

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18092

大豆抗原蛋白对罗氏沼虾生理生化及免疫的影响

杨景丰^{1, 2, 3}, 郭子好⁴, 蔡修兵⁵, 华雪铭^{1, 2, 3}, 刘韬^{1, 2, 3}, 孔纯^{1, 2, 3}, 冯悦^{1, 2, 3},
王刚^{1, 2, 3}

1. 上海海洋大学, 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306;
2. 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;
3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;
4. 上海源耀生物股份有限公司, 上海 201316;
5. 安徽省巢湖市槐林镇农业综合服务站, 安徽 巢湖 238054

摘要: 为探讨大豆抗原蛋白与豆粕饲用效果的关系, 本研究配制 4 种等氮等能的实验饲料, 以含有 21.5%鱼粉、15.45%豆粕和 15%发酵豆粕的实用饲料为基础饲料(T15 组), 用发酵豆粕完全替代 T15 组中的豆粕(TF 组), 比较发酵豆粕对豆粕的替代效果; 再以鱼粉、酪蛋白和大豆分离蛋白为主要蛋白源分别配制与 T15、TF 组相近抗原蛋白含量的半纯化饲料 AP5、AP0(抗原蛋白含量分别为 5%和 0%)组, 探究抗原蛋白的生物学效应。选用初始体重为 (0.17 ± 0.02) g 的罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)在室内水泥池网箱中进行为期 64 d 的养殖实验。结果显示: 两种系列饲料中, 大豆抗原蛋白含量的降低对罗氏沼虾生长、血清生化指标及免疫相关基因表达有不同的影响。在实用饲料组中, 随着大豆抗原蛋白的降低, 罗氏沼虾的增重率、肝胰腺蛋白酶活力、血清白蛋白、总蛋白、鳃 Toll 受体 mRNA、NF- κ B mRNA 和肝胰腺 HSP70 mRNA 相对表达量都显著降低($P < 0.05$), 而血清超氧化物歧化酶活力显著升高($P < 0.05$); 在纯化饲料组中, 随着大豆抗原蛋白的降低, 罗氏沼虾的增重率、血清超氧化物歧化酶活力和丙二醛含量、肝胰腺 HSP70 mRNA 相对表达量没有显著性差异($P > 0.05$), 肝胰腺淀粉酶活力、蛋白酶活力、血清白蛋白、总蛋白都显著降低($P < 0.05$), 而肌肉粗灰分、血清香草转氨酶活力、鳃 Toll 受体 mRNA、NF- κ B mRNA 相对表达量显著升高($P < 0.05$)。比较实用饲料组与半纯化饲料组的结果可知, 罗氏沼虾对实用饲料中 5%的大豆抗原蛋白有一定的耐受性, 并且有利于其生长和健康, 推测大豆抗原蛋白与豆粕中的其他抗营养因子间存在有益的联合效应, 显著降低其中的大豆抗原蛋白含量则不利于蛋白合成代谢和肝胰腺健康, 导致生长性能下降。建议在实际生产中发酵豆粕和豆粕按一定比例混合使用。

关键词: 罗氏沼虾; 大豆抗原蛋白; 生长; 血清生化指标; 免疫基因

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)02-0322-11

大豆抗原蛋白是豆粕的主要营养成分, 也是豆粕主要的抗营养因子之一, 其中大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白具有较强的免疫原性和热稳定性^[1]。对仔猪(*Sus*)^[2]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[3-4]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[5]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[6]的研究证实, 大豆抗原蛋白能够引起

动物特别是幼小动物消化道过敏反应, 造成胃、肠道的免疫损伤, 同时限制对营养物质的消化吸收, 抑制生长; 激活机体特异性和非特异性免疫, 如特异性 IgE 介导的 I 型过敏反应、上调 Toll 受体和 NF- κ B 等相关免疫基因表达量、增加免疫细胞数量和提高相关酶活力参与宿主防御异物的免疫

收稿日期: 2018-03-13; 修订日期: 2018-09-10.

基金项目: 农业部淡水水产种质资源重点实验室开放课题.

作者简介: 杨景丰(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料. E-mail: 1014299589@qq.com

通信作者: 华雪铭, 教授, 硕士生导师, 研究方向为水产动物营养与饲料. E-mail: xmhua@shou.edu.cn

反应; 经过机体损伤、氧化应激等作用后导致细胞发生热休克反应, 甚至死亡。与豆粕中其他抗营养因子相比, 大豆抗原蛋白对蛋白质利用率的影响更显著, 对动物造成的危害更加严重^[7]。因此, 大豆抗原蛋白是限制大豆蛋白源在水产动物饲料中应用的关键因素, 钝化或消除大豆抗原蛋白对机体负面作用成为近几年的研究热点。研究表明, 利用微生物发酵技术可以大大降低大豆抗原蛋白的含量, 且发酵豆粕有着比普通豆粕更好的鱼粉替代效果^[8-9]。但这并不表示发酵豆粕过量使用或完全替代鱼粉后仍不会对水产动物肠道及肝脏产生负面影响^[10], 普通豆粕仍有使用的必要。

抗营养因子的抗营养作用是相对的^[11]。对建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)的研究表明, 低剂量大豆抗原蛋白能激发机体的免疫系统, 增强对外界病原菌的抗感染能力, 但是如果剂量超过了一定的限度, 则会破坏动物肠道上皮和细胞结构, 使机体的特异性免疫受到抑制^[12]。此外, 抗营养因子对机体的作用还与豆粕中的其他多种抗营养因子如胰蛋白酶抑制剂、凝集素等有关, 抗营养因子的联合效应或导致更强的毒性, 或增强机体的整体功能^[13]。因此研究大豆抗原蛋白与其他抗营养因子的相互作用具有重要的实际意义。

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)又称马来西亚大虾、淡水长臂大虾, 是世界淡水虾类养殖的主要种类之一。目前, 对于罗氏沼虾不同生长阶段蛋白质的需求量已有较多的研究^[14-16], 使用廉价蛋白源替代鱼粉也有少许报道, 如豆粕^[17]、玉米蛋白粉^[18]和肉骨粉^[19]等。在鱼粉资源紧缺的情况下, 增加植物蛋白豆粕或发酵豆粕的用量成为减少鱼粉用量的重要途径。本研究以罗氏沼虾为实验动物, 比较研究发酵豆粕与豆粕对罗氏沼虾的生长性能、抗氧化能力及免疫机能的影响, 探讨大豆抗原蛋白与替代效果之间的联系, 为豆粕的改良和罗氏沼虾饲料配方的优化提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

