

金属蛋白酶对奥尼罗非鱼生长、消化率及非特异性免疫功能的影响

乌 兰^{1,2}, 谢 骏², 王广军², 余德光², 胡朝莹^{1,2}, 牛继峰^{2,3}

(1. 上海水产大学生命科学学院, 上海 200090; 2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;
3. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要: 在基础饲料中分别添加 0、0.03%、0.05%、0.10% 的金属蛋白酶, 饲喂奥尼罗非鱼 56 d, 测定奥尼罗非鱼的生长、消化率及血清溶菌酶活力和超氧化物歧化酶活力 (SOD)。结果表明, 添加 0.10% 的金属蛋白酶显著提高了奥尼罗非鱼的增重率 ($P < 0.05$), 降低了饵料系数 ($P < 0.05$); 添加 0.10% 的金属蛋白酶显著提高了奥尼罗非鱼对蛋白质的表观消化率 ($P < 0.05$), 添加 0.05% 和 0.10% 的金属蛋白酶均显著提高奥尼罗非鱼对干物质的表观消化率 ($P < 0.05$); 在血清酶活力方面, 添加 0.10% 的金属蛋白酶组 SOD 活力比对照组高 ($P < 0.05$)。因此, 饲料中添加金属蛋白酶能显著促进罗非鱼生长和营养物质的利用, 提高罗非鱼血清 SOD 活力。

关键词: 金属蛋白酶; 奥尼罗非鱼; 生长; 消化率; 非特异性免疫

中图分类号: S963.73^{1,2} 文献标识码: A 文章编号: 1673-2227-(2007)03-0008-06

Effect of the metalloprotease on growth performance, digestibility and non-specific immune of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*

WU Lan^{1,2}, XIE Jun², WANG Guangjun², YU Deguang², HU Zhaoying^{1,2}, NIU Jifeng^{2,3}

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;
2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
3. College of Aquaculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: The effects of adding different level of metalloprotease in the diet on growth performance, apparent digestibility and non-specific immune of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) were investigated. Four different diets were fed to fish for 56 days: a basic diet as control and three diets supplemented with 0.03%, 0.05% and 0.10% metalloprotease. Fish fed with the diet added 0.10% enzyme had significantly higher weight gain and lower feed conversion ratio (FCR) than that of the control group ($P < 0.05$). Furthermore, the addition of the 0.10% metalloprotease had positive effects on the protein apparent digestibility ($P < 0.05$) and dry matter apparent digestibility ($P < 0.05$), and the level of 0.05% also improved the dry matter apparent digestibility significantly ($P < 0.05$). Superoxide dismutase (SOD) activity in tilapia serum was significantly higher than that of the control group when the fish fed with the diet supplemented with 0.10% metalloprotease. In conclusion, the addition of dietary metalloprotease had significant positive effects on growth performance, protein digestibility and nutrient utilization of tilapia, and enhanced the activities of SOD in tilapia serum.

收稿日期: 2006-12-22; 修回日期: 2007-01-15

资助项目: 广东省科技计划项目 (2005B33201012; 2005B20301024); 广东省自然科学资金项目 (5004159; 05011783)

作者简介: 乌 兰 (1980-), 女, 硕士研究生, 从事水产动物营养与健康养殖方面的研究。E-mail: largewlwl@tom.com

通讯作者: 谢 骏, E-mail: xj007@tom.com

Key words: metalloprotease; *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*; growth; digestibility; non-specific immune

酶是活细胞产生的一类具有催化能力的蛋白质, 是促进生化反应的高效物质。从 20 世纪 80 年代以来酶制剂已成为养殖业应用的热点。现今使用的多为复合酶制剂, 对单一酶制剂的研究侧重于植酸酶、木聚糖酶及葡聚糖酶, 而对于蛋白酶作为饲用酶制剂的研究甚少^[1-2]。蛋白酶的作用是将组成蛋白的大分子多肽水解成寡肽或氨基酸, 从而提高饲料蛋白的利用率。金属蛋白酶是从韩国巫婆蜘蛛 (*Nephila clavata*) 肠道分离出的微生物产生的高活性蛋白酶, 该蛋白酶与饲料中的金属离子具有高度协同作用, 对植物蛋白和动物蛋白有很强的分解能力, 且安全、无毒, 可作为各种饲料的酶制剂^[3]。本试验在罗非鱼基础饲料中添加金属蛋白酶制剂, 研究其对奥尼罗非鱼生长、消化率及非特异性免疫功能的影响, 从营养物质的消化吸收和免疫学角度来探讨酶制剂的作用机理, 为其在罗非鱼饲料中的推广应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验地点与时间

