

酶水解蛋白替代鱼粉对鲮鱼仔鱼生长性能及营养生理的影响*

何芬^{1,3} 潘庆^{1*} 汪小东² 梁春梅¹ 毕英佐¹

(1 华南农业大学动物科学学院水产养殖系, 广东 广州, 510642;

2 广东海大畜牧水产研究中心, 广东 广州, 511400;

3 广州海因特生物技术分公司, 广东 广州, 511400)

摘要: 研究了酶水解蛋白(EHP)部分替代鱼粉对鲮鱼仔鱼生长性能和营养生理的影响。4组等氮等能的饲料中酶水解蛋白替代鱼粉比例分别为0%, 25%, 50%, 75%, 自孵化后12天到47天投喂有三个重复的鲮鱼仔鱼。结果表明 75%替代组仔鱼成活率显著低于鱼粉组和 25%替代组($P < 0.05$)。25%替代组鲮鱼仔鱼的特定生长率与鱼粉组相当, 并显著高于 50%和 75%替代组。体谷胱甘肽含量和谷胱甘肽还原酶活性在 50%替代组显著高于鱼粉组, 体丙二醛在酶水解蛋白替代组均显著低于鱼粉组。75%替代组的蛋白酶活性和 25%、50%替代组的淀粉酶活性显著高于鱼粉组。结果说明饲料中酶水解蛋白替代 25%的鱼粉能提高鲮鱼仔鱼的抗氧化能力和消化酶活性, 从而促进生长。

关键词: 鲮鱼; 仔鱼; 酶水解蛋白; 生长

Effects of Enzymatically Hydrolyzed Protein on Growth Performance and Nutritional Physiology in Mud Carp Larvae

He Fen¹, Pan Qing^{1*}, Wang Xiao-dong², Liang Chun-mei¹, Bi Yin-zuo¹

(1 Department of Aquaculture, College of animal science technology, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China; 2 Guangdong Haid Feed Co., Ltd, China Guangdong, 511400)

Abstracts: The effect of enzymatically hydrolyzed protein (EHP) as a partial replacement of fishmeal on growth performance and nutritional physiology in mud carp *Cirrhina molitorella* larvae was studied. Four isoenergy and isonitrogen diets with a gradient replacement of EHP (0%, 25%, 50%, 75%) were fed to triplicate groups of mud carp larvae from 12 days post-hatching to 47 days. The results showed the survival rate in larvae fed the diet with 75% EHP replacement was significantly lower ($P < 0.05$) than those fed the fishmeal based diet and the diet with 25% EHP replacement. Mud carp larvae in group of 25% EHP replacement had comparable specific growth rate as that fed the fishmeal based diet, and significantly higher than those in groups of 50% and 75% EHP replacement. Body content of GSH and activity of glutathione reductase in group of 50% EHP replacement was significantly higher than that in fishmeal based group. And body contents of maleic dialdehyde in all groups of EHP replacement were significantly lower than the basal group. Protease activity in group of 75% EHP replacement and amylase activities in groups of 25% and 50% EHP replacement markedly increased compared to that in basal group. The results suggest that EHP can replace 25% of fishmeal in the diet of mud carp larvae through the improvement of antioxidant ability and activities of digestive enzyme.

Keywords: Mud carp; larvae; Enzymatically hydrolyzed protein; Growth

*资助项目: 广州市科技攻关项目, 2003J1-C0151

通讯作者: 潘庆(1969-), 女, 教授, 主要从事水产动物营养研究。Email:qpan@scau.edu.cn

以 Cahu 和 Zambonino^[1, 2]为代表的法国学者研究用鱼粉蛋白酶解物替代海鲈仔鱼饲料中的部分鱼粉，发现低剂量替代组不仅提高了海鲈仔鱼的存活率、生长率，还促进海鲈仔鱼消化道结构和功能发育。本试验采用广东海大提供的蛋白酶解物替代饲料中的部分鱼粉，探讨不同替代比例对鲮鱼仔鱼生长及营养生理的影响。

1 材料与方法

1.1 试验鱼及试验分组 试验仔鱼由广东省级鳜鱼良种场提供的 2 日龄刚开口的鲮鱼仔鱼，暂养 10 日后，选择健康鱼苗随机分入 12 个网箱中，每个网箱 300 尾。分网箱后观察仔鱼生长情况，分网箱第二天仔鱼生长稳定，投喂四组试验饲料，每组三个重复。

1.2 试验饲料 将饲料原料（广东海大和广州诚一提供，营养成分见表 1）粉碎过 200 目后，自行在实验室加工配制完成，做成 40 目和 60 目两种规格的微粘合饲料，饲料成分及营养组成见表 2。制好的饲料均保存在 -20℃ 冰箱备用。