根据罗氏沼虾的营养需求, 配制以秘鲁鱼粉(蛋白含量 67%)、豆粕(蛋白含量 46%, 球蛋白含

量约 180 mg/g, β -伴球蛋白含量约 140 mg/g)和发酵豆粕(蛋白含量 49%, 球蛋白含量约 10 mg/g, β -伴球蛋白含量约 3 mg/g)为主要蛋白源的实用饲料(T15 组)。在此基础上, 用发酵豆粕完全替代 T15 组中的豆粕(TF 组), 比较发酵豆粕对豆粕的替代效果; 再以鱼粉、酪蛋白和大豆分离蛋白(蛋白含量 90%, 球蛋白 179.74 mg/g 和 β -伴球蛋白 138.18 mg/g)为主要蛋白源, 分别配制与 T15、TF 组相近抗原蛋白含量的半纯化饲料 AP5、AP0 组, 探讨抗原蛋白的生物学效应, AP5 中除大豆抗原蛋白外, 无其他抗营养因子。两种实用饲料和半纯化饲料等氮等能(表 1)。将各种饲料原料粉碎, 过 80 目筛, 按配方称重用逐级扩大法混合均匀, 添加鱼油和适量水用绞肉机加工成直径为 1.5 mm 的条状, 90℃熟化 20 min, 避光晾干后破碎成实验虾可摄食的大小, 装自封袋室温保存备用。

1.2 饲养管理

养殖实验在上海海洋大学滨海养殖基地进行, 罗氏沼虾苗购自上海市水产研究所, 预先用漂白粉将暂养池和实验池消毒, 冲洗干净。虾苗暂养 30 d, 待幼虾规格达到(0.17±0.02) g 时, 挑选规格整齐、健康无病的实验虾, 分到规格为 2 m×1.5 m×1 m 的网箱中, 共 4 组, 每组设置 4 个重复, 每个重复放养 60 尾虾。实验开始前用商品饲料驯养 5~7 d, 待虾能正常摄食且无死亡后开始实验。每天投喂 4 次(6:00, 10:00, 16:00, 21:30), 以早晚投喂为主, 日投喂量为罗氏沼虾体重的 3%~5%, 达表观饱食。实验为期 64 d, 实验期间 24 h 充气, 溶解氧 ≥6 mg/L, 不定期吸污换水, 进水均用 200 目筛网过滤, 水温为 26~30℃, 氨氮 ≤0.3 mg/L, pH 7.8~8.3。

1.3 样品采集和指标测定

养殖实验结束后, 停食 24 h, 逐个网箱称重、计数。然后从每个网箱随机取 12 尾虾, 先用 1 mL 注射器于围心腔处取血淋巴于 1.5 mL 离心管中; 取肝胰腺和鳃放入无菌离心管中, 并在液氮中短暂保存; 最后将所有样品置于 -80℃ 保存用于后续检测分析。

1.3.1 生长性能测定

成活率(survival rate, SR, %) = 实验结束时虾尾数/实验初始时虾尾数×100

表 1 饲料组成和营养水平
Tab. 1 Composition and nutrient levels of diets
%, 干物质 dry matter

配方成分 ingredient	饲料 diet			
	T15	TF	AP5	AP0
秘鲁鱼粉 Peru fish meal	21.50	21.50	21.50	21.50
豆粕 soybean meal	15.45	0	0	0
发酵豆粕 fermented soybean meal	15.00	28.70	0	0
酪蛋白 casein	0	0	8.34	24.50
大豆分离蛋白 soy protein isolate	0	0	16.16	0
玉米蛋白粉 corn gluten meal	5.00	5.00	0	0
花生粕 peanut meal	7.00	7.00	0	0
肉粉 meat meal	7.00	7.00	0	0
鱼油 fish oil	1.40	1.40	4.00	4.00
磷脂粉 phospholipid	2.00	2.00	2.00	2.00
面粉 wheat flour	20.80	22.55	22.80	22.80
糊精 dextrin	0	0	5.20	5.20
明胶 gelatin	0	0	8.00	8.00
多矿 ¹⁾ mineral premix ¹⁾	0.70	0.70	0.70	0.70
多维 ²⁾ vitamin premix ²⁾	0.80	0.80	0.80	0.80
微晶纤维素 MCC	0	0	5.70	6.50
羧甲基纤维素钠 CMC	0	0	2.00	2.00
乌贼膏 squid meal	2.00	2.00	2.00	2.00
蛋氨酸 Met	0.35	0.35	0.30	0
赖氨酸 Lys	0.80	0.80	0.40	0
苏氨酸 Thr	0.20	0.20	0.10	0
合计 total	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 nutrient level				
粗蛋白 crude protein	43.40	43.38	43.39	43.60
粗脂肪 ether extract	6.89	6.79	6.90	6.77
蛋氨酸 Met	1.78	1.77	1.74	1.74
赖氨酸 Lys	1.09	1.09	1.09	1.13
苏氨酸 Thr	3.21	3.19	3.21	3.25
大豆抗原蛋白含量 soybean antigen protein	5.14	0.37	5.14	0

注: 1) 每千克矿物质预混料含有: Ca, 10.5 g; K, 90 g; Mg, 12 g; Fe, 1.0 g; Cu, 3.0 g; Zn, 10 g; Mn, 3.8 g; Co, 0.8 g; Se, 20 mg.
2) 每千克维生素预混料含有: 维生素 A, 8000000 IU; 维生素 D, 2000000 IU; 维生素 E, 50 g; 维生素 K, 10 g; 维生素 B₁, 5 g; 维生素 B₂, 15 g; 维生素 B₆, 8 g; 维生素 B₁₂, 0.02 g; 烟酰胺, 40 g; D-泛酸钙, 25 g; 叶酸, 2.5 g; 生物素, 0.08 g; 肌醇, 100 g.
Note: 1) Contain the following per kg of mineral premix: Ca, 10.5 g; K, 90 g; Mg, 12 g; Fe, 1.0 g; Cu, 3.0 g; Zn, 10 g; Mn, 3.8 g; Co, 0.8 g; Se, 20 mg.
2) Contain the following per kg of vitamin premix: vitamin A, 8000000 IU; vitamin D, 2000000 IU; vitamin E, 50 g; vitamin K, 10 g; vitamin B₁, 5 g; vitamin B₂, 15 g; vitamin B₆, 8 g; vitamin B₁₂, 0.02 g; nicotinamide, 40 g; calcium D-pantothenate, 25 g; folic acid, 2.5 g; biotin, 0.08 g; inositol, 100 g.

