

doi: 10.7541/2019.135

饲料中发酵芝麻粕替代菜粕对草鱼生长性能、肠道形态和微生物及小肽转运相关基因表达的影响

宋 鹏^{1,2} 曹申平² 唐建洲^{1,2} 彭 亮² 罗文婕² 熊 鼎²
邓岳松³ 贺 喜¹ 刘 臻²

(1. 湖南农业大学动物科技学院, 长沙 410128; 2. 长沙学院生物与环境工程学院, 水生动物营养与品质调控湖南省重点实验室, 长沙 410022; 3. 唐人神集团股份有限公司, 株洲 412000)

摘要: 实验以初重(99.98±0.69) g的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)为研究对象, 研究饲料中发酵芝麻粕替代菜粕蛋白对草鱼生长性能、肠道形态和微生物以及小肽转运相关基因表达的影响。添加0%、5%、10%和15%发酵芝麻粕分别替代菜粕蛋白0%、11.8%、23.5%和35.1%, 配制4组等氮等脂的饲料, 分别为对照组、实验1组、实验2组和实验3组。实验在室内循环水养殖系统中进行, 每组3个重复, 每一重复饲喂20尾鱼, 每天饱食投喂2次, 实验共持续45d。结果发现: 各处理组间草鱼增重率、特定生长率和蛋白质效率均无显著差异, 实验1组和2组略高于对照组($P>0.05$); 组间饵料系数也无显著差异, 实验1组和2组略低于对照组($P>0.05$)。实验组草鱼肠绒毛高度均显著高于对照组($P<0.05$), 而实验组隐窝深度小于对照组 ($P>0.05$), 绒毛高度与隐窝深度的比值(V/C)在实验组也显著高于对照组($P<0.05$)。随着发酵芝麻粕替代比例的增加, 乳酸杆菌(*Lactobacillus*)和芽孢杆菌(*Bacillus*)占比显著上升($P<0.05$), 而大肠杆菌(*Escherichia coli*)和气单胞菌(*Aeromonas*)占比显著下降。小肽转运相关基因方面, 尾型同源盒基因2 (*CDX2*)、特异性蛋白1 (*Sp1*)和小肽转运蛋白1 (*PepT1*)基因mRNA相对表达量均随着发酵芝麻粕替代比例的增加呈现先显著上调后下调的趋势, 且均在实验1组时达到最大值($P<0.05$)。综合考量鱼体生长性能、肠道黏膜形态、菌群及小肽转运相关基因表达方面, 草鱼饲料中发酵芝麻粕蛋白适宜替代菜粕蛋白的比例为11.8%—23.5%。

关键词: 发酵芝麻粕; 草鱼; 蛋白替代; 生长性能; 肠道吸收

中图分类号: S965.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2019)06-1147-08

芝麻粕是指芝麻经压榨取油后的残粕, 再经粉碎所得的副产品。芝麻粕中主要成分为蛋白质, 粗蛋白质含量45%以上, 其所具有的几种主要必需氨基酸, 如蛋氨酸、胱氨酸、精氨酸以及色氨酸, 含量均高于菜粕和豆粕^[1]。然而, 芝麻粕中的赖氨酸含量较低, 而且还含有草酸、植酸及少量的单宁, 这些抗营养因子会阻碍或者破坏营养物质的消化利用, 并对动物健康和生长性能产生不良影响, 从而制约了芝麻粕在畜禽和水产中的应用^[1-3]。Yamauchi等^[4]研究发现, 饲喂蛋鸡(*Gallus gallus domesticus*)芝麻粕后, 能显著抑制其生长; Mamputu等^[5]同样发现蛋鸡在饲喂芝麻粕饲料后, 其饲料转化率和增重率均

低于对照组。微生物发酵是指在适宜的条件下, 利用微生物的代谢作用, 将原料中部分多糖、脂肪和蛋白质等大分子降解为有机酸、可溶性多肽等小分子的过程。微生物发酵法可以有效地减少芝麻粕中植酸等抗营养因子的含量, 同时对芝麻粕中营养物质破坏较小, 还能够提高其粗蛋白和小肽等有益成分的含量^[2, 5]。因此, 微生物发酵消除芝麻粕中抗营养因子对于其在畜禽和水产饲料中的应用前景尤为重要。

菜粕是油菜籽经压榨或浸提取油后的副产品, 具有蛋白质丰富、低廉易得等优点。如今, 菜粕已成为我国水产和畜禽养殖饲料中一种重要的蛋白源, 此外, 菜粕中氨基酸组成不平衡, 且具有硫代葡

收稿日期: 2018-10-24; 修订日期: 2019-05-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31772865)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31772865)]

作者简介: 宋鹏(1994—), 男, 湖南湘潭人; 硕士研究生; 研究方向为水产动物营养与饲料学。E-mail: 1329322327@qq.com

通信作者: 贺喜(1975—), 教授, 博士生导师, E-mail: hexi111@126.com; 刘臻(1975—), 教授, 博士生导师, E-mail: 25300085@qq.com

葡萄糖甙、芥酸和植酸等抗营养因子,严重制约了水产动物对其利用效率^[6]。随着我国养殖行业的快速发展,对于菜粕等蛋白资源的需求也与日俱增,菜粕资源也面临短缺,从而菜粕价格不断上涨^[1, 6]。因此,寻求菜粕的优质替代蛋白源也成为亟待解决的科学问题。

