

## 饲料中高直链淀粉对大口黑鲈肠道物理屏障和菌群的影响

刘欣平<sup>1</sup>, 董文静<sup>1</sup>, 黄 汉<sup>1</sup>, 廖瑞生<sup>1</sup>,  
陈拥军<sup>1</sup>, 谭北平<sup>2</sup>, 林仕梅<sup>1\*</sup>

(1. 西南大学水产学院, 西南大学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:** 为了评价淀粉结构对大口黑鲈肠道健康的影响, 实验用 10% 的普通玉米淀粉 (直/支链比例为 3: 7, CS) 和高直链玉米淀粉 (直/支链比例为 7: 3, HACS) 分别配制成 CS 和 HACS 两组等氮等脂的实验饲料, 在室内循环系统中饲养初始体重为 (8.53±0.06) g 的大口黑鲈 8 周。结果显示, HACS 组大口黑鲈特定生长率 (SGR) 和蛋白质效率 (PER) 显著高于 CS 组。与 CS 组相比, HACS 组肠道过氧化氢酶 (CAT) 和总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 的活性显著升高, 且抗氧化基因 *nrf2*、*cat* 的表达量显著上调。同时, HACS 组促炎细胞因子 (*tnf-α*、*il-8*) 的相对表达量显著下调, 而抗炎细胞因子 (*tgf-β*) 的相对表达量显著上调。此外, HACS 组在门水平中显著提高放线菌门的丰度, 在属水平中显著提高有益菌乳酸菌属的丰度, 降低部分潜在有害菌 (不动杆菌属、考克氏菌属) 的丰度。进一步表型预测发现, 相较于普通玉米淀粉, 饲喂高直链玉米淀粉能显著降低革兰氏阴性菌比例, 增加革兰氏阳性菌比例, 显著降低潜在致病菌丰度。研究表明, 高直链淀粉能提高大口黑鲈抗氧化能力和免疫水平, 改善肠道形态结构和肠道菌群。因此, 高直链淀粉能改善大口黑鲈的肠道健康状况。

**关键词:** 大口黑鲈; 高直链淀粉; 肠道形态; 肠道菌群

中图分类号: S 963.7

文献标志码: A

淀粉作为饲料中碳水化合物的主要存在形式, 是由葡萄糖通过糖苷键结合而成的多糖, 按其结构可分为直链淀粉和支链淀粉, 二者占淀粉干重的 99%<sup>[1]</sup>。其中直链淀粉是 D-葡萄糖基以  $\alpha$ -(1,4) 糖苷键连接, 而支链淀粉中葡萄糖分子之间含有  $\alpha$ -(1,4) 和  $\alpha$ -(1,6) 两种糖苷键, 结构的不同使得它们在鱼体内的消化速率也不同, 直链淀粉含氢键多, 与酶接触的表面小, 因此降解速率较慢<sup>[2-4]</sup>。大多数天然淀粉都是以直链淀粉和支链淀粉组成, 其组成比例是影响其功能特征的关键因素之一<sup>[5]</sup>。直链淀粉的分支较少, 可以形成具有复杂晶体结

构的抗性淀粉, 在肠道中会抵抗消化<sup>[6]</sup>。适宜的抗性淀粉可降低炎症反应<sup>[7]</sup>, 调节肠道菌群<sup>[8]</sup>, 提高机体抗病力<sup>[9]</sup>。

健康的肠道是动物生长和免疫的基础, 任何影响肠道健康的因素都会限制动物生长性能的发挥<sup>[10]</sup>。通过膳食营养干预来减轻肠道炎症、改善肠道功能已成为一种有效途径<sup>[11-12]</sup>。大多数鱼类, 尤其是肉食性鱼类对碳水化合物的利用能力十分有限, 过高的碳水化合物会导致糖代谢紊乱、免疫功能下降, 从而抑制鱼体生长<sup>[13]</sup>。淀粉作为饲料中廉价的能源和黏合剂, 适量添加可以节约蛋

收稿日期: 2022-08-14 修回日期: 2022-09-17

资助项目: 蓝色粮仓科技创新专项 (2019YFD0900200); 重庆市生态渔产业技术体系 (2022); 重庆市水产科技创新联盟项目 (2022)

第一作者: 刘欣平 (照片), 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: 1150172614@qq.com

通信作者: 林仕梅, 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: linsm198@163.com



白质, 降低饲料成本<sup>[14]</sup>。大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 是我国重要的经济养殖鱼类, 对淀粉的利用能力较低<sup>[15]</sup>。目前淀粉的研究主要聚焦于对大口黑鲈肝脏的影响, 涉及肠道方面的研究甚少<sup>[16]</sup>。寻求适宜的营养调控措施来保障肠道健康, 对水产行业的发展有着重要的现实意义。本研究以大口黑鲈为对象, 从生长、肠道形态、抗氧化能力以及肠道菌群角度, 探究鱼类肠道对饲料淀粉结构的营养生理响应和适应策略, 阐明高直链淀粉改善鱼类肠道健康的可行性, 为大口黑鲈饲料配方的优化提供理论依据和技术资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料

以秘鲁蒸汽鱼粉、小麦蛋白粉、大豆分离蛋白和豆粕为主要蛋白源, 以鱼油和豆油 (3:5, 质量比) 为脂肪源, 分别添加 10% 的普通玉米淀粉 (直/支链质量比为 3:7) 和高直链玉米淀粉 (直/支链质量比为 7:3) 配置等氮等脂饲料, 两组饲料配方和营养组成见表 1。饲料原料粉碎过 80 目筛, 采取逐级稀释法混合均匀, 制成粒径为 3.0 mm 的颗粒饲料, 自然风干后于 4 °C 冰柜中保存备用。

### 1.2 实验鱼与饲养管理

实验大口黑鲈来自重庆市三峡生态渔业股份有限公司, 暂养在室内玻璃缸, 用商品饲料 (福建天马科技集团股份有限公司) 驯化 1 周。禁食 24 h, 选取体质健康、活力较好、初始体重为 (8.53±0.06) g 的大口黑鲈随机分为 2 个处理, 每个处理设 3 个重复, 每个重复 25 尾, 在室内淡水循环养殖系统 (容积: 280 L) 饲养 56 d。养殖水源为曝气自来水, 日饱食投喂 2 次 (8:30、17:30), 光照周期为 12 L:12 D。养殖期间水温 25.0~28.0 °C, 溶解氧 6.5 mg/L, 氨氮 0.48 mg/L, pH 7.5~8.5。实验过程中操作人员严格遵守西南大学实验动物福利伦理审查委员会伦理规范, 并按照西南大学实验动物福利伦理审查委员会的规章制度进行。

