



棉籽蛋白源对大口黑鲈生长、体组成及健康的影响

周兴梅¹, 何光伦¹, 许志城¹, 陈拥军¹, 谭北平², 林仕梅^{1*}

(1. 西南大学水产学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400716;

2. 广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524088)

摘要: 为评价棉籽蛋白在大口黑鲈饲料中应用的可行性, 用4种不同质量的棉籽蛋白替代30%鱼粉配制成5种等氮等脂的实验饲料(CPC₀为对照组, CPC₁, CPC₂, CPC₃, CPC₄), 在室内循环养殖系统饲喂大口黑鲈[平均体质量(12.20±0.11)g]8周。结果显示, 4种棉籽蛋白的营养组成、棉酚、棉籽糖和水苏糖含量不同, 以CPC₃棉籽蛋白质量最优。CPC₃组鱼的终末体质量、增重率和特定生长率显著高于其他组, 而各实验组全鱼常规营养成分和肌肉氨基酸组成没有显著差异。CPC₃组肝脏SOD、GSH-Px活性以及CAT和SOD mRNA表达水平最高, MDA含量最低。CPC₃组肝脏抗炎因子IL-10、TGF-β的相对表达量最高, 而促炎因子IL-1β、IL-8和TNF-α的相对表达量最低。此外, 棉籽蛋白源会显著影响大口黑鲈肝脏蛋白质代谢, CPC₃组ALT、AST活性以及基因PI3K、AKT、m-TOR、S6K1、4E-BP表达水平最高。同时发现, CPC₃组大口黑鲈肠道SOD酶活性最高、MDA含量最低, 且肠道通透性指标(二胺氧化酶活性、D-乳酸和内毒素含量)也最低。棉籽蛋白源也影响了肠道紧密连接蛋白相关基因ZO-1、Claudin-1和Occludin的表达。研究表明, 棉籽蛋白质量对大口黑鲈生长和健康会产生显著影响, 其中棉籽蛋白CPC₃效果最佳, 显著改善大口黑鲈的肝脏和肠道健康, 进而促进其生长。因此, 棉籽蛋白CPC₃可以作为大口黑鲈饲料的优质蛋白源。

关键词: 大口黑鲈; 棉籽蛋白; 生长; 肝功能; 肠道健康

中图分类号: S 963

文献标志码: A

棉籽蛋白作为非粮植物蛋白源, 资源丰富, 据统计2019年我国棉粕产量约320万t^[1], 因其富含优质蛋白质而受到广泛关注。目前, 棉籽蛋白已经在动物生产上广泛应用, 包括猪^[2]、鸡^[3]、鱼^[4]等, 其添加量因动物品种以及棉籽蛋白质量而有所不同。然而, 由于棉籽蛋白含有棉酚、纤维等抗营养因子限制了其在动物饲料中的使用, 通常可通过生物降解^[5]、加工^[6]或遗传改良^[7]来降低或去除抗营养物质——棉酚, 进而提高

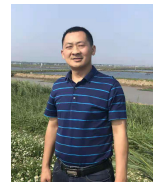
其添加剂量。目前, 在鱼类上研究较多的是单一棉籽蛋白(如发酵棉籽蛋白、脱酚棉籽蛋白)替代鱼粉或其他蛋白源的应用效果, 未见不同加工工艺棉籽蛋白质量的比较研究。大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)作为我国重要的经济养殖鱼类, 因其肉质、体质量、贮存等优势而深受市场欢迎, 但养殖效益受季节的影响而波动较大, 降低其饲料养殖成本是目前关注的热点。为此, 本实验以大口黑鲈为研究对象, 从生长、

收稿日期: 2021-04-12 修回日期: 2021-05-25

资助项目: 蓝色粮仓科技创新(2019YFD0900200); 重庆市技术创新与应用发展(面上项目)(cstc2020jcsx-msxmX0046)

第一作者: 周兴梅, 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: 2521302477@qq.com

通信作者: 林仕梅(照片), E-mail: linsm198@163.com



体组成、肝功能和肠道健康角度,评价不同质量的棉籽蛋白在大口黑鲈饲料中应用的可行性,旨在为大口黑鲈饲料配方的优化提供技术资料。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

以鱼粉、鸡肉粉、大豆浓缩蛋白和豆粕为蛋白源,以鱼油、豆油为脂肪源配制基础饲料,

用4种棉籽蛋白(CPC₁、CPC₂、CPC₃和CPC₄,均来自新疆,加工工艺不同,根据GB 13086-91法测定其棉酚含量,根据高效液相色谱分析方法测定其棉籽糖和水苏糖含量^[8],具体组成见表1)分别替代30%的鱼粉配制成4种等氮等脂的实验饲料(表2),饲料原料粉碎过80目筛,采取逐级稀释法混合均匀,制成粒径2.0 mm的颗粒饲料,自然风干后于4 °C冰柜中保存备用。

表1 不同棉籽蛋白的营养组成

Tab. 1 Nutrient composition of different cottonseed proteins

项目 items	棉籽蛋白 cottonseed protein			
	CPC ₁	CPC ₂	CPC ₃	CPC ₄
水分/% moisture	7.20±0.08 ^c	8.88±0.18 ^d	5.20±0.05 ^b	4.67±0.08 ^a
粗蛋白质/% crude protein	49.27±0.57 ^a	53.62±1.11 ^b	62.42±0.58 ^d	57.14±0.96 ^c
粗脂肪/% crude lipid	3.26±0.04 ^b	3.27±0.07 ^b	1.24±0.01 ^a	3.43±0.06 ^b
粗灰分/% crude ash	6.80±0.08 ^a	7.53±0.16 ^b	8.06±0.07 ^c	7.62±0.13 ^{bc}
棉酚/(mg/kg) gossypol	970.93±11.21 ^d	894.50±18.59 ^c	169.36±1.56 ^a	431.31±7.22 ^b
棉籽糖/(mg/g) raffinose	52.23±0.60 ^a	52.07±1.08 ^a	60.12±0.56 ^b	53.93±0.90 ^a
水苏糖/(mg/g) stachyose	6.61±0.08 ^a	7.37±0.15 ^b	9.45±0.09 ^d	7.84±0.13 ^c

注:同行中上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同

Notes: in the same row, values with different lowercase letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), the same below

