

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15106

复合植物蛋白源替代鱼粉对半滑舌鲷生长、生理生化指标和肠组织结构的影响

代伟伟, 麦康森, 徐玮, 张彦娇, 许丹丹, 艾庆辉

中国海洋大学 水产动物营养与饲料农业部重点实验室, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

摘要: 实验以 6 种植物蛋白源(谷朊粉、大豆浓缩蛋白、豆粕、棉籽蛋白、花生粕和玉米蛋白粉)配比成复合植物蛋白源, 以其替代半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Güntuer)饲料鱼粉蛋白, 共设计 9 种实验饲料, 分别为全鱼粉组(FM)以及替代鱼粉蛋白水平分别为 20% (PP20)、30% (PP30)、40% (PP40I、PP40II、PP40III 和 PP40IV)、60% (PP60) 和 80% (PP80)组, 旨在最大限度替代舌鲷饲料中鱼粉蛋白, 而不影响鱼体生长、生理生化指标和肠组织结构形态。以初重为(255.21±0.79) g 的半滑舌鲷为研究对象, 在室内流水系统中进行 9 周摄食生长实验, 每个处理设 3 个重复, 每桶放养 15 尾鱼。结果表明, 各处理组实验鱼的增重率、特定生长率、饲料效率、摄食量、蛋白质效率、蛋白质沉积率和成活率均无显著性差异($P>0.05$); 复合植物蛋白源替代鱼粉后对鱼体粗蛋白和水分含量以及血浆甘油三酯含量无显著影响($P>0.05$); 但当复合植物蛋白源替代高比例鱼粉蛋白时, 显著降低鱼体粗脂肪和血浆胆固醇含量($P<0.05$), 且肝体比随植物蛋白源的添加而降低, PP30 组显著低于 FM 组($P<0.05$); 另外, 4 个 PP40 组相比, PP40III 组的脏体比显著高于其他 3 个 40%替代组。复合植物蛋白源替代鱼粉比例不超过 60%时, 对半滑舌鲷后肠组织结构无损伤或仅有轻微损伤, 而 PP80 组后肠绒毛出现严重损伤现象。以上结果表明, 复合植物蛋白源可以有效替代 80%的鱼粉蛋白而不影响半滑舌鲷的生长性能和饲料利用率, 但综合考虑鱼体生理生化和肠道组织结构指标, 认为在半滑舌鲷饲料中复合植物蛋白源替代鱼粉的比例不宜超过 60%。

关键词: 半滑舌鲷; 植物蛋白源; 生长; 生理指标; 组织结构

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)01-0125-13

鉴于全球水产养殖业对鱼油和鱼粉的需求^[1], 开发新型蛋白源以满足不同养殖鱼类生长的需要, 已成为当今鱼类营养饲料研究的一个重要课题^[2-3]。目前, 已有大量关于植物蛋白源替代水产动物饲料鱼粉蛋白的研究, 并且在开发新型饲料蛋白源、降低成本和保护环境方面已有初步成果^[4-6]。然而, 尽管一系列植物性蛋白源可用于部分替代饲料中的鱼粉而不影响鱼类生长及生理特性^[7-9], 但是对于很多肉食性和偏肉食性的杂食性鱼类, 应用单一蛋白源对鱼粉蛋白的替代研究却遇到了瓶颈, 因为其替代比例很难超过 50%; 一旦替代

率过高, 会导致鱼类生长急剧下降, 且其品质也随之降低^[10-12]。研究表明, 当多种植物蛋白源复合替代饲料鱼粉时, 不仅可以缓解单一蛋白源氨基酸不平衡的问题, 也可以减缓某一种植物蛋白原料中抗营养因子过多的问题^[13-14]。基于此原理, 本实验选用多种来源稳定、价格合理的植物蛋白源来复合替代鱼类饲料中的鱼粉蛋白。另外, 在基于植物蛋白源的饲料中适当添加鱼类营养研究和实际生产中行之有效地改善饲料利用的外源添加物, 如植酸酶^[9, 15]、牛磺酸 0.5%^[16-17]、复合诱食剂^[18]、一水硫酸亚铁^[9]、晶体氨基酸^[19-20]等, 以期尽可

收稿日期: 2015-3-18; 修订日期: 2015-06-01.

基金项目: 现代农业产业技术体系项目(CARS 50-G08).

作者简介: 代伟伟(1983-), 男, 博士, 主要从事水产动物营养与饲料研究. E-mail: winningedavid@gmail.com

通信作者: 艾庆辉, 教授. E-mail: qhai@ouc.edu.cn

能提高复合植物蛋白源替代饲料鱼粉蛋白的比例,同时降低养殖成本。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther),为近海常见的暖水性大型底层鱼类;其生长速度快,肉质细腻、鲜美,营养丰富,经济价值高,适合于我国沿海养殖^[21]。目前,研究者仅有少数学者对半滑舌鲷的适宜蛋白需求和氮能比进行了研究^[22-23],而鱼粉的替代研究尚未见文献报道。鉴于半滑舌鲷对饲料蛋白质需求量高,大概为 50%左右,其植物蛋白源替代研究尚属空白,因此本研究选择半滑舌鲷作为研究对象。

本实验在综合考虑适口性、氨基酸平衡、无机盐平衡、抗营养因子等的基础上,选用谷朊粉、大豆浓缩蛋白、豆粕、棉籽蛋白、花生粕和玉米蛋白粉等 6 种产量大、价格合理的植物蛋白源,配比成复合植物蛋白源,在补充磷、限制性氨基酸、牛磺酸、植酸酶的条件下,研究替代饲料中不同比例鱼粉蛋白对半滑舌鲷生长、摄食、饲料效率、生理生化指标和肠道组织结构的影响,以期在半滑舌鲷低鱼粉饲料的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

饲料设计基本原则:本实验选择谷朊粉、大

豆浓缩蛋白、豆粕、棉籽蛋白、花生粕和玉米蛋白粉等 6 种产量大、价格合理的植物蛋白原料;复合植物蛋白源的配比基本参照先前已发表的文献^[8-9, 20, 24],并依据本实验原料种类和其他参考原则稍加调整;配方设计过程中还综合考虑了氨基酸平衡、鱼体对抗营养因子的耐受性阈值、无机盐平衡、适口性、原料来源稳定性和成本等因素^[9, 23, 25]。

具体配方设计:实验共设计 9 种不同的实验饲料,分别为全鱼粉组(FM)以及以 6 种植物蛋白源不同比例的复合物替代全鱼粉饲料中的鱼粉蛋白(替代水平为 20%、30%、40%、60%和 80%),分别命名为 PP20(参考文献[9]中的 CS20+Fe&P 处理组)、PP30(参考文献[20]中的 FM40 处理组)、PP40、PP60(参考文献[8]中的 PP50 处理组)和 PP80(参考文献[20]中的 FM12 处理组);其中 40%替代水平设计 4 个处理组,分别为 PP40I(参考文献[24]中的 40PP70VO 处理组)、PP40II(参考文献[9]中的 CS30+Fe&P 处理组)、PP40III(参考文献[8]中的 PP50 处理组)和 PP40IV(本试验 PP40III 处理组,未补加牛磺酸)(表 1)。为避免任何一种单一抗营养因子含量超过舌鲷的耐受范围,各实验原料最高添加量控制不超过如下范围:大豆浓缩蛋白 $\leq 12\%$ ^[23];玉米蛋白粉 $\leq 20\%$ ^[25];棉籽粕 $\leq 8\%$ ^[9];花生粕 $\leq 6\%$ (为避免黄曲霉中毒);另外,添加了

