

高植物蛋白饲料中不同水平低分子水解 鱼蛋白对大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.) 幼鱼生长及肝脏 IGF-I 受体表达的影响*

牟玉超^{1,2} 梁萌青^{1,3}① 郑珂珂¹ 卫育良¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 本研究利用低分子水解鱼蛋白设计了 4 组等氮等能的高植物蛋白饲料, 研究不同水平低分子水解鱼蛋白对大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.) 幼鱼[(4.16±0.01) g] 生长性能、鱼体组成及肝脏中类胰岛素生长因子 I 受体(Insulin-like growth factor receptor, IGF-IR) 表达的影响。水解鱼蛋白分别替代总蛋白的 5%(UF-5)、10%(UF-10)、20%(UF-20) 的鱼粉, 无添加 FPH 组为对照组(UF-0), 用这 4 种饲料饲喂大菱鲂幼鱼 84 d, 结果显示, UF-0、UF-5 和 UF-10 组的增重率、特定生长率无显著差异($P>0.05$), 但显著高于 UF-20 组($P<0.05$); UF-0、UF-5 组的饲料效率、蛋白质效率和蛋白质沉积率无显著差异($P>0.05$), 而显著高于 UF-10、UF-20 组($P<0.05$); UF-0、UF-5 和 UF-10 三组鱼体粗蛋白、粗脂肪含量无显著差异($P>0.05$), 但显著高于 UF-20 组($P<0.05$); UF-5 组必需氨基酸含量及必需氨基酸与非必需氨基酸比值显著高于其他 3 组($P<0.05$), 其他 3 组间无显著差异($P>0.05$); 肝脏中 IGF-IR mRNA 的表达随着水解鱼蛋白替代水平的增加而升高, 且 UF-20 组与其他 3 组差异显著($P<0.05$)。结果表明, 适当添加低水平水解鱼蛋白(UF-5) 可促进大菱鲂幼鱼的生长、提高饲料效率及促进肌肉必需氨基酸的积累; 高水平添加低分子水解鱼蛋白(UF-20) 会抑制其生长及饲料利用等; 低分子水解鱼蛋白可提高大菱鲂肝脏中 IGF-IR 基因的表达量。

关键词 水解鱼蛋白; 植物蛋白; 大菱鲂; 生长; IGF-I 受体

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0049-09

大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.) 属于鲽形目(Pleuronectiformes)、鲆科(Bothidae)、菱鲆属(*Scophthalmus*), 俗称“多宝鱼”, 为原产于大西洋东岸的冷水性经济海水鱼类(马爱军等, 2003)。自 1992 年引进我国后, 由于其适应低水温生活、生长迅速、经济价值高、易于集约化养殖等特点(Bromley, 1980), 大菱鲂的工厂化养殖已经成为北方海水养殖业的支柱产业。

鱼粉需求量上升, 价格不断上涨, 依靠鱼粉为主要饲料蛋白源已经难以满足水产养殖业的发展要求。用价格低廉的植物蛋白替代部分鱼粉是解决目前鱼粉短缺问题的一种有效措施, 但由于植物蛋白含有抗营养因子、氨基酸不平衡等, 限制了其在水产饲料中的添加量(周歧存等, 2005; Bureau *et al.*, 1998; Francis *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 1995; 陈伟等, 2009¹⁾; El-Saidy

* 国家自然科学基金项目(31172423)和农业公益性行业专项(201303053)共同资助。牟玉超, E-mail: muyuchao@163.com

① 通讯作者: 梁萌青, 研究员, E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-02-11, 收修改稿日期: 2015-03-27

1) 陈伟. 抗营养因子对牙鲆(*Paralichthys olivaceus olivaceus*) 利用大豆蛋白源的影响. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2009

et al, 2003; Kaushik et al, 1998; 庄平等, 2002)。

水解鱼蛋白(Fish protein hydrolysate, FPH)是鱼蛋白在酸、碱或酶的条件下水解获得的一种含有不同长度的多肽片段和少量游离氨基酸的蛋白制品(Liaset et al, 2008; 王新星等, 2011)。FPH 已作为一种新型的优质蛋白源用于水产饲料(王长云等, 1995; Liaset et al, 2000; Kotzamanis et al, 2007; Zheng et al, 2013)。经过超滤获得的 FPH 分子量较小, 低分子 FPH 在鱼类饲料中的效果要优于高分子 FPH(郑珂珂等, 2011; Bui et al, 2014)。Aksnes 等(2006a)研究发现, 低分子 FPH 是维持虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)在饲喂高植物蛋白饲料条件下正常生物功能必不可少的成分。许团辉等(2012)在研究不同水平低分子 FPH 对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的影响时发现, 特定生长率、摄食率、饲料效率等随着 FPH 添加量的增加呈先上升后下降的趋势。然而, 关于大菱鲆高植物蛋白饲料中低分子 FPH 的适宜添加水平的研究尚未报道。