1.2 饲养管理

实验用大口黑鲈购于重庆长寿区鱼种场,用商品饲料驯化10 d,禁食24 h,用0.01% MS-222麻醉后称重,将体质健壮、规格整齐、初始体质量为(12.20±0.11) g的大口黑鲈幼鱼随机分为5个处理,每个处理3个重复,每个重复30尾鱼,在室内淡水循环养殖系统(有效容积为200 L)中饲养8周,实验期间,每日投喂3次(08:30、12:30、18:00),投饲率3%~5%,养殖水源为充分曝气的自来水,养殖期间水温为23.2~28.5 °C,溶解氧含量≥6.5 mg/L,氨氮含量<0.1 mg/L,亚硝酸盐含量<0.01 mg/L, pH为7.2~7.6。

1.3 样品采集及分析方法

样品采集 饲养实验结束后,禁食24 h,用0.01% MS-222麻醉后称重并计数,每个重复随机选取3尾鱼用于全鱼常规成分的测定;每个重复随机取5尾鱼,测量体质量、体长,在冰盘上解剖并分离出内脏团、肝脏和肠道后称重,用于形体指标的测定,并收集肝脏和肠道组织

用液氮速冻后于-80 °C冰箱中保存备用;每个重复随机取5尾鱼,用一次性注射器于尾静脉取血,置于4 °C冰箱过夜后4 000 r/min离心10 min,收集血清,-80 °C冰箱中保存备用;每个重复随机取6尾鱼,于无菌操作台上处死并使用预先去除RNA酶并灭菌的解剖器材解剖,取出大口黑鲈的肝脏及肠道,在相同部位取3 mm³左右大小的肝脏及肠道组织样品,置于含有500 μL RNA保护剂(Takara, Japan)的去RNA酶的无菌离心管中,液氮速冻后-80 °C冰箱中保存,用于基因相对表达量的测定。

饲料、全鱼常规营养成分的测定 采用标准方法对饲料、全鱼常规营养成分进行测定。水分采用105 °C烘干恒重法测定;粗蛋白质含量采用凯氏定氮法测定;粗脂肪含量采用索氏抽提法测定;粗灰分含量采用550 °C马弗炉煅烧法测定;肝脏脂肪含量采用氯仿-甲醇法测定;肌肉氨基酸组成采用GB/T 18654.11—2008法测定。

抗氧化及代谢指标测定 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化

表 2 饲料组成及营养水平 (风干基础)

Tab. 2 Composition and nutrient levels of the test diets (air-dry basis)

项目 items	棉籽蛋白 cottonseed protein				
	CPC ₀	CPC ₁	CPC ₂	CPC ₃	CPC ₄
原料/% ingredients					
蒸汽鱼粉 steam fish meal	40.00	28.00	28.00	28.00	28.00
国产鸡肉粉 domestic chicken powder	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
棉籽蛋白1 cottonseed protein 1		18.61			
棉籽蛋白2 cottonseed protein 2			17.12		
棉籽蛋白3 cottonseed protein 3				13.48	
棉籽蛋白4 cottonseed protein 4					14.27
豆粕 soybean meal	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
大豆浓缩蛋白 soy protein concentrate	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00
小麦面筋蛋白 wheat gluten protein	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
木薯淀粉 cassava starch	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
鱼油 fish oil	1.15	2.10	2.03	1.86	2.05
大豆卵磷脂 soybean lecithin	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
豆油 soybean oil	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
维生素预混料 vitamin premix	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
矿物质预混料 mineral premix	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
氯化胆碱 choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.40	2.58	2.64	2.65	2.85
维生素C vitamin C	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
乙氧基喹啉 ethoxyquin	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	8.85	0.00	1.59	5.41	4.00
赖氨酸 lysine	0.00	0.16	0.17	0.11	0.22
蛋氨酸 methionine	0.00	0.07	0.04	0.05	0.05
营养成分 nutritional levels					
粗蛋白质/% crude protein	48.21	48.16	48.12	48.15	48.17
粗脂肪/% crude lipid	11.29	11.31	11.30	11.31	11.29
粗灰分/% crude ash	10.25	11.80	11.66	11.70	11.69
棉酚/(mg/kg) gossypol	0.00	182.69	156.14	23.85	61.75

物酶 (GSH-Px)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 以及丙二醛 (MDA) 含量均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定, 测定方法参照试剂盒说明书进行。

抗氧化、免疫及代谢相关基因表达分析 采用实时荧光定量 PCR 法测定基因 mRNA 表达水

平。肝脏及肠道总 RNA 使用 RNAiso Plus 试剂 (Takara, Japan) 提取, 使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计 (Thermo Fisher, USA) 测定总 RNA 浓度。随后使用反转录试剂盒 FastKing-RT SuperMix (天根, 北京) 将提取的总 RNA 反转录为 cDNA, 并用 DEPC 水进行稀释后置于 -20 °C 保存备用。实

时荧光定量 PCR 的体系为 20 μ L, 其中上下游引物各 1 μ L、cDNA 2 μ L、10 μ l 2 \times NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus (Novoprotein, 上海) 和 DEPC 水 6 μ L。定量仪器为实时定量 PCR 仪 (Bio-rad-

CFX96)。实时定量 PCR 的程序为 95 $^{\circ}$ C 持续 1 min 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 持续 20 s, 60 $^{\circ}$ C 持续 1 min, 共计 40 个循环。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta G_i}$ 法计算基因的相对表达量, 相关引物序列见表 3。

表 3 实时定量 (q-PCR) 引物设计序列

Tab. 3 Primers pair sequences for real-time PCR

基因 gene	上游引物(5'-3') forward primer (5'-3')	下游引物(5'-3') reverse primer (5'-3')	登录号 GenBank
CAT	TGGTGTTCACGGATGAGATGG	GGAGAAGCGGACAGCAATAGG	XM_038704976.1
SOD	CCACCAGAGGTCTCACAGCA	CCACTGAACCGAAGAAGGACT	XM_038713969.1
GSH-Px	ATACCAAGTCTCCTTCCTCTGT	CGTCCACCACTTTGCCATT	XM_038715030.1
IL-10	CGGCACAGAAATCCAGAGC	CAGCAGGCTCACAAAATAAACATCT	XM_038696252.1
TGF- β	GCTCAAAGAGAGCGAGGATG	TCCTTACCATTTCGCAATCC	XM_038693206.1
IL-1 β	CGTGACTGACAGCAAAAAGAGG	GATGCCCAGAGCCACAGTTC	XM_038733429.1
IL-8	CGTTGAACAGACTGGGAGAGATG	AGTGGGATGGCTTCATTATCTTGT	XM_038704088.1
TNF- α	CTTCGTCTACAGCCAGGCATCG	TTTGGCACACCGACCTCACC	XM_038710731.1
PI3K	AAGACCTTCCTCATCACGAC	CCTTCCACTACAACACTGCA	XM_038733024.1
AKT	ATGGACTCCTCTCCAGACCC	TTCATGGCGTAGTAGCGTCC	XM_038729217.1
m-TOR	GCGTATCGTAGAGGACTGGC	GTCAACACCGAGAAGGAGCA	XM_038723321.1
S6K1	TCGTTTCGAGCCAAAGGTCC	TCGATACCTCCATGGGTTGC	XM_038708508.1
4E-BP	ACGAGGTCTGCCCAACATTC	CAGCGTTGCTGCTATCAGGT	XM_038703879.1
Claudin-1	CCAGGGAAGGGGAGCAATG	GCTCTTTGAACCACTGCGAC	XM_038713307.1
Occludin	GATATGGTGGCAGCTACGGT	TCCTACTGCGGACAGTGTTG	XM_038715419.1
ZO-1	ATCTCAGCAGGGATTTCGACG	CTTTTTCGGTGGCGTTGG	XM_038701018.1
β -actin	AAAGGGAATCGTGCCTGAC	AAGGAAGCTGGAAGAGGG	XM_038695351.1

