

Zhao T H, Zhou H H, HE G, et al. *Shewanella* sp. fermented cottonseed protein replacing fishmeal on growth and non-specific immunity of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2025, 49(12): 122510. [赵天豪, 周慧慧, 何艮, 等. 希瓦氏菌发酵棉籽蛋白替代鱼粉对大菱鲆生长及非特异性免疫的影响 [J]. 水生生物学报, 2025, 49(12): 122510.]

希瓦氏菌发酵棉籽蛋白替代鱼粉对大菱鲆生长及非特异性免疫的影响

赵天豪 周慧慧 何 艮 王 旋 刘成栋 麦康森

(中国海洋大学水产学院, 海水养殖教育部重点实验室, 青岛 266003)

摘要: 为了探究希瓦氏菌(*Shewanella* sp.)发酵棉籽蛋白替代鱼粉对大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)生长性能及非特异性免疫的影响。研究以50%鱼粉组为对照组, 以发酵棉籽蛋白、棉籽蛋白替代饲料中20%的鱼粉为实验组配制三种等氮等脂的配合饲料(鱼粉组、棉籽蛋白组、发酵棉籽蛋白组)。挑选初始体重为 (17.52 ± 0.02) g的大菱鲆, 开展为期8周的养殖实验。结果显示: 发酵棉籽蛋白组大菱鲆增重率(WGR)、特定生长率(SGR)、蛋白质效率(PER)较棉籽蛋白组均显著升高, 饲料系数(FCR)显著降低($P < 0.05$), 且与鱼粉组无显著差异。抗氧化指标显示, 发酵棉籽蛋白组大菱鲆肝脏总抗氧化能力(T-AOC)和超氧化物歧化酶(SOD)活性较棉籽蛋白组显著提高, 过氧化氢酶(CAT)活性较鱼粉组显著升高, 丙二醛(MAD)含量较鱼粉组显著下降($P < 0.05$)。组织形态方面, 发酵棉籽蛋白组肠绒毛高度较棉籽蛋白组显著升高($P < 0.05$), 且与鱼粉组无显著差异。在免疫方面, 与棉籽蛋白组相比, 发酵棉籽蛋白组大菱鲆肠道促炎因子基因(*il-8*、*ifn- γ* 、*il-1 β*)和TLR2/NF- κ B通路基因(*tlr2*、*myd88*、*nf- κ b p65*)表达受到显著抑制($P < 0.05$), 与鱼粉组无显著差异, 同时紧密连接蛋白基因(*zo-1*、*occludin*、*tricellulin*)的表达显著上调($P < 0.05$), 其中*zo-1*和*occludin*基因表达量显著高于鱼粉组。在本实验条件下, 希瓦氏菌发酵棉籽蛋白可显著改善棉籽蛋白替代鱼粉对大菱鲆生长、免疫造成的负面影响, 可以替代大菱鲆饲料中20%的鱼粉。

关键词: 发酵棉籽蛋白; 生长; 非特异性免疫; 大菱鲆

中图分类号: S965.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2025)12-122510-10

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0133 CSTR: 32229.14.SSSWXB.2025.0133



鱼粉具有蛋白质含量高、富含必需氨基酸、易于消化吸收等特点, 作为水产饲料中主要蛋白质来源, 具有显著的营养优势^[1], 近年来, 全球变暖和环境污染加剧了海洋渔业资源的衰退, 导致鱼粉供应量大幅下降, 价格不断上涨^[2]。相比于鱼粉, 植物蛋白具有来源广、产量大、价格低的优势, 饲料中加入植物蛋白可以减少对鱼粉的依赖, 有效降低饲料成本。

棉籽蛋白是棉籽油提取的副产品, 由于其具有蛋白质含量高、产量大、成本低等优点, 作为水产养殖饲料的蛋白质来源具有巨大的潜力。然而, 棉

籽蛋白中含有一种有毒的多酚化合物——游离棉酚。在棉籽蛋白中, 游离棉酚的含量一般为550.46—735.98 mg/kg^[3]。研究表明游离棉酚可以诱导活性氧的产生, 这会导致鱼类肠道氧化损伤, 进而损害肠道功能, 抑制氨基酸吸收, 从而影响鱼类的生长^[4]。对杂交石斑鱼(♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *E. lanceolatus*)进行的一项研究表明, 用棉籽蛋白替代饲料中45%的鱼粉蛋白导致杂交石斑鱼生长性能受到影响、肠皱襞高度降低^[5], 在大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[6]中也发现类似结果。游离棉酚可以通过不同的方法来降低, 例如加热、洗涤、溶

收稿日期: 2025-04-17; 修订日期: 2025-05-13

基金项目: 国家重点研发计划(2023YFD2400601); 国家海水鱼产业技术体系项目(CARS-47-G10)资助 [Supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD2400601); the China Agriculture Research System for Marine Fish Culture Industry (CARS-47-G10)]

作者简介: 赵天豪(1999—), 男, 硕士研究生; 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: 18853731342@163.com

通信作者: 周慧慧, E-mail: zhouhuihui@ouc.edu.cn

剂萃取、发酵和酶解处理^[7]。在众多降低游离棉酚含量的方法中,微生物发酵被认为是最有前途的,微生物发酵不仅可以降低棉籽蛋白中游离棉酚含量,还可以改善原料营养^[8]。寻找合适的微生物发酵菌株,可以有效降解棉酚,并提高棉籽蛋白的营养价值。研究发现,希瓦氏菌(*Shewanella* sp.)发酵豆粕在替代鱼粉方面表现出了优异的性能^[9],其在植物蛋白发酵应用上具有巨大潜力。

大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.), 俗称多宝鱼,是我国北方重要的工厂化养殖海水鱼种。因其肉食性习性,大菱鲆对饲料蛋白需求较高,所以对鱼粉的依赖度较高。目前发酵植物蛋白在大菱鲆饲料中得到广泛应用,研究表明发酵豆粕可替代饲料中55%的鱼粉而不对大菱鲆生长性能产生负面影响^[10]。然而,有关发酵棉籽蛋白在大菱鲆饲料上的应用较少。本研究使用希瓦氏菌对棉籽蛋白进行发酵来探究发酵棉籽蛋白替代鱼粉对大菱鲆生长、饲料利用和非特异性免疫的影响。

1 材料与方法

1.1 饲料制备

以50%鱼粉组为对照组,以棉籽蛋白、发酵棉籽蛋白替代饲料中20%的鱼粉,配制成3组蛋白含量为50%,脂肪含量为12%的等氮等脂的配合饲料,分别为鱼粉组(FM)、棉籽蛋白组(CP)、发酵棉籽蛋白组(FCP)。饲料配方及营养成分见表1。棉籽蛋白购自新疆泰昆集团,营养成分详见表2其余原料均购自青岛赛格林生物工程有限公司。本研究所用的希瓦氏菌是由大菱鲆的肠黏膜中分离并鉴定^[11],该菌株已存放在中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC),收集编号为CGMCC1.17098。将希瓦氏菌活化扩培后按照棉籽蛋白:菌液1:0.6的比例进行接种,菌液浓度为 2×10^9 个/L,接种后置于37℃的条件下进行厌氧发酵48h。发酵48h后立刻取出发酵棉籽蛋白,置于60℃干燥箱中24h烘干,以便保存并用于饲料的制作。将原料经粉碎机粉碎后过80目筛,依照饲料配方表,按照从少到多的原则称取原料均匀混合,大豆卵磷脂与鱼油需经过混合揉搓均匀后,再与已混好的原料充分混合,混匀后过60目筛。将过筛后的原料用膨化制粒机制成缓沉饲料(3.5 mm×3.5 mm),然后于鼓风干燥箱中55℃烘干24h。