本研究的目的是在含有高植物蛋白源的大菱鲆幼鱼饲料中添加不同水平的低分子 FPH 替代鱼粉, 探讨其对大菱鲆幼鱼生长存活状况、鱼体组成及肝脏中类胰岛素生长因子 I 受体(Insulin-like growth factor receptor, IGF-IR)基因表达量的影响, 并以此评价低分子 FPH 替代鱼粉的效果, 筛选合适的 FPH 替代水平, 为肉食性鱼类科学利用 FPH 及提高植物蛋白源的利用效率提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 水解鱼蛋白的制备及分子量测定

水解鱼蛋白的实验用鱼为去头和内脏的太平洋狭鳕鱼(*Theragra chalcogramma*), 水解鱼蛋白的制备参考 Zheng 等(2012)的方法。

利用高效液相色谱仪测定水解蛋白的分子量, 依据 Zheng 等(2012)的方法, 测得低分子水解鱼蛋白的分子量分布见表 1。

1.2 实验饲料

本实验以鱼粉、植物蛋白(豆粕、玉米蛋白粉、谷朊粉)及水解鱼蛋白为蛋白源, 以鱼油为脂肪源, 制作成 4 种等氮等能的饲料(表 2): 无添加 FPH 组为对照组(UF-0), FPH 替代总蛋白的 5%、10%、20%分别为 UF-5、UF-10、UF-20 组。所有原料粉碎过 80 目筛, 按照饲料配方(表 2)将原料混合, 制成粒径为 3 mm 的饲料, 用烘箱在 55℃ 下烘 12 h 至恒重, 置于 -20℃ 冰箱保存备用。饲料氨基酸组成见表 3。

表 1 水解鱼蛋白的分子量分布
Tab.1 Distribution of molecular weight of FPH

分子量 Molecular weight (Da)	水解鱼蛋白 Fish protein hydrolysate (%)
10000-5000	0.20
5000-2000	1.14
2000-1000	5.21
1000-500	21.34
200-500	56.64
100-200	3.66
<100	11.82

1.3 实验鱼及养殖管理

实验鱼选用初始体重为(4.16±0.01) g 的大菱鲆幼鱼, 养殖基地在烟台开发区天源水产有限公司。将鱼苗暂养 14 d 使其适应养殖环境。采用自然采光, 养殖于水体体积为 120 L 的玻璃钢桶内。养殖用水为深井海水, 采用流水养殖模式, 流速为 5 L/min, 连续充气, 水温为(14.0±0.5)℃, 溶氧高于 7 mg/L, 盐度为 30.0±0.5, pH 为 7.5-8.0。生长实验开始时, 停食 24 h, 选择大小均匀、体格健壮且体表无病的大菱鲆幼鱼, 称重后随机分配在 16 个玻璃钢桶内(1 个对照组, 3 个实验组), 每桶 25 尾鱼, 每天用实验饲料饱食投喂两次(06:30 和 16:30), 投喂结束 30 min 后, 对残饵进行统计, 根据 100 粒饲料的平均重量计算残饵的重量。养殖周期为 84 d。

1.4 样品采集和生化分析

实验开始时, 随机取 10 尾鱼麻醉处理后, 保存于 -20℃ 以供后续的鱼体成分分析实验。实验结束时, 停食 24 h, 每桶鱼称重, 随机取 5 尾鱼, 保存于 -20℃ 用于鱼体成分分析; 每桶取两尾鱼的肌肉, 保存于 -20℃; 每桶取 1 尾鱼, 取同一位置的肝脏保存于 RNAAwait 保存液(Slarbio)中。

饲料和鱼体样品在 105℃ 烘干至恒重, 通过失重法测定干物质含量, 然后进行生化测定。粗蛋白采用凯氏定氮法; 粗脂肪采用索氏抽提法; 灰分的测定需先在电炉上炭化后再在马福炉中 550℃ 燃烧 3 h, 失重法测定。使用日立 L-8900 型氨基酸分析仪测定饲料和鱼体肌肉氨基酸组成。

1.5 实时定量检测肝脏中 IGF-IR 基因表达量

1.5.1 RNA 的提取和 cDNA 的合成 利用 RNA Extraction Kit(TaKaRa)试剂盒从实验鱼的肝脏中提取总 RNA, 利用微量核酸测定仪(Nanodrop ND2000)检

表2 实验饲料配方和营养组成

Tab.2 Formulation and proximate chemical composition of the experimental diets (%)

原料 Ingredients (%)	UF-0	UF-5	UF-10	UF-20
鱼粉 Fish meal	15.00	11.50	8.00	1.00
豆粕 Soybean meal	24.00	24.00	24.00	24.00
玉米蛋白粉 Corn gluten meal	12.00	12.00	12.00	12.00
谷朊粉 Wheat gluten	18.00	18.00	18.00	18.00
水解鱼蛋白 FPH	0	3.10	6.20	12.40
小麦粉 Wheat meal	12.30	12.50	12.60	12.90
鱼油 Fish oil	8.70	8.90	9.20	9.70
卵磷脂 Soybean lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00
维生素混合物 Vitamin premix ¹	1.50	1.50	1.50	1.50
矿物质混合物 Mineral premix ²	1.50	1.50	1.50	1.50
氯化胆碱 Choline chloride	2.00	2.00	2.00	2.00
磷酸二氢钙 CaH ₂ PO ₄	2.00	2.00	2.00	2.00
维生素 C Vitamin C	0.50	0.50	0.50	0.50
L-赖氨酸 L-lysine	0.80	0.80	0.80	0.80
D/L-蛋氨酸 D/L-methionine	0.40	0.40	0.40	0.40
L-精氨酸 L-arginine	0.30	0.30	0.30	0.30
营养组成 Proximate composition (%)				
粗蛋白 Crude protein	51.81	52.42	52.24	52.16
粗脂肪 Crude lipid	10.56	10.71	10.75	10.78
灰分 Ash	7.24	7.06	7.00	6.83