1.4 计算公式

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

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

摄食率 (feeding ratio, FR, % /d)= $W_f / [(W_t + W_0) / 2 \times t] \times 100\%$

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

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

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

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

肝体比 (hepatosomatic index, HSI, %)= $W_h /$

$W \times 100\%$

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

式中, W_t 和 W_0 分别为终末鱼体质量和初始鱼体质量 (g); t 为养殖实验天数 (d); W_f 为总摄食量 (g); N_t 和 N_0 分别为终末尾数和初始尾数 (尾); W 为鱼质量 (g); L 为鱼体长 (cm); W_v 为内脏重 (g); W_h 为肝脏重 (g); W_p 为饲料蛋白质含量 (%)。

1.5 数据处理与分析

实验数据均以平均值+标准误 (mean+SE) 表示, 采用 SPSS 22.0 软件进行方差性检验和单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 若达到显著水平, 则进行 Tukey 氏多重比较, 显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 棉籽蛋白对大口黑鲈生长性能的影响

CPC₃组大口黑鲈的FBW、WGR和SGR显著高于其他实验组 ($P < 0.05$), CPC₀、CPC₁、CPC₂和CPC₄组之间无显著差异。PER值也是CPC₃组最高。各实验组FR无显著差异, 成活率SR均为100% ($P > 0.05$) (表4)。

2.2 棉籽蛋白对大口黑鲈形体指标和体组成的影响

CPC₃组HSI显著低于对照组(CPC₀) ($P < 0.05$), 各实验组VSI以及全鱼营养含量(水分、粗蛋白

质、粗脂肪、粗灰分)无显著差异。尽管各实验组肝脂含量无显著差异, 但对照组肝脂含量比其他实验组低10.8%~29.0%, 以CPC₂组最高(表5)。CPC₃组肌肉非必需氨基酸总量(Σ NEAA)、必需氨基酸总量(Σ EAA)和氨基酸总量(Σ TAA)含量均高于其他实验组(表6)。

2.3 棉籽蛋白对大口黑鲈肝脏抗氧化及免疫的影响

CPC₃组肝脏SOD、GSH-Px活性以及CAT和SOD mRNA表达水平显著高于其他实验组(表7, 图1), 而MDA含量最低 ($P < 0.05$)。CPC₃组抗炎因子IL-10和TGF- β 表达量最高, 促炎因子

表4 棉籽蛋白对大口黑鲈生长性能和饲料利用的影响

Tab. 4 Effects of dietary cottonseed protein on growth performance and feed utilization of *M. salmoides*

项目 items	棉籽蛋白 cottonseed protein				
	CPC ₀	CPC ₁	CPC ₂	CPC ₃	CPC ₄
初始体质量/g IBW	12.21±0.06	12.13±0.02	12.23±0.02	12.13±0.05	12.23±0.03
终末体质量/g FBW	83.19±0.38 ^{ab}	82.17±1.47 ^a	82.14±1.59 ^a	87.49±0.32 ^b	83.92±1.07 ^{ab}
增重率/% WGR	581.35±5.86 ^{ab}	577.21±11.04 ^a	571.73±13.99 ^a	621.04±1.03 ^b	586.29±10.28 ^{ab}
特定增长率/% SGR	3.427±0.02 ^{ab}	3.415±0.03 ^{ab}	3.401±0.04 ^a	3.528±0.01 ^b	3.439±0.03 ^{ab}
摄食率/(%/d) FR	2.75±0.01	2.86±0.07	2.89±0.01	2.76±0.02	2.74±0.05
蛋白质效率/% PER	2.01±0.01 ^{ab}	1.94±0.04 ^{ab}	1.91±0.02 ^a	2.04±0.01 ^b	2.03±0.04 ^b
饲料系数 FCR	1.03±0.00 ^{ab}	1.08±0.02 ^{ab}	1.09±0.01 ^b	1.02±0.01 ^a	1.03±0.02 ^a
存活率/% SR	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

表5 棉籽蛋白对大口黑鲈形体指标和营养组成的影响(鲜重)

Tab. 5 Effects of dietary cottonseed protein on morphological measurements and nutrition composition of *M. salmoides* (fresh weight)

项目 items	棉籽蛋白 cottonseed protein				
	CPC ₀	CPC ₁	CPC ₂	CPC ₃	CPC ₄
形态指标 morphological measurements					
脏体比 VSI	8.50±0.43	8.60±0.20	8.45±0.31	7.49±0.25	7.71±0.11
肝体比 HSI	2.18±0.03 ^b	2.14±0.06 ^{ab}	1.98±0.05 ^{ab}	1.93±0.04 ^a	2.05±0.06 ^{ab}
营养组成 nutrition composition					
水分 moisture	70.07±0.81	70.44±0.53	70.90±0.81	70.09±0.64	70.19±1.21
粗蛋白质 crude protein	17.70±0.20	17.47±0.24	17.13±0.14	18.08±0.21	17.89±0.19
粗脂肪 crude lipid	6.27±0.12	6.29±0.07	6.33±0.10	6.12±0.08	6.15±0.10
粗灰分 crude ash	4.48±0.05	4.55±0.12	4.52±0.10	4.47±0.07	4.39±0.09
肝脂含量 liver lipid content	3.79±0.18	4.53±0.02	4.89±0.09	4.20±0.61	4.65±0.19

表 6 棉籽蛋白对大口黑鲈肌肉氨基酸含量的影响

Tab. 6 Effects of dietary cottonseed protein on amino acid content in muscle of *M. salmoides*

