

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230225001

http://www.yykxjz.cn/

付豪, 宋红梅, 牟希东, 田雪, 刘超, 刘奕, 杨叶欣. 发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤生长、体色及血清生化指标的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(5): 80–89

FU H, SONG H M, MU X D, TIAN X, LIU C, LIU Y, YANG Y X. Effects of fish meal replacement with fermented Antarctic krill meal on growth performance, body color and serum biochemical indexes of koi carp (*Cyprinus carpio* L.). Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(5): 80–89

发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤生长、 体色及血清生化指标的影响

付豪^{1,2} 宋红梅^{1①} 牟希东¹ 田雪² 刘超¹ 刘奕¹ 杨叶欣¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室 广东省现代休闲渔业工程技术研究中心 广东 广州 510380; 2. 河南师范大学水产学院 河南 新乡 453007)

摘要 为探讨发酵南极磷虾(*Euphausia superba*)粉替代鱼粉对锦鲤(*Cyprinus carpio* L.)生长、体色和血清生化指标的影响,以初始体质量为(4.92±0.22)g的锦鲤450尾为实验对象,随机分为5组,每组设置3个重复,每个重复30尾鱼,对照组添加未发酵的脱脂南极磷虾粉,实验组添加由粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)和复合菌(1:1:1)发酵的脱脂南极磷虾粉,分别命名为ES(对照组)、EF、LP、CB和MIX,南极磷虾粉的添加量均为200g/kg,共投喂70d。结果表明,与对照组相比,发酵南极磷虾粉替代鱼粉显著提高了锦鲤的终末体质量、特定生长率和增重率($P<0.05$),MIX组的终末体质量、特定生长率和增重率显著高于其他组($P<0.05$)。实验组皮肤和鳞片中层胡萝卜素含量显著增加($P<0.05$),红色(a^*)值、黄色(b^*)值以及 tyr 在皮肤和鳞片中的相对表达量显著提高($P<0.05$),MIX组的 a^* 值、 b^* 值和基因相对表达量显著高于其他组($P<0.05$)。实验组血清甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)含量均显著提高($P<0.05$),谷草转氨酶/谷丙转氨酶(AST/ALT)比值和丙二醛(MDA)含量显著下降($P<0.05$)。对照组锦鲤肝细胞出现脂滴和空泡化现象。研究表明,在脱脂磷虾粉添加水平为20%的锦鲤饲料中,使用复合菌对磷虾粉进行发酵能有效提高磷虾粉的吸收和转化利用率。

关键词 发酵南极磷虾粉; 锦鲤; 生长; 体色; 血清生化指标; 基因表达

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)05-0080-10

锦鲤(*Cyprinus carpio* L.)是世界上最重要的观赏鱼类之一,体色鲜艳多姿,泳姿优美,有“水中活宝石”和“会游泳的艺术品”之称,丰满的体态和艳丽的体色是决定锦鲤观赏价值和经济价值的主要因素。

锦鲤自身并不能合成类胡萝卜素,其主要依靠摄取食物中的类胡萝卜素转化为虾青素,或者直接投喂含有虾青素的着色饲料,从而达到增色的目的,投喂着色饲料是最直接有效改善观赏鱼体色的途径(孙刘娟等,

* 广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队”建设专项(2021KJ150)、广州市科技计划项目(202201010211)、广东省淡水水产种质资源库运行项目(2022-SBH-00-001)和国家淡水水产种质资源库(FGRC18537)共同资助。付豪, E-mail: 1006937978@qq.com

① 通信作者: 宋红梅, 副研究员, E-mail: shm1227@126.com

收稿日期: 2023-02-25, 收修改稿日期: 2023-05-22

2016), 所以开发锦鲤饲料要兼顾营养和体色的需求。

鱼粉是水产饲料中重要的蛋白源, 近年来随着水产养殖业的发展以及全球鱼粉产量的减少, 鱼粉价格持续攀升, 寻找新型优质蛋白源替代鱼粉成为研究热点。植物蛋白原料替代鱼粉是研究突破口之一, 目前已见大豆蛋白、菜籽蛋白、花生蛋白和玉米蛋白等在水产动物中的研究, 但是植物蛋白原料普遍存在适口性差、消化率低和含有抗营养因子等缺点, 导致饲料利用率低、资源浪费(彭凯等, 2022)。南极磷虾(*Euphausia superba*)资源储备量巨大且营养丰富, 南极磷虾粉(以下简称磷虾粉)是由南极磷虾干燥加工而成的一种优质蛋白源, 富含虾青素、磷脂和不饱和脂肪酸, 适口性强且不含抗营养因子, 在水产饲料领域应用前景广阔(李福后等, 2023)。本课题组前期研究证实了磷虾粉替代部分鱼粉可提高锦鲤的生长性能、改善体色、优化血清生化指标, 推荐在鱼粉含量为 500 g/kg 的锦鲤饲料中添加 20% 的脱脂磷虾粉(梁艺馨等, 2021)。脱脂磷虾粉是提取磷虾油后的产物, 包括磷虾的肌肉和外骨骼成分, 含有较多的几丁质和氟, 过量摄入会对鱼体产生不利影响(Kousoulaki *et al.*, 2013), 如何进一步提高磷虾粉在水产饲料中的高效利用值得深入探索。

微生物发酵工艺可以将大分子蛋白质转化为更容易吸收的小分子蛋白多肽和氨基酸等, 还能产生有机酸和风味物质, 提高适口性和营养价值, 有机酸可以激活消化酶, 提高饲料的利用率, 有益菌在肠道内的定植可以维持宿主肠道菌群稳定, 抵御病原微生物, 保护肠道健康, 此外, 微生物发酵还可以提高磷虾粉的抗氧化活性(李雪萍等, 2022; 丁亚伟等, 2022)。目前, 饲料发酵中常用的益生菌有乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)、芽孢杆菌(*Bacillus*)和酵母菌(*Saccharomyces*), 相较单一菌种, 复合菌种可以实现多菌种间的互补从而弥补单一菌种的不足, 实用性更强(闫星月等, 2022)。本研究拟使用粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)以及三者复合菌(1:1:1)对磷虾粉进行发酵, 比较益生菌发酵的磷虾粉与未发酵磷虾粉、不同益生菌发酵磷虾粉、单一和复合益生菌发酵磷虾粉对锦鲤的生长、体色、血清生化指标以及相关基因表达的影响, 以期磷虾粉在锦鲤饲料中更加科学高效地利用提供参考依据。

