酮酸激酶 (PK) 和磷酸烯醇式丙酮酸激酶 (PEPCK), 脂肪酸合成代谢中的过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR-α)、过氧化物酶体增殖物激活受体 β (PPAR-β) 和乙酰辅酶 A 羧化酶 1 (ACC1), 甘油三酯合成代谢中

表 4 实时荧光定量所用的引物列表

Tab. 4 Primer sequences used for real-time quantitative PCR

基因 genes	正向引物(5'~3') forward primer (5'-3')	反向引物(5'~3') reverse primer (5'-3')	目的 purpose
<b>糖酵解的关键调节因子 key regulators in glycolysis</b>			
<i>PK</i>	CTCTTTCATCCGCAAAGC	AATCCCAGGTCACCACG	RT-qPCR
<i>PEPCK</i>	GGAAACGGCCAACATTCT	GCCAACCAGCAGTTCAT	RT-qPCR
<b>脂质代谢的关键调节因子 key regulators in lipid metabolism</b>			
<i>PPAR-α</i>	CCACCGCAATGGTCGATATG	TGCTGTTGATGGACTGGGAAA	RT-qPCR
<i>PPAR-β</i>	AGCACCTCGCCATTGTAATCT	GGACCCCAATCTCCTTCGTC	RT-qPCR
<i>ACC1</i>	ATCCCTCTTTGCCACTGTTG	GAGGTGATGTTGCTCGCATA	RT-qPCR
<i>DGAT1</i>	CACGCCTTCTTGGAGAAC	AATGGTACCCACAGCCAGAC	RT-qPCR
<i>LPIN1</i>	TCCTACGTTCCCGAGAGAAA	TACGAGGGAACCACTTCCTG	RT-qPCR
<i>LPL</i>	TTCCTCGACCCTCTGAAAGA	GGAGTCAAGTTTGCCAGGAA	RT-qPCR
<i>MGL</i>	AAGGTTTTTCTGGCGAAGGT	CGTGGAAAGTTCAGCTCATCA	RT-qPCR
<i>HSL</i>	ATCAGAGCTGGAGCACCTA	GCAGAGGAGAGCAGAAAAGGA	RT-qPCR
<b>免疫系统的关键调节因子 key regulators in immune system</b>			
<i>TNF-α</i>	CTTCGCTACAGCCAGGCATCG	TTTGGCACACCGACCTCACC	RT-qPCR
<i>IL-1β</i>	CGTGACTGACAGCAAAAAGAGG	GATGCCAGAGCCACAGTTC	RT-qPCR
<i>IL-8</i>	CGTTGAACAGACTGGGAGAGATG	AGTGGGATGGCTTCATTATCTTGT	RT-qPCR
<i>IL-10</i>	CGGCACAGAAATCCAGAGC	CAGCAGGCTCACAAAATAAACATCT	RT-qPCR
<i>TGF-β1</i>	GCTCAAAGAGAGCGAGGATG	TCCTTACCATTGCAATCC	RT-qPCR
<i>GST</i>	AACTTTTGCTGGCTGATGT	TCTGTCCCTGTGGGTCTC	RT-qPCR
<i>SOD1</i>	TGGCAAGAACAAGAACCACA	CCTCTGATTTCTCCTGTCACC	RT-qPCR



的二酰甘油酰基转移酶 1 (DGAT1), 以及脂肪合成与分解代谢中的磷脂磷酸水解酶 1 (LPIN1)、脂蛋白脂肪酶 (LPL)、单酰甘油脂肪酶 (MGL) 和激素敏感脂肪酶 (HSL)。qRT-PCR 还分析了肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和白细胞介素 8 (IL-8) 等促炎性细胞因子; 白细胞介素 10 (IL-10)、转化生长因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 等抗炎细胞因子; 用于细胞解毒的谷胱甘肽转移酶 (GST) 和超氧化物歧化酶 1 (SOD1)。

### 1.7 计算公式

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

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

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

饲料效率 (feed efficiency ratio, FER, %) =  $(W_t - W_0)/W_f \times 100\%$

蛋白质效率 (protein efficiency ratio, PER, %) =  $(W_t - W_0)/(W_f \times W_p) \times 100\%$

蛋白质沉积率 (protein deposition rate, PDR, %) =  $(W_t \times CP_t - W_0 \times CP_0)/(W_f \times W_p) \times 100\%$

脂肪沉积率 (fat deposition rate, FDR, %) =  $(W_t \times CL_t - W_0 \times CL_0)/(W_f \times W_1) \times 100\%$

肥满度 (condition factor, CF,  $g/cm^3$ ) =  $W/L^3 \times 100\%$

脏体比 (viscerosomatic index, VSI, %) =  $W_v/W \times 100\%$

肝体比 (hepatosomatic index, HSI, %) =  $W_h/W \times 100\%$

式中,  $N_t$  为终末尾数,  $N_0$  为初始尾数,  $W_t$  为终末体质量 (g),  $W_0$  为初始体质量 (g),  $t$  为实验天数 (d),  $CP_t$  为终末粗蛋白含量 (%),  $CP_0$  为初始粗蛋白含量 (%),  $CL_t$  为终末粗脂肪含量 (%),  $CL_0$  为初始粗脂肪含量 (%),  $W_1$  为饲料中的粗脂肪含量 (%),  $W_f$  为摄入饲料量 (g),  $W_h$  为鱼肝脏质量 (g),  $W$  为鱼体质量 (g),  $L$  为鱼体长 (cm),  $W_p$  为饲料中的粗蛋白质含量 (%)。

### 1.8 数据分析

所有统计分析使用 SPSS 22 软件进行, 数据使用“平均值 $\pm$ 标准误”(mean $\pm$ SE) 表示, 实验结果采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Tukey 氏检验进行组间差异显著性比较,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 大口黑鲈生长情况

饲料苏氨酸水平对大口黑鲈鱼体增重率、特定生长率、饲料效率、脂肪和蛋白质沉积率等均有显著影响 (表 5)。与对照组相比, LT 饲料组显著降低了大口黑鲈的终末体质量、增重率和特定生长率 ( $P < 0.05$ ), 补充苏氨酸后大口黑鲈终末体质量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 但与对照组相比仍显著降低 ( $P > 0.05$ )。与 TC 组相比, 大口黑鲈摄食 LT 组饲料后, 其饲料效率、蛋白质效率、脂肪和蛋白质沉积率也显著下降 ( $P < 0.05$ ), 然而在 TS 处理组中, 饲料效率、蛋白质效率、脂肪和蛋白质沉积率相比于 LT 处理组均显著上升, 但与对照组相比显著降低 ( $P < 0.05$ )。苏氨酸缺乏还显著提升鱼体的脏体比 ( $P < 0.05$ ), 但对肥满度和肝体比无显著影响 ( $P > 0.05$ )。就鱼体成分而言, 与 TC 组相比, LT 处理组显著降低鱼体蛋白质含量 ( $P < 0.05$ ), 饲料中补充苏氨酸对鱼体的蛋白含量没有显著的提高作用 ( $P > 0.05$ )。不同处理组间鱼体的灰分、脂肪和水分含量均无显著影响 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 大口黑鲈血浆生理生化指标