增重率(weight gain rate, WGR, %) = (终末平均体重-初始平均体重)/初始平均体重×100

特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d) = (ln 终末平均体重-ln 初始平均体重)×100/实验周期

饲料系数(feed conversion ratio, FCR) = 平均摄食量/(终末平均体重-初始平均体重)

1.3.2 其他指标测定 豆粕、发酵豆粕和大豆分离蛋白中的抗原蛋白用大豆球蛋白和 β-伴大豆球蛋白定量测定试剂盒(酶联免疫法)进行测定, 试剂盒由北京龙科方舟生物公司提供。

对肌肉样品进行常规营养成分检测, 粗蛋白质采用凯氏定氮法, 粗脂肪采用氯仿甲醇法测定, 粗灰分采用 550℃灼烧法测定。

血淋巴经 4℃、10000 r/min 离心 20 min 取血清, -20℃保存待测; 肝胰腺取适宜大小的组织块, 按 1 : 9 (*m* : *v*)的比例加入生理盐水, 在玻璃匀浆机上匀浆。匀浆液在 4℃, 4000 r/min 下离心 10 min, 上清液经稀释待测。血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、肝胰腺淀粉酶(α-amylase)采用南京建成生物工程有限公司试剂盒检测, 蛋白酶活力(trypsin)采用福林酚法测定, 谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)用迈瑞全自动生化分析仪测定。

其中, 淀粉酶活力采用碘-淀粉比色法测定, 酶活力定义: 每毫克蛋白在 37℃与底物作用 30 min, 水解 10 mg 淀粉定义为 1 个淀粉酶活力单位(U/mg prot); 蛋白酶活力采用福林酚法测定, 酶活力定义: 每毫克蛋白在 40℃下每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸, 定义为 1 个蛋白酶活力单位(U/mg prot); ALT 和 AST 均采用 IFCC 法, 酶活力定义: 单位待测样本与基质在 37℃下反应, 340 nm 下, NADH 吸光度的下降速率(Δ*A*/min)乘以常数(*F*), 即为 1 个酶活力单位(U/L); SOD 采用黄嘌呤氧化酶测定法测定, 酶活力定义: 每毫升反应液中 SOD 抑制率达到 50%时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U)。

1.3.3 基因表达的荧光定量 PCR (qRT-PCR)分析 取-80℃冰箱中保存的各待测组织样本, 参照 Trizol(Invitrogen)操作说明书提取总 RNA。提

取的总 RNA 用紫外分光光度计测量 RNA 浓度, RNA 浓度高于 100 ng/μL, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0, 则认为 RNA 可用。用反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)将 RNA 反转录为 cDNA, 并保存在-20℃用于 qRT-PCR 分析。

采用在线 Primer 3 设计 Toll receptor、HSP70、NF-κB 基因 qRT-PCR 所用引物, 引物序列见表 2,

PCR 反应程序(表 3): 95℃预变性 15 min; 95℃变性 10 s, 58℃退火 32 s, 72℃延伸 32 s, 共 40 个循环。熔解曲线分析: 95℃, 15 s; 60℃, 1 min; 95℃, 30 s; 60℃, 15 s。以罗氏沼虾 β-肌动蛋白为内参, 对得到的各样品循环数(C_t)值进行均一化处理, 两种系列饲料以 T15 组 mRNA 为基准, 使用 2^{-ΔΔC_t} 比较 C_t 值方法对目的基因相对表达水平进行分析。

表 2 qRT-PCR 引物序列
Tab. 2 Primers sequences for qRT-PCR

引物名称 primer name	GenBank 登录号 GenBank accession no.	引物序列(5'-3') primer sequence	引物类型 primer type
Toll receptor	JF895474.1	TCTACGACCGCAACGAGC	Forward
		CGGAGTGGGAGTGAACAG	Reverse
HSP70	HG001455.1	CTCTGCCCAAGCAAGTAT	Forward
		GAATCTGTGCCTTATCCA	Reverse
NF-κB	KR827675.1	GTGGCTCACTTACGACTC	Forward
		AAGGTCCATACTCTTTC	Reverse
β-actin	AF221096.1	GTGCGTGACATCAAGGAA	Forward
		TTGTAGGTGGTCTCGTGAAT	Reverse

表 3 实时荧光定量反应体系
Tab. 3 Reaction system for quantitative real-time PCR

试剂名称 reagent name	使用量/μL dosage
Goldstar PCR Master Mix (2×)	10
ddH ₂ O	6.4
ROX	0.4
引物	1.2
cDNA	2

1.4 数据处理与统计分析

实验结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)的方式表示, 采用 SPSS 18.0 对数据进行独立样本 *t* 检验法比较, *P*<0.05 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 生长性能、体成分和肝胰腺消化酶活力

结果表明(表 4、表 5), 两种系列饲料组的存

表 4 各组罗氏沼虾的生长性能和体成分
Tab. 4 Growth performance and composition of whole body of *Macrobrachium rosenbergii* fed with different trial diets

指标 index	组别 group			
	T15	TF	AP5	AP0
成活率/% SR	89.17±1.67 ^a	85.00±10.00 ^a	94.12±5.84 ^A	93.89±2.55 ^A
增重率/% WGR	2024.71±4.71 ^b	1929.31±55.98 ^a	1960.30±69.12 ^A	2012.56±44.12 ^A
特定生长率/(%/d) SGR	4.75±0.02 ^a	4.70±0.05 ^a	4.73±0.05 ^A	4.76±0.03 ^A
饲料系数 FCR	1.33±0.09 ^a	1.50±0.14 ^a	1.38±0.05 ^A	1.41±0.07 ^A
粗蛋白 crude protein	86.27±0.58 ^a	86.41±0.87 ^a	85.14±0.77 ^A	85.54±0.68 ^A
粗脂肪 ether extract	4.61±0.18 ^a	4.75±0.26 ^a	4.93±0.33 ^A	4.86±0.36 ^A
灰分 ash	5.19±0.12 ^a	5.19±0.22 ^a	5.05±0.12 ^A	5.26±0.21 ^B

注: 不同小写字母表示 T15、TF 组差异显著(*P*<0.05), 不同大写字母表示 AP5、AP0 组差异显著(*P*<0.05), 相同字母表示差异不显著(*P*>0.05).
Note: Values with different small letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05) between T15 group and TF group, and with different uppercase letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05) between AP5 group and AP0 group, while with same letter superscripts in the same row mean no significant difference (*P*>0.05).

