

# 菜粕替代鱼粉对翘嘴鳊肠道吸收 和氨基酸代谢的影响

王杰 梁旭方 李姣 何珊 窦亚琪

华中农业大学水产学院/华中农业大学鳊鱼研究中心/

淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心/农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 为研究翘嘴鳊对基础饲料中植物蛋白的吸收和利用,选取初始体质量为 $(13.83 \pm 0.93)$  g的翘嘴鳊81尾,共设计9组等氮等能的流体饲料:FM为全鱼粉对照组;R12为菜粕替代水平12.5%;R37为菜粕替代水平37.5%;R12+L、R12+M分别为低菜粕组补加赖氨酸、蛋氨酸;R37+L、R37+M分别为高菜粕组补加赖氨酸、蛋氨酸;R37+LM、R12+LM分别为高低菜粕组同时补加赖氨酸和蛋氨酸,进行为期1周的灌胃试验。试验结果发现,高菜粕替代会对翘嘴鳊肠道粘膜结构造成破坏,同时降低肠道 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力,影响肠道吸收和转运。但是补充赖氨酸可以有效缓解肠道损伤,改善肠道吸收;补加赖氨酸还可以降低肌肉中腺苷单磷酸脱氨酶 $ampd1$ 基因表达,减少肌肉中游离氨基酸分解代谢,促进氨基酸保留,用于蛋白质合成。低菜粕替代不会对肠道粘膜结构和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力造成影响,补加赖氨酸可以加速肠道转运效率,同时补加赖氨酸和蛋氨酸还可以减少肝脏中谷氨酸脱氨酶 $gdh$ 基因表达,进一步减少肝脏中游离氨基酸脱氨分解作用,极大促进蛋白质合成,有利于鱼体生长。本试验结果证实了翘嘴鳊对于12.5%的菜粕水平替代是可以接受的,并且补加赖氨酸可进一步加速肠道转运效率和减缓游离氨基酸脱氨分解。

**关键词** 翘嘴鳊; 菜粕; 肠道结构; 赖氨酸; 蛋氨酸; 脱氨分解

**中图分类号** S 963.31<sup>+</sup>4 : Q 959.483 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)04-0093-09

翘嘴鳊(*Siniperca chuatsi*)隶属鲈形目(Perciformes)、真鲈科(Percichthyidae)、鳊属(*Siniperca*),其生长速度快、肉质细腻鲜美、营养丰富,是久负盛名的淡水名贵鱼类。翘嘴鳊作为一种底栖肉食性鱼类,终生以活饵为食,驯化后可接受人工饲料<sup>[1]</sup>。由于其食性特殊,对饲料中蛋白需求量较高,在5%日投喂率的条件下,翘嘴鳊饲料中适宜蛋白质含量为47%~53%<sup>[2]</sup>,为满足其正常生长和饲料适口性,饲料中多以鱼粉作为主要蛋白源。但由于鱼粉资源日益匮乏,价格长期居高不下,且大量使用导致水体总氮总磷排放过多,造成水体的富营养化<sup>[3]</sup>,因此,开发新型植物蛋白源替代鱼粉是解决翘嘴鳊人工饲料改良和大规模可控养殖的关键。

菜粕作为一种优质的植物性蛋白源,其蛋白质含量高,价格低廉,资源丰富,加工方便,广泛应用于

水产配合饲料。但同时由于菜粕适口性差、赖氨酸和蛋氨酸等必需氨基酸缺乏以及含有硫甙、植酸和芥子碱等抗营养因子<sup>[4]</sup>导致在实际养殖过程中菜粕替代的比例受限。研究表明,用5%~15%的菜粕替代饲料饲喂虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)不会影响其生长性能<sup>[5]</sup>;莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)饲料中菜粕替代水平达到15%及以上会导致鱼体生长和饲料效率的下降<sup>[6]</sup>;在苏氏圆腹鲑(*Pangasius sutchi*)饲料中,菜粕替代水平不宜超过20%<sup>[7]</sup>;而用30%的菜粕替代鱼粉饲喂泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)稚鱼可以明显降低鱼体的摄食量和增重率<sup>[8]</sup>。

赖氨酸作为菜粕蛋白中第一限制性氨基酸,同时也是鱼类必需氨基酸,赖氨酸的缺乏会直接引起饲料中氨基酸的不平衡,从而导致饲料利用效率下降,甚至会影响水产动物的健康。在虹鳟上的研究

收稿日期: 2018-01-18

基金项目: 国家重点基础研究项目(973计划)(2014CB138601); 国家自然科学基金面上项目(31772822)

王杰, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类营养与生理. E-mail: 1163274877@qq.com

通信作者: 梁旭方, 博士, 教授. 研究方向: 鱼类营养和摄食调控及饲料利用遗传改良. E-mail: xufang\_liang@hotmail.com

表明,向植物蛋白替代鱼粉饲料中额外补充 0.4% 及以上水平的赖氨酸可以显著提高虹鳟生长性能并减少氨氮排泄<sup>[9]</sup>。而在配合饲料中添加赖氨酸可促进异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)的生长,提高饲料利用率,增加鱼体蛋白质沉积率<sup>[10]</sup>。同时也有研究表明,饲料中赖氨酸的添加可以有效改善幼建鲤(*Cyprinus carpio* var. *Jian*)的肠道吸收<sup>[11]</sup>;提高草鱼肠道酶活力<sup>[12]</sup>。除此之外,还有研究表明配合饲料中补充赖氨酸能增强水产动物抗病及抗应激能力<sup>[13]</sup>。