### 1.3 样品的制备与分析

**样品采集** 养殖实验结束禁食 24 h 后, 使用浓度为 0.01% 的 MS-222 麻醉后逐条称重计数, 每个重复随机选取 3 尾鱼, 在冰盘上解剖并分离出完整的肠道, 将肠道等分为 3 段, 剪取后段中央约 1 cm 的片段作为大口黑鲈后肠, 放入 4% 多

表 1 实验饲料配方及营养水平 (风干基础)

Tab. 1 Formulation and proximate chemical composition of

trial diets (air-dry basis)		%	
项目 items		淀粉种类 dietary starch types	
		CS	HACS
<b>原料 ingredient</b>			
秘鲁蒸汽鱼粉	Peru steam-treated fish meal	35	35
小麦筋蛋白	wheat gluten	10	10
大豆分离蛋白 (无糖)	isolated soy protein (no sugar)	14	14
去皮豆粕	dehulled soybean meal	8	8
玉米淀粉	corn starch	10	0
高直链玉米淀粉	high amylose corn starch	0	10
鱼油	fish oil	3	3
豆油	soybean oil	5	5
氯化胆碱	choline chloride	0.3	0.3
维生素C	vitamin C	0.2	0.2
磷酸二氢钙	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1	1
复合预混料	composite premix <sup>1)</sup>	3	3
α纤维素	α-cellulose	10.5	10.5
<b>营养成分 chemical composition</b>			
粗蛋白	crude protein	47.2	47.2
粗脂肪	crude lipid	11.3	11.3
粗灰分	crude ash	9.2	9.3

注: CS.普通玉米淀粉, HACS.高直链玉米淀粉, 下同。1).维生素预混料和矿物质预混料。每千克饲料提供矿物质包括钠30 mg, 钾50 mg, 镁100 mg, 铜4 mg, 铁25 mg, 锌35 mg, 锰12 mg, 碘1.6 mg, 硒0.2 mg, 钴0.8 mg。每千克饲料提供维生素, 维生素A 18 mg, 维生素D 5 mg, 维生素E 150 mg, 维生素C 500 mg, 维生素B<sub>1</sub> 16 mg, 维生素B<sub>6</sub> 20 mg, 维生素B<sub>12</sub> 6 mg, 维生素K<sub>3</sub> 18 mg, 核黄素40 mg, D-泛酸钙60 mg, 叶酸5 mg, 生物素2 mg, 乙氧基喹啉100 mg。Notes: CS. common corn starch, HACS. high amylose corn starch, the same below. 1). vitamin premixes and mineral premixes, per kg feed provides minerals, sodium 30 mg, potassium 50 mg, magnesium 100 mg, copper 4 mg, iron 25 mg, zinc 35 mg, manganese 12 mg, iodine 1.6 mg, selenium 0.2 mg, cobalt 0.8 mg. Per kg of feed provides vitamins, vitamin A 18 mg, vitamin D 5 mg, vitamin E 150 mg, vitamin C 500 mg, vitamin B<sub>1</sub> 16 mg, vitamin B<sub>6</sub> 20 mg, vitamin B<sub>12</sub> 6 mg, vitamin K<sub>3</sub> 18 mg, riboflavin 40 mg, D-calcium pantothenate 60 mg, folic acid 5 mg, biotin 2 mg, ethoxyquinoline 100 mg.

聚甲醛固定液中, 用于肠道组织切片的制作, 收集剩余的肠道组织, 迅速放入液氮中速冻, 保存于-80 °C 冰箱, 用于生理生化的测定。禁食 24 h 后重新饱食投喂, 在摄食 1 h 后随机选取每个重复各 6 尾鱼, MS-222 麻醉后使用 0.1% 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 预处理过的无菌无酶解剖工具于冰上迅速解剖并分离出肠道, 剪取大口黑鲈中肠 (与上述用于切片制作的肠道片段相同位置) 约 50 mg, 迅速放入存有 500 mL 核酸保护液 (Sample Protector for RNA/DNA, TaKaRa, 日本) 的 1.5 mL 无菌无酶离心管中保存, 保证组织完全浸入 RNA 保

护液内, 液氮速冻后 $-80^{\circ}\text{C}$ 条件保存, 用于肠道各类基因相对表达量测定。饱食投喂 6 h 后, 每个重复随机选取 3 尾鱼, 在无菌操作台上使用无菌解剖工具将大口黑鲈肠道分离, 用镊子小心取出内容物, 混匀后装入 1.5 mL 无菌离心管中, 用 PBS 缓冲液小心冲洗肠道, 一并装入离心管, 液氮速冻后 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存, 用于肠道菌群 16S rRNA 测序。

**饲料常规营养成分的测定** 粗蛋白质含量采用凯氏定氮法 (GB/T 6432—2018) 测定; 粗脂肪含量采用索式抽提法 (GB/T 2479—2003) 测定; 粗灰分含量采用  $550^{\circ}\text{C}$  马弗炉煅烧法 (GB/T 212—2008) 测定。

**抗氧化及代谢指标测定** 采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 活性 (WST-1 法)、过氧化氢酶 (CAT) 活性 (钼酸铵法) 以及丙二醛 (MDA) 含量 (TBA 法)。

**肠道组织学切片** 将 4% 多聚甲醛固定的肠道组织用 70% 酒精冲洗, 逐级脱水, 用无水乙醇与二甲苯溶液进行透明, 在恒温箱中浸蜡, 进行石蜡包埋, 苏木精-伊红染色 (H.E,  $100\times$ )。

**16S rRNA 测序** 原始数据委托百迈客生物云平台测序和文库构建, 数据结果在百迈客生物云平台 (BMKCloud) 中进行分析。使用 Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, 美国) 从样品中提取细菌总 RNA。采用 PCR (正向引物: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3', 反向引物: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), 并使用 HiSeq 平台 (Illumina, 美国) 进行测序。使用 Metastats 分析各组间菌属水平的显著差异, 采用 BugBase 工具进行菌群表型预测分析。