项目 items	棉籽蛋白 cottonseed protein				
	CPC ₀	CPC ₁	CPC ₂	CPC ₃	CPC ₄
非必需氨基酸 (NEAA)					
天门冬氨酸 Asp	9.10±0.10	9.04±0.18	8.99±0.16	9.22±0.09	9.09±0.09
谷氨酸 Glu	14.00±0.16	13.81±0.28	13.82±0.24	14.16±0.13	13.97±0.14
丝氨酸 Ser	3.41±0.04	3.33±0.07	3.39±0.06	3.42±0.03	3.38±0.03
甘氨酸 Gly	4.08±0.05	3.99±0.08	3.97±0.07	4.06±0.03	3.99±0.04
丙氨酸 Ala	5.15±0.06	5.10±0.10	5.10±0.09	5.22±0.05	5.11±0.05
脯氨酸 Pro	2.93±0.03	2.87±0.06	2.90±0.05	2.95±0.03	2.95±0.03
酪氨酸 Tyr	3.10±0.03	3.05±0.06	3.04±0.05	3.13±0.03	3.10±0.03
非必需氨基酸总量 ΣNEAA	41.77±0.48	41.19±0.83	41.22±0.72	42.16±0.39	41.57±0.43
必需氨基酸 (EAA)					
组氨酸 His	2.17±0.03	2.16±0.04	2.13±0.04	2.19±0.02	2.13±0.02
精氨酸 Arg	6.41±0.08	6.31±0.13	6.29±0.11	6.39±0.06	6.27±0.07
苏氨酸 Thr	3.88±0.04	3.80±0.08	3.84±0.07	3.88±0.04	3.79±0.04
缬氨酸 Val	4.30±0.05	4.19±0.09	4.20±0.07	4.35±0.04	4.22±0.04
蛋氨酸 Met	2.65±0.03	2.61±0.05	2.63±0.04	2.70±0.02	2.64±0.03
异亮氨酸 Ile	4.09±0.05	3.97±0.08	3.99±0.07	4.15±0.04	3.98±0.04
亮氨酸 Leu	6.73±0.08	6.59±0.13	6.63±0.11	6.80±0.06	6.62±0.07
苯丙氨酸 Phe	3.71±0.04	3.67±0.08	3.65±0.06	3.76±0.03	3.66±0.04
赖氨酸 Lys	7.67±0.09	7.55±0.15	7.55±0.13	7.78±0.07	7.59±0.08
必需氨基酸总量 ΣEAA	41.60±0.48	40.85±0.83	40.89±0.71	42.00±0.39	40.91±0.42
氨基酸总量 ΣTAA	83.37±0.96	82.04±1.66	82.11±1.42	84.15±0.78	82.48±0.86
ΣEAA/ΣTAA	49.90±0.58	49.79±1.00	49.80±0.86	49.91±0.46	49.60±0.52
ΣNEAA/ΣTAA	50.10±0.58	50.21±1.02	50.20±0.87	50.10±0.46	50.40±0.52

IL-1β、*IL-8* 和 *TNF-α* 表达量最低 ($P<0.05$) (图 2)。

2.4 棉籽蛋白对大口黑鲈肝脏蛋白质代谢酶及相关基因表达的影响

实验发现, 棉籽蛋白源也显著影响大口黑鲈肝脏的蛋白质代谢。CPC₃ 组 ALT、AST 活性以及基因 *PI3K*、*AKT*、*m-TOR*、*S6K1*、*4E-BP* 表达水平最高 (图 3)。

2.5 棉籽蛋白对大口黑鲈肠道健康的影响

CPC₃ 组大口黑鲈肠道 SOD 活性及 *SOD* 基因表达水平显著高于其他实验组 ($P<0.05$), 而 MDA

含量最低, 各实验组肠道 CAT 活性及 *CAT* 基因表达水平无显著差异 ($P>0.05$) (图 4)。CPC₁ 和 CPC₂ 组血清二胺氧化酶活性、D-乳酸和内毒素含量显著高于其他实验组 ($P<0.05$) (图 5)。肠道基因 *Occludin* 和 *ZO-1* mRNA 的表达水平组间无显著差异, 但 CPC₄ 组基因 *Claudin-1* 表达水平显著高于 CPC₂ 组 (图 6)。

3 讨论

大量研究表明, 棉籽中含有棉酚、粗纤维等抗营养因子会对鸡^[3]、鹅^[9]、猪^[2]等畜禽动物

表 7 棉籽蛋白对大口黑鲈肝脏抗氧化能力的影响

Tab. 7 Effects of dietary cottonseed protein on hepatic antioxidant capacity of *M. salmoides*

项目 items	棉籽蛋白 cottonseed protein				
	CPC ₀	CPC ₁	CPC ₂	CPC ₃	CPC ₄
过氧化氢酶/(U/mg prot) CAT	18.77±0.77 ^{ab}	18.27±0.21 ^{ab}	17.74±0.07 ^a	19.92±0.33 ^b	19.32±0.11 ^{ab}
总超氧化物歧化酶/(U/mg prot) SOD	451.57±5.70 ^a	458.27±2.77 ^a	442.63±12.89 ^a	498.38±9.82 ^b	466.49±8.67 ^a
谷胱甘肽过氧化物/(U/mg prot) GSH-Px	40.23±1.29 ^a	39.88±0.33 ^a	38.98±0.61 ^a	46.56±0.94 ^b	41.30±0.17 ^a
丙二醛/(nmol/mg prot) MDA	0.81±0.02 ^b	0.81±0.02 ^b	0.82±0.03 ^b	0.67±0.02 ^a	0.80±0.03 ^b

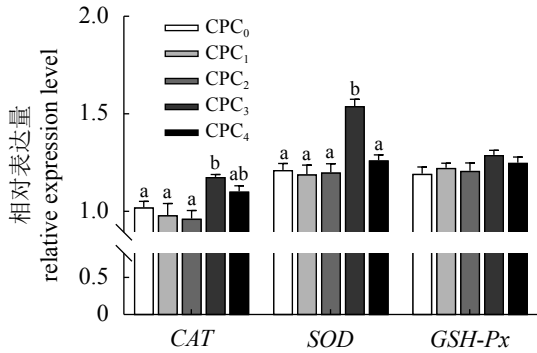


图 1 棉籽蛋白对大口黑鲈肝脏抗氧化相关基因表达的影响

Fig. 1 Effects of dietary cottonseed protein on mRNA expression of antioxidant related genes in liver of *M. salmoides*