1.2 养殖管理及养殖条件

大菱鲆购于山东省烟台市海阳某养殖场。在山东烟台国信东方(烟台)循环水养殖科技有限公司中开展养殖实验,养殖周期为56d。大菱鲆到场后

进行两周的驯化暂养,暂养结束后饥饿24h,选取体格健壮、规格均一的大菱鲆[初始体重(17.52 ± 0.02) g]随机分配到9个养殖桶中(水量约266 L),每桶分配40尾鱼。在养殖实验期间,每次投喂前半小时开灯,每日投喂两次(7:00和19:00),投喂至表观饱食,水温(18 ± 0.5)℃,盐度(29 ± 0.5)‰,氨氮 ≤ 0.2 mg/L,亚硝酸盐 ≤ 0.1 mg/L,溶氧 ≥ 7 mg/L。

1.3 样品采集

本实验的所有步骤都是基于中国海洋大学的实验动物管理规定。待养殖实验结束,将大菱鲆饥饿24h,对每桶中的大菱鲆分别进行称重和统计存活尾数,以计算存活率、增重率、特定生长率等。每桶随机选取3条实验鱼置于-20℃冰箱保存,做鱼体常规成分分析;随机选取2尾实验鱼用丁香酚(1:10000)进行麻醉后解剖,取中肠和肝脏样品,将中肠内容物在生理盐水中清洗干净后置于1.5 mL离心管中,组织样品立即置于液氮中冷冻;随机选取2尾实验鱼,取肠道、肝脏置于波恩固定液中作为切片样品,24h后倒掉波恩固定液换成70%的酒精并将肠道、肝脏完全浸没,用于后期石蜡组织切片。

1.4 游离棉酚和酸溶蛋白的测定

采用苯胺法检测实验原料、饲料中游离棉酚含量,在3-氨基-1-丙醇存在下,用异丙醇与正己烷混合溶剂(6:4, v/v)提取游离棉酚,游离棉酚与苯胺作用生成苯胺棉酚,该化合物在440 nm处有最大吸收,其颜色深浅与游离棉酚含量呈正比,可用紫外分光光度计比色检测。

用三氯乙烷提取样品中的酸溶蛋白,取10.00 mL提取液于消化管内,加入5.5 g混合催化剂和12 mL浓硫酸,420℃消化1.5h后用全自动凯氏定氮仪(Kjeltec™ 8400, FOSS, Sweden)测定氮含量并换算为样品酸溶蛋白含量。

1.5 生化分析

将发酵棉籽蛋白、饲料和全鱼放到锡纸盒中,置于105℃烘箱将样品烘至恒重,烘干后称其重量并计算水分;烘干后的样品,用粉碎机粉碎后使用凯氏定氮仪(Kjeltec™ 8400, FOSS, Sweden)测定样品干物质的粗蛋白;用脂肪测定仪器(SOX606, 海能仪器),抽除脂肪后运用差额法计算出干物质的粗脂肪含量,在马弗炉(SX470, 永光明医疗仪器)中550℃高温充分灼烧16h测定粗灰分含量。

1.6 抗氧化能力分析

准确称取肝脏组织样品,按重量(g):体积(mL)=1:9的比例,加入9倍体积的生理盐水,在冰水浴条件下机械匀浆。将匀浆液置于4000 r/min的条件下,

离心10min, 取上清液待测。处理好的样品的过氧化氢酶(CAT, 货号A007-1-1)、超氧化物歧化酶(SOD, 货号A001-2)、总抗氧化能力(T-AOC, 货号A015-2-1)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX, 货号A005-1)、丙二醛(MDA, 货号A003-1)均采用南京

表 1 实验饲料配方和主要营养成分(%干物质)

Tab. 1 Composition of experimental diets (% dry mater)

项目Item	组别Group		
	FM	CP	FCP
原料Ingredient			
鱼粉Fishmeal	50.00	40.00	40.00
棉籽蛋白Cottonseed protein	0	11.10	0.00
发酵棉籽蛋白Fermented cottonseed protein	0	0	10.78
豆粕Soybean meal	10.00	10.00	10.00
玉米蛋白粉Corn gluten meal	5.00	5.00	5.00
谷朊粉Wheat gluten	3.00	3.00	3.00
小麦粉Wheat flour	15.00	15.00	15.00
微晶纤维素Microcrystalline cellulose	5.41	3.45	3.72
鱼油Fish oil	5.59	6.32	6.37
大豆卵磷脂Soy lecithin	2.00	2.00	2.00
蛋氨酸DL-Methionine	0.00	0.13	0.13
其他Others ¹	4.00	4.00	4.00
合计Total	100.00	100.00	100.00
化学成分Chemical composition			
粗蛋白Crude protein (%)	50.51	50.45	50.40
粗脂肪Crude fat (%)	11.65	11.54	12.08
游离棉酚Free gossypol (mg/kg)	ND	48.20	24.00

注: ¹其他: 氯化胆碱0.25%; 磷酸二氢钙0.50%; 维生素预混料1% (硫胺素, 0.00125%; 核黄素, 0.00225%; 维生素B6 0.001%、维生素B12 0.0005%、甲萘醌0.0005%; 肌醇, 0.04%; 泛酸盐, 0.003%; 烟酸0.01%; 叶酸, 0.001%; 生物素, 0.003%; 乙酸视黄酯, 0.0016%; 维生素D₃, 0.00025%; α -生育酚, 0.012%; 维生素C, 0.1%; 乙氧基喹啉, 0.00015%; 微晶纤维素, 0.8235%; 矿物质预混料0.5% (CoCl₂·6H₂O, 0.0025%; CuSO₄·5H₂O, 0.0005%; FeSO₄·H₂O, 0.004%; ZnSO₄·H₂O, 0.0025%; MnSO₄·H₂O, 0.00225%; MgSO₄·7H₂O, 0.06%; 亚硒酸钠, 0.001%; 钙碘, 0.003%; 沸石, 0.42425%; 丙酸钙0.10%; 乙氧基喹啉0.05%; 海藻酸钠0.5%; 三氧化二钼0.1%; 诱食剂1% (甜菜碱: 二甲基丙氨酸噻亭: 甘氨酸: 丙氨酸: 肌苷5'-磷酸=4:2:2:1:1); ND, 未检出