**抗氧化及免疫相关基因表达分析** 肝脏及肠道总 RNA 使用 RNAiso Plus 试剂 (TaKaRa, 日本) 提取, 使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计 (Thermo Fisher, 美国) 测定总 RNA 浓度并适当稀释至  $1\ 000\ \text{ng}/\mu\text{L}$ 。随后使用反转录试剂盒 FastKing-RT SuperMix [天根生化科技 (北京) 有限公司] 将提取的总 RNA 反转录为 cDNA, 并用 DEPC 水稀释后备用。实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 反应体系为  $20\ \mu\text{L}$ , 上下游引物各  $1\ \mu\text{L}$ 、cDNA  $2\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}\ 2\times\text{NovoStart}^{\circledR}\ \text{SYBR}\ \text{qPCR}\ \text{SuperMix}\ \text{Plus}$  (Novoprotein, 上海) 和无酶水  $6\ \mu\text{L}$ 。定量仪器为实时定量 PCR 仪 (Bio-rad - CFX96)。RT-PCR 的程序为  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 1 min;  $95^{\circ}\text{C}$  变性 20 s;  $60^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 40 个循环, 之后形成熔解曲线。引物序列见表 2。通过定量 PCR 得出每对引物每个浓度 cDNA 的  $C_t$  值, 目的基因的相对 mRNA 表达归一化到  $\beta\text{-actin}$  (内参基因), 并使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法测定。

#### 1.4 计算公式

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

摄食率 (FI, %/d) =  $F / [(W_t + W_0) / 2 \times t] \times 100\%$

饲料系数 (FC) =  $F / (W_t - W_0)$

蛋白质效率 (PER) =  $(W_t - W_0) / (F \times F_p) \times 100\%$

式中,  $W_t$  和  $W_0$  分别为终末鱼体重和初始鱼体重 (g);  $t$  为养殖实验天数 (d);  $F$  为总摄食量 (g);  $F_p$  为饲料蛋白质含量 (%)。

#### 1.5 数据分析

所有数据均以平均值  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SE) 表

表 2 实时定量 (RT-PCR) 引物设计序列

Tab. 2 Primers pair sequences for RT-PCR

引物名称 primer name	上游引物(5'-3') forward primer	下游引物(5'-3') reverse primer	$T_m/^{\circ}\text{C}$
<i>il-8</i>	CGTTGAACAGACTGGGAGAGATG	AGTGGGATGGCTTCATTATCTTGT	64.9
<i>il-10</i>	CGGCACAGAAATCCCAGAGC	CAGCAGGCTCACAAAATAAACATCT	62.1
<i>il-1<math>\beta</math></i>	CGTGACTGACAGCAAAAAGAGG	GATGCCAGAGCCACAGTTC	59.4
<i>tgf-<math>\beta</math></i>	GCTCAAAGAGAGCGAGGATG	TCCTCTACCATTCGCAATCC	59.0
<i>tnf-<math>\alpha</math></i>	CTTCGTCTACAGCCAGGCATCG	TTTGGCACACCGACCTCACC	63.1
<i>keap1</i>	GCACCTAACCGTGAACCTCAA	CCAGTTTTAGCCAGTCATTGTTC	56.9
<i>nr12</i>	CCACACGTGACTCTGATTCTC	TCCTCCATGACCTTGAAGCAT	66.6
<i>sod</i>	CCACCAGAGGTCTCACAGCA	CCACTGAACCGAAGAAGGACT	62.2
<i>cat</i>	TGGTGTTACGGATGAGATGG	GGAGAAGCGGACAGCAATAGG	60.8
18S	GGACACGGAAGGATTGACAG	CGGAGTCTCGTTCGTTATCGG	60.0

示。使用 SPSS 18.0 软件 (IBM, 美国) 进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 确定显著性水平, 使用 Tukey 氏法对所得数据进行多重比较, 显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 高直链淀粉对大口黑鲈生长性能的影响

HACS 组的 FBW、SGR 和 PER 均显著高于 CS 组 ( $P < 0.05$ ), FC 显著低于 CS 组 ( $P < 0.05$ ), 两组间的 FI 无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (表 3)。

表 3 高直链淀粉对大口黑鲈生长性能的影响

Tab. 3 Effects of high amylose starch on growth performance of *M. salmoides*

项目 items	组别 groups	
	CS	HACS
平均初始体重/g IBW	8.53±0.06	8.65±0.11
平均终末体重/g FBW	43.86±1.22	47.03±1.62*
特定增长率/(%/d) SGR	3.15±0.01	3.24±0.04*
摄食率/(%/d) FR	3.79±0.21	3.51±0.11
饲料系数 FC	1.20±0.02	1.12±0.02*
蛋白质效率/% PER	1.26±0.06	1.44±0.05*

注: “\*”表示同行数据之间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。  
Notes: In the same row, the data with superscript \* indicates significant difference ( $P < 0.05$ ), the same below.

### 2.2 高直链淀粉对大口黑鲈肠道抗氧化能力的影响

HACS 组大口黑鲈肠道 CAT 和 T-SOD 活性均显著高于 CS 组 ( $P < 0.05$ ), MDA 含量显著低于 CS 组 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。HACS 组 *cat* 和 *nrf2* mRNA 表达水平显著高于 CS 组 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。

### 2.3 高直链淀粉对大口黑鲈肠道形态学的影响

各实验组大口黑鲈肠道结构完整, 肠绒毛整齐, 肠黏膜光滑, 杯状细胞数量充足 (图 3, 箭头所示)。HACS 组后肠的肠绒毛宽度显著高于 CS 组 ( $P < 0.05$ ), 两实验组的后肠的绒毛高度、肌层厚度和杯状细胞数目均无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (表 4)。

### 2.4 高直链淀粉对大口黑鲈肠道免疫的影响

HACS 组肠道促炎细胞因子 *tnf-α* 和 *il-8* 的表达量显著低于 CS 组, 抗炎细胞因子 *tgf-β* 的表达量显著高于 CS 组 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

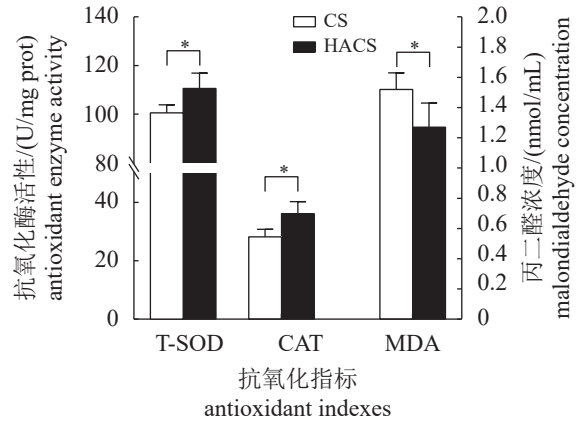


图 1 高直链淀粉对大口黑鲈肠道抗氧化能力的影响

\*表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

Fig. 1 Effects of high amylose starch on intestinal antioxidant capacity of *M. salmoides*

\* indicate significant difference among treatments ( $P < 0.05$ ), the same below.