近年来,我国水产品的产量呈逐年递增趋势,其中草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的产量最高,2016年,我国草鱼产量达 5.8988×10^9 kg^[7]。草鱼,隶属鲤形目鲤科草鱼属,具有蛋白需求低、生长速度快、肉质鲜美等特点^[8]。本实验利用芽孢杆菌、酵母菌和乳酸杆菌协同发酵芝麻粕,研究其替代菜粕蛋白添加到饲料中对草鱼生长性能、肠道形态和微生物及尾型同源盒基因2 (Caudal-related homeobox 2, *CDX2*)、特异性蛋白1 (Specificity protein 1, *Sp1*)和小肽转运载体(Oligopeptide transporter 1, *PepT1*)三个小肽转运相关基因的影响,为发酵芝麻粕在鱼类饲料中的应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

本实验对照组饲料配方参照唐人神集团股份有限公司骆驼牌913饲料配方进行设计,实验用芝麻粕购买于河南正康粮油有限公司,发酵芝麻粕(粗蛋白质45.52%、水分9.36%、钙2.25%、总磷1.12%)的制备方法参照唐建洲CN107183356A发明专利^[9]。实验以5%、10%和15%发酵芝麻粕蛋白分别替代对照组饲料中11.8%、23.5%和35.1%的菜粕蛋白,共设计了四组等氮(28.5%)等脂(5%)的饲料。实验以豆油为主要脂肪源。具体饲料配方如表1所示。各实验原料经粉碎机粉碎后,过40目筛,以小型平模制粒机(陈氏机械厂,浙江新昌, KL-105A型, 2.5 mm)制成饲料颗粒,自然风干后存于-4℃冰箱备用。

1.2 养殖系统和养殖条件

实验在唐人神集团股份有限公司古大桥实验基地(湖南,株洲)室内循环水养殖系统中进行。循环水以6 L/min的速度进入每缸(体积400 L/缸)。在非投喂期间使用充气头连续充气增氧。采用节能灯作为光源,每天光照12h (8:00—20:00)。每天记录水温 and 水体pH,每周监测循环水中氨氮、亚硝酸盐和溶解氧含量。实验期间水温为18—26℃, pH为6.5—7.5, 氨氮<0.1 mg/L, 亚硝酸盐<0.01 mg/L, 溶解氧>6.5 mg/L。

1.3 实验鱼及饲养

实验用草鱼由湖南省水产科学研究所(湖南,

长沙)提供,在正式养殖实验开始之前,用对照组饲料驯养草鱼2周。驯养期间,每天饱食投喂2次(9:00和15:00)。养殖实验开始前1周,用4种实验饲料混合后饱食投喂草鱼,使其适应实验饲料。实验前1d不进行投喂,选取规格均匀、体格健壮的草鱼

表1 饲料配方及生化组成(%干物质)

Tab. 1 Formulation and Chemical composition of experimental diets (% dry matter)

项目 Item	对照组 Control group	实验1组 Group 1	实验2组 Group 2	实验3组 Group 3
原料Ingredient				
小麦Wheat grain	12.40	12.40	12.40	12.40
豆粕Soybean meal	24.00	24.00	24.00	24.00
米糠Rice bran	10.00	9.00	8.00	7.00
玉米Corn	10.00	10.00	10.00	10.00
菜粕Rapeseed meal	34.00	30.00	26.00	22.00
发酵芝麻粕 Fermented sesame meal	0.00	5.00	10.00	15.00
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	2.00	2.00	2.00	2.00
石粉Limestone	5.00	5.00	5.00	5.00
豆油Soybean oil	1.40	1.35	1.30	1.25
氯化钠NaCl	0.23	0.23	0.23	0.23
氯化胆碱 Choline chloride	0.15	0.15	0.15	0.15
赖氨酸Lysine	0.10	0.15	0.20	0.25
多维预混物 Vitamin premix ¹	0.32	0.32	0.32	0.32
多矿预混物 Mineral premix ²	0.40	0.40	0.40	0.40
合计Total	100.00	100.00	100.00	100.00
生化组成Chemical composition				
粗蛋白 Crude protein	28.53	28.64	28.83	28.91
粗脂肪Crude lipid	5.07	5.36	4.92	5.25
灰分Ash	12.59	12.51	12.43	12.34
磷Phosphorus	1.22	1.11	1.15	1.08

注: ¹多维预混物(mg/kg饲料): 维生素B₁, 20; 维生素B₂, 20; 维生素B₆, 20; 维生素B₁₂, 0.02; 叶酸, 5; 泛酸钙, 50; 肌醇, 100; 烟酸, 100; 生物素, 0.1; 纤维素, 3522; 维生素C, 100; 维生素A, 110; 维生素D, 20; 维生素E, 50; 维生素K, 10; ²多矿预混物(mg/kg饲料): 氯化钠, 500.0; 硫酸镁, 8155.6; 磷酸二氢钠, 12500.0; 磷酸二氢钾, 16000.0; 磷酸氢钙, 7650.6; 硫酸亚铁, 2286.2; 乳酸钙, 1750.0; 硫酸锌, 178.0; 硫酸锰, 61.4; 硫酸铜 15.5; 硫酸钴, 34.5; 碘化钾, 114.8; 淀粉, 4930.9

Note: ¹Vitamin premix (mg/kg diet): Vitamin B₁, 20; Vitamin B₂, 20; Vitamin B₆, 20; Vitamin B₁₂, 0.02; Folic acid, 5; Calcium pantothenate, 50; Inositol, 100; Nicotinic acid, 100; Biotin, 0.1; Cellulose, 3522; Vitamin C, 10; Vitamin A, 110; Vitamin D, 20; Vitamin E, 50; Vitamin K, 10; ²Mineral premix (mg/kg diet): NaCl, 500; MgSO₄·7H₂O, 8155.6; NaH₂PO₄·2H₂O, 12500.0; KH₂PO₄, 16000.0; CaHPO₄·H₂O, 7650.6; FeSO₄·7H₂O, 2286.2; C₆H₁₀CaO₆·5H₂O, 1750.0; ZnSO₄·7H₂O, 178.0; MnSO₄·H₂O, 61.4; CuSO₄·5H₂O, 15.5; CoSO₄·7H₂O, 34.5; KI, 114.8; Starch, 4930.9