1 材料与方法

益生菌菌粉由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心提供, 粪肠球菌活菌数 $\geq 10^8$ CFU/g、植物乳杆菌

活菌数 $\geq 10^8$ CFU/g、丁酸梭菌活菌数 $\geq 10^8$ CFU/g、复合菌活菌数 $\geq 10^8$ CFU/g。

1.1 发酵南极磷虾粉制备

以脱脂南极磷虾粉为发酵底物, 将益生菌粉溶于 1 L 温水中, 并将益生菌粉 2 倍质量的葡萄糖加入发酵液中混匀, 将稀释好的菌液加入到发酵底物中搅拌, 磷虾粉含水量为 30%, 之后, 将混合好的磷虾粉密封, 发酵温度为 30 °C, 发酵时间为 14 d, 开封后在室温放置 14 d 后保存备用。对照组、粪肠球菌组、植物乳杆菌组、丁酸梭菌组和复合菌组, 分别记为 ES、EF、LP、CB 和 MIX。发酵前后的南极磷虾粉营养水平见表 1。

表 1 发酵前后南极磷虾粉营养水平
Tab.1 Nutrient levels of Antarctic krill meal before and after fermentation/%

项目 Items	组别 Groups				
	ES	EF	LP	CB	MIX
粗蛋白质 Crude protein	59.05	61.80	62.92	60.57	61.98
粗脂肪 Crude lipid	12.38	12.45	12.85	13.66	12.97
粗灰分 Ash	17.12	16.33	16.45	17.26	17.48
粗纤维 Crude fiber	6.23	6.07	6.11	5.98	5.76

1.2 实验饲料

以鱼粉、小麦粉和豆粕为主要蛋白源(购自广州市某饲料公司), 大豆油为主要脂肪源配制基础饲料, 原料组成及营养成分见表 2。所有原料粉碎过 80 目筛, 根据饲料配方, 采用逐级扩大法混匀后, 加入大豆油及适量蒸馏水再次混合均匀, 经螺旋挤压机加工成直径为 2.5 mm 的硬颗粒饲料, 自然风干后置于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.3 实验鱼与养殖管理

养殖实验在中国水产科学研究院珠江水产研究所观赏鱼基地内进行。正式养殖实验开始前, 将锦鲤放置于 5.0 m×2.0 m×1.5 m 的水泥池中暂养 14 d, 暂养期间投喂基础饲料。暂养结束后, 选取平均体质量为(4.92±0.22) g、健康活泼的锦鲤 450 尾, 将实验鱼随机分为 5 组, 每组 3 个重复, 每个重复 30 尾鱼, 分别养殖在 15 个 100 cm×60 cm×30 cm 的水族缸中。实验期间, 每日饱食投喂 2 次(08:00 和 14:00), 水温为(27±1) °C, pH 为 7.6~7.8, 溶解氧含量 ≥ 7 mg/L, 每周换曝气水 3 次, 换水量为全部水量的 1/3, 养殖周期为 70 d, 保持不间断充气。

1.4 样品采集

养殖实验开始前和结束后, 实验鱼均禁食 24 h,

表2 实验饲料组成及营养水平(风干基础, g/kg)
Tab.2 Composition and nutrient levels of experimental diets (air-dry basis, g/kg)

原料 Ingredients	组别 Groups				
	ES	EF	LP	CB	MIX
鱼粉 Fish meal	300	300	300	300	300
豆粕 Soybean meal	159	159	159	159	159
小麦粉 Wheat flour	220	220	220	220	220
豆油 Soybean oil	50	50	50	50	50
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	20	20	20	20	20
腐殖酸钠 Sodium humate	5	5	5	5	5
螺旋藻 Spirulina	20	20	20	20	20
氯化胆碱 Choline chloride	4	4	4	4	4
维生素预混料 Vitamin premix ¹	10	10	10	10	10
矿物质预混料 Mineral premix ²	10	10	10	10	10
虾青素 Astaxanthin	1	1	1	1	1
抗氧化剂 Antioxidant	1	1	1	1	1
脱脂磷虾粉 Defatted krill meal	200	200	200	200	200
合计 Total	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
营养水平 Nutrient levels/%					
粗蛋白质 Crude protein	46.86	48.95	47.09	47.31	49.36
粗脂肪 Crude lipid	6.58	6.61	6.73	6.57	6.50
粗灰分 Ash	8.54	8.54	8.51	8.61	8.59

注: 1. 维生素预混料每 500 g 提供: 维生素 A 1 100 000 IU, 维生素 D₃ 320 000 IU, 烟酸 7.8 g, 维生素 E 2.5 g, 维生素 B₁ 1 g, 生物素 8 mg, 维生素 B₂ 2 g, 维生素 B₆ 1 g, 叶酸 400 mg, 维生素 B₁₂ 125 mg, 维生素 C 18 g, 木聚糖酶 1 g, 钾 1.1%, 食盐 4.5%, 蛋氨酸 400 mg, 水分 ≤ 10%; 2. 矿物质预混料每千克提供磷 40 g, 铁 7 g, 铜 200 mg, 锌 3 g, 锰 2 g, 镁 25 g, 碘 30 mg, 钴 10 g, 硒 10 mg, 载体为沸石粉。

Note: 1. The vitamin premix provided the following per 500 g of the diet: Vitamin A 1 100 000 IU, vitamin D₃ 320 000 IU, nicotinic acid 7.8 g, vitamin E 2.5 g, vitamin B₁ 1 g, biotin 8 mg, vitamin B₂ 2 g, vitamin B₆ 1 g, folic acid 400 mg, vitamin B₁₂ 125 mg, vitamin C 18 g, xylanase 1 g, K 1.1%, NaCl 4.5%, methionine 400 mg, moisture ≤ 10%. 2. Contained the following per kg of mineral premix: P 40 g, Fe 7 g, Cu 200 mg, Zn 3 g, Mn 2 g, Mg 25 g, I 30 mg, Co 10 g, Se 10 mg, the carrier was zeolite meal.