Note: ¹Others: Choline Chloride 0.25%, Calcium Dihydrogen Phosphate 0.50%, Vitamin premix 1% (thiamine, 0.00125%; riboflavin, 0.00225%; vitamin B6 0.001%, vitamin B12 0.0005%, menaquinone 0.0005%; inositol, 0.04%; pantothenate, 0.003%; niacin 0.01%; folic acid, 0.001%; biotin, 0.003%; retinyl acetate 0.0016%; vitamin D₃, 0.00025%; α -tocopherol, 0.012%; vitamin C, 0.1%; ethoxyquinoline, 0.00015%; and microcrystalline cellulose, 0.8235%), and mineral premix 0.5% (CoCl₂·6H₂O, 0.0025%; CuSO₄·5H₂O, 0.0005%; FeSO₄·H₂O, 0.004%; ZnSO₄·H₂O, 0.0025%; MnSO₄·H₂O, 0.00225%; MgSO₄·7H₂O, 0.06%; sodium selenite, 0.001%; calcium iodide, 0.003%; zeolite, 0.42425%), calcium propionate 0.10%, ethoxyquinoline 0.05%, sodium alginate 0.5%, yttrium trioxide 0.1%, food attractant (betaine-propionic acid thapsigargin-glycine-alanine-inosine 5-phosphate =4:2:2:1:1) 1%; ND, not detected

建成生物公司的试剂盒进行活性检测。实验步骤严格参照说明书进行。

1.7 组织切片

取固定好的肠道、肝脏样品置于包埋盒中使用全自动脱水机脱水, 脱水后用石蜡进行包埋, 用切片机对包埋好的样品进行切片(7 μ m), 采用购买自北京索莱宝科技有限公司的苏木素伊红(HE)染色试剂盒、Masson三色染色试剂盒分别对肠道和肝脏进行组织染色。用中性树胶封固。

1.8 RNA提取及实时反转录定量PCR

采用Trizol法提取肠道样品中的总RNA。用Nano Drop[®] 2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific, USA)测定OD值, OD₂₆₀/OD₂₈₀值在1.8—2.0且尽量接近于2.0。采用TaKaRa反转录试剂反转录合成cDNA。反转后统一用DEPC水将浓度调至200 ng/ μ L, 保存至-80℃冰箱备用。引物购自生物工程(上海)股份有限公司, 序列见表3。反应体系为20 μ L, 其中SYBR[®] Premix Ex Taq (TaKaRa)10 μ L, 上下游引物各0.8 μ L, 2 μ L cDNA溶液及6.4 μ L DEPC水。实时定量PCR仪为(Mastercycler ep realplex, Eppendorf, Germany)。扩增程序为95℃预变性20s, 39个循环(95℃ 15s; 57—58℃ 15s; 72℃ 30s)。注意要保证目的基因与内参基因扩增效率的一致性且接近1, 使用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法分析数据。

1.9 统计分析

增重率(WGR, %)=(终末体重-初始体重)/初始体重×100;

特定生长率(SGR, %/d)=(Ln终末体重-Ln初始体重)/养殖天数×100;

摄食率(FR, %/d)=摄食量(g)/[(终末体重+初始

表 2 发酵对棉籽蛋白营养组成影响(%干物质)

Tab. 2 Effect of fermentation on the nutritional composition of cottonseed protein (% dry matter)

指标Index	组别Group	
	棉籽蛋白Cottonseed protein	发酵棉籽蛋白Fermented cottonseed protein
粗蛋白Crude protein (%)	65.21±0.18 ^a	67.18±65.97 ^b
脂肪Crude lipid (%)	0.48±0.10	0.68±0.09
酸溶蛋白Acid soluble protein (%)	4.59±0.32 ^a	7.04±0.44 ^b
游离棉酚Free gossypol (mg/kg)	472.5±1.66 ^b	237.90±2.37 ^a

注: 数值用平均值±标准误差表示(n=3); 在同一行中, 不同的上标字母表示有显著性差异(P<0.05); 下同

Note: Values are expressed as mean±standard error (n=3); In the same row, different superscript letters indicate significant differences (P<0.05); The same applies below

体重)/2]/养殖天数×100。

饲料系数(FCR)=总摄食量(g)/湿增重(g);

蛋白质效率(PER)=湿增重(g)/蛋白质摄入量(g);

存活率(SR, %)=(终末尾数/初始尾数)×100。

实验数据用平均值±标准误(mean±SE)表示, 使用SPSS19.0软件对所得数据进行单因素方差(One-way ANOVA), 采用Tukey多重比较检验, $P<0.05$ 表示组间存在显著性差异。实验结果表示为平均值±标准误。

2 结果

2.1 发酵棉籽蛋白营养成分

如表2所示, 与棉籽蛋白相比, 发酵后棉籽蛋白的粗蛋白含量由65.21%提高至67.18%, 提高了3.0%; 酸溶蛋白含量由4.59%升高至7.04%, 升高了53.3%; 游离棉酚含量由472.5mg/kg下降至237.90 mg/kg, 下降了49.7% ($P<0.05$)。

2.2 生长性能、饲料利用与体成分

如表4所示, 与棉籽蛋白组相比, 发酵棉籽蛋白组末重(FBW)、增重率(WGR)、特定生长率(SGR)、蛋白质效率(PER)均显著升高($P<0.05$), 饲料系数(FCR)显著降低($P<0.05$), 而与鱼粉组相比, 以上指标均无显著差异。

如表5所示, 各组之间大菱鲆粗蛋白、粗灰分

均没有显著差异。同棉籽蛋白组相比, 发酵棉籽蛋白组粗脂肪含量有所下降, 且同鱼粉组无显著差异。

2.3 组织学分析

大菱鲆肠道HE染色结果表明, 与棉籽蛋白组相比, 发酵棉籽蛋白组大菱鲆肠绒毛高度/肠腔直径显著升高($P<0.05$), 且与鱼粉组无显著差异(图1)。大菱鲆肝脏Masson染色结果表明, 与棉籽蛋白组相比, 发酵棉籽蛋白组肝脏纤维化程度显著改善($P<0.05$; 图2)。

2.4 肝脏抗氧化能力

据表6可知, 与棉籽蛋白组相比, 发酵棉籽蛋白组过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)均显著提高, 丙二醛(MDA)含量显著降低($P<0.05$)。其中发酵棉籽蛋白组SOD、T-AOC活性与鱼粉组无显著差异, 而CAT活性显著大于鱼粉组、MDA显著小于鱼粉组($P<0.05$), 发酵棉籽蛋白组表现出更强的抗氧化能力。

2.5 非特异性免疫因子及肠道屏障基因定量表达

结果表明, 相比于棉籽蛋白组, 发酵棉籽蛋白组促炎因子(*il-8*、*ifn-γ*、*il-1β*)和TLR2/NF-κB通路(*tlr2*、*nf-κb p65*、*myd88*)的表达量均显著下降($P<$