[初重(99.98±0.69) g], 随机放入12个养殖缸中, 每缸20尾。实验共4个处理, 每处理3重复。生长实验持续45d。实验期间, 每天定时饱食投喂2次(9:00和15:00)。

1.4 样品采集与指标测定

生长指标测定 在实验结束时, 草鱼停止摄食24h后, 分别称取每缸草鱼总体重并记录尾数, 结合摄食情况和饲料的基本组成统计增重率(Weight gain rate, *WGR*)、特定生长率(Special growth rate, *SGR*)、成活率(Survival rate, *SR*)、饵料系数(Feed conversion ratio, *FCR*)和蛋白质效率(Protein efficiency ratio, *PER*)。各组实验鱼的生长指标根据以下公式计算求得:

增重率(*WGR*, %)=100%×(终末体重-初始体重)/初始体重

特定生长率(*SGR*, %/d)=100%×[ln(终末体重)-ln(初始体重)]/天数

成活率(*SR*, %)=100%×终末尾数/初始尾数

饵料系数(*FCR*)=摄入饲料总量/(终末体重-初始体重)

蛋白质效率(*PER*, %)=100%×(终末体重-初始体重)/(摄入饲料总量×蛋白质含量)

饲料常规营养成分测定 实验饲料中的粗蛋白、粗脂肪和灰分的测定参照AOAC(2003)标准方法: 采用凯氏定氮仪(2300, Kjeltac Analyzer Unit)测定粗蛋白; 粗脂肪采用索氏抽提仪(Soxtec System HT6, Tecator, Hoganas, Sweden)进行抽提测定; 灰分在马弗炉中550℃煅烧3h, 采用失重法测定。

肠道黏膜形态测定 每缸随机捞取3尾鱼、每组9尾, 置于冰上解剖后分离肠道, 用0.1 mol/L PBS溶液轻轻冲洗内容物后, 再以4%多聚甲醛溶液将前肠部分固定于1.5 mL无RNase EP管中, 并密封保存于4℃冰箱, 用于制作肠道光学显微镜切片。肠道黏膜形态样品参照孙浪等^[10]石蜡切片的制作程序(脱水、石蜡包埋、切片和H-E染色)制出切片, 使用光学显微镜, 放大40倍观察并拍照。每张切片随机选数根平整完好的绒毛, 测量绒毛高度与隐窝深度的比值, 最后把各指标的平均数作为测定数值。

肠道微生物测定 每缸随机捞取2尾鱼、每组6尾, 置于冰上解剖后分离肠道, 用0.1 mol/L PBS溶液轻轻冲洗, 收集食糜, 用封口膜封好放入液氮中用于肠道微生物分析。肠道微生物样品先用DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取草鱼肠道食糜中DNA。然后将DNA样品送去人和未来生物科技有限公司(湖南, 长沙)进行16S

rDNA测序分析。16S rDNA测序包括细菌基因组DNA提取、16S rDNA特异引物PCR扩增、扩增产物纯化、DNA测序、序列比对等步骤, 本实验基于Illumina Miseq测序平台对构建的小片段文库进行双末端测序。

小肽转运相关基因表达水平测定 每缸随机捞取3尾鱼、每组9尾, 置于冰上解剖后分离肠道, 取前肠用剪刀剪碎装入1.5 mL无RNase EP管中, 迅速投入液氮中后转移至-80℃冰箱保存, 用于基因表达分析。取冻存的草鱼肠道样品液氮研磨后, 用RNA提取试剂(TaKaRa, RNAiso Plus, Cat. 9109)提取总RNA, 具体方法按说明书进行操作, 分别采用1%琼脂糖凝胶电泳和全波长读数仪(Beijing Free More bioscience)检测RNA的完整性和纯度。各取500 ng总RNA作为反转录模板, 用反转录试剂盒(TaKaRa, Cat.RR036A)进行第一链cDNA合成。设计荧光定量引物: 从GenBank中查询并下载草鱼的*CDX2*、*Sp1*和*PepT1*基因的特异序列, 用Primer Premier 5.0软件设计实时荧光定量PCR (Real-time PCR)特异引物, 内参基因引物根据草鱼管家基因β-actin设计(表2)。采用试剂盒(TaKaRa, Cat.RR104A)和BIO-RAD CFX96TM Real-time PCR仪进行Real-time PCR扩增。PCR反应体系为: SYBR Premix Ex TaqTM (2×)10 μL, 正向引物(10 μmol/L) 0.5 μL, 反向引物(10 μmol/L) 0.5 μL, 模板0.5 μL, 双蒸水8.5 μL, 总体积为20 μL, 每个样品重复3次。Real-time PCR反应在Eppendorf Master cycler gradient (Eppendorf, German)中进行, 反应程序: 95℃ 30s, 95℃ 3s、55℃ 25s、72℃ 11s共40个循环, 95℃ 1min、55℃ 30s、95℃ 30s终止, 4℃保存。Real-time PCR结束后, 从扩增曲线得出*Ct*值。