饲料中苏氨酸水平对大口黑鲈血浆甘油三酯、胆固醇、谷丙转氨酶均有显著影响 (表 6)。与对照组相比, LT 处理组降低血浆中甘油三酯和胆固醇的含量 ( $P < 0.05$ ), 苏氨酸添加对于提高血浆中甘油三酯和胆固醇水平无显著性作用 ( $P > 0.05$ )。另一方面, 与摄食 TC 组饲料的大口黑鲈相比, 摄食 LT 组饲料的大口黑鲈其血浆中谷丙转氨酶的含量显著升高 ( $P < 0.05$ ), LT 组饲料中添加晶体苏氨酸 (TS 组) 对降低血浆中谷丙转氨酶的含量无显著作用 ( $P > 0.05$ ); 不同处理组对血浆中总蛋白、谷草转氨酶和乳酸脱氢酶均无显著性影响 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 大口黑鲈血浆游离氨基酸水平

饲料中苏氨酸水平对大口黑鲈血浆游离氨基酸水平有显著影响 (表 7)。根据检测结果发现, 与 TC 处理组相比, LT 处理组显著降低了血浆中 EAA、NEAA 和 TAA 的含量 ( $P < 0.05$ ), 补充苏氨酸后显著提高血浆中 NEAA 和 TAA 的含量 ( $P < 0.05$ ), 使之与 TC 处理组间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。除此之外, 与摄食 TC 组饲料的大口黑鲈相比,

表 5 饲料苏氨酸水平对大口黑鲈生长及饲料利用的影响

Tab. 5 Effect of dietary threonine level on growth performance and feed utilization of *M. salmoides*

项目 items	饲料 diets			P
	TC	TS	LT	
初始体质量/g initial body weight	4.18±0.04	4.10±0.07	4.19±0.06	0.50
终末体质量/g final body weight	28.80±0.26 <sup>a</sup>	26.93±0.14 <sup>b</sup>	25.49±0.25 <sup>c</sup>	0.00
存活率/% SR	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	
增重率/% WGR	589.90±13.50 <sup>a</sup>	557.34±7.41 <sup>ab</sup>	508.22±13.43 <sup>b</sup>	0.01
特定增长率/(%/d) SGR	3.45±0.04 <sup>a</sup>	3.36±0.02 <sup>ab</sup>	3.22±0.04 <sup>b</sup>	0.01
饲料效率/% FER	1.19±0.01 <sup>a</sup>	1.12±0.00 <sup>b</sup>	1.04±0.02 <sup>c</sup>	0.00
蛋白质效率/% PER	2.41±0.02 <sup>a</sup>	2.28±0.01 <sup>b</sup>	2.14±0.03 <sup>c</sup>	0.00
脂肪沉积率/% FDR	88.87±2.14 <sup>a</sup>	79.04±1.15 <sup>b</sup>	70.49±1.63 <sup>c</sup>	0.00
蛋白质沉积率/% PDR	47.53±1.38 <sup>a</sup>	43.33±0.95 <sup>b</sup>	40.7±0.30 <sup>c</sup>	0.00
肥满度/(g/cm <sup>3</sup> ) CF	2.09±0.04	2.10±0.03	2.12±0.07	0.90
脏体比/% VSI	7.39±0.28 <sup>a</sup>	8.20±0.25 <sup>ab</sup>	8.33±0.14 <sup>b</sup>	0.02
肝体比/% HSI	4.60±0.33	4.63±0.15	4.00±0.11	0.12
<b>鱼体成分(湿重) proximate composition of whole body (wet weight)</b>				
灰分/% ash	3.48±0.13	3.34±0.13	3.57±0.05	0.33
粗脂肪/% crude lipid	6.84±0.08	6.77±0.07	6.70±0.13	0.60
粗蛋白质/% crude protein	17.19±0.07 <sup>a</sup>	16.79±0.13 <sup>b</sup>	16.51±0.08 <sup>b</sup>	0.00
水分/% moisture	72.98±0.18	72.54±0.20	72.95±0.18	0.22

注：同行数据上标字母不同表示差异显著( $P<0.05$ )，下同

Notes: different superscripted letters in the same row indicate significant differences ( $P<0.05$ ), the same below

表 6 饲料苏氨酸水平对大口黑鲈血浆生理生化指标的影响

Tab. 6 Effect of dietary threonine levels on plasma physiological and biochemical indexes of *M. salmoides*

项目 items	饲料 diets			P
	TC	TS	LT	
总蛋白/( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) TP	48.77±0.59	47.90±0.12	47.80±0.61	0.38
甘油三酯/(mmol/L) TG	15.49±0.21 <sup>a</sup>	14.40±0.43 <sup>ab</sup>	12.51±0.66 <sup>b</sup>	0.01
胆固醇/(mmol/L) TCH	13.10±0.21 <sup>a</sup>	11.68±0.12 <sup>b</sup>	11.61±0.06 <sup>b</sup>	0.00
谷丙转氨酶/(U/L) ALT	18.00±0.58 <sup>b</sup>	23.33±0.33 <sup>a</sup>	23.00±0.58 <sup>a</sup>	0.00
谷草转氨酶/(U/L) AST	138.67±1.33	136.67±2.19	124.00±8.33	0.16
乳酸脱氢酶/(U/L) LDH	1248.33±11.39	1272.00±47.61	1263.67±102.55	0.97

摄食 LT 组饲料的大口黑鲈血浆中 Thr、Met、Lys、His、Gly、Ala 和 Cys 含量均显著下降 ( $P<0.05$ )。饲料中补充苏氨酸能够显著提高血浆中 Thr、Met、

Lys、Gly 和 Cys 的游离氨基酸水平 ( $P<0.05$ )，使之与 TC 处理组间无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