表3 实时荧光定量PCR引物序列

Tab. 3 Primer sequences used for quantitative Real-time PCR

基因 Gene	引物 Primer (5'—3')	序列号 Accession number
β-肌动蛋白 <i>β-actin</i>	GCTGTCTTCCCTTCTATCGTC G TCCATGTCATCCAGTTGGTC	AY008305.1
toll样受体2 <i>tlr2</i>	AGGAGCCAAGGGAGACCGAT GGCGCTCATGATGTTGTCC	KU746963.1
髓样分化 因子 <i>myd88</i>	CCCAATGGTAGCCCTGAGAT CATCTCGGTGGAACACACAC	KP985236.1
核因子-κB <i>p65 nf-κb</i>	ATGCCTTTGAGGACCTTTT GTGTTCTGGGATGCTGTGT	MF370855
<i>p65</i>		
干扰素-γ <i>ifn-γ</i>	GCTTTCCCGATCATCTTCTG GGTTTCCCAGATTCCCATTTC	DQ400686.1
白细胞介 素8 <i>il-8</i>	GACAGAGAGCAAACCCATC CCAGTCAAGTACATTCAAG	XM_035638412.1
白细胞介 素-1β <i>il-1β</i>	TACCTGTCGTGCCAACAGGA A TGATGTACCAGTTGGGGAA	AJ295836.2
紧密连接 支架蛋白 <i>zo-1</i>	AGAGAACCTGTCACTGATAG ATGC CTGTCGGAATTGTTGCCTGAT	KU238184
跨膜紧密 连接蛋白 <i>occludin</i>	G ACTGGCATTCTTCATCGC GGTACAGATTCTGGCACATC	KU238182
紧密连接 蛋白 <i>tricellulin</i>	GCCTACATCCACAAAGACAA CG TCATTCCCAGCACTAATACAA	KU238183.1
	TCAC	

表4 发酵棉籽蛋白替代鱼粉对大菱鲆生长性能和饲料利用率的影响

Tab. 4 Effects of fermented cottonseed protein replacing fishmeal on growth performance and feed utilization of turbot

项目Item	处理组Treatment		
	FM	CP	FCP
初始体重 IBW (g)	17.51±0.01	17.53±0.01	17.52±0.01
末体重 FBW (g)	72.05±0.78 ^b	62.49±0.13 ^a	72.49±0.32 ^b
增重率 WGR (%)	311.33±4.53 ^b	256.37±0.59 ^a	313.65±1.84 ^b
特定生长率 SGR (%/d)	2.52±0.02 ^b	2.27±0.01 ^a	2.53±0.01 ^b
摄食率 FR (%/d)	1.76±0.01 ^b	1.70±0.01 ^a	1.70±0.01 ^a
饲料系数 FCR	0.81±0.01 ^a	0.85±0.01 ^b	0.78±0.01 ^a
蛋白质效率 PER	2.44±0.03 ^b	2.33±0.01 ^a	2.54±0.02 ^b
存活率 SR (%)	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00

表5 发酵棉籽蛋白替代鱼粉对大菱鲆全鱼体成分的影响(%湿重)

Tab. 5 Effect of fermented cottonseed protein replacing fishmeal on whole-body composition of turbot (% wet weight)

项目Item	组别Group		
	FM	CP	FCP
粗蛋白Crude protein	15.73±0.05	15.54±0.08	15.80±0.07
粗脂肪Crude lipid	3.54±0.04 ^a	3.82±0.06 ^b	3.66±0.01 ^{ab}
水分Ash	77.33±0.19	77.05±0.10	77.24±0.02
粗灰分Crude ash	3.46±0.07	3.44±0.02	3.35±0.03

0.05), 同鱼粉组无显著差异。与之相反的是, 相比于棉籽蛋白组, 发酵棉籽蛋白组肠道屏障相关基因 *zo-1*、*occludin* 和 *tricellulin* 的表达量显著提高 ($P < 0.05$), 其中发酵棉籽蛋白组 *zo-1* 和 *occludin* 的表达量显著高于鱼粉组, 体现出更强的肠道屏障保护能力 (图 3)。

3 讨论

3.1 发酵处理对棉籽蛋白营养成分的影响

微生物发酵处理对棉籽蛋白的营养特性具有改良效果, 有研究表明发酵不仅降低了植物蛋白抗营养因子、粗纤维和有毒物质的含量, 还增加了植物蛋白源的粗蛋白的含量^[12, 13]。微生物发酵时可分泌大量酶, 包括蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和羧肽酶^[14], 可将大分子蛋白降解为小分子肽和游离氨基酸, 并可显著提升酸溶蛋白含量^[15]。在本研究中, 希瓦氏菌发酵显著提高棉籽蛋白粗蛋白、酸溶蛋白的含量, 也得到相似的结论。游离棉酚是一种多酚类化合物, 微生物发酵可有效降解游离棉酚。在枯草芽孢杆菌^[15]和乳酸菌^[16]发酵棉籽蛋白的研究中均发现了对于游离棉酚的降解作用。本研究也

得到了相似的结论, 希瓦氏菌发酵棉籽蛋白显著降低了游离棉酚的含量。这可能是由于漆酶是游离棉酚的降解酶^[17], 而希瓦氏菌可通过分泌漆酶来催化棉酚的氧化聚合, 使其形成分子量更大的惰性产物, 从而降低其生物毒性^[18]。

3.2 发酵棉籽蛋白替代鱼粉对大菱鲆生长性能、饲料利用及体组成的影响

研究表明, 发酵棉籽蛋白可替代饲料中的部分鱼粉, 对水产动物的生长性能不会造成显著影响^[12, 19]。本研究也有相同结论, 发酵棉籽蛋白组和鱼粉组生长性能无显著差异, 可以替代大菱鲆饲料中20%

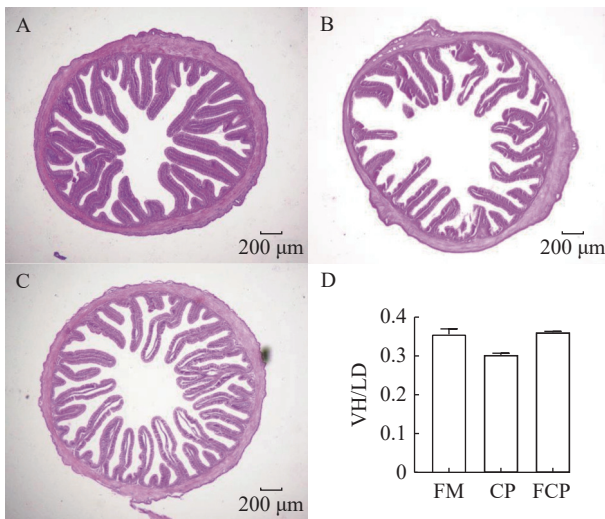


图1 发酵棉籽蛋白替代鱼粉对大菱鲆肠组织切片的影响

Fig. 1 Effect of fermented cottonseed protein replacing fishmeal on tissue sections of turbot

A—C依次为鱼粉组(FM)、棉籽蛋白组(CP)、发酵棉籽蛋白组(FCP), 比例尺为200 μm; D为肠道绒毛高度(VH)与肠腔直径(LD)的比值; 柱状图上不同的上标字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$); 下同

A—C show the fish meal group (FM), cottonseed protein group (CP), and fermented cottonseed protein group (FCP), in that order, with a scale bar of 200 μm; D shows the ratio of intestinal villus height (VH) to intestinal lumen diameter (LD); Different super-script letters on the bar graphs indicate significant differences ($P < 0.05$); The same applies below

