



南极磷虾肽对斑马鱼生长及生理生化指标的影响

梁冰 刘云 姜国良

中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003

摘要 评估在饲料中添加不同质量比南极磷虾肽作为饵料添加剂, 对斑马鱼的生长及生理生化指标的影响。将试验鱼分成3个试验组, 在其饲料中添加南极磷虾肽分别为100、250和500 mg/kg, 连续喂养56 d。喂养结束后检测斑马鱼的体增重率、特定增长率、内脏质量比、肥满度、繁殖力、红细胞及白细胞计数、血红蛋白含量、骨骼及肌肉氟含量和血浆及红细胞超氧化物歧化酶(SOD)等指标, 并同时检测饲料的转化率、饲料系数和蛋白质效率等指标进行检测。添加南极磷虾肽后, 斑马鱼在增重率、特定增长率、红细胞及白细胞计数、骨骼氟含量和血浆及红细胞SOD均高于对照组; 对于肌肉内氟含量无影响, 但在繁殖力方面低于对照组。在饲料效率方面, 添加南极磷虾肽100 mg/kg的试验组在饲料系数、饲料转化率和蛋白质效率均优于其他组。结果表明: 添加南极磷虾肽后可促进斑马鱼的生长以及免疫, 但需注意对亲鱼繁殖的不利影响。

关键字 南极磷虾肽; 斑马鱼; 生长指标; 生理生化指标

中图分类号: S 816.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-2813(2014)17-0042-04

南极磷虾肽是将去壳后的南极磷虾肉通过生物酶解作用, 将大分子的蛋白质进行降解成为多肽。多肽可分为营养型多肽和功能型多肽。营养型多肽提供生物每天所需的各种氨基酸, 既有利于氨基酸的吸收和沉积, 又能促进吸收矿物质; 而功能型多肽可影响生物体内许多重要生理生化功能, 如抗菌抗炎等免疫调节活性、抗氧化活性和促进生长活性等。免疫调节多肽多为小分子环肽, 含有丰富的羧基、β-氨基酸和D型氨基酸等, 有些还含有烯键和炔键, 使得多肽的生物利用度和稳定性大大提高。

目前已经通过体外酶解的方法制备出具有生物活性的南极磷虾肽。南极磷虾肉的酶解液经浓缩和喷雾干燥后, 得到淡黄色且具虾香味的干燥粉末, 其主要成分多肽含量在87.32%; 并利用牡蛎壳粉作为脱氟材料的静态吸附试验, 脱氟效率可达95.64%, 同时证明其具有较好的清除自由基能力。目前, 已证实南极磷虾酶解多肽具有抑菌活性。另

外, 免疫增强剂也能提高鱼体抗体水平, 增强鱼类特异性免疫应答水平。因此, 南极磷虾肽作为动物来源的生物活性物质, 可作为鱼类免疫增强剂, 在促进鱼类摄食、促进生长和提高免疫力等多方面发挥多方面的积极作用。试验通过研究添加南极磷虾肽后对斑马鱼的生长指标和生理及生化指标的影响, 旨在探讨鱼类饲料中适宜的南极磷虾肽添加量, 为配制更效率的鱼类饲料配方提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验饲料

试验饲料是在基础日粮中分别额外添加质量比为1.0%、2.5%及5.0%的南极磷虾肽, 按顺序分别记为D1、D2和D3。用木瓜蛋白酶酶解去壳南极磷虾肉, 然后超滤离心, 去除相对分子质量大于10 000的蛋白后获得南极磷虾肽溶液, 采用福林酚法测定多肽含量。基础日粮配方按照对角线法设计各组分的比例。试验饲料原料按配方称质量, 均匀混合, 然后试验组饲料按配方加入南极磷虾肽, 不添加南极磷虾肽的饲料为对照组饲料。所有饲料烘干粉碎后过20、40和60目筛, 制成颗粒直径在

收稿日期: 2014-01-10

第一作者: 梁冰, E-mail: ic_521@126.com

通信作者: 刘云, E-mail: liuyun@ouc.edu.cn

0.3~0.45 mm 的小颗粒和 0.45~0.9 mm 的大颗粒饲料。采用 105 ℃ 恒温烘干失水法测定水分, 采用凯氏定氮法测定粗蛋白含量, 采用 600 ℃ 灼烧法测定灰分, 采用索氏提取法测定粗脂肪含量, 采用氟电极法测定氟含量。饲料配方及营养成分见表 1。