试验时间: 2006 年 6 月 30 日 ~ 2006 年 8 月 24 日。

试验地点: 中国水产科学院珠江水产研究所基地。

1.2 试验鱼

奥尼罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) 购于珠江水产研究所良种基地。

1.3 试验饲料

试验的基础饲料营养成分为粗蛋白 30%、粗纤维 15%、粗灰分 15%、总磷 0.6%、钙 0.5% ~ 1.2%、食盐 0.2% ~ 0.8%、赖氨酸 1.0%、水分 12.9%, 试验饲料为基础饲料中分别添加 0、0.03%、0.05%、0.10% 的金属蛋白酶。试验饲料由佛山市金屏饲料有限公司加工。

金属蛋白酶由北京金英赛得科技有限公司提供, 含 600 000 IU·kg⁻¹ 的蛋白酶, 该蛋白酶是从韩国巫婆蜘蛛肠道分离出的微生物产生的高活性蛋白酶, 并且与多数金属离子 (Zn²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Co²⁺、Cu²⁺) 具有高度协同作用,

该酶制剂经特殊工艺包埋处理可耐高温, 经检测, 制粒后仍可保持 80% 以上的酶活。

1.4 试验设计与日常管理

1.4.1 生长试验 试验鱼暂养 1 周后, 挑选规格较为一致的个体 (平均体重 8.5 g 左右) 放于网箱 (1 m × 1 m × 1 m), 网箱置于室外水泥池, 每网 30 尾。试验分 4 组, 即对照、低浓度、中浓度、高浓度, 每组各设 3 个重复。每天定时投饵 (8:00, 11:30, 17:00), 定时测定水温、溶氧、pH 值, 日投饵量为鱼体重的 4% ~ 6%, 并根据鱼体进食情况和天气变化情况及时调整投饵量, 试验期间水温为 27.6 ~ 32.3℃, DO > 4.0 mg·L⁻¹, pH 值为 7.0 ~ 8.5。

1.4.2 消化率试验 试验分 4 组, 同上, 每组各设 3 个重复, 在规格为 69 cm × 48 cm × 60 cm 的塑料箱中进行, 每箱放鱼 8 尾, 投喂添加 1% Cr₂O₃ 的试验饲料, 24 h 连续充气。每天投饵 2 次 (9:00, 16:00), 投喂 7 d 后, 每天喂料 2 h 后收集粪便, 用捞网捞起条状粪便, 用镊子选择新鲜、外表带有包膜的, 尽可能完整的粪便放入容器中冷冻保存, 实验结束后将每天收集到的粪便集中, 并在 60℃ 烘箱中烘干备用。

1.4.3 免疫试验 血清制备, 生长试验结束次日, 从每个网箱中对应取出 8 尾鱼, 用 1 mL 一次性无菌注射器从鱼侧线下第 2 个鳞片处深入针头于脊柱正下方血管中取血, 去掉针头, 将血液注入 1.5 mL 的灭菌离心管中, 放 4℃ 冰箱过夜后, 以 4 000 rmp·min⁻¹ 低温离心 5 min, 吸取上清液, 每 4 尾鱼的上清液混合, 置于 -20℃ 冰箱备用。

1.5 测定指标

1.5.1 生长指标 在试验开始及试验结束的前 1 d 停止投饵, 将鱼饥饿 1 d。然后用电子天平称鱼体重, 精确到 0.01 g, 计算相对增重率, 饲料系数及成活率。有关计算公式如下:

$$\text{相对增重率} (\%) = \frac{\text{试验末鱼均重} - \text{试验初鱼均重}}{\text{试验初鱼均重}} \times 100$$

$$\text{饲料系数} = \frac{\text{总摄食量}}{\text{鱼体净增重}}$$

$$\text{成活率} (\%) = \frac{\text{试验末鱼总数} - \text{试验初鱼总数}}{\text{试验初鱼总数}} \times 100$$