## 2.4 大口黑鲈肝脏糖脂代谢

饲料中苏氨酸水平对大口黑鲈糖酵解、脂肪酸与甘油三酯代谢、脂肪合成与分解代谢中关键酶的表达均有显著影响 (图 1)。糖酵解关键酶中，与 TC 和 LT 组相比，TS 处理组显著升高鱼体肝脏中 PK mRNA 水平的表达量 ( $P<0.05$ )，然而 3 个处理组对 PEPCK mRNA 水平的表达无显著影响 ( $P>0.05$ ) (图 1-a)。饲料苏氨酸水平显著影响大口黑鲈脂肪酸、甘油三酯代谢和脂肪合成中关键酶基因表达 (图 1-b)，与 TC 组相比，LT 处理组显著降低了肝脏中 PPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\beta$ 、ACCI 和 LPIN1 的表达量 ( $P<0.05$ )。饲料中补充苏氨酸显著提高肝脏中 PPAR- $\beta$ 、ACCI 和 LPIN1 的表达量 ( $P<0.05$ )，使其与 LC 组无显著差异

表 7 饲料苏氨酸水平对大口黑鲈血浆游离氨基酸水平的影响  
 Tab. 7 Effect of dietary threonine levels on plasma free amino acids level of *M. salmoides* μg/mL

氨基酸 amino acids	饲料 diets			P
	TC	TS	LT	
<b>必需氨基酸 essential amino acids</b>				
苏氨酸 Thr	25.35±0.34 <sup>a</sup>	19.15±0.30 <sup>b</sup>	13.65±1.18 <sup>c</sup>	0.00
缬氨酸 Val	26.44±0.31	27.26±0.18	27.58±0.88	0.38
蛋氨酸 Met	16.23±0.07 <sup>a</sup>	14.88±0.13 <sup>b</sup>	13.51±0.45 <sup>c</sup>	0.00
异亮氨酸 Ile	16.10±0.21	16.33±0.16	15.99±0.53	0.78
亮氨酸 Leu	29.19±0.46	28.97±0.24	29.18±1.07	0.97
苯丙氨酸 Phe	16.37±0.06	15.36±0.13	15.85±0.42	0.08
赖氨酸 Lys	29.79±0.20 <sup>a</sup>	29.29±0.12 <sup>a</sup>	22.53±0.75 <sup>b</sup>	0.00
精氨酸 Arg	2.46±0.15 <sup>b</sup>	2.72±0.07 <sup>b</sup>	3.39±0.16 <sup>a</sup>	0.01
组氨酸 His	16.40±0.25 <sup>a</sup>	12.20±0.22 <sup>b</sup>	13.63±0.77 <sup>b</sup>	0.00
必需氨基酸 EAA	178.33±1.49 <sup>a</sup>	166.16±0.87 <sup>ab</sup>	155.31±5.71 <sup>b</sup>	0.01
<b>非必需氨基酸 non-essential amino acids</b>				
丝氨酸 Ser	6.80±0.09	7.16±0.02	6.64±0.19	0.06
谷氨酸 Glu	12.66±0.29	12.52±0.09	12.48±1.12	0.98
甘氨酸 Gly	83.22±0.67 <sup>a</sup>	76.52±1.24 <sup>b</sup>	58.15±1.80 <sup>c</sup>	0.00
丙氨酸 Ala	60.69±0.71 <sup>a</sup>	53.30±1.23 <sup>b</sup>	50.90±2.12 <sup>b</sup>	0.01
半胱氨酸 Cys	5.46±0.16 <sup>a</sup>	5.21±0.06 <sup>a</sup>	4.32±0.21 <sup>b</sup>	0.01
酪氨酸 Tyr	19.48±0.09	19.22±0.51	17.94±0.82	0.20
非必需氨基酸 NEAA	188.30±1.80 <sup>a</sup>	173.93±2.58 <sup>a</sup>	150.42±5.96 <sup>b</sup>	0.00
总氨基酸 TAA	366.63±3.14 <sup>a</sup>	340.09±3.02 <sup>a</sup>	305.73±11.66 <sup>b</sup>	0.00

( $P>0.05$ )。苏氨酸水平显著影响脂肪分解代谢中关键酶基因表达(图 1-c), 与 TC 组相比, LT 处理组显著提高肝脏中 *LPL* 和 *MGL* mRNA 的表达水平, 同时降低了 *HSL* mRNA 的表达水平 ( $P<0.05$ )。饲料中补充苏氨酸显著降低了肝脏中 *LPL* 和 *MGL* 的基因表达水平, 也提高了 *HSL* 的基因表达水平 ( $P<0.05$ ), 使之与 LC 组无显著差异 ( $P>0.05$ )。

### 2.5 大口黑鲈肾脏免疫指标

与对照组相比, 低苏氨酸处理组显著降低了肾脏中 *TNF- $\alpha$*  的表达量, 同时升高了肾脏中 *IL-1 $\beta$*  和 *IL-8* 的 mRNA 水平表达量 ( $P<0.05$ )。饲料中补充苏氨酸对于提高 *TNF- $\alpha$*  的 mRNA 水平和降低肾脏中 *IL-1 $\beta$* 、*IL-8* 的 mRNA 水平均有显著作用 ( $P<0.05$ )。3 个处理组对肾脏中 *IL-10*、

*TGF- $\beta$ 1*、*GST* 和 *SOD1* 的表达量均无显著调控作用 ( $P>0.05$ )(图 2)。

## 3 讨论

非鱼粉蛋白源中, 氨基酸组成不平衡是导致其替代效率低下的重要原因之一。苏氨酸作为鱼类的必需氨基酸之一, 是非鱼粉蛋白源替代鱼粉后最常见的限制性氨基酸<sup>[15]</sup>。饲料中苏氨酸水平对鱼类生长性能和饲料利用具有明显的调控作用。在评估了鸡肉粉替代鱼粉后, 不同的氨基酸添加水平对大口黑鲈生长和代谢的影响不尽相同。本研究发现, 宠物级鸡肉粉完全替代鱼粉后, 苏氨酸缺乏可导致大口黑鲈的增重率、特定生长率均显著下降, 这一结果可能与苏氨酸缺乏导致饲料效率、蛋白质和脂质沉