注: 1. 维生素混合料(mg/kg or g/kg 饲料): 硫胺素, 25 mg; 核黄素, 45 mg; 盐酸吡哆醇, 20 mg; 维生素 B₁₂, 0.1 mg; 维生素 K₃, 10 mg; 肌醇, 800 mg; 泛酸, 60 mg; 烟酸, 200 mg; 叶酸, 20 mg; 生物素, 1.20 mg; 维生素 A, 32 mg; 维生素 D, 5 mg; 维生素 E, 120 mg; 次粉 18.67 g

2. 矿物质混合料(mg/kg or g/kg 饲料): 氯化钠, 2 mg; 碘化钾, 0.8 mg; 氯化钴, 50 mg; 硫酸铜, 10 mg; 硫酸铁, 80 mg; 硫酸锌, 50 mg; 硫酸镁, 1200 mg; 磷酸二氢钙, 3000 mg; 氯化钠, 100 mg; 沸石粉, 15.51 g

Note: 1. Vitamin premix (mg/kg or g/kg diet): thiamine 25 mg, riboflavin 45 mg, pyridoxine 20 mg, vitamin B₁₂ 0.1 mg, menadione 10 mg, inositol 800 mg, pantothenate 60 mg, tocopherol acetate 200 mg, folic acid 20 mg, biotin 1.20 mg, vitamin A 32 mg, vitamin D 5 mg, vitamin E 120 mg, wheat flour 18.67 g

2. Mineral premix (mg/kg or g/kg diet): NaF 2 mg; KI 0.8 mg; CoCl₂·6H₂O 50 mg; CuSO₄·5H₂O 10 mg; FeSO₄·7H₂O 80 mg; ZnSO₄·7H₂O 50 mg; MnSO₄·4H₂O 1200 mg; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 3000 mg; NaCl 100 mg; Mordenzeo 15.51 g

表3 饲料氨基酸含量分析(饲料干物质%)

Tab.3 Amino acid composition of the experimental diets (Dry matter%)

氨基酸 Amino acid (%)	UF-0	UF-5	UF-10	UF-20
天冬氨酸 Asp	2.86	2.58	2.47	2.77
苏氨酸 Thr	1.43	1.34	1.28	1.36
丝氨酸 Ser	1.92	1.78	1.75	1.86
谷氨酸 Glu	10.54	9.61	9.59	10.38
甘氨酸 Gly	1.67	1.58	1.54	1.65
丙氨酸 Ala	2.07	1.98	1.93	2.06
半胱氨酸 Cys	0.53	0.58	0.49	0.55
缬氨酸 Val	1.81	1.74	1.63	1.75
蛋氨酸 Met	0.89	0.62	0.84	0.92
异亮氨酸 Ile	1.61	1.61	1.50	1.60
亮氨酸 Leu	3.56	3.50	3.38	3.59
酪氨酸 Tyr	1.58	1.47	1.33	1.43
苯丙氨酸 Phe	2.72	3.06	3.72	3.42
赖氨酸 Lys	2.31	2.45	2.32	2.38
组氨酸 His	1.02	1.06	0.96	0.89
精氨酸 Arg	1.93	2.24	1.88	1.90
牛磺酸 Tau	0.14	0.15	0.15	0.16
总氨基酸 TAA	38.59	37.35	36.76	38.67
必需氨基酸 EAA	17.28	17.62	17.51	17.81
非必需氨基酸 NEAA	21.31	19.73	19.25	20.86
EAA/TAA	44.78	47.18	47.67	46.06
EAA/NEAA	81.09	89.31	90.96	85.38

测 RNA 的浓度和纯度,使用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量; -80℃ 保存。

以提取的肝脏总 RNA 为模板, 根据 PrimeScriptTM RT Reagent Kit(TaKaRa)反转录试剂盒的操作说明合成 cDNA, 利用微量核酸测定仪(Nanodrop ND2000)检测 cDNA 的浓度; -20℃ 保存。

1.5.2 引物的设计 本实验采用的是荧光定量的相对定量 2^{-ΔΔCt} 法, 选用 β-actin 管家基因, 目的基因 IGF-IR 的引物根据 GenBank 中大菱鲆 IGF-IR (AJ224993.1)基因序列设计, 两种引物由上海生工生物工程股份有限公司合成(表 4)。

1.5.3 荧光定量 采用 SYBR Green I 染料法, 荧光定量试剂由 TaKaRa 公司提供; 在荧光定量仪 (Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System)上进行扩增和数据分析。反应体系为 10 μl; SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (×2) 5 μl, ROX Reference Dye II (×50) × 3 0.2 μl, 上下游引物各 0.4 μl (10 μmol/L), 模板 cDNA