蛋氨酸属于含硫氨基酸,参与体内甲基转移、磷的代谢以及肾上腺素、胆碱和肌酸的合成,是豆粕蛋白中典型的限制性氨基酸,大部分鱼类蛋氨酸的需要量为蛋白质的 2%~3%<sup>[14]</sup>。研究表明蛋氨酸的缺乏会导致水生动物生产性能下降,食欲减退<sup>[15]</sup>,饲料转化效率和鱼体蛋白沉积率低下<sup>[16]</sup>。在虹鳟饲料中补充赖氨酸、蛋氨酸显著提高了虹鳟的生长水平<sup>[17]</sup>。

目前,有关翘嘴鲌饲料中植物蛋白替代及补充赖氨酸、蛋氨酸的研究鲜有报道,本试验一方面通过研究菜粕替代比例对翘嘴鲌肠道吸收转运以及氨基酸分解代谢的影响,以阐释翘嘴鲌对植物蛋白利用情况;另一方面研究向植物蛋白替代鱼粉饲料中额

外补充限制性氨基酸对翘嘴鲌肠道吸收转运以及氨基酸分解代谢的影响,以探索限制性氨基酸在植物蛋白饲料利用中的平衡优化作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验饲料配制

试验所选用的鱼粉、菜粕等所有饲料原料购自武汉高龙饲料有限公司,*L*-赖氨酸和 *L*-蛋氨酸,均为晶体氨基酸,购自美国 Sigma 公司,纯度高达 99%。采用菜粕分别替代 12.5% 和 37.5% 的鱼粉,全鱼粉组(鱼粉粗蛋白质为 50%)为对照组,在不同替代水平上补加晶体赖氨酸和蛋氨酸,一共配置成 9 种等氮等能的基础饲料。饲料分别是全鱼粉对照组(FM)、低菜粕替代组(R12)、低菜粕补加赖氨酸组(R12+L)、低菜粕补加蛋氨酸组(R12+M)、低菜粕同时补加赖氨酸和蛋氨酸组(R12+LM)、高菜粕替代组(R37)、高菜粕补加赖氨酸组(R37+L)、高菜粕补加蛋氨酸组(R37+M)、高菜粕同时补加赖氨酸和蛋氨酸组(R37+LM)。各组原料经粉碎后过孔径为 0.178 mm 筛,按照配方设计精确称质量,采用逐级扩大方法来将原料混合均匀,加 50% 的纯水配制成流体饲料,用塑料软管灌胃,至翘嘴鲌胃中<sup>[17]</sup>。试验饲料配方及营养水平见表 1。

表 1 试验饲料配方及营养成分(干物质)

Table 1 Ingredients and chemical composition of experimental diets (dry matter)

试验饲料 Experimental diets	FM	R12	R12+L	R12+M	R12+LM	R37	R37+L	R37+M	R37+LM
原料/(g/kg) Ingredients									
鱼粉 Fish meal	800	725	725	725	725	575	575	575	575
菜粕 Rapeseed meal	0	100	100	100	100	300	300	300	300
纤维素 Cellulose	180	155	153	155	153	105	98	104	97
羧甲基纤维素钠 Sodium carboxymethylcellulose	20	20	20	20	20	20	20	20	20
<i>L</i> -赖氨酸 <i>L</i> -Lysine	0	0	2.24	0	2.24	0	6.72	0	6.72
<i>L</i> -蛋氨酸 <i>L</i> -Methionine	0	0	0	0.60	0.60	0	0	1.80	1.80
合计 Total	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
常规组成(干物质)/% Proximate composition									
粗蛋白 Crude protein	50.48	50.71	51.08	51.19	51.26	50.32	50.09	50.55	50.90
粗脂肪 Crude lipid	9.34	8.76	7.84	7.99	7.69	8.10	7.92	7.21	8.18
粗灰分 Crude ash	18.16	17.00	19.21	17.45	19.64	17.01	17.58	15.95	16.26
赖氨酸水平 Lysine level	4.18	3.92	4.14	3.90	4.14	3.39	4.06	3.39	4.06
蛋氨酸水平 Methionine level	1.37	1.30	1.31	1.36	1.36	1.17	1.18	1.35	1.36

## 1.2 试验鳊暂养及其驯化

约 200 尾试验用鱼购自武汉市江夏区四汇水产科技有限公司。试验鱼为纯种翘嘴鳊, 体质优良, 健康无病。试验鱼运回之后先暂养于 55 cm × 60 cm × 60 cm 的透明玻璃水族箱中, 每个玻璃缸配备循环水系统及气泵曝气, 确保每天水质正常交换 1/3。前期通过投喂死饵及冰鲜鱼过渡驯化至翘嘴鳊可接受流体饲料。然后从中挑选出 81 尾大小一致 (13.83 ± 0.93 g)、驯化效果优异的翘嘴鳊随机分为 9 个试验组, 每个组 3 个重复, 每个重复放养 3 尾翘嘴鳊, 试验持续 1 周。采用室内养殖模式, 一共使用 27 个 20 cm × 20 cm × 30 cm 白色养殖缸, 每个养殖缸配备气泵曝气, 溶氧 > 6.0 mg/L, pH 为 7.1 ~ 7.6, 水温控制在 25 ± 2 °C。