表 1 蛋白酶解物与鱼粉的营养成分比较 (%)

原料	粗蛋白	粗脂肪	粗灰分	钙	总磷
鱼粉	62.59	6.97	18.63	3.96	2.56
蛋白酶解物	53.47	17.67	7.07	0.35	1.20

1.3 饲养管理 试验期为 35 天，头 25 天投喂 60 目规格饲料，后 10 天投喂 40 目规格饲料。每天投喂 10 次，分别在 8:00、9:00、10:00、11:00、12:00、15:00、16:00、17:00、18:00、19:00 投喂。根据摄食情况投喂率在 10-30% 范围内适当调整，达到饱食投喂。饲养期间，24 小时充氧，水温为 28.2-31.8℃，pH 值为 7.29-7.51，氨氮含量为 0.16-0.17 mg/L。

1.4 测定指标与方法

饲料的常规成分按照国家标准方法测定^[3]。总能用半自动氧弹式测热度计（长沙仪器厂，WGR-1）测定。用 MS-222 麻醉，滤纸吸干仔鱼体表水分后，用游标卡尺测量每尾仔鱼体长，用感量 0.0001g 精密天平称 10 尾仔鱼总重。计算生产指标：特定生长率（specific growth rate, SGR, %/d）=100×(ln 终末平均重 - ln 初始平均重) / 饲养时间 (天)；存活率 (survival rate, %) =100×终末鱼尾数 / (初始鱼尾数 - 取做样品鱼尾数)。匀浆样品制备：从 -80℃ 冰箱中取出鱼体样品，用玻璃匀浆器中，制成 10% 组织匀浆液，离心取上清液，分装保存在 -20℃ 冰箱。GSH、丙二醛 (MDA) 含量、谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性，均采用南京建成试剂盒测定。采用福林-酚法测定蛋白酶活性，方法参考大连水产学院自编讲义——《水产动物生理学试验指导》^[4]。采用碘-淀粉比色法测定淀粉酶活性^[5]。

1.5 数据的统计分析 全部数据用 SAS8.2 统计软件进行统计分析。试验结果采用平均数±标准误 (M±SE) (n=3) 表示，经方差分析后有显著差异再做 Duncan's 多重比较进行组间显著性差异的两两比较，显著水平采用 0.05。

2 结果

2.1 鲮鱼仔稚鱼的生产指标

表 3 列出了各饲料组鲮鱼仔稚鱼的存活率、终末平均重和特定生长率结果。存活率以 H0 组最低，显著低于 H75 组 ($P < 0.05$)，而 H50、H75 组间差异不显著 ($P > 0.05$)。终末平均重以 H25 组显著高于 H0、H50、H75 组 ($P < 0.05$)，特定生长率以 H25 组最高，显著高于 H50、H75 组 ($P < 0.05$)。

2.2 鲣鱼仔稚鱼鱼体的 GSH 含量

表 4 列出了各饲料组鲮鱼仔稚鱼鱼体的 GSH 含量。第 21、31 日龄时, H0 组 GSH 低于其他各组, 但各组间差异不显著 ($P>0.05$), 而到第 47 日龄时, H50 组的 GSH 含量显著高于 H0 组 ($P<0.05$)。

2.3 鲣鱼仔稚鱼鱼体的 MDA 含量

表 5 列出了各饲料组鲮鱼仔稚鱼鱼体的 MDA 含量。第 21 日龄时, 各组间差异不显著 ($P>0.05$)。第 31 日龄时, 以 H0 组显著高于 H75 组 ($P<0.05$)。第 47 日龄时, H0 组显著高于其他各组 ($P<0.05$)。

表 2 试验饲料配方及营养成分分析 (%)

饲料成分组成	H0	H25	H50	H75
鱼粉	40	30	20	10
蛋白酶解物 ¹	0	10	20	30
豆粕	20	20	20	20
谷朊粉	6	8	10	11.5
次粉	10	7.7	5.38	3.55
鱼油	5	4	3	2
磷酸二氢钙	1	1.65	2.3	2.95
碳酸钙	0	0.65	1.32	2
复矿 ²	1	1	1	1
多维 ³	1	1	1	1
其他	16	16	16	16
营养成分 (%)				
水分	9.42	8.85	10.65	10.70
粗蛋白	40.36	40.10	41.07	39.48
粗脂肪	18.66	17.98	16.85	18.56
灰分	12.22	12.49	12.65	12.32
钙	2.49	2.51	2.47	2.36
总磷	3.60	3.58	3.78	3.62
总能 (MJ/kg)	19.93	19.75	19.63	19.70