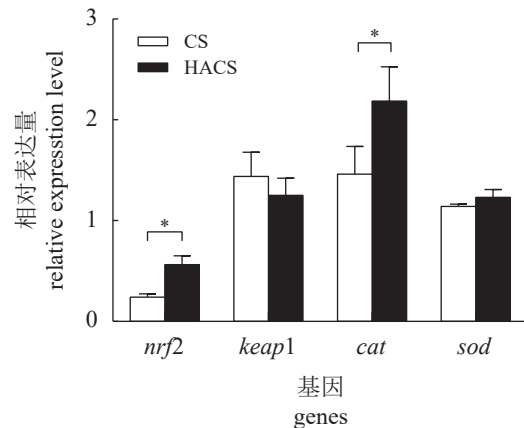


图 2 高直链淀粉对大口黑鲈肠道抗氧化相关基因表达的影响

Fig. 2 Effects of high amylose starch on intestinal antioxidant genes of *M. salmoides*

### 2.5 高直链淀粉对大口黑鲈肠道菌群结构和功能的影响

相比于 CS 组, HACS 组变形菌门 (Proteobacteria) 相对丰度无显著变化, 而厚壁菌门 (Firmicutes) (从 22.43% 下降到了 18.13%) 和蓝细菌门 (Cyanobacteria) (从 12.57% 下降到了 4.65%) 相对丰度显著降低, 放线菌门 (Actinobacteria) (从 6.18% 上升到了 17.81%) 相对丰度显著升高 (图 5)。Metastats<sup>[17]</sup> 分析发现, HACS 组肠道菌群中微杆菌属 (*Microbacteriaceae*)、根瘤菌属 (*Rhizobiales*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、考克氏菌属 (*Kocu-*

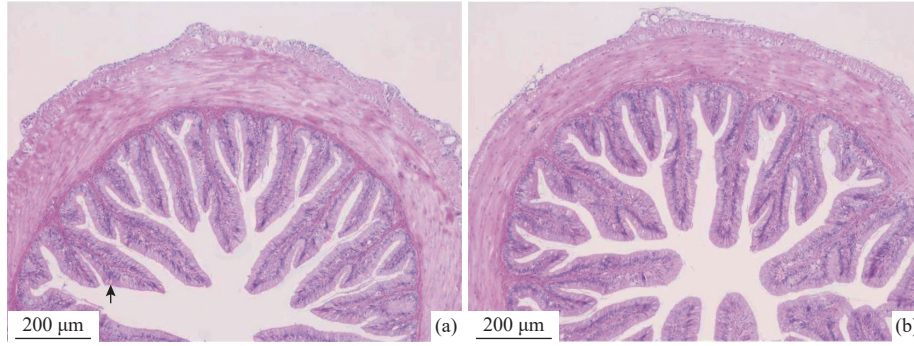


图3 饲料淀粉结构对大口黑鲈后肠组织结构的影响

Fig. 3 Effects of dietary starch structure on hindgut in *M. salmoides* under a light microscope

(a) CS, (b) HACS.

表4 不同结构对大口黑鲈后肠形态学参数的影响

Tab. 4 Effects of dietary HACS on morphology parameters of *M. salmoides*

项目 items	组别 groups	
	CS	HACS
绒毛高度/ $\mu\text{m}$ villus height	312.60 $\pm$ 15.60	305.23 $\pm$ 20.75
绒毛宽度/ $\mu\text{m}$ villus width	82.34 $\pm$ 2.95	94.21 $\pm$ 2.71*
肌层厚度/ $\mu\text{m}$ muscle layer thickness	115.46 $\pm$ 4.16	120.28 $\pm$ 4.45
杯状细胞数/(个/ $100\ \mu\text{m}^2$ ) number of goblet cells	13.5 $\pm$ 1.6	11.5 $\pm$ 4.3

ria) 和林杆菌属 (*Alsobacter*) 相对丰度显著低于 CS 组 ( $P < 0.05$ ), 乳酸菌属 (*Lactobacillus*) 相对丰度显著高于 CS 组 ( $P < 0.05$ ) (图 5, 图 6)。Bugbase 表型预测发现, HACS 组和 CS 组的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的丰度具有一定的差异。

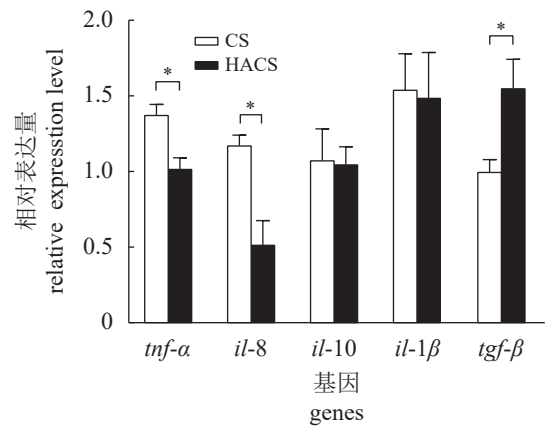


图4 高直链淀粉对大口黑鲈肠道免疫基因表达水平的影响

Fig. 4 Effects of high amylose on intestinal immune gene expression in *M. salmoides*