表 1 不同处理的饲料及其营养成分

项目	对照组	D1	D2	D3
日粮组成				
鳕鱼粉/%	37.0	37.0	37.0	37.0
脱脂豆粕/%	34.5	34.5	34.5	34.5
小麦粉/%	14.8	14.8	14.8	14.8
玉米粉/%	8.2	8.2	8.2	8.2
氯化胆碱/%	1.5	1.5	1.5	1.5
复合矿物/%	2.5	2.5	2.5	2.5
复合多维/%	1.5	1.5	1.5	1.5
磷虾肽/(g·100 g ⁻¹)	0	1	2.5	5
营养水平				
粗蛋白/%	32.29	32.77	32.86	32.89
粗脂肪/%	11.24	12.12	14.44	15.50
水分/%	8.36	8.84	9.00	8.56
灰分/%	4.07	4.42	3.85	4.28
氟含量/(mg·kg ⁻¹)	3.8	5.9	8.9	15.6

注: 每千克提供复合矿物: KCl 200、KI 60、CoCl₂·6H₂O 7、Cu-SO₄·5H₂O 14、Fe₂(SO₄)₃·H₂O 400、ZnSO₄·H₂O 200、MnSO₄·H₂O 80、NaCl 136、Na₂Se₂O₃·5H₂O 65、MgSO₄·7H₂O 300 和 Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 220mg; 沸石粉 5.84 g。每千克饲料提供复合维生素: 维生素 B₁ 45、维生素 B₂ 2.5、维生素 B₆ 13、烟酸 150、泛酸钙 15、维生素 C400、生物素 1、肌醇 500、叶酸 5 和维生素 D 25 mg; 维生素 A 3 000 和维生素 E 50 IU。

1.2 试验设计及饲养管理

共设立 1 个对照组, 3 个试验组。对照组投喂不添加南极磷虾肽的饲料, 试验组投喂试验饲料。试验用斑马鱼均购自青岛市南区南路花鸟鱼市场, 1.5 月龄斑马鱼, 共 300 条。试验开始前先驯养 1 周, 去除体形弱小的鱼。喂养阶段开始时随机挑选其中 240 条, 每组 60 条, 测量并记录每条试验用斑马鱼的体长和体质量。喂养时间为 8 周, 每日饲料投喂量为体质量的 5%, 投喂 2 次(早上 08:30, 下午 17:30), 养殖期间保持水温在 25~27 ℃, 养殖期间采用部分换水法。每隔 2 周进行 1 次阶段检测, 每组随机采样 30 条鱼, 记录体长及体质量。

在检测各项终期指标前, 所有试验用鱼均禁食 1 d。然后测量每条鱼的体长和体质量。采集肌肉和骨骼样本, -20 ℃ 保存备用。采集血液并用肝素抗凝, 一部分血液样本离心(1 000 r/min, 10 min), 分离红细胞和血浆, 并立即用于超氧化物歧化酶(SOD)检测, 另一部分血液样本用于血红蛋白含量测定。血细胞计数的血样在采集后立即计数, 用于红细胞计数的血样用鱼类氯化钠注射液稀释 200 倍,

用于白细胞计数的血样用白细胞稀释液稀释 200 倍。

1.3 各项指标检测及方法

1.3.1 鱼体生长指标及饲料效率的测定

$$\text{体长增长率}/\% = (L_t - L_0) / L_0 \times 100$$

$$\text{增重率}/\% = (W_t - W_0) / W_0 \times 100$$

$$\text{特定增长率}/(\% \cdot \text{d}^{-1}) = (\ln W_t - \ln W_0) \times 100 / t$$

$$\text{饲料系数} = F / (W_t - W_0)$$

$$\text{饲料转化率}/\% = (W_t - W_0) / F \times 100$$

$$\text{蛋白质效率}/\% = (W_t - W_0) / (F \times P) \times 100$$

$$\text{内脏质量比}/\% = W_n / W_b \times 100$$

$$\text{肥满度} = 100 \times W_t / L_t^3$$

其中, L_t: 喂养结束时鱼平均体长; L₀: 喂养开始时鱼平均体长; W_t: 喂养结束时鱼平均体质量; W₀: 喂养开始时鱼平均体质量; t: 喂养的天数; F: 饲料总投喂量; P: 饲料的粗蛋白含量; W_n: 内脏质量; W_b: 去内脏后体质量。