## 1.3 试验设计与灌胃

本试验主要为了探究基础饲料中不同水平菜粕替代对翘嘴鳊肠道粘膜结构和吸收转运以及氨基酸分解代谢的影响, 同时考虑到翘嘴鳊食性奇特, 在经过驯化后虽然可以接受人工饲料, 但接受程度不一, 而且基础饲料在水中溶解速率较快, 影响试验结果, 所以采取灌胃对其定量定时喂食, 确保所有试验鱼精确接受同等水平饲料。同时考虑到翘嘴鳊对灌胃耐受能力和肠道病理变化最短周期, 所以正式试验周期为 1 周<sup>[18]</sup>。试验期间每天定时 (08:30) 对翘嘴鳊灌胃混合均匀的流体饲料 2 mL (5% 日投喂量), 采用内径 4 mm、长 40 mm 塑料软管搭配 5 mL 注射器制作灌胃注射装置, 灌胃前, 取下软管, 吸取 2 mL 流体饲料, 再安装上塑料软管, 将翘嘴鳊上下颌掰开, 伸入咽部, 缓慢推注射器内饲料至翘嘴鳊胃中。

## 1.4 样本采集及分析

饲料中水分测定采用 105 °C 恒温烘干法 (GB/T 6435-1986); 粗蛋白测定采用凯氏定氮法 (GB/T 6432-1994); 粗脂肪测定采用索氏抽提法 (GB/T 6433-1994); 粗灰分采用马弗炉灼烧法 (GB/T 6438-1994); 氨基酸水平用氨基酸分析仪测定 (GB/T 18246-2000)。

灌胃试验结束后, 试验鱼禁食 24 h。用质量浓度为 50 mg/L 的鱼类安定 MS-222 进行麻醉, 称质量。称质量结束后, 所有翘嘴鳊解剖取出内脏和肠道, 取前肠 1 cm, 用 PBS 洗净内容物, 保存至 4 °C 冰箱, 甲醛中固定, 快速脱水透明, 石蜡包埋, ERMA 切片机切至 5 μm 厚, 苏木素-伊红 (H-E) 染色做肠

道切片; 部分肠道研磨制成粗酶液, 用于肠道 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活力的检测, 测定方法参照试剂盒说明书 (试剂盒购于南京建成生物工程研究所)。肠道组织 ATPase 活力定义为每小时每毫克组织蛋白中 ATP 酶水解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为 1 个 ATP 酶活力单位, U。另取翘嘴鳊鱼肝脏和肌肉组织样品液氮冻存后保存至 -80 °C 冰箱用于 RNA 的提取。RNA 的提取采用 TaKaRa 公司的 TRIzol Reagent 试剂裂解组织, 提取总 RNA 后, 琼脂糖电泳 (220 V, 10 min) 确定 RNA 提取的质量。用 synergy 2 多功能酶标仪测定其提取的 RNA 浓度, 根据所测得 RNA 浓度, 用 Prime Script<sup>TM</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa) 逆转录试剂盒提取 cDNA 用于 RT-PCR 的检测。后采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 扩增反应。荧光定量 PCR 反应液组成: 10 μL SYBR premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2 ×), 0.4 μL PCR 正向引物 (10 μmol/L)、0.4 μL PCR 反向引物 (10 μmol/L)、1 μL 模板、8.2 μL ddH<sub>2</sub>O。反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 10 s; 57 °C 30 s; 40 个循环; 72 °C 3 min; 融解曲线的反应条件为 65 ~ 95 °C, 每升高 0.5 °C 保持 5 s 读板, 记录荧光值。本试验所检测基因定量引物信息见表 2。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物信息

Table 2 Primers information for RT-PCR

引物 Primers	序列 (5'-3') Sequences (5'-3')	退火温度/°C Temperature
rpl13a-F	TATCCCCACCCCTATGACA	60
rpl13a-R	ACGCCAAGGAGAGCGAACT	
gdh-F	GACGACGACCCCAACTTCT	57
gdh-R	GACCCGCTTCTCTTCTGC	
ampd1-F	CATTTTCCTTCCCGTGTT	58
ampd1-R	TCTGTCTGCGAGTTGGT	

## 1.5 数据处理及统计分析

所有试验数据采用“平均值 ± 标准误”表示, 使用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 差异显著后进行 Duncan's 多重比较, 以  $P < 0.05$  为差异显著性标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 菜粕替代对翘嘴鳊肠道粘膜结构的影响

各组处理后的翘嘴鳊肠道组织切片 (10 ×) 见图 1。不同水平菜粕替代后对肠道组织形态学产生不一样的影响。R12 相较于 FM 组, 肠道绒毛高度、绒毛密度、绒毛宽度、肠壁厚度、杯状细胞数都没有显

著性变化( $P>0.05$ );R12+L 组相较于 R12 组,肠道绒毛宽度和绒毛密度都显著增加( $P<0.05$ ),R12+M 和 R12+LM 相较于 R12 组,其肠道组织形态学没有显著性差异( $P>0.05$ )(表 3)。但 R37 组相较于 FM 组,肠道绒毛大量脱落,绒毛高度、绒毛宽度、绒毛密度都显著下降( $P<0.05$ ),同时肠壁

厚度和杯状细胞数目显著增加( $P<0.05$ );而 R37+L 和 R37+LM 组相较于 R37 组,其肠道绒毛高度、绒毛宽度、绒毛密度显著增加,杯状细胞数和肠壁厚度减少( $P<0.05$ );R37+M 组相较于 R37 组,其肠道组织形态学没有显著性变化( $P>0.05$ )(表 4)。