表 5 各组罗氏沼虾肝胰腺消化酶活力
Tab. 5 Digestive enzyme activities in hepatopancreas of *Macrobrachium rosenbergii* fed with different trial diets
 $n=4$; $\bar{x} \pm SD$

组别 group	指标 index	
	淀粉酶活力/(U/mg prot) amylase	蛋白酶活力/(U/mg prot) trypsin
T15	18.88±1.11 ^a	97.12±1.98 ^b
TF	19.96±2.93 ^a	65.26±1.79 ^a
AP5	18.85±1.38 ^B	112.11±3.50 ^B
AP0	14.24±1.55 ^A	105.03±4.03 ^A

注：不同小写字母表示 T15、TF 组差异显著($P<0.05$)，不同大写字母表示 AP5、AP0 组差异显著($P<0.05$)，相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。
Note: Values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$) between T15 group and TF group, and with different uppercase letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$) between AP5 group and AP0 group, while with same letter superscripts in the same row mean no significant difference ($P>0.05$).

活率、特定生长率、饲料系数、粗蛋白和粗脂肪均无显著性差异($P>0.05$)。随着抗原蛋白浓度的降低，增重率在这两种系列饲料中呈相反的趋势。实用饲料系列中，T15 组增重率显著高于 TF 组($P<0.05$)；半纯化饲料系列中，两组增重率无显著性差异($P>0.05$)。灰分 T15、TF 两组无显著性差异($P>0.05$)，而 AP0 组显著高于 AP5 组($P<0.05$)。

实用饲料组中，T15 组蛋白酶活力显著高于 TF 组($P<0.05$)，而淀粉酶活力无显著性差异($P>0.05$)；纯化饲料组中，AP5 组的淀粉酶活力和蛋白酶活力都显著高于 AP0 组($P<0.05$)。

2.2 血清抗氧化和生化指标

血清抗氧化指标(表 6)显示，实用饲料系列中 TF 组 SOD 活力显著高于 T15 组($P<0.05$)、而 MDA 含量变化不显著($P>0.05$)，T15 组表现出较大的抗氧化压力。半纯化饲料系列中，SOD 活力和 MDA 含量没有显著性差异($P>0.05$)。

由罗氏沼虾血清生化指标(表 7)可知，两种系列饲料中 ALB 和 TP 含量随着抗原蛋白浓度的降低都呈现降低的趋势。实用饲料系列中，T15 组的 TP 含量显著高于 TF 组($P<0.05$)，ALB 含量没有显著性差异($P>0.05$)；半纯化饲料系列中，AP5 组的 ALB、TP 含量都显著高于 AP0 组($P<0.05$)。实用饲料组 AST 和 ALT 的活力差异不显著($P>0.05$)，

表 6 各组罗氏沼虾血清抗氧化酶活力和丙二醛含量
Tab. 6 Antioxidant enzyme activities and MDA content in serum of *Macrobrachium rosenbergii* fed with different trial diets
 $n=4$; $\bar{x} \pm SD$

组别 group	指标 index	
	超氧化物歧化酶/(U/mL) SOD	丙二醛/(nmol/mL) MDA
T15	312.24±10.36 ^a	78.09±1.85 ^a
TF	350.47±7.51 ^b	79.76±0.51 ^a
AP5	315.19±16.40 ^A	91.17±8.58 ^A
AP0	311.64±11.28 ^A	85.95±0.98 ^A

注：不同小写字母表示 T15、TF 组差异显著($P<0.05$)，不同大写字母表示 AP5、AP0 组差异显著($P<0.05$)，相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。
Note: Values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$) between the T15 group and the TF group, and with different uppercase letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$) between the AP5 group and the AP0 group, while with same letter superscripts in the same row mean no significant difference ($P>0.05$).

表 7 各组罗氏沼虾血清生化指标
Tab. 7 Biochemical indices in serum of *Macrobrachium rosenbergii* fed with different trial diets
 $n=4$; $\bar{x} \pm SD$

组别 group	指标 index			
	谷草转氨酶 /(U/L) AST	谷丙转氨酶 /(U/L) ALT	白蛋白 /(g/L) ALB	总蛋白 /(g/L) TP
T15	49.42±6.78 ^a	37.53±4.48 ^a	12.63±2.55 ^a	94.98±3.06 ^b
TF	53.77±1.64 ^a	34.13±1.25 ^a	9.50±2.33 ^a	87.80±2.56 ^a
AP5	46.65±0.15 ^A	33.33±1.62 ^A	14.88±2.22 ^B	101.80±2.53 ^B
AP0	54.12±1.61 ^B	36.65±1.85 ^A	10.33±1.68 ^A	93.17±5.15 ^A

注：不同小写字母表示 T15、TF 组差异显著($P<0.05$)，不同大写字母表示 AP5、AP0 组差异显著($P<0.05$)，相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。
Note: Values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$) between T15 group and TF group, and with different uppercase letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$) between AP5 group and AP0 group, while with same letter superscripts in the same row mean no significant difference ($P>0.05$).