测量体长和体重, 并于实验的第 1、35、70 天在每个重复组随机取 6 尾鱼, 使用色差计测量实验鱼背鳍下方及侧线上方之间的体表红色区域的色度值, 实验期间持续记录死亡数量。养殖实验结束后, 每个重复组随机取 6 尾鱼放入浓度为 120 mg/L 的 MS-222 溶液中进行麻醉, 使用一次性无菌注射器从尾静脉取血, 4 °C 静置 6 h 后离心(4 000 r/min, 15 min, 4 °C), 取上清液, -80 °C 保存用于血清生化指标的测定; 之后, 分别取约 0.05 g 鳞片和皮肤用于类胡萝卜素含量的测定; 解剖取肝脏与内脏团称重用于测定肝体比和脏体比。每个重复随机取 2 尾鱼, 取其鳞片和皮肤少许置于 RNAlater 溶液中, 保存于 -80 °C, 后续用于 RNA 提取, 另取肝脏组织少许, 放入有 4% 多聚甲醛的离心管内, 用于切片制备, 常温保存。

1.5 指标测定

1.5.1 生长性能测定 根据下列公式, 计算实验鱼特定生长率、增重率、成活率、肥满度、肝体比和

脏体比, 计算公式如下:

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

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

成活率(survival rate, SR, %)= $100 \times$ 成活尾数/总尾数;

肥满度(condition factor, CF)= $100 \times W_t / L^3$;

肝体比(hepatosomatic ratio, HSI, %)= $100 \times$ 肝脏总重(g)/实验鱼体重(g);

脏体比(viscerosomatic ratio, VSI, %)= $100 \times$ 内脏团重(g)/实验鱼体重(g)。

式中, W_0 为实验鱼初始体质量(g), W_t 为实验鱼终末体质量(g), t 为实验天数(d), L 为实验鱼的体长(cm)。

1.5.2 色度值的测定 采用国际照明委员会 CIE 规定的 L^* 、 a^* 、 b^* 表示体色状态, L^* (luminance, 表示亮度)、 a^* (redness, $+a^*$ 表示偏红色, $-a^*$ 表示偏绿色)、 b^* (yellowness, $+b^*$ 表示偏黄色, $-b^*$ 表示偏

蓝色)(崔培等, 2011)。每个重复组随机取 6 尾鱼, 使用 CR-400 型彩色色差计(柯尼卡-美能达, 日本)测定实验鱼体表的 L^* 、 a^* 和 b^* 值, 使用前用白板校准, 用吸水纸吸干鱼体表面的水分, 再将色差计的探头紧贴鱼体背鳍下方及侧线上方的红色区域, 扫描并记录读数。

1.5.3 类胡萝卜素含量的测定 类胡萝卜素的提取和测定方法参考崔培等(2011)的方法, 计算公式如下: $S=(A \times K \times V)/(E \times G)$

式中, S 为类胡萝卜素含量(mg/kg); A 为吸光度值; K 为常数(10 000); V 为提取液体积(mL); E 为吸光系数(2 500); G 为样品质量(g)。

1.5.4 血清生化指标测定 血清甘油三酯(triglyceride, TG)和总胆固醇(total cholesterol, TC)含量、谷草转氨酶(glutamic oxaloacetic transaminase, AST)和谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, ALT)活性、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的测定均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

1.5.5 肝脏切片制备与观察 肝脏组织样品经 4% 多聚甲醛固定后, 进行脱水、透明、浸蜡、包埋, 组织切片(厚度为 5 μ m), HE 染色, 中性树胶封片等步骤后, 置于光学显微镜下观察并拍照。

1.5.6 基因表达 总 RNA 提取及反转录: 鳞片和皮肤样品 RNA 的提取均参照 Omega 试剂盒说明书进行, 琼脂糖凝胶电泳及核酸蛋白仪鉴定 RNA 完整性和纯度, 反转录使用艾科瑞生物公司生产的 Evo M-MLV 反转录试剂盒进行, 获得的 cDNA 样品置于 -20°C 保存, 用于 PCR 扩增。

实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)检测酪氨酸酶

(tyrosinase, *tyr*)基因的相对表达量, 根据 GenBank 中现有的锦鲤基因保守序列, 使用 Primer Premier 5 软件设计引物(表 3), 所有引物由广州艾基生物技术有限公司合成。取各组 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 扩增, 以 β -actin 内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因相对表达量。

表 3 实时荧光定量 PCR 引物序列
Tab.3 Primer sequences of real-time fluorescence quantification PCR

引物 Primers	引物序列(5'~3') Primer sequences (5'~3')
β -actin-F	TGCAAAGCCGATTCGCTGG
β -actin-R	AGTTGGTGACAATACCGTGC
<i>tyr</i> -F	GCCCGTCCTCGGTGTTCTCC
<i>tyr</i> -R	GGTTTGGGTCGTGGTTTCCT

1.6 数据处理与分析

实验数据用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示, 使用 SPSS Statistics 21.0 软件对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 若差异显著, 则采用 Tukey 进行多重比较, 显著性水平为 0.05。

2 结果

2.1 发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤生长性能的影响

从表 4 可知, 与对照组相比, 各实验组的终末体质量、特定生长率和增重率显著提高($P<0.05$), 其中, MIX 组的终末体质量、特定生长率和增重率显著高于 EF、LP 和 CB 组($P<0.05$); 各组存活率无显著差异($P>0.05$), 实验组锦鲤肥满度、肝体比和脏体比高于对照组, 未达到显著差异($P>0.05$)。

表 4 发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤生长性能的影响

Tab.4 Effects of replacing fish meal with fermented Antarctic krill meal on growth performance of koi carp

项目 Items	组别 Groups				
	ES	EF	LP	CB	MIX
初始体质量 IBW/g	4.33 \pm 0.22	4.90 \pm 0.28	5.01 \pm 0.19	4.88 \pm 0.13	4.92 \pm 0.28
终末体质量 FBW/g	49.56 \pm 1.79 ^c	57.47 \pm 1.48 ^b	58.20 \pm 1.50 ^b	59.67 \pm 1.52 ^b	63.15 \pm 1.85 ^a
特定生长率 SGR/(%d)	2.43 \pm 0.14 ^c	2.85 \pm 0.20 ^b	2.83 \pm 0.18 ^b	2.90 \pm 0.24 ^b	3.14 \pm 0.15 ^a
增重率 WGR/%	341.25 \pm 1.25 ^c	384.65 \pm 1.24 ^b	377.7 \pm 1.79 ^b	385.56 \pm 1.45 ^b	398.75 \pm 1.58 ^a
成活率 SR/%	98.23 \pm 1.04	97.26 \pm 1.07	98.87 \pm 1.16	97.56 \pm 1.84	98.75 \pm 2.01
肥满度 CF	1.49 \pm 0.05	1.60 \pm 0.02	1.52 \pm 0.03	1.64 \pm 0.04	1.61 \pm 0.03
肝体比 HSI/%	1.16 \pm 0.03	1.20 \pm 0.04	1.24 \pm 0.02	1.22 \pm 0.03	1.21 \pm 0.03
脏体比 VSI/%	5.86 \pm 0.09	6.17 \pm 0.14	5.93 \pm 0.19	6.02 \pm 0.12	6.04 \pm 0.08

注: 同行数据肩标字母不同表示差异显著($P<0.05$), 字母相同或无字母表示差异不显著($P>0.05$)。下表同。

Note: Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$), values in the same row with the same or no superscripts are not significantly different ($P>0.05$). The same below.