表 1 实验饲料配方及化学组成

Tab. 1 Composition and proximate analysis of the experimental diets

原料 ingredient	饲料编号/添加水平 diet no/ supplementation level								
	FM	PP20	PP30	PP40I	PP40II	PP40III	PP40IV	PP60	PP80
鱼粉 ^a fish meal ^a	63	50.4	44.1	37.8	37.8	37.8	37.8	25.2	12.6
豆粕 ^a soybean meal ^a	0	6	0	0	8	0	0	0	0
玉米蛋白粉 ^a corn gluten meal ^a	0	6.5	7	10	10	9.4	9.4	13.5	16
花生粕 ^a peanut meal ^a	0	3	3.5	5	5	4.7	4.7	6	6
谷朊粉 ^a wheat gluten meal ^a	0	0	3	0	6	4.6	4.6	10	16.6
大豆浓缩蛋白 ^a soy protein concentrate ^a	0	0	7	12	0	8.5	8.5	11.5	15
棉籽粕 ^a cottonseed meal ^a	0	4	4	6	5	4.7	4.7	6	8
小麦粉 ^a wheat meal ^a	21.8	13.67	14.23	10.79	9.83	11.77	12.27	7.52	2.98
苏氨酸 ^b L-threonine ^b	0	0.2	0.17	0.2	0.24	0.2	0.2	0.24	0.4
赖氨酸盐酸盐 ^b L-lysine.HCl ^b	0	0	0.2	0.3	0.4	0.35	0.35	0.6	1
蛋氨酸 ^b DL-methionine ^b	0	0.1	0.25	0.25	0.35	0.4	0.4	0.4	0.55
牛磺酸 taurine	0	0.2	0	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5
鱼油 fish oil	6.2	6.7	7.1	7.4	7.3	7.4	7.4	8	8.6
大豆卵磷脂 lecithin	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
多矿 ^c mineral premix ^c	2	2	2	2	2	2	2	2	2

%干物质% dry matter

续表 1(Tab.1 continued)

原料 ingredient	饲料编号/添加水平 diet no/supplementation level								
	FM	PP20	PP30	PP40I	PP40II	PP40III	PP40IV	PP60	PP80
多维 ^d vitamin premix ^d	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
诱食剂 ^e attractanth ^e	1	1	1	1	1	1	1	1	1
磷酸二氢钙 Ca (H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	0	0	0.2	0.5	0.3	0.4	0.4	1.3	1.9
一水硫酸亚铁 FeSO ₄ ·H ₂ O	0	0.02	0.03	0.05	0.05	0.05	0.05	0.02	0.05
一水硫酸锌 ZnSO ₄ ·H ₂ O	0	0.01	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02
植酸酶 phytase	0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
其他 ^f others ^f	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
主要成分 proximate analysis (dry matter basis, DM)									
粗蛋白/% crude protein	49.1	49.4	50.8	50.2	51.0	51.2	50.8	51.9	53.9
真蛋白/% true protein	49.8	50.0	49.7	49.7	49.9	50.0	49.6	50.0	50.2
粗脂肪/% crude lipid	13.3	13.4	13.4	13.0	13.5	13.0	13.0	13.0	12.4
必需氨基酸/% EAA	20.3	20.8	20.0	20.4	20.8	21.9	21.9	22.3	21.9
非必需氨基酸/% NEAA	28.8	28.6	30.8	29.8	30.3	29.3	29.3	29.5	32.0
必需氨基酸/非必需氨基酸 EAA/NEAA	0.7	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7
非植酸磷/% N-Phy-P content	1.3	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0
锌含量/(mg·kg ⁻¹) Zn content	118.1	137.2	167.6	123.8	195.6	195.5	196.0	150.1	140.0
铁含量/(mg·kg ⁻¹) Fe content	111.6	188.2	219.6	291.0	280.9	283.3	283.6	199.2	292.4
干物质含量/% dry matter	94.8	95.3	90.9	90.5	93.0	91.7	93.3	93.1	93.3
灰分/% ash	15.4	14.3	13.2	12.6	12.3	12.4	12.3	10.8	9.2
游离棉酚含量/(mg·kg ⁻¹) free gossypol	27.2	44.9	41.3	58.1	48.8	40.6	42.4	61.4	91.3

注: ^a 鱼粉, 粗蛋白 71.6%, 粗脂肪 9.2%; 豆粕, 粗蛋白 50.9%, 粗脂肪 1.0%; 玉米蛋白粉, 粗蛋白 65.9%, 粗脂肪 1.5%; 花生粕, 粗蛋白 49.3%, 粗脂肪 0.5%; 小麦粉粗蛋白 16.5%; 粗脂肪 0.4%, 由青岛七好生科有限公司提供(中国, 山东); 谷朊粉, 粗蛋白 78.8%; 粗脂肪 2.0%, 潍坊市海达淀粉有限公司(中国, 山东)提供; 大豆浓缩蛋白, 粗蛋白 67.2%, 粗脂肪 1.4%, 黑龙江双河松嫩大豆生物工程有限公司(中国, 黑龙江)提供; 棉籽粕, 粗蛋白 53.1%; 粗脂肪 0.5%, 山东国信实业有限公司(中国, 济南)提供;

^b L-赖氨酸盐酸盐, L-苏氨酸和 DL-蛋氨酸, 冀州市华阳化工有限责任公司(中国, 河北)提供;

^c 多矿(mg/kg diet): 六水氯化钴(1%), 50; 五水硫酸铜(25%), 10; 一水硫酸亚铁(30%), 80; 一水硫酸锌(34.50%), 50; 一水硫酸锰(31.80%), 45; 七水硫酸镁(15%), 1200; 亚硒酸钠(1%), 20; 碘酸钙(1%), 60; 沸石粉, 18485. PP30、PP40I、PP40II、PP40III 和 PP40IV 多矿预混物有效含量加倍, 沸石粉含量相应减少; PP60 和 PP80 多矿有效含量增加至 3 倍, 沸石粉相应减少;

^d 多维(mg/kg diet): 盐酸硫胺素(98%), 25; 维生素 B₂(80%), 45; 盐酸吡哆醇(99%), 20; 维生素 B₁₂(1%), 10; 维生素 K(51%), 10; 肌醇(98%), 800; 泛酸钙(98%), 60; 烟酸(99%), 200; 叶酸(98%), 20; 生物素(2%), 60; 维生素 A(50 万 IU/g), 32; 维生素 D(50 万 IU/g), 5; 维生素 E(50%), 240; 维生素 C(35%), 2000; 抗氧化剂(克氧灵, 100%), 3; 稻壳粉(100%), 1470;

^e 复合诱食剂(%) (甜菜碱 二甲基-丙酸噻亭 甘氨酸 丙氨酸 5-磷酸肌苷=4 2 2 1 1), 1;

^f 其他(%): 啤酒酵母(粗蛋白 54.1%, 粗脂肪 1.0%;), 2.5; 氯化胆碱, 0.25; 防霉剂(丙酸钙), 0.10; 抗氧化剂, 0.05; 三氧化二钨, 0.10.

Note: ^a Fish meal, crude protein 71.6%, crude lipid 9.2%; Soybean meal, crude protein 50.9%, crude lipid 1.0%; Corn gluten meal, crude protein 65.9%, crude lipid 1.5%; Peanut meal, crude protein 49.3%, crude lipid 0.5%; Wheat flour, crude protein 16.5%, crude lipid 0.4%, Supplied by Great Seven Bio-tech (Shandong, China); Wheat gluten meal, crude protein 78.8%, crude lipid 2.0%, Supplied by Haida starch Co., Ltd of Weifang. (Shandong, China); SPC, crude protein 67.2%, crude lipid 1.4%, Supplied by Heilongjiang Shuanghe Songnen Soybean Bioengineering Co., Ltd. (Heilongjiang, China); Cottonseed meal, crude protein 53.1%, crude lipid 0.5%, Supplied by Shandong Guoxin Industrial Co., Ltd (Shandong, China).