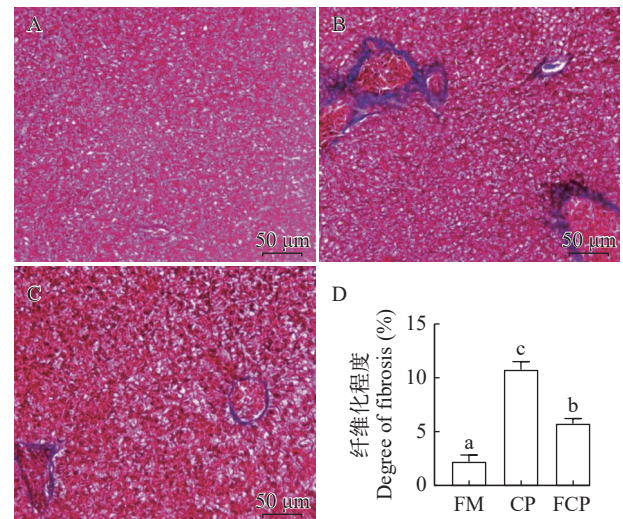


图2 发酵棉籽蛋白替代鱼粉对大菱鲆肝脏组织切片的影响

Fig. 2 Effect of fermented cottonseed protein replacing fishmeal on liver tissue sections of turbot

A—C依次为鱼粉组(FM)、棉籽蛋白组(CP)、发酵棉籽蛋白组(FCP), 比例尺为50 μm; 蓝色区域为肝脏纤维化染色区域; D为肝脏纤维化程度

A—C show the fish meal group (FM), cottonseed protein group (CP), and fermented cottonseed protein group (FCP), in that order, with a scale bar of 50 μm; the blue area is the stained area of liver fibrosis; D shows the degree of liver fibrosis

表6 发酵棉籽蛋白替代鱼粉对大菱鲆肝脏抗氧化酶活的影响

Tab. 6 Effects of fermented cottonseed protein replacing fishmeal on liver antioxidant enzyme activities in turbot

项目 Item	组别Group		
	FM	CP	FCP
过氧化氢酶 CAT (U/mg prot)	1085.42±16.26 ^b	664.66±8.97 ^a	1319.33±24.71 ^c
超氧化物歧化酶 SOD (U/mg prot)	34.74±0.70 ^b	25.63±0.46 ^a	33.88±0.30 ^b
总抗氧化能力 T-AOC (mmol/gprot)	3.60±0.06 ^b	2.28±0.13 ^a	3.81±0.15 ^b
谷胱甘肽过氧 化物酶GSH-PX (U/mg prot)	25.37±0.77	25.31±0.65	24.87±0.41
丙二醛MDA (nmol/mg prot)	3.53±0.13 ^b	5.68±0.20 ^c	2.34±0.20 ^a

的鱼粉。这可能是通过两个方面来提高大菱鲆的生长性能。一方面,通过提高酸溶蛋白含量提供了易吸收的短肽,可直接通过肠上皮细胞的肽转运体PepT1吸收,减少消化能耗并提升蛋白质效率^[20]。另一方面,通过降低棉酚的含量,减轻了其对肠道黏膜的氧化损伤,避免了因肠炎症导致的饵料系数下降,营养流失,进而提高生长性能^[21]。在体组成方面,发酵棉籽蛋白组的粗脂肪含量与棉籽蛋白组相比显著下降,则可能由于游离棉酚下降减轻了对肝脏带来的损伤^[22],促进了脂肪代谢。

3.3 发酵棉籽蛋白替代鱼粉对大菱鲆肠道、肝脏的影响

检测鱼肠道绒毛高度/肠道横切面直径,不仅能评估肠道的营养吸收潜力,还能反映鱼类整体健康状况。在黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)上的研究表明,植物蛋白中的抗营养因子可诱导肠道褶皱高度萎缩^[23]。本研究中发酵棉籽蛋白组和鱼粉组的肠道绒毛高度/肠腔直径显著高于未发酵的棉籽蛋白组,表明发酵棉籽蛋白组的发酵处理有效保护了肠道结构的完整性,其机制可能与其高效的棉酚脱毒能力直接相关^[24]。

肝脏纤维化程度是反映肝脏健康的一个重要指标,肝脏的纤维化与炎症因子的过量表达密切相关,持续性的炎症反应总是先于纤维化,IL-1 β 和TLR等决定了肝脏损伤的纤维化反应^[25]。其中,IL-1 β 是促炎细胞因子,可刺激肝卫星细胞激活,从而产生细胞外基质蛋白并导致肝脏损伤^[26]。TLR则在肝纤维化期间激活肝免疫细胞和星状细胞中发挥重要作用^[27]。有研究表明,棉酚主要在肝脏中积累^[28]。在本研究中,Masson三色染色显示蓝色的胶原纤维在棉籽蛋白组的肝脏中过度沉积,表明肝脏发生纤维化,而发酵棉籽蛋白组胶原纤维沉积量较

棉籽蛋白组相比明显下降,说明棉籽蛋白经发酵后可以有效改善对大菱鲆肝脏纤维化的负面影响。

3.4 发酵棉籽蛋白替代鱼粉对肝脏抗氧化能力的影响

在鱼类中,非特异性免疫反应被认为是抵御生物和非生物胁迫的第一道防线。这种应激通常会导致组织中活性氧的产生和积累,对细胞造成伤害并诱导水生生物的抗氧化反应。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶则可通过去除过多的自由基来减少脂质过氧化带来的损伤^[29]。而丙二醛(MDA)作为脂质过氧化的终产物,较高的含量表明肝脏细胞膜受到严重氧化损伤^[30]。

在本研究中,尽管所有组的GSH-PX活性无显著差异,但是未发酵的棉籽蛋白组在肝脏抗氧化酶活性方面表现出显著的氧化应激特征。发酵棉籽蛋白组的CAT活性显著高于鱼粉组,而MDA含量显著低于鱼粉组。一方面,这可能是由于微生物发酵过程中产生了各种抗氧化活性物质^[31],另一方面发酵还可能通过影响其他物质的生物活性,例如胞外多糖和维生素,从而进一步增强生物体内和体外的抗氧化活性^[32]。此外,发酵棉籽蛋白组饲料棉酚含量较低,缓解了棉籽蛋白中棉酚对肝脏的损害,而发酵产物中的小分子肽可能通过Nrf2/ARE通路,上调CAT表达^[33]。黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的研究也表明,发酵可显著改善抗营养因子诱导的氧化损伤^[34]。

3.5 发酵棉籽蛋白替代鱼粉对肠道免疫与屏障功能的调控

TLR是一个跨膜糖蛋白家族,可激活先天免疫应答并作为宿主的第一道防线^[35]。信号转导由各种接头蛋白与TLR的Toll/IL-1R (TIR)结构域结合而启动。髓样分化因子88 (MyD88)是其中的一种

