

蛋白水解肽-Fe²⁺配合物对克氏原螯虾生长及非特异性免疫的影响

王晓玲, 张宾, 马路凯, 王强, 邓尚贵, 王斌

(浙江海洋学院食品与医药学院, 浙江舟山 316000)

摘要: 在饲料中添加蛋白水解肽-Fe²⁺配合物 (TPH-Fe²⁺), 探讨其对克氏原螯虾生长及非特异性免疫的影响。生长性能结果表明, 饲喂 60 d 后, 400~1000 mg/kg TPH-Fe²⁺添加组与空白组相比, 螯虾成活率、增重率、特定增长率及出肉率分别提高 9.94~10.10%、8.55~8.72%、0.24~0.29%/d 及 2.39~3.05% ($P<0.05$); 添加 800、1000 mg/kg 时, 显著提高螯虾粗蛋白及粗脂肪含量。免疫结果表明, 饲喂 30 d, 200、400 mg/kg TPH-Fe²⁺对螯虾血清和肝胰腺 SOD、PO、LSZ 和 ACP 活力, 与空白组相比较无显著性差异 ($P>0.05$); 800、1000 mg/kg TPH-Fe²⁺显著提高螯虾体内 SOD、LSZ 和 ACP 酶活力 ($P<0.05$)。饲喂 60 d, 400、600 mg/kg TPH-Fe²⁺对螯虾血清和肝胰腺中 SOD、LSZ 活力, 表现出显著性提高作用 ($P<0.05$), 而对 PO、ACP 活力无显著性影响 ($P>0.05$); 添加达 800、1000 mg/kg 时, 显著提高螯虾体内 SOD、PO、LSZ 和 ACP 酶活力 ($P<0.05$)。综合考虑螯虾生长性能及非特异性免疫酶活性, 在饲料中添加 TPH-Fe²⁺800~1000 mg/kg 为宜。

关键词: 水解肽; 配合物; 克氏原螯虾; 生长特性; 非特异性免疫

文章编号: 1673-9078(2014)11-71-78

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.014

Effect of Protein Hydrolysate-Fe²⁺ Complex on the Growth Performance and Non-specific Immune Parameters of *Procambarus clarkii*

WANG Xiao-ling, ZHANG Bin, MA Lu-kai, WANG Qiang, DENG Shang-gui, WANG Bin

(College of Food and Medicine, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effects of addition of protein hydrolysate-Fe²⁺ complex (TPH-Fe²⁺) to feed on the growth performance and non-specific immune parameters of *Procambarus clarkii*. After 60 days of consumption of the basal feed supplemented with 400~1000 mg/kg TPH-Fe²⁺, the survival rate, weight, specific growth rate, and meat yield were increased by 9.94%~10.10%, 8.55%~8.72%, 0.24%~0.29%/d and 2.39%~3.05%, respectively ($P < 0.05$), compared to the control group. When 800 and 1000 mg/kg TPH-Fe²⁺ were added to the feed, the crude protein and fat contents of *P. clarkii* increased significantly. After 30 days of consumption of the basal feed supplemented with 200 and 400 mg/kg TPH-Fe²⁺, superoxide dismutase (SOD), phenoloxidase (PO), lysozyme (LSZ), and acid phosphatase (ACP) activities in the serum and hepatopancreas did not differ significantly from those in the control group ($P > 0.05$). However, feed supplementation with 800 and 1000 mg/kg TPH-Fe²⁺ significantly increased the SOD, LSZ, and ACP activities ($P < 0.05$). After 60 days of feeding with 400 and 600 mg/kg TPH-Fe²⁺, the activities of SOD and LSZ were significantly enhanced, but the activities of PO and ACP were not significantly affected. When 800 and 1000 mg/kg TPH-Fe²⁺ were added to the feed, the SOD, PO, LSZ, and ACP activities were all significantly increased ($P < 0.05$). In conclusion, the addition of 800~1000 mg/kg TPH-Fe²⁺ to the basal feed could improve the growth performance of and activities of non-specific immune enzymes in *P. clarkii*.

Key words: protein hydrolysate; complex; *Procambarus clarkii*; growth characteristics; non-specific immunity

收稿日期: 2014-04-21

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31201452); 浙江省公益性技术应用研究计划项目 (2012C33081); 舟山市科技计划项目 (2013C41015)

作者简介: 王晓玲 (1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工及贮藏

通讯作者: 张宾 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为水产品加工及贮藏

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 俗称小龙虾, 是目前全世界养殖最广的淡水螯虾种类, 其在我国长江中下游地区均有养殖。克氏原螯虾营养和食疗价值较高, 近年来国内外需求量不断上升, 致使其养殖总量也逐年增大。2012 年, 我国克氏原螯虾总产量为 55.48 万 t, 比 2011 年增加 14.09%^[1]。另一方面, 随着现代工业发展, 环境污染加剧也导致了养殖螯虾

体免疫机能降低、生长速度变缓、饵料效率下降及病原体疾病频发等多种问题。

螯虾等甲壳类水产动物抵御外界胁迫因子的最好方法,是增强机体的免疫功能。由于甲壳类水产动物体液中不含有免疫球蛋白,因而其免疫主要为非特异性免疫。谢佳磊等^[2]将枯草芽孢杆菌作为饲喂添加物,饲喂螯虾 7 d 后,虾体溶菌活力、酚氧化酶及抗菌活性均显著高于空白组。任秀芳等^[3]发现,在螯虾饲料中添加 0.5~1.5% 壳聚糖时,可对螯虾起到一定的免疫保护作用,并显著增强了其消化生理机能。洪徐鹏等^[4]比较不同浓度黄芪多糖对螯虾非特异性免疫的影响发现,当黄芪多糖添加范围为 0.40~0.75% 时,螯虾增重率、特定生长率及非特异性免疫酶活性最高。