2.2 发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤体色的影响

由表 5 可以看出,第 1 天时,各组间 L^* 、 a^* 和 b^* 值无显著差异($P>0.05$);第 35 天时,各组间 L^* 值无显著差异($P>0.05$),实验组 a^* 值和 b^* 值显著高于对照组($P<0.05$),各实验组间无显著差异($P>0.05$);第 70 天时,各组间 L^* 值无显著差异($P>0.05$),实验组

a^* 值和 b^* 值均显著高于对照组($P<0.05$),其中, MIX 组的 a^* 值和 b^* 值显著高于其他组($P<0.05$)。

由图 1 可知,实验组锦鲤皮肤和鳞片的类胡萝卜素含量均显著高于对照组($P<0.05$),MIX 组锦鲤皮肤和鳞片的类胡萝卜素含量均显著高于其他组($P<0.05$),除 MIX 组外,各实验组间无显著差异($P>0.05$)。

表 5 发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤体表 L^* 、 a^* 和 b^* 的影响

Tab.5 Effects of replacing fish meal with Antarctic krill meal on L^* , a^* , and b^* values of koi carp

体色参数 Body color indexes	养殖时间 Culture time/d	组别 Groups				
		ES	EF	LP	CB	MIX
L^*	1	56.11±1.06	58.77±0.90	54.08±1.08	60.59±0.64	56.97±0.96
	35	50.05±1.02	47.95±0.91	51.88±1.73	48.65±1.02	51.35±1.59
	70	54.05±1.39	50.34±1.22	52.22±1.09	51.43±1.43	53.13±1.68
a^*	1	16.91±0.79	15.31±0.92	17.04±0.56	17.84±0.67	18.87±0.76
	35	17.54±0.73 ^b	17.83±0.71 ^b	18.84±0.98 ^b	18.75±1.03 ^b	20.39±0.72 ^a
	70	21.72±1.04 ^c	25.63±1.82 ^b	25.43±1.80 ^b	24.67±1.36 ^b	28.69±1.05 ^a
b^*	1	32.44±1.27	33.70±1.75	35.74±1.68	33.58±1.58	34.55±1.27
	35	35.88±1.65 ^b	38.64±1.95 ^a	39.12±1.95 ^a	37.04±1.94 ^a	39.58±1.29 ^a
	70	39.59±1.29 ^c	46.91±1.64 ^b	46.59±1.54 ^b	47.11±1.30 ^b	49.95±1.44 ^a

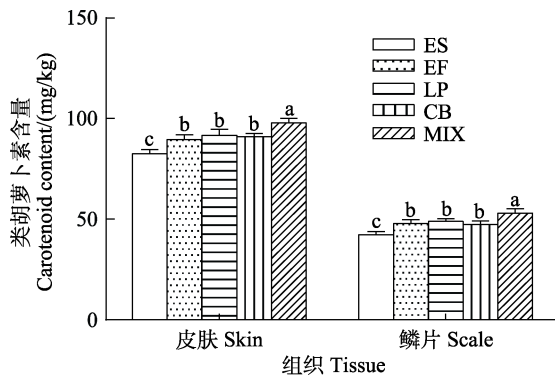


图 1 发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤皮肤和鳞片类胡萝卜素含量的影响

Fig.1 Effects of replacing fish meal with Antarctic krill meal on carotenoid content in skin and scale of koi carp

2.3 发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤血清生化指标的影响

由表 6 可知,相比对照组,实验组血清 TG 和 TC 含量显著提高($P<0.05$);血清 AST/ALT 比值显著降低($P<0.05$);血清 MDA 含量显著降低($P<0.05$)。以上指标各实验组间均无显著差异($P>0.05$)。

2.4 发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤肝脏组织的影响

由图 2 的肝脏切片可见,各组肝脏组织肝小叶轮廓清晰,肝细胞排列整齐,对照组锦鲤部分肝细胞胞浆内出现脂滴,细胞核被脂滴挤压,导致细胞核偏移,部分肝细胞的细胞核已消失,呈现出空泡化状态,但肝细胞轮廓结构仍然完整。

表 6 发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤血清生化指标的影响

Tab.6 Effects of replacing fish meal with Antarctic krill meal on serum biochemical indexes of koi carp

血清生化指标 Serum biochemical indexes	组别 Groups				
	ES	EF	LP	CB	MIX
甘油三酯 TG/(mmol/L)	3.45±0.19 ^b	4.03±0.24 ^a	4.10±0.16 ^a	4.15±0.14 ^a	4.56±0.09 ^a
总胆固醇 TC/(mmol/L)	0.90±0.03 ^b	1.75±0.07 ^a	1.68±0.04 ^a	1.77±0.05 ^a	1.73±0.04 ^a
谷草转氨酶/谷丙转氨酶 AST/ALT	6.25±0.34 ^a	2.05±0.28 ^b	2.06±0.22 ^b	2.84±0.3 ^b	2.38±0.36 ^b
丙二醛 MDA/(mmol/mL)	6.03±0.22 ^a	5.48±0.88 ^b	5.07±0.71 ^b	5.11±0.34 ^b	4.97±0.22 ^b