半纯化饲料中 AP0 的 AST 活力显著高于 AP5 组($P<0.05$)，ALT 的活力无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 Toll 受体、NF-κB 和 HSP70 转录水平相对表达量

大豆抗原蛋白含量降低对不同系列饲料组的罗氏沼虾 Toll 受体、NF-κB 和 HSP70 转录水平相对表达量有着不同的影响(图 1、图 2、图 3)，在

实用饲料组中, T15 组 Toll 受体、HSP70 转录水平表达量显著高于 TF 组 ($P<0.05$), 而 NF- κ B mRNA 相对表达量没有显著性差异 ($P>0.05$); 在半纯化饲料组中, AP5 组 Toll 受体、NF- κ B 转录水平相对表达量显著低于 AP0 组 ($P<0.05$), 而 HSP70 转录水平相对表达量没有显著性差异 ($P>0.05$)。

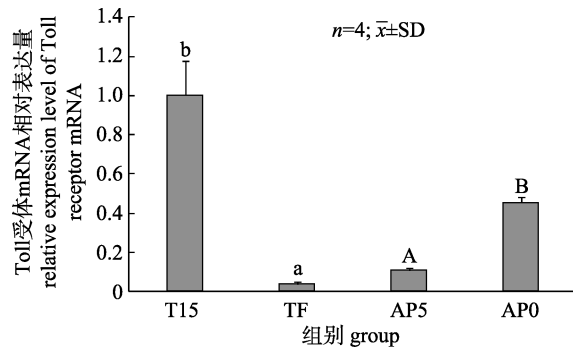


图1 不同饲料组罗氏沼虾 Toll 受体 mRNA 在鳃中的相对表达量

不同小写字母表示 T15、TF 组差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示 AP5、AP0 组差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 1 Toll-like receptor mRNA expression levels in gills of *Macrobrachium rosenbergii* fed with different diets. Values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$) between T15 group and TF group, and with different uppercase letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$) between AP5 group and AP0 group.

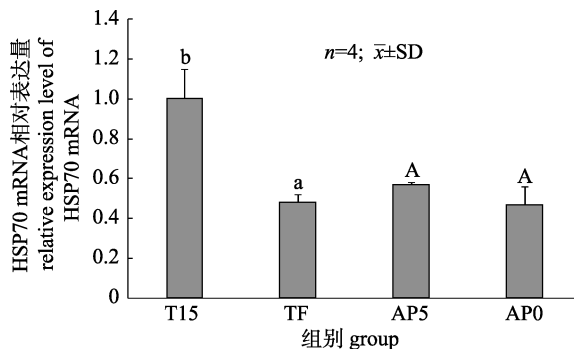


图2 不同饲料组罗氏沼虾 NF- κ B mRNA 在鳃中的相对表达量

不同小写字母表示 T15、TF 组差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示 AP5、AP0 组差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 2 NF- κ B mRNA expression levels in gills of *Macrobrachium rosenbergii* fed with different diets. Values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$) between T15 group and TF group, and with different uppercase letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$) between AP5 group and AP0 group.

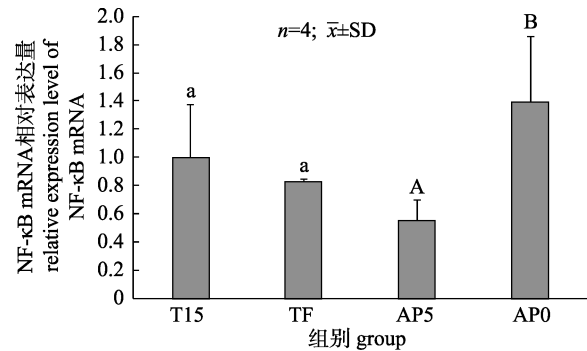


图3 不同饲料组罗氏沼虾 HSP70 mRNA 在肝胰腺中的相对表达量

不同小写字母表示 T15、TF 组差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示 AP5、AP0 组差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 3 HSP70 mRNA expression levels in hepatopancreas of *Macrobrachium rosenbergii* fed with different diets. Values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$) between T15 group and TF group, and with different uppercase letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$) between AP5 group and AP0 group.

3 讨论

3.1 大豆抗原蛋白的不同形式对罗氏沼虾生长的影响

动物的生长是通过摄食、消化、吸收, 使食物转化成体长和体质量的增长过程。研究表明, 饲料中添加 8% 的大豆球蛋白可导致建鲤的生长性能下降, 使肠道功能受到抑制^[20]; 而大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 可以承受相对较高含量的大豆球蛋白 (8.31%), 此时没有表现出生长的抑制、肠道的显著损伤^[21]。可见, 不同动物对大豆抗原蛋白的耐受性不同。

本研究显示, 大豆抗原蛋白并没有影响罗氏沼虾肌肉的粗脂肪和粗蛋白。实用饲料中大豆抗原蛋白含量降低并没有改善生长, 反而使生长降低。而冷向军等^[22]研究中发现用发酵豆粕替代饲料中全部豆粕, 可达到与高鱼粉对照组凡纳滨对虾一致的生长效果, 产生差异的原因可能是不同的动物对大豆抗原蛋白的耐受性不同, 并且其研究中豆粕含量为 16.5%, 略高于本研究豆粕含量。而在半纯化饲料中罗氏沼虾的生长没有显著性差异, 也证实罗氏沼虾对 5% 大豆抗原蛋白具有一定的耐受限度, 因此不会对生长产生显著的负面影响。豆粕经过微生物发酵后, 部分抗营养因子,

尤其是大豆抗原蛋白含量显著降低,但对比两种系列饲料的差异看出,在实用饲料 T15 组中大豆抗原蛋白与其他抗营养因子共同存在时,显著降低大豆抗原蛋白的含量,可能破坏了抗营养因子之间的平衡,使之产生了更强的毒素,导致生长下降。例如,单宁和凝集素的相互作用可消除单宁对淀粉酶的抑制作用^[23],皂苷和单宁的相互作用可使各自的毒性都降低^[24]。同样是降低大豆抗原蛋白,却在只有大豆抗原蛋白这类抗营养因子的半纯化饲料中产生了相反的趋势,因此推测单一的 5%大豆抗原蛋白对罗氏沼虾的生长影响较小,而大豆抗原蛋白和其他抗营养因子复杂的协同效应,可能成为影响机体生长的关键因素。

从实用和半纯化饲料组的蛋白酶活力结果可以看出,其与一定浓度的大豆抗原蛋白都呈正相关关系。推测一定含量的大豆抗原蛋白可能刺激机体分泌蛋白酶,提高单位浓度蛋白酶的活力,促进机体对饲料中抗原类物质的消化,进而对生长产生影响。而这也可能是 T15 组生长要好于 TF 组的重要原因。