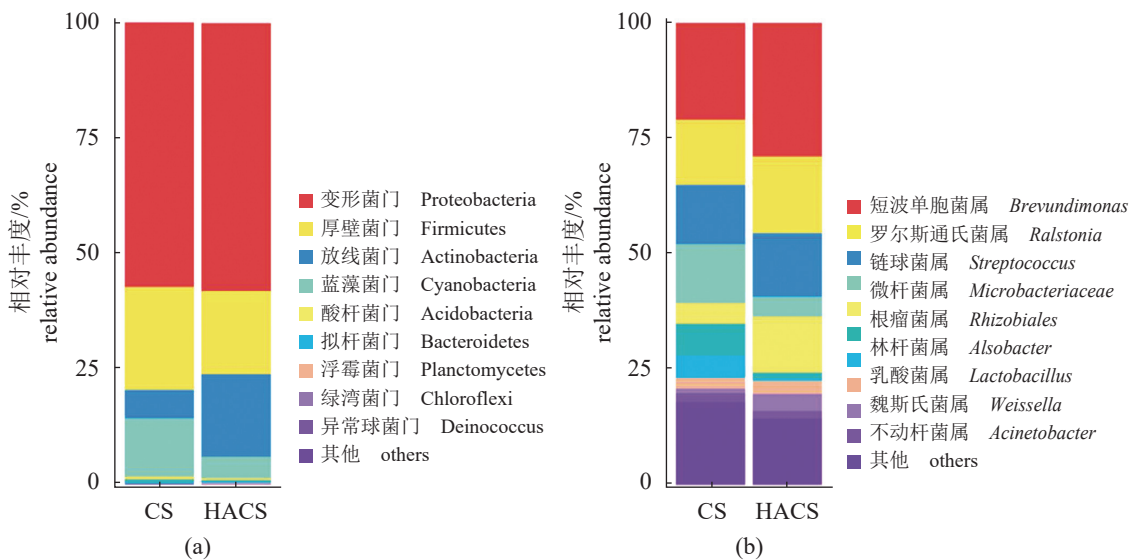


图5 普通淀粉组和高直链淀粉组肠道菌群在门水平 (a) 和属水平 (b) 的组成

Fig. 5 Composition of gut microbiota at phylum level (a) and genus level (b) in the common starch and high amylose groups

HACS组的革兰氏阳性菌丰度显著高于CS组 ( $P<0.05$ ), 革兰氏阴性菌丰度显著低于CS组 ( $P<0.05$ )。此外, HACS组的潜在致病菌丰度显著低于CS组 ( $P<0.05$ ) (图7)。

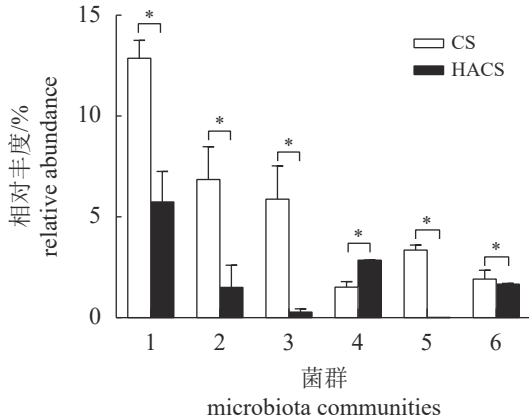


图6 CS组与HACS组肠道菌群的Metastat分析

1.微杆菌属, 2.根瘤菌属, 3.林杆菌属, 4.乳酸菌属, 5.考克氏菌属, 6.不动杆菌属。

Fig. 6 Metastat analysis of intestinal microbiota communities between CS and HACS groups of *M. salmoides*

1. *Microbacteriaceae*, 2. *Rhizobiales*, 3. *Alsobacter*, 4. *Lactobacillus*, 5. *Kocuria*, 6. *Acinetobacter*.

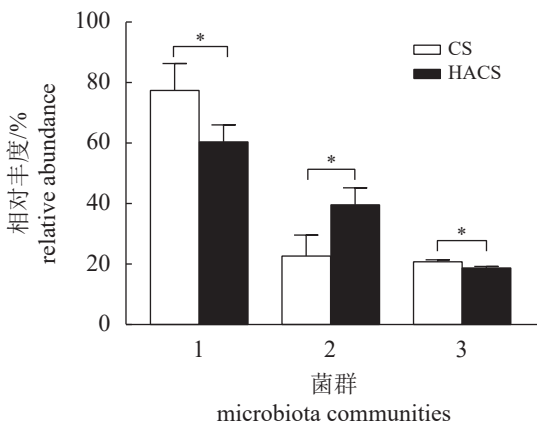


图7 CS组和HACS组肠道菌群表型预测

1.革兰氏阴性菌, 2.革兰氏阳性菌, 3.潜在致病菌。

Fig. 7 BugBase analysis of intestinal microbiota communities between CS and HACS groups of *M. salmoides*

1. Gram negative, 2. Gram positive, 3. potentially pathogenic.

### 3 讨论

本研究表明, 高直链淀粉能够显著提高大口黑鲈的生长性能。同样在太阳鲈 (*Lepomis gibbosus*)<sup>[18]</sup>、断奶羔羊 (*Lepomis gibbosus*)<sup>[19]</sup> 中也发现, 高直链淀粉能够改善动物的生长性能。有研究指

出, 淀粉结构不会影响异育银鲫和长吻鮠 (*Leiocassis longirostris*) 的生长<sup>[20]</sup>。相反, 高直链淀粉会显著抑制青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) 的生长性能<sup>[21]</sup>。可见, 不同鱼种对饲料淀粉结构的生理响应有显著差异。作为典型肉食性鱼类的大口黑鲈, 因高直链淀粉的血糖指数 (GI) 值低, 其添加有效减缓了血液葡萄糖的生成速率, 缓解或减轻了血糖对鱼类生理机能的持续伤害, 致使高直链淀粉组大口黑鲈对营养物质的消化吸收功能发挥得更好, 进而提高饲料蛋白质的利用效率, 促进鱼类的生长。高直链淀粉组 PER 值升高, 也支持此推断。