蛋白水解肽可与机体必需微量元素结合,形成蛋白肽-金属配合物(有机金属化合物),其在提高生物体生长繁殖、增强抗病免疫力、调节生理代谢等方面均有重要作用。Gelinsky 等^[5]制备了谷胱甘肽及其衍生肽与 Zn^{2+} 的配合物,并证实螯合制备的蛋白肽- Zn^{2+} 配合物可满足人体对谷胱甘肽的需求。郭存荣等^[6]将蛋白肽- Zn^{2+} 配合物进行罗非鱼饲喂试验,发现饲料中添加该配合物显著提高了罗非鱼的生长性能、饲料利用率、血清溶菌酶及 SOD 活力。Deng 等^[7]以低值鱼类为原料,经酶解、金属螯合制备了蛋白肽- Fe^{2+} 配合物,经研究发现制备配合物具有较强抗氧化、清除自由基活性。目前,关于带鱼加工副产物水解肽-金属配合物,对于甲壳类水产动物生长及非特异性免疫的影响研究,尚未见报道。

本研究在实验室前期蛋白水解肽-金属配合物制备、抗氧化及营养价值研究基础上^[7-9],在克氏原螯虾饲料中添加带鱼蛋白肽- Fe^{2+} 配合物,通过测定螯虾存活率、特定增长率、增重率及出肉率,以及血清和胰腺组织中非特异性免疫因子活性,重点探讨制备配合物对克氏原螯虾生长性能及非特异性免疫功能的影响,以期蛋白肽- Fe^{2+} 配合物在克氏原螯虾养殖及其他甲壳类动物机体免疫调节中的应用提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

试验原料:克氏原螯虾,平均体长 5.5 ± 0.2 cm,平均体重 10.2 ± 0.4 g,于室内水族箱(100×50×50 cm,15 尾/箱,水深 15 cm,设置瓦片和树枝为遮蔽物)内驯养 2 周后,挑选健康活泼、体色正常、大小均匀的试验虾种,进行饲喂试验。带鱼(*Trichiurus lepturus*)加工副产物(含鱼头、内脏、鱼骨及碎肉等),浙江兴

业集团有限公司提供。

试验仪器:FreeZone 4.5 真空冷冻干燥机,美国 Labconco 公司;U-2800 紫外分光光度计,日本 Hitachi 公司;SHAB 恒温水浴振荡器,常州国华有限公司;MDF-U53V 型超低温冰箱,日本 SANYO 公司;实验室纳滤膜分离设备,上海朗极膜分离设备工程有限公司;Kjeltec8400 全自动凯氏定氮仪瑞士 Foss 公司;Soxtec2050 全自动索氏抽提仪,瑞士 Foss 公司;高速组织捣碎机,上海精科仪器有限公司;CF16RX 型冷冻离心机,日本日立公司等。

1.2 试验分组及处理

1.2.1 带鱼蛋白水解肽- Fe^{2+} 配合物制备^[10]

带鱼副产物约 20 g,溶于 200 mL 去离子水,调节混合浆液 pH 值至 6.5 ± 0.1 ,40 °C 保温 10 min;按 20000 U/g 比例加入木瓜蛋白酶,45 °C 水浴、搅拌酶解 8 h;每隔 2 h 调节体系 pH 值至 6.5 ± 0.1 ;酶解结束后,85 °C 水浴加热 10 min,钝化木瓜蛋白酶;快速冷却至 4 °C,5000 r/min 离心 20 min,获得中间清液为带鱼蛋白水解肽。将蛋白水解肽溶液以 1.0 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0,按体积的 2.0% 加入 1 mol/L $FeCl_2$ 溶液(同时加入少量 Vc 保护),30 °C 水浴振荡 30 min,10000 r/min 离心 20 min,获得上清液;采用实验室纳滤膜分离设备,截留分子量 <1500 Da 水解肽- Fe^{2+} 配合物(混合肽);经冷冻干燥后,即为蛋白水解肽- Fe^{2+} 配合物(记为 TPH- Fe^{2+})。

1.2.2 克氏原螯虾饲料的制备及组成

基础饲料:鱼粉 37.0%、豆粕 28.0%、大豆油 2.5%、鱼油 2.5%、玉米粉 10.0%、小麦粉 15.0%、复合维生素及各种矿质元素 3.0%、羧甲基纤维素钠 2.0%。经测定,基础饲料营养水平为粗蛋白 28.5%、粗脂肪 6.2%、碳水化合物 41.9%、粗灰分 8.1%。

将以上组分粉碎至 60 目,混合均匀,分别添加 0、200、400、600、800、1000 mg/kg TPH- Fe^{2+} ,加少量水搅拌。采用双螺杆压条机制成直径 1~2 mm 颗粒饲料,经 55 °C 熟化烘干 2 h,室温晾干后于 4 °C 保存、备用。

1.2.3 试验分组及管理

试验分组:①对照组:基础饲料饲喂;②TPH- Fe^{2+} 饲喂组 1:以添加 200 mg/kg TPH- Fe^{2+} 的基础饲料饲喂;③TPH- Fe^{2+} 饲喂组 2:以添加 400 mg/kg TPH- Fe^{2+} 的基础饲料饲喂;④TPH- Fe^{2+} 饲喂组 3:以添加 600 mg/kg TPH- Fe^{2+} 的基础饲料饲喂;⑤TPH- Fe^{2+} 饲喂组 4:以添加 800 mg/kg TPH- Fe^{2+} 的基础饲料饲喂;⑥TPH- Fe^{2+} 饲喂组 5:以添加 1000 mg/kg TPH- Fe^{2+} 的

