

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00265

家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾肌肉营养成分、氨基酸和肌苷酸含量的影响

严晶^{1,2,3,4}, 曹俊明^{2,3,4}, 王国霞^{2,3,4}, 黄燕华^{2,3,4}, 张荣斌^{1,2,3,4}, 刘群芳^{2,3,4},
孙智武^{1,2,3,4}, 文远红^{2,3,4}

1. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070;
2. 广东省农业科学院 畜牧研究所, 广东 广州 510640;
3. 广东省动物育种与营养公共实验室, 广东 广州 510640;
4. 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室, 广东 广州 510640

摘要: 采用等蛋白替代方式, 以家蝇蛆粉(housefly maggot meal)分别替代饲料中 0%、20%、40%、60%、80%和 100% 的鱼粉, 配制 6 种等氮等能的饲料, 饲养初始体质量(0.56±0.03) g 的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 相应记为 G0、G20、G40、G60、G80 和 G100 实验组。养殖 45 d 后测定对虾肌肉的常规成分和氨基酸、肌苷酸含量, 研究家蝇蛆粉对凡纳滨对虾肌肉品质的影响。结果显示, 凡纳滨对虾肌肉粗蛋白和灰分含量随家蝇蛆粉替代水平的增加而升高, 其中 G100 组粗蛋白含量和 G80、G100 组灰分含量显著高于 G0 组($P<0.05$); 水分和粗脂肪含量各组之间差异不显著。各组肌肉游离氨基酸中谷氨酸、丙氨酸等鲜味氨基酸和游离鲜味氨基酸总量之间无显著性差异; 除 G40 组外, G20-G100 组游离必需氨基酸总量显著高于 G0 组($P<0.05$); 与 G0 组相比, 替代组游离精氨酸含量显著增加($P<0.05$), 游离赖氨酸含量随替代水平的增加而显著降低($P<0.05$); G20 组游离氨基酸总量显著高于 G0 组($P<0.05$), 其他各组之间差异不显著。替代组肌肉结合氨基酸中天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸和丙氨酸等鲜味氨基酸、必需氨基酸和氨基酸总量与 G0 组相比差异均不显著。G20-G80 组肌肉肌苷酸含量与 G0 组相比差异不显著, G100 组显著升高($P<0.05$)。结果表明, 当家蝇蛆粉替代鱼粉水平不超过 60%时, 除凡纳滨对虾肌肉游离精氨酸含量显著升高外, 对肌肉常规营养成分组成和必需氨基酸、鲜味氨基酸和肌苷酸含量无显著性影响。

关键词: 凡纳滨对虾; 鱼粉; 家蝇蛆粉; 肌肉成分; 氨基酸; 肌苷酸

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)02-0265-10

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 俗称南美白对虾, 具有生长快、抗环境变化能力强、饵料要求低、肉味鲜美和出肉率高等特点^[1], 是目前世界上养殖产量最大的三大对虾种类之一, 同时在中国的养殖产量占对虾养殖总产量的 80%以上^[2]。鱼粉作为传统的优质蛋白源, 蛋白质和必需氨基酸含量丰富, 适口性好, 抗营养因子少, 能够被

水产动物很好的消化利用, 被广泛的应用于水产养殖中^[3]。然而鱼粉资源有限, 价格昂贵, 限制了其在水产养殖中的大规模使用。虽然国内外对凡纳滨对虾饲料中鱼粉的替代蛋白源进行了广泛的研究^[4-7], 然而有关替代蛋白源对凡纳滨对虾肌肉品质的影响报道较少。肌肉品质包括多个方面, 其中肌肉的常规化学指标如水分、粗蛋白、粗脂

收稿日期: 2011-08-11; 修订日期: 2011-09-27.

基金项目: 广东省农业攻关项目(2010B020309003); 广东省海洋渔业科技推广专项项目(A201001H03); 2010 年广东省中小企业发展专项项目.

作者简介: 严晶(1986-), 男, 硕士研究生, 从事水产动物营养与饲料学研究. E-mail: jingyan1001828@163.com

通信作者: 曹俊明, 博士生导师, 研究员. E-mail: junmcao@163.com

肪、灰分和风味物质的含量如氨基酸、肌苷酸、脂肪酸等是用来衡量肉品质的两个重要方面^[8]。

家蝇蛆粉(housefly maggot meal, HMM)蛋白质含量高, 含有多种微量元素以及抗菌肽等活性成分, 且养殖蝇蛆的原料来源广泛, 饲养周期短, 具有替代水产动物饲料中鱼粉的巨大潜力^[9]。据报道, 家蝇蛆粉可以部分替代杂交鲈 [*Heterobranchus longifilis* (♀) × *Clarias gariepinus* (♂)]^[10]、非洲鲈 (*Clarias gariepinus*)^[11] 或全部替代尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[12-15] 饲料中的鱼粉。Fasakin 等^[11] 研究表明, 用全脂和脱脂蝇蛆粉完全替代鱼粉对非洲鲈的常规营养成分影响不显著; Ogunji 等^[15-16] 报道, 用蝇蛆粉替代鱼粉会降低尼罗罗非鱼的水分含量, 而粗脂肪含量显著升高, 脂肪酸组成发生显著变化。本实验室前期研究显示, 当家蝇蛆粉替代鱼粉水平为 40% 时, 对凡纳滨对虾生长、抗氧化和非特异性免疫指标的影响不显著; 当替代水平为 60% 时, 对虾特定生长率显著降低, 但对凡纳滨对虾的摄食和饲料利用无显著影响, 存活率与鱼粉组相比提高了 17.9% (另文发表)。目前, 有关家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾肌肉品质的影响尚未见报道。为此, 本实验研究了家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾幼虾肌肉常规营养成分、氨基酸组成和含量、肌苷酸含量的影响, 以便为家蝇蛆粉在对虾饲料中的应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验饲料