1.5 数据处理

实验以Image-pro plus 6.0软件分析肠道切片

表2 荧光定量分析的引物参数

Tab. 2 Primers used for real-time quantitative PCR

引物名称Primer name	引物序列Sequence (5'—3')
<i>PepT1</i> -F	TGCTCTTGTTGTGTTTCATCG
<i>PepT1</i> -R	CTCTCTCTTGGGGTATTGCTT
<i>CDX2</i> -F	TTTGTAAACCGCACCTCC
<i>CDX2</i> -R	AGTTCCTGGCCCATAGT
<i>Sp1</i> -F	AGTGACCCAGTAAGAAGAAGCA
<i>Sp1</i> -R	CAAGTGTGCCCCGAGATG
β-actin-F	GAACACTGTGCTGTCTGGAGGTA
β-actin-R	CTTGGGTTGGTCGTTTGAATC

注: “F”代表正向引物, “R”代表反向引物

Note: “F” stands for forward primer and “R” stands for reverse primer

图,并计算出绒毛高度/隐窝深度的比值。*Real-time* PCR数据通过公式 $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ [$\Delta\Delta Ct=(Ct_{\text{目的基因}}-Ct_{\text{管家基因}})-\Delta Ct_{\text{校准样}}$]计算得出目的基因的相对表达量^[11]。用Excel 2007进行数据统计,以SPSS 19.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),所有数据以平均值±标准误(Means±SE)表示。采用Duncan检验进行多重比较,检验不同组间的差异是否显著,以 $P<0.05$ 为显著性判断标准。

2 结果

2.1 生长性能

如表3所示,各组间草鱼增重率、特定生长率和蛋白质效率均无显著性差异,实验1组和2组略高于对照组,实验3组略低于对照组($P>0.05$);各组间饵料系数也无显著性差异,实验1组和2组略低于对照组,实验3组略高于对照组($P>0.05$);在存活率方面,四组均为100%。

2.2 肠道形态

用不同比例的发酵芝麻粕替代菜粕的四组草鱼前肠黏膜形态在光学显微镜下的观察比较情况如图1。表4展示了发酵芝麻粕替代菜粕对草鱼肠道形态的影响:实验组的草鱼肠绒毛高度均显著高于对照组($P<0.05$)。随着饲料中发酵芝麻粕替代比例的增加,草鱼肠绒毛高度也随之增加,在实验2组(替代比例为23.5%)时达到最大值,随后显著下降($P<0.05$);实验组鱼肠隐窝深度小于对照组,但无显著差异($P>0.05$);实验组鱼肠绒毛高度与隐窝深度的比值(V/C)也均显著高于对照组($P<0.05$),其变化趋势与绒毛高度变化趋势相似。

2.3 肠道微生物

表5展示了发酵芝麻粕替代饲料中菜粕蛋白后,大肠杆菌(*Escherichia coli*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)和气单胞菌(*Aeromonas*)在草鱼肠道总菌群中所占比例的变化情况。与对

照组相比,实验组大肠杆菌占比显著下降($P<0.05$),实验组间无显著差异;实验组乳酸杆菌和芽孢杆菌占比均显著高于对照组($P<0.05$),乳酸杆菌占比随发酵芝麻粕替代比例的增加而升高,芽孢杆菌占比在实验组间无显著差异($P>0.05$);实验2组和3组的气单胞菌占比显著低于对照组($P<0.05$)。

2.4 小肽转运相关基因mRNA表达量

图2表示饲料中不同水平发酵芝麻粕对草鱼肠道小肽转运相关基因*CDX2*、*Sp1*和*PepT1* mRNA相对表达量的影响。这3种基因mRNA的相对表达量均在实验1组时达到最高,显著高于对照组($P<0.05$)。如图所示,实验1组的*CDX2* mRNA表达水平显著高于对照组($P<0.05$),其他实验组也高于对照组,但无显著差异($P>0.05$)。*Sp1* mRNA表达量在实验1组时显著高于其他三组($P<0.05$),其余三组间无显著差异。实验1组*PepT1* mRNA表达量显著高于对照组和其他实验组($P<0.05$),实验2组*PepT1* mRNA表达量显著高于对照组和实验3组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 发酵芝麻粕替代菜粕蛋白对草鱼生长性能的影响

目前,有关发酵芝麻粕对畜禽和水产动物生长性能影响的研究已有很多。Wu等^[1]用发酵芝麻粕替代基础日粮中豆粕来饲喂樱桃谷肉鸭,结果显示各处理组肉鸭平均日增重和料增重比差异均不显著,而以4%—8%发酵芝麻粕替代饲料中豆粕时,鸭胸肌率和屠宰率显著高于对照组。Oluwagbenga等^[12]研究发现,在罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)饲料中添加164.3 g/kg发酵芝麻粕时,对照组与实验组鱼之间的生长性能无显著性差异。本实验结果表明,发酵芝麻粕代替饲料中菜粕对草鱼生长有一定的促进作用。发酵芝麻粕代替饲料中菜粕蛋白11.8%和23.5%时,草鱼增重率、特定生长率和蛋

表3 发酵芝麻粕替代饲料中菜粕蛋白对草鱼生长性能的影响

Tab. 3 Effects of fermented sesame meal replacing dietary rapeseed meal on growth performance of grass carp

项目Item	对照组Control group	实验1组Group 1	实验2组Group 2	实验3组Group 3
初始体重IBW (g)	99.97±0.64	99.83±0.68	100.12±0.85	100.03±0.59
终末体重FBW (g)	148.80±3.29	152.49±2.49	151.71±3.49	147.93±2.42
增重率WGR (%)	48.90±1.12	52.75±1.23	51.53±2.25	47.89±1.66
特定生长率SGR (%/d)	0.98±0.01	1.04±0.01	1.02±0.04	0.97±0.02
成活率SR (%)	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
饵料系数FCR	1.77±0.06	1.65±0.03	1.69±0.03	1.80±0.07
蛋白质效率PER (%)	1.98±0.19	2.10±0.07	2.05±0.22	1.93±0.11