基础饲料饲喂。(以上各组均 6 个平行饲喂养殖箱, 15 尾螯虾/箱)。

饲养管理: 首先采用 3~4% 食盐水对螯虾浴洗 10 min, 进行虾体消毒。试验期间, 控制水体 pH 7.8~8.0、温度 25 ± 0.2 °C; 静水连续充氧, 每日定时更换 3/4 体积水, 并清洁吸污。每天投喂螯虾体重 5.0~8.0% 饲料, 视情况进行适当调整; 每天投喂 3 次, 采用定时 (06:30、12:30 和 18:30)、定点 (分布均匀, 避免争食) 投喂方法, 同时观察螯虾进食、活动状况。饲喂试验为 60 d。

1.3 试验指标测定

1.3.1 克氏原螯虾生长指标测定

饲养试验第 0、30、60 d, 分别将各箱中克氏原螯虾计数、称重, 计算成活率、增重率、特定增长率及出肉率 (均为平均值)。计算公式如下:

$$\text{成活率}/\% = \text{成活虾尾数}/\text{试验初投放虾尾数} \times 100\%$$

$$\text{增重率}/\% = (\text{试验末虾体重量} - \text{试验初虾体重量}) / \text{试验初虾体重量} \times 100\%$$

$$\text{特定增长率} (\%/d) = \ln(\text{试验末虾体重量} - \text{试验初虾体重量}) / \text{饲养天数} \times 100\%$$

$$\text{出肉率}/\% = \text{肌肉重量} / \text{体重} \times 100\%$$

1.3.2 克氏原螯虾生化成分测定

将螯虾样品称重后置于培养皿中, 65 °C 烘干, 再在 105 °C 烘箱中烘至恒重, 称重计算干物质含量。螯虾肌肉粗蛋白含量采用全自动凯氏定氮仪测定; 粗脂肪含量采用全自动索氏抽提仪测定; 灰分含量采用 GB 5009.4-2010《食品中灰分的测定》测定。

1.3.3 克氏原螯虾非特性免疫指标测定

饲喂结束后, 从每个组中随机取 10 尾螯虾, 采用一次性无菌注射器从虾头胸甲刺入心脏, 抽取血液于离心管中, 4 °C 冰箱中过夜, 5000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液为螯虾血清。采血后螯虾, 迅速采集肝胰腺组织 (4 °C), 加入 9 倍质量的预冷无菌生理盐水, 冰浴匀浆, 3000 r/min 离心 10 min (4 °C), 吸取上清液为螯虾肝胰腺组织提取液。血清和肝胰腺提取液中, 超氧化物歧化酶 (SOD)、酚氧化酶 (PO)、溶菌酶

(LSZ) 及酸性磷酸酶 (ACP) 活性, 采用南京建成生物公司试剂盒进行测定, 具体测定方法及含量计算, 依据说明书进行。所制备样品均在 12 h 内完成测定。

1.3.4 数据处理与分析

数据处理及作图采用 Origin 8.1、SPSS 13.0 统计分析软件, 结果为平均值±标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 TPH-Fe²⁺对克氏原螯虾生长性能的影响

TPH-Fe²⁺饲喂对克氏原螯虾成活率、增重率、特定生长率及出肉率影响, 见表 1。饲喂第 30 d, 添加 0、200、400 mg/kg TPH-Fe²⁺对克氏原螯虾基本生长性能指标, 均无显著性影响 ($P>0.05$); 随着 TPH-Fe²⁺浓度增加 (600~1000 mg/kg), TPH-Fe²⁺对克氏原螯虾的生长, 表现出显著促进作用 ($P<0.05$)。与空白组相比较, 600~1000 mg/kg TPH-Fe²⁺提高螯虾成活率 3.98~4.13%、增重率 5.43~5.84% 及特定增长率 0.22~0.39%/d。饲喂第 60 d, 200 mg/kg TPH-Fe²⁺显著提高了螯虾成活率 (4.24%, $P<0.05$), 而该浓度对螯虾增重率、特定生长率、出肉率未产生显著性影响 ($P>0.05$); 添加 400~1000 mg/kg TPH-Fe²⁺显著提高螯虾成活率 9.94~10.10%、增重率 8.55~8.72%、特定增长率 0.24~0.29%/d 及出肉率 2.39~3.05% ($P<0.05$)。

水解肽与金属元素形成配合物时, 除小肽 N 端氨基、C 端羧基及氨基酸侧链基团可供配位之外, 羧基和亚氨基也可参与配位, 因此形成的水解肽-金属元素的配合率、体内外稳定性更佳^[11]。大量研究表明, 多种不同来源的 (分子量较小) 水解肽, 与金属元素形成的配合物, 具有较为特殊的生物体内转运机制及生理活性, 如表现出抗菌、激素、酶的抑制、免疫、生理调节等功能^[12-13]。本实验制备的 TPH-Fe²⁺进行饲喂, 对螯虾生长性能的影响机制, 可能为摄入螯虾体内的 TPH-Fe²⁺, 通过增强机体的非特异性免疫能力, 而达到改善螯虾生长活力的作用。

表 1 饲喂 TPH-Fe²⁺对克氏原螯虾生长性能的影响

Table 1 Effect of addition of TPH-Fe²⁺ to the feed on the growth performance of *Procambarus clarkii*