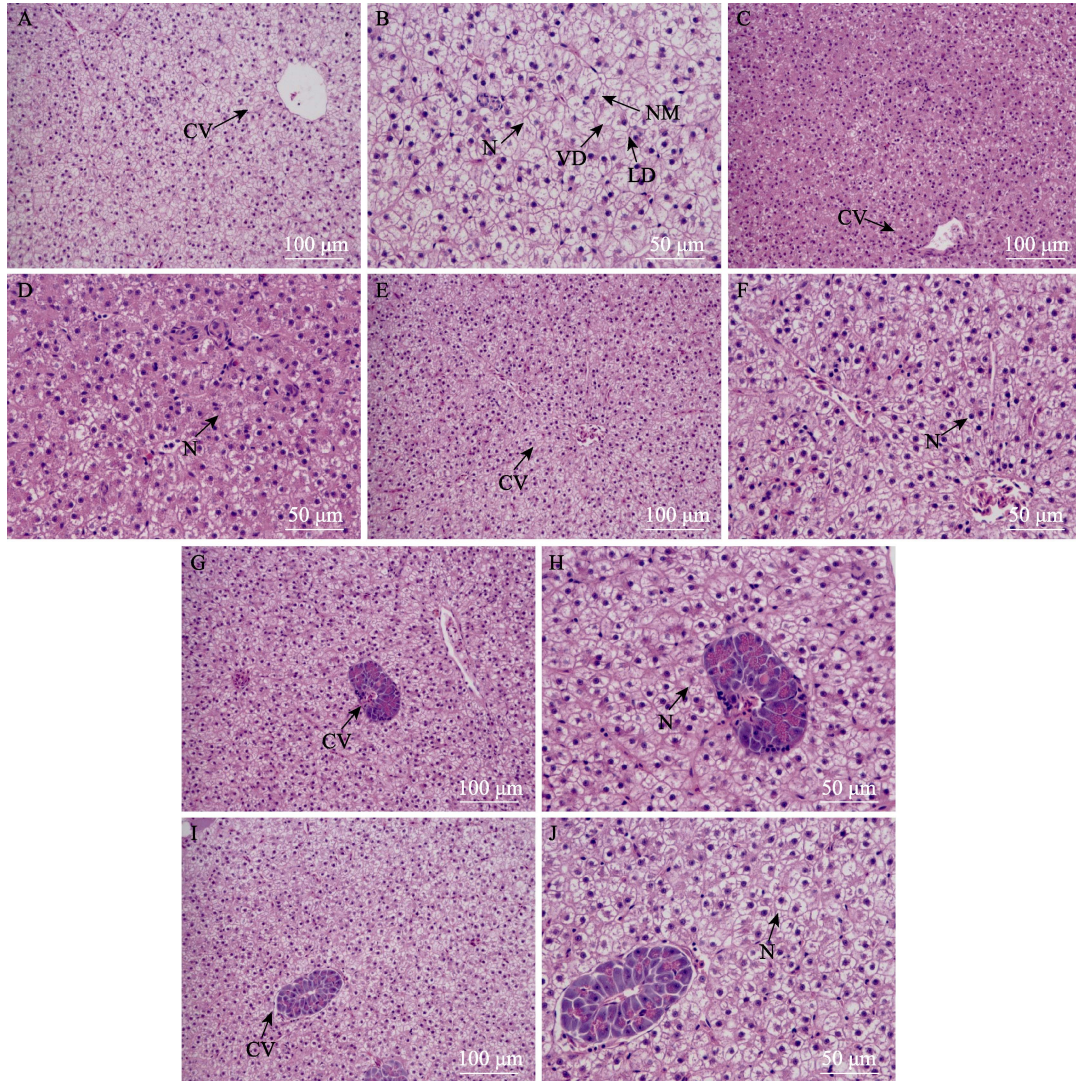


图 2 发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤肝脏组织的影响

Fig.2 Effects of replacing fish meal with Antarctic krill meal on liver tissue of koi carp

A、B: ES 组; C、D: EF 组; E、F: LP 组; G、H: CB 组; I、J: MIX 组;
CV: 中央静脉; N: 细胞核; NM: 细胞核偏移; VD: 空泡变性; LD: 脂滴。

A, B: ES group; C, D: EF group; E, F: LP group; G, H: CB group; I, J: MIX group; CV: Central veins; N: Nucleus; NM: Nucleus migration; VD: Vacuolar degeneration; LD: Lipid droplets.

2.5 发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤相关基因表达量的影响

由图 3 可以看出, 与对照组相比, *tyr* 在实验组锦鲤皮肤和鳞片中的相对表达量显著提高($P < 0.05$), 其中 MIX 组相对表达量显著高于其他组($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 益生菌发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤生长性能的影响

本研究中, 实验组锦鲤的终末体质量、特定生长

率、增重率相比对照组显著提高, 该结果与云龙石斑鱼(*Epinephelus moara*♀ × *E. lanceolatus*♂)(李忠琴等, 2022)、吉富罗非鱼(GIFT *O. niloticus*)(黄旺等, 2017)和黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)(王海瑞等, 2022)的研究结果一致。发酵工艺可以降解大分子营养物质, 便于吸收; 发酵过程产生的有机酸和风味物质可以抑制饲料中有害菌的滋生、增加饲料的适口性; 益生菌进入肠道内定植有助于维护肠道菌群稳定、保护肠道健康, 益生菌同时也能产生维生素、氨基酸和促生长因子等, 益生菌自身具有的蛋白质和矿物质等对机体生长都有促进作用(暴宁, 2017)。肥满度、肝体比和脏体比是重要的鱼类形体指标参数, 肥满度指标常用

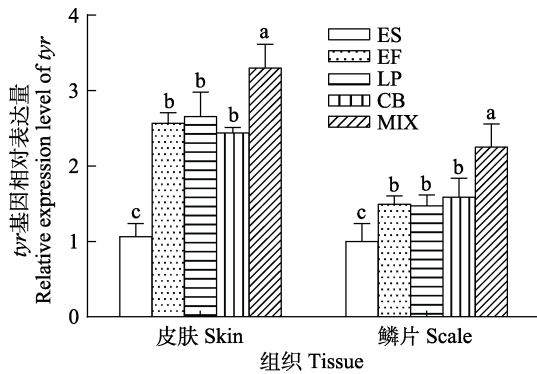


图3 发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤皮肤和鳞片中的 *tyr* 相对表达量的影响

Fig.3 Effects of replacing fish meal with Antarctic krill meal on the relative expression level of *tyr* in the skin and scales of koi carp