的生长、肝脏功能、生殖产生不利影响。畜禽动物对游离棉酚的耐受剂量因品种、日龄、棉籽蛋白质量等因素而有较大差异, 如我国饲料卫生标准限定蛋鸡饲料游离棉酚含量≤20 mg/kg

(GB 13078-2017), 蛋鸡对棉酚的耐受能力不如肉鸡^[10]。研究同样发现, 饲料中棉酚含量会影响鱼类生长和健康, 不同鱼类对棉酚的耐受程度不同, 如异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 可以耐受饲料 642 mg/kg 棉酚^[11], 斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 可以耐受 300~1 200 mg/kg 棉酚^[12], 而条纹锯鲷 (*Centropristis striata*) 饲料含 150 mg/kg 棉酚就会降低其生长性能^[13]。本实验中 4 种棉籽蛋白以 CPC₃ 质量最优, 棉酚含量最低 (169.36 mg/kg, 表 1), 相应大口黑鲈的生长效果也最好, 即 CPC₃ 组鱼的生长速度最快, 饲料中棉酚含量仅有 23.85 mg/kg, CPC₄ 组鱼生长速度相较于 CPC₃ 组略有下降, 其饲料中棉酚含量为 61.75 mg/kg (表 2), 这些结果表明大口黑鲈对棉酚的敏感性强于其他鱼类, 且棉酚是影响其生长的一个重要因子^[14]。有研究指出, 对棉籽蛋白进行适当的工艺处理^[15-16], 可以有效降低棉酚的含量 (脱毒率达到 70.0% 以上), 提高棉籽蛋白在鱼饲料中

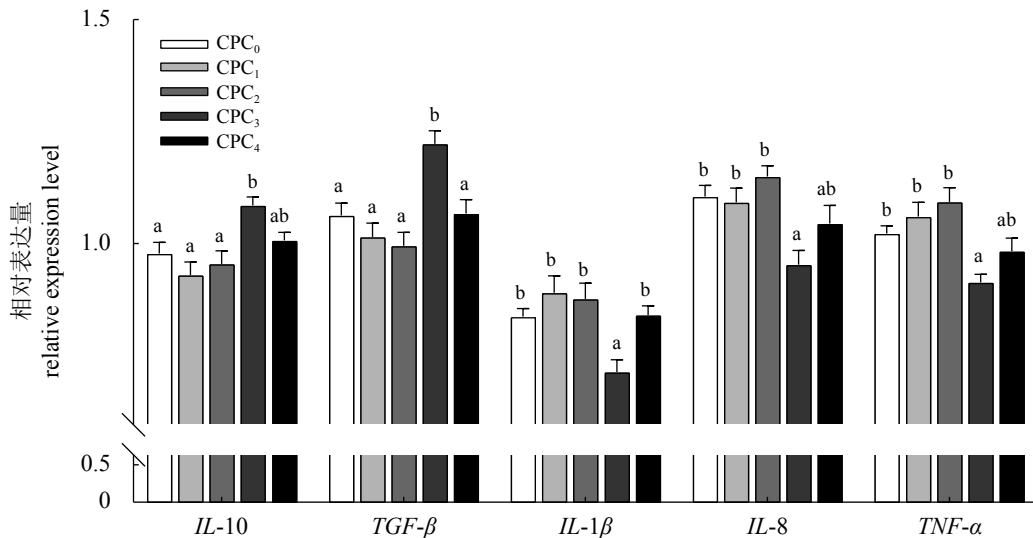


图 2 棉籽蛋白对大口黑鲈肝脏炎症相关基因表达的影响

Fig. 2 Effects of dietary cottonseed protein on mRNA expression of inflammation related genes in liver of *M. salmoides*

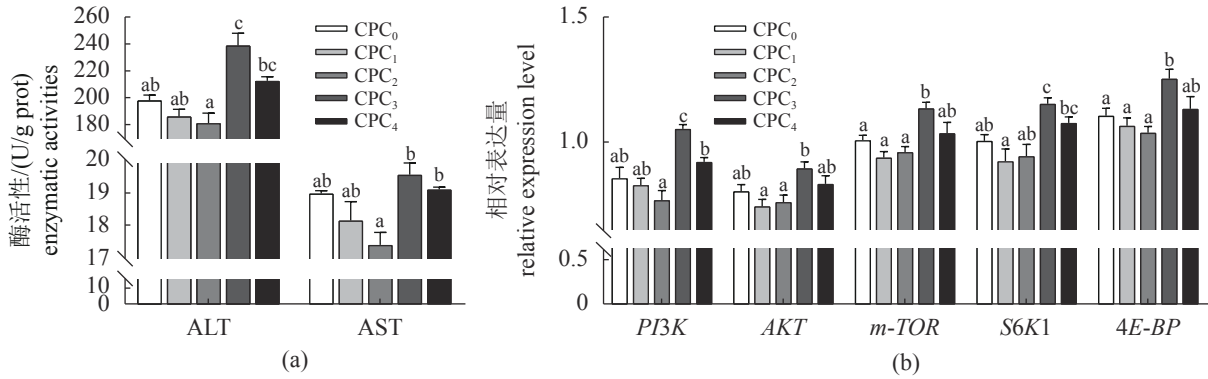


图 3 棉籽蛋白对大口黑鲈肝脏蛋白质代谢酶 (a) 及相关基因表达 (b) 的影响

Fig. 3 Effects of dietary cottonseed protein on protein metabolism enzymes (a) and related gene expression (b) in the liver of *M. salmoides*

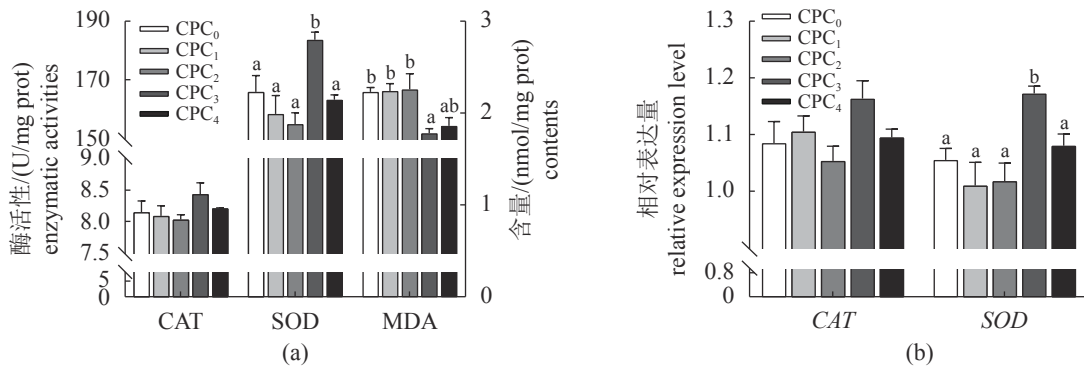


图 4 棉籽蛋白对大口黑鲈肠道抗氧化能力 (a) 及相关基因表达 (b) 的影响

Fig. 4 Effects of dietary cottonseed protein on intestinal antioxidant capacity (a) and related gene expression (b) of *M. salmoides*