TPH-Fe ²⁺ (mg/kg)	成活率/%		增重率/%		特定增长率/(%/d)		出肉率/%
	30 d	60 d	30 d	60 d	30 d	60 d	
0(对照)	95.20±2.14 ^a	84.32±4.20 ^a	76.52±4.36 ^a	108.30±6.41 ^a	2.04±0.12 ^a	1.13±0.09 ^a	11.25±2.16 ^a
200	95.42±3.10 ^a	88.56±3.69 ^b	76.40±3.89 ^a	110.05±5.46 ^a	2.09±0.23 ^a	1.16±0.11 ^a	11.39±3.10 ^a
400	96.30±2.42 ^a	92.15±2.98 ^c	78.19±2.66 ^b	114.39±6.02 ^b	2.11±0.19 ^a	1.24±0.13 ^b	12.85±2.45 ^b
600	99.18±2.07 ^b	94.42±3.56 ^d	82.36±4.40 ^c	116.85±4.59 ^c	2.26±0.29 ^b	1.40±0.15 ^c	13.64±1.99 ^b
800	99.25±1.22 ^b	94.29±4.10 ^d	82.19±3.39 ^c	116.90±6.17 ^c	2.43±0.17 ^c	1.37±0.10 ^c	14.28±1.86 ^c
1000	99.33±2.09 ^b	94.26±3.10 ^d	81.86±3.50 ^c	117.02±4.33 ^c	2.26±0.15 ^b	1.42±0.16 ^c	14.30±2.05 ^c

注：饲喂第 0、30、60 d，分别统计每组实验动物的平均生长性能指标；同列不同小写字母，表示显著性差异 $P < 0.05$ 。

2.2 TPH-Fe²⁺对克氏原螯虾生化特性的影响

饲喂 TPH-Fe²⁺对螯虾基本生化特性影响，见表 2。饲喂第 0 d，空白组螯虾干物质、粗蛋白质、粗脂肪及灰分含量依次为 32.56、39.95、9.22 及 30.23%。添加 200~600 mg/kg TPH-Fe²⁺对螯虾粗蛋白质、粗脂肪含量，无显著性影响 ($P > 0.05$)，而 800、1000 mg/kg TPH-Fe²⁺提高含量依次为 0.62~0.92%、0.14~0.17%，与空白组相比较差异显著 ($P < 0.05$)。对于螯虾干物质和灰分含量的影响，400~1000 mg/kg TPH-Fe²⁺饲喂效果显著 ($P < 0.05$)。综上所述，当 TPH-Fe²⁺添加量达到 800、1000 mg/kg 时，可显著提高饲喂螯虾基本生化特性指标。

表 2 饲喂 TPH-Fe²⁺对克氏原螯虾生化特性的影响

Table 2 Effect of addition of TPH-Fe²⁺ to the feed on the biochemical characteristics of *Procambarus clarkii*

TPH-Fe ²⁺ / (mg/kg)	干物质/%	粗蛋白质/%	粗脂肪/%	灰分/%
0(对照)	32.56±1.25 ^a	39.95±0.98 ^a	9.22±1.02 ^a	30.23±1.16 ^a
200	33.29±1.56 ^a	40.04±1.12 ^a	9.13±0.89 ^a	30.36±1.92 ^a
400	35.78±2.01 ^b	40.18±1.07 ^a	9.28±1.62 ^a	31.50±1.22 ^b
600	36.82±2.32 ^c	40.12±1.48 ^a	9.25±2.10 ^a	32.41±1.99 ^c
800	36.83±2.54 ^c	40.57±0.87 ^b	9.39±2.24 ^b	32.26±2.35 ^c
1000	36.90±3.02 ^c	40.87±0.87 ^b	9.36±1.62 ^b	32.33±2.39 ^c

注：饲喂 60 d，每组实验动物取全虾 10 尾，打碎匀浆后进行测定生化特性指标；同列中不同小写字母，表示显著性差异 $P < 0.05$ 。

2.3 TPH-Fe²⁺对克氏原螯虾非特异性免疫性能的影响

2.3.1 TPH-Fe²⁺对克氏原螯虾 SOD 活性的影响

SOD 作为生物体内清除活性氧反应过程中第 1 个

表 3 饲喂 TPH-Fe²⁺对螯虾 SOD 活性的影响

Table 3 Effect of addition of TPH-Fe²⁺ to the feed on SOD activity in *Procambarus clarkii*

TPH-Fe ²⁺ / (mg/kg)	血清中 SOD/(U/mL)			肝胰腺中 SOD/(U/mL)		
	0 d	30 d	60 d	0 d	30 d	60 d
0(对照)	125.5±2.3	138.1±3.4 ^a	152.0±4.4 ^a	179.3±3.6	184.0±4.4 ^a	192.0±4.8 ^a
200	124.7±3.0	139.5±4.6 ^a	150.9±2.8 ^a	179.5±3.2	183.6±3.6 ^a	192.5±3.3 ^a
400	125.1±2.4	138.5±3.9 ^a	156.1±3.0 ^b	178.7±3.0	184.2±2.9 ^a	194.5±4.1 ^b
600	125.6±2.6	139.2±3.1 ^a	157.4±4.1 ^b	179.2±2.9	186.7±2.4 ^b	196.2±2.6 ^c
800	124.9±2.2	144.6±4.2 ^b	160.9±5.2 ^c	178.4±2.5	187.2±3.0 ^b	196.8±3.0 ^c
1000	125.0±2.1	144.1±3.5 ^b	159.8±3.7 ^c	179.0±3.1	187.9±2.8 ^b	196.5±4.0 ^c

发挥作用的抗氧化酶，在机体抗氧化酶类中处于核心地位。SOD 清除活性氧的能力与生物体的免疫水平密切相关，其活力大小在一定程度上也反应了机体的健康状况。TPH-Fe²⁺饲喂对螯虾血清、肝胰腺组织中 SOD 活性影响，见表 3。饲喂第 0 d，螯虾血清和肝胰腺中，SOD 酶活性为 124.7~125.6 和 178.4~179.5 U/mL。饲喂第 30 d，添加 200、400 mg/kg TPH-Fe²⁺对螯虾血清和肝胰腺 SOD 酶活性，与空白组相比较无显著性差异 ($p > 0.05$)；添加 800、1000 mg/kg 时，TPH-Fe²⁺显著提高螯虾 SOD 酶活性至 144.1~144.6 和 187.2~187.9 U/mL ($p < 0.05$)。饲喂第 60 d，TPH-Fe²⁺添加量为 400~1000 mg/kg 时，即显著提高了血清和肝胰腺中 SOD 酶活性 ($p < 0.05$)；尤其当浓度达 800~1000 mg/kg 时，SOD 酶活性增幅程度更大。