1.5.2 表观消化率 蛋白质的测定采用凯氏定氮法, Cr_2O_3 含量的测定采用湿氏灰化定量法。其计算公式为:

$$\text{蛋白质表观消化率} (\%) = 100 - 100 \times$$

$$\frac{\text{粪便中粗蛋白含量}}{\text{含量} \times \text{饲料中粗蛋白含量}} \times \frac{\text{饲料中} \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{含量}}{\text{粪便中} \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{含量}}$$

$$\text{干物质表观消化率} (\%) = 100 - 100 \times \frac{\text{饲料中} \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{含量}}{\text{粪便中} \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{含量}}$$

1.5.3 溶菌酶、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性

(1) 溶菌酶活力测定。采用溶菌酶试剂盒 (购于南京建成生物工程研究所), 其原理为在一定浓度的混浊菌液中, 由于溶菌酶能水解细菌细胞壁粘多肽使细菌裂解浓度降低, 透光度增强, 故可以根据浊度变化来推测溶菌酶含量。具体步骤见试剂盒说明书。

$$\text{溶菌酶活力计算公式: 溶菌酶活力} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{\text{测定管透光度} - \text{空白管透光度}}{\text{标准管透光度} - \text{空白管透光度}} \times \text{标准管浓度} (10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$$

(2) SOD 活力测定。采用超氧化物歧化酶试剂盒 (购于南京建成生物工程研究所), 其原理为通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基 ($\text{O}^{2-}\cdot$), 后者氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂的作用下呈现紫红色, 用可见光分光光度计测其吸光度。当被测样品中含 SOD 时, 则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用, 使形成的亚硝酸盐减少, 比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值, 通过公式计算可求出被测样品中的 SOD 活力。

SOD 活力定义为, 每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位 (U)。测定步骤参照说明书进行, 取样量为 50 μL 。SOD 活力计算公式: 总 SOD 活力 ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) = $\frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总量}}{\text{取样量}}$

1.6 数据统计处理

实验数据用 Microsoft Excel 作初步处理, 用 SPSS (Ver. 11.5) 进行统计分析。实验各组间的差异采用单因子方差 (One-Way Anova) 分析, 多重比较采用最小显著差数法 (LSD), 结果用平均数 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 金属蛋白酶对奥尼罗非鱼生长的影响

由表 1 可知, 与对照组相比, 添加高浓度蛋白酶组的增重率表现显著性差异 ($P < 0.05$), 其增重率提高了 25.13%, 而低浓度与中浓度组增重率虽有所提高, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。饲料系数各浓度组与对照组相比均有所降低, 分别降低了 6.98%、4.65%、12.79%, 其中高浓度蛋白酶组与对照组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。饲料中添加金属蛋白酶对奥尼罗非鱼成活率没有显著性影响 ($P > 0.05$)。

2.2 金属蛋白酶对奥尼罗非鱼表观消化率的影响

由表 2 可知, 饲料中添加金属蛋白酶可提高奥尼罗非鱼对蛋白质的表观消化率。与对照组相比, 添加高浓度蛋白酶组差异显著 ($P < 0.05$), 其蛋白质消化率提高了 5.25%。随着饲料中蛋白酶含量的增加干物质表观消化率呈上升趋势, 与对照组相比, 饲料中添加中浓度、高浓度蛋白酶组差异均显著 ($P < 0.05$), 其干物质消化率分别 16.63%、27.82%, 同时, 高浓度组与低浓度组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 金属蛋白酶对奥尼罗非鱼非特异性免疫功能的影响

2.3.1 金属蛋白酶对奥尼罗非鱼血清溶菌酶活力的影响 如图 1 可知, 饲料中添加金属蛋白酶可提高血清溶菌酶活力, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3.2 金属蛋白酶对奥尼罗非鱼血清超氧化物歧化酶活力的影响 如图 2 可知, 与对照组相比, 饲料中添加高浓度蛋白酶的实验组差异显著 ($P < 0.05$), 低浓度组、中浓度组 SOD 活力均有所提高, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 1 金属蛋白酶对奥尼罗非鱼生长性能的影响