肠道的抗氧化能力在一定程度上反映了肠道的健康状况<sup>[22]</sup>。本研究结果显示, 高直链淀粉显著提高大口黑鲈肠道抗氧化酶 (T-SOD、CAT) 活性, 降低脂质过氧化产物 (MDA) 含量, 表明高直链淀粉能够提高大口黑鲈肠道抗氧化能力, 改善肠道健康。这与在日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*)<sup>[23]</sup> 中的研究结果一致, 证实了高直链淀粉具有改善动物抗氧化能力的作用。抗氧化基因 (*nrf2*、*cat*) 上调进一步证实了高直链淀粉对大口黑鲈肠道抗氧化能力的改善作用。在小鼠 (*Mus musculus*)<sup>[24]</sup> 中同样发现, 高直链淀粉能够显著上调 *nrf2* 基因的表达量。这预示高直链淀粉可通过调控 *nrf2* 基因的表达水平来提高抗氧化酶活性。

众所周知, *tnf- $\alpha$* 、*il-1 $\beta$*  和 *il-8* 是常见的促炎细胞因子, 而 *tgf- $\beta$*  和 *il-10* 在免疫反应中起抗炎作用<sup>[25]</sup>。本实验结果显示, 高直链淀粉显著上调大口黑鲈肠道抗炎细胞因子 (*tgf- $\beta$* ) mRNA 的表达水平, 而下调促炎细胞因子 (*tnf- $\alpha$* 、*il-8*) mRNA 的表达水平, 表明添加高直链淀粉能够影响大口黑鲈肠道的免疫指标。研究发现, 高直链淀粉对动物肠道免疫的影响是基于其对益生菌的增殖作用, 能够激活 *PPAP $\gamma$*  的表达, 促进动物组织 IL-10 等抗炎基因的表达, 进而阻遏细胞因子介导的肠道炎症反应<sup>[26]</sup>。而在人体肠道酵解模型中, 研究认为高直链淀粉饮食导致的丁酸盐含量增加也是动物免疫增强的重要因素, 因为丁酸盐能通过弱化组蛋白脱乙酰基酶, 抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路, 从而下调促炎细胞因子的产生<sup>[27]</sup>。本研究以大口黑鲈为模型, 同样发现高直链淀粉可以改善肠道免疫功能。在牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 中的研究也发现, 高直链淀粉能够显著上调免疫相关基因的表达量<sup>[28]</sup>。

肠绒毛能够增加肠道消化吸收面积、分泌多种消化酶, 在吸收营养物质和提高生长性能方面具有重要作用<sup>[29]</sup>。肠绒毛的高度、宽度通常被视为评价肠道功能状态的主要指标, 肠绒毛面积越大, 肠道吸收面积越大, 机体的消化吸收能力越强<sup>[30]</sup>。本研究结果显示, 高直链淀粉显著提高了大口黑鲈后肠绒毛宽度, 改善肠道营养物质的吸收能力。这与在小鼠<sup>[31]</sup>和断奶仔猪<sup>[32]</sup>中的研究结果一致, 高直链淀粉能够改善其肠道形态结构。此外, 肠道绒毛发育受肠道环境的影响, 氧化应激损伤是影响其发育的重要因素之一<sup>[33]</sup>。高直链淀粉组肠道抗氧化能力明显提高, 表明高直链淀粉可缓解氧化应激引起的肠道损伤, 进而改善大口黑鲈肠道的形态结构。

本研究同样证实, 变形菌门和厚壁菌门是大口黑鲈肠道中的优势菌门<sup>[34]</sup>。放线菌门是一类革兰氏阳性菌, 部分放线菌能够产生具有生物活性的次生代谢物, 降低病原体的致病力<sup>[35]</sup>。也有研究表明, 放线菌在一定程度上能反映肠道健康, 放线菌门丰度越高, 肠道健康状况越好<sup>[36]</sup>。在哺乳动物中, 厚壁菌门与拟杆菌门(Bacteroidetes)的比值越高, 其营养物质运输和利用能力越强<sup>[37]</sup>。在本实验中, 观察到高直链淀粉组放线菌门丰度增加, 厚壁菌门与拟杆菌门的比值增加。表明高直链淀粉能改善肠道菌群结构, 同时提高大口黑鲈免疫力, 促进营养物质吸收。进一步研究发现, 高直链淀粉能够提升潜在有益菌(乳酸菌属)的丰度, 降低潜在有害菌(不动杆菌属<sup>[38]</sup>、考克氏菌属<sup>[39]</sup>)的丰度。在对莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)的研究中也得到了类似的结果<sup>[40]</sup>。众所周知, 乳酸菌是一种革兰氏阳性菌, 能够产生丁酸, 具有降低炎症反应、保护肠道屏障功能的作用<sup>[41]</sup>。此外, 菌群表型分析发现, 高直链淀粉会显著降低大口黑鲈肠道革兰氏阴性菌比例、提高革兰氏阳性菌比例, 抑制了产生内毒素的革兰氏阴性菌的繁殖。相似结果也在关于人类肠道健康的研究中被发现, 高直链淀粉摄入能够促进双歧杆菌等有益菌的增加, 降低革兰氏阴性菌的丰度<sup>[42]</sup>。这是因为直链淀粉会在后肠发酵, 产生短链脂肪酸, 降低后肠酸碱度, 从而产生抑制病原菌生长的酸性环境, 同时选择性地促进有益微生物的生长<sup>[43]</sup>。高直链淀粉组较低的潜在致病菌丰度则进一步验证了前面的推论。因此, 研究认为高直链淀粉饲料能够改善大口黑鲈肠道菌群组

成, 促进大口黑鲈肠道健康。

综上所述, 摄食高直链淀粉有利于提高大口黑鲈生长性能和饲料利用率, 改善大口黑鲈肠道形态结构、抗氧化能力, 增强肠道抗应激能力, 还能调节肠道菌群结构, 进而促进其生长。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Copeland L, Blazek J, Salman H, *et al.* Form and functionality of starch[J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(6): 1527-1534.
- [2] Zhao F F, Ren W, Zhang A, *et al.* Effects of different amylose to amylopectin ratios on rumen fermentation and development in fattening lambs[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2018, 31(10): 1611-1618.
- [3] Pinloche E, Mcewan N, Marden J P, *et al.* The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67824.
- [4] Brewer L R, Cai L M, Shi Y C. Mechanism and enzymatic contribution to *in vitro* test method of digestion for maize starches differing in amylose content[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(17): 4379-4387.
- [5] 尹梦洁, 汪水平, 冉涛, 等. 饲料直链/支链淀粉比例对断奶羔羊瘤胃发酵及细菌菌群的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(9): 5142-5151.  
Yin M J, Wang S P, Ran T, *et al.* Effects of dietary amylose/amylopectin ratio on rumen fermentation and bacterial community in weaned lambs[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(9): 5142-5151 (in Chinese).
- [6] 车明晓, 姚春风, 陆梓晔, 等. 不同直链淀粉/支链淀粉对大口黑鲈饲料加工特性、营养物质表观消化率和肠道消化酶活性的影响[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(5): 320-3232.  
Che M X, Yao C F, Lu Z Y, *et al.* Effects of amylose/amylopectin on feed processing characteristics, nutrient apparent digestibility and intestinal digestive enzyme activities of largemouth bass (*Largemouth bass*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(5): 320-3232 (in Chinese).