注:表中数据表示为平均值±标准误,同列数值不同上标英文字母表示差异显著($P<0.05$);下同

Note: Data presented are Means±SE. Values in the same row with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$); The same applies below

白质效率均高于对照组, 饵料系数低于对照组, 但差异不显著。相似的是, 有研究报道表明, 饲料中使用发酵芝麻粉(未榨油)能促进鱼体的生长性能。Mukhopadhyay等^[3]发现, 以乳酸菌发酵芝麻粉, 能有效的消除芝麻粉中的主要抗营养因子植酸和单宁。同时, 露斯塔野鲮(*Labeo rohita*)在摄食含有40%该发酵芝麻粉日粮60d后, 其生长、饲料转化率和蛋白质效率显著提高^[3]。同样, Roy等^[13]用从成年露斯塔野鲮肠道中分离出的地衣芽孢杆菌LF1和LH1发酵芝麻粉, 并以30%此发酵芝麻粉饲喂野鲮幼鱼, 能显著提高其生长速度、饲料转化率和蛋白效率。

3.2 发酵芝麻粕替代菜粕蛋白对草鱼肠道形态的影响

肠道是动物机体消化吸收营养物质的主要部位, 绒毛高度、隐窝深度以及两者的比值是反映小

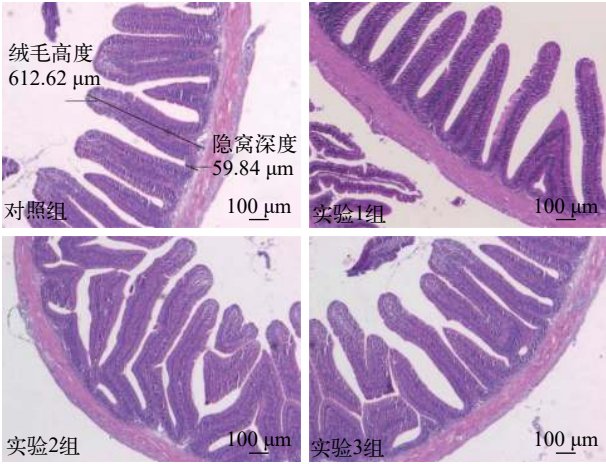


图1 不同发酵芝麻粕替代组草鱼前肠黏膜形态光镜下比较(×100)
Fig. 1 The foregut mucosa morphology of grass carp in different groups under optical microscope (×100)

肠消化吸收功能的重要指标^[14]。肠黏膜上有大量肠绒毛, 绒毛高度越高则肠道对营养物质的吸收面积越大, 消化吸收功能越强; 隐窝深度的高低反映了肠上皮细胞的生成率, 肠道隐窝的细胞不断的向绒毛处分化, 替代补充脱落或损伤的绒毛细胞, 隐窝处细胞生成率下降将使隐窝深度变浅, 表明绒毛细胞成熟率上升, 小肠营养吸收功能增强; 肠绒毛高度与隐窝深度的比值(V/C)可以比较直观的反映小肠的消化吸收能力, 绒毛高度与隐窝深度的比值越高则代表小肠消化吸收能力越强^[14, 15]。本实验结果表明, 草鱼前肠绒毛高度随着发酵芝麻粕替代比例的增加呈先升高后下降趋势, 当用发酵芝麻粕替代草鱼饲料中23.5%的菜粕蛋白时, 草鱼肠绒毛高度显著高于对照组, 肠绒毛高度与隐窝深度的比值(V/C)也达最大值。这是因为发酵有效地降低了芝麻粕中抗营养因子的含量, 在对照组饲料中因豆粕和菜粕的存在, 从而单宁、植酸等抗营养因子含量过高而损害了草鱼的肠道结构^[16], 而实验组中使用发酵芝麻粕替代菜粕, 相应减少了有关抗营养因子, 保护了鱼肠道的形态结构^[3, 13]。

3.3 发酵芝麻粕替代菜粕蛋白对草鱼肠道微生物的影响

动物肠道微生物种群的稳态与宿主的肠道健康状况及生长性能密切相关, 肠道微生物种群的变化可直接影响动物肠道对营养物质的吸收代谢^[17, 18]。饲喂不同饵料会在很大程度上影响肠道菌群结构^[19]。本实验中发酵芝麻粕替代菜粕蛋白增加了草鱼肠道中乳酸杆菌和芽孢杆菌的占比, 减少了肠道内气单胞菌和大肠杆菌的占比。这与夏素银等^[20]用发酵蛋白饲料替代豆粕饲喂肉仔鸡, 导致肠道大肠杆菌数数量下降的结果相似。在一定程度上可以说明, 发酵芝麻粕能够促进肠道中有益菌的增殖并抑

表4 发酵芝麻粕替代饲料中菜粕蛋白对草鱼前肠形态的影响

Tab. 4 Effects of fermented sesame meal replacing dietary rapeseed meal on foregut morphology of grass carp

项目Item	对照组Control group	实验1组Group 1	实验2组Group 2	实验3组Group 3
绒毛高度Villus height (μm)	635.65±38.72 ^a	844.03±60.59 ^{bc}	980.12±68.15 ^c	758.97±40.54 ^b
隐窝深度Crypt depth (μm)	65.75±5.42	60.93±8.42	55.49±5.49	59.71±3.79
绒毛高度/隐窝深度Villus height/Crypt depth (V/C)	9.55±1.58 ^a	13.90±2.66 ^{bc}	17.45±2.23 ^c	12.69±1.81 ^b