表 3 12.5% 菜粕替代对翘嘴鳊肠道结构的影响

Table 3 Effect of 12.5% rapeseed meal substitution on intestinal structure of Chinese perch

项目 Items	FM	R12	R12+L	R12+M	R12+LM
绒毛高度/ $\mu\text{m}$ Villous height	576.59±14.51	580.66±17.21	572.35±12.09	583.24±16.29	565.98±16.81
绒毛宽度/ $\mu\text{m}$ Villous width	309.25±11.52a	277.49±10.70a	342.71±7.04b	284.42±12.25a	284.03±10.01a
绒毛密度 Villous density	22.67±1.23ab	20.00±1.21a	25.50±0.92b	19.67±0.99a	22.17±1.54a
肠壁厚度/ $\mu\text{m}$ Intestinal wall thickness	128.85±6.57	129.39±7.62	124.69±8.04	112.02±8.09	118.48±7.18
杯状细胞数 Goblet cells	52.17±2.20	54.83±3.23	54.50±5.25	50.17±2.32	56.33±5.79

注:不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下表同。Note: Different lowercase letters mean significant difference ( $P<0.05$ ). The same as follow.

表 4 37.5% 菜粕替代对翘嘴鳊肠道结构的影响

Table 4 Effect of 37.5% rapeseed meal substitution on intestinal structure of Chinese perch

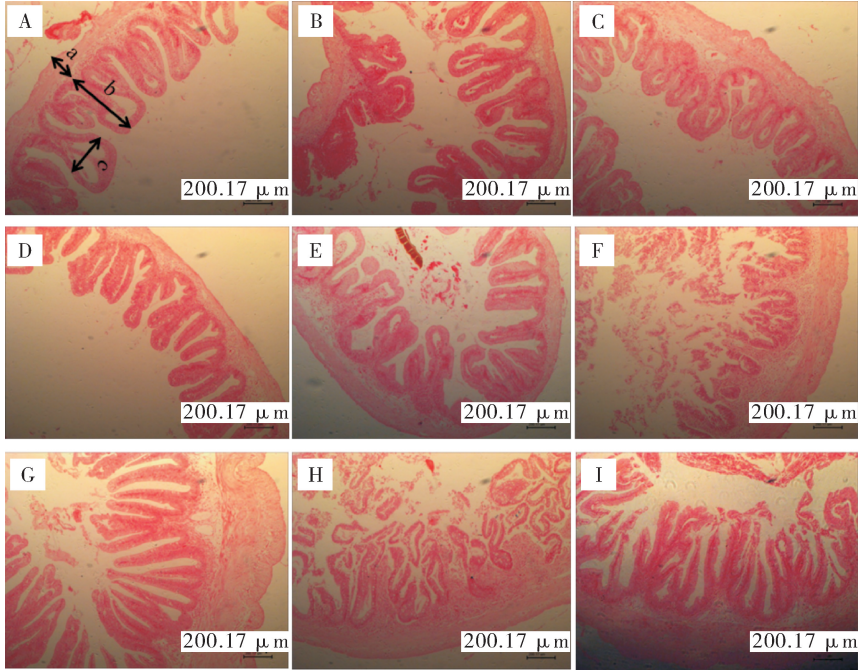
项目 Items	FM	R37	R37+L	R37+M	R37+LM
绒毛高度/ $\mu\text{m}$ Villous height	576.59±14.51c	376.62±16.52a	508.16±19.07b	426.31±16.03a	556.36±32.40bc
绒毛宽度/ $\mu\text{m}$ Villous width	309.25±11.52c	199.07±10.85a	262.32±13.92b	217.45±7.86a	253.62±10.80b
绒毛密度 Villous density	22.67±1.23c	11.50±1.26a	16.00±0.86b	14.17±1.40ab	15.50±0.76b
肠壁厚度/ $\mu\text{m}$ Intestinal wall thickness	128.85±6.57a	370.38±16.37d	297.49±14.60b	340.57±10.00cd	319.87±7.26bc
杯状细胞数 Goblet cells	52.16±2.20a	93.00±7.31c	66.67±3.63ab	81.50±5.77bc	73.17±4.98b

## 2.2 菜粕替代对肠道 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力的影响

R12 组相较于 FM 组,其肠道  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活力没有显著性差异( $P>0.05$ );而 R12+L 组相较于 R12 组,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活力显著升高( $P<0.05$ );R12+M 组和 R12+LM 组相较于 R12 组,酶活力都没有变化( $P>0.05$ )(图 2A)。R37 组相较于 FM 组,肠道  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活力显著降低( $P<0.05$ );R37+L 组相较于 R37 组,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活力显著提高( $P<0.05$ );R37+M 组和 R37+LM 组相较于 R12 组,酶活力没有变化( $P>0.05$ )(图 2B)。