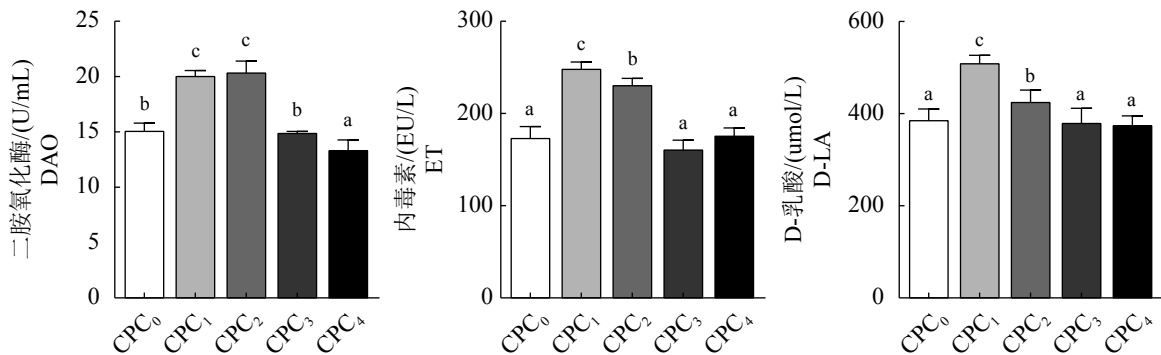


图 5 棉籽蛋白对大口黑鲈肠道通透性指标的影响

Fig. 5 Effects of dietary cottonseed protein on intestinal permeability indexes of *M. salmoides*

的用量 (从 10.0%^[17]提高至 30.5%^[18])。此外, 棉酚与赖氨酸结合会引起赖氨酸缺乏或不足, 进而导致鱼类的生长下降^[19-20]。本实验各处理饲料中赖氨酸含量一致, 而高棉酚组 (CPC₁、CPC₂) 大口黑鲈的生长效果显著低于低棉酚组 (CPC₃) 的实验结果支持这个推断。可见, 在富含棉酚的

棉籽蛋白饲料中易致其可利用赖氨酸水平降低, 不能满足大口黑鲈生长的需要。目前还不明确大口黑鲈能够耐受多少剂量的棉酚, 需要进一步通过长期的生长实验来证实。

本研究发现饲料中添加不同质量的棉籽蛋白不会影响大口黑鲈的摄食量, 类似的结果在

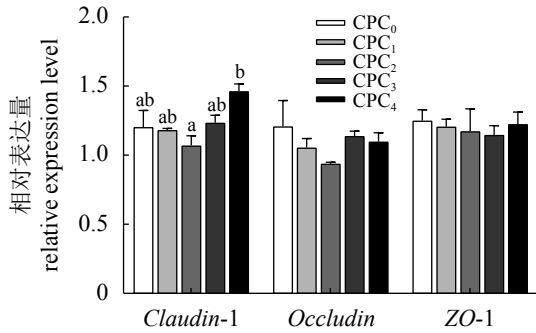


图 6 棉籽蛋白对大口黑鲈肠道紧密连接蛋白相关基因表达的影响

Fig. 6 Effects of dietary cottonseed protein on mRNA expression of intestinal tight junction protein-related genes in *M. salmoides*

珍珠龙胆石斑鱼 (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂)^[21]、卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)^[22]上也有报道。但有研究发现,棉籽蛋白会影响饲料的适口性,如饲料中添加 46.0% 脱酚棉籽蛋白会降低花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 的摄食量,进而导致其生长不良^[23]。然而,条纹锯鲈^[24]饲料中添加 30.2% 棉籽浓缩蛋白(鱼粉含量仅 7%)既不影响鱼的摄食也不影响鱼的生长。本研究中,棉籽蛋白的实际添加量为 13.0%~19.0%,其中 CPC₁ 组添加水平最高为 18.61%,这些添加量都远远低于上述研究结果。这些结果表明,不同的鱼类对棉籽蛋白的敏感程度不一样,涉及鱼类的摄食生理,情况比较复杂。

肝脏是鱼类重要的代谢器官,因此维持正常的肝功能对鱼类的生长有非常重要的作用。以往研究表明添加适量的植物蛋白对鱼体的抗氧化能力及免疫功能有一定的改善作用^[25],但是过量的植物蛋白会损伤鱼类的肝脏组织,导致其蛋白质代谢功能受损^[26]。本研究发现饲料中添加棉籽蛋白 CPC₃ 能够显著提高大口黑鲈肝脏抗氧化能力 (CAT 和 SOD mRNA 表达水平增强, CAT、SOD、GSH-Px 活性升高),同时上调肝脏抗炎因子 (*IL-10*、*TGF-β*) mRNA 的表达,下调促炎因子 (*IL-1β*、*IL-8* 和 *TNF-α*) mRNA 的表达。此外,还可以提高肝脏转氨酶 (AST、ALT) 活性以及蛋白质代谢基因 (*P13K*、*AKT*、*m-TOR*、*S6K1*、*4E-BP*) 表达水平。这说明适宜的棉籽蛋白可以通过提高肝脏的免疫功能、抗氧化能力,改善肝脏健康,进而提高蛋白质的利用效率,促进大口黑鲈的生长。CPC₃ 组 SGR 和 PER 优于其他实

验组,也证实和支持这个结论。这与在卵形鲳鲹^[22]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[27] 上的研究结果一致。这可能是因为棉籽蛋白中含有棉籽糖、水苏糖等益生元所致。研究证实在饲料中添加棉籽糖和水苏糖能够提高尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[28]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[29] 的肝脏抗氧化能力,促进巨噬细胞活化,增强机体免疫功能,从而促进生长。