表5 饲料中发酵芝麻粕替代菜粕蛋白对草鱼肠道微生物的影响

Tab. 5 Effects of fermented sesame meal replacing dietary rapeseed meal on intestinal microflora of grass carp (%)

项目Item	对照组Control group	实验1组Group 1	实验2组Group 2	实验3组Group 3
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	18.54±1.61 ^b	12.67±2.43 ^a	11.45±1.29 ^a	12.14±3.02 ^a
乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	1.08±0.68 ^a	5.32±1.74 ^b	7.59±2.28 ^{bc}	8.24±1.85 ^c
芽孢杆菌 <i>Bacillus</i>	2.36±0.87 ^a	8.33±2.42 ^b	9.15±2.94 ^b	8.56±1.88 ^b
气单胞菌 <i>Aeromonas</i>	12.47±1.43 ^b	10.51±0.82 ^{ab}	8.63±1.24 ^a	7.12±1.06 ^a

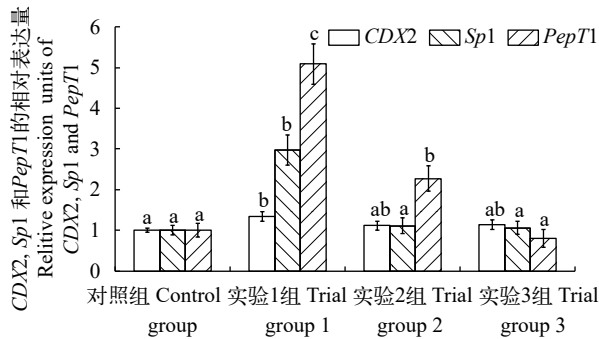


图2 发酵芝麻粕替代菜粕蛋白对草鱼肠道 $CDX2$ 、 $Sp1$ 和 $PepT1$ mRNA表达的影响

Fig. 2 The effect of fermented sesame meal replacing dietary rapeseed meal on gene expression of $CDX2$, $Sp1$ and $PepT1$ mRNA in intestine of grass carp

制有害细菌的生长,从而改善肠道微生态,促进肠道健康。本实验中肠道菌群的变化可能是由于饲喂芝麻粕经过微生物发酵后,发酵产生的一些中间产物如肽类和氨基酸等促进了有益微生物混合菌的生长,主要包括乳酸杆菌、酵母菌和芽孢杆菌,后两者的存在正好为乳酸杆菌的生长繁殖创造了厌氧环境,而乳酸杆菌大量繁殖产生的乳酸又降低了肠道中pH,从而有效抑制了肠道中有害菌如大肠杆菌和气单胞菌的繁殖,保持了肠道健康的微生态环境^[18, 21, 22]。

3.4 发酵芝麻粕替代菜粕蛋白对草鱼肠道小肽转运相关基因的影响

很多研究都证明蛋白质并不是全部以氨基酸的形式被机体吸收,有一部分是以小肽的形式被吸收且其吸收效果优于氨基酸的形式^[23–25]。动物肠道上皮细胞是小肽吸收的主要场所,而小肽的吸收是受到多种因素共同调控的^[25]。小肽转运载体 $PepT1$ 是位于肠道上皮细胞上的一种转运小肽的蛋白,它负责将小肽从肠道细胞外转运到细胞内,并在动物肠道小肽的吸收过程中发挥关键性作用^[26, 27]。 $CDX2$ 作为一种肠道上皮细胞特异性核转录因子,对营养物质在肠道内消化吸收起着关键性作用,它调控了机体内糖代谢、脂肪代谢、蛋白质代谢和矿物元素代谢等相关功能基因的表达^[28, 29]。 $Sp1$ 作为转录激活因子或抑制因子在细胞生长、分化、凋亡、染色质重构、纤维化和炎症等方面起作用^[30]。Shimakura等^[31]在2005年报道,转录因子 $CDX2$ 和 $Sp1$ 能相互作用来调控人类 $PepT1$ 基因的表达。本实验用发酵芝麻粕替代菜粕蛋白饲喂草鱼,结果发现小肽转运相关基因($CDX2$ 、 $Sp1$ 和 $PepT1$)的表达水平均在饲料中发酵芝麻粕替代11.8%菜粕蛋白时处于最高值,替代比例为23.5%和35.1%时,基因表

达水平也高于对照组或与对照组没有显著差异。这可能是由于微生物发酵将芝麻粕中大量蛋白质降解为了肠道可吸收的小肽,从而提高了机体小肽转运相关基因的表达,进而促进肠道对小肽分子的吸收^[1, 32]。 $CDX2$ 、 $Sp1$ 和 $PepT1$ 基因表达水平的升高在一定程度上可以说明在饲料中用适量添加发酵芝麻粕替代菜粕有助于小肽的转运以及氨基酸的消化吸收,从而有利于草鱼的健康和生长。

4 结论

本实验结果表明,使用发酵芝麻粕替代草鱼饲料中11.8%—23.5%的菜粕蛋白时,鱼体的生长和饲料利用均有上升趋势;在饲料中添加适量发酵芝麻粕可改善草鱼的肠道形态结构,优化肠道菌群,并上调鱼肠道中小肽转运相关基因 $CDX2$ 、 $Sp1$ 和 $PepT1$ 的表达水平。综上所述,发酵芝麻粕可以部分替代菜粕用于草鱼饲料中。

参考文献:

- [1] Wu D, Li L M, Qian K, *et al.* Effects of soybean meal replaced by fermented sesame meal on growth performance, meat quality and serum biochemical indexes of meat ducks [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, **25**(10): 2386—2393
- [2] Van der Klis J, Versteegh H, Simons P, *et al.* The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens [J]. *Poultry Science*, 1997, **76**(11): 1535—1542
- [3] Mukhopadhyay N, Ray A K. Effect of fermentation on the nutritive value of sesame seed meal in the diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2015, **5**(4): 229—236
- [4] Yamauchi K, Samanya M, Seki K, *et al.* Influence of dietary sesame meal level on histological alterations of the intestinal mucosa and growth performance of chickens [J]. *The Journal of Applied Poultry Research*, 2006, **15**(2): 266—273
- [5] Mamputu M, Buhr R. Effect of substituting sesame meal for soybean meal on layer and broiler performance [J]. *Poultry Science*, 1995, **74**(4): 672—684
- [6] Meng Y Q, Miao X, Mai K S, *et al.* Potential risk of high level replacement of dietary fish meal by canola meal on large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Richardson, 1846): growth, health and nutritional values as a food fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, **41**(1): 127—138 [孟玉琼, 苗新, 麦康森, 等. 双低菜粕高水平替代饲料鱼粉对大黄鱼潜在风险的评估: 生长、健康和营养价值. *水生生物学报*, 2017, **41**(1): 127—138]
- [7] China Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2017, 25 [2017中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社. 2017, 25]

- [8] Qiao Q, Liu Q L, Xiao T Y, *et al.* The study of ploidy and fertility of the hybrid F1 of *Ctenopharyngodon idellus*♀×*Squaliobarbus curriculus*♂ [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(2): 313—322 [乔庆, 刘巧林, 肖调义, 等. 草鱼(♀)×赤眼鳟(♂)杂交F₁倍性分析和性腺发育特点. *水生生物学报*, 2018, **42**(2): 313—322]
- [9] Tang J Z, Peng L, Wang H, *et al.* Preparation of peptides rich in taurine from fermented sesame meal by multi strain fermentation [P]. Hunan: CN107183356A, 2017-09-22 [唐建洲, 彭亮, 汪慧, 等. 多菌种发酵芝麻粕生产富含牛磺酸的菌肽饲料的制备方法. 湖南: CN107183356A, 2017-09-22]
- [10] Sun L, Liu Z, Hao G, *et al.* Effects of sodium butyrate on growth and intestinal cell proliferation of *Carassius auratus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, **20**(4): 893—901 [孙浪, 刘臻, 郝光, 等. 丁酸钠对鲫鱼生长和肠细胞增殖的影响. *中国水产科学*, 2013, **20**(4): 893—901]
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402—408
- [12] Oluwagbenga O, Francisca G, Wilfred A. Utilization of autoclaved and fermented sesame (*Sesamum indicum* L.) seed meal in diets for Til-aqua natural male tilapia [J]. *Animal Nutrition*, 2016, **2**(4): 339—344
- [13] Roy T, Banerjee G, Dan S K, *et al.* Improvement of nutritive value of sesame oilseed meal in formulated diets for rohu, *Labeo rohita*, (Hamilton), fingerlings after fermentation with two phytase-producing bacterial strains isolated from fish gut [J]. *Aquaculture International*, 2014, **22**(2): 633—652
- [14] Liu Y C, Song F G, Gai B S, *et al.* Effects of dietary composite rare earth on performance, apparent digestibility and intestinal mucosal morphology of laying hens during laterlaying period [J]. *China Poultry*, 2018, **40**(19): 28—31 [刘禹辰, 宋风格, 盖伯舜, 等. 饲料添加复合稀土制剂对产蛋后期蛋鸡生产性能、表观消化率以及小肠黏膜形态的影响. *中国家禽*, 2018, **40**(19): 28—31]
- [15] Chi S Y, Han F L, Tan B P, *et al.* Effects of dietary arginine level on growth and intestinal morphology of juvenile grouper *Epinephelus coioides* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(2): 388—394 [迟淑艳, 韩凤禄, 谭北平, 等. 饲料精氨酸水平对斜带石斑鱼幼鱼生长和肠道形态的影响. *水生生物学报*, 2016, **40**(2): 388—394]
- [16] Lü Y Y, Chang Q, Chen S Q, *et al.* The effects of dietary fermented soybean meal on the growth and digestive ability of spotted halibut, *Verasper variegatus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(1): 10—18 [吕云云, 常青, 陈四清, 等. 发酵豆粕对圆斑星鲈生长及消化能力的影响. *水生生物学报*, 2016, **40**(1): 10—18]
- [17] Yegani M, Korver D R. Factors affecting intestinal health in poultry [J]. *Poultry Science*, 2008, **87**(10): 2052
- [18] Hong K J, Lee C H, Kim S W. Aspergillus oryzae GB-107 fermentation improves nutritional quality of food soybeans and feed soybean meals [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2004, **7**(4): 430—435
- [19] Wang Q, Xiong B X, Luo G Q, *et al.* Gut microbiota of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) and paddlefish (*Polyodon spathula*) affected by their diets [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(4): 814—822 [王琴, 熊邦喜, 罗国强, 等. 喂养不同饵料对匙吻鲟和鲢消化道微生物区系的影响. *水生生物学报*, 2016, **40**(4): 814—822]
- [20] Xia S Y, Wang C Z, Yan X B, *et al.* Effects of substitution of soybean protein feed for soybean meal on growth performance, nutrient digestibility and intestinal microflora of Broiler chickens [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, **22**(2): 352—357 [夏素银, 王成章, 严学兵, 等. 发酵蛋白饲料替代豆粕对肉仔鸡生长性能、养分消化率及肠道菌群的影响. *动物营养学报*, 2010, **22**(2): 352—357]
- [21] Smits C H, Veldman A, Verkade H J, *et al.* The inhibitory effect of carboxymethylcellulose with high viscosity on lipid absorption in broiler chickens coincides with reduced bile salt concentration and raised microbial numbers in the small intestine [J]. *Poultry Science*, 1998, **77**(10): 1534—1539
- [22] Zhao J, Feng L, Liu Y, *et al.* Effect of dietary isoleucine on the immunity, antioxidant status, tight junctions and microflora in the intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, **41**(2): 663—673
- [23] Alfonso C. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2000, **11**(7): 254—262
- [24] Cao S P, Han D, Xie S Q, *et al.* Effects of fish meal substituted with *Spirulina platensis* on growth, feed utilization and protein deposition in juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(4): 647—654 [曹申平, 韩冬, 解绶启, 等. 螺旋藻粉替代饲料中鱼粉对异育银鲫幼鱼生长、饲料利用和蛋白沉积的影响. *水生生物学报*, 2016, **40**(4): 647—654]
- [25] Chen H, Pan Y, Wong E A, *et al.* Molecular cloning and functional expression of a chicken intestinal peptide transporter (*cPepT1*) in *Xenopus* oocytes and Chinese hamster ovary cells [J]. *Journal of Nutrition*, 2002, **132**(3): 387—393
- [26] Dabrowski K, Lee K J, Rinchard J. The smallest vertebrate, teleost fish, can utilize synthetic dipeptide-based diets [J]. *Journal of Nutrition*, 2003, **133**(12): 4225
- [27] Liu Z X, Zhang J D, Liu X Y, *et al.* Molecular characterization and expression research of oligopeptide transporter *PepT1* in *Siniperca chuatsi* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, **38**(3): 556—562 [刘知行, 张健东, 刘小燕, 等. 鳊小肽转运载体 *PepT1* 基因分子特征及其表达研究. *水*