以进口秘鲁红鱼粉、豆粕、花生粕、乌贼膏和虾壳粉为蛋白源, 高筋面粉作为糖源, 鱼油和磷脂为脂肪源, 配制基础饲料, 并作为对照饲料 (G0), 其鱼粉含量为 28%。采用等蛋白替代方式, 以家蝇蛆粉分别替代对照饲料中 20%、40%、60%、80% 和 100% 的鱼粉配制 5 种试验饲料, 记作 G20、G40、G60、G80 和 G100。饲料配方及营养组成见表 1。饲料原料经粉碎后过 80 目筛, 维生素、矿物质等微量成分采用逐级扩大法添加, 加入鱼油、磷脂和水, 混匀后用 SLX-80 型双螺杆挤压机

制成直径为 1.0 mm 的颗粒饲料, 55 °C 下烘干, 冷却后放入密封袋中, 置于 -20 °C 冰箱中保存备用。

1.2 实验虾与饲养管理

实验虾购于广州市番禺对虾养殖场, 饲养实验在广东省农业科学院畜牧研究所水产研究中心室内循环水养殖系统中进行。养殖系统包括 24 个 350 L 圆柱形玻璃纤维缸 (直径 80 cm, 高 70 cm, 水体体积 300 L), 进水速率为 3.5 L·min⁻¹。将购买的虾暂养于水泥池中, 驯养 2 周后选取健康、活泼、体质量 (0.56±0.03) g 的凡纳滨对虾 960 尾, 随机分为 6 组, 每组设 4 个重复, 每个重复放养 40 尾虾。采用饱食投喂法, 投喂时间分别为 8:00、14:00 和 20:00。根据摄食情况及时调整投喂量, 养殖期为 45 d。每天记录水温、投饵量、死亡情况。光照为自然光源, 实验期间水温 25~29 °C, 盐度 5.0~6.0, 溶解氧 > 6.0 mg·L⁻¹, 氨氮 < 0.10 mg·L⁻¹, 亚硝酸盐 < 0.01 mg·L⁻¹, pH 7.70~7.90。

1.3 指标测定

1.3.1 采样 养殖结束后, 禁食 24 h, 从每个平行组随机选取 20 尾虾, 用镊子剔除腹部附肢和甲壳, 去除肠道, 得到对虾肌肉, 其中 5 尾用于肌肉氨基酸含量的测定, 5 尾用于肌肉肌苷酸含量的测定, 剩余对虾肌肉用于常规成分的测定, 对虾肌肉保存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.3.2 肌肉常规成分测定 水分含量采用冷冻干燥法 (GB/T6435-1986)、粗蛋白含量采用凯氏定氮法 (GB/T6432-1994)、粗脂肪含量采用乙醚抽提法 (GB/T6433-1994)、灰分含量采用 550 °C 灼烧法 (GB/T6438-1992)。

1.3.3 肌肉游离氨基酸含量测定 参考李宝山等^[17] 的方法。每个平行组随机取 5 尾虾, 从每尾虾的相同部位取肌肉组成混合样品, 约 0.5 g, 加入 4 mL 10% 的磺基水杨酸溶液, 匀浆 3 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 上清用 0.2 μm 的滤膜过滤, 装入氨基酸分析专用瓶中。采用日立 L-8900 型全自动氨基酸分析仪测定。

1.3.4 肌肉结合氨基酸含量测定 每个平行组随机取 5 尾虾, 冷冻干燥 (德国 CHRIST 公司) 后粉碎, 采用 6 mol·L⁻¹ 盐酸水解法, 用 Waters 高效液相

表 1 实验饲料配方及营养水平
Tab.1 Composition and nutrient levels of the experimental diets

%, 风干重 air dry basis

成分 ingredients	分组 trial					
	G0	G20	G40	G60	G80	G100
鱼粉 fish meal	28.00	22.40	16.80	11.20	5.60	0
家蝇蛆粉 HMM	0	7.36	14.72	22.08	29.44	36.80
豆粕 soybean meal	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
花生粕 peanut meal	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
乌贼膏 squid cream	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
虾壳粉 shrimp shell meal	3.00	3.50	4.00	4.50	5.00	5.50
高筋面粉 strong flour	23.35	21.64	19.94	17.23	14.52	11.82
海藻酸钠 sodium alginate	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
鱼油 fish oil	2.35	1.91	1.47	1.03	0.59	0.15
大豆磷脂(50%) soybean lecithin	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1.00	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00
氯化胆碱(50%) choline chloride	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
胆固醇 cholesterol	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
维生素预混料 vitamin premix ¹⁾	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
乳酸钙 calcium lactate	0	0.69	1.37	2.06	2.75	3.43
矿物质预混料 mineral premix ²⁾	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
VC 酯(35%) vitamin C	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
微晶纤维素 cellulose	2.00	1.00	0	0	0	0
营养成分 nutrient level						
水分 moisture	7.26	6.97	7.34	7.12	7.37	7.76
粗蛋白 crude protein	36.62	37.18	37.18	37.08	36.88	36.82
粗脂肪 crude lipid	7.39	8.02	8.59	9.10	9.91	10.03
灰分 ash	10.73	11.03	11.27	11.53	11.86	12.16
钙 Ca	1.54	1.58	1.63	1.66	1.70	1.70
总磷 total P	1.33	1.35	1.35	1.35	1.38	1.39
能量/(MJ·kg ⁻¹) energy	17.76	17.58	17.72	17.90	18.10	18.06