^b L-Lysine monohydrochloride, L-Threonine, DL-Methionine, Supplied by Jinzhoucity Huayang Chemical Co., Ltd. (Hebei, China).

^c Mineral premix (mg/kg diet): CoCl₂·6H₂O (1%), 50; CuSO₄·5H₂O (25%), 10; FeSO₄·H₂O (30%), 80; ZnSO₄·H₂O (34.50%), 50; MnSO₄·H₂O(31.80%), 45; MgSO₄·7H₂O(15%), 1200; Sodium selenite (1%), 20; Calcium iodine (1%) 60; Zoelite, 18485. Effective content of mineral premix doubled in PP30, PP40I, PP40II, PP40III and PP40IV, while zoelite corresponding reduced; effective content of mineral premix tripled in PP60 and PP80, while zeolite corresponding reduced.

^d Vitamin premix (mg/kg diet): thiamin (98%), 25; riboflavin (80%), 45; pyridoxine-HCl (99%), 20; vitamin B₁₂ (1%), 10; vitamin K (51%), 10; inositol (98%), 800; pantothenic acid (98%), 60; niacin acid (99%), 200; folic acid (98%), 20; biotin (2%), 60; retinol acetate (500000IU/g), 32; cholecalciferol (500000IU/g), 5; alpha-tocopherol (50%), 240; ascorbic acid (35%), 2000; anti-oxidants (oxygen ling grams, 100%), 3; rice husk powder (100%), 1470.

^e Attractant(% diet) (Betaine Dimethyl - propiothetin glycine alanine 5 - phosphate inosine = 4 2 2 1 1), 1.

^f Others (% diet): Beer yeast (crude protein 54.0% , crude lipid 1.0%), 2.5; Choline chloride, 0.25; Mold inhibitor (calcium propionic), 0.05; Antioxidant, 0.05; Y₂O₃, 0.10.

0.2%植酸酶和适量 $\text{FeSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 以结合游离棉酚毒性。以半滑舌鲷鱼体氨基酸含量为标准,添加相应的晶体氨基酸,使各种限制性氨基酸含量不低于半滑舌鲷鱼体 50%粗蛋白的氨基酸组成或满足舌鲷氨基酸需求,各组饲料的氨基酸组

成见表 2。各复合植物蛋白源替代组补充植酸酶、牛磺酸,并适量添加复合诱食剂、一水硫酸亚铁、一水硫酸锌和磷酸二氢钙(表 1)。经全自动氨基酸分析仪测定得各组饲料的氨基酸组成(表 2)。

表 2 实验饲料中氨基酸组成及半滑舌鲷鱼体 50%粗蛋白的氨基酸组成(%干物质)
Tab. 2 Amino acid contents of experimental diets (% dry matter)

氨基酸 amino acid	实验饲料 experimental diet									50%体组成 ^a 50% body protein ^a
	FM	PP20	PP30	PP40I	PP40II	PP40III	PP40IV	PP60	PP80	
必需氨基酸 essential amino acid										
精氨酸 Arg	2.76	3.08	2.95	3.01	2.75	2.72	2.66	2.60	2.63	2.97
组氨酸 His	0.95	0.94	0.91	0.95	0.93	0.83	0.87	0.89	0.88	0.24
异亮氨酸 Ile	2.05	2.02	1.89	1.83	1.78	1.90	1.87	1.92	1.90	1.89
亮氨酸 Leu	3.46	3.69	3.43	3.56	3.75	3.82	3.80	4.11	3.95	3.44
赖氨酸 Lys	2.96	2.63	2.59	2.67	2.58	2.58	2.51	2.42	2.46	3.42
蛋氨酸 Mat	1.57	1.61	1.45	1.45	1.60	1.68	1.66	1.63	1.65	1.4
苯丙氨酸 Phe	1.71	1.81	1.87	1.98	2.52	3.32	3.34	3.86	3.60	1.83
苏氨酸 Thr	1.84	2.05	1.94	2.00	1.93	1.90	1.76	1.76	1.76	1.99
缬氨酸 Val	2.47	2.47	2.43	2.41	2.41	2.62	2.59	2.64	2.62	2.45
非必需氨基酸 non-essential amino acid										
丙氨酸 Ala	2.84	2.79	2.62	2.68	2.75	2.89	2.74	2.73	2.73	3.25
天冬氨酸 Asp	3.99	4.10	3.95	4.24	3.96	3.90	3.85	3.77	3.81	4.75
半胱氨酸 Cys	0.70	0.73	0.57	0.54	0.60	0.52	0.49	0.51	0.50	0.62
谷氨酸 Glu	6.99	7.35	8.05	8.04	8.75	8.20	8.41	9.69	9.05	6.79
甘氨酸 Gly	3.46	3.17	2.88	2.84	2.76	2.79	2.49	2.30	2.40	4.32
丝氨酸 Ser	1.93	1.99	2.04	2.10	2.10	2.02	2.07	2.17	2.12	2.16
酪氨酸 Tyr	1.31	1.31	1.23	1.34	1.34	1.36	1.33	1.51	1.42	1.16

注: 结果均为 3 个样品测定结果的平均值;^a 半滑舌鲷鱼体 50%粗蛋白的氨基酸组成。
Note: Values are the means of triplication; ^aAmino acid profiles in 50% whole body protein of tongue sole.

实验饲料配制前,所有原料经过粉碎,过 80 目筛网。将粉碎好的原料按饲料配方由小到大逐一混合均匀,然后再加入鱼油和大豆卵磷脂,手工将油脂微小颗粒搓散,于 V 型高效混合机(STC,中外合资上海天祥,健台制药机械有限公司)中混合均匀,最后再加入大约 30%蒸馏水揉匀,于单螺杆制粒机中制成 5 mm 和 6 mm 两种规格的饲料颗粒,在 50℃ 恒温下干燥 12 h,置于-20℃ 冰箱中保存备用。

1.2 实验鱼与饲养管理

初始体重为(255.21±0.79) g 的实验用半滑舌鲷为人工培育的同一批苗种,基本全为雌鱼,购于山东省海阳市黄海水产有限公司。养殖实验在

山东省海阳市黄海水产公司养殖基地室内长流水系统中进行。实验前,先取各处理实验饲料等量混合在一起作为暂养料暂养 2 周,使之逐渐适应饲料和养殖环境。

实验开始前所有半滑舌鲷停食 24 h。选择大小均匀,体格健壮、无病的半滑舌鲷,随机分配于 27 个养殖桶,每桶 15 尾,养殖周期为 9 周。实验期间,先投喂直径 5 mm 规格饲料 3 周,后 6 周投喂直径 6 mm 规格饲料。每天投喂 2 次至饱食(07:30 和 19:00),投喂时戴头灯作业、停水,每次投喂分 4 轮进行,每轮间隔 5~10 min,以残饵作为饱食的标准,记录每顿的残饵数量。投喂后换水 70%左右。如有死鱼记录数量、重量和症状,监

测海水温度、盐度和溶氧变化。

养殖用水为浅井海水, 经二级沉淀、砂滤后进入蓄水池, 采用室内长流水系统。实验所采用养殖桶均为玻璃纤维桶, 有效水体体积分别为 500 L, 注水量为 10.6 L/min, 日换水量大于 20 个循环。整个养殖期间均采用 24 h 连续充氧, 遮蔽所有窗户, 关闭灯光降低室内光线强度。实验期间, 水温, 24.2~27.4℃, 盐度为 29.1, 溶氧 6.2~6.4 mg/L, pH 为 7.9~8.0。