- 生生物学报, 2014, **38**(3): 556—562]
- [28] Gilbert E R, Li H, Emmerson D A, *et al.* Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks [J]. *Journal of Nutrition*, 2008, **138**(2): 262—271
- [29] Daniel H, Kottra G. The proton oligopeptide cotransporter family *SLC15* in physiology and pharmacology [J]. *Pflügers Archiv*, 2004, **447**(5): 610—618
- [30] Pugh B F, Tjian R. Mechanism of transcriptional activation by *Sp1*: Evidence for coactivators [J]. *Cell*, 1990, **61**(7): 1187—1197
- [31] Shimakura J, Terada T, Katsura T, *et al.* Characterization of the human peptide transporter *PEPT1* promoter: *Sp1* functions as a basal transcriptional regulator of human *PEPT1* [J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal & Liver Physiology*, 2005, **289**(3): G471
- [32] Xie F Z, Peng H H, Li Y, *et al.* Separation and purification of small peptides from fermented sesame meal and their antioxidant activities [J]. *Protein & Peptide Letters*, 2014, **21**(9): 966—974

EFFECTS OF DIETARY RAPESEED MEAL ON THE GROWTH PERFORMANCE, INTESTINAL MORPHOLOGY AND MICROFLORA OF GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*)

SONG Peng^{1,2}, CAO Shen-Ping², TANG Jian-Zhou^{1,2}, PENG Liang², LUO Wen-Jie²,
XIONG Ding², DENG Yue-Song³, HE Xi¹ and LIU Zhen²

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory of Nutrition and Quality Control of Aquatic Animals, Department of Biological and Environmental Engineering, Changsha University, Changsha 410022, China; 3. TRS Group Co., Ltd., Zhuzhou 412000, China)

Abstract: To investigate effects of dietary rapeseed meal on the growth performance, intestinal morphology, microflora, and the expression of small peptide transport related genes of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), four isonitrogenous and isolipidic diets were formulated by adding 0, 5%, 10% and 15% fermented sesame meal to replace 0, 11.8%, 23.5% and 35.1% of rapeseed meal protein respectively, which were named as control group, trial group 1, trial group 2 and trial group 3. The experiment was carried out in an indoor recirculating system with three replicates in each group. Triplicates of 20 fish [initial body weight of (99.98±0.69) g] were fed to apparent satiation with four experiment diets twice a day for 45 days. The results showed no significant difference in weight gain rate (*WGR*), specific growth rate (*SGR*) and protein efficiency rate (*PER*) among all the groups, and *WGR*, *SGR* and *PER* of trial group 1 and 2 were slightly higher than those of the control group ($P>0.05$). Feed conversion ratio (*FCR*) of trial group 1 and 2 was slightly lower than that of the control group ($P>0.05$). The heights of intestinal villi in the trial groups were significantly higher than those of the control group ($P<0.05$), while the depth of crypt in the trial groups was significantly lower than that of the control group ($P>0.05$). The ratio of villi height to crypt depth (*V/C*) in the trial groups were significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). Dietary fermented sesame meal significantly induced *Lactobacillus* and *Bacillus* ($P<0.05$) and significantly decreased *Escherichia coli* and *Aeromonas* ($P<0.05$). The expressions of *CDX2*, *Sp1* and *PepT1* genes increased significantly at first and then decreased with the increasing fermented sesame meal inclusion ($P<0.05$). These results suggest that the optimum proportion of fermented sesame meal replacement dietary rapeseed meal was 11.8%—23.5%.

Key words: Fermented sesame meal; Grass carp; Protein substitution; Growth performance; Intestinal absorption