1.3.2 鱼体生理及生化指标及含氟量测定的测定

每组采血 10 uL 用于 SOD 检测, 25 uL 用于血红蛋白检测, 均采用试剂盒。每组采 1 g 肌肉用于氟含量检测, 1 g 用于蛋白质含量检测。每组保存脊椎骨用于骨骼氟含量检测。每组分别采集 10 条斑马鱼的血液做红细胞计数, 分别采集 5 条鱼的血液做白细胞计数。

1.3.3 繁殖力检测

每组挑选雌鱼, 取出卵巢, 称质量并计数卵巢中全部的卵粒数。同时称量去除内脏及卵巢后的鱼体质量。计算相对繁殖力、绝对繁殖力和成熟系数。

$$\text{绝对繁殖力} = \text{计数卵粒数} / \text{计数卵巢质量} \times W_g$$

$$\text{相对繁殖力} = \text{绝对繁殖力} / L_n$$

$$\text{成熟系数} = W_g / L_n \times 100$$

其中, L_n: 喂养结束时鱼体长; W_g: 卵巢质量。

1.4 数据处理和分析

应用 SPSS 19 for windows 对所得试验数据进行处理和统计学分析, 肥满度、内脏质量比、细菌胞计数、白细胞计数、相对繁殖力和成熟系数以平均数 ± 标准差表示, 若差异性达到显著, 则进行 Turkey 多重比较, 显著性水平为 P < 0.05。

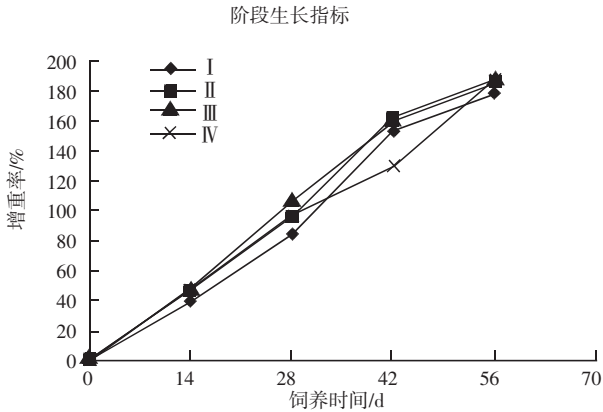
2 结果与分析

2.1 添加南极磷虾肽对斑马鱼的生长情况的影响

2.1.1 斑马鱼各个阶段生长情况

从图 1 可见: 除 D3 组在第 3 阶段时的增重率

低于对照组外，其余各组在各个阶段的增重率均高于对照组。在第 14 天时，各试验组间的增重率差别很小；在第 28 天时，D3 组略有超出；第 42 天时，除 D3 组外，其他各试验组的增长率超过对照组；在第 56 天时，各试验组的终末生长指标均高于对照组。



注：I 为对照组；II 为 D1 组；III 为 D2 组；IV 为 D3 组

图 1 不同南极磷虾肽添加量对斑马鱼的增重率影响

2.1.2 添加南极磷虾肽对斑马鱼生长性能及生物学性状的影响

表 2 不同南极磷虾肽添加量对斑马鱼生长性能的影响

项目	对照组	D1 组	D2 组	D3 组
饲料系数	3.40	3.14	3.45	3.50
饲料转化率/%	29.40	31.77	28.97	28.55
特定增长率/%	1.83	1.87	1.88	1.89
蛋白质效率/%	0.91	0.97	0.88	0.87
增重率/%	178.52	185.30	186.20	188.17
体长增长率/%	39.47	28.00	35.13	33.51
肥满度 / (g · cm ⁻³)	1.73 ± 0.16 ^{ac}	1.80 ± 0.15 ^{bd}	1.70 ± 0.09 ^c	1.79 ± 0.15 ^d
内脏质量比/%	5.46 ± 1.36 ^a	5.04 ± 1.39 ^b	5.88 ± 1.17 ^c	6.12 ± 0.83 ^d

注：同行数据肩标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，肩标相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

从表 2 可见：当添加的南极磷虾肽达到 D1 组水平时，饲料系数及内脏质量比最小且与其他组有明显差异 ($P < 0.05$)，饲料转化率及蛋白质效率最大且与其他各组有差异。随着南极磷虾肽添加量的增多，各试验组的饲料系数、特定增长率、增重率和内脏质量比呈现逐步提高的趋势，并且均高于对照组；同时，蛋白质效率却呈现下降趋势，并且出现了 D2 和 D3 的蛋白质效率均低于对照组的情况。各试验组中的体长增长率均低于对照组，其中 D2 组最高，D3 组次之，D1 组最低。肥满度在对照组与各试验组间的对比没有呈现规律性，对照组与 D3 组的结果接近，并且 D2 和 D4 组的结果接近，