来表示鱼类生长情况和质量优劣,各实验组肥满度均高于对照组,表明实验组锦鲤生长状况更好(李正民, 2022)。

3.2 益生菌发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤体色的影响

鱼类摄取食物中的类胡萝卜素吸收沉淀转化,最终合成虾青素,可以直接贮存在鱼体中,虾青素具有较强的色素沉积能力,从而使鱼类的皮肤和鳞片等组织呈现出鲜艳健康的颜色(王月等, 2015)。相较于其他类胡萝卜素,虾青素更容易被吸收和沉积,磷虾粉中含有丰富的虾青素,发酵工艺可以激发虾青素的活性,提高虾青素的利用率(王裕玉等, 2021)。在衡量锦鲤体色的色度值中, L^* 值代表物体表面颜色的鲜亮程度, a^* 值和 b^* 值分别表示红色和黄色的量化程度。本研究中,实验组锦鲤皮肤 a^* 值和 b^* 值以及皮肤鳞片中的类胡萝卜素的含量均显著提高,表明益生菌发酵磷虾粉比普通磷虾粉对锦鲤体色的提升作用更强。目前关于益生菌发酵饲料对水产动物体色的研究较少,使用酵母菌和芽孢杆菌发酵饲料投喂草金鱼 (*Carassius auratus red var*) 后,草金鱼的 L^* 和 a^* 以及鳍条中类胡萝卜素含量均显著提高(葛玲瑞等, 2021),表明益生菌发酵饲料可以改善草金鱼的体色。

鱼类色素细胞由神经嵴细胞分化形成,大量基因参与神经嵴细胞向色素细胞的迁移与分化。*tyr* 是黑色素合成通路中的关键基因,在锦鲤体色发育各个阶段均存在,其表达量影响黑色素生成的速度和种类,在各组织中均有表达(田雪等, 2017)。研究发现, *tyr* 在橘色双冠丽鱼 (*Amphilophus citrinellus*) 胚胎发育的整个阶段都有表达,且在黑色素细胞形成的初始时期表达量迅速增至最高(蒋燕玲, 2016)。王巍等(2012)

在锦鲤的研究中发现, *tyr* 基因在眼睛和黑色皮肤中表达量最高,其次是大脑、红色皮肤和黄色皮肤,表达量最低的是肝脏和心脏。本研究结果显示, *tyr* 在皮肤中的表达量高于鳞片中,且实验组表达量均显著高于对照组。在本研究中,单一和复合益生菌发酵磷虾粉均对锦鲤的体色起到一定的改善作用,其中复合菌效果最好。

3.3 益生菌发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤血清生化指标的影响

血清生化指标与鱼体代谢、健康和疾病密切相关,因此常用来衡量鱼体健康和营养状况。ALT 和 AST 分别存在于肝脏细胞和肝脏线粒体中,在肝脏健康的状态下这 2 种酶的活性很低,当肝脏组织受损时,细胞膜通透性发生变化,ALT 和 AST 就会进入到血液,从而导致血清中酶活性提高(何娇娇等, 2017),所以, ALT/AST 升高暗示着肝脏受损,对照组血清 ALT/AST 比值显著高于实验组,表明对照组锦鲤肝脏细胞出现了一定程度的损伤,本课题组在前期实验中也得到了相同的结论。TG 和 TC 均与脂质代谢有关,血液是维持脂质在机体内正常运转的主要途径, TG 和 TC 是血脂的主要组成部分,其含量与鱼体脂质代谢能力成正比(李宜芳等, 2022),胆固醇主要在肝脏中形成,当肝脏受损时,血清中 TG 和 TC 含量会减少(逯冠政等, 2022),本研究中,对照组 TG 和 TC 含量显著低于实验组,表明对照组锦鲤肝脏可能出现了损伤,脂质代谢率下降,而对对照组锦鲤肝脏切片也证实了肝脏损伤的存在。

鱼类在日常的生理活动中会产生氧自由基,正常情况下,氧自由基处于稳定状态,如果产生过多则对机体造成损伤,抗氧化酶可以清除过多氧自由基,抵御氧化给机体带来的损伤(孙全贵等, 2016)。MDA 则是脂质过氧化的产物,可以用来判断细胞受损的程度(何娇娇等, 2017)。本研究实验组锦鲤血清 MDA 含量显著下降,说明益生菌发酵的磷虾粉替代鱼粉对锦鲤抗氧化能力有所提高。磷虾粉中丰富的虾青素具有较强的抗氧化能力,配合发酵工艺使虾青素释放出更多活性物质,进一步增强抗氧化能力(李雪萍等, 2022)。

3.4 益生菌发酵南极磷虾粉替代鱼粉对锦鲤肝脏组织的影响

肝脏是鱼类重要的消化代谢器官,还兼有解毒和免疫等多重功能,其显微结构可以直观的反映肝脏的健康状况(谭晓晨等, 2021)。本研究中,对照组锦鲤肝脏出现少量脂滴以及部分肝细胞空泡变性,推测原

因是对照组锦鲤脂质代谢能力不足, 导致肝脏中脂肪积累, 肝脏的生理机能下降, 脂蛋白合成减少, 肝脏内多余的脂肪不能及时运出, 肝脏的脂肪含量升高从而导致肝脏受损。此外, 脱脂磷虾粉中包括磷虾的肌肉和外骨骼, 其中氟和几丁质的含量较高, 长期摄食后在鱼体积累导致肝损伤, 使用磷虾粉梯度替代鱼粉喂养圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)对其肝脏无不良影响(严俊丽等, 2016), 研究结果的差异可能和鱼的种类有关。实验组锦鲤肝脏尚未发现上述情况, 可能是受到益生菌以及发酵工艺的双重影响, 从而提高了肝脏的脂质代谢能力, 肝脏脂肪压力减小, 生理机能正常运转。

4 结论

本研究表明, 使用单一和复合益生菌发酵磷虾粉均能提高锦鲤的生长性能, 改善体色, 优化血清生化指标, 提高抗氧化能力, 保护肝脏健康。与对照组相比, 锦鲤皮肤和鳞片中的 *tyr* 相对表达量显著提高。3 个单一益生菌组之间各项指标无显著性差异, 复合菌组锦鲤的生长性能和体色最佳。综上所述, 在脱脂南极磷虾粉添加水平为 20% 的锦鲤配合饲料中, 建议使用复合菌发酵磷虾粉。