表4 RT-PCR实验用到的引物

Tab.4 Real-time PCR primers used in the experiment

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')	引物长度 Length (bp)
β-actin	F:CCAAAGCCACACGGGAGAA	19
	R:AGAGGCATACAGGGACAGCACA	22
IGF-IR	F:CGTGGACAAATGCTGTGGAT	20
	R:CCAGAAGGCAGATGAAGAGG	20

1 μl, ddH₂O 3 μl 补充至总体积。反应程序为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算 IGF-IR 基因的相对表达量, $\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{目的基因}} - C_{t \text{管家基因}})_{\text{实验组}} - (C_{t \text{目的基因}} - C_{t \text{管家基因}})_{\text{对照组}}$ 。

1.6 计算及统计分析方法

增重率(%)=100×(终末体重-初始体重)/初始体重

特定生长率(%/d)=100×[ln(终末体重)-ln(初始体重)]/实验天数

摄食率(%体重/d)=100×总干物质摄食量/[实验天数×(初始体重+终末体重)/2]

饲料效率=鱼体增重(湿重)/总干物质摄食量

蛋白质效率=(终末体重-初始体重)/蛋白摄入量

蛋白质沉积率(%)=100×鱼体蛋白质贮存量/蛋白摄入量

采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 当差异达到显著水平($P < 0.05$), 进行邓肯多重比较(Duncan's multiple range tests), 数据表示为平均值±标准差(Mean±SD)。

2 结果

2.1 不同水平低分子 FPH 对大菱鲂幼鱼生长性能的影响

不同水平低分子 FPH 对大菱鲂生长性能的影响如表 5 所示。经过 84 d 的饲喂, 4 个组的大菱鲂幼鱼

的成活率在 98% 以上, 且成活率在各组之间无显著差异($P > 0.05$)。高植物蛋白饲料组 UF-5 的增重率、特定生长率高于 UF-0、UF-10 组, 但差异不显著($P > 0.05$), 3 组显著高于 UF-20 组($P < 0.05$)。UF-5 组的饲料效率、蛋白质效率和蛋白质沉积率与 UF-0 组无显著差异($P > 0.05$), 但显著高于 UF-10 和 UF-20 组($P < 0.05$)。UF-10 组的饲料效率、蛋白质效率和蛋白质沉积率显著高于 UF-20 组($P < 0.05$)。摄食率随着 FPH 添加量的增加有上升趋势, 且 UF-20 组显著高于其他 3 组($P < 0.05$)。

2.2 不同水平低分子 FPH 对大菱鲂幼鱼鱼体成分及肌肉氨基酸组成的影响

高植物蛋白饲料中添加不同水平水解鱼蛋白对鱼体化学组成的影响见表 6。对照组 UF-0 与 UF-5、UF-10 组的鱼体水分、粗蛋白和粗脂肪含量无显著差异($P > 0.05$), 但 UF-5 组与 UF-10 组鱼体粗蛋白含量及粗脂肪含量高于对照组, 且二者之间无显著差异($P > 0.05$)。FPH 高添加组 UF-20 的水分含量最高, 蛋白和脂肪含量最低。UF-0 组的灰分含量最高, 与其他 3 组差异显著($P < 0.05$)。

4 组实验的鱼体肌肉氨基酸含量组成中(表 7), UF-5 组肌肉中的缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸和亮氨酸 4 种必需氨基酸含量显著高于 UF-0、UF-20 组($P < 0.05$), 与 UF-10 组无显著差异。UF-5 组的苯丙氨酸、赖氨酸和组氨酸 3 种必需氨基酸含量显著高于其他 3 组($P < 0.05$), 其他 3 组之间无显著差异($P > 0.05$)。UF-5 组必需氨基酸含量及必需氨基酸与非必需氨基酸比值最高, 且显著高于其他 3 组($P < 0.05$), UF-0、UF-10 和 UF-20 三组间无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 IGF-IR 基因实时定量的表达结果

本实验采取相对定量的 2^{-ΔΔC_t} 法对 IGF-IR 基因在对照组 UF-0 和实验组 UF-5、UF-10、UF-20 的表

表5 不同水平低分子 FPH 对大菱鲂幼鱼生长性能的影响(平均值±标准差)

Tab.5 The effects of small molecular weight of fish protein hydrolysate levels on the growth performance of juvenile turbot (Mean±SD)

组别 Group	鱼体增重率 Weight gain rate(%)	特定生长率 Specific growth rate(%/d)	摄食率 Feeding rate(%/d)	饲料效率 Feed efficiency	蛋白质效率 Protein efficiency ratio	蛋白沉积率 Protein deposition rate(%)
UF-0	630.92±44.02 ^a	2.37±0.07 ^a	1.29±0.02 ^c	1.38±0.03 ^a	2.37±0.06 ^a	35.02±0.72 ^a
UF-5	642.04±37.65 ^a	2.38±0.06 ^a	1.31±0.05 ^c	1.41±0.07 ^a	2.43±0.13 ^a	35.51±1.74 ^a
UF-10	578.29±109.81 ^a	2.27±0.18 ^a	1.36±0.03 ^b	1.29±0.08 ^b	2.22±0.14 ^b	32.77±1.97 ^b
UF-20	428.20±15.49 ^b	1.98±0.02 ^b	1.45±0.02 ^a	1.12±0.01 ^c	1.92±0.03 ^c	26.89±1.00 ^c