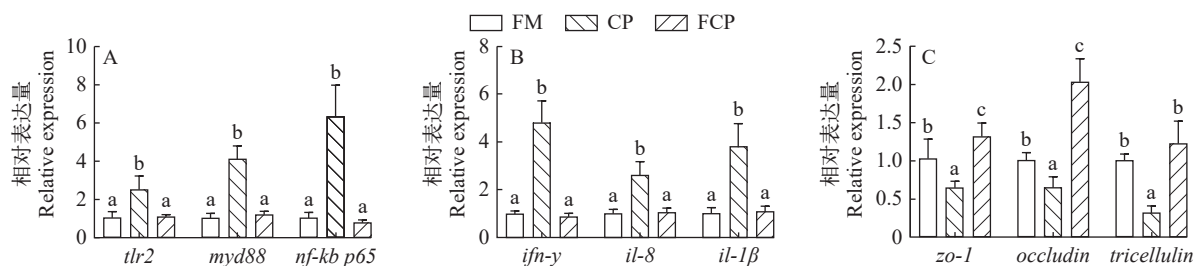


图3 发酵棉籽蛋白替代鱼粉对大菱鲆肠道非特异性免疫因子及肠道屏障基因相对表达量的影响

Fig. 3 Effect of fermented cottonseed protein replacing fishmeal on the relative expression of intestinal nonspecific immune factor and intestinal barrier genes in turbot

A为促炎因子基因相对表达量; B为TLR2/NF- κ B通路基因相对表达量; C为肠道屏障基因相对表达量; 柱状图上不同的上标字母表示有显著性差异($P < 0.05$)

A shows the relative expression of pro-inflammatory factor genes; B shows the relative expression of TLR2/NF- κ B pathway genes; C shows the relative expression of intestinal barrier genes; Different superscript letters on the bar graphs indicate significant differences ($P < 0.05$)

接头激活蛋白, 通过自身的TIR结构域结合, 激活信号级联反应, 导致IL-1R相关激酶(IRAK)的聚集, 并最终激活核因子 κ B (NF- κ B)^[36]。TLR2、MyD88信号通过TRAF6激活促炎细胞因子在维持组织和免疫稳态中的重要功能已得到充分证实^[37]。促炎细胞因子(包括IFN- γ 、IL-1 β 和IL-8)具有引起炎症的作用。干扰素- γ (IFN- γ)主要由活化的T细胞和自然杀伤细胞(NK细胞)产生。它在免疫系统中起着调节和激活的作用, 过量的IFN- γ 可能导致组织损伤和慢性炎症^[38]。白细胞介素-1 β (IL-1 β)在炎症反应发生中起着至关重要的作用, 可导致肠道损伤^[39]。炎性细胞因子IL-8是免疫应答的一个组成部分, 过量表达会引起肠道炎症^[40]。抑制因子激酶(IKK)复合物, 导致抑制蛋白磷酸化降解, 释放NF- κ B进入细胞核, 启动炎症基因表达^[41]。

金鲳(*Trachinotus ovatus*)^[42]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[43]的研究表明过高的游离棉酚含量可通过上调大菱鲆的*il-1 β* 、*myd88*等基因的表达, 诱导炎症反应^[44]。在本研究中, 发酵棉籽蛋白组的TLR2/NF- κ B通路基因(*tlr2*、*nf- κ b p65*、*myd88*)及促炎因子(*ifn- γ* 、*il-1 β* 、*il-8*)的mRNA表达量显著低于棉籽蛋白组, 且与鱼粉组无差异。结果表明棉籽蛋白组可能通过激活TLR2/NF- κ B通路, 促进促炎因子释放。这可能与其高浓度游离棉酚相关, 而发酵处理可通过降解棉酚削弱这一过程。本结果表明发酵处理可以显著降低棉酚对大菱鲆炎症反应的影响。

鱼类的肠道被认为是重要的物理屏障, 维持其结构完整性对于有效抵抗外来抗原至关重要^[45]。紧密连接支架蛋白ZO-1, 通过维持上皮屏障的紧密度来发挥作用^[46]。跨膜紧密连接蛋白Occludin的细胞外环直接进入紧密连接蛋白复合物并与跨膜结构域相互作用以改变细胞外选择性的通透性^[47, 48]。Tricellulin是在三细胞紧密连接处发现的第一个紧密连接蛋白, 对于维持屏障功能具有重要意义^[49]。有关大口黑鲈的研究表明, 饲料中添加高水平棉籽蛋白会显著降低紧密连接蛋白的表达, 损害肠道形态和屏障功能^[50]。在本研究中, 棉籽蛋白组也呈现相同规律, 相较而言发酵棉籽蛋白组则显著提升了紧密连接蛋白基因(*zo-1*、*occludin*、*tricellulin*)的表达, 这可能与发酵棉籽蛋白组的低棉酚含量相关, 发酵通过对饲料中游离棉酚的降解, 降低了对大菱鲆肠道物理屏障的破坏。而发酵棉籽蛋白组*zo-1*、*occludin*表达量显著高于鱼粉组, 这可能是因为发酵作用改善了肠道微生物菌群, 促进了肠道物理屏障的功能, 在南美白对虾上也有相似的结果^[51]。

4 结论

发酵结果表明, 发酵作用可显著提升棉籽蛋白营养价值, 与棉籽蛋白相比, 发酵棉籽蛋白粗蛋白含量和酸溶蛋白含量分别提高了3.0%和53.4%。同时, 发酵作用可显著降低棉籽蛋白毒性, 与棉籽蛋白相比, 发酵棉籽蛋白游离棉酚含量降低了49.7%。

养殖实验结果表明, 与棉籽蛋白组相比, 发酵棉籽蛋白组大菱鲆在生长性能、抗氧化能力和非特异性免疫能力方面得到显著提升。同时, 发酵棉籽蛋白组在抗氧化酶活性、肠道屏障基因表达方面要优于鱼粉组, 生长性能和鱼粉组相比无显著差异。在本实验条件下, 发酵棉籽蛋白在替代鱼粉方面体现了优异的性能, 可替代大菱鲆饲料中20%的鱼粉。(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Ding C H, Wang Y, Wang W L, *et al.* Study on the contents of acidic and basic amino acids and flavor amino acids in fish meal [J]. *Feed Industry*, 2018, **39**(16): 49-52. [丁晨红, 王英, 王威利, 等. 鱼粉中酸碱性氨基酸及呈味氨基酸含量特点研究 [J]. 饲料工业, 2018, **39**(16): 49-52.]
- [2] Qian Y, Jiang K J, Wang X T, *et al.* Sources and utilization of fish meal and fish oil in China [J]. *Fishery Information & Strategy*, 2020, **35**(2): 91-100. [钱好, 蒋科技, 王希挺, 等. 中国鱼粉鱼油来源及利用 [J]. 渔业信息与战略, 2020, **35**(2): 91-100.]
- [3] Wang A P, Lü Y F, Zhang J M, *et al.* Investigation on nutritional components and gossypol content of cottonseed meal and cottonseed protein in China [J]. *Acta Agricuturae Boreali-Sinica*, 2010, **25**(S1): 301-304. [王安平, 吕云峰, 张军民, 等. 我国棉粕和棉籽蛋白营养成分和棉酚含量调研 [J]. 华北农学报, 2010, **25**(S1): 301-304.]
- [4] Wang K Z. Effects of gossypol on the intestinal structure and immune barrier and the related mechanisms in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2019. [王开卓. 棉酚对草鱼肠道结构和免疫屏障的作用及其机制 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2019.]
- [5] Yin B, Liu H, Tan B, *et al.* Preliminary study of mechanisms of intestinal inflammation induced by plant proteins in juvenile hybrid groupers (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *E. lanceolatus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(106): 341-356.
- [6] Zhou X M, He G L, Xu Z C, *et al.* Effects of cottonseed protein source on growth, body composition and health of *Micropterus salmoides* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, **45**(10): 1703-1714. [周兴梅, 何光伦, 许志城, 等. 棉籽蛋白源对大口黑鲈生长、体组成及健康的影响 [J]. 水产学报, 2021, **45**(10): 1703-1714.]