肠道是从外界获取营养和能量的主要场所,并与体内各种免疫、应激和新陈代谢息息相关,因此保护肠道屏障对鱼体的生长和健康极为重要。研究证实添加适量的植物蛋白能够提高鱼类的肠道抗氧化酶活性,维持良好的肠道黏膜屏障功能^[30]。本实验中不同质量的棉籽蛋白源显著影响大口黑鲈肠道健康,饲料中添加棉籽蛋白 CPC₃ 对大口黑鲈的肠道抗氧化能力 (CAT 和 SOD 活性提高) 及通透性 (二胺氧化酶活性、D-乳酸和内毒素含量降低) 有改善作用,而棉籽蛋白 CPC₁ 和 CPC₂ 显著增加肠道的通透性,同时下调紧密连接蛋白基因 *Claudin-1* 的表达水平。这可能是棉籽蛋白 CPC₃ 抗营养因子含量少,降低了肠道的氧化应激,维持相对正常的肠道生理功能。众所周知,棉籽蛋白含有一定量的益生元 (如棉籽糖、水苏糖),它可以促进有益菌的生长,减少有毒代谢物的产生,从而维持正常的肠道功能^[31]。本实验中 CPC₁ 和 CPC₂ 组含有较高的棉酚,但与对照组相比,并没有降低大口黑鲈的生长性能,这可能是棉籽蛋白中益生元的作用效果抵消了或减弱了棉酚的危害作用所致,这个推论需要进一步证实。在团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[32] 上的研究也发现,饲料中添加适宜的植物蛋白可以改善肠道健康。建议今后可以选择肠道抗氧化和通透性指标详细评估蛋白质的质量。

综上所述,饲料中棉籽蛋白源会影响大口黑鲈的肝脏和肠道健康,进而影响其生长性能。本研究中棉籽蛋白 CPC₃ 有助于提高肝脏抗氧化能力及免疫功能,改善肠道健康。因此,棉籽蛋白 CPC₃ 可以作为鱼类的饲料蛋白源,降低肉食性鱼类对鱼粉的依赖性。

参考文献 (References):

- [1] 胡春雷,李孝华,何锡玉,等. 2020年棉花加工行业产业发展报告(下)[J]. 中国棉花加工, 2021(2): 4-15.

- Hu C L, Li X H, He X Y, *et al.* 2020 Cotton processing industry Report (Part II)[J]. *China Cotton Processing*, 2021(2): 4-15(in Chinese).
- [2] Li R, Hou G F, Song Z H, *et al.* Nutritional value of enzyme-treated soybean meal, concentrated degossypolized cottonseed protein, dried porcine solubles and fish meal for 10-to-20 kg pigs[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2019, 252: 23-33.
- [3] Qi M, Sun L H, Guo J, *et al.* Abnormal characteristics of eggs laid by hens fed with high levels of cottonseed meal[J]. *Journal of Applied Poultry Research*, 2017, 26(1): 122-129.
- [4] Liu H, Dong X H, Tan B P, *et al.* Effects of fish meal replacement by low-gossypol cottonseed meal on growth performance, digestive enzyme activity, intestine histology and inflammatory gene expression of silver sillago (*Sillago sihama* Forsskål) (1775)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, 26(5): 1724-1735.
- [5] Zhang W J, Xu Z R, Zhao S H, *et al.* Development of a microbial fermentation process for detoxification of gossypol in cottonseed meal[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 135(1-2): 176-186.
- [6] Pelitire S M, Dowd M K, Cheng H N. Acidic solvent extraction of gossypol from cottonseed meal[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 195: 120-128.
- [7] Alam M S, Watanabe W O, Carroll P M, *et al.* Evaluation of genetically-improved (glandless) and genetically-modified low-gossypol cottonseed meal as alternative protein sources in the diet of juvenile southern flounder *Paralichthys lethostigma* reared in a recirculating aquaculture system[J]. *Aquaculture*, 2018, 489: 36-45.
- [8] 姚怡莎. 膨化大豆的评价指标及其相关性研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
Yao Y S. Studies of evaluation indicators and correlation of extruded soybean[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016 (in Chinese).
- [9] Yu J, Wang Z Y, Yang H M, *et al.* Effects of cottonseed meal on growth performance, small intestinal morphology, digestive enzyme activities, and serum biochemical parameters of geese[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(5): 2066-2071.
- [10] Devanaboyina N, Rao S V R, Panda A K, *et al.* Cottonseed meal in poultry diets: a review[J]. *The Journal of Poultry Science*, 2007, 44(2): 119-134.
- [11] Cai C, Li E, Ye Y, *et al.* Effect of dietary graded levels of cottonseed meal and gossypol on growth performance, body composition and health aspects of allogynogenetic silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio*♀ × *Cyprinus carpio*♂[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2011, 17(4): 353-360.
- [12] Yildirim M, Lim C, Wan P J, *et al.* Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol-acetic acid[J]. *Aquaculture*, 2003, 219(1-4): 751-768.
- [13] Anderson A D, Alam M S, Watanabe W O, *et al.* Full replacement of menhaden fish meal protein by low-gossypol cottonseed flour protein in the diet of juvenile black sea bass *Centropristis striata*[J]. *Aquaculture*, 2016, 464: 618-628.
- [14] Wang X F, Li X Q, Leng X J, *et al.* Effects of dietary cottonseed meal level on the growth, hematological indices, liver and gonad histology of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Aquaculture*, 2014, 428-429: 79-87.
- [15] Khalaf M A, Meleigy S A. Reduction of free gossypol levels in cottonseed meal by microbial treatment[J]. *International Journal of Agriculture & Biology*, 2008, 10(2): 185-190.
- [16] Mayorga H, González J, Menchú J F, *et al.* Preparation of a low free gossypol cottonseed flour by dry and continuous processing[J]. *Journal of Food Science*, 1975, 40(6): 1270-1274.
- [17] Cheng Z J, Hardy R W. Apparent digestibility coefficients and nutritional value of cottonseed meal for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquaculture*, 2002, 212(1-4): 361-372.
- [18] Luo L, Xue M, Wu X F, *et al.* Partial or total replacement of fishmeal by solvent-extracted cottonseed meal in diets for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2006, 12(6): 418-424.
- [19] Robinson E H. Improvement of cottonseed meal protein with supplemental lysine in feeds for channel catfish[J]. *Journal of Applied Aquaculture*, 1991, 1(2): 1-14.
- [20] Robinson E H, Li M H. Use of plant proteins in catfish feeds: replacement of soybean meal with cottonseed meal and replacement of fish meal with soybean meal