注: 同列数据中相同上标字母表示差异不显著($P > 0.05$)

Note: Values in the same column with same superscripts are not significantly different ($P > 0.05$)

表 6 不同水平低分子 FPH 对大菱鲆鱼体化学组成的影响(平均值±标准差)

Tab.6 The effects of small molecular weight of fish protein hydrolysate levels on the body chemical compositions of juvenile turbot (Mean±SD)

组别 Group	水分 Moisture(%)	粗蛋白 Crude protein(%)	粗脂肪 Crude lipid(%)	灰分 Ash(%)
UF-0	76.93±0.42 ^b	14.64±0.20 ^a	3.99±0.20 ^{ab}	3.40±0.10 ^a
UF-5	76.87±0.35 ^b	14.74±0.02 ^a	4.31±0.22 ^a	3.13±0.24 ^b
UF-10	76.88±0.39 ^b	14.75±0.11 ^a	4.53±0.37 ^a	3.15±0.10 ^b
UF-20	78.94±0.69 ^a	14.12±0.30 ^b	3.64±0.67 ^b	3.05±0.10 ^b

注: 同列数据中相同上标字母表示差异不显著($P>0.05$)

Note: Values in the same column with same superscripts are not significantly different ($P>0.05$)

表 7 不同水平低分子 FPH 对大菱鲆鱼体肌肉氨基酸组成的影响(平均值±标准差)

Tab.7 The effects of small molecular weight of fish protein hydrolysate levels on the amino acid composition of fish muscle in juvenile turbot (%) (Mean±SD)

氨基酸 Amino acid(%)	UF-0	UF-5	UF-10	UF-20
天冬氨酸 Asp	8.54±0.12 ^a	7.07±0.03 ^b	8.73±0.15 ^a	8.52±0.14 ^a
苏氨酸 Thr	3.78±0.09 ^a	3.44±0.13 ^b	3.88±0.05 ^a	3.79±0.06 ^a
丝氨酸 Ser	3.39±0.08 ^a	2.96±0.15 ^b	3.45±0.02 ^a	3.42±0.08 ^a
谷氨酸 Glu	13.78±0.20 ^a	12.94±0.64 ^b	14.17±0.19 ^b	13.42±0.11 ^b
甘氨酸 Gly	4.03±0.04 ^a	3.66±0.24 ^c	3.81±0.07 ^b	3.72±0.04 ^b
丙氨酸 Ala	5.20±0.13 ^{ab}	4.97±0.22 ^b	5.25±0.03 ^a	5.12±0.11 ^{ab}
半胱氨酸 Cys	0.79±0.04 ^c	1.78±0.21 ^a	1.00±0.15 ^{bc}	1.09±0.12 ^b
缬氨酸 Val	3.79±0.17 ^b	4.18±0.18 ^a	3.88±0.12 ^{ab}	3.91±0.12 ^{ab}
蛋氨酸 Met	2.31±0.04 ^b	2.56±0.07 ^a	2.31±0.03 ^b	2.18±0.11 ^b
异亮氨酸 Ile	3.69±0.02 ^b	3.91±0.14 ^a	3.80±0.07 ^{ab}	3.68±0.08 ^b
亮氨酸 Leu	6.45±0.09 ^b	6.72±0.26 ^a	6.63±0.11 ^a	6.49±0.13 ^b
酪氨酸 Tyr	2.82±0.03 ^{ab}	2.91±0.07 ^a	2.74±0.03 ^b	2.79±0.08 ^b
苯丙氨酸 Phe	3.57±0.07 ^b	6.83±0.58 ^a	3.55±0.05 ^b	3.64±0.18 ^b
赖氨酸 Lys	7.68±0.10 ^b	8.42±0.32 ^a	7.79±0.14 ^b	7.83±0.07 ^b
组氨酸 His	1.70±0.02 ^b	1.93±0.02 ^a	1.72±0.02 ^b	1.70±0.02 ^b
精氨酸 Arg	5.00±0.07	5.02±0.12	4.99±0.09	4.84±0.13
牛磺酸 Tau	0.12±0.01 ^b	0.15±0.02 ^b	0.12±0.02 ^b	0.20±0.04 ^a
总氨基酸 TAA	76.63±1.04 ^b	79.45±1.23 ^a	77.82±0.78 ^{ab}	76.37±0.63 ^b
必需氨基酸 EAA	37.97±0.50 ^b	43.01±0.37 ^a	38.55±0.33 ^b	38.09±0.56 ^b
非必需氨基酸 NEAA	43.01±0.57 ^a	36.43±0.95 ^b	39.28±0.51 ^a	38.29±0.10 ^a
EAA/TAA	49.55±0.15 ^b	54.14±0.53 ^a	49.53±0.24 ^b	49.87±0.33 ^b
EAA/NEAA	98.22±0.60 ^b	118.09±2.53 ^a	98.14±0.93 ^b	99.47±1.29 ^b