- [7] 罗毅平, 谢小军. 鱼类利用碳水化合物的研究进展[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 381-390.  
Luo Y P, Xie X J. Progress of carbohydrate utilization in fish[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(2): 381-390 (in Chinese).
- [8] 屈青云, 许伟, 胡源, 等. 抗性淀粉饮食模式下L-茶氨酸对大鼠肠道免疫功能的调节作用[J]. 食品与机械, 2021, 37(12): 32-39, 51.  
Qu Q Y, Xu W, Hu Y, et al. Effect of L-theanine on intestinal immunity of rats under resistant starch feeding[J]. Food and Machinery, 2021, 37(12): 32-39, 51 (in Chinese).
- [9] Demartino P, Cockburn D W. Resistant starch: impact on the gut microbiome and health[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2020, 61: 66-71.
- [10] Catalioto R M, Maggi C A, Giuliani S. Intestinal epithelial barrier dysfunction in disease and possible therapeutical interventions[J]. Current Medicinal Chemistry, 2011, 18(3): 398-426.
- [11] 秦艳枝. 大黄川芎汤鼻饲联合肠内营养治疗对危重症患者肠道功能及机体免疫功能的影响[J]. 中国民间疗法, 2021, 29(4): 75-77.  
Qin Y Z. Effects of RHB Chuanxiong decoction combined with enteral nutrition on intestinal function and immune function in critically ill patients[J]. China's Naturopathy, 2021, 29(4): 75-77 (in Chinese).
- [12] 唐甜, 索化夷, 李键, 等. 膳食营养与宿主遗传通过肠道菌群调节能量代谢研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(3): 225-230.  
Tang T, Suo H Y, Li J, et al. Research progress in regulation of energy metabolism by dietary nutrition and host inheritance via intestinal flora[J]. Food & Machinery, 2019, 35(3): 225-230 (in Chinese).
- [13] Kamalam B S, Medale F, Panserat S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: new insights on influencing factors, biological limitations and future strategies[J]. Aquaculture, 2017, 467: 3-27.
- [14] 党江雨, 高攀为, 徐祺, 等. 亚东鲑幼鱼饲料中适宜淀粉种类与水平的研究[J]. 水生生物学报, 2022, 46(1): 69-78.  
Dang J Y, Gao B W, Xu Z, et al. The suitable starch types and levels in the diet of brown trout (*Salmo trutta*) juveniles[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2022, 46(1): 69-78 (in Chinese).
- [15] Basto-Silva C, Enes P, Oliva-Teles A, et al. Dietary protein/carbohydrate ratio and feeding frequency affect feed utilization, intermediary metabolism, and economic efficiency of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles[J]. Aquaculture, 2022, 554: 738182.
- [16] 桑春燕. 饲料碳水化合物来源和水平对大口黑鲈生长性能、餐后血糖、肝脏糖代谢及胰岛素通路的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.  
Sang C Y. Effects of dietary carbohydrate sources and levels on growth performance, postprandial serum glucose, hepatic glucose metabolism and insulin pathway of largemouth bass (*Micropterus Salmoides*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [17] Paulson J N, Pop M, Bravo H C. Metastats: an improved statistical method for analysis of metagenomic data[J]. Genome Biology, 2011, 12(1): 1-27.
- [18] Rawles S, Lochmann R. Effects of amylopectin/amylose starch ratio on growth, body composition and glycemic response of sunshine bass *Morone chrysops* × *M. saxatilis*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2003, 34(3): 278-288.
- [19] 陈凯, 刘勇, 冉涛, 等. 高直链淀粉玉米替代普通玉米对断奶羔羊生长性能、营养物质表观消化率和血液生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2021, 33(2): 965-973.  
Chen K, Liu Y, Ran T, et al. Effects of normal corn replacement by high amylose corn on growth performance, nutrient apparent digestibility and blood biochemical and physiological indexes of weaning goats[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(2): 965-973 (in Chinese).
- [20] 谭青松. 异育银鲫和长吻鮠对饲料碳水化合物利用的比较研究[D]. 武汉: 中国科学院研究生院(水生生物研究所), 2005.  
Tan Q S. A comparative study on dietary carbohydrate utilization by gibel carp and Chinese longsnout catfish[D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, 2005 (in Chinese).
- [21] Wu C L, Ye J Y, Gao J E, et al. The effects of dietary carbohydrate on the growth, antioxidant capacities, innate immune responses and pathogen resistance of juvenile black carp *Mylopharyngodon piceus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 49: 132-142.
- [22] Sun J, Wu W Y, Ji H. Effect of overwintering on body