Tab. 1 Effects of metalloprotease on growth performance of tilapia

组别 group	初均重/g initial average weight	末均重/g final average weight	增重率/% weight gain rate	饵料系数 feed conversion rate	成活率/% survival rate
对照 control	8.70 ± 0.14	45.23 ± 1.54 ^a	420.10 ± 24.34 ^a	1.72 ± 0.04 ^a	98.89 ± 0.02
低浓度 (0.03%) light concentration	8.38 ± 0.36	45.88 ± 2.59 ^a	447.06 ± 8.09 ^a	1.60 ± 0.14 ^{ab}	96.67 ± 0.01
中浓度 (0.05%) medium concentration	8.17 ± 0.17	44.18 ± 1.54 ^a	441.09 ± 26.72 ^a	1.64 ± 0.08 ^{ab}	97.78 ± 0.04
高浓度 (0.10%) high concentration	8.55 ± 0.41	53.37 ± 3.38 ^b	525.68 ± 64.05 ^b	1.50 ± 0.07 ^b	97.78 ± 0.04

注: 同一列不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different letters in the same row mean significant difference ($P < 0.05$).

表 2 金属蛋白酶对奥尼罗非鱼营养物质表观消化率的影响

Tab. 2 Effects of metalloprotease on the apparent digestibility of nutrient of tilapia

组别 group	蛋白质表观消化率 protein apparent digestibility	干物质表观消化率 dry matter apparent digestibility
对照 control	80.79 ± 0.67 ^a	46.37 ± 1.50 ^a
低浓度 light concentration	83.02 ± 0.88 ^{ab}	51.32 ± 0.87 ^{ab}
中浓度 medium concentration	82.91 ± 2.25 ^{ab}	54.08 ± 5.19 ^{bc}
高浓度 high concentration	85.03 ± 0.92 ^b	59.27 ± 0.93 ^c

注: 同一列不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different letters in the same mean significant difference ($P < 0.05$).

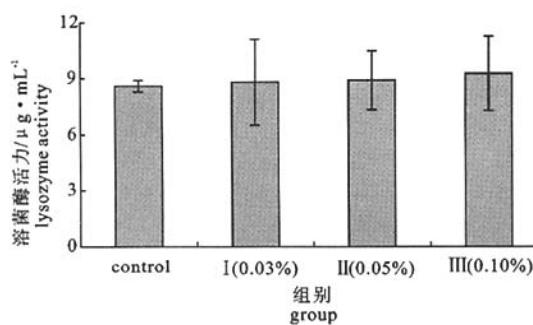


图 1 金属蛋白酶对奥尼罗非鱼血清溶酶活力的影响

Fig. 1 Effects of metalloprotease on the lysozyme activity in tilapia serum

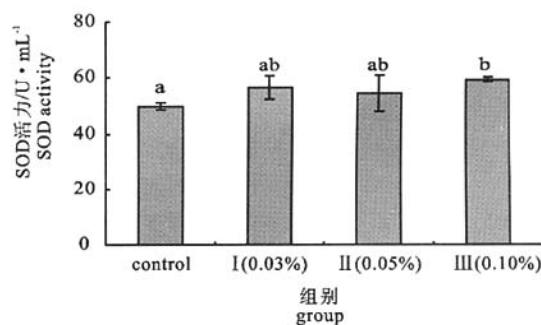


图 2 金属蛋白酶对奥尼罗非鱼血清超氧化物歧化酶活力的影响

Fig. 2 Effects of metalloprotease on the SOD activity in tilapia serum

3 讨论

3.1 金属蛋白酶对奥尼罗非鱼生长的影响

金属蛋白酶之所以促进罗非鱼生长, 可能有以

下几点原因: (1) 该蛋白酶与饲料中的金属离子具有高度协同作用, 当豆粕等饲料原料中含有金属离子时可以使金属蛋白酶的活性增加; (2) 该蛋白酶对植物蛋白和动物蛋白有很强的分解能力, 尤