## 2.3 低菜粕替代对翘嘴鳊谷氨酰胺脱氢酶基因(*gdh*)和腺苷单磷酸脱氢酶基因(*ampd1*)的影响

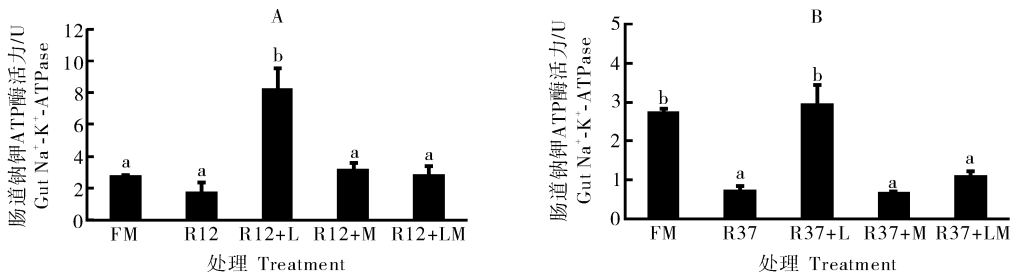
如图 3 所示,分别检测了低菜粕水平翘嘴鳊肝脏中 *gdh* 和肌肉中 *ampd1* 基因的表达。R12 组与 FM 组相比 *gdh* 基因表达没有显著性差异( $P>0.05$ );R12+L 和 R12+M 组与 R12 组相比也都没有显著性差异( $P>0.05$ );然而 R12+LM 与 R12 组相比 *gdh* 基因表达显著下调( $P<0.05$ )(图 3A)。而 *ampd1* 基因在各组间都没有显著性差异( $P>0.05$ )(图 3B)。



A;FM 组; B;R12 组; C;R12+L 组; D;R12+M 组; E;R12+LM 组; F;R37 组; G;R37+L 组; H;R37+M 组; I;R37+LM 组。A:FM group; B:R12 group; C:R12+L group; D:R12+M group; E:R12+LM group; F:R37 group; G:R37+L group; H:R37+M group; I:R37+LM group. a:肠壁厚度; b:绒毛高度; c:绒毛宽度。a: Intestinal wall thickness; b: Villous height; c: Villous width.

图 1 翘嘴鳊肠道组织切片

Fig.1 Tissue slice of intestine of Chinese perch



A:12.5%菜粕替代水平  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶活力; B:37.5%菜粕替代水平  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶活力。柱上标不同小写字母表示有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。A:Enzyme activities of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  of 12.5% rapeseed meal substitute level; B:Enzyme activities of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  of 37.5% rapeseed meal substitute level.Data with different lowercase letters above the bars indicated significant difference ( $P < 0.05$ ).

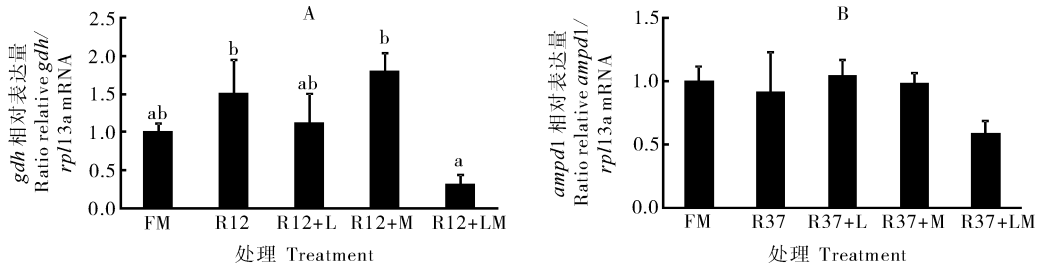
图 2 翘嘴鳊肠道  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶活力

Fig.2 Enzyme activities of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  of intestine in Chinese perch

### 2.4 高菜粕替代对翘嘴鳊谷氨酸脱氢酶基因(*gdh*)和腺苷单磷酸脱氢酶基因(*ampd1*)的影响

图 4A、B 分别显示了高菜粕水平翘嘴鳊肝脏中 *gdh* 和肌肉中 *ampd1* 基因的表达情况。肝脏中 *gdh* 基因的表达在各处理组都没有显著性变化

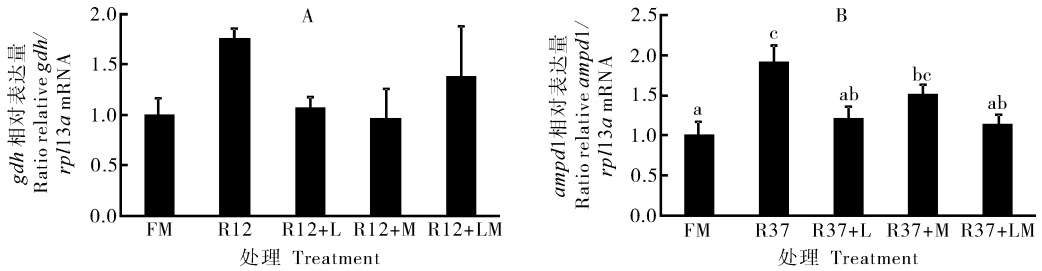
( $P > 0.05$ ) (图 4A)。R37 组相较于 FM 组, *ampd1* 基因表达显著上调 ( $P < 0.05$ ); R37+L 和 R37+LM 组相较于 R37 组显著下调 ( $P < 0.05$ ); 而 R37+M 组相较于 R37 组没有显著变化 ( $P > 0.05$ ) (图 4B)。



A: 肝脏中 *gdh* 基因表达; B: 肌肉中 *ampd1* 基因表达。柱上标不同小写字母表示有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。  
A: *gdh* gene expression in liver; B: *ampd1* gene expression in muscle. Data with different lowercase letters above the bars indicated significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 3 翘嘴鲈 12.5% 菜粕替代水平脱氨基因表达

Fig.3 Gene expression of deamination of 12.5% rapeseed meal substitute level in Chinese perch