3.2 不同形式大豆抗原蛋白与罗氏沼虾抗氧化能力和免疫基因的关系

大豆抗原蛋白能以完整形式进入血液或淋巴,并激活特异性和非特异性免疫系统^[25]。研究证实,大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白可分别引起仔猪和大鼠的 IgE 抗体浓度升高,肠道中肥大细胞增加^[26-27]。关于大豆抗原蛋白对水产动物免疫系统的作用,有研究表明,大豆抗原蛋白可以引起虹鳟^[28]、大西洋鲑^[29]和亚洲尖吻鲈(*Lates calcarifer*)^[30]等后肠免疫学变化,淋巴细胞、巨噬细胞等免疫细胞数增多,中肠溶菌酶活力显著升高,后肠黏膜固有层 IgM 增加。而罗氏沼虾作为无脊椎动物,其免疫应答比较原始,虽然近年来一些研究发现,虾血清中可能有类 IgG、类 IgA、类 IgM 等免疫球蛋白样物质,但仍主要依靠先天的非特异性免疫来抵抗病原微生物。因此对虾免疫机制的研究主要集中在抗氧化酶系统、Toll 受体、热休克蛋白等免疫相关因子及相关反应上^[31]。

从生化指标来说,正常生理状况下,机体内自由基的形成和清除处于一种动态平衡中,即机

体产生超氧自由基的能力与 SOD 清除超氧自由基的能力处于动态平衡状态。当机体的氧自由基无法清除,过量的氧自由基则会产生过氧化物(如 MDA)损害细胞,进而会出现氧化应激现象^[32]。在本研究中,实用饲料中 TF 组 SOD 活力显著高于 T15 组,而 MDA 含量变化不显著,说明发酵豆粕相较于豆粕会通过抗氧化酶的合成来清除氧自由基,降低氧化应激的风险,这可能与大豆抗原蛋白含量降低没有直接的关系。因为半纯化饲料的单因子实验证实,5%的大豆抗原蛋白并不破坏罗氏沼虾抗氧化系统的平衡状态。此时无论是单一抗营养因子还是混合抗营养因子都不会增加脂质过氧化程度,结合生长性能结果,推测 TF 组消耗更多的蛋白质用于抗氧化酶的合成,将不利于动物的生长。

另一方面,从免疫基因表达水平来说,Toll 受体和 NF- κ B 在甲壳类的免疫系统中起着至关重要的作用,能够诱导产生一系列的免疫效应因子和免疫反应^[33-35]。本研究显示,Toll 受体和 NF- κ B 基因相对表达量在实用饲料随抗原蛋白含量的降低而降低,而在半纯化饲料中则呈相反的趋势,表明抗原蛋白的单独效应和联合效应导致罗氏沼虾对模式识别受体不同的免疫反应。相比较而言,大豆抗原蛋白与多种抗营养因子的共同作用更易激发机体的免疫系统,并通过 Toll 和 NF- κ B 基因表达量的上调来实现宿主对异物的防御免疫反应。

大量的大豆抗原蛋白对机体抗原反应及免疫反应即会对机体造成损伤^[36],最终引起肠道炎症和免疫系统崩溃,而 HSP70S 是热休克蛋白中最保守和最重要的一族,可以通过检测肝胰腺 HSP70 mRNA 相对表达量来评价大豆抗原蛋白对罗氏沼虾抗应激能力的影响^[37-38]。在本研究中,肝胰腺 HSP70 基因表达在实用饲料和半纯化饲料中呈现出不同的变化,发酵豆粕相较于豆粕降低了肝胰腺的受应激程度,这可能与抗原蛋白的降低没有直接的关系。半纯化饲料抗原蛋白单因子实验证实,相同水平的抗原蛋白不会对机体产生明显的胁迫,同样表明抗营养因子协同效应的复杂性。

综合以上结果表明,罗氏沼虾对单一的 5%

抗原蛋白表现出一定的耐受性,而混合抗营养因子的共同作用对机体免疫方面的影响要大于单一抗原蛋白。推测这种影响可能对机体产生一定积极的影响,并最终表现出较好的生长状况,但TF组生长降低的原因还需进一步研究。

3.3 一定含量的大豆抗原蛋白更利于罗氏沼虾的肝胰腺健康与蛋白代谢

血液生化指标往往能够表征动物的营养、健康和对环境的适应状况。谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)是氨基酸代谢中两种重要酶,而血清中这两种酶的含量也常用做肝损伤指标^[39]。实用饲料中AST和ALT的活力差异均不显著,半纯化饲料中AP0的AST活力显著高于AP5组,说明罗氏沼虾对抗原蛋白有一定的耐受程度,而且该浓度的抗原蛋白更利于肝胰腺的健康。结合HSP70基因表达结果,认为由该浓度的大豆抗原蛋白导致的对罗氏沼虾的应激作用仍在机体正常生理功能的可调节范围内。

总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)在肝中合成,其含量在血清中的变化能够反映肝的蛋白质合成能力和健康状况^[40-41]。当动物摄入一定量的蛋白质时,机体会平衡用于生长和免疫的蛋白代谢,当机体免疫系统被激活时用于免疫防御的蛋白合成会增加,而用于生长的则降低。在本研究中,发酵豆粕替代豆粕以及半纯化饲料中大豆抗原蛋白含量降低时,罗氏沼虾血清中的ALB和TP均呈现下降的趋势,说明混合以及单一抗营养因子都能刺激机体在保护肝胰腺健康的基础上提高氨基酸及蛋白质的合成代谢;再加上更为灵敏的机体免疫应答,从而使T15组表现出较好的生长性能。

4 结论

在本研究条件下,罗氏沼虾对5%左右的单一大豆抗原蛋白有一定的耐受性;混合抗营养因子较单一大豆抗原蛋白更能激活机体的免疫系统,提高蛋白的合成代谢,促进机体的生长,保护机体的健康。大豆抗原蛋白和其他抗营养因子联合效应的复杂性,在实际的饲料生产中,建议不要一味地追求降低豆粕用量,增加发酵豆粕用量,寻求两者之间的适宜配比是关键。

参考文献:

- [1] Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, et al. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig[J]. *Journal of Animal Science*, 1990, 68(6): 1790-1799.
- [2] Hao Y, Zhan Z F, Guo P F, et al. Soybean beta-conglycinin-induced gut hypersensitivity reaction in a piglet model[J]. *Archives of Animal Nutrition*, 2009, 63(3): 188-202.
- [3] Romarheim O H, Skrede A, Gao Y, et al. Comparison of white flakes and toasted soybean meal partly replacing fish meal as protein source in extruded feed for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquaculture*, 2006, 256(1-4): 354-364.
- [4] Oddhelge R, Anders S, Michael P, et al. Lipid digestibility, bile drainage and development of morphological intestinal changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing defatted soybean meal[J]. *Aquaculture*, 2008, 274(2-4): 329-338.
- [5] Baeverfjord G, Krogdahl A. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 19(5): 375-387.
- [6] Chen X M, Hua X M, Zhu W X, et al. Effects of soybean allergic proteins on growth, digestion and non-specific immune of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Acta Zoonutrimenta Sinica*, 2015, 27(7): 2115-2127. [陈晓明, 华雪铭, 朱伟星, 等. 大豆抗原蛋白对南美白对虾生长、消化及非特异性免疫的影响[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(7): 2115-2127.]
- [7] Sun Z W, Qin G X, Zhang Q H. Effects of soybean protein antigen to the growth performance, diet digestibility, intestinal absorption of calf[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2005, 41(11): 30-33. [孙泽威, 秦贵信, 张庆华. 大豆抗原蛋白对犊牛生长性能、日粮养分消化率和肠道吸收能力的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2005, 41(11): 30-33.]
- [8] Ilham I, Fotedar R. Growth, enzymatic glutathione peroxidase activity and biochemical status of juvenile barramundi (*Lates calcarifer*) fed dietary fermented soybean meal and organic selenium[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(3): 775-790.
- [9] Liang X F, Hu L, Dong Y C, et al. Substitution of fish meal by fermented soybean meal affects the growth performance and flesh quality of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2017, 229: 1-12.
- [10] Peng X, Song W X, Zhou F, et al. Effects of fermented soybean meal replacing fish meal on gastrointestinal tract and serum indexes in black sea bream[J]. *Jiangsu Journal of Ag-*

- ricultural Sciences, 2012, 28(5): 1096-1103. [彭翔, 宋文新, 周凡, 等. 发酵豆粕替代鱼粉对黑鲟胃肠道和血清指标的影响[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 1096-1103.]
- [11] Cheng W. Effect of antinutritional factors on the utilization of soybean proteins by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009. [陈伟. 抗营养因子对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)利用大豆蛋白源的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.]
- [12] Zhang J X. The effects of soybean protein source on growth performance and intestinal immune of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var Jian)[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2003. [张锦秀. 大豆蛋白源对幼建鲤生长性能及肠道免疫的影响[D]. 成都: 四川农业大学, 2003.]
- [13] Iwashita Y, Suzuki N, Matsunari H, et al. Influence of soya saponin, soya lectin, and cholytaurine supplemented to a casein-based semipurified diet on intestinal morphology and biliary bile status in fingerling rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Fisheries Science, 2009, 75(5): 1307-1315.
- [14] Hari B, Kurup B M. Comparative evaluation of dietary protein levels and plant-animal protein ratios in *Macrobrachium rosenbergii* (de Man)[J]. Aquaculture Nutrition, 2003, 9(2): 131-137.
- [15] Chowdhury M A K, Goda A M A S, El-Haroun E R, et al. Effect of dietary protein and feeding time on growth performance and feed utilization of post larval freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man 1879)[J]. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 2008, 3(1): 1-11.
- [16] Manush S M, Pal A K, Das T, et al. Dietary high protein and vitamin C mitigate stress due to chelate claw ablation in *Macrobrachium rosenbergii* males[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2005, 142(1): 10-18.
- [17] Du L, Niu C J. Effects of dietary substitution of soya bean meal for fish meal on consumption, growth, and metabolism of juvenile giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture Nutrition, 2015, 9(2): 139-143.
- [18] Cheng Y Y, Zhou H Q, Hua X M, et al. Effects of partial replacement of dietary fish meal by corn gluten meal on growth, nutrient ingredients and amino acid retention in muscle of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(4): 572-579. [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.]
- [19] Arshad H M, Farzana I S. Meat and bone meal as partial substitute for fish meal in nursery diet for giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man)[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2007, 38(2): 272-280.
- [20] Jiang W D, Hu K, Zhang J X, et al. Soybean glycinin depresses intestinal growth and function in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var Jian): protective effects of glutamine[J]. British Journal of Nutrition, 2015, 114(10): 1569-1583.
- [21] Li Y X, Yang P, Zhang Y J, et al. Effects of dietary glycinin on the growth performance, digestion, intestinal morphology and bacterial community of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, L.[J]. Aquaculture, 2017, 479: 125-133.
- [22] Leng X J, Wang W L, Li X Q. Experiment on feeding *Penaeus vannamei* bones with fermented soybean meal as partial substitute for fish meal[J]. Cereal & Feed Industry, 2007(3): 40-41. [冷向军, 王文龙, 李小勤. 发酵豆粕部分替代鱼粉对凡纳滨对虾的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2007(3): 40-41.]
- [23] Fish B C, Thompson L U. Lectin-tannin interactions and their influence on pancreatic amylase activity and starch digestibility[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(4): 727-731.
- [24] Freeland W J, Calcott P H, Anderson L R. Tannins and saponin: Interaction in herbivore diets[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 1985, 13(2): 189-193.
- [25] Lallès J P, Peltre G. Biochemical features of grain legume allergens in humans and animals[J]. Nutrition Reviews, 1996, 54(4): 101-107.
- [26] Sun P, Li D F, Li Z J, et al. Effects of glycinin on IgE-mediated increase of mast cell numbers and histamine release in the small intestine[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2008, 19(9): 627-633.
- [27] Hao Y, Zhan Z F, Guo P F, et al. Recombinant soybean protein beta-conglycinin alpha'-subunit expression and induced hypersensitivity reaction in rats[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2008, 145(2): 102-110.
- [28] Refstie S, Korsoen O J, Storebakken T, et al. Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Aquaculture, 2000, 190(1-2): 49-63.
- [29] Refstie S, Storebakken T, Baeverfjord G, et al. Long-term protein and lipid growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level[J]. Aquaculture, 2001, 193(1-2): 91-106.
- [30] Boonyaratpalin M, Suraneiranat P, Tunpibal T. Replacement of fish meal with various types of soybean products in diets for the Asian seabass, *Lates calcarifer*[J]. Aquaculture, 1998, 161(1-4): 67-78.
- [31] Huang X X, Luo C X, Guo T F, et al. Toll receptor in prawn