注: 1) 每千克维生素预混料含维生素 A 4 000 000 IU; 维生素 D 2 000 000 IU; 维生素 E 30 g; 维生素 K₃ 10 g; 维生素 B₁ 5 g; 维生素 B₂ 15 g; 维生素 B₆ 8 g; 泛酸钙 25 g; 叶酸 2.5 g; 生物素 0.08 g; 烟酸 40 g; 维生素 B₁₂ 0.02 g; 肌醇 150 g。2) 每千克矿物质预混料含有一水硫酸镁 12 g; 氯化镁 90 g; 蛋氨酸-铜 3 g; 一水硫酸铁 1 g; 一水硫酸锌 10 g; 碘酸钙 0.06 g; 蛋氨酸-钴 0.16 g; 硒酸钠 0.0036 g。
Note: 1) One kilogram of vitamin premix contained VA 4 000 000 IU; VD 2 000 000 IU; VE 30 g; VK₃ 10 g; VB₁ 5g; VB₂ 15 g; VB₆ 8 g; calcium pantothenate 25 g; folic acid 2.5 g; biotin 0.08 g; nicotinic acid 40 g; VB₁₂ 0.02 g; inositol 150 g。2) One kilogram of mineral premix contained MgSO₄·H₂O 12 g; KCl 90 g; Met-Cu 3 g; FeSO₄·H₂O 1 g; ZnSO₄·H₂O 10 g; Ca(IO₃)₂ 0.06 g; Met-Co 0.16 g; NaSeO₃ 0.003 6 g。

色谱仪测定结合氨基酸的含量。分析柱: PICO.TAG 氨基酸分析柱; 检测波长: 254 nm; 柱温: 38℃; 流速: 1 mL·min⁻¹。

1.3.5 肌肉肌苷酸含量的测定 采用高效液相色谱法^[18]。标准品配制: 肌苷酸对照品(sigma, 97%), 称取适量对照品用水溶解成储备液, 再将储备溶液用 0.25 mol·L⁻¹ pH 3.5 的磷酸氢二钾盐稀释成 40.0 μL·mL⁻¹ 的对照品溶液。样品处理: 每

个平行随机取 5 尾虾, 从每尾虾的相同部位取肌肉组成混合样品, 准确至 1.0 g, 将样品放入 100 mL 容量瓶中, 加入 50℃热水 80 mL, 彻底混匀, 加水至刻度。准确吸取 10 mL 上述溶液至 100 mL 容量瓶, 加入 5%乙酸 5 mL、水 10 mL, 加水至刻度混合后过滤, 收集约 30 mL 滤液。将氨基酸相萃取柱先用 10 mL 甲醇、10 mL 水活化后, 再将 20 mL 样品滤液过滤, 以水清洗萃取柱, 用 0.25

mol·L⁻¹ pH 3.5 的磷酸二氢钾溶液洗脱出 5 mL 滤液。全部过程需要控制流速 1 滴/s。测定仪器为日本岛津 LC-20AB 液相色谱仪, 岛津 LC solution 色谱工作站。色谱条件: Welch C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸二氢钾(0.01 mol·L⁻¹)-磷酸氢二钾(0.01 mol·L⁻¹)(pH5.0, 体积比 480:20); SPD-M20A PDA 检测器, 检测波长 254 nm, 柱温 25℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL。

1.4 统计分析

实验数据用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。采用 SPSS13.0 软件进行数据统计和分析, 先对数据进行方差齐性检验, 如满足方差齐性条件则对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 差异显著再作 Duncan's 多重比较, 如不满足方差齐性条件则用 Dunnett's T3 检验法进行多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾肌肉常规营养成分的影响

从表 2 可以看出, 凡纳滨对虾肌肉粗蛋白和灰分含量随家蝇蛆粉替代鱼粉水平的增加而升高, G100 组粗蛋白含量显著高于对照组和 G20-G60 组, G80、G100 组灰分含量显著高于其他各组 ($P < 0.05$)。肌肉粗脂肪含量随家蝇蛆粉添加水平的增加而降低, 但差异未达到显著性水平 ($P > 0.05$)。各组肌肉的水分含量差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾肌肉游离氨基酸组成的影响

凡纳滨对虾肌肉游离氨基酸组成如表 3 所

示。共检测出 24 种氨基酸及其衍生物, 其中包括 2 种鲜味氨基酸和 14 种常见氨基酸。鲜味氨基酸含量为 0.30%~0.34%, 占总游离氨基酸含量的 21%~24%, 其中丙氨酸含量较高, 占鲜味氨基酸总量的 90%以上, 各实验组谷氨酸、丙氨酸等单个鲜味氨基酸以及鲜味氨基酸总量之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。游离氨基酸中凡纳滨对虾的 10 种必需氨基酸均能检测到, 必需氨基酸总量占游离氨基酸总量的 60%~66%, 除 G40 组外, G20-G100 组显著高于对照组 ($P < 0.05$)。必需氨基酸中精氨酸的含量最高, 其次是半胱氨酸和赖氨酸, 精氨酸含量随着家蝇蛆粉替代水平的增加而升高, 各替代组均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 肌肉中游离赖氨酸的含量则与精氨酸的变化趋势相反, 随着家蝇蛆粉替代水平的增加而降低, G80、G100 组显著低于对照组 ($P < 0.05$); 半胱氨酸含量各组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。在不常见氨基酸中, 牛磺酸含量最高, 占不常见氨基酸含量的 60%左右; 此外对虾肌肉中还检测到鸟氨酸、L-鹅肌肽等特殊氨基酸, 各替代组不常见氨基酸与对照组相比差异均不显著 ($P > 0.05$)。肌肉游离氨基酸总量 G20 组显著高于对照组, 其他各组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾肌肉结合氨基酸组成的影响

从表 4 可以看出, 凡纳滨对虾肌肉中共检测出 17 种氨基酸, 包括 9 种必需氨基酸和 8 种非必需氨基酸, 色氨酸因在水解过程中被破坏, 未能检测到。4 种鲜味氨基酸天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸和丙氨酸中谷氨酸的含量最高, 占鲜味氨基

表 2 家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾肌肉常规营养成分的影响

Tab.2 Effects of replacement of fish meal by HMM on muscle composition of *L.vannamei*