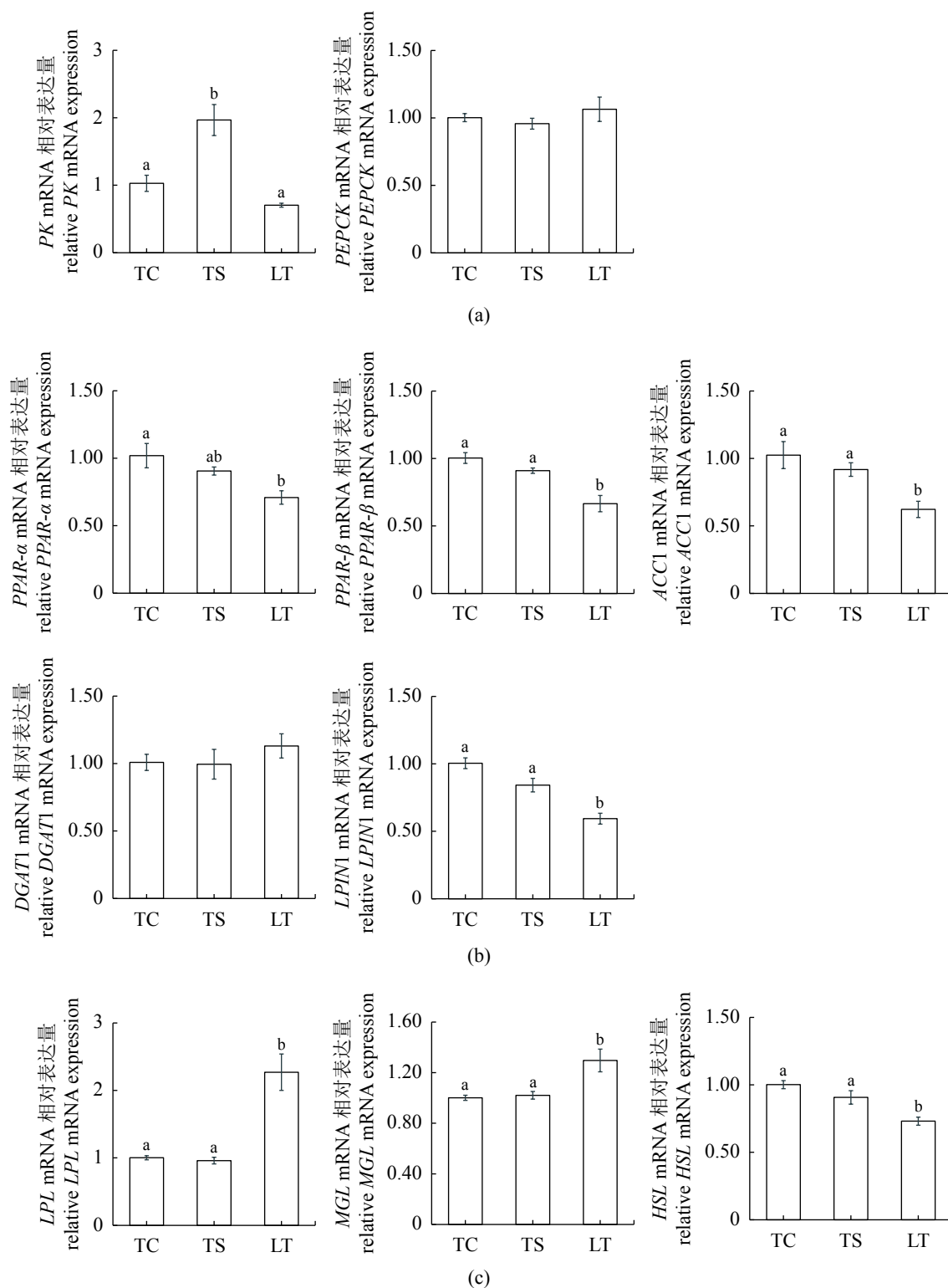


图1 饲料苏氨酸水平对大口黑鲈肝脏中葡萄糖脂代谢关键酶基因表达的影响

(a) 糖酵解关键酶, (b) 脂肪酸、甘油三酯和脂肪合成的关键酶, (c) 脂肪分解的关键酶, 图中上标字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); 下同

**Fig. 1 Effect of threonine levels on gene expressions of the key enzymes in liver involved in glucose and lipid metabolism in *M. salmoides***

(a) key enzymes in glycolysis, (b) key enzymes in fatty acid, triglycerides and lipogenesis metabolism, (c) key enzymes in lipolysis, different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ); the same below