A: 肝脏中 *gdh* 基因表达; B: 肌肉中 *ampd1* 基因表达。柱子上标不同小写字母表示有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。  
A: *gdh* gene expression in liver; B: *ampd1* gene expression in muscle. Data with different lowercase letters above the bars indicated significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 4 翘嘴鲈 37.5% 菜粕替代水平脱氨基因表达

Fig.4 Gene expression of deamination of 37.5% rapeseed meal substitute level in Chinese perch

### 3 讨论

本试验结果显示低菜粕替代和高菜粕替代对翘嘴鲈肠道组织形态学和  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活力造成了不同的影响。肠道是鱼类消化吸收营养物质的重要场所,而肠绒毛作为小肠的重要组成部分,其绒毛高度、绒毛宽度、绒毛密度直接影响小肠的吸收面积,进而影响机体吸收营养物质的能力<sup>[19]</sup>。肠壁厚度增加会影响营养物质吸收和转运效率,饲料利用率下降,除此之外肠壁增厚一定程度上是由于肠道粘膜受损后组织细胞增生导致<sup>[20]</sup>,肠道杯状细胞在肠道炎症和粘膜受损后会大量增生<sup>[21]</sup>。而  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  主要存在于肠道吸收细胞的基底膜,通过分解 ATP 产生能量,以维持钠和钾的逆浓度梯度,在氨基酸转运中发挥重要作用,其活性可间接反映小肠粘膜的吸收能力和氨基酸转运效率<sup>[22-23]</sup>。试验结果表明,当菜粕替代鱼粉水平为 12.5% 时, R12 组

和 FM 组相比,其肠道绒毛高度、绒毛宽度、绒毛密度、肠壁厚度、杯状细胞数以及  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活力都没有显著性差异,表明低菜粕水平替代不会影响肠道对氨基酸等营养物质的吸收转运,这和大黄鱼上菜粕替代鱼粉的研究结果一致<sup>[24]</sup>。但当菜粕替代鱼粉水平达到 37.5% 的时候, R37 组相较于 FM 组,其肠道绒毛高度、绒毛宽度、绒毛密度及  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活力显著性下降,肠壁厚度和杯状细胞数增加,这一结果也和大黄鱼上的研究结果吻合<sup>[24-25]</sup>。本试验饲料中当菜粕替代水平高达 37.5% 的时候,翘嘴鲈肠道绒毛受到破坏,绒毛断裂破损,且大量脱落,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活力下降,导致肠道对氨基酸等营养物质吸收转运效率降低,与此同时肠壁厚度增加,杯状细胞数目急剧上升都说明高菜粕替代对肠道产生强烈应激,并且伴有炎症反应。表明高菜粕替代鱼粉抑制鱼体肠道吸收,影响鱼体生长发育,这也和莫桑比克罗非鱼<sup>[6]</sup>、草鱼<sup>[26]</sup> 以及

大马哈鱼<sup>[27]</sup>上的研究结果一致。

在菜粕替代组中补加限制性氨基酸一定程度上可以改善肠道吸收,缓解肠道损伤。R12+L组相较于R12组,其肠道绒毛高度、肠壁厚度和杯状细胞数没有显著性变化,但绒毛宽度、绒毛密度和 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活力显著升高。这说明低菜粕中添加赖氨酸可以有效提高肠道绒毛吸收面积和酶活力,进而提高肠道对氨基酸等营养物质的吸收转运效率,这一结果也和幼建鲤<sup>[11]</sup>、草鱼<sup>[12]</sup>上的结论一致。而R37+L和R37+LM组相较于R37组,其肠道绒毛高度、绒毛宽度和绒毛密度显著增加,肠壁厚度和杯状细胞数减少, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活力上升。这说明高菜粕组添加赖氨酸能显著改善肠绒毛结构和酶活力,减少肠道应激和炎症反应<sup>[8]</sup>,缓解了高菜粕替代对于肠道粘膜结构的损伤。

谷氨酸脱氢酶(GDH)和腺苷单磷酸脱氢酶(AMPD1)作为氨基酸联合脱氨基反应中最重要的2个关键限速酶,其基因的变化反映了氨基酸的分解代谢作用,而且其具有组织表达特异性<sup>[28]</sup>。GDH主要存在于肝脏中,其主要功能是将 $\alpha$ -酮戊二酸上的氨基脱去生成 $\alpha$ -酮戊二酸进入三羧酸循环用于氧化供能;AMPD1主要存在于骨骼肌中,其主要功能是通过嘌呤核苷酸循环将AMP脱氨生成IMP<sup>[29]</sup>。当机体摄入的氨基酸不平衡时,机体内分解代谢大于合成代谢,体内氨基酸被用做能量消耗;氨基酸平衡时,体内合成代谢大于分解代谢,体内氨基酸或蛋白质被储存下来<sup>[29-30]</sup>。试验结果显示R12组与FM组比较,肝脏中 $gdh$ 和肌肉中 $ampd1$ 基因都没有显著性变化,这说明低菜粕替代后不会影响翘嘴鳊的氨基酸分解代谢作用。这可能是因为低菜粕替代首先不会影响肠道形态学变化和 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶的活力,进而也就不会影响到肠道对氨基酸的转运效率,从而导致翘嘴鳊摄入的氨基酸依旧处于一个平衡状态,肝脏和肌肉中游离氨基酸也不会被大量用于分解代谢。而在虹鳟<sup>[5]</sup>、莫桑比克罗非鱼<sup>[6]</sup>、大马哈鱼<sup>[27]</sup>上的研究结果也表明低菜粕替代不影响鱼体对饲料蛋白质的吸收和利用。R37组和FM组相比较, $gdh$ 基因的表达不受影响,但 $ampd1$ 基因显著上调,这说明R37组肌肉中的游离氨基酸大量分解代谢,这可能是因为高菜粕替代后,相较于全鱼粉对照组(FM),首先必需氨基酸(赖氨