$n=4$; $\bar{x} \pm SD$; %, 干重 dry matter

肌肉成分 muscle composition	分组 trial					
	G0	G20	G40	G60	G80	G100
水分 moisture	75.71±0.39	75.33±0.50	75.16±0.30	75.18±0.30	75.46±0.26	75.84±0.59
粗蛋白 crude protein	81.97±0.63 ^b	82.03±0.38 ^b	82.03±0.35 ^b	82.15±0.45 ^b	82.86±0.28 ^{ab}	83.06±0.56 ^a
粗脂肪 crude lipid	4.46±0.57	4.37±0.67	4.13±0.70	4.01±0.35	3.78±0.49	3.77±0.25
灰分 ash	5.15±0.09 ^b	5.18±0.08 ^b	5.19±0.09 ^b	5.23±0.05 ^b	5.36±0.09 ^a	5.47±0.05 ^a

注: 表中同行数据后上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 同行数据后未标注字母表示无显著差异 ($P > 0.05$)。

Note: Values in the same row with different small letter superscript mean significant difference ($P < 0.05$). Values without superscript in the same row are not significantly different ($P > 0.05$).

表 3 家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾肌肉游离氨基酸组成的影响

Tab.3 Effects of replacement of fish meal by HMM on free amino acids composition in muscle of *L.vannamei*n=4; $\bar{x} \pm SD$; mg·100⁻¹·g⁻¹

氨基酸 amino acids	分组 trial					
	G0	G20	G40	G60	G80	G100
牛磺酸 Tau	33.07±4.66	36.72±4.60	32.98±4.42	33.28±1.63	34.06±3.95	32.90±1.17
天冬氨酸 Asp *	/	/	/	/	/	/
苏氨酸 Thr☆	9.48±1.23	11.81±2.41	11.16±1.60	10.62±1.69	11.70±1.21	10.72±0.36
丝氨酸 Ser	/	/	/	/	/	/
谷氨酸 Glu *	24.69±5.14	27.52±4.98	25.89±3.62	27.22±3.98	22.86±4.30	22.23±3.90
甘氨酸 Gly *	/	/	/	/	/	/
丙氨酸 Ala *	314.45±27.78	304.61±52.44	327.02±34.76	276.50±14.48	282.37±20.82	282.51±16.57
半胱氨酸 Cys	118.63±22.14 ^{ab}	126.94±10.56 ^a	117.04±12.92 ^{ab}	130.41±7.12 ^a	109.58±19.60 ^{ab}	101.23±5.43 ^b
缬氨酸 Val☆	0.34±0.09 ^b	0.51±0.24 ^{ab}	0.47±0.24 ^{ab}	0.49±0.16 ^{ab}	0.66±0.17 ^a	0.43±0.15 ^{ab}
蛋氨酸 Met☆	11.55±1.43	12.99±1.52	11.24±0.95	11.62±3.14	11.45±3.18	9.72±1.15
异亮氨酸 Ile☆	18.72±3.61 ^{ab}	21.08±3.18 ^a	18.26±1.26 ^{ab}	20.70±2.95 ^{ab}	17.03±3.94 ^{ab}	16.04±2.05 ^b
亮氨酸 Leu☆	33.37±7.05 ^a	35.04±5.30 ^a	29.31±5.09 ^{ab}	33.15±3.21 ^a	27.28±5.12 ^{ab}	24.47±2.76 ^b
酪氨酸 Tyr	30.85±3.10	30.39±2.39	28.14±2.41	30.21±3.15	26.11±6.33	24.61±4.12
苯丙氨酸 Phe☆	26.45±3.92 ^a	28.40±2.48 ^a	23.94±2.83 ^{ab}	27.76±2.32 ^a	23.61±5.32 ^{ab}	20.99±0.73 ^b
b-丙氨酸 b-Ala	3.37±1.07	3.73±0.40	3.61±0.88	3.14±0.44	3.88±0.57	3.32±1.23
b-氨基异丁酸 b-AiBA	3.48±1.26	3.90±0.63	3.47±0.51	3.56±1.14	3.97±1.37	2.80±0.85
g-氨基正丁酸 g-ABA	1.89±0.87 ^{ab}	2.10±0.29 ^a	1.77±0.23 ^{ab}	1.52±0.49 ^{ab}	1.78±0.39 ^{ab}	1.22±0.59 ^b
色氨酸 Trp☆	8.17±1.24	9.96±2.96	12.04±4.29	11.31±4.07	11.26±3.27	8.27±3.48
鸟氨酸 Orn	4.44±0.52	5.10±1.10	5.14±1.53	5.04±1.00	6.00±1.15	5.41±0.83
赖氨酸 Lys☆	109.80±9.63 ^a	82.45±7.80 ^{ab}	89.06±9.84 ^{ab}	77.81±12.60 ^{abc}	53.38±18.13 ^{bc}	45.96±4.49 ^c
组氨酸 His☆	44.77±3.15 ^a	41.29±5.78 ^{ab}	41.54±3.19 ^{ab}	43.60±5.49 ^{ab}	39.53±7.14 ^{ab}	35.65±4.66 ^b
3-甲基组氨酸 3-Mehis	3.06±1.27	2.75±1.23	2.59±0.67	2.32±0.57	2.29±0.51	2.05±1.00
L-鹅肌肽 Ans	4.04±1.25	5.05±1.69	4.66±0.87	4.62±0.85	4.04±1.42	3.73±0.90
精氨酸 Arg☆	583.65±77.76 ^c	717.62±77.59 ^{ab}	677.61±64.68 ^b	709.79±24.10 ^{ab}	792.22±45.14 ^a	780.56±54.83 ^a
鲜味氨基酸 TDEE	339.15±26.05	332.13±47.93	352.91±35.73	303.72±16.12	305.22±23.67	304.75±16.12
必需氨基酸 TEAA	843.81±58.33 ^b	961.14±81.53 ^a	914.63±53.58 ^{ab}	946.85±22.70 ^a	988.11±54.91 ^a	952.81±50.70 ^a
总氨基酸 TAA	1385.77±75.96 ^b	1509.94±58.87 ^a	1466.94±61.20 ^{ab}	1464.66±40.86 ^{ab}	1484.90±77.11 ^{ab}	1434.83±61.57 ^{ab}

注: “*” 示鲜味氨基酸; “☆” 示必需氨基酸。表中同行数据后上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 同行数据后未标注字母表示无显著差异($P > 0.05$)。 “/” 表示未测到。

Note: “*” means delicious amino acid; “☆” means essential amino acid. Values in the same row with different small letter superscript mean significant difference ($P < 0.05$). Values without superscript in the same row are not significantly different ($P > 0.05$). “/” means undetectable.