1.3 样品采集

实验开始前, 实验鱼饥饿 24 h, 随机取 5 尾麻醉的实验鱼, 保存于-20℃的冰箱中, 用于常规分析; 另取 5 尾进行肌肉氨基酸分析。9 周生长实验结束时, 实验鱼饥饿 24 h, 使用 1:10000 的丁香酚麻醉, 然后计数, 称重。分别从每桶中随机抽取 4 尾鱼, 保存于-20℃的冰箱中, 用于常规分析; 另外再从每桶抽取 4 尾鱼, 分别称重、测体长, 然后从尾静脉抽取血液, 迅速打入肝素钠抗凝管中, 4℃静置 2 h 后, 以 3000 r/min 离心 10 min 取上清, 置-80℃保存; 解剖取内脏和肝脏并称重。另外, 每桶取两尾鱼解剖取后肠, 于波恩试液(Bouin's)中固定 24 h, 然后转入 70%乙醇中保存, 用于小肠组织结构分析。

1.4 样品分析测定

原料、饲料及鱼体样品均在 105℃烘干至恒重后, 求得干物质含量, 然后进行常规指标测定。采用全自动定氮仪(Kjeltec 2300, Sweden)测定粗蛋白含量(N×6.25); 采用索氏抽提法, 测定粗脂肪含量(Buchi 36680, Switzerland); 将样品在电炉上炭化后, 在马福炉中(550℃)灼烧 12 h 后测得样品灰分含量。饲料中游离棉酚含量的检测采用国家标准(GB 13086-91)方法(表 2)。

参照国家标准(GB/18246-2000)方法, 使用氨基酸自动分析仪(Biochrom 30, GE, England)测定饲料原料及实验饲料的氨基酸组成。准确称取 20~40 mg 样品双份于 25 mL 水解管中, 加 10 mL 盐酸酸解剂, 真空泵抽真空约 1 min, 冲入高纯氮气约 1 min, 盖紧试管盖, 置于 110℃恒温鼓风干燥箱中水解 24 h。使用定量滤纸过滤后用水定容

至 100 mL, 充分混匀。准确吸取 1 mL 于 10 mL 烧杯中, 放真空干燥箱中蒸发至干。加入 2 mL 0.02 mol/L 盐酸, 充分溶解, 0.22 μm 滤膜过滤, 用于检测氨基酸含量。

血浆中胆固醇和甘油三酯含量采用试剂盒测定(南京建成生物工程研究所提供)。

后肠石蜡切片制作及观察: 对 70%乙醇保存的后肠采用程控自动脱水机(LEICA TP1020)脱水、石蜡包埋机(LEICA EG 1160)包埋和半自动切片机(LEICA RM2145)连续切片, 切片厚度为 5~6 μm, 每份样品选取非连续切片两段。利用程控自动染色机(SHANDON Varistain)染色, 中性树胶封片。染色剂采用苏木精 2 伊红(H.E), 操作步骤为二甲苯脱蜡、梯度酒精复水、苏木精染色和自来水冲洗, 然后以 0.5%或 1%的伊红染色, 梯度酒精脱水入二甲苯。利用显微镜(Olympus, DP71)与配套的图像处理软件 DP Manager 对切片进行观察与拍照, 观察半滑舌鳎后肠组织学特征。

1.5 计算及统计分析

体增重(WG, g)=末重-初重

特定生长率(SGR, %/d)=(ln 末重-ln 初重)×100 /饲喂天数

饲料效率(FER)=鱼体湿增重/采食干饲料重

摄食率(FI, %/d)=消耗的饲料/[(鱼体末重+鱼体初重)/2×饲喂天数]

蛋白质效率(PER, %)=鱼体湿增重/采食蛋白量

蛋白滞留率(PR, %)=(鱼体末重×实验结束时鱼体蛋白含量-鱼体初重×初始鱼体蛋白含量)/(采食干饲料重×饲料蛋白含量)×100

成活率(SR, %)=(实验结束时活鱼数/实验开始时活鱼数)×100

肝体比(HIS, %)=肝脏重量/鱼体重量×100

内脏指数(VSI, %)=100×内脏重量/体重

肥满度(CF, g/cm³)=100×(鱼体重量, g)/(鱼体长, cm)³

所有数值均以平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示, 采用 SPASS 16.0 软件进行数据分析和统计。数据作单因子方差分析, 且数据进行方差齐性检验,

若处理间有显著差异, 再作 Tukey's 多重比较, $P<0.05$ 表示处理间差异性显著。

2 结果与分析

2.1 生长和饲料利用

如表 3 所示, 与全鱼粉组(FM)相比, 复合植物蛋白源替代不同水平的饲料鱼粉后对半滑舌鲷的体增重(WG)、特定生长率(SGR)、饲料效率(FER)、摄食率(FI)、蛋白质效率(PER)、蛋白质滞留率(PR)和成活率的影响均不显著($P>0.05$)。值得注意的是, 尽管数据统计不显著, PP30、PP40II、

PP40III 和 PP60 组的 WG、SGR、FER、PER 和 PR 均较 FM 组有所升高($P>0.05$)。

2.2 全鱼体组成

复合植物蛋白源替代饲料鱼粉后, 对半滑舌鲷鱼体粗蛋白和水分影响不显著($P>0.05$), 但显著影响全鱼粗脂肪和灰分含量($P<0.05$, 表 4)。与 FM 组相比, 复合植物蛋白源替代饲料鱼粉后均降低全鱼粗脂肪含量, 其中以 PP40III 和 PP80 组最低且与之差异显著($P<0.05$)。当复合植物蛋白源替代 80%饲料鱼粉后, 显著提高了全鱼灰分含量($P<0.05$), 而其他替代组与 FM 组相比均未出现显

表 3 摄食不同饲料对半滑舌鲷生长和饲料利用的影响
Tab. 3 Growth performance and nutrient utilization of tongue sole fed different experimental diets

n=3; $\bar{x} \pm SE$

饲料 diet	体增重/g WG	特定生长率/ (%·d ⁻¹) SGR	饲料效率 FER	摄食率/(%·d ⁻¹) FI	蛋白质效率 PER	蛋白质滞留率/% PR	成活率/% SR
FM	216.3±3.59	0.97±0.01	1.12±0.02	0.13±0.002	2.28±0.03	41.50±1.10	97.8±2.22
PP20	223.1±5.78	1.00±0.02	1.11±0.04	0.13±0.003	2.26±0.09	38.53±1.77	97.8±2.22
PP30	227.6±6.45	1.01±0.02	1.28±0.04	0.12±0.002	2.50±0.09	43.53±1.43	100.0±0.00
PP40I	214.2±2.47	0.97±0.01	1.10±0.03	0.13±0.002	2.19±0.05	37.16±1.15	100.0±0.00
PP40II	246.5±17.99	1.07±0.06	1.24±0.02	0.12±0.001	2.42±0.05	42.28±2.27	97.8±2.22
PP40III	230.7±1.33	1.02±0.01	1.26±0.05	0.12±0.005	2.47±0.09	43.48±1.70	100.0±0.00
PP40IV	219.0±1.30	0.98±0.01	1.19±0.03	0.12±0.004	2.34±0.06	40.94±1.57	97.8±2.22
PP60	230.7±10.78	1.02±0.03	1.30±0.04	0.11±0.001	2.52±0.07	43.38±2.36	100.0±0.00
PP80	214.7±15.34	0.97±0.05	1.23±0.11	0.12±0.006	2.28±0.21	38.02±3.28	100.0±0.00
P	0.32	0.33	0.06	0.07	0.19	0.20	0.75

注: 同一列标注有不同上标表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Values in the same column with different superscript are significant different ($P<0.05$).