- and its application in nutrition-immunity assessing on prawn [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(6): 930-936. [黄旭雄, 罗词兴, 郭腾飞, 等. 对虾 Toll 受体及其在虾类营养免疫评价中的应用. *水产学报*, 2012, 36(6): 930-936.]
- [32] Ossani G, Dalghi M, Repetto M. Oxidative damage lipid peroxidation in the kidney of choline-deficient rats[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2007, 12(3): 1174-1183.
- [33] Li H Y, Fang Y, Yang L Y. Research progress on oxidative stress and immunity of animals[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(11): 3217-3221. [李昊阳, 房义, 杨连玉. 动物氧化应激与免疫的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(11): 3217-3221.]
- [34] Gay N J, Keith F J. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor[J]. *Nature*, 1991, 351(6325): 355-356.
- [35] Ganesan S, Aggarwal K, Paquette N, et al. NF- κ B/Rel proteins and the humoral immune responses of *Drosophila melanogaster*[J]. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 2011, 349(5): 25-60.
- [36] Guo L Y, Zhou X Q. Relationship between soybean antigen protein and intestinal function in aquatic animals[J]. *Journal of Hydroecology*, 2006, 26(1): 87-90. [郭林英, 周小秋. 大豆抗原蛋白与水生动物肠道功能的关系[J]. *水生生态学杂志*, 2006, 26(1): 87-90.]
- [37] Basu N, Todgham A E, Ackerman P A, et al. Heat shock protein genes and their functional significance in fish[J]. *Gene*, 2002, 295(2): 173-183.
- [38] Han J Y, Li J, Li J T, et al. Cloning and expression of heat shock protein 70 (HSP70) of *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(8): 1130-1138. [韩俊英, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及其表达分析[J]. *水产学报*, 2011, 35(8): 1130-1138.]
- [39] Yan Q, Xie S, Zhu X, et al. Dietary methionine requirement for juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2007, 13(3): 163-169.
- [40] Djangmah J S. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (fabricius)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1970, 32(4): 709-731.
- [41] Yildirim M, Lim C, Wan P J, et al. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol-acetic acid[J]. *Aquaculture*, 2003, 219(1-4): 751-768.

Physiological, biochemical, and immune effects of dietary soybean antigen proteins in the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)

YANG Jingfeng^{1,2,3}, GUO Zihao⁴, CAI Xiubing⁵, HUA Xueming^{1,2,3}, LIU Tao^{1,2,3}, KONG Chun^{1,2,3}, FENG Yue^{1,2,3}, WANG Gang^{1,2,3}

1. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition (CREEFN) of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
4. Shanghai Yuanyao Biotechnology Co. Ltd, Shanghai 201306, China;
5. Huailin Town Agricultural Comprehensive Service Station of Chaohu City, Chaohu 238054, China

Abstract: Soybean antigen proteins (soybean glycinin and β -conglycinin) are the main anti-nutritional factors in soybean meal. Recent studies showed that a high level of glycinin and β -conglycinin in soybean meal can disrupt the intestinal tissue structure, resulting in digestion and absorption disorders, stunted growth, and allergic reactions with a variety of non-specific and specific immune responses in aquatic animals. In recent years, fermented soybean meal has been increasingly used in aquatic animal feed. Compared to soybean meal, anti-nutritional factors, particularly soybean antigen proteins in fermented soybean meal, are drastically reduced. This study was conducted to compare the effects of soybean meal (SBM) and fermented soybean meal (FSBM) on the growth,

serum biochemical indices, gene expression, and oxidative status in *Macrobrachium rosenbergii* and evaluate whether the effects were caused by soybean antigen protein. Practical diets (T15, TF) and purified diets (AP0, AP5) were formulated for the feeding trial. Compared to T15 (21.5% FM, 15.45% SBM, 15% FSBM), the soybean meal was completely replaced with fermented soybean meal in TF, while AP0 and AP5 were semi-purified diets containing approximately the same content of soybean antigenic protein as TF (nearly 0% soybean antigen proteins) and T15 (approximately 5% soybean antigen proteins), respectively, with soybean antigen proteins included as the sole anti-nutritional factor. Giant river prawns with an initial average body weight of (0.17 ± 0.02) g were cultured in net cages in a fixed indoor cement tank and fed the above four diets for 64 days. The results showed that as soybean antigen proteins were reduced, trypsin activity was decreased for both series of diets. The practical diet groups showed a significantly decreased growth rate, while the purified diet groups did not, demonstrating that 5% soybean antigen protein did not affect the growth of *M. rosenbergii*. In contrast, a significant reduction in soybean antigen protein in the practical diet was not conducive for growth. A certain amount of soybean antigen protein increased trypsin activity to promote digestion of the feed, which in turn had a positive impact on growth. In the practical diet groups, there was no significant difference in the serum malondialdehyde content and expression of nuclear factor- κ B mRNA in the gills. Superoxide dismutase activity in the serum was significantly higher in TF, while expression of the Toll-like receptor in the gills and HSP70 mRNA in the hepatopancreas was significantly decreased. In the purified diet groups, there was no significant difference in the serum superoxide dismutase activity, malondialdehyde content, and HSP70 mRNA expression in the hepatopancreas, while expression of the Toll-like receptor and nuclear factor- κ B mRNA in the gills was significantly higher in the AP0 group. The results showed that fermented soybean meal scavenged free radicals by synthesizing antioxidant enzymes and reducing oxidative stress in the hepatopancreas, which may not be directly related to the reduction of soybean antigen protein content. Soybean antigen proteins and a variety of anti-nutritional factors together likely stimulate the body's immune system and promote immunity by decreasing Toll-like receptor and nuclear factor- κ B mRNA expression levels. Total protein in the serum was significantly decreased in the practical diet groups, and aspartate aminotransferase activity was significantly increased. However, total protein and albumin levels were significantly decreased in the purified diet groups. The results demonstrated that this concentration of antigen proteins improved the health of the hepatopancreas and the body's amino acid and protein synthesis metabolism. In addition to a more sensitive immune response, the T15 group showed better growth performance in the practical diet groups. In conclusion, *M. rosenbergii* was tolerant to 5% of soybean antigen protein, which was beneficial for its growth and health. A synergistic effect between soybean antigen protein and other anti-nutritional factors likely occurred. Low levels of soybean antigen proteins in the feed led to reduced protein synthesis and metabolism in the hepatopancreas and decreased growth. These results suggest that fermented soybean meal and soybean meal can be mixed together in an appropriate proportion under normal feeding conditions.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; soybean antigen protein; growth; serum biochemical indices; immune genes

Corresponding author: HUA Xueming. E-mail: xmhua@shou.edu.cn