酸总量的 40%; 家蝇蛆粉替代鱼粉对鲜味氨基酸含量无明显影响, 各替代组对虾肌肉鲜味氨基酸含量以及鲜味氨基酸总量均与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾的必需氨基酸总量和单个必需氨基酸含量影响不显著 ($P > 0.05$)。非必需氨基酸和氨基酸总量方面, 各实

验组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾肌肉肌苷酸含量的影响

各组对虾肌肉肌苷酸含量如图 1 所示。各替代组对虾肌肉中肌苷酸含量均高于对照组, 其中 G20-G80 组与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$),

表 4 家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾肌肉结合氨基酸组成的影响

Tab.4 Effects of replacement of fish meal by HMM on combined amino acids composition in muscle of *L.vannamei*n=4; $\bar{x} \pm SD$; %, 干重 dry matter

氨基酸 amino acids	分组 trial					
	G0	G20	G40	G60	G80	G100
天冬氨酸 Asp *	10.43±0.57 ^{ab}	10.21±0.34 ^{ab}	10.25±0.39 ^{ab}	10.67±0.40 ^{ab}	10.77±0.31 ^a	10.13±0.21 ^b
苏氨酸 Thr☆	2.99±0.24	2.94±0.14	2.96±0.21	3.04±0.12	3.10±0.07	2.89±0.09
丝氨酸 Ser	2.86±0.17	2.81±0.08	2.73±0.11	2.90±0.17	2.85±0.14	2.70±0.07
谷氨酸 Glu *	14.65±0.47	14.19±0.72	14.01±0.30	14.51±0.74	14.27±0.34	13.79±0.79
脯氨酸 Pro	5.92±0.40	5.69±0.32	5.89±0.48	6.09±0.44	5.92±0.32	5.74±0.37
甘氨酸 Gly *	6.42±0.52	6.37±0.18	6.19±0.22	6.58±0.31	6.39±0.28	6.30±0.19
丙氨酸 Ala *	4.90±0.59	4.75±0.17	4.58±0.17	4.63±0.09	4.70±0.54	4.36±0.11
半胱氨酸 Cys	0.110±0.027 ^{ab}	0.097±0.040 ^{ab}	0.065±0.003 ^b	0.130±0.035 ^a	0.091±0.038 ^{ab}	0.056±0.031 ^b
缬氨酸 Val☆	3.14±0.10 ^{ab}	3.24±0.10 ^{ab}	3.13±0.18 ^{ab}	3.20±0.08 ^{ab}	3.26±0.05 ^a	3.08±0.07 ^b
蛋氨酸 Met☆	1.35±0.18	1.38±0.13	1.48±0.19	1.40±0.11	1.45±0.22	1.46±0.10
异亮氨酸 Ile☆	3.02±0.15	3.13±0.10	3.02±0.24	3.03±0.08	3.16±0.10	2.94±0.09
亮氨酸 Leu☆	5.37±0.10	5.56±0.22	5.39±0.32	5.53±0.19	5.49±0.27	5.29±0.17
酪氨酸 Tyr	2.84±0.08	2.90±0.19	2.83±0.13	2.81±0.10	2.89±0.12	2.70±0.20
苯丙氨酸 Phe☆	3.10±0.07	3.36±0.16	3.14±0.21	3.12±0.11	3.25±0.23	3.11±0.08
赖氨酸 Lys☆	6.16±0.77	6.34±1.00	6.25±0.40	5.73±0.8	6.47±1.37	5.69±1.16
组氨酸 His☆	2.14±0.53	2.31±0.74	2.03±0.05	1.81±0.27	2.26±0.33	1.86±0.32
精氨酸 Arg☆	7.24±0.21	7.67±0.60	7.19±0.34	7.35±0.38	7.82±0.57	7.47±0.69
鲜味氨基酸 TDEE	36.40±1.93	35.53±0.56	35.04±0.93	36.38±1.35	36.12±0.56	34.57±1.03
必需氨基酸 TEAA	34.51±0.34	35.92±2.36	34.60±1.76	34.21±0.97	36.26±2.47	33.78±2.45
总氨基酸 TAA	82.65±2.12 ^{ab}	82.95±2.50 ^{ab}	81.14±3.22 ^{ab}	82.51±1.65 ^{ab}	84.14±2.68 ^a	79.55±3.56 ^b

注：“*”示鲜味氨基酸；“☆”示必需氨基酸。表中同行数据后上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)，同行数据后未标注字母表示无显著差异($P>0.05$)。

Note：“*”means delicious amino acid; “☆”means essential amino acid. Values in the same row with different small letter superscript mean significant difference($P<0.05$). Values without superscript in the same row are not significantly different($P>0.05$).