表 4 摄食不同饲料对半滑舌鲷全鱼体组成的影响
Tab. 4 Proximate composition in whole body of tongue sole fed different experimental diets

n=3; $\bar{x} \pm SE$; %湿物质% wet weight

饲料 diet	粗蛋白 crude protein	粗脂肪 crude lipid	灰分 ash	水分 moisture
FM	17.24±0.28	5.76±0.09 ^a	2.11±0.05 ^{bc}	75.10±0.25
PP20	16.79±0.24	5.21±0.37 ^{ab}	2.00±0.03 ^{bc}	76.19±0.52
PP30	16.88±0.14	4.99±0.05 ^{ab}	1.96±0.02 ^c	76.59±0.13
PP40I	16.68±0.20	5.10±0.15 ^{ab}	2.06±0.01 ^{bc}	76.32±0.25
PP40II	16.92±0.30	5.66±0.55 ^{ab}	1.99±0.04 ^{bc}	75.50±0.74
PP40III	17.00±0.17	4.51±0.05 ^b	2.02±0.02 ^{bc}	76.73±0.16
PP40IV	16.91±0.12	5.39±0.14 ^{ab}	1.97±0.02 ^{bc}	76.13±0.11
PP60	16.82±0.30	5.05±0.19 ^{ab}	2.12±0.01 ^b	76.21±0.34
PP80	16.54±0.05	4.55±0.06 ^b	2.28±0.04 ^a	76.84±0.21
P	0.58	0.02	<0.001	0.05

注: 同一列标注有不同上标字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Values in the same column with different superscripts are significant different ($P<0.05$).

著性差异($P>0.05$)。

2.3 形体指标和血浆生理指标

如表 5 所示, 所有复合植物蛋白源替代组的肝体比均低于 FM 组, 其中以 PP30 组最低, 与 FM 组差异显著($P<0.05$), 但与其他各替代组的差异不显著($P>0.05$)。FM 组的脏体比(VSI)和肥满度(CF)与所有复合植物蛋白源替代组的差异均不显著($P>0.05$), 但是各替代组之间出现了显著性差

异, 其中 VSI 以 PP40III 组数值最高, 显著高于 PP20、PP40I、PP40II 和 PP40IV 组($P<0.05$); 且 CF 也以 PP40III 组的最高, 显著高于 PP80 组($P<0.05$)。

与 FM 组相比, 复合植物蛋白源替代不同梯度的鱼粉后均降低了血浆胆固醇(CHO)含量, 但仅 PP40III 和 PP80 组有显著性降低($P<0.05$)。不同实验饲料对半滑舌鲷的血浆甘油三酯含量影响不显著($P>0.05$)。

表 5 摄食不同饲料对半滑舌鲷形体指标和血浆生理指标的影响
Tab. 5 Body index and plasma physiological index of tongue sole fed different experimental diets

n=3; $\bar{x} \pm SE$

饲料 diet	形体指标 body index			血浆 plasma	
	肝体比/% HSI	脏体比/% VSI	肥满度/% CF	胆固醇/(mmol·L ⁻¹) CHO	甘油三酯/(mmol·L ⁻¹) TG
FM	0.54±0.03 ^a	2.63±0.01 ^{abcd}	0.80±0.03 ^{ab}	5.38±0.15 ^a	7.04±1.21
PP20	0.49±0.03 ^{ab}	2.57±0.03 ^{bcd}	0.77±0.01 ^{ab}	5.28±0.60 ^{ab}	7.72±0.93
PP30	0.43±0.02 ^b	2.66±0.08 ^{abc}	0.77±0.04 ^{ab}	4.43±0.41 ^{abc}	6.22±0.32
PP40I	0.47±0.01 ^{ab}	2.30±0.01 ^d	0.74±0.01 ^{ab}	4.77±0.37 ^{abc}	7.07±0.70
PP40II	0.46±0.01 ^{ab}	2.45±0.09 ^{cd}	0.77±0.00 ^{ab}	4.43±0.21 ^{abc}	7.02±0.93
PP40III	0.53±0.01 ^{ab}	2.940.01 ^a	0.82±0.01 ^a	3.53±0.11 ^{bc}	5.04±0.53
PP40IV	0.45±0.01 ^{ab}	2.34±0.03 ^{cd}	0.79±0.03 ^{ab}	4.34±0.49 ^{abc}	7.47±1.20
PP60	0.51±0.02 ^{ab}	2.83±0.16 ^{ab}	0.72±0.03 ^{ab}	3.98±0.28 ^{abc}	7.16±1.05
PP80	0.52±0.03 ^{ab}	2.67±0.06 ^{abc}	0.71±0.02 ^b	3.42±0.33 ^c	5.72±1.01
P value	0.02	<0.001	0.04	0.01	0.53

注: 同一列标注有不同上标字母表示差异显著($P<0.05$).
Note: Values in the same column with different superscript are significantly different ($P<0.05$).

2.4 后肠组织结构特征

后肠组织切片结果显示, FM(图 1a)、PP20(图 1b)和 PP40II(图 1e)和 PP40IV(图 1g)组肠组织结构完整; PP30(图 1c)、PP40I(图 1d)、PP40III(图 1f)和 PP60(图 1h)组小肠绒毛结构中有少量损伤, 小肠绒毛结构的固有层和上皮层有少量分离; PP80(图 1i)组小肠绒毛结构出现严重损伤现象, 固有层和上皮层大量分离。

3 讨论

3.1 不同实验饲料对半滑舌鲷存活和生长的影响

本实验表明, 随着复合植物蛋白源替代鱼粉水平的升高, 半滑舌鲷的生长性能和饲料利用均未受到显著影响($P>0.05$), 即使在高替代水平组(60%、80%)也未见生长、摄食和饲料利用率有显著降低。由此可知, 半滑舌鲷在 9 周的养殖周期

内, 能够有效利用实验所用的高水平复合植物蛋白源。相似的研究结果在埃及鲷(*Solea aegyptiaca*)^[26]、塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)^[27]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[24]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[28]、金头鲷(*Sparus aurata*)^[29]、鸚鵡鱼(*Oplegnathus fasciatus*)^[9]等都有报道。与此相反, 也有一些研究表明, 随着饲料中鱼粉含量的降低, 植物蛋白源含量的升高, 养殖对象的生长显著降低^[23, 30-31]。

研究发现, 当复合植物蛋白源替代不同水平的鱼粉后, 半滑舌鲷的特定生长率(SGR)、饲料效率(FER)和蛋白质效率(PER)均较鱼粉组数值保持不变或者提高, 其中 PP30、PP40II、PP40III 和 PP60 组的 SGR、FER 和 PER 较全鱼粉组分别提高 4.12%~10.31%、1.71%~16.07%和 6.14%~10.53% ($P>0.05$)。这说明使用复合植物蛋白源替代一定水平鱼粉蛋白时, 不但没有降低生长, 反