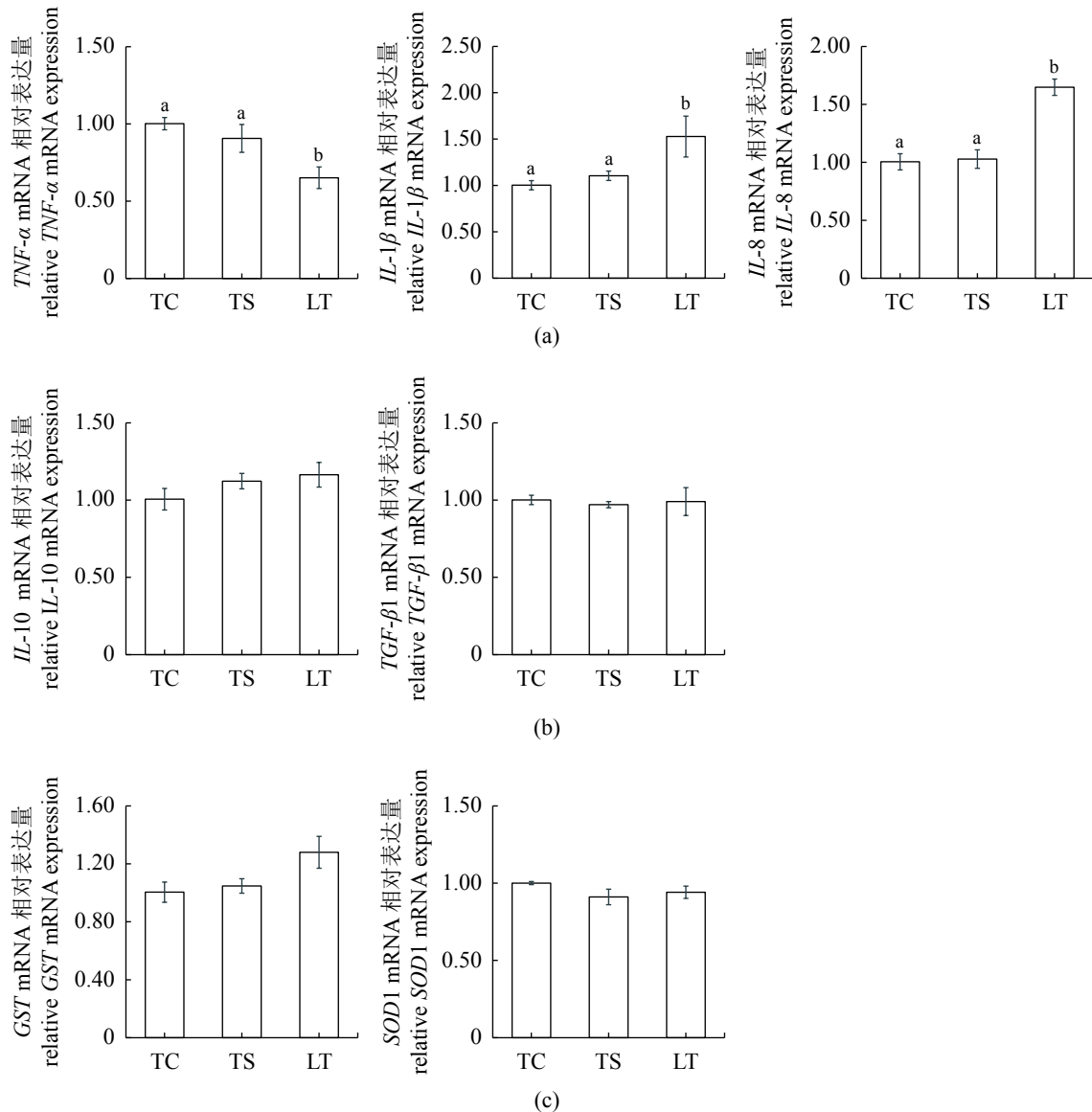


图2 饲料苏氨酸水平对大口黑鲈肾脏免疫应答相关基因表达的影响

(a) 抗炎反应关键调控因子; (b) 促炎反应关键调控因子; (c) 细胞解毒关键调控因子

Fig. 2 Effect of dietary threonine level on gene expression related to renal immune response in *M. salmoides*

(a) key regulators in anti-inflammatory response; (b) key regulators in pro-inflammatory response; (c) key regulators in cell detoxification

积率的下降有关。同样, 此研究结果在草鱼<sup>[16]</sup>、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)<sup>[17]</sup>、杂交鲂<sup>[6]</sup>、银黑鲷 (*Sparidentex hasta*)<sup>[18]</sup>、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)<sup>[10]</sup>、斑点叉尾鲟 (*Ictalurus punctatus*)<sup>[19]</sup> 的研究中也有发现。在鱼类的生长中, 机体蛋白质沉积做出了很大的贡献<sup>[6]</sup>, 而苏氨酸缺乏的饲料会显著降低鱼体蛋白质含量, 补充苏氨酸后, 大口黑鲈的增重率、特定生长率和饲料效率等均得到了显著提高。本研究结果表明, 宠物级鸡肉粉完全替代鱼粉后, 苏氨酸的添加能够显著促进大口黑鲈的生长性能, 并提高鸡肉

粉的利用效率。

血浆生理生化指标不仅能反映物种的特性, 而且还能作为动物生理、病理研究的重要参考依据<sup>[20]</sup>。本研究结果表明, 饲料中苏氨酸不足可显著提高血浆中 ALT 含量, 但对血浆中 AST 的含量没有显著性影响。AST 和 ALT 是肝脏中两种重要的转氨酶, 与 AST 相比, ALT 对鱼的营养状况变化更为敏感<sup>[18]</sup>。血浆中 AST 和 ALT 活性升高表明肝功能受到损伤<sup>[21]</sup>, 因此这一实验结果表明, 饲料中苏氨酸缺乏会在一定程度上影响肝脏的健康状态。乳酸脱氢酶 (LDH) 是一种

存在于很多组织中的细胞质酶，血清 LDH 水平的升高表明细胞溶解<sup>[22]</sup>。饲料中苏氨酸水平对血浆中 LDH 含量无显著影响，说明苏氨酸缺乏未必会造成细胞损伤。

另外，检测血浆中的营养成分时发现，与对照组相比，LT 饲料组导致鱼体血浆中甘油三酯和胆固醇含量均显著下降，但血浆中总蛋白水平无显著差异。血浆胆固醇水平可指示肝脏中脂质和脂蛋白代谢水平，甘油三酯也主要在肝脏中合成，它可以作为肝脏健康状态的标志物<sup>[23]</sup>，这一研究结果表明，鸡肉粉完全替代鱼粉显著降低了血浆中脂类成分的含量，从而对肝脏的代谢水平有显著的影响。在鸡肉粉完全替代鱼粉的饲料中，补充晶体苏氨酸可以在一定程度上提高血浆中甘油三酯和胆固醇的含量，但是作用效果不显著。综合各项生理生化指标，发现饲料中鸡肉粉完全替代会对鱼体肝脏造成一定的损伤，补充苏氨酸后，各项生理生化指标也无显著性变化，说明了苏氨酸在改善鱼体肝脏损伤方面的作用不显著。

本研究还发现，饲料中苏氨酸水平对血浆中游离氨基酸含量有显著的调控作用。饲喂未添加苏氨酸的饲料时，血浆中的苏氨酸含量与对照组相比呈现极显著下降趋势 ( $P < 0.001$ )。除此之外，其他多数 EAA 和 NEAA 的含量也显著降低，游离氨基酸总量显著下降 ( $P < 0.05$ )。这些结果与鱼类饲喂氨基酸受限日粮的结果一致<sup>[24]</sup>，苏氨酸缺乏造成饲料氨基酸组成的不平衡，进而降低了其他多种氨基酸的转运和吸收。饲料中补充晶体苏氨酸后，显著升高了血浆中多数 EAA 和 NEAA 以及 TAA 的含量 ( $P < 0.05$ )。已有研究证明，血浆中的游离氨基酸水平与饲料氨基酸含量具有高度相关性<sup>[25-26]</sup>。Yun 等<sup>[27]</sup>通过测量血浆游离氨基酸和氨浓度，来确定虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的饲料最佳苏氨酸需要量。此外，也有研究通过测定血浆游离氨基酸，以推断不同蛋白质来源饲料中的限制性氨基酸<sup>[28]</sup>。本研究的结果与上述研究一致，说明苏氨酸是宠物级鸡肉粉完全替代鱼粉饲料的限制性氨基酸。补充了苏氨酸后，大口黑鲈血浆中游离氨基酸水平呈现出显著的上升趋势，且多数氨基酸含量与对照组间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