酸、蛋氨酸)的缺乏导致摄入氨基酸的比例不平衡;其次高菜粕水平替代造成了肠道绒毛结构的破坏,降低了 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶的活力导致氨基酸在肠道中吸收转运的效率降低,从而导致摄入的氨基酸比例失衡,进而导致肌肉中的氨基酸大量脱氨分解,蛋白质分解加快,合成减少<sup>[30]</sup>。这也和草鱼饲料中高菜粕替代后造成鱼体肌肉中粗蛋白含量减少,鱼体蛋白沉积率下降的结果吻合<sup>[26]</sup>。

鱼类相比于哺乳动物,其对饲料中碳水化合物的利用程度低,对蛋白质的需求远远大于陆生动物。而实际上鱼类对蛋白质的需求就是对饲料中必需氨基酸和非必需氨基酸混合比例的数量需要。因此,氨基酸的平衡是关键。本试验中,R12+LM组相较于R12组 $gdh$ 基因的表达显著下调,这说明低菜粕组同时补加赖氨酸、蛋氨酸后减少了肝脏内游离氨基酸的脱氨分解作用,这可能是因为低菜粕替代首先不会对翘嘴鳊肠道氨基酸转运效率造成影响,肠道依旧处于一个对氨基酸正常吸收转运的状态,其次额外补充了适量的赖氨酸、蛋氨酸后机体摄入必需氨基酸比例增加,更多游离氨基酸被合理利用起来,蛋白的合成作用大于分解作用<sup>[30]</sup>。同时发现R37+L和R37+LM组相较于R37组 $ampd1$ 基因表达量也显著下调,这可能是因为高菜粕组赖氨酸、蛋氨酸的补加一定程度上提高了R37组缺乏的必需氨基酸比例,同时赖氨酸对肠道的吸收转运也有一定的改善作用,导致吸收转运的必需氨基酸的比例相较于R37组趋于平衡,从而达到减缓肌肉中氨基酸的脱氨分解作用,促进了蛋白质的合成,这也和目前部分研究表明饲料中补加赖氨酸、蛋氨酸可有效提高花鲈和团头鲂肌肉中蛋白沉积率<sup>[31-32]</sup>的结果一致。

## 参 考 文 献

- [1] 梁旭方. 鳊鱼驯食人工饲料原理与技术[J]. 淡水渔业, 1994, 24(6): 36-37.
- [2] 梁旭方. 鳊鱼人工饲料的研究[J]. 水产科技情报, 2002, 29(2): 64-67.
- [3] HECKY R E, KILHAM P. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment[J]. *Limnology & oceanography*, 1988, 33(4): 796-822.
- [4] SOSULSKI F. Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products: a review[J]. *Journal of*