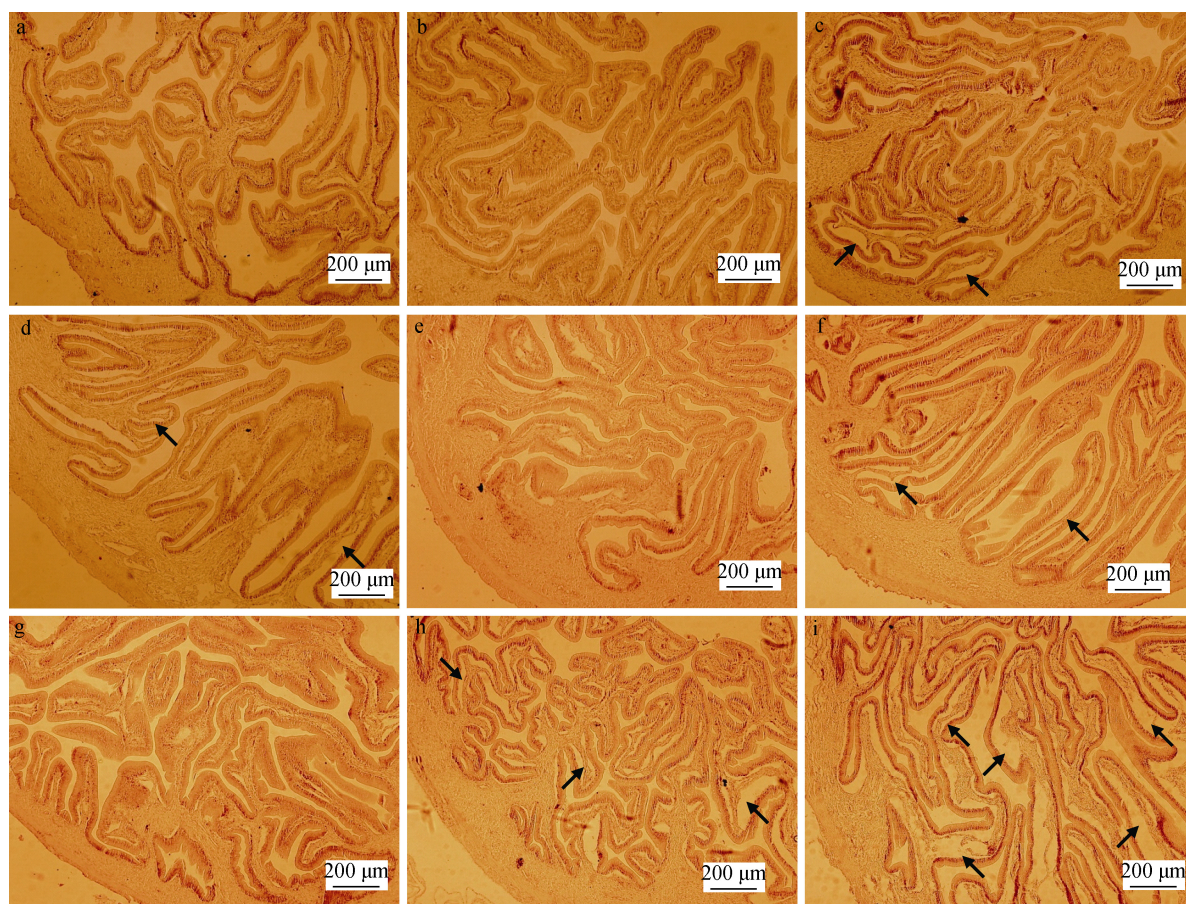


图 1 摄食不同饲料对半滑舌鲷后肠组织结构的影响

图 a、b、e 和 g 的后肠组织结构正常；图 c、d、f 和 h 后肠组织结构有少量损伤，箭头所示处固有层和上皮层有少量分离。图 i 后肠组织结构损伤严重，箭头所示处固有层和上皮层有大量分离。

Fig. 1 Distal intestine histology of tongue sole fed different experimental diets

Fig. a, b, e and g are normal intestine tissue structure; Fig. c, d, f and h intestine structure has a little damage, the lamina propria and the epithelium has quite a small amount of separation; Fig. i shows the intestine structure was serious damaged, the lamina propria and the epithelium has quite a lot of separation.

而可一定程度改善生长性能，这与其他学者研究结果一致^[16, 32]。半滑舌鲷能有效利用复合植物蛋白源的原因大概有 4 种：(1)自然条件下半滑舌鲷以底栖生物为食，食性杂^[33]，肠结构较肉食性鱼类发达^[34]，食物在消化道内滞留时间长(11 h 左右)等原因，因而对植物蛋白的利用能力强；(2)本实验选用的半滑舌鲷为 255 g 左右的中鱼，而绝大多数鱼粉替代研究所选用的鱼类为不超过 50 g 的幼鱼^[6, 15, 26]。中鱼阶段鱼体无论对饲料蛋白源的氨基酸组成还是对饲料中抗营养因子的敏感性均较早期生长阶段降低，且此阶段鱼体对蛋白质的需求量也较幼鱼低^[35]。另外，在此阶段，消化系统的结构和功能已逐步完善，消化腺逐步形成^[36]，利用植物

蛋白的能力比幼鱼阶段更强些；(3)当饲料中植物蛋白源的添加量逐渐升高时，氨基酸的不平衡性表现得越来越明显，对生长的抑制作用也越来越显著^[37-38]。但在一定的添加范围内，植物蛋白源的复合使用可能会改善单一植物原料替代时导致的必需氨基酸缺乏，使饲料中的氨基酸配比趋于合理，使之适合于水生动物的需求^[35, 37]；(4)多种蛋白源搭配使用可以降低某些抗营养因子过高的可能，加之添加多种可缓解抗营养因子抗性作用的添加剂，如植酸酶、金属离子和牛磺酸等，从而保证在高水平替代饲料鱼粉后仍使半滑舌鲷保持较高的生长和饲料利用能力。

此外，与 PP40III 组相比，PP40IV 组半滑舌鲷

的特定增长率、饲料效率、肝体比和脏体比分别降低了 3.92%、5.56%、15.09%和 20.41%。这表明在使用复合植物蛋白源替代 40%鱼粉蛋白基础上, 添加 0.5%的牛磺酸对半滑舌鲷生长、饲料利用和形体指标均有改善作用。在虹鳟^[39]和军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[16]中也有类似报道。

3.2 不同实验饲料对半滑舌鲷全鱼体组成和生理生化指标的影响

本实验表明, 复合植物蛋白源替代不同水平的饲料鱼粉蛋白后, 均降低了鱼体粗脂肪含量, 降低幅度在 1.73%~21.70%, 其中 PP40III 和 PP80 组较全鱼粉组有显著性降低。在红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)^[40]、金头鲷(*Sparus aurata*)^[14]和尖吻鲈(*Lates calcarifer*)^[41]等鱼类上也发现相似的结果, 表明当植物蛋白源替代鱼粉比例过高, 可以影响鱼类体脂积累。这可能是由于植物蛋白源中非淀粉性多糖和低聚糖含量较高, 导致了脂肪的消化吸收率下降, 因而影响了脂肪在水生动物体内的累积代谢率, 使鱼类脂肪含量随着饲料中植物蛋白源含量的升高而下降^[11, 42]。

肝脏是中间代谢的主要器官, 同时还是重要的营养储存器官, 在营养变动时, 肝脏重量会发生明显变化。研究表明, 复合植物蛋白源添加组的肝体比均低于全鱼粉组, 降低幅度为 1.85%~20.37%, 仅 PP30 组差异显著。说明复合植物蛋白源替代饲料鱼粉后使半滑舌鲷形体发生一定程度改变。

饲料中复合植物蛋白源水平对半滑舌鲷血浆胆固醇含量影响显著, 鱼粉组血浆胆固醇含量最高, 随着植物蛋白源替代水平的增加血浆胆固醇含量逐渐下降, 在最高替代组血浆胆固醇含量最低。大量研究发现, 饲料蛋白源显著影响鱼类血液胆固醇浓度。目前, 在黄尾鲷(*Seriola quinqueradiata*)^[43]、虹鳟^[28]、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[44]、欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[45]等鱼类上都发现植物蛋白源的降胆固醇作用。Yun 等^[46-47]在大菱鲆饲料鱼粉替代研究中发现, 植物蛋白源降低鱼体胆固醇的作用是由于植物原料中本身胆固醇含量较低的缘故。

综上所述, 复合植物蛋白源替代鱼粉后降低了全鱼粗脂肪含量、肝体比及血浆胆固醇含量, 这些指标均与脂代谢相关, 因此研究表明高比例植物蛋白源替代鱼粉后导致鱼体内脂代谢平衡的改变^[48], 引起脂肪沉积的降低和形体指标的变化, 其分子机制有待进一步研究。

3.3 不同实验饲料对半滑舌鲷后肠组织结构特征的影响

鱼类的肠道组织由黏膜层、黏膜下层、肌肉层和浆膜层构成。肠上皮细胞是吸收营养物质的功能细胞, 前肠和后肠是行使消化吸收功能的主要部位, 而后肠为炎症多发部位。因此, 肠道形态结构, 尤其是肠黏膜的正常结构与功能是营养物质充分消化与吸收的基本保证。本研究发现, 不同实验处理组的后肠组织结构有所不同, FM、PP20 和 PP40II 组后肠组织结构完整, PP30、PP40I、PP40III、PP40IV 和 PP60 组小肠绒毛结构中有少量损伤, PP80 组小肠绒毛结构有严重损伤现象。