大量研究证实，蛋白质在机体消化道内的终产物大部分是寡肽（或称小肽）而不是游离氨基酸^[4]。金属元素在与寡肽配合后，能借助寡肽的转运、吸收机制，以配合物整体的形式被吸收而直接达到靶向器官，从而增强机体相关酶活性，提高机体蛋白质、脂肪和维生素利用率^[5]。邓尚贵等^[9]采用复合酶水解低值鱼蛋白，制备了水解肽-Fe²⁺配合物，经证实制备的水解肽-Fe²⁺配合物具有显著的体外抗氧化、抑菌活性。郭存荣等^[6]将水解肽-Zn²⁺配合物饲喂奥尼罗非鱼，发现饲料中添加 1.0 g/kg 多肽-Zn²⁺配合物，显著提高了罗非鱼血清中 SOD 活力。SOD 作为 1 种含有金属的活性蛋白酶，其中 1 种形式即为含铁 (Fe-SOD) 蛋白酶^[6]。本实验制备的 TPH-Fe²⁺经体外检测发现，同样具有较强清除自由基能力(结果略)。在螯虾体内实验中，TPH-Fe²⁺显著提高了螯虾体内 SOD 活性，其作用可能是借助 TPH 的转运吸收机制，携带 Fe²⁺到达螯虾血液、肝胰腺及其他组织中，通过寡肽提高机体营养物质利用同时，再结合 Fe²⁺离子作用，协同增强了机体 SOD 活力。

注：饲喂第 0、30、60 d，每组实验动物取全虾 10 尾，分别制备血清、肝胰腺提取液进行 SOD 活性测定；同列中不同小写字母，表示显著性差异 $P < 0.05$ 。

2.3.2 TPH-Fe²⁺对克氏原螯虾 PO 活性的影响

正常情况下，PO 以无活性酚氧化酶原形式，存在于甲壳动物大颗粒血细胞中，一定条件下通过胞吐作用释放，经一系列过程转变成具有活性的 PO，PO 再将酚氧化成醌，形成黑色素而发挥免疫作用，这是虾类等甲壳动物重要的免疫因子^[17]。TPH-Fe²⁺饲喂对螯虾血清、肝胰腺组织中 PO 活性影响，见表 4。螯虾饲喂初始（0 d）血清和肝胰腺中，PO 活性为 3.48~3.53 和 1.19~1.23 U/mL。饲喂第 30 d，与空白组相比较，200~1000 mg/kg TPH-Fe²⁺对虾血清和肝胰腺 PO 活性（3.85~3.95 和 1.37~1.43 U/mL），均无显著性差异影响（ $P > 0.05$ ）。饲喂第 60 d，200~600 mg/kg TPH-Fe²⁺对螯虾 PO 活性无显著性影响（ $P > 0.05$ ）；1000 mg/kg TPH-Fe²⁺显著提高了血清中 PO 活性（4.46 U/mL）；800、1000 mg/kg TPH-Fe²⁺显著提高了肝胰腺组织中 PO 活性（1.74~1.76 U/mL）（ $P < 0.05$ ）。

本实验中螯虾血清和肝胰腺组织中 PO 活性整体

相对较低，是由于整个实验过程，严格控制了养殖动物所处环境、水体理化因子等条件，避免了螯虾遭受外界环境、病原体侵染及重金属离子胁迫等影响，因此，饲喂螯虾体内酚氧化酶原在外界因素影响下激活生成 PO 活性也相对较低。螯虾血清中 PO 活性相对肝胰腺较高，该结果与王建国^[18]、刘晓云^[19]等研究结果相似。机体内 PO 主要是参与宿主的防御反应，但同时其也是一个复杂的酶级联系统，它还可作为调理素，如起到促进血细胞吞噬和包裹作用等^[20]。本实验中低浓度（200~800 mg/kg）、短时间（30 d）TPH-Fe²⁺饲喂，对螯虾机体 PO 活性影响不显著；而当高浓度（1000 mg/kg）、较长时间（60 d）饲喂后，螯虾血清和肝胰腺中 PO 活性出现了一定程度的升高，其原因可能是 TPH-Fe²⁺对 PO 激活级联反应系统中，某些关键因子的激活或信号传导起到了辅助作用^[21]，该结果对于判断螯虾机体非特异性免疫力具有一定参考价值。

表 4 饲喂 TPH-Fe²⁺对螯虾 PO 活性的影响

Table 4 Effect of addition of TPH-Fe²⁺ to the feed on the activity of PO in *Procambarus clarkii*

TPH-Fe ²⁺ (mg/kg)	血清中 PO(U/mL)			肝胰腺中 PO(U/mL)		
	0 d	30 d	60 d	0 d	30 d	60 d
0(对照)	3.52±0.22	3.89±0.36 ^a	4.26±0.33 ^a	1.21±0.13	1.42±0.20 ^a	1.61±0.19 ^a
200	3.49±0.35	3.85±0.42 ^a	4.28±0.27 ^a	1.23±0.12	1.37±0.13 ^a	1.65±0.25 ^a
400	3.48±0.27	3.90±0.34 ^a	4.29±0.19 ^a	1.20±0.11	1.39±0.11 ^a	1.62±0.16 ^a
600	3.50±0.18	3.95±0.18 ^a	4.30±0.16 ^a	1.19±0.14	1.43±0.17 ^a	1.65±0.20 ^a
800	3.53±0.25	3.92±0.26 ^a	4.27±0.31 ^a	1.23±0.15	1.40±0.21 ^a	1.76±0.11 ^b
1000	3.49±0.20	3.90±0.31 ^a	4.46±0.19 ^b	1.20±0.17	1.41±0.16 ^a	1.74±0.16 ^b