参 考 文 献

- BAO N. Characteristics of growth, immune of juvenile turbot fed multiple probiotic. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2017 [暴宁. 复合益生菌对大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 生长、免疫等指标的影响. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- CUI P, JIANG Z Q, HAN Y Z, *et al.* Effects of dietary lipid levels on body pigmentation, growth, partial physiological and biochemical indexes of ornamental carp (*Cyprinus carpio* L). Journal of Tianjin Agricultural University, 2011, 18(2): 23–31 [崔培, 姜志强, 韩雨哲, 等. 饲料脂肪水平对红白锦鲤体色、生长及部分生理生化指标的影响. 天津农学院学报, 2011, 18(2): 23–31]
- DING Y W, LIU Y, XU Y H, *et al.* Quality evaluation and antimicrobial activity analysis of full corn-soybean meal feed fermented with compound probiotics. Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2022, 43(11): 19–24 [丁亚伟, 刘月, 徐艳辉, 等. 复合益生菌发酵玉米-豆粕型饲料的品质评价及抑菌性能研究. 家畜生态学报, 2022, 43(11): 19–24]
- GE L R, AN J G, LIU K J, *et al.* Effect of yeast and *Bacillus* fermentation feed on body color, digestion and intestinal flora composition of grass goldfish (*Carassius auratus* red var). Feed Research, 2021, 44(9): 66–70 [葛玲瑞, 安建国, 刘科均, 等. 酵母菌和芽孢杆菌发酵饲料对草金鱼体色、消化及肠道菌群组成的影响. 饲料研究, 2021, 44(9): 66–70]
- HE J J, WANG P, FENG J, *et al.* Effects of replacing fish meal with corn gluten meal on growth, serum biochemical indices and liver histology of large yellow croaker *Larimichthys crocea*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 41(3): 506–515 [何娇娇, 王萍, 冯建, 等. 玉米蛋白粉替代鱼粉对大黄鱼生长、血清生化指标及肝脏组织学的影响. 水生生物学报, 2017, 41(3): 506–515]
- HUANG W, LI H Q, LUO L, *et al.* Effects of *Enterococcus faecalis* on growth performance, body composition, blood physiological and biochemical indexes and digestive enzyme of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Fisheries of China, 2017, 41(11): 1756–1765 [黄旺, 李洪琴, 罗莉, 等. 粪肠球菌对吉富罗非鱼的生长、体组成、消化酶活性及血液生理生化指标的影响. 水产学报, 2017, 41(11): 1756–1765]
- JIANG Y L. Body color variation and cloning, expression analysis of *TYR* gene in *Amphilophus citrinellus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [蒋燕玲. 橘色双冠丽鱼体色发育变化及体色相关基因 *TYR* 的克隆与表达研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- KOUSOULAKI K, RØNNESTAD I, OLSEN H J, *et al.* Krill hydrolysate free amino acids responsible for feed intake stimulation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture Nutrition, 2013, 19(SI): 47–61
- LI F H, HUANG Y L, LIU X F, *et al.* Optimization of a nanofiltration desalination process for Antarctic krill peptides using orthogonal tests. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(1): 228–235 [李福后, 黄岳磊, 刘小芳, 等. 正交实验优化南极磷虾蛋白肽的纳滤脱盐工艺. 渔业科学进展, 2023, 44(1): 228–235]
- LI X P, LIU Z D, NING X B. Study on the fermentation and *in vitro* digestion and antioxidant properties of Antarctic krill shrimp meal. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2022, 37(2): 249–256 [李雪萍, 刘志东, 宁喜斌. 南极磷虾粉的发酵及体外消化抗氧化特性研究. 云南农业大学学报(自然科学), 2022, 37(2): 249–256]
- LI Y F, CHEN T, HU Y, *et al.* Effects of adding sanguinarine in low protein diet on growth performance, serum biochemical indices and intestinal health of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(11): 7332–7341 [李宜芳, 陈团, 胡毅, 等. 低蛋白质饲料中添加血根碱对草鱼生长性能、血清生化指标和肠道健康的影响. 动物营养学报, 2022, 34(11): 7332–7341]
- LI Z M. Effect of different feeding strategies on the growth and digestion of *Exopalaemon carinicauda*. Master's Thesis of Jiangsu Ocean University, 2022 [李正民. 不同投喂策略对脊尾白虾生长、消化的影响. 江苏海洋大学硕士研究生学位论文, 2022]
- LI Z Q, ZOU W Z, ZHANG G M, *et al.* Effects of *Lactobacillus*