- the American oil chemists' society, 1979, 56(8): 711-715.
- [5] GOMES E F, CORRAZE G, KAUSHIK S. Effects of dietary incorporation of a co-extruded plant protein (rapeseed and peas) on growth, nutrient utilization and muscle fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 1993, 113(4): 339-353.
- [6] DAVIES S J, MCCONNELL S, BATESON R I. Potential of rapeseed meal as an alternative protein source in complete diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus*) [J]. Aquaculture, 1990, 87(2): 145-154.
- [7] 刘修英, 王岩, 王建华. 利用豆粕、菜粕和棉粕替代饲料中鱼粉对苏氏圆腹鲑摄食、生长和饲料利用的影响 [J]. 水产学报, 2009, 33(3): 479-487.
- [8] 燕杰, 文永辉, 王卫民, 等. 饲料不同蛋白源对泥鳅稚鱼生长性能、体氨基酸组成和抗氧化性能的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(3): 101-107.
- [9] CHENG Z J, HARDY R W, USRY J L. Plant protein ingredients with lysine supplementation reduce dietary protein level in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets, and reduce ammonia nitrogen and soluble phosphorus excretion [J]. Aquaculture, 2003, 218: 553-565.
- [10] 周贤君, 解绶启, 谢从新, 等. 异育银鲫幼鱼对饲料中赖氨酸的利用及需要量研究 [J]. 水生生物学报, 2006, 30(3): 247-255.
- [11] 赵春蓉. 赖氨酸对幼建鲤消化能力和免疫功能的影响 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2005.
- [12] 李雪吟, 李树红, 旷声耀, 等. 赖氨酸对生长后期草鱼生长、肠道酶活力和抗氧化状态的影响 [C]. 厦门: 世界华人鱼虾营养学术研讨会, 2013.
- [13] 周贤君. 异育银鲫对晶体赖氨酸和蛋氨酸的利用及需求量研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [14] 张玲, 张卫东, 张小玲, 等. 外源性蛋氨酸对鲤鱼离体消化率及酶解速度的影响 [J]. 水生生物学报, 2012, 36(6): 1200-1204.
- [15] AHMED I, KHAN M A, JAFRI A K. Dietary methionine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) [J]. Aquaculture international, 2003, 11(5): 449-462.
- [16] ZHOU Q C, WU Z H, TAN B P, et al. Optimal dietary methionine requirement for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. Aquaculture, 2006, 258(1): 551-557.
- [17] 吴遵霖, 李蓓. 填喂配合饲料对鳊鱼营养的初步研究 [J]. 水产学报, 1989, 13(4): 360-364.
- [18] BAEVERFJORD G, KROGDAHL A. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish [J]. Journal of fish diseases, 2010, 19(5): 375-387.
- [19] CASPARY W F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption [J]. American journal of clinical nutrition, 1992, 55: 299S.
- [20] 柯祥军, 瞿明仁, 易中华, 等. 不同水平发酵豆粕对肉鸡肠黏膜结构的影响 [J]. 饲料博览, 2007(14): 25-28.
- [21] 董文道, 曹海龙, 王邦茂. 杯状细胞在肠道疾病发病中作用的研究进展 [J]. 国际消化病杂志, 2015(4): 244-246.
- [22] ALMANSA E, SANCHEZ J, COZZI S, et al. Segmental heterogeneity in the biochemical properties of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase along the intestine of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. Journal of comparative physiology B biochemical systemic & environmental physiology, 2001, 171(7): 557-567.
- [23] VEILLETTE P A, YOUNG G. Temporal changes in intestinal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity and in vitro responsiveness to cortisol in juvenile chinook salmon [J]. Comparative biochemistry & physiology A molecular & integrative physiology, 2004, 138(3): 297-303.
- [24] 苗新. 大黄鱼对豆粕和双低菜粕的耐受性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [25] 孟玉琼, 苗新, 孙瑞健, 等. 双低菜粕高水平替代饲料鱼粉对大黄鱼潜在风险的评估: 生长、健康和营养价值 [J]. 水生生物学报, 2017, 41(1): 127-138.
- [26] 马利, 黄峰, 吴建开, 等. 不同菜粕水平对草鱼生长、血清生化指标和毒素残留的影响 [J]. 水产学报, 2005, 29(6): 798-803.
- [27] HIGGS D A, MCBRIDE J R, MARKERT J R, et al. Evaluation of Tower and Candle rapeseed (canola) meal and Bronowski rapeseed protein concentrate as protein supplements in practical dry diets for juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. Aquaculture, 1982, 29(1/2): 1-31.
- [28] COFFEE C J. AMP deaminase from rat skeletal muscle [J]. Methods in enzymology, 1978, 51: 490-497.
- [29] ZHOU F, XIAO J X, HUA Y, et al. Dietary L-methionine requirement of juvenile black sea bream (*Sparus macrocephalus*) at a constant dietary cystine level [J]. Aquaculture nutrition, 2011, 17(5): 469-481.
- [30] HELENA P, AIRES O T. Lysine requirement and efficiency of lysine utilization in turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles [J]. Aquaculture, 2008, 275: 283-290.
- [31] 胡亮. 可消化必需氨基酸平衡模式下不同蛋白源替代鱼粉对花鲈生长性能、生理功能及肉品质的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [32] 廖英杰, 刘波, 任鸣春, 等. 赖氨酸对团头鲂幼鱼生长、血清生化及游离必需氨基酸的影响 [J]. 水产学报, 2013, 37(11): 1716-1724.



## Effect of substituting fish meal with rapeseed meal on intestinal absorption and amino acids metabolism in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)

WANG Jie LIANG Xufang LI Jiao HE Shan DOU Yaqi

*College of Fisheries/Chinese Perch Research Center, Huazhong Agricultural University/  
Freshwater Aquaculture/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding,  
Ministry of Agriculture, Wuhan 430070, China*

**Abstract** The purpose of this study is to explore the absorption and utilization of plant protein in artificial diets of Chinese perch. A total of 81 experimental fish with an initial weight of  $13.83 \pm 0.93$  g were selected to carry out the gavage feeding experiment for a week. Nine fluid isonitrogenous and isoen-ergetic diets, with different dietary protein resources were designed, including fish meal as the control group (FM), 12.5% rapeseed meal substitution group (R12), 37.5% rapeseed meal substitution group (R37), R12 supplemental with *L*-lysine or *L*-methionine (R12+L or R12+M), R37 supplemental with *L*-lysine or *L*-methionine (R37+L or R37+M), and R12 or R37 co-supplemental with *L*-lysine and *L*-methionine (R12+LM or R37+LM). The results indicated that high level rapeseed meal substitution would damage the intestinal mucosa structure and decrease the intestinal enzyme activities of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ , then restrain the intestinal absorption and transportation. But lysine supplement would effectively alleviate intestinal damage and improve intestinal absorption. Besides, it could lead to down-regulation of the adenosine monophosphate deamination enzyme (AMPD1) mRNA expression and reduce the catabolism of free amino acids, which promoted amino acid retention for protein synthesis in the muscle. However, low level rapeseed meal substitution wouldn't affect intestinal mucosa structure and enzyme activities of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ . Lysine supplement could accelerate intestinal transportation efficiency, at the same time, lysine and methionine co-supplementation could reduce the glutamic acid dehydrogenase (GDH) mRNA expression in the liver, to further decelerate the deamination of free amino acids in the liver and promote protein synthesis, which was conducive to the growth of fish. In summary, this study confirmed that the rate of 12.5% rapeseed meal substitution is acceptable for Chinese perch, lysine supplement could further enhance intestinal transportation efficiency and decelerate deamination of free amino acids, which provided a theoretical basis for the feasibility of feeding Chinese perch with plant protein instead of fish meal.

**Keywords** Chinese perch; rapeseed meal; intestinal structure; lysine; methionine; deamination

(责任编辑:边书京)