注：饲喂第 0、30、60 d，每组实验动物取全虾 10 尾，分别制备血清、肝胰腺提取液进行 PO 活性测定；同列中不同小写字母，表示显著性差异 $P < 0.05$ 。

2.3.3 TPH-Fe²⁺对克氏原螯虾 LSZ 活性的影响

LSZ 广泛存在于生物体血清及其他组织液中，通过切断细菌肽聚糖中 β -1, 4 糖苷键，破坏细胞壁支架致使细胞胀裂死亡。正常虾血淋巴中具有较强溶菌活力，而濒死虾溶菌活性基本丧失^[22]，因此，LSZ 活力可作为检测虾体免疫状态的参考指标。TPH-Fe²⁺饲喂对克氏原螯虾血清、肝胰腺组织中 LSZ 活性影响，见表 5。空白组螯虾血清和肝胰腺中，LSZ 活性为 41.0~41.5 和 27.7~28.3 U/mL。饲喂第 30 d，600~1000 mg/kg TPH-Fe²⁺显著提高了螯虾血清（46.7~46.9 U/mL）和肝胰腺（30.7~31.3 U/mL）中 LSZ 活性（ $P < 0.05$ ）。饲喂第 60 d，400~1000 mg/kg TPH-Fe²⁺对螯虾 LSZ 活性，表现出了显著增强作用（ $P < 0.05$ ）。

林仕梅等^[23]通过比较无机微量元素（Fe、Zn 及

Mn 等）与氨基酸微量元素组合体，对罗非鱼非特异性免疫力影响发现，氨基酸微量元素组合体，对于提高罗非鱼血清和肝胰腺组织中的 LSZ、SOD 及 CAT 等活性效果更佳。郭存荣等^[6]采用水解肽-Zn²⁺饲喂罗非鱼后发现，添加量为 1.0 g/kg 可显著增强罗非鱼血清 LSZ 和 SOD 活性。研究表明，生物体所必需的金属离子（如 Fe、Zn、Ca 及 Mn 等），可在寡肽或氨基酸配位体的保护下，有效抵御与其他离子生成难溶的无机盐，缓解金属元素间的拮抗竞争作用，从而可减少营养物质损失，并增强其吸收利用效率^[24-25]。由实验结果可知，添加 600~1000 mg/kg TPH-Fe²⁺显著提高了螯虾血清和肝胰腺组织中 LSZ 活力，因此，在螯虾基础饲料中添加该配合物，有利于养殖螯虾在遭受环境污染（如亚硝态氮、氯氰菊酯等）、病原体侵染、

重金属离子胁迫时,提高机体的非特异性免疫能力及存活率。

表5 饲喂 TPH-Fe²⁺对螯虾 LSZ 活性的影响

Table 5 Effect of addition of TPH-Fe²⁺ to the feed on the activity of LSZ in *Procambarus clarkii*

TPH-Fe ²⁺ (mg/kg)	血清中 LSZ/(U/mL)			肝胰腺中 LSZ/(U/mL)		
	0 d	30 d	60 d	0 d	30 d	60 d
0(对照)	41.5±1.8	45.4±1.7 ^a	47.3±2.6 ^a	28.3±2.0	30.1±1.6 ^a	32.0±2.1 ^a
200	41.0±2.2	45.1±2.0 ^a	47.5±2.4 ^a	27.8±1.8	29.8±1.7 ^a	32.2±1.9 ^a
400	41.2±1.6	44.9±2.3 ^a	48.3±1.8 ^b	27.7±2.3	29.6±2.0 ^a	33.1±1.6 ^b
600	41.5±2.0	46.8±1.9 ^b	48.5±2.0 ^b	28.0±1.7	30.9±1.8 ^b	33.4±1.9 ^b
800	41.1±2.2	46.7±1.8 ^b	49.8±2.2 ^c	27.9±1.5	31.3±2.2 ^b	33.0±2.3 ^b
1000	41.3±2.1	46.9±2.2 ^b	49.6±3.1 ^c	28.1±1.8	30.7±2.0 ^b	34.3±1.7 ^c

注:饲喂第 0、30、60 d, 每组实验动物取全虾 10 尾, 分别制备血清、肝胰腺提取液进行 LSZ 活性测定; 同列中不同小写字母, 表示显著性差异 P<0.05。

2.3.4 TPH-Fe²⁺对克氏原螯虾 ACP 活性的影响

ACP 在生物体内作为机体巨噬细胞的标识酶, 活性高低反应了巨噬细胞被激活的程度, 其还对生物体钙质吸收、甲壳质分泌及形成等有重要影响。TPH-Fe²⁺ 饲喂对克氏原螯虾血清、肝胰腺组织中 ACP 活性影响, 见表 5。螯虾血清 ACP 活力比肝胰腺低, 这与组织差异性有关; 此外, 肝胰腺组织作为机体解毒器官和脂肪代谢场所, 其水解酶类 ACP 含量较为丰富, 因而 ACP 活力也相对较高。对螯虾血清, 800~1000

mg/kg TPH-Fe²⁺可显著增强 ACP 活力 (P<0.05); 对于螯虾肝胰腺组织, 600~1000 mg/kg TPH-Fe²⁺即可起到显著提高 ACP 活力作用 (P<0.05)。潘剑雄等^[26]将虾头酶解产物饲喂凡纳滨对虾发现, 1.5~3.0%添加量对虾血清中 ACP 活力有明显提高作用。许庆陵等研究罗非鱼多肽-Zn²⁺配合物生物活性发现, 制备的水解肽-Zn²⁺配合物对体外超氧阴离子自由基具有较强清除作用, 同时对小鼠体内巨噬细胞的吞噬活力也有显著增强效果, 其影响机制可能与配合物中水解肽、金属离子两种组成均有关系^[27]。