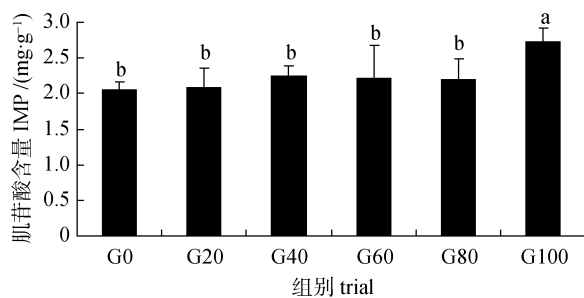


图 1 家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾肌肉肌苷酸含量的影响

柱上不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)；反之则表示组间差异不显著。

Fig.1 Effects of replacement of fish meal by HMM on inosine monophosphate (IMP) content in muscle of *L.vannamei*

Values in the same row with different small letter superscript mean significant difference($P<0.05$). Values without superscript in the same row are not significantly different($P>0.05$).

G100 组肌苷酸含量比对照组显著升高(+32.0%) ($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾肌肉常规成分的影响

本实验中，随家蝇蛆粉替代鱼粉水平的增加，凡纳滨对虾肌肉粗蛋白和灰分含量显著增加，水分和粗脂肪含量各组之间差异不显著。这与 Yang 等^[19]用家禽副产物替代鱼粉对鲤鱼(*Carassius auratus gibelio*)以及 Shapawi 等^[20]用宠物级家禽副产物替代鱼粉对石斑鱼(*Cromileptes altivelis*)的研究结果相一致，但与 Ogunji 等^[15]用蝇蛆粉替代鱼粉对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的研究结果不同。该作者研究表明，各组罗非鱼体粗蛋

白含量无明显差异, 随蝇蛆粉替代水平的提高, 鱼体粗脂肪含量显著升高, 水分和灰分含量显著降低。Fasakin 等^[11]用 4 种不同来源的蝇蛆粉完全替代鱼粉对非洲鲷的研究表明, 鱼体水分、粗蛋白、粗脂肪、灰分含量不受蝇蛆粉的影响, 各组之间均无显著性差异。蝇蛆粉对水产动物常规营养成分的影响可能与肉骨粉类似, 除了鱼的种类不同外, 不同的饲料组成和环境因素可能是引起不同鱼类摄食蝇蛆粉后体组成差异的原因所在^[20]。

一般而言, 鱼肉水分含量高, 则蛋白质、脂肪含量就会减少, 鱼肉品质就差, 反之则肥嫩好吃, 鱼肉品质好^[8]。罗庆华等^[21]研究表明, 在饲料中添加杜仲叶粉可以使鲤鱼肌肉粗蛋白含量升高, 脂肪含量降低, 氨基酸总量和必需氨基酸含量有所提高, 表明杜仲叶粉可以提高鲤鱼肌肉的营养价值。段青源等^[22]研究发现, 与口感和营养价值较高的天然大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)相比, 网箱养殖的大黄鱼体蛋白含量低、粗脂肪含量较高。倪娟等^[23]的研究也表明, 与营养价值较低的养殖日本沼虾(*Macrobrachium nipponensis*)相比, 营养价值高的野生日本沼虾肌肉粗蛋白含量显著高于养殖种群, 粗脂肪含量显著低于养殖种群。本实验中, 与对照组相比, 各蝇蛆粉组凡纳滨对虾肌肉水分含量无明显变化, 粗蛋白含量高于对照组, 粗脂肪含量有不同程度的降低, 表明家蝇蛆粉替代鱼粉不会对凡纳滨对虾肌肉常规成分产生显著的不利影响。

3.2 家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾肌肉氨基酸含量的影响

谷氨酸、甘氨酸、天冬氨酸和丙氨酸被认为是鲜味氨基酸, 虾肉味道的鲜美程度主要由肌肉中鲜味氨基酸的组成和含量来决定的^[24], 其中谷氨酸、天冬氨酸是呈鲜味的特征性氨基酸, 甘氨酸、丙氨酸是呈甘味的特征性氨基酸^[25]。对虾肌肉中氨基酸的组成和含量, 尤其是必需氨基酸的含量高低和构成比例, 是评价食物蛋白质营养价值的重要指标^[23]。游离氨基酸中, 牛磺酸具有抑制血小板凝集、降血压、降低胆固醇、保护视力、促进大脑发育、防治胆结石等多种生理功能^[25]。

本实验中, 各组凡纳滨对虾肌肉中牛磺酸、单个鲜味氨基酸的含量和鲜味氨基酸总量与对照组相比差异均不显著。必需氨基酸方面, G20-G60 组游离的单个必需氨基酸含量和游离必需氨基酸总量与对照组相比差异不显著, 或者显著高于对照组, 随替代水平的提高, G100 组对虾肌肉游离赖氨酸、亮氨酸等必需氨基酸含量显著降低。这与 Albrektsen 等^[26]用植物蛋白源替代鱼粉对大西洋鳕(*Gadus morhua*)、Ai 等^[27]用肉骨粉替代鱼粉对大黄鱼, 韩斌等^[7]、程媛媛等^[28]分别用玉米蛋白粉替代鱼粉对凡纳滨对虾、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的研究结果相似。但是 Regost 等^[29]用玉米蛋白粉对大菱鲆(*Psetta maxima*)的研究显示, 各替代组大菱鲆背肌中游离赖氨酸、精氨酸、异亮氨酸和苏氨酸等必需氨基酸含量均显著低于对照组, 并认为可能与氨基酸的消化率降低有关。Gomez-Requeni 等^[30]用植物蛋白源替代鱼粉对金头鲷(*Sparus aurata*)的研究表明, 替代组金头鲷白肌中游离精氨酸、赖氨酸的含量显著降低, 并认为与肌肉中游离精氨酸和赖氨酸被快速利用有关。本实验中, 与对照组相比, 凡纳滨对虾肌肉结合氨基酸中赖氨酸和精氨酸的含量无显著性变化, 但随家蝇蛆粉替代水平的提高, G80-G100 组游离赖氨酸含量显著降低($P < 0.05$), 游离精氨酸含量显著升高, 可能是与饲料中精氨酸与赖氨酸不平衡有关。有研究表明, 赖氨酸和精氨酸可能共用一个载体, 赖氨酸和精氨酸在肠道中的吸收可能会发生交互作用^[31]。