但是它们 2 对结果间存在差异 ($P < 0.05$)。在内脏质量比方面，除 D1 组低于对照组外，其他各试验组均高于对照组。

2.2 添加南极磷虾肽对斑马鱼生理生化指标和氟含量的影响

表 3 不同南极磷虾肽添加量对斑马鱼生理生化指标和氟含量的影响

项目	对照组	D1 组	D2 组	D3 组
红细胞计数(× 10 ⁹)	1.80 ± 0.58 ^{ab}	1.96 ± 1.19 ^b	2.25 ± 1.13 ^c	2.41 ± 0.81 ^d
白细胞计数(× 10 ⁷)	2.32 ± 1.15 ^a	2.88 ± 0.86 ^{bc}	3.21 ± 0.88 ^c	3.96 ± 1.14 ^d
血红蛋白含量/(g · L ⁻¹)	90.3	145.5	112.6	102.3
血清超氧化物歧化酶/(U · mg ⁻¹)	187	188	197	200
红细胞超氧化物歧化酶/(U · gHb ⁻¹)	17 001.95	17 896.79	20 121.12	24 014.71
肌肉氟含量/(mg · kg ⁻¹)	1.58	1.59	1.61	1.61
骨骼氟含量/(mg · kg ⁻¹)	24.23	57.44	85.23	213.32

注同表 2。

从表 3 可见：各试验组的红细胞计数和白细胞计数结果都随南极磷虾肽添加量增加而呈现出逐步提高的趋势，并且均高于对照组的结果。在血清 SOD 和红细胞 SOD 方面也出现与血细胞计数结果相似的结果。试验组的血红蛋白含量均高于对照组，但是 D1 组最高，D2 组次之，D3 组最低，呈现的是随着南极磷虾肽添加量增加而降低的趋势。在鱼体氟含量方面，肌肉中的氟含量在对照组与各试验组中基本相同；然而，各试验组 D1、D2 和 D3 组中骨骼氟含量显著增多，并且随南极磷虾肽添加量的增加呈明显的上升趋势 ($P < 0.05$)。D1 组骨骼含氟量为 57.44 mg/kg，高出对照组 2.24 倍；D2 组骨骼含氟量为 85.23 mg/kg，高出对照组 3.51 倍；D3 组骨骼含氟量为 213.32 mg/kg，高出对照组 8.8 倍。

2.3 添加南极磷虾肽对斑马鱼繁殖力的影响

表 4 不同南极磷虾肽添加量对斑马鱼繁殖力的影响

项目	对照组	D1 组	D2 组	D3 组
绝对繁殖力(怀卵数)	288 ~ 407	45 ~ 285	54 ~ 187	15 ~ 69
相对繁殖力	946.3 ± 105.2 ^a	839.7 ± 99.3 ^b	594.6 ± 103.2 ^c	201.9 ± 100.2 ^d
成熟系数/%	19.44 ± 2.96 ^a	14.94 ± 3.11 ^b	10.39 ± 2.8 ^c	7.19 ± 0.91 ^d

注：同表 2。绝对繁殖力以最小计数值和最大计数值表示。

从表 4 可见：随着南极磷虾肽添加量的增加，各个试验组的绝对繁殖力均呈现逐步下降的趋势，并且均低于对照组，结果差异显著 ($P < 0.05$)。各组的怀卵量计数结果显示，D1 组的雌鱼的最大怀卵量为 285 粒，D2 组的雌鱼的最大怀卵量为 187 粒，D3 组的雌鱼的最大怀卵量为 69 粒，均低于对照组的最低怀卵量 288 粒。各试验组的成熟系数明显低于对照组。南极磷虾肽添加量越大，这种降低

的趋势越明显。

3 讨论

因为生物不能直接利用蛋白质，所以必须先经消化系统中消化分解为小分子的短肽和氨基酸才能够被吸收利用。多肽类作为添加剂加入到饲料中，也会促进鱼类摄食，从而提高增长率。

试验中，各个对照组的增重率和特定生长率均高于对照组，证明南极磷虾肽在鱼类生长方面有促进作用。但是，各试验组中不同的南极磷虾肽添加量表现出不同的结果。如当添加量为 100 mg/kg 时，表现为饲料系数最低，蛋白质吸收率最高；当添加量为 500 mg/kg 时，表现为增长率最高。分析可能的原因是当少量添加南极磷虾肽（100 mg/kg）时，促进鱼体对饵料的吸收及同化作用为其表现的主要方面；当添加量增高至 500 mg/kg 时，南极磷虾肽对斑马鱼生长的促进作用同时表现为促进吸收和增强摄食能力两个方面。