注: 同列数据中相同上标字母表示差异不显著($P>0.05$)

Note: Values in the same column with same superscripts are not significantly different ($P>0.05$)

达量进行相对定量, UF-0 组的表达量设定为 1(表 8)。从表 8 中可以看出, 肝脏中 IGF-IR 基因的表达水平随着水解鱼蛋白添加水平的升高而上升, 且 UF-20 组表

达量显著高于其他 3 组($P<0.05$), UF-10 组显著高于 UF-0 组($P<0.05$), UF-5 组与 UF-0、UF-10 组差异不显著($P>0.05$)。

表8 不同水平低分子 FPH 对大菱鲂幼鱼肝脏中 IGF-IR 基因 mRNA 表达量的影响(平均值±标准差)

Tab.8 The effects of small molecular weight of fish protein hydrolysate levels on mRNA expression of IGF-IR gene in liver of juvenile turbot (Mean ± SD)

组别 Group	IGF-IR 基因 mRNA 相对表达量 mRNA relative expression of IGF-IR gene
UF-0	1.00±0.00 ^c
UF-5	1.12±0.20 ^{bc}
UF-10	1.37±0.22 ^b
UF-20	1.90±0.39 ^a

注: 数据中相同上标字母表示差异不显著($P>0.05$)

Note: Values with the same superscripts are not significantly different ($P>0.05$)

3 讨论

3.1 低分子 FPH 对大菱鲂幼鱼生长的影响

本研究中 90% 的 FPH 的分子量小于 1000 Da, 含有丰富的必需氨基酸、呈味氨基酸及牛磺酸。Oliva-Teles 等(1999)在大菱鲂幼鱼饲料中添加不同水平的 FPH, 结果发现, FPH 不能提高其摄食率。Refstie 等(2004)在大西洋鲑(*Salmo salar*)饲料中添加不同水平的 FPH, 发现摄食率随着 FPH 添加水平的升高而升高; 本研究的摄食率随着 FPH 添加量的升高而升高, 且 UF-20 显著高于其他 3 组($P<0.05$), 表明 FPH 能提高大菱鲂幼鱼的摄食率, 因此, 各实验组之间的生长差异不是由于饲料的适口性造成的, 与 Refstie 等(2004)结果相似。许多研究表明, 在一定范围内添加 FPH 可以提高鱼类的生长性能和饲料利用, 但高水平的添加会造成鱼类生长性能的下降(Hevrøy *et al.*, 2005; Aksnes *et al.*, 2006b; 柳旭东等, 2010; 许团辉等, 2012)。Espe 等(2012)在大西洋鲑高植物蛋白饲料中添加水解浓缩鱼蛋白(FPC)的研究表明, 几组实验饲料氨基酸组成相似, 添加 FPC 没有改变饲料氨基酸组成, 随着 FPC 的增加生长呈下降趋势, 可能原因是消耗相同的饲料时, 添加高水平 FPC 跟低水平相比会消耗更多的能量在代谢上, 所以生长积累就少, 表现出生长性能下降, 该研究结果跟本研究的生长结果相似。本研究中高水平添加组 UF-20 的增重率、特定生长率等生长指标显著低于 UF-0、UF-5、UF-10 组($P<0.05$), UF-20 组与 UF-0、UF-5、UF-10 组饲料氨基酸组成无显著差异(表 3), 说明高水平添加 FPH 抑制生长不是由于氨基酸不平衡造成的。Oliva-Teles 等(1999)在大菱鲂幼鱼饲料中添加不同水平 FPH, 结果表明 FPH 对大菱鲂幼鱼的生长及饲料利用无促进

作用, 分析其原因可能是鱼粉含量较高, 在这种高含量鱼粉基础饲料中加入 FPH, 可能会掩盖 FPH 的作用, 而本研究对照组的鱼粉含量只有 15%, UF-5、UF-10 及 UF-20 组分别只含有 11.5%、8%、1% 的鱼粉, 在低鱼粉含量条件下, UF-5、UF-10 与对照组的增重率、特定生长率之间无显著差异($P>0.05$), 未对大菱鲂幼鱼的生长造成不利影响, 可见在低鱼粉含量条件下 FPH 的作用不可忽视。因此, 高植物蛋白饲料中适量添加低分子 FPH 可节约鱼粉的使用量, 提高植物蛋白饲料的利用率, 从而降低生产成本, 提高生产效益。

3.2 低分子 FPH 对大菱鲂幼鱼鱼体组成的影响

低分子 FPH 影响了鱼类的鱼体成分(郑珂珂等, 2011; 卫育良等, 2014), 许团辉等(2012)在牙鲆饲料中添加不同水平低分子 FPH, 发现添加 4.5% FPH 组(FPH₁₁)显著提高了鱼体粗蛋白和粗脂肪含量, 高水平 FPH 组(FPH₂₆)粗蛋白含量最低。Zheng 等(2013)在高植物蛋白的大菱鲂饲料中分别添加 1.2%、3.7% 的低分子水解鱼蛋白, 发现水解鱼蛋白组提高了鱼体蛋白含量, 且 3.7% 组鱼体粗蛋白含量显著高于对照组。与许团辉等(2012)和 Zheng(2013)结果相似。本研究中 UF-5 和 UF-10 组的鱼体粗蛋白含量和粗脂肪含量显著高于对照组和 UF-20 组(表 6), 表明在大菱鲂幼鱼饲料中添加适量的低分子 FPH 可促进鱼体蛋白和脂肪的积累。