在鱼类糖代谢过程中，涉及的主要途径是

糖酵解和糖异生的过程<sup>[29]</sup>。目前关于氨基酸调控鱼类糖代谢的研究较少，仅见于亮氨酸<sup>[30]</sup>、蛋氨酸和赖氨酸<sup>[31]</sup>。本研究测定了饲喂大口黑鲈不同苏氨酸水平的饲料后，糖酵解途径关键酶 mRNA 的表达水平，以阐明苏氨酸调节鱼体糖代谢的潜在机制。结果表明，鸡肉粉完全替代鱼粉后对这两种酶的 mRNA 水平均无显著影响。然而，添加了苏氨酸后，肝脏中 PK 基因的表达水平显著上升。以上结果表明，宠物级鸡肉粉完全替代鱼粉对大口黑鲈糖酵解代谢过程无显著影响。

与糖代谢不同，苏氨酸对大口黑鲈脂代谢的影响非常显著。在 Song 等<sup>[32]</sup>的研究中，氨基酸受限的鱼粉替代饲料能显著降低肝脏的脂肪合成代谢，增加脂肪的分解代谢，而 Dai 等<sup>[33]</sup>在对虹鳟的研究中也发现，高水平氨基酸能显著上调脂肪合成相关基因的表达。Liang 等<sup>[30]</sup>的研究发现，亮氨酸不足会显著降低脂肪合成相关基因 *FAS* 和 *ACC1* 的表达，而补充亮氨酸后可明显改善这一反应，说明单一氨基酸受限也能够影响鱼类的脂质代谢。与上述研究结果一致，本研究发现，苏氨酸不足能显著降低脂肪从头合成关键酶 (*PPAR- $\alpha$* 、*PPAR- $\beta$* 、*ACC1*) 的表达，脂肪沉积减少 (*LPIN1* 表达水平下降)，而脂肪分解代谢关键酶 (*LPL*、*MGL*) 表达显著上升。添加苏氨酸可明显促进脂肪的合成并抑制脂肪分解，使之与对照组无差异。这些结果与先前探究不同赖氨酸水平饲料对大口黑鲈脂质代谢影响的结果相似<sup>[31]</sup>。本研究证明，与亮氨酸、赖氨酸等相同，苏氨酸也是调控鱼类脂质代谢的必需营养素，宠物级鸡肉粉替代鱼粉时，苏氨酸的添加与否对脂质代谢具有重要的调节作用。

除了对生长代谢的调控以外，饲料中适当添加氨基酸还能够增强机体的免疫机能，提高动物体的健康水平<sup>[34-35]</sup>。SOD 是机体内重要的抗氧化酶之一<sup>[36]</sup>，能够催化超氧化物自由基歧化为过氧化氢<sup>[37]</sup>，在自卫和免疫系统中起着重要作用<sup>[38]</sup>，被认为是生物体抗氧化状态的指标和氧化应激的生物标志物<sup>[39]</sup>。而 GST 具有将谷胱甘肽 (GSH) 与含有亲电中心的化合物结合的能力，是一类主要的解毒酶<sup>[40]</sup>，SOD 与 GST 共同作用，在细胞解毒和保护方面发挥着重要作用。在 Zhou 等<sup>[41]</sup>、Habte-Tsion 等<sup>[39]</sup>和 Dong<sup>[7]</sup>等的研究中，喂食低水平苏氨酸饲料时鱼类的 SOD 和 GST 活性

下降, 而适宜的苏氨酸水平会提升 SOD 和 GST 的活性。在本研究中, 无论鱼粉替代饲料是否添加了苏氨酸, 肾脏中 *SOD1* 和 *GST* 的 mRNA 水平均与对照组无显著差异, 说明苏氨酸缺乏对大口黑鲈肾脏的氧化应激的影响不显著, 在团头鲂幼鱼的研究中也有相似的结果<sup>[10]</sup>。炎症细胞因子在免疫反应中也起着重要的作用, 包括促炎细胞因子(如 TNF、IL-1 $\beta$ 、IL-8)和抗炎细胞因子(如 TGF- $\beta$ 1、IL-10)<sup>[42-44]</sup>。在鱼类中, 促炎细胞因子的上调和抗炎细胞因子的下调均会导致炎症反应<sup>[45]</sup>。已有研究发现, 苏氨酸缺乏时能上调促炎细胞因子 *TNF- $\alpha$* 、*IL-1 $\beta$* 、*IL-8* mRNA 水平, 下调抗炎细胞因子 *TGF* 和 *IL-10* mRNA 水平, 从而减弱机体的免疫屏障功能<sup>[8]</sup>, 在此过程中可能有 NF- $\kappa$ B 和 TOR 信号的介导<sup>[7]</sup>。本研究结果显示, 苏氨酸缺乏时, 促炎细胞因子 *IL-8*、*IL-1 $\beta$*  的 mRNA 水平均显著上升, 这与以往已有的研究结果一致, 添加了苏氨酸后, 促炎细胞因子的 mRNA 水平明显下调, 与对照组无显著差异。以上所有结果进一步论证了饲料中苏氨酸水平对大口黑鲈免疫的调节作用。

本研究表明, 使用宠物级鸡肉粉完全替代鱼粉后, 苏氨酸的添加与否对大口黑鲈生长、肝脏糖脂代谢和免疫具有重要的调控作用。苏氨酸作为鱼类的必需营养素, 适量补充能够提高大口黑鲈生长性能、促进脂肪合成和抑制脂肪分解, 并增强免疫机能。本研究为宠物级鸡肉粉在大口黑鲈饲料中的高效利用提供了方法途径, 并为使用苏氨酸提高非鱼蛋白质的利用效率提供了理论依据。

综上所述, 鸡肉粉替代鱼粉是一个综合性的问题, 其替代后对机体生长和代谢的影响涉及多方面, 如氨基酸不平衡、缺乏小分子活性物质等, 本研究探讨了鸡肉粉替代鱼粉重要的限制因素之一, 即氨基酸不平衡问题, 评估了鸡肉粉替代鱼粉后单一添加苏氨酸对大口黑鲈生长性能和代谢的影响, 发现鸡肉粉替代鱼粉后, 单一添加苏氨酸对大口黑鲈生长性能、糖代谢和免疫有一定的促进作用, 但添加后的效果还是显著低于鱼粉组的效果, 将来可能需要从除氨基酸以外的其他方面, 如添加小分子活性物质等, 全面优化提高鸡肉粉替代鱼粉的策略及方案, 为实际生产提供全面有力的理论依据。