注: 1 由鱼粉及昆虫蛋白的混合物经过蛋白酶解制得。

2 复矿组成 (%): NaCl: 1, MgSO₄·7H₂O: 15, NaH₂PO₄·2H₂O: 25, KH₂PO₄: 32, Ca(H₂PO₄)₂·H₂O: 20, FeSO₄: 2.5, 乳酸钙: 3.5, ZnSO₄·7H₂O: 0.353, MnSO₄·4H₂O: 0.162, CuSO₄·5H₂O: 0.031, CoCl₂·6H₂O: 0.01, KIO₃: 0.003, CaCO₃: 0.45, Na₂SeO₃: 0.02。

3 多维组成 (%): 硫胺素: 0.12; 核黄素: 0.25; 尼克酸: 0.5; 泛酸钙: 0.5; 叶酸: 0.05; 盐酸吡哆醇: 0.10; 钴胺素: 0.02; VA: 0.06; D: 0.03; VE: 1; K₃: 0.2; 肌醇: 4; VC: 6; 胆碱: 40; 纤维素: 47.17。

4 其他包括: 酵母粉: 5; 豆油: 5; 卵磷脂: 5; 维生素 C: 0.3; 胆碱: 0.5; 肌醇: 0.2。

表 3 各饲料组鲮鱼仔鱼的存活率、终末平均重、特定生长率 (M±SE, n=3)

组别	H0	H25	H50	H75
初始尾数	300	300	300	300
取样尾数	60	60	60	60
终末尾数	29±3 ^b	31±5 ^b	46±1 ^{ab}	64±13 ^a
存活率 (%)	12.09±1.18 ^b	14.59±2.94 ^b	18.96±0.30 ^{ab}	26.67±5.30 ^a
初始平均重 (g)	0.0029	0.0029	0.0029	0.0029
终末平均重 (g)	0.70±0.08 ^b	0.86±0.02 ^a	0.55±0.01 ^b	0.31±0.00 ^c
SGR (%/d)	15.63±0.32 ^a	16.25±0.06 ^a	14.97±0.03 ^b	13.35±0.01 ^c

注: 同一行数据右上角英文字母有相同的表示差异不显著 ($P>0.05$)。

表 4 各饲料组鲮鱼仔稚鱼鱼体的 GSH 含量 (mgGSH/g prot.) (M±SE, n=3)

日龄	H0	H25	H50	H75
21	10.98±0.20	14.13±2.71	14.15±1.16	14.61±1.50
31	16.04±2.92	17.42±4.40	19.95±2.83	17.94±2.30
47	10.26±0.76 ^b	14.61±4.98 ^{ab}	24.41±0.69 ^a	12.75±5.16 ^{ab}

注：同一行数据右上角英文字母有相同的表示差异不显著 ($P>0.05$)。

表 5 各饲料组鲮鱼仔稚鱼鱼体的 MDA 含量 (nmol/mg prot.) (M±SE, n=3)

日龄	H0	H25	H50	H75
21	1.77±0.30	2.66±0.35	3.01±0.92	2.18±0.56
31	3.95±0.64 ^a	3.09±0.47 ^{ab}	2.83±0.11 ^{ab}	1.99±0.47 ^b
47	5.40±0.02 ^a	1.57±0.06 ^c	2.75±0.41 ^{bc}	3.34±0.69 ^b

注：同一行数据右上角英文字母有相同的表示差异不显著 ($P>0.05$)。

2.4 鲮鱼仔稚鱼鱼体 GR 活性

表 6 列出了各饲料组鲮鱼仔稚鱼鱼体的 GR 含量。第 21、31 日龄时, 各组间差异不显著 ($P>0.05$)。第 47 日龄时, H50 组显著高 H0、H25、H75 组 ($P<0.05$)。

表 6 各饲料组鲮鱼仔稚鱼鱼体的 GR 含量 (U/g prot.) (M±SE, n=3)

日龄	H0	H25	H50	H75
21	5.18±1.55	5.93±0.88	4.86±0.52	4.80±1.60
31	7.54±0.75	9.09±1.09	8.84±1.01	7.74±1.28
47	3.67±0.54 ^b	3.58±0.38 ^b	9.30±0.77 ^a	5.18±0.63 ^b

注：同一行数据右上角英文字母有相同的表示差异不显著 ($P>0.05$)。

2.5 鲮鱼仔稚鱼鱼体的蛋白酶、淀粉酶活性

表 7 列出了各饲料组仔稚鱼鱼体蛋白酶、淀粉酶结果。第 21 日龄蛋白酶以 H75 组最高, 显著高于 H0 组 ($P<0.05$)。第 31 日龄淀粉酶以 H0 组最低, 显著低于 H25、H50 组 ($P<0.05$)。