其是对植物蛋白, 通过在动、植物原料中添加金属蛋白酶, 可以显著提高水解产物中容易被动物吸收利用的必需氨基酸和非必需氨基酸的含量^[3-4]; (3) 可能会激活内源消化酶的分泌^[5-6], 促进内外消化酶共同作用。

在奥尼罗非鱼基础饲料中添加 0.10% 的金属蛋白酶可以显著提高增重率并降低饲料系数。这与蛋白酶在畜禽上的许多报道相符, 如在断奶仔猪日量中添加 0.2% 的酸性蛋白酶能提高仔猪断奶后日增重 1.4%, 提高饲料转化率 9.0%^[7]; 在肉鸡饲料中添加蛋白水解酶能提高饲料转化率^[8]。

3.2 金属蛋白酶对饲料养分表观消化率的影响

在尼罗罗非鱼 *O. niloticus*^[9]、异育银鲫 *Carassius auratus gibelio*^[10]、黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco*^[11] 和彭泽鲫 *Carassius auratus varpengze*^[12] 等的研究中, 含蛋白酶的复合酶制剂能提高营养物质消化率, 特别是显著提高粗蛋白质和干物质的表观消化率。在虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 饲料中添加蛋白水解酶时, 能增加粗蛋白的表观消化率^[13]。奚刚等^[14]也报道了饲料中添加中性蛋白酶能显著提高前期、后期丝毛乌骨鸡 *Gallus gallus domesticus brisson* 对粗蛋白的表观消化率。本试验中, 饲料中添加 0.10% 的金属蛋白酶能显著提高奥尼罗非鱼对粗蛋白的表观消化率, 添加 0.05% 和 0.10% 的金属蛋白酶能显著提高对干物质的表观消化率。这与上述研究报道相似。

3.3 金属蛋白酶对非特异性免疫功能的影响

水产动物体内的溶菌酶是一种重要的非特异性防御因子, 特别是鱼生理防御水平的一个重要标志, 也可以体现病原菌及其它环境因素对鱼体健康的影响^[15]。溶菌酶活性提高, 表明吞噬细胞活性增加, 促进机体的免疫保护^[16]。

超氧化物歧化酶广泛存在于各种需氧生物体内, 具有清除机体在新陈代谢过程中产生的超氧阴离子自由基 (O^{2+}) 的能力, 属于生物体内的防御系统酶类^[17]。已有研究发现, SOD 活性与生物的免疫水平密切相关, 因此, 可作为机体非特异性免疫评价指标^[18]。

近年来, 有关鱼类非特异性免疫功能的研究多数是关于低聚果糖、 β -葡聚糖、低聚木糖、中草药、维生素 C 和维生素 E 的研究^[19-23], 而对于酶

制剂的研究很少。本研究结果表明, 金属蛋白酶可提高罗非鱼血清 SOD 活力, 且添加量为 0.10% 时与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。这与钟国防等^[24]的报道, 饲料中添加木聚糖酶和含蛋白酶的复合酶制剂能提高罗非鱼 SOD 活力 ($P < 0.01$) 相符, 钟国防等认为添加酶制剂能提高非特异性免疫能力, 主要是养分利用率对免疫应答有间接作用, 其作用机制是添加酶制剂后, 提高了罗非鱼的消化吸收能力, 特别是提高了鱼体对蛋白质及其它营养成分的利用率, 从而促进了相关免疫因子的合成。这与本研究的结果, 即金属蛋白酶能提高奥尼罗非鱼蛋白质表观消化率和干物质表观消化率相符。另外, 本研究显示, 金属蛋白酶可以提高血清溶菌酶活力, 但与对照组相比差异不显著。其原因可能是罗非鱼血清中溶菌酶含量比较低, 微量酶制剂在短时间内对其发挥作用不明显。

参考文献:

- [1] 李孝辉. 饲用微生物酶制剂及其研究应用概况 [J]. 饲料工业, 2001, 22 (1): 40-43.
- [2] 王新梅, 朱文渊. 饲用酶制剂发展概况 [J]. 新疆农业科学, 2004, 41 (专刊): 112-115.
- [3] PARK M J, SHIN D H, SON K H, et al. The effect of the addition of a protease Arazyme® Ron the dissolution of proteins in animal and vegetable feed materials [R]. Daejeon: Insect Resources Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, R & D Center, Insect Biotech Co., Ltd, 2004.
- [4] PARK M J, PARK D S, SHIN D H, et al. The effect of consecutive treatment by phytase and protease, Arazyme on the protein degradation in soybean meal [R]. Daejeon: Insect Resources Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, R & D Center, Insect Biotech Co., Ltd, 2004.
- [5] 姚瑞清. 植酸酶对奥尼罗非鱼营养物质表观消化率及消化酶活性的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [6] 施培松. 复合酶制剂对草鱼鱼种生长性能及消化酶的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [7] 吴天星, 王亚军. 日量中添加甲酸钙和酸性蛋白酶对断奶仔猪生产性能的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2002, 38 (2): 23-25.
- [8] CHAZI S, ROOKE T A, GALBRATH H, et al. The potential for improving soya-bean meal in diets for chickens: treated with different proteolytic enzyme [J]. British Poultry Sci, 1997b, 37 (2): 554-555.
- [9] 钟国防, 周洪琪. 木聚糖酶和复合酶制剂 PS 对尼罗罗非鱼生长性能、消化率及肌肉营养成分的影响 [J]. 浙江海洋学院学

- 报, 2005, 24 (4): 324-329.
- [10] 王爱民, 刘文斌. 外源酶对异育银鲫生长及表观消化率的影响研究 [J]. 饲料工业, 2006, 27 (2): 26-29.
- [11] 韩庆, 夏维福, 罗玉双; 等. 酶制剂对黄颡鱼生长性能的影响 [J]. 水产学杂志, 2002, 15 (1): 84-87.
- [12] 陈应华. 复合酶制剂对彭泽鲫生长性能的影响试验 [J]. 饲料工业, 2001, 22 (3): 27-28.
- [13] HEO G J. A study on efficacy of the mixed digestive in cultured fish, *Cyprinus carpio* and *Oncorhynchus mykiss* [J]. Korean J Lab Anim Sci, 1996, 12 (3): 31-36.
- [14] 奚刚, 许梓荣. 中性蛋白酶制剂对丝毛乌骨鸡氮利用率及内源性蛋白质消化酶活性的影响 [J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24 (4): 399-404.
- [15] MISRA C K, DAS B K, MUKHERJEE S C, et al. Effect of multiple injections of β -glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings [J]. Fish & Shell Immunol, 2006, 20 (3): 305-319.
- [16] 何四旺, 许国焕, 吴月娟, 等. 低聚异麦芽糖和低聚果糖对罗非鱼生长和非特异性免疫的影响 [J]. 中国饲料, 2003 (23): 14-15.
- [17] 张学明, 徐俊良. 超氧化物歧化酶 (SOD) 在蚕业上的研究进展 [J]. 蚕桑通报, 1998, 29 (3): 11-13.
- [18] 李桂峰, 钱沛峰, 孙际佳, 等. 维生素 C 对胡子鲶血清免疫相关酶活性的影响 [J]. 大连水产学院学报, 2004, 19 (4): 301-305.
- [19] 乔高华, 刘至治, 冷向军. 饲料中添加 β -葡聚糖和低聚果糖对中华鳖幼鳖生长和血清 SOD、溶菌酶活力的影响 [J]. 上海水产大学学报, 2004, 13 (1): 36-41.
- [20] 熊沈学. 饲料中添加低聚木糖对异育银鲫增重率、消化酶活性及免疫功能的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [21] 王吉桥, 孙永新, 张剑诚. 金银花等复方中草药对牙鲆生长、消化和免疫功能的影响 [J]. 水产学报, 2006, 30 (1): 90-96.
- [22] 谢一荣, 吴锐全, 谢骏, 等. 维生素 C 对大口黑鲈生长和非特异性免疫功能的影响 [J]. 南方水产, 2006, 2 (3): 40-45.
- [23] LEE M H, SHIAU S Y. Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses [J]. Fish & Shell Immunol, 2004, 16 (4): 475-485.
- [24] 钟国防, 周洪琪. 木聚糖酶和复合酶制剂 PS 对尼罗罗非鱼生长性能、非特异性免疫能力的影响 [J]. 海洋渔业, 2005, 27 (4): 286-291.