- [7] Bahraini Z, Salari S, Sari M, *et al.* Effect of radiation on chemical composition and protein quality of cottonseed meal [J]. *Animal Science Journal*, 2017, **88**(9): 1425-1435.
- [8] Wei C, Yan Y W, Zhang Y L, *et al.* Optimization of technology based on the combination of the cottonseed meal extraction and solid-state fermentation [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2015, **41**(6): 100-3. [魏春, 颜雨薇, 张艳丽, 等. 棉籽粕浸提及固态发酵联合工艺的优化 [J]. 食品与发酵工业, 2015, **41**(6): 100-3.]
- [9] Wei C, Wang X, Li C, *et al.* Replacement of fishmeal with *Shewanella* sp. MR-7 fermented soya bean meal in Pacific white shrimp [J]. *Aquaculture Research*, 2021, **52**(5): 2110-2120.
- [10] Chen J H. Effects of partially replacing fish meal with *Aspergillus oryzae* fermented soybean meal and unfermented soybean meal in diets on feed intake and growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, **25**(2): 277-282. [陈京华. 米曲霉AS 3.951发酵豆粕对大菱鲆摄食生长的影响 [J]. 中国农学通报, 2009, **25**(2): 277-282.]
- [11] Li C, Zhang B, Wang X, *et al.* Improved utilization of soybean meal through fermentation with commensal *Shewanella* sp. MR-7 in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, **18**(1): -214.
- [12] Sun H, Tang J W, Yao X H, *et al.* Partial substitution of fish meal with fermented cottonseed meal in juvenile black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) diets [J]. *Aquaculture*, 2015(**446**): 30-36.
- [13] Wang L, Zhou H, He R, *et al.* Effects of soybean meal fermentation by *Lactobacillus plantarum* P8 on growth, immune responses, and intestinal morphology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *Aquaculture*, 2016(**464**): 87-94.
- [14] Xuan Q, Qiao L, Hou X, *et al.* Fermentation technology of fermented cottonseed meal and its application in animal production [J]. *Feed Industry*, 2021, **42**(18): 29-35. [宣秋希, 乔琳, 侯晓林, 等. 发酵棉粕的工艺研究及其在动物生产中的应用 [J]. 饲料工业, 2021, **42**(18): 29-35.]
- [15] Li J, Gao T, Hao Z, *et al.* Anaerobic solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* for digesting free gossypol and improving nutritional quality in cottonseed meal [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022(**9**): 1017637.
- [16] Wang W K, Li W J, Wu Q C, *et al.* Isolation and identification of a rumen *Lactobacillus* bacteria and its degradation potential of gossypol in cottonseed meal during solid-state fermentation [J]. *Microorganisms*, 2021, **9**(11): 2200.
- [17] Kumar M, Tomar M, Punia S, *et al.* Cottonseed: A sustainable contributor to global protein requirements [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021(**111**): 100-113.
- [18] Mageshwaran V, Sharma V, Chinnkar M, *et al.* Biodegradation of gossypol by mixed fungal cultures in minimal medium [J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2018, **54**(3): 301-308.
- [19] Sun H, Tang J W, Yao X H, *et al.* Effects of replacement of fish meal with fermented cottonseed meal on growth performance, body composition and haemolymph indexes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 [J]. *Aquaculture Research*, 2016, **47**(8): 2623-2632.
- [20] Daniel H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport [J]. *Annual Review of Physiology*, 2004(**66**): 361-384.
- [21] Su Z, Chen F, Guan J, *et al.* Bovine bone meal combined with dephenolized cottonseed protein is an effective fishmeal substitution in *Trachinotus ovatus* feed: a comprehensive evaluation of growth, muscle quality, and intestinal digestion physiology [J]. *Aquaculture Reports*, 2024(**39**): 102444.
- [22] Mena H, Santos J E P, Huber J T, *et al.* The effects of varying gossypol intake from whole cottonseed and cottonseed meal on lactation and blood parameters in lactating dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2004, **87**(8): 2506-2518.
- [23] Yang B B, Hua Y, Xiao J X, *et al.* Effects of partial replacement of fish meal by cottonseed meal on digestive enzymes activity and intestine histology of juvenile black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* [J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2015, **36**(4): 45-51. [杨彬彬, 华颖, 肖金星, 等. 棉粕替代部分鱼粉对黑鲷幼鱼消化酶活性及肠道组织结构的影响 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2015, **36**(4): 45-51.]
- [24] Wang L, Chen M, Luo X, *et al.* Intramolecular annulation of gossypol by laccase to produce safe cottonseed protein [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020(**8**): 583176.
- [25] Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2005, **115**(2): 209-218.
- [26] Liu C, Tao Q, Sun M, *et al.* Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats [J]. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 2010, **90**(12): 1805-1816.
- [27] Aoyama T, Paik Y H, Seki E. Toll-like receptor signaling and liver fibrosis [J]. *Gastroenterology Research and Practice*, 2010, **2010**(1): 192543.
- [28] Lee K J, Dabrowski K. High-performance liquid chromatographic determination of gossypol and gossypolone enantiomers in fish tissues using simultaneous electrochemical and ultraviolet detectors [J]. *Journal of Chromatography B*, 2002, **779**(2): 313-319.
- [29] Jia Y, Chen X, Wang Z, *et al.* Physiological response of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) during hyperthermal stress [J]. *Aquaculture*, 2020(**529**): 735645.