- composition, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, glucose and lipid-metabolic related gene expression of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737125.
- [23] Kong Y Q, Ding Z L, Zhang Y X, *et al.* Types of carbohydrate in feed affect the growth performance, antioxidant capacity, immunity, and activity of digestive and carbohydrate metabolism enzymes in juvenile *Macrobrachium nipponense*[J]. *Aquaculture*, 2019, 512: 734282.
- [24] Vaziri N D, Liu S M, Lau W L, *et al.* High amylose resistant starch diet ameliorates oxidative stress, inflammation, and progression of chronic kidney disease[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114881.
- [25] Kushner I. Semantics, inflammation, cytokines and common sense[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 1998, 9(3-4): 191-196.
- [26] Wang F, Liu J, Weng T, *et al.* The inflammation induced by lipopolysaccharide can be mitigated by short-chain fatty acid, butyrate, through upregulation of IL-10 in septic shock[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2017, 85(4): 258-263.
- [27] Yoshida N, Sasaki K, Sasaki D, *et al.* Effect of resistant starch on the gut microbiota and its metabolites in patients with coronary artery disease[J]. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 2019, 26(8): 705-719.
- [28] Jeong S M, Khosravi S, Lee S Y, *et al.* Evaluation of the three different sources of dietary starch in an extruded feed for juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Aquaculture*, 2021, 533: 736242.
- [29] Yu L J, Wen H, Jiang M, *et al.* Effects of ferulic acid on intestinal enzyme activities, morphology, microbiome composition of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed oxidized fish oil[J]. *Aquaculture*, 2020, 528: 735543.
- [30] Huang B C, Zhang S, Dong X H, *et al.* Effects of fishmeal replacement by black soldier fly on growth performance, digestive enzyme activity, intestine morphology, intestinal flora and immune response of pearl gentian grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 120: 497-506.
- [31] Guice J, Bendiks Z A, Coulon D, *et al.* Differences in capacity of high-amylose resistant starch, whole-grain flour, and a combination of both to modify intestinal responses of male Sprague Dawley rats fed moderate and high fat diets[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(51): 15176-15185.
- [32] Hedemann M S, Knudsen K E B. Resistant starch for weaning pigs — effect on concentration of short chain fatty acids in digesta and intestinal morphology[J]. *Live-stock Science*, 2007, 108(1-3): 175-177.
- [33] Tan P, Zhu W L, Zhang P, *et al.* Dietary soybean lecithin inclusion promotes growth, development, and intestinal morphology of yellow drum (*Nibea albiflora*) larvae[J]. *Aquaculture*, 2022, 559: 738446.
- [34] Zhao L L, He K, Luo J, *et al.* Co-modulation of liver genes and intestinal microbiome of largemouth bass larvae (*Micropterus salmoides*) during weaning[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1332.
- [35] Barka E A, Vatsa P, Sanchez L, *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 80(1): 1-43.
- [36] 邢薇, 罗琳. 棉籽糖对杂交鲟肠道结构及肠道菌群影响的研究[J]. *中国水产*, 2020(7): 84-87.
- Xing W, Luo L. Effects of raffinose on intestinal structure and intestinal microflora of hybrid sturgeon[J]. *China Fisheries*, 2020(7): 84-87 (in Chinese).
- [37] Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(11): 1715.
- [38] Kurokawa M, Maehara K, Nakao S, *et al.* A pediatric case with peritoneal dialysis-associated peritonitis caused by *Kocuria arsenatis*, which is unrecognized as a cause of human infection[J]. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2022, 41(2): E64-E65.
- [39] 孙莉. 鲍曼不动杆菌血流感染的流行特征和危险因素分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- Sun L. The epidemiological characteristics and risk factors of *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015 (in Chinese).
- [40] 王琨, 杨伟, 叶继丹. 饲料中直链与支链淀粉比对尼罗罗非鱼生长、肠道菌群和挥发性脂肪酸生成的影响 [J]. *水产学杂志*, 2015, 28(1): 24-28.
- Wang K, Yang W, Ye J D. Effect of dietary amylose-

- amylopectin ratio on growth, intestinal bacterial flora and volatile fatty acid production in Nile tilapia[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2015, 28(1): 24-28 (in Chinese).
- [41] Kong Y D, Gao C S, Du X Y, *et al.* Effects of single or conjoint administration of lactic acid bacteria as potential probiotics on growth, immune response and disease resistance of snakehead fish (*Channa argus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 102: 412-421.
- [42] Maier T V, Lucio M, Lee L H, *et al.* Impact of dietary resistant starch on the human gut microbiome, metaproteome, and metabolome[J]. MBio, 2017, 8(5): e01343.
- [43] Regassa A, Nyachoti C M. Application of resistant starch in swine and poultry diets with particular reference to gut health and function[J]. *Animal Nutrition*, 2018, 4(3): 305-310.

## Effects of dietary high amylose on intestinal health of *Micropterus salmoides*

LIU Xinping<sup>1</sup>, DONG Wenjing<sup>1</sup>, HUANG Han<sup>1</sup>, LIAO Ruisheng<sup>1</sup>,  
CHEN Yongjun<sup>1</sup>, TAN Beiping<sup>2</sup>, LIN Shimei<sup>1\*</sup>

(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:** Carnivorous fish have a very limited ability to use carbohydrates, and excessive carbohydrate will lead to the disorder of sugar metabolism and the decline of immune function, thus inhibiting the growth of fish. Starch as a cheap energy and adhesive in feed, appropriate addition can save protein and reduce feed cost. In order to evaluate the effects of starch structure on intestinal health of *Micropterus salmoides*, two isonitrogenous and lipid experimental diets were fed with 10% common corn starch (CS) and high amylose corn starch (HACS), respectively. *M. salmoides* with an initial weight of (8.53±0.06) g were fed for 8 weeks in an indoor system. The results showed that specific growth rate (SGR) and protein efficiency rate (PER) of *M. salmoides* in HACS group were significantly higher than those in CS group. Meanwhile, the intestinal catalase (CAT) and total superoxide dismutase (T-SOD) activities in HACS group were significantly higher than those in CS group, and the expressions of antioxidant related genes *nrf2* and *cat* were significantly up-regulated. Moreover, compared with CS group, the relative expression levels of pro-inflammatory cytokines (*TNF-α* and *IL-8*) in HACS group were significantly down-regulated, while the relative expression levels of anti-inflammatory cytokines (*TGF-β*) were significantly up-regulated. At the same time, it was observed that the abundance of *Cyanobacteria* and *Lactobacillus* in HACS group was significantly increased at phylum level and genus level. It reduced the abundance of potentially harmful bacteria (*Acinetobacter*, *Kocuria*). Further phenotypic prediction showed that compared with common corn starch, feeding high amylose corn starch could significantly reduce the proportion of Gram-negative bacteria, increase the proportion of gram-positive bacteria, and significantly reduce the abundance of potential pathogenic bacteria. In conclusion, high amylose maize starch can effectively improve intestinal morphology, antioxidant capacity and immune level, and improve intestinal microflora structure and function of largemouth bass. Therefore, high amylose can improve the intestinal health of *M. salmoides*.

**Key words:** *Micropterus salmoides*; high amylose; intestinal morphology; intestinal flora

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

**Funding projects:** National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900200); Chongqing Ecological Fishery Technical System (2022); Chongqing Fishery Technology Innovation Union (2022)