## 参考文献 (References):

- [1] 朱瑞, 李良, 吴莉芳, 等. 大豆浓缩蛋白替代鱼粉加工现状及对鱼类影响[J]. 大豆科学, 2019, 38(2): 317-321. Zhu R, Li L, Wu L F, et al. Soy protein concentrate instead of fish meal processing status and impact on fish[J]. Soybean Science, 2019, 38(2): 317-321(in Chinese).
- [2] Cerqueira M, Schrama D, Silva T S, et al. How tryptophan levels in plant-based aquafeeds affect fish physiology, metabolism and proteome[J]. Journal of Proteomics, 2020, 221: 103782.
- [3] 付闰吉, 纪文秀, 王岩, 等. 利用畜禽加工副产品替代点带石斑鱼饲料中的鱼粉[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2011, 37(6): 663-669. Fu R J, Ji W X, Wang Y, et al. Replacement of fish meal with rendered animal protein ingredients in diets for Malabar grouper[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2011, 37(6): 663-669(in Chinese).
- [4] Zhou Q C, Zhao J, Li P, et al. Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. Aquaculture, 2011, 322-323: 122-127.
- [5] 张高明. 苏氨酸对水生动物生产性能的影响[J]. 湖南饲料, 2015(1): 30-32. Zhang G M. The effect of threonine on the production performance of aquatic animals[J]. Hunan Feed, 2015(1): 30-32(in Chinese).
- [6] Zhao Y, Jiang Q, Zhou X Q, et al. Effect of dietary threonine on growth performance and muscle growth, protein synthesis and antioxidant-related signalling pathways of hybrid catfish *Pelteobagrus vachelli*♀×*Leiostichus longirostris*♂[J]. British Journal of Nutrition, 2020, 123(2): 121-134.
- [7] Dong Y W, Feng L, Jiang W D, et al. Dietary threonine deficiency depressed the disease resistance, immune and physical barriers in the gills of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) under infection of *Flavobacterium columnare*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 72: 161-173.
- [8] Dong Y W, Jiang W D, Liu Y, et al. Threonine deficiency decreased intestinal immunity and aggravated inflammation associated with *NF- $\kappa$ B* and *target of rapamycin* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 87: 1-10.

- mycin* signalling pathways in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) after infection with *Aeromonas hydrophila*[J]. *British Journal of Nutrition*, 2017, 118(2): 92-108.
- [9] Wang X, Qiao S Y, Yin Y L, *et al.* A deficiency or excess of dietary threonine reduces protein synthesis in jejunum and skeletal muscle of young pigs[J]. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137(6): 1442-1446.
- [10] Habte-Tsion H M, Ge X P, Liu B, *et al.* A deficiency or an excess of dietary threonine level affects weight gain, enzyme activity, immune response and immune-related gene expression in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(2): 439-446.
- [11] 王秀娟, 胡嘉雯, 王悦, 等. 大口黑鲈营养需求的研究进展[J]. *饲料研究*, 2019, 42(8): 112-116.
- Wang X J, Hu J W, Wang Y, *et al.* Research progress of nutritional requirement for largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Feed Research*, 2019, 42(8): 112-116(in Chinese).
- [12] 朱光来, 顾夕章, 王权, 等. 加州鲈营养与饲料研究进展[J]. *饲料研究*, 2013(4): 16-17, 43.
- Zhu G L, Gu X Z, Wang Q, *et al.* Research progress on nutrition and feed for largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Feed Research*, 2013(4): 16-17, 43(in Chinese).
- [13] 许丹丹. 大菱鲆幼鱼对不同蛋白源营养感知与应答机制的初步研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Xu D D. Preliminary study on the mechanisms of nutrient sensing and responses of different protein sources in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014(in Chinese).
- [14] 李明珠. 皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino.) $\Delta 6$  脂肪酸去饱和酶 ( $\Delta 6$ FAD) 基因克隆以及不同脂肪源对皱纹盘鲍稚鲍生长、脂肪酸组成和 $\Delta 6$ FAD表达的影响 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- Li M Z. Cloning of  $\Delta 6$  fatty acid desaturase ( $\Delta 6$ FAD) and the effect of different dietary lipids on growth, fatty acid composition and  $\Delta 6$ FAD mRNA relative expression level of juvenile abalone (*Haliotis discus hannai* Ino.)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010(in Chinese).
- [15] Bodin N, Mambrini M, Wauters J B, *et al.* Threonine requirements for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) at the fry stage are similar[J]. *Aquaculture*, 2008, 274(2-4): 353-365.
- [16] 文华, 高文, 罗莉, 等. 草鱼幼鱼的饲料苏氨酸需要量[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(2): 238-247.
- Wen H, Gao W, Luo L, *et al.* Determination of dietary threonine requirement for juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(2): 238-247(in Chinese).
- [17] 窦秀丽, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 生长后期对苏氨酸需要量[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(6): 45-52.
- Dou X L, Liang M Q, Zheng K K, *et al.* Threonine requirement of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) in mature stages[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(6): 45-52(in Chinese).
- [18] Yaghoubi M, Mozanzadeh M T, Safari O, *et al.* Gastrointestinal and hepatic enzyme activities in juvenile silvery-black porgy (*Sparidentex hasta*) fed essential amino acid-deficient diets[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, 44(3): 853-868.
- [19] Wilson R P, Allen Jr O W, Robinson E H, *et al.* Tryptophan and threonine requirements of fingerling channel catfish[J]. *The Journal of Nutrition*, 1978, 108(10): 1595-1599.
- [20] 徐万士, 龚佳男, 谢海军. 鱼血液生理生化指标分析[J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2014, 27(3): 28-31.
- Xu W T, Gong J N, Xie H J. Blood physiological and biochemical indices of *Miichthys miituy*[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition)*, 2014, 27(3): 28-31(in Chinese).
- [21] Habte-Tsion H M, Liu B, Ge X P, *et al.* Effects of dietary protein level on growth performance, muscle composition, blood composition, and digestive enzyme activity of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) fry[J]. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2013, 65: 9.
- [22] Lemaire P, Draï P, Mathieu A, *et al.* Changes with different diets in plasma enzymes (GOT, GPT, LDH, ALP) and plasma lipids (cholesterol, triglycerides) of sea-bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Aquaculture*, 1991, 93(1): 63-75.
- [23] Coz-Rakovac R, Strunjak-Perovic I, Hacmanjek M, *et al.* 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