- [30] Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2007, **35**(Pt 5): 1147-1150.
- [31] Kalita C, Mehta U, Aayush K, *et al.* Recent trends in antioxidative peptides derived from soybean and other soy-based products: a comprehensive review [J]. *Process Biochemistry*, 2024(**136**): 311-323.
- [32] Verni M, Verardo V, Rizzello C G. How fermentation affects the antioxidant properties of cereals and legumes [J]. *Foods*, 2019, **8**(9): 362.
- [33] Li W, Kong A N. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response [J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2009, **48**(2): 91-104.
- [34] Zou F Y, Jia B Y, Luo Z, *et al.* Effects of fermented cottonseed meal on growth performance, apparent digestibility and intestinal health of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2025, **49**(3): 191-204. [邹峰余, 贾冰玉, 罗智, 等. 发酵棉籽粕对黄颡鱼生长性能、表观消化率和肠道健康的影响 [J]. 水产学报, 2025, **49**(3): 191-204.]
- [35] Miggin S M, O'Neill L A J. New insights into the regulation of TLR signaling [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006, **80**(2): 220-226.
- [36] Gao F Y, Dong J J, Zhang H T, *et al.* Cloning of large-mouth bass (*Micropterus salmoides*) *MyD88* gene and its activating effect on *NF-κB* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2025, **33**(2): 366-378. [高凤英, 董浚键, 张赫桐, 等. 大口黑鲈 *MyD88* 基因的克隆及其对 *NF-κB* 的激活作用 [J]. 农业生物技术学报, 2025, **33**(2): 366-378.]
- [37] Mantovani A, Dinarello C A, Molgora M, *et al.* Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity [J]. *Immunity*, 2019, **50**(4): 778-795.
- [38] Ding H, Wang G, Yu Z, *et al.* Role of interferon-gamma (*IFN-γ*) and *IFN-γ* receptor 1/2 (*IFNγR1/2*) in regulation of immunity, infection, and cancer development: *IFN-γ*-dependent or independent pathway [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022(**155**): 113683.
- [39] Li X N, Chen X M, Peng S B, *et al.* Research progress on intestinal mucosal barrier function, injury mechanism and nutritional regulation of fish [J]. *Feed Research*, 2023, **46**(19): 126-129. [李旭男, 陈秀梅, 彭思博, 等. 鱼类肠黏膜屏障功能、损伤机制及其营养调控的研究进展 [J]. 饲料研究, 2023, **46**(19): 126-129.]
- [40] Hossain M S, Lee S, Small B C, *et al.* Histidine requirement of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a low fishmeal-based diet for maximum growth and protein retention [J]. *Aquaculture Research*, 2021, **52**(8): 3785-3795.
- [41] Wang H, Bi C, Wang Y, *et al.* Selenium ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells by inhibiting activation of TLR2, *NF-κB* and MAPK signaling pathways [J]. *BMC Veterinary Research*, 2018, **14**(1): 197.
- [42] Wang Z, Liao S, Wang J, *et al.* Effects of fermented cottonseed meal substitution for fish meal on intestinal enzymatic activity, inflammatory and physical-barrier-related gene expression, and intestinal microflora of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*) [J]. *Fishes*, 2023, **8**(9): 466.
- [43] Lim S J, Lee K J. A microbial fermentation of soybean and cottonseed meal increases antioxidant activity and gossypol detoxification in diets for Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2011, **42**(4): 494-503.
- [44] Bian F, Jiang H, Man M, *et al.* Dietary gossypol suppressed postprandial TOR signaling and elevated ER stress pathways in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2017, **312**(1): E37-E47.
- [45] Zhao L, Liang J, Chen F, *et al.* High carbohydrate diet induced endoplasmic reticulum stress and oxidative stress, promoted inflammation and apoptosis, impaired intestinal barrier of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021(**119**): 308-317.
- [46] Chen Y, Li F F, Zhang Y, *et al.* Biological function and mechanism of tight junction of intestinal mucosal epithelium [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, **29**(9): 3068-3074. [陈意, 李方方, 张勇, 等. 肠黏膜上皮组织紧密连接的生物学功能和作用机理 [J]. 动物营养学报, 2017, **29**(9): 3068-3074.]
- [47] Zhao J, Zhao Y, Liu H, *et al.* Dietary leucine improves fish intestinal barrier function by increasing humoral immunity, antioxidant capacity, and tight junction [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, **24**(5): 4716.
- [48] Wu X Q, Chen X M, Wang G Q, *et al.* A review on tight junction protein in fish intestinal barrier injury [J]. *Feed Industry*, 2023, **44**(6): 56-62. [吴雪芹, 陈秀梅, 王桂芹, 等. 紧密连接蛋白在鱼类肠道屏障损伤中的研究进展 [J]. 饲料工业, 2023, **44**(6): 56-62.]
- [49] Mariano C, Sasaki H, Brites D, *et al.* A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance [J]. *European Journal of Cell Biology*, 2011, **90**(10): 787-796.
- [50] He G, Zhang T, Zhou X, *et al.* Effects of cottonseed protein concentrate on growth performance, hepatic function and intestinal health in juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides* [J]. *Aquaculture Reports*, 2022(**23**): 101052.
- [51] Han F, Qian J, Qu Y, *et al.* Partial replacement of soybean meal with fermented cottonseed meal in a low fishmeal diet improves the growth, digestion and intestinal microbiota of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture Reports*, 2022(**27**): 101339.

***SHEWANELLA* SP. FERMENTED COTTONSEED PROTEIN REPLACING FISH-MEAL ON GROWTH AND NON-SPECIFIC IMMUNITY OF TURBOT (*SCOPHTHALMUS MAXIMUS* L.)**

ZHAO Tian-Hao, ZHOU Hui-Hui, He Gen, WANG Xuan, LIU Cheng-Dong and MAI Kang-Sen

(Key Laboratory of Mariculture of Ministry of Education, College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In order to investigate the effect of *Shewanella* sp. fermented cottonseed protein replacing fishmeal on growth performance and non-specific immunity of turbot (*Scophthalmus maximus* L.), this study was conducted using 50% fish meal group as the control group, and experimental groups with fermented cottonseed protein and cottonseed protein were used as the experimental group replacing 20% of fish meal in the feed. Three kinds of compound feeds with isonitrogenous and isofat (fish meal group, cottonseed protein group, fermented cottonseed protein group) were prepared. Turbot with an initial body weight of (17.52 ± 0.02) g were cultured for 8 weeks. The results showed that the weight gain rate (WGR), specific growth rate (SGR), and protein efficiency (PER) in the fermented cottonseed protein group were significantly higher than those in the cottonseed protein group, and the feed coefficient (FCR) was significantly lower ($P < 0.05$), with no significant difference from the fish meal group. The antioxidant indices revealed that the fermented group had significantly higher total antioxidant capacity (T-AOC) and superoxide dismutase (SOD) activity in the liver than that in the cottonseed protein group, significantly higher catalase (CAT) activity than that in the fish meal group, and significantly lower malondialdehyde (MAD) content than that in the fish meal group ($P < 0.05$). Histomorphology analysis showed that the intestinal villi height in the fermented group was significantly higher compared to the cottonseed protein group ($P < 0.05$) and not significantly different from the fish meal group. In terms of immunity, the expression of intestinal pro-inflammatory factor genes (*il-8*, *ifn γ* , *il-1 β*) and TLR2/NF- κ B pathway genes (*tlr2*, *myd88*, *nf- κ b p65*) was significantly suppressed in the fermented cottonseed protein group compared with the cottonseed protein group ($P < 0.05$), with no significant difference from the fish meal group. Conversely, the expression of tight junction protein genes (*zo-1*, *occludin*, *tricellulin*) was significantly up-regulated ($P < 0.05$), in which *zo-1* and *occludin* expression was significantly higher than that of fish meal group. Under the present experimental conditions, *Shewanella* sp. fermentation of cottonseed protein significantly improved the negative effects of cottonseed protein replacing fish meal on the turbot growth and immunity, and could replace 20% of fish meal in turbot feed.

Key words: Fermented cottonseed protein; Growth; Non-specific immunity; Turbot