表6 饲喂 TPH-Fe²⁺对螯虾 ACP 活性的影响

Table 6 Effect of addition of TPH-Fe²⁺ to the feed on the activity of ACP in *Procambarus clarkii*

TPH-Fe ²⁺ (mg/kg)	血清中 ACP/(U/100 mL)			肝胰腺中 ACP/(U/100 mL)		
	0 d	30 d	60 d	0 d	30 d	60 d
0(对照)	3.15±0.14	3.32±0.23 ^a	3.50±0.19 ^a	11.22±0.21	11.89±0.24 ^a	13.28±0.26 ^a
200	3.13±0.17	3.34±0.19 ^a	3.47±0.22 ^a	11.19±0.17	11.84±0.15 ^a	13.30±0.23 ^a
400	3.19±0.20	3.30±0.20 ^a	3.52±0.20 ^a	11.24±0.16	11.82±0.17 ^a	13.27±0.19 ^a
600	3.11±0.16	3.29±0.17 ^a	3.51±0.16 ^a	11.20±0.22	11.95±0.22 ^b	13.95±0.18 ^b
800	3.15±0.20	3.38±0.15 ^b	3.62±0.15 ^b	11.19±0.18	11.97±0.16 ^b	14.06±0.20 ^c
1000	3.14±0.15	3.40±0.25 ^b	3.60±0.21 ^b	11.21±0.20	12.09±0.17 ^c	14.10±0.17 ^c

注:饲喂第 0、30、60 d, 每组实验动物取全虾 10 尾, 分别制备血清、肝胰腺提取液进行 ACP 活性测定; 同列中不同小写字母, 表示显著性差异 P<0.05。

3 结论

以克氏原螯虾为实验动物, 在基础饲料中添加不同浓度的带鱼蛋白水解肽-金属配合物 (TPH-Fe²⁺), 考察了 TPH-Fe²⁺对克氏原螯虾的生长促进及非特异性免疫增强效果。结果表明, 较低浓度 (200、400 mg/kg)、短时间 (30 d) TPH-Fe²⁺饲喂, 对螯虾机体生长性能、生化指标及非特异性免疫酶活力, 与空白对照组相比较, 无显著性差异影响; 高浓度 (≥800 mg/kg)、较长时间 (60 d) TPH-Fe²⁺饲喂, 螯虾生化

指标、血清和肝胰腺中非特异性免疫酶 (SOD、PO、LSZ、及 ACP) 活力等, 均出现了一定程度升高, 其原因可能是利用了寡肽在生物体内特殊的转运、吸收机制, 将寡肽金属配合物吸收至特定靶向器官, 从而增强了机体非特异性免疫能力, 同时提高了机体对蛋白质、脂肪和维生素的利用效率。(进一步作用机制研究正在进行中。此外, TPH-Fe²⁺饲喂对螯虾体内重金属离子及其他金属含量的影响, 将另文报道。)