- plantarum*-enriched diet on growth performance, antioxidant ability, and serum biochemical level of *Epinephelus Yunlong* grouper. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2022, 53(2): 457–465 [李忠琴, 邹文政, 张光明, 等. 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)对云龙石斑鱼生长、抗氧化性能及血清生化水平的影响. *海洋与湖沼*, 2022, 53(2): 457–465]
- LIANG Y X, WU G Q, YANG Y X, *et al.* Effects of whole fat or defatted Antarctic krill meal instead of fish meal on growth performance, body color and serum biochemical indexes of red-white koi carp (*Cyprinus carpio* var. koi). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(12): 6973–6981 [梁艺馨, 邬国强, 杨叶欣, 等. 全脂或脱脂南极磷虾粉替代鱼粉对红白锦鲤生长性能、体色和血清生化指标的影响. *动物营养学报*, 2021, 33(12): 6973–6981]
- LU G Z, YAO Z L, LAI Q F, *et al.* Growth performance, blood parameters, and texture characteristics of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to highly saline-alkaline water. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(4): 1–11 [逯冠政, 么宗利, 来琦芳, 等. 高盐碱环境下大口黑鲈幼鱼生长性能、血液生理指标与质构特征研究. *渔业科学进展*, 2022, 43(4): 1–11]
- PENG K, LUO J W, HUANG W. Research progress of plant protein ingredients replacing fish meal in aquatic feed. *Feed Research*, 2022, 45(15): 136–140 [彭凯, 罗锦伟, 黄文. 植物蛋白原料替代鱼粉在水产饲料中的研究进展. *饲料研究*, 2022, 45(15): 136–140]
- SUN L J, WU L Y, BAI D Q, *et al.* Effect of astaxanthin on parrot blood body color, growth and nonspecific immune indexes. *Journal of Northern Agriculture*, 2016, 44(1): 91–95 [孙刘娟, 吴李芸, 白东清, 等. 虾青素对血鹦鹉体色、生长和非特异性免疫指标的影响. *北方农业学报*, 2016, 44(1): 91–95]
- SUN Q G, LONG Z, ZHANG X D, *et al.* Novel progress in antioxidant system. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016(11): 2197–2200, 2190 [孙全贵, 龙子, 张晓迪, 等. 抗氧化系统研究新进展. *现代生物医学进展*, 2016(11): 2197–2200, 2190]
- TAN X C, MA Y Q, DONG S H, *et al.* Effect of Chinese herbal medicine compound preparations on growth performance and liver tissue of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Feed Research*, 2021, 44(17): 39–43 [谭晓晨, 麻艳群, 董升辉, 等. 中草药复方制剂对团头鲂生长性能及肝脏组织的影响. *饲料研究*, 2021, 44(17): 39–43]
- TIAN X, PANG X L, WANG L Y, *et al.* Expression of MITFa and TYR gene in body color formation in red color Koi carp *Cyprinus carpio* at different stages. *Fisheries Science*, 2017, 36(2): 197–201 [田雪, 庞小磊, 王良炎, 等. MITFa 及 TYR 基因在红色锦鲤体色发生不同阶段的表达分析. *水产科学*, 2017, 36(2): 197–201]
- WANG H R, MO W Y, ZHAO H X, *et al.* Effects of adding *Clostridium butyricum* in diets on growth performance, serum biochemical indices, immune function and antioxidant ability of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(8): 5295–5303 [王海瑞, 莫文艳, 赵红霞, 等. 饲料添加丁酸梭菌对黄颡鱼生长性能及血清生化指标、免疫功能和抗氧化能力的影响. *动物营养学报*, 2022, 34(8): 5295–5303]
- WANG W, HU H X, SUN X J, *et al.* Analysis of tyrosinase gene and tissue expression in five different strains of Koi carp (*Cyprinus carpio* Koi). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(11): 1658–1666 [王巍, 胡红霞, 孙向军, 等. 锦鲤酪氨酸酶基因序列分析及其在不同锦鲤品系不同组织中的表达. *水产学报*, 2012, 36(11): 1658–1666]
- WANG Y Y, ZHAO L, GUO X H, *et al.* Nutritional characteristics of Antarctic krill meal and its application in aquatic feed. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(12): 6601–6611 [王裕玉, 赵璐, 郭晓华, 等. 南极磷虾粉营养特性及其在水产饲料中的应用. *动物营养学报*, 2021, 33(12): 6601–6611]
- WANG Y, LI G J, HUANG Y, *et al.* Effects of defat Antarctic krill meal on growing performance and feed utilization of *Acanthopagrus schlegelii* though replacement fish meal by two plant based proteins. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2015, 36(4): 52–57 [王月, 李广经, 黄勇, 等. 植物蛋白替代鱼粉饲料中添加脱脂磷虾粉对黑鲷幼鱼生长及饲料利用的影响. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2015, 36(4): 52–57]
- YAN J L, CHEN S Q, CHANG Q, *et al.* Effects of Antarctic krill meal replacing fish meal on growth performance, serum and liver biochemical indices and serum non-specific immune indices of juvenile spotted halibut (*Verasper variegatus*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(11): 3503–3510 [严俊丽, 陈四清, 常青, 等. 南极磷虾粉替代鱼粉对圆斑星鲽幼鱼生长性能、血清和肝脏生化指标及血清非特异性免疫指标的影响. *动物营养学报*, 2016, 28(11): 3503–3510]
- YAN X Y, WANG Y, WANG Y, *et al.* Characteristics and application of agricultural by-products by microbial fermentation. *Farm Products Processing*, 2022(1): 62–67 [闫星月, 王艳, 王悦, 等. 微生物发酵农副产品特性及其应用研究. *农产品加工*, 2022(1): 62–67]

(编辑 马璀艳)

Effects of Fish Meal Replacement with Fermented Antarctic Krill Meal on Growth Performance, Body Color and Serum Biochemical Indexes of Koi Carp (*Cyprinus carpio* L.)

FU Hao^{1,2}, SONG Hongmei¹①, MU Xidong¹, TIAN Xue², LIU Chao¹, LIU Yi¹, YANG Yexin¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs;

Guangdong Modern Leisure Fishery Engineering Research Center, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract To investigate the effects of replacing fish meal with fermented Antarctic krill meal on growth performance, body color, and serum biochemical indexes of koi carp, 450 koi carp with an average body weight of (4.92±0.22) g were randomly divided into five groups with three replicates per group and 30 fish per replicate. In the control group, we added unfermented defatted Antarctic krill meal, and in the experimental groups, we added defatted Antarctic krill meal fermented by *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Clostridium butyricum*, and compound bacteria (1:1:1), which were termed as ES (control group), EF, LP, CB, and MIX, respectively. The addition amount of Antarctic krill meal in each group was 200 g/kg, and the experiment lasted for 70 days. The results showed the following: Compared with those in the control group, the replacement of fish meal with fermented Antarctic krill meal significantly improved final body weight (FBW), weight gain rate (WGR), and specific growth rate (SGR) ($P<0.05$); additionally, the FBW, WGR, and SGR of the MIX group were significantly higher than those in other groups ($P<0.05$). The carotenoid content in the skin and scales of the experimental group was significantly increased ($P<0.05$); the red (a^*) and yellow (b^*) value, and relative expression of *tyr* in the skin and scales were significantly increased ($P<0.05$); and the a^* and b^* values and the relative expression of the *tyr* gene in the MIX group were significantly higher than those in other groups ($P<0.05$). The contents of serum triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) in the experimental group were significantly increased ($P<0.05$), whereas the ratio of glutamic oxalate transaminase/alanine transaminase (AST/ALT) and the content of malondialdehyde (MDA) were significantly decreased ($P<0.05$). The liver cells of the control group showed lipid droplets and vacuolar degeneration. No significant difference was observed in each index among the EF, LP, and CB groups ($P>0.05$). Based on the above results, using complex bacteria to ferment krill meal in the koi carp feed is recommended with a 20% addition level of defatted krill meal, which can effectively improve the absorption and conversion utilization rate of krill meal.

Key words Fermented Antarctic krill meal; Koi carp; Growth; Body color; Serum biochemical indexes; Gene expression

① Corresponding author: SONG Hongmei, E-mail: shm1227@126.com