- and cottonseed meal[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1994, 25(2): 271-276.
- [21] 殷彬. 植物蛋白源替代鱼粉对珍珠龙胆生长性能、肠道菌群和免疫的影响 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2019.
- Yin B. Effects of plant protein sources replacing fishmeal on growth performance, intestinal microflora and immunity of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂)[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [22] 申建飞, 陈铭灿, 刘泓宇, 等. 浓缩棉籽蛋白替代鱼粉对卵形鲳鲹幼鱼生长性能、血清生化指标、肝脏抗氧化指标及胃肠道蛋白酶活性的影响[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(2): 746-756.
- Shen J F, Chen M C, Liu H Y, et al. Effects of fish meal replacement by concentrated cottonseed protein on growth performance, serum biochemical indices, liver antioxidant indices and gastrointestinal tract protease activities of juvenile *Trachinotus ovatus*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(2): 746-756(in Chinese).
- [23] 罗琳, 薛敏, 吴秀峰, 等. 脱酚棉籽蛋白对日本鲈的生长、体成分及营养成分表观消化率的影响[J]. *水产学报*, 2005, 29(6): 866-870.
- Luo L, Xue M, Wu X F, et al. Effect of degossypolled cottonseed meal in diets on growth, body composition and apparent digestibility coefficients of nutrients in *Lateolabrax japonicus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(6): 866-870(in Chinese).
- [24] 张静雅, 任幸, 李伟业, 等. 利用棉籽浓缩蛋白替代条纹锯鲷饲料鱼粉的潜力[J]. *水产学报*, 2020, 44(11): 1873-1882.
- Zhang J Y, Ren X, Li W Y, et al. Potential of replacing fish meal with cottonseed protein concentrate in black sea bass (*Centropristis striata*) diet[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(11): 1873-1882(in Chinese).
- [25] 李宁宇, 刘利平, 华雪铭, 等. 豆粕影响日本鳗鲡黑仔鳗饲料中发酵豆粕对鱼粉的替代效果: 生长、抗氧化能力以及生化指标[J]. *海洋渔业*, 2020, 42(3): 352-364.
- Li N Y, Liu L P, Hua X M, et al. Effects of soybean meal on fermented soybean meal partially replacing fish meal in the feed of *Anguilla japonica*: growth performance, antioxidant capacity and biochemical indices[J]. *Marine Fisheries*, 2020, 42(3): 352-364(in Chinese).
- [26] de la Higuera L, Garzón A, Hidalgo M C, et al. Influence of temperature and dietary-protein supplementation either with free or coated lysine on the fractional protein-turnover rates in the white muscle of carp[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1998, 18(1): 85-95.
- [27] Zheng Q M, Wen X B, Han C Y, et al. Effect of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, hematology, antioxidant enzymes activity and expression for juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2012, 38(4): 1059-1069.
- [28] Abdel-Latif H M R, Soliman A A, Sewilam H, et al. The influence of raffinose on the growth performance, oxidative status, and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 18: 100457.
- [29] Yang P, Hu H B, Liu Y, et al. Dietary stachyose altered the intestinal microbiota profile and improved the intestinal mucosal barrier function of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L.[J]. *Aquaculture*, 2018, 486: 98-106.
- [30] 丁桂涛. 大口黑鲈饲料中动物性蛋白源和植物性蛋白源的应用研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- Ding G T. Study on the application of animal protein and plant protein in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) diets[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [31] 李伟, 王嘉炜, 孟令媛, 等. 水苏糖及其应用和对肠道菌群作用的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2017, 29(9): 1110-1113.
- Li W, Wang J W, Meng L Y, et al. Application and effects of stachyose on enterobacteria: Research progress[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2017, 29(9): 1110-1113(in Chinese).
- [32] 王经远, 戈贤平, 周群兰, 等. 发酵豆粕替代复合植物蛋白源对团头鲂幼鱼生长性能及肠道健康的影响[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(11): 5112-5122.
- Wang J Y, Ge X P, Zhou Q L, et al. Effects of compound plant protein sources replaced by fermented soybean meal on growth performance and intestinal health of juvenile Blunt Snout Bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(11): 5112-5122(in Chinese).

Effects of cottonseed protein source on growth, body composition and health of *Micropterus salmoides*

ZHOU Xingmei¹, HE Guanglun¹, XU Zhicheng¹, CHEN Yongjun¹, TAN Beiping², LIN Shimei^{1*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: To evaluate the feasibility of cottonseed protein in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) diet, five isonitrogen-isolipid experimental diets (CPC₀ as control group, CPC₁, CPC₂, CPC₃, and CPC₄) were prepared by replacing 30% fish meal with 4 cottonseed proteins of different quality. *Micropterus salmoides* [average body weight (12.20±0.11) g] were fed in indoor circulating culture system for 8 weeks. The results showed that the nutrient composition, contents of gossypol, raffinose and stysaccharide of the four kinds of cottonseed proteins were different, and CPC₃ cottonseed protein quality was the best. The final body weight, weight gain rate and specific growth rate of CPC₃ group were significantly higher than those of the other groups, but there were no significant difference in the routine nutrients and muscle amino acid nutritional composition among all groups. The activities of SOD and GSH-Px and the mRNA expressions of *CAT* and *SOD* in liver of CPC₃ group were the highest, while the content of MDA was the lowest. The relative expressions of anti-inflammatory factors *IL-10* and *TGF-β* were the highest in CPC₃ group, while the relative expressions of pro-inflammatory factors *IL-1β*, *IL-8* and *TNF-α* were the lowest in CPC₃ group. In addition, cottonseed protein sources could significantly affect the liver protein metabolism of largemouth bass, and the activities of ALT and AST and the expression levels of *PI3K*, *Akt*, *mTOR*, *S6K1* and *4E-BP* in CPC₃ group were the highest. Meanwhile, it was found that CPC₃ group had the highest intestinal T-SOD enzyme activity, the lowest MDA content, and the lowest intestinal permeability indexes (diamine oxidase, D-lactic acid and endotoxin). Cottonseed protein sources also affected the expression of tight junction protein-related genes *ZO-1*, *Claudin-1* and *Occludin* in the intestine. The results showed that different cottonseed protein quality had different effects on the growth and health of *M. salmoides*, among which cottonseed protein CPC₃ showed the best effect and significantly improved the liver and intestinal health of *M. salmoides*, thereby promoting the growth of *M. salmoides*. Cottonseed protein CPC₃ can be used as a good protein source for *M. salmoides* feed.

Key words: *Micropterus salmoides*; cottonseed protein; growth performance; liver function; intestinal health

Corresponding author: LIN Shimei. E-mail: linsm198@163.com

Funding projects: National Key R&D Program of China (2019YFD0900200); Chongqing Technology Innovation and Application Development Project (cstc2020jscx-msxmX0046)