很多研究表明, 植物蛋白源中的抗营养因子水平会影响鱼体生长或肠道组织结构的完整性^[49-51]。Baeverfjord 等^[49]指出用含有大豆粉的饲料饲养大西洋鲑, 会导致肠炎; 当饲料中去除大豆成分后, 大西洋鲑能够恢复到健康状态。Francis 等^[52]证实, 包括牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)和真鲷(*Pagrosomus major*)在内的高价值的海水鱼类对植物蛋白中的抗营养因子是非常敏感的, 极少量的抗营养因子就能对这几种鱼产生负面的影响。与之不同的是, 半滑舌鲷对少量的抗营养因子不敏感, 这与 Burrells 等^[50]的研究结果类似。本实验设计中使用了多种可以中和抗营养因子的添加剂, 如植酸酶、金属离子和牛磺酸等, 可在一定程度上起到缓解抗营养因子对肠道结构的破坏作用。关于高比例植物蛋白源引发鱼类肠道损伤的诱因, 本实验分析发现, 半滑舌鲷肠道受损伤情况与饲料中游离棉酚含量有很大相关性(表 1)。另有研究者认为大豆凝集素和大豆抗原蛋白(大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白)对肠道结构也有很大的破坏作用^[51, 53-54]。

4 结论

在 9 周养殖时间内, 使用复合植物蛋白源可以有效替代 80% 的饲料鱼粉蛋白而不影响半滑舌鲷生长性能、饲料利用和蛋白质沉积; 但是, 植物蛋白源的使用影响了鱼体脂肪代谢, 表现为高比例植物蛋白源的使用显著降低了全鱼粗脂肪和血浆胆固醇的含量, 另外也降低了鱼体的肝体比; 当复合植物蛋白源替代饲料鱼粉水平超过 60% 时, 小肠绒毛结构损伤严重。综上所述, 研究表明复合植物蛋白源替代饲料鱼粉水平不宜超过 60%; 当鱼粉替代比例为 60% 时的各植物蛋白源最佳配比为: 玉米蛋白粉: 大豆浓缩蛋白: 谷朊粉: 花生粕: 棉籽粕=2.7: 2.3: 2: 1.2: 1。

参考文献:

- [1] Naylor R L, Hardy R W, Bureau D P, et al. Feeding aquaculture in an era of finite resources[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(36): 15103–15110.
- [2] Hardy R, Kissil G. Trends in aquaculture feeding: We can now obtain a kg of salmon weight gain for each kg of feed[J]. Feed Mix, 1997, 5: 31–37.
- [3] Hardy R W. Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of fishmeal[J]. Aquacult Res, 2010, 41(5): 770–776.
- [4] Cheng Z J, Hardy R W. Apparent digestibility coefficients and nutritional value of cottonseed meal for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquaculture, 2002, 212(1-4): 361–372.
- [5] Booth M A, Allan G L. Utilization of digestible nitrogen and energy from four agricultural ingredients by juvenile silver perch *Bidyanus bidyanus*[J]. Aquacult Nutr, 2003, 9(5): 317–326.
- [6] Khan M A, Jafri A K, Chadha N K, et al. Growth and body composition of rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing oilseed meals: Partial or total replacement of fish meal with soybean meal[J]. Aquacult Nutr, 2003, 9(6): 391–396.
- [7] Adamidou S N, Henry M, Grigorakis K, et al. Growth, feed utilization, health and organoleptic characteristics of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed extruded diets including low and high levels of three different legumes[J]. Aquaculture, 2009, 293(3-4): 263–271.
- [8] Alami-Durante H, Médale F, Cluzeaud M, et al. Skeletal muscle growth dynamics and expression of related genes in white and red muscles of rainbow trout fed diets with graded levels of a mixture of plant protein sources as substitutes for fishmeal[J]. Aquaculture, 2010, 303(1-4): 50–58.
- [9] Lim S J, Lee K J. Partial replacement of fish meal by cottonseed meal and soybean meal with iron and phytase supplementation for parrot fish *Oplegnathus fasciatus*[J]. Aquaculture, 2009, 290(3): 283–289.
- [10] Mundheim H, Aksnes A, Hope B. Growth, feed efficiency and digestibility in salmon (*Salmo salar* L.) fed different dietary proportions of vegetable protein sources in combination with two fish meal qualities[J]. Aquaculture, 2004, 237(1-4): 315–331.
- [11] Opstvedt J, Aksnes A, Hope B, et al. Efficiency of feed utilization in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with increasing substitution of fish meal with vegetable proteins[J]. Aquaculture, 2003, 221(1-4): 365–379.
- [12] Ostaszewska T, Dabrowski K, Palacios M E, et al. Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins[J]. Aquaculture, 2005, 245(1-4): 273–286.
- [13] Fournier V, Huelvan C, Desbruyeres E. Incorporation of a mixture of plant feedstuffs as substitute for fish meal in diets of juvenile turbot (*Psetta maxima*)[J]. Aquaculture, 2004, 236(1-4): 451–465.
- [14] Gómez-Requeni P, Mingarro M, Caldach-Giner J A, et al. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. Aquaculture, 2004, 232(1-4): 493–510.
- [15] Biswas A K, Kaku H, Ji S C, et al. Use of soybean meal and phytase for partial replacement of fish meal in the diet of red sea bream, *Pagrus major*[J]. Aquaculture, 2007, 267(1): 284–291.
- [16] Lunger A N, McLean E, Gaylord T, et al. Taurine supplementation to alternative dietary proteins used in fish meal replacement enhances growth of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. Aquaculture, 2007, 271(1): 401–410.
- [17] Pinto W, Figueira L, Ribeiro L, et al. Dietary taurine supplementation enhances metamorphosis and growth potential of solea senegalensis larvae[J]. Aquaculture, 2010, 309(1-4): 159–164.
- [18] Chen J. Effects of fermentation, exogenous enzyme and feeding stimulants on utilization of soybean meal protein by Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006.[陈京华. 微生物发酵、外源酶制剂和促摄食物物质对牙鲆利用豆粕蛋白的影响[D].