3.3 家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾肌肉肌苷酸含量的影响

研究表明, 对鲜味贡献最大的两类物质分别为氨基酸和核苷酸, 核苷酸主要包括肌苷酸和鸟苷酸, 在野生鲤鱼的风味组成中, 肌苷酸含量占核苷酸总量的 60%, 肌苷酸是相当重要的风味指标, 目前国际上已将肌苷酸的含量作为衡量肉质鲜味的一个重要指标^[32-33]。本实验中, 各蝇蛆粉替代组凡纳滨对虾肌肉中肌苷酸的含量均高于对照组, 其中 G100 组肌苷酸含量显著高于对照组。目前尚未见到鱼粉替代蛋白源对水产动物肌肉肌

苷酸含量影响的报道。占秀安等^[34]研究表明,在饲料中添加甜菜碱可以显著提高中华鳖(*Trionyx sinensis*)肌肉中肌苷酸的含量;吴成福等^[35]在饲料中添中低水平的 L-肉碱可提高斑节对虾(*Penaeus monodon*)肌肉中肌苷酸的含量。有研究表明,野生对虾肌肉肌苷酸含量高于养殖对虾^[35],海水养殖对虾肌肉肌苷酸含量要高于淡水养殖对虾^[36],肌苷酸除自身呈鲜味之外,与谷氨酸共存时有鲜味增效作用,可能会使海水养殖对虾或野生对虾的鲜味明显高于淡水养殖对虾。本实验中,添加家蝇蛆粉并未使凡纳滨对虾肌肉中肌苷酸的含量降低,肌肉中谷氨酸等鲜味氨基酸的含量各组之间也没有显著差异,表明家蝇蛆粉替代鱼粉不会降低凡纳滨对虾肌肉的鲜味。

4 结论

当家蝇蛆粉替代鱼粉水平不超过 60%时,除凡纳滨对虾肌肉游离精氨酸含量显著升高外,对肌肉常规营养成分组成和必需氨基酸、鲜味氨基酸、肌苷酸含量无显著性影响。

参考文献:

- [1] 张伟权. 世界重要养殖品种—南美白对虾生物学简介[J]. 海洋科学, 1990(3): 69-73.
- [2] 黄永春, 艾华水, 殷志新, 等. 第四代凡纳滨对虾抗 WSSV 选育家系的抗病及免疫特性研究[J]. 水产学报, 2010, 34(10): 1549-1558.
- [3] 周歧存, 麦康森, 刘永坚, 等. 动植物蛋白源替代鱼粉研究进展[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 404-410.
- [4] Forster I P, Dominy W, Obaldo L, et al. Rendered meat and bone meals as ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)[J]. Aquaculture, 2003, 219: 655-670.
- [5] Yang Y, Xie S, Lei W, et al. Effect of replacement of fish meal by meat and bone meal and poultry by-product meal in diets on the growth and immune response of *Macrobrachium nipponense*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 17: 105-114.
- [6] Hernandez C, Olvera-Novoa M A, Aguilar-Vejar K, et al. Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Aquaculture, 2008, 277: 244-250.
- [7] 韩斌, 黄旭雄, 华雪铭, 等. 玉米蛋白粉替代部分鱼粉对凡纳滨对虾摄食量、生长和肌肉成分的影响[J]. 水产学报, 2009, 33(4): 658-665.
- [8] 刘丽, 余红心, 肖维, 等. 鱼肉品质的研究进展[J]. 内陆水产, 2008(8): 9-12.
- [9] 贾生福. 蝇蛆蛋白质饲料在畜牧业中的应用效果初探[J]. 中国动物保健, 2004(10): 31.
- [10] Sogbesan A O, Ajuonu N, Musa B O, et al. Harvesting techniques and evaluation of maggot meal as animal dietary protein source for 'Heteoclarias' in outdoor concrete tanks[J]. World J Agr Sci, 2006, 2(4): 394-402.
- [11] Fasakin E A, Balogun A M, Ajayi O O. Evaluation of full-fat and defatted maggot meals in the feeding of clariid catfish *Clarias gariepinus* fingerlings[J]. Aqu Res, 2003, 34: 733-738.
- [12] Fashina-Bombata H A, Balogun O. The effect of partial or total replacement of fish meal with maggot meal in the diet of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry[J]. J Prosp Sci, 1997(1): 178-181.
- [13] Ajani E K, Nwanna L C, Musa B O. Replacement of fish-meal with maggot meal in the diets of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. World Aqu Res, 2004, 35(1): 52-54.
- [14] Ogunji J O, Nimptsch J, Wiegand C, et al. Evaluation of the influence of housefly maggot meal (maggot meal) diets on catalase, glutathione S-transferase and glycogen concentration in the liver of *Oreochromis niloticus* fingerling[J]. Comp Biochem Physiol-Part A: Molec Integrat Physiol, 2007, 147(4): 942-947.
- [15] Ogunji J O, Kloas W, Wirth M, et al. Housefly maggot meal (Maggot meal) as a protein source for *Oreochromis niloticus*(Linn.)[J]. Asian Fish Sci, 2008, 21(3): 319-331.
- [16] Ogunji J, Toor R S, Schulz C. Growth performance, nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed housefly maggot meal (Maggot meal) diets[J]. Turkish J Fish Aqu Sci, 2008, 8: 141-147.
- [17] 李宝山, 冷向军, 李小勤, 等. 投饲蚕豆对草鱼生长和肌肉品质的影响[J]. 中国水产科学, 2008, 15(6): 1042-1049.
- [18] 马莺, 王静, 牛天娇. 功能性食品活性成分测定[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 302-304.
- [19] Yang Y, Xie S, Cui Y, et al. Partial and total replacement of fishmeal with poultry by-product meal in diets for gibel carp, *Carassius auratus* gibelio Bloch[J]. Aqu Res, 2006, 37: 40-48.
- [20] Shapawi R, Ng W, Mustafa S. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in diets formulated for the