在对斑马鱼的生理及生化指标方面，南极磷虾肽也有着明显的影响。首先，各添加南极磷虾肽组的斑马鱼的血红蛋白含量和红细胞计数均高于对照组，并且增长明显。另外，据文献报道，在饲料中添加抗菌肽，可以提高吉福罗非鱼的红细胞数量。试验在斑马鱼中得出相似结果。这意味着添加南极磷虾肽后，可能促进鱼体的携氧能力。D1 组血红蛋白含量较高可能与其较高的蛋白质效率相关。其次，各添加南极磷虾肽组的斑马鱼的白细胞计数、血浆 SOD 及红细胞 SOD 均高于对照组并且提高显著（ $P < 0.05$ ）。白细胞数量对于鱼体抵抗致病菌的侵害有着重要影响，同时，SOD 的去除自由基能力可以有效减少由于自由基导致的氧化应激，保护机体细胞膜不被自由基氧化而受到损伤。从而表明南极磷虾肽在促进免疫方面也有一定的作用。由于在南极磷虾中氟含量较高，所以试验同时也关注了斑马鱼体内氟含量。从结果可知，喂养添加南极磷虾肽的斑马鱼与未添加的对照组在鱼肉中的氟含量基本相同，并且没有高出国家标准（鱼类食品中氟含量不得超过 2 mg/kg）。但是，骨骼中的氟含量却明显升高，这与用南极磷虾作为虹鳟和五条鲫等的饲料时得出的结果相似。由于鱼虾等鲜活食品在死亡后会有自溶现象，导致骨骼内的氟会污染肌肉。表明应用南极磷虾肽作为饲料添加剂应把脱氟作为重要目的。

在繁殖力方面，投喂添加南极磷虾肽的各试验组在三项指标（绝对繁殖力、相对繁殖力和成熟系

数）上均低于对照组。分析可能的原因：氟对于斑马鱼的生殖腺发育或卵子成熟有负面影响，导致繁殖力下降，多肽在促进斑马鱼生长的同时，也推迟了其生殖腺发育的时间。如果延长喂养时间，可能各试验组在各项繁殖力指标上达到或超过对照组。

综上所述，添加南极磷虾肽后可促进斑马鱼的生长及免疫，但是对亲鱼的繁育的不利影响还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 励建荣, 封平. 功能肽的研究进展 [J]. 食品科学, 2004, 25(11): 415 - 419.
- [2] 孔令明, 李芳, 陶永霞. 多肽的功能活性与研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2009(3): 71 - 73.
- [3] 李明杰, 姜国良, 赫佳明. 南极磷虾肽制备工艺优化及抗氧化测定 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(3): 279 - 282.
- [4] 赵玲, 曹荣, 刘淇. 南极磷虾酶解多肽的抑菌活性 [J]. 渔业科学进展, 2011, 23(4): 112 - 116.
- [5] 黄洪敏, 邵健忠, 项黎新. 鱼类免疫增强剂的研究现状与进展 [J]. 水产学报, 2005, 29(4): 552 - 559.
- [6] 姜珊, 王宝杰, 刘梅. 饲料中添加重组抗菌肽对吉富罗非鱼生长性能及免疫力的影响 [J]. 中国水产科学, 2011, 18(6): 1308 - 1314.
- [7] 叶继丹, 韩友文, 赵吉伟, 等. 喹乙醇对鲤肝胰抗氧化酶系统的影响 [J]. 水产学报, 2004, 28(3): 231 - 235.
- [8] Yoshitomi B, Aoki M, Oshima S, et al. Evaluation of krill (*Euphausia superba*) meal as a partial replacement for fish meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets [J]. Aquaculture, 2006, 261(1): 440 - 446.
- [9] Yoshitomi B, Nagano I. Effect of dietary fluoride derived from Antarctic krill (*Euphausia superba*) meal on growth of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) [J]. Chemosphere, 2012, 86(9): 891 - 897.
- [10] Gigliotti J C, Jaczynski J, Tou J C. Determination of the nutritional value, Protein quality and safety of krill protein concentrate isolated using an isoelectric solubilization/precipitation technique [J]. Food Chemistry, 2008(111): 209 - 214.

通信地址：中国海洋大学海洋生命学院山东省青岛市市南区鱼山路 5 号科学馆 120 室 266003