表 7 各饲料组鲮鱼仔稚鱼鱼体的蛋白酶 (U/mg prot./min) (M±SE, n=3)

日龄	指标	H0	H25	H50	H75
21	蛋白酶	15.86±0.38 ^b	17.56±2.25 ^{ab}	- ¹	24.59±1.80 ^a
31	淀粉酶	0.48±0.06 ^b	0.67±0.03 ^a	0.73±0.06 ^a	0.63±0.04 ^{ab}

注：同一行数据右上角英文字母有相同的表示差异不显著 ($P>0.05$)。

“1”表示数据缺失。

3 讨论

3.1 饲料中蛋白酶解物替代部分鱼粉对鲮鱼仔稚鱼生长的影响

小肽有自己的运转载体^[6], 其吸收机制与氨基酸相比具有速度快、载体不易饱、没有游离氨基

酸相互竞争共同吸收位点而产生拮抗等优点^[7]。而有人测得 15 日龄海鲈仔鱼的亮一丙肽酶活是 40 日龄的 10 倍^[8], 说明早期仔鱼消化吸收小肽的能力就很强。研究报道草鱼^[9、10]、鲤鱼^[11]、太平洋鲑鱼^[12]等鱼类可以完整吸收某些小肽进入血液循环。可见, 小肽不仅可以提供仔稚鱼所需要的氨基酸合成体蛋白质, 还可被直接吸收做为活性物质在机体内发挥其生理功能, 从而促进生长。仔稚鱼饲料除了要提供满足仔稚鱼所需要的蛋白质外, 还必须有适量的小肽组成^[13]。

Zambonino 等以 19 日龄的海鲈仔鱼为研究对象, 用鱼粉蛋白酶解物替代对照组中的部分鱼粉, 结果 20% 蛋白酶解物替代组取得最佳生长效果^[14]。Cahu 等对 10 日龄的海鲈仔鱼做了相似研究, 发现 25% 鱼粉蛋白酶解物组获得最佳的生长效果^[15]。大西洋鲑鱼开口饲料中应用鱼粉蛋白酶解物替代 5% 和 8% 的鱼粉, 生长率得到显著提高^[16]。鲤鱼仔鱼饲料中的总氮的 50% 被鱼粉酶解蛋白氮替代也能提高生长率^[17]。本试验中, 蛋白酶解物替代鱼粉可以显著提高 13~47 日龄的存活率 ($P < 0.05$), 而且随着替代量的增加而提高, 25% 蛋白酶解物替代组取得最高终末平均重和特定生长率 ($P < 0.05$)。这与以上学者的研究结果基本一致。

Carvalho 等研究了饲料中蛋白源的水溶性和水解性对鲤鱼仔稚鱼生长的影响, 发现可溶性非水解的酪蛋白替代部分不可溶酪蛋白可以促进生长, 如果再添加适宜的水解酪蛋白又可显著促进鲤鱼仔稚鱼生长, 但过多的添加则会阻碍生长^[18]。可见, 饲料中过高的添加小肽抑制仔稚鱼的生长^[14、15、17、19], 这与过多的游离氨基酸的添加有关。López-Alvarado 等报道当饲料中氨基酸混合物替代饲料蛋白比例达 10% 时显著抑制海鲈仔鱼的生长^[20]。本试验中, H50、H75 组特定生长率显著下降, 与上述报道结果一致。

本试验中 4 个组鲮鱼的存活率较低, 原因可能是, (1) 初始饲养密度相对较大; (2) 饲养过程中, 取样两次, 干扰鲮鱼生长。本试验中, H75 组获得最高的存活率, 但其终末平均重最低, 这可能与饲养密度有关, 也可能与饲料中蛋白酶解物替代比例过高有关, 但究竟哪个因素影响更大, 还需进一步试验证明。

3.2 饲料中蛋白酶解物替代部分鱼粉对鲮鱼仔稚鱼抗氧化能力的影响

GSH、MDA 含量及 GR 活性与机体抗氧化系统密切相关, 可以作为判断机体抗氧化能力高低的指标之一。从本试验的结果推测蛋白酶解物替代部分鱼粉可以显著提高鲮鱼的抗氧化能力。但本试验中没有测定蛋白酶解物的具体成分, 不能解释其提高仔稚鱼抗氧化能力的具体机理。