本研究通过对鱼体肌肉氨基酸分析, 4 组实验鱼在测得的 16 种氨基酸中, 除了精氨酸含量没有差异外, 其他氨基酸都有差异(表 7), 表明添加 FPH 对实验鱼肌肉氨基酸组成有影响。Espe 等(1993、1999)发现, 饲料中添加水解鱼蛋白使大西洋鲑血浆和肌肉中的氨基酸浓度增加。Hevrøy 等(2005)研究发现, 添加不同水平的 FPH 对大西洋鲑鱼体肌肉氨基酸组成无显著影响。而本研究的 4 组鱼体肌肉中蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸几种必需氨基酸的含量较高, 且 UF-5 组肌肉中的苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸 3 种氨基酸含量、必需氨基酸含量及必需氨基酸与非必需氨基酸比值显著高于其他 3 组($P<0.05$), 说明低水平 FPH 可以促进肌肉必需氨基酸的吸收积累, 提高鱼体肌肉必需氨基酸的含量。

3.3 低分子 FPH 对大菱鲂幼鱼肝脏中 IGF-IR 基因表达的影响

类胰岛素生长因子受体是胰岛素生长因子家族中的一员, 广泛存在于脊椎动物体内(Toyoshima *et al.*,

2008; Laustsen *et al*, 2006)。关于虹鳟、大菱鲃(Elies *et al*, 1996)、斑马鱼(Ayaso *et al*, 2002)和牙鲈(Nakao *et al*, 2002)等的 IGF-IR 结构和生理功能的研究早有报道。IGF-IR 是一种跨膜酪氨酸激酶,通过促进细胞有丝分裂抑制细胞凋亡,促进胚胎、神经和骨骼的生长发育,对鱼类的生长和发育有重要的调节作用。IGF-IR 在 IGF 家族中发挥重要作用,IGF-IR 结合 IGF-I 以促进 IGF-I 跨血管壁运输(Chauvigne *et al*, 2003),延长 IGF-I 在血液中的半衰期,提高 IGF-I 的促生长作用。IGF-IR mRNA 的表达受到营养、温度及应激等因素的影响(Chauvigne *et al*, 2003; 沈文英等, 2012; Montserrat *et al*, 2007)。Gabillard 等(2003)对虹鳟的研究表明,水温跟食物差异都会对虹鳟 IGF-IR mRNA 的表达进行调节。Valentinis 等(2001)研究发现,IGF-IR 的信号传递作用与胰岛素受体底物 1(Insulin receptor substrate 1, IRS-1)的浓度有关:IRS-1 浓度高时,IGF-IR 就会传递促有丝分裂、抗细胞凋亡的信号;浓度低时,IGF-IR 就会传递变异信号,导致造血细胞的粒系分化。本研究 UF-20 组肝脏中 IGF-IR mRNA 表达量显著高于对照组($P<0.05$),但生长却显著低于对照组($P<0.05$),可能与鱼体内的 IRS-1 浓度有关。同时,本研究 IGF-IR 的相对定量表达的结果与张俊玲等(2012)提出的 IGF-IR 的表达不一致,推断 IGF-IR 的高表达量是对体内 IGF-I 低表达量的一种补偿,从而使 IGF-I 保持组织敏感性和促生长活性,但仍需要进一步的实验来证明 IGF-IR 与 IGF-I 表达的关系。

4 结论

高植物蛋白饲料中添加低水平低分子 FPH(UF-5)可促进大菱鲃幼鱼的生长,提高饲料利用率,促进肌肉必需氨基酸的积累。添加高水平 FPH(UF-20)抑制其生长,添加低分子 FPH 可提高肝脏中 IGF-IR 基因的表达量。因此,大菱鲃幼鱼的高植物蛋白饲料中可适当添加低分子 FPH 以节约鱼粉使用量,提高植物蛋白的利用。