- Blood chemistry and histological properties of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the North Adriatic Sea[J]. *Veterinary Research Communications*, 2005, 29(8): 677-687.
- [24] 许丹丹, 何良, 周慧慧, 等. 玉米蛋白粉部分替代鱼粉对大菱鲂幼鱼的生长性能和游离氨基酸代谢的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2016, 46(2): 26-34.
- Xu D D, He G, Zhou H H, *et al.* Effects of partial replacement of fish meal with corn gluten meal on growth performance and free amino acid metabolism of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 46(2): 26-34(in Chinese).
- [25] Kwasek K, Zhang Y F, Hliwa P, *et al.* Free amino acids as indicators of nutritional status of silver bream (*Vimba vimba*), when using commercial and purified diets[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2009, 153(2): 113-119.
- [26] Ogata H. Correlations of essential amino acid patterns between the dietary protein and the blood, hepatopancreas, or skeletal muscle in carp[J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1986, 52(2): 307-312.
- [27] Yun H, Park G, Ok I, *et al.* Evaluation of optimum dietary threonine requirement by plasma free threonine and ammonia concentrations in surgically modified rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2015, 28(4): 551-558.
- [28] Dunkelgod K E, Winkleman G E. Free amino acids in the plasma of poult used as an indicator of possible limiting amino acids in presently available protein sources[J]. *Poultry Science*, 1982, 61(8): 1674-1683.
- [29] 王广宇, 刘波, 谢骏, 等. 鱼类糖代谢几种关键酶的研究进展[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(3): 377-383.
- Wang G Y, Liu B, Xie J, *et al.* Research progress of several carbohydrate metabolic key enzymes in fish[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(3): 377-383(in Chinese).
- [30] Liang H L, Mokrani A, Chisomo-Kasiya H, *et al.* Dietary leucine affects glucose metabolism and lipogenesis involved in TOR/PI3K/Akt signaling pathway for juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(2): 719-732.
- [31] Yang P, Wang W Q, Chi S Y, *et al.* Effects of dietary lysine on regulating GH-IGF system, intermediate metabolism and immune response in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 17: 100323.
- [32] Song F, Xu D D, Mai K S, *et al.* Comparative study on the cellular and systemic nutrient sensing and intermediary metabolism after partial replacement of fishmeal by meat and bone meal in the diet of turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0165708.
- [33] Dai W W, Panserat S, Kaushik S, *et al.* Hepatic fatty acid biosynthesis is more responsive to protein than carbohydrate in rainbow trout during acute stimulations[J]. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2016, 310(1): R74-R86.
- [34] Mao X B, Lai X, Yu B, *et al.* Effects of dietary threonine supplementation on immune challenge induced by swine *Pseudorabies* live vaccine in weaned pigs[J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2014, 68(1): 1-15.
- [35] Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1999, 893: 13-18.
- [36] Lin S M, Pan Y, Luo L, *et al.* Effects of dietary  $\beta$ -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 788-794.
- [37] Kohen R, Nyska A. Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification[J]. *Toxicologic Pathology*, 2002, 30(6): 620-650.
- [38] Hayes J D, Pulford D J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance Part II [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 30(6): 521-600.
- [39] Habte-Tsion H M, Ren M C, Liu B, *et al.* Threonine modulates immune response, antioxidant status and gene expressions of antioxidant enzymes and antioxidant-immune-cytokine-related signaling molecules in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 51: 189-199.

- [40] Liu N, Chen R H, Du H W, *et al.* Expression of IL-10 and TNF- $\alpha$  in rats with cerebral infarction after transplantation with mesenchymal stem cells[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2009, 6(3): 207-213.
- [41] Zhou Q C, Wang Y L, Wang H L, *et al.* Dietary threonine requirements of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2013, 392-395: 142-147.
- [42] Zuo R T, Ai Q H, Mai K S, *et al.* Effects of conjugated linoleic acid on growth, non-specific immunity, antioxidant capacity, lipid deposition and related gene expression in juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) fed soyabean oil-based diets[J]. *British Journal of Nutrition*, 2013, 110(7): 1220-1232.
- [43] Mia S, Warnecke A, Zhang X M, *et al.* An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- $\beta$  yields a dominant immunosuppressive phenotype[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2014, 79(5): 305-314.
- [44] Dash P, Patel S, Dixit A, *et al.* Four pro-inflammatory cytokines of rohu (*Labeo rohita*) during early developmental stages, their tissue distribution and expression by leucocytes upon *in-vitro* stimulation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 913-922.
- [45] Rymuszka A, Adaszek L. Pro- and anti-inflammatory cytokine expression in carp blood and head kidney leukocytes exposed to cyanotoxin stress—an *in vitro* study[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(2): 382-388.

## Effects of threonine supplementation in poultry by-product meal (petfood grade) replacement diet on growth performance, intermediary metabolism and immunity response in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

XU Yujue<sup>1</sup>, WANG Wenqiang<sup>1</sup>, YANG Peng<sup>1</sup>, HE Chaoqun<sup>1</sup>, QIN Yawen<sup>1</sup>, SONG Fei<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Science, South China Normal University, Institute of Modern Aquaculture Science and Engineering (IMASE), Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, Guangzhou 510631, China;

2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory, Zhuhai 519000, China)

**Abstract:** In order to investigate the effects of different dietary threonine levels on growth performance, glucose and lipid metabolism, immunity and utilization rate of poultry by-product meal (petfood grade) in largemouth bass (*Micropterus salmoides*), three isonitrogenous and isolipid diets were designed using *M. salmoides* with an initial body weight of (4.16±0.06) g as the research subjects (TC diet: threonine control group, LT diet: low threonine group and TS diet: threonine supplementation group) were cultured for 8 weeks. Present results showed that compared with the TC diet, the LT diet significantly decreased the growth performance, feed efficiency and body nutrient composition, threonine addition could promote those differential effects caused by fishmeal totally substituted by poultry by-product meal. Moreover, the LT diet also suppressed the concentration of plasma nutrients and free amino acids compared with the control diet. TS diet had significant effects on elevating the plasma free amino acids concentration and made no notable difference compared to the TC diet. The mRNA expression level demonstrated that threonine supplementation markedly ameliorated the inhibition of anabolism, aggravation of catabolism and cellular inflammation caused by complete replacement of fishmeal with poultry by-product meal. Studies have shown that appropriate threonine supplementation could promote the growth performance by improving nutrient anabolism and immune response and inhibiting catabolism in *M. salmoides*.

**Key words:** *Micropterus salmoides*; threonine; poultry by-product meal (pet grade); growth performance; intermediary metabolism

**Corresponding author:** SONG Fei. E-mail: songfei@m.scnu.edu.cn

**Funding projects:** Foundation and Applied Basic Research Fund Project of Guangdong Province (2019A1515110606); Innovation Group Project of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhuhai); Research and Development Fund for Young Teachers of South China Normal University (19KJ03)