- 青岛: 中国海洋大学, 2006.]
- [19] Hansen A C, Rosenlund G, Karlsen Ø, et al. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for atlantic cod (*Gadus morhua* L.) i — effects on growth and protein retention[J]. Aquaculture, 2007, 272(1-4): 599–611.
- [20] Kaushik S, Coves D, Dutto G, et al. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the european seabass, *dicentrarchus labrax*[J]. Aquaculture, 2004, 230(1): 391–404.
- [21] Niu H, Chang J, Wang L. The biology and cultural ecology of *Cynoglossus semilaevis* Güntuer[J]. Fisheries Science, 2007, 26 (7): 425–426.[牛化欣, 常杰, 王莉. 半滑舌鲷生物学及养殖生态学研究进展[J]. 水产科学, 2007, 26(7): 425–426.]
- [22] Zhang X. Research on the fetation and further nutritional needs of *Cynoglossus semilaevis* juvenile[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006.[张鑫磊. 半滑舌鲷胚胎发育及幼鱼营养需求的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.]
- [23] Liu X. The study on protein nutrition physiology of turbot, *Scophthalmus maximus* Linnaeus and half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis* Gunther[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010.[刘兴旺. 大菱鲆及半滑舌鲷蛋白营养生理的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.]
- [24] Torstensen B, Espe M, Sanden M, et al. Novel production of atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends[J]. Aquaculture, 2008, 285(1): 193–200.
- [25] Regost C, Arzel J, Kaushik S. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*)[J]. Aquaculture, 1999, 180(1): 99–117.
- [26] Bonaldo A, Roem A J, Pecchini A, et al. Influence of dietary soybean meal levels on growth, feed utilization and gut histology of egyptian sole (*Solea aegyptiaca*) juveniles[J]. Aquaculture, 2006, 261(2): 580–586.
- [27] Aragao C, Conceicao L E, Dias J, et al. Soy protein concentrate as a protein source for senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) diets: Effects on growth and amino acid metabolism of postlarvae[J]. Aquacult Res, 2003, 34(15): 1443–1452.
- [28] Kaushik S, Cravedi J, Lalles J, et al. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Aquaculture, 1995, 133(3): 257–274.
- [29] Sitjà-Bobadilla A, Peña-Llopis S, Gómez-Requeni P, et al. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. Aquaculture, 2005, 249: 387–400.
- [30] Kissil G W, Lupatsch I, Higgs D, et al. Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead seabream *Sparus aurata* L.[J]. Aquacult Res, 2000, 31(1): 595–601.
- [31] Li H T, Mai K S, Ai Q H, et al. Apparent digestibility of selected protein ingredients for larger yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(3): 370–376.[李会涛, 麦康森, 艾庆辉, 等. 大黄鱼对几种饲料蛋白原料消化率的研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(3): 370–376.]
- [32] Kikuchi K. Partial replacement of fish meal with corn gluten meal in diets for japanese flounder *paralichthys olivaceus*[J]. J World Aquacult Soc, 1999, 30(3): 357–363.
- [33] Xie X Y, Li J E, Li C H, et al. The biology and culture of *Cynoglossus semilaevis*[J]. Fisheries Science & Technology, 2009, (2): 40–42.[颜晓勇 李加儿, 李纯厚, 等. 半滑舌鲷生物学特性与养殖技术[J]. 水产科技, 2009, (2): 40–42.]
- [34] Wootton R J. Ecology of teleost fishes[M]. London: London Champan and Hall, 1990.
- [35] Ai Q, Xie X. Advance in utilization of plant proteins by aquatic animals[J]. Periodical of Ocean University of China, 2005, 35(6): 929–935.[艾庆辉, 谢小军. 水生动物对植物蛋白源利用的研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(6) : 929–935.]
- [36] De Silva S S, Anderson T A. Fish nutrition in aquaculture[M]. London: Chapman & Hall, 1993.
- [37] Elangovan A, Shim K. The influence of replacing fish meal partially in the diet with soybean meal on growth and body composition of juvenile tin foil barb (*Barbodes altus*)[J]. Aquaculture, 2000, 189(1): 133–144.
- [38] Hasan M, Macintosh D, Jauncey K. Evaluation of some plant ingredients as dietary protein sources for common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry[J]. Aquaculture, 1997, 151(1): 55–70.
- [39] Gaylord T G, Barrows F T, Teague A M, et al. Supplementation of taurine and methionine to all-plant protein diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquaculture, 2007(1), 269: 514–524.
- [40] Lim S J, Kim S S, Ko G Y, et al. Fish meal replacement by soybean meal in diets for tiger puffer, *Takifugu rubripes*[J]. Aquaculture, 2011, 313(1-4): 165–170.
- [41] Tantikitti C, Sangpong W, Chiavareesajja S. Effects of defatted soybean protein levels on growth performance and nitrogen and phosphorus excretion in asian seabass (*Lates calcarifer*)[J]. Aquaculture, 2005, 248(1): 41–50.

- [42] Gallagher M L. The use of soybean meal as a replacement for fish meal in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*) [J]. *Aquaculture*, 1994, 126(1-2): 119-127.
- [43] Shimeno S, Hosokawa H, Yamane R, et al. Change in nutritive value of defatted soybean meal with duration of heating time for young yellowtail [A]. *Bull Jpn Soc Sci Fish*, 1992.
- [44] Hossain M A, Focken U, Becker K. Effect of soaking and soaking followed by autoclaving of sesbania seeds on growth and feed utilisation in common carp, *Cyprinus carpio* L. [J]. *Aquaculture*, 2001(1-2), 203: 133-148.
- [45] Robaina L, Corraze G, Aguirre P, et al. Digestibility, postprandial ammonia excretion and selected plasma metabolites in european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed pelleted or extruded diets with or without wheat gluten [J]. *Aquaculture*, 1999, 179(1-4): 45-56.
- [46] Yun B, Mai K, Zhang W, et al. Effects of dietary cholesterol on growth performance, feed intake and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed high plant protein diets [J]. *Aquaculture*, 2011, 319(1): 105-110.
- [47] Yun B, Ai Q, Mai K, et al. Synergistic effects of dietary cholesterol and taurine on growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed high plant protein diets [J]. *Aquaculture*, 2012, 324-325: 85-91.
- [48] Panserat S, Kolditz C, Richard N, et al. Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets [J]. *Brit J Nutr*, 2008, 100(5): 953-967.
- [49] Baeverfjord G, Krogdahl Å. 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]. *J Fish Dis*, 1996, 19(5): 375-387.
- [50] Burrells C, Williams P, Southgate P, et al. Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999, 72(3): 277-288.
- [51] 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): 91-106.
- [52] Francis G, Makkar H P S, Becker K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish [J]. *Aquaculture*, 2001, 199(3-4): 197-227.
- [53] Refstie S, Korsøen ØJ, 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.
- [54] Refstie S, Sahlström S, Bråthen E, et al. Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Aquaculture*, 2005, 246(1): 331-345.

Effects of replacing fish meal with plant-based protein on growth, physiological and biological indices, and intestinal histology in tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther

DAI Weiwei, MAI Kangsen, XU Wei, ZHANG Yanjiao, XU Dandan, AI Qinghui

Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feeds, Ministry of Agriculture; The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: This study was conducted to replace fish meal protein (FM) with plant-based protein in the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) diet without affecting growth performance, physiological and biological indices, or intestinal histology. Six plant ingredients (wheat gluten, soy protein concentrate, soybean meal, cottonseed meal, peanut meal, and corn gluten meal) were selected, and eight plant-based diets were formulated to replace 20% (PP20), 30% (PP30), 40% (PP40I, PP40II, PP40III, and PP40IV), 60% (PP60), and 80% (PP80) of FM. Each diet was assigned randomly to triplicate groups of 15 fish [initial weight, (255.21 ± 0.79) g] per 500-L aquarium. The fish were maintained in flow-through aquaria and fed twice daily to apparent satiation for 9 weeks. The results showed that weight gain, specific growth rate, feed efficiency ratio, protein efficiency ratio, protein retention, whole-body crude protein, and plasma triglycerides were not affected by the different plant-based protein diets compared with those of the FM-based diet ($P > 0.05$). However, whole-body crude lipid and plasma cholesterol levels were negatively correlated with increasing plant-based protein level ($P < 0.05$). The hepatosomatic index in fish in the PP30 treatment was significantly lower than that in fish in the FM treatment ($P < 0.05$). In addition, the viscerosomatic index of the PP40III diet group was significantly higher than that of the three other 40% FM-substituted diets. The histological results showed that intestinal villus of the hindgut were seriously damaged in the PP80 treatment, whereas they remained intact in the other treatments. According to these results, 20%, 30%, 40%, 60%, and 80% FM can be replaced by plant-based protein without affecting survival, growth performance, or feed efficiency of *C. semilaevis*. However, replacing 80% of the FM with plant-based protein affected the physiological and histological indices, which would likely reduce growth performance and feed intake in long-term trials. Thus, our results indicate that up to 60% of FM can be replaced by plant-based protein in the tongue sole diet without affecting growth, physiological and biological indices, or intestinal histology.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; plant-based proteins; growth; physiological index; histology

Corresponding author: AI Qinghui. E-mail: qhai@ouc.edu.cn