- humpback grouper, *Cromileptes altivelis*[J]. Aquaculture, 2007, 273: 118-126.
- [21] 罗庆华, 卢向阳, 李文芳. 杜仲叶粉对鲤鱼肌肉品质的影响[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2002, 28(3): 212-214.
- [22] 段青源, 钟惠英, 斯列钢, 等. 网箱养殖大黄鱼与天然大黄鱼营养成分的比较分析[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2000, 19(2): 125-128.
- [23] 倪娟, 赵晓勤, 陈立侨, 等. 日本沼虾 4 种群肌肉营养品质的比较[J]. 中国水产科学, 2003, 10(3): 212-215.
- [24] 潘英, 王如才, 罗永巨, 等. 海水和淡水养殖南美白对虾肌肉营养成分的分析比较[J]. 青岛海洋大学学报: 自然科学版, 2001, 31(6): 828-834.
- [25] 章超桦, 吴红棉, 洪鹏志, 等. 马氏珠母贝肉的营养成分及其游离氨基酸组成[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 180-184.
- [26] Albrektsen S, Mundheim H, Aksnes A. Growth, feed efficiency, digestibility and nutrient distribution in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed two different fish meal qualities at three dietary levels of vegetable protein sources[J]. Aquaculture, 2006, 261: 626-640.
- [27] Ai Q, Mai K, Tan B, et al. Replacement of fish meal by meat and bone meal in diets for large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*[J]. Aquaculture, 2006, 260: 255-263.
- [28] 程媛媛, 周洪琪, 华雪铭, 等. 玉米蛋白粉部分替代鱼粉对罗氏沼虾生长、氨基酸沉积率和肌肉营养成分的影响[J]. 中国水产科学, 2009, 16(4): 572-579.
- [29] Regost C, Arzel J, Kaushik S J. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*)[J]. Aquaculture, 1999, 180: 99-117.
- [30] Gomez-Requeni P, Mingarro M, Caldach-Giner J A, et al. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. Aquaculture, 2004, 232: 493-510.
- [31] Berge G E, Bakke-Mckellep A M, Lied E. In vitro uptake and interaction between arginine and lysine in the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Aquaculture, 1999, 179: 181-193.
- [32] 张海艳, 于太永, 关伟军. 肌苷酸形成机理及其含量影响因素浅析[J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(3): 17-21.
- [33] 刘旭, 王军, 张纹, 等. 6 种鱼类肌肉组织肌苷酸的检测分析[J]. 海洋科学, 2008, 32(2): 22-24, 35.
- [34] 占秀安, 钱利纯, 李卫芬. 甜菜碱对中华鳖肌肉和裙边食用品质指标的影响[J]. 水产科学, 2001, 20(4): 4-6.
- [35] 吴成福, 江世贵, 林黑着, 等. 饲料中 L-肉碱对斑节对虾肌肉中肌苷酸含量的影响[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(1): 72-76.
- [36] 王士稳, 梁萌青, 林洪, 等. 海水和淡水养殖凡纳滨对虾呈味物质的比较分析[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(5): 79-84.

Effects of replacement of fish meal with housefly maggot meal on muscle nutritional composition, amino acids, and inosine monophosphate content in juvenile *Litopenaeus vannamei*

YAN Jing^{1,2,3,4}, CAO Junming^{2,3,4}, WANG Guoxia^{2,3,4}, HUANG Yanhua^{2,3,4}, ZHANG Rongbin^{1,2,3,4}, LIU Qunfang^{2,3,4}, SUN Zhiwu^{1,2,3,4}, WEN Yuanhong^{2,3,4}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

3. Guangdong Public Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Guangzhou 510640, China;

4. Guangdong Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Guangzhou 510640, China

Abstract: We evaluated the effects of replacing fish meal with housefly maggot meal (HMM) on the nutritional composition, amino acids, and inosine monophosphate content in the muscle of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Six isonitrogenous and isoenergetic diets (G0, G20, G40, G60, G80, and G100) were formulated by replacing 0, 20%, 40%, 60%, 80%, or 100%, respectively, of the fish meal with HMM (protein basis). The shrimp initial body weight (0.56 ± 0.03 g), were fed the experimental diets for 45 d. There was a positive correlation between crude protein and ash content in the muscle and the proportion HMM in the diet. The crude protein content in G100 and the ash content in G80 and G100 were significantly higher than in the control group ($P < 0.05$). HMM had no effect on moisture and crude lipid content ($P > 0.05$). Similarly, there was no difference in free delicious amino acid (DAA) content (glutamate and alanine only) and total free DAA among the groups. Total free essential amino acid (FEAA) content was significantly higher in groups G40 to G100 than in G0 ($P < 0.05$). Increasing amounts of HMM were associated with a significant increase in free arginine content ($P < 0.05$) and a significant decrease in lysine content ($P < 0.05$). The total free amino acid content was significantly higher in G20, but not in G40–G100, than in G0 ($P > 0.05$). The inclusion of HMM only had an effect on inosine monophosphate (IMP) content at the highest level (G100: $P < 0.05$). There was no significant difference in the content of combined DAA (aspartate, glutamate, glycine, alanine), EAA, or total amino acids in the muscle of groups fed HMM compared to the control ($P > 0.05$). Overall, inclusion of HMM had no significant effect on the nutritional composition, EAA, DAA, and IMP content in the muscle, with the exception that the free arginine content increased significantly when HMM was substituted at levels below 60%.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; fish meal; housefly maggot meal; muscle; nutritional composition; amino acids; inosine monophosphate

Corresponding author: CAO Junming. E-mail: junmcao@163.com