参 考 文 献

- 马爱军, 雷霖霖, 陈四清, 等. 大菱鲃营养需求与饲料研究进展. 海洋与湖沼, 2003, 34(4): 450-459
- 卫育良, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 水解鱼蛋白对大菱鲃幼鱼消化率的影响. 水生生物学报, 2014, 38(5): 910-920
- 王长云, 林洪, 周东, 等. 从鲑鱼碎肉中提取水解蛋白. 海洋湖沼通报, 1995(4): 33-39
- 王新星, 孔凡华, 许团辉, 等. 水解鱼蛋白营养组成及评价. 渔业科学进展, 2011, 32(3): 104-110
- 庄平, 陈喜斌, 曾翠平, 等. 中华鲟幼鲟饲料中适宜动植物蛋白比的研究. 动物营养学报, 2002, 14(1): 61-64
- 许团辉, 高湘萍, 梁萌青, 等. 高植物蛋白饲料中以低分子水解蛋白替代鱼粉对牙鲈生长性能及非特异性免疫的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 60-69
- 沈文英, 任岗, 祝尧荣. 补偿生长对异育银鲫 IGF-1、IGFBP-1 水平及 IGF-1、IGF-1R mRNA 表达的影响. 动物学研究, 2012, 33(3): 298-303
- 张俊玲, 施志仪, 翟万营, 等. Western 印迹法检测 IGF-I 及其受体蛋白在牙鲈仔鱼变态中的表达. 上海海洋大学学报, 2012, 21(5): 679-683
- 周歧存, 麦康森, 刘永坚, 等. 动植物蛋白源替代鱼粉研究进展. 水产学报, 2005, 29(3): 404-410
- 郑珂珂, 梁萌青, 姚宏波, 等. 在高植物蛋白饲料中添加水解鱼蛋白对牙鲈幼鱼的影响. 水生生物学报, 2011, 35(5): 829-834
- 柳旭东, 梁萌青, 张利民, 等. 饲料中添加水解鱼蛋白对半滑舌鳎稚鱼生长及生理生化指标的影响. 水生生物学报, 2010, 34(2): 242-249
- Aksnes A, Hope B, Høstmark Ø, *et al*. Inclusion of size fractionated fish hydrolysate in high plant protein diets for Atlantic cod, *Gadus morhua*. Aquaculture, 2006a, 261(3): 1102-1110
- Aksnes A, Hope B, Jönsson E, *et al*. Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. Aquaculture, 2006b, 261(1): 305-317
- Ayaso E, Nolan CM, Byrnes L. Zebrafish insulin-like growth factor-I receptor: molecular cloning and developmental expression. Mol Cell Endocrinol, 2002, 191(2): 137-148
- Bromley PJ. The effect of dietary water content and feeding rate on the growth and food conversion efficiency of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture, 1980, 20(2): 91-99
- Bui HTD, Khosravi S, Fournier V, *et al*. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. Aquaculture, 2014, 418: 11-16
- Bureau DP, Harris AM, Cho CY. The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 1998, 161(1-4): 27-43
- Chauvigne F, Gabillard JC, Weil C, *et al*. Effect of refeeding on IGF I, IGF II, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. Gen Comp Endocr, 2003, 132(2): 209-215
- Elies G, Groigno L, Wolff J, *et al*. Characterization of the insulin-like growth factor type 1 receptor messenger in two

- teleost species. *Mol Cell Endocrinol*, 1996, 124(1): 131–140
- El-Saidy DMSD, MMA Gaber. Replacement of fish meal with a mixture of different plant protein sources in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) diets. *Aquac Res*, 2003, 34(13): 1119–1127
- Espe M, Lieda E, Torrissen KR. Changes in plasma and muscle free amino acids in Atlantic salmon (*Salmo salar*) during absorption of diets containing different amounts of hydrolyzed cod muscle protein. *Comp Biochem Phys A*. 1993, 105(3): 555–562
- Espe M, Ruohonen K, El-Mowafi A. Hydrolysed fish protein concentrate (FPC) reduces viscera mass in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed plant-protein-based diets. *Aquacult Nutr*, 2012, 18(6): 599–609
- Espe M, Sveier H, Hogoy I, *et al.* Nutrient absorption and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish protein concentrate. *Aquaculture*, 1999, 174(1–2): 119–137
- Francis G, Makkar HPS, Becker K. Antinutritional factors present in plant derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 2001, 199(3–4): 197–227
- Gabillard JC, Weil C, Rescan PY, *et al.* Effects of environmental temperature on IGF1, IGF2, and IGF type I receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocr*, 2003, 133(2): 233–242
- Gomes EF, Rema P, Kaushik SJ. Replacement of fish meal by plant proteins in the diets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture*, 1995, 130(2–3): 177–186
- Hevrøy EM, Espe M, Waagbø R, *et al.* Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquacult Nutr*, 2005, 11(4): 301–313
- Kaushik SJ. Whole body amino acid composition of European seabass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Psetta maxima*) with an estimation of their IAA requirement profiles. *Aquat Living Resour*, 1998, 11(5): 355–358
- Kotzamanis YP, Gisbert E, Gatesoupe FJ, *et al.* Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp Biochem Physiol Part A: Mol Int Physiol*, 2007, 147(1): 205–214
- Laustsen PG, Russell SJ, Cui L, *et al.* Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function. *Mol Cell Biol*, 2006, 27(5): 1649–1664
- Liaset B, Espe M. Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. *Process Biochem*, 2008, 43(1): 42–48
- Liaset B, Lied E, Espe M. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *J Sci Food Agr*, 2000, 80(5): 581–589
- Montserrat N, Gómez-Requeni P, Bellini G, *et al.* Distinct role of insulin and IGF-I and its receptors in white skeletal muscle during the compensatory growth of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 2007, 267(1): 188–198
- Nakao N, Tanaka M, Higashimoto Y, *et al.* Molecular cloning, identification and characterization of four distinct receptor subtypes for insulin and IGF-I in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Endocrinol*, 2002, 173(2): 365–375
- Oliva-Teles A, Cerqueira AL, Gonçalves P. The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture*, 1