参考文献

- [1] 农业部渔业局编制.2013年中国渔业统计年鉴[M].北京:中国农业出版社,2013
Fishery Bureau of Ministry of Agriculture. Chinese yearbook of fishery statistics 2013 [M]. Beijing:China Agriculture Press, 2013
- [2] 谢佳磊,肖丹,殷蝶,等.枯草芽孢杆菌对克氏原螯虾免疫机能的影响[J].淡水渔业.2007,37(6):24-27
XIE Jia-lei, XIAO Dan, YIN Die, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on immune functions of *Procambarus clarkia* [J]. Freshwater Fisheries, 2007, 37(6): 24-27
- [3] 任秀芳,周鑫,赵朝阳,等.壳聚糖对克氏原螯虾生长、血清相关免疫因子、肌肉成分和消化酶的影响[J].大连海洋大学学报,2013, 28(5):468-474
REN Xiu-fang, ZHOU Xi, ZHAO Chao-yang, et al. Effects of dietary chitosan supplementation on growth, non-specific immune factors, muscle compositions and activities of digestive enzymes in red swamp crayfish *Procambarus clarkia* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(5): 468-474
- [4] 洪徐鹏,夏思瑶,唐嘉蕊,等.黄芪多糖对克氏原螯虾生长和非特异性免疫指标的影响[J].上海海洋大学学报,2013, 22(4):571-576
HONG Tu-peng, XIA Si-yao, TANG Jia-jin, et al. Effect of astragalus polysaccharide on the growth and non-specific immune parameters of *Procambarus clarkia* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(4): 571-576
- [5] Gelinsky M, Vogler R, Vahrenkamp H. Zinc complexation of glutathione and glutathione-derived peptides [J]. Inorganica Chimica Acta, 2003, 344: 230-238
- [6] 郭存荣,郭清泉,方细娟,等.多肽-锌配合物对奥尼罗非鱼生长性能和血清生化指标的影响[J].中国饲料,2010,23:35-37
GUO Cun-rong, GUO Qing-quan, FANG Xi-juan, et al. Effect of peptide zinc complexes on growth performance and serum biochemical indexes of tilapia [J]. China Feed, 2010, 23: 35-37
- [7] Deng S G, Huo J C, Xie C. Preparation by Enzymolysis and Bioactivity of Iron Complex of Fish Protein Hydrolysate (Fe-FPH) From Low Value Fish [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2008, 26: 300-306
- [8] 林慧敏,张宾,邓尚贵,等.舟山海域 4 种低值鱼酶解蛋白亚铁螯合物自由基清除活性与抑菌活性研究[J].中国食品学报,2012,12(1):19-24
LIN Hui-min, ZHANG Bin, DENG Shang-gui, et al. Free radical scavenging activities and antibacterial activity of enzymatic hydrolysates protein ferrous chelates peptides from several low value fish of zhoushan sea area [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(1): 19-24
- [9] 邓尚贵,杨燊,秦小明.低值鱼蛋白多肽-铁(II)螯合物的酶解制备及其抗氧化、抗菌活性[J].湛江海洋大学学报,2006, 26(4):54-58
DENG Shang-gui, YANG Miao, QIN Xiao-ming. Synthesis of compound enzymic peptides iron from wastefish and its activity of antioxidation and antibacterial [J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2006, 26(4): 54-58
- [10] 张宾,邓尚贵,林慧敏.一种水产品重金属脱除剂的制备方法及应用[P].中国:ZL201110197874.4.7,2014.04.
ZHANG Bin, DENG Shang-gui, LIN Hui-min. The preparation and application of an agent used for the removing of heavy metals in live marine organism [P]. China: ZL201110197874.4.7, 2014.04.
- [11] 方细娟,曾庆祝,战宇,等.多肽-金属元素配合物的研究进展及发展前景[J].食品工业科技,2012,33(4):413-416
FANG Xi-juan, ZENG Qing-zhu, ZHAN Yu, et al. Review on the development and application of peptide-element complexes [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(4): 413-416
- [12] 赵海军,王宝贵,张桂英,等.大豆多肽螯合锌对自然衰老小鼠的作用[J].中国老年学杂志,2009,29(12):1501-1502
ZHAO Hai-jun, WANG Bao-gui, ZHANG Gui-ying, et al. Effects of soy bean peptide chelated zinc on the natural aging mice [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2009, 29(12): 1501-1502
- [13] Yang M, Cui G, Zhao M, et al. The effect of complexation of Cu (II) with P6A peptide and its analogs on their thrombolytic activities [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 362(1): 81-87
- [14] Hara H, Funabiki R, Iwata M, et al. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions [J]. The Journal of Nutrition, 1984, 114(6): 1122
- [15] Rerat A, Nunes C S, Mendy F, et al. Amino acid absorption and production of pancreatic hormones in non-anaesthetized pigs after duodenal infusions of a milk enzymic hydrolysate or of free amino acids [J]. British Journal of Nutrition, 1988, 60(1): 121-136
- [16] 李晓晓,李刚,何玉凤,等.高分子抗氧化剂研究进展[J].化学通报,2011,74(4):319-324
LI Xiao-xiao, LI Gang, HE Yu-feng, et al. Advances in polymer antioxidants [J]. Chemistry, 2011, 74(4): 319-324
- [17] 何南海.对虾免疫功能指标的建立及其应用[J].厦门大学学

- 报(自然科学版),2004,23(3):385-388
- HE Nan-hai. The establishment and application of immune indexes of penaeid shrimp [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2004, 23(3): 385-388
- [18] 王建国,陆宏达.硫酸锌胁迫对克氏原螯虾非特异性免疫因子的影响[J].江苏农业学报,2011,27(1):129-136
- WANG Jian-guo, LU Hong-da. Changes of the activities of nonspecific immunity factors of *Procambarus clarkii* exposed to zinc sulphate [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2011, 27(1): 129-136
- [19] 刘晓云,张志峰,于利,等.中国对虾组织细胞中酚氧化酶活力的研究[J].高技术通讯,2002,12(8):89-92
- LIU Xiao-yun, ZHANG Zhi-feng, YU Li, et al. Studies on the phenoloxidase activities in the tissue cell of *Penaeus chinensis* [J]. High Technology Letters, 2002, 12(8): 89-92
- [20] Sung H H, Chang H J, Her C H, et al. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1998, 71(1): 26-33
- [21] Gollas-Galván T, Hernández-López J, Vargas-Albores F. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 122(1): 77-82
- [22] 曹剑香,简纪常,吴灶和.虾类体液免疫研究进展[J].湛江海洋大学学报,2006,26(1):89-92
- CAO Jian-xiang, JIAN Ji-chang, WU Zao-he. Progress in the study of humoral immunity of shrimps [J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2006, 26(1): 89-92
- [23] 林仕梅,潘瑜,罗莉,等.不同来源微量元素铁、锌、锰、铜对罗非鱼生长、代谢和非特异性免疫力的影响[J].动物营养学报,2011,23(5):763-770
- LIN Shi-mei, PAN Yu, LUO Li, et al. Effects of different sources of iron, zinc, manganese and copper on growth, metabolism and non-specific immunity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(5): 763-770
- [24] Apines-Amar M J S, Satoh S, Caipang C M A, et al. Amino acid-chelate: a better source of Zn, Mn and Cu for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Aquaculture, 2004, 240(1): 345-358
- [25] Jung W K, Kim S K. Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame [J]. European Food Research and Technology, 2007, 224(6): 763-767
- [26] 潘剑雄,林小涛,程炜轩,等.虾头提取物对凡纳滨对虾生长和免疫因子的影响[J].生态科学,2005,24(4):322-325
- PAN Jian-xiong, LIN Xiao-tao, CHENG Wei-xuan, et al. The effect of shrimp-head extract on growth and immune factors of *Litopenaeus vannamei* [J]. Ecological Science, 2007, 224(6): 763-767
- [27] 许庆陵,曾庆祝,闫磊,等.罗非鱼多肽-锌配合物的制备及其生物活性[J].食品科学,2010,31(10):75-79
- XU Qing-ling, ZENG Qing-zhu, YAN Lei, et al. Preparation and biological activities of Zn (II)-tilapia peptide complexes [J]. Food Science, 2010, 31(10): 75-79