3.3 饲料中蛋白酶解物替代部分鱼粉对鲮鱼仔稚鱼消化酶活性的影响

消化酶的活性变化可以很好的反映仔稚鱼消化能力变化情况。在 Zambonino 和 Cahu 等的试验中, 分别测定了仔鱼的胰蛋白酶、糜蛋白酶、氨肽酶、碱性磷酸酶、亮-丙肽酶等多种消化酶, 发现小肽可显著影响这些酶的活性^[14、15]。例如用适量的鱼粉蛋白水解物替代部分鱼粉, 海鲈仔鱼的胰蛋白酶的分泌显著增强, 小肠刷状缘相关酶活力显著增强, 而细胞二肽酶活力显著下降^[15], 促进海鲈仔鱼消化模式向稚鱼消化模式发育。从本试验的结果推测蛋白酶解物替代部分鱼粉可以提高鲮鱼消化能力, 从而促进生长。

从上可见用蛋白酶解物替代鲮鱼饲料的部分鱼粉可以提高鲮鱼机体抗氧化能力, 提高蛋白酶、淀粉酶活性, 从而促进鲮鱼生长。75% 替代组获得最高的存活率, 提示育苗生产中, 可用蛋白酶解物替代较高比例的鱼粉来提高苗种成活率。25% 替代组获得最高的 SGR, 提示育苗生产中, 可用蛋白酶解物替代较低比例的鱼粉促进仔稚鱼生长。

参考文献

- [1] Cahu, C.L., Zambonino infante, J.L., Quazuguel, P., M.M.Lē Gallet al. Protein hydrolysate vs. fish

- meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 1999, 171: 109-119
- [2] Zambonino Infante, J. L., Cahu, C. L., Armande Peres. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus Labrax* larval development. *J. Nutr.*, 1997, 127:608-614
- [3] 崔淑文, 陈必芳. 饲料标准资料汇编[M]. 北京: 中国标准出版社, 1991, 254-280
- [4] 吴垠编. 水产动物生理学实验指导[M]. 大连水产学院
- [5] 王继贵. 临床生化检验(第二版) [M]. 长沙: 湖南科学技术出版, 1996, 414-416
- [6] 邓敦, 李铁军, 黄瑞林, 印遇龙, 范明哲, 伍国耀, 钟华宜. 小肽转运蛋白(PepT1)及其活性调控. *广西农业生物科学*, 2005, 24 (4): 352-358
- [7] 谷伟, 王淑梅, 徐奇友. 小肽营养及其在水产养殖中的应用进展. *饲料工业*, 2006, 27 (5): 10-12
- [8] Cahu, C., José Zambonion Infante. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 2001, 200: 161-181
- [9] 冯键, 刘栋辉, 刘永坚, 田丽霞, 梁桂英. 草鱼肠道中小肽与血液循环中肽的关系. *水产学报*, 2004, (5): 505-509
- [10] 冯键, 刘栋辉. 草鱼日粮中小肽对幼龄草鱼生长性能的影响. *水生生物学报*, 29 (1): 20-25
- [11] 易军, 岳秀英, 冯健. 鲤鱼肠道中小肽与血液中肽的关系研究. *四川畜牧兽医*, 2005, 5: 3030-31
- [12] 刘栋辉, 冯键, 田丽霞, 刘永坚, 黄仲立. 太平洋鲑鱼肠道中小肽与血液循环中肽关系的研究. *中山大学学报(自然科学版)*, 2004, 43: 69-72
- [13] Cahu, C.L., Ma H., Zambonino Infante, J.L., Mai K.. Digestive capacity in marine fish larvae and formulation of adapted microdiets. In: 2003' Forum on Fishery Science and Technology. Guangzhou, Chian, Sept.22-25.p41
- [14] Zambonino Infante, J. L., Cahu, C. L., Armande Peres. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus Labrax* larval development. *J. Nutr.*, 1997, 127:608-614
- [15] Cahu, C.L., Zambonino infante, J.L., Quazuguel, P., M.M.Lē Gallet al. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 1999, 171: 109-119
- [16] Berge, G.D., Storebakken, T., Fish protein hydrolysate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture*, 1996, 145: 205-212
- [17] Carvalho, A.P., Escaffre, A.M., Oliva Teles, A. et al.. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquacult. Int.*, 1997, 5: 361-367
- [18] Carvalho, A.P., R.Sa, A.Oliva-Teles, P.Bergot. Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages. *Aquaculture*, 2004, 234: 319-333
- [19] Klokovski, S., Tandler, A.. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream larvae. *Aquac.Nutr.*, 2000, 6: 11-15
- [20] López-Alvarado, J., Kanazawa, A., Optimum levels of crystalline amino acids in diets for red sea bream (*Pagrus major*). *ICES Mar. Sci. Symp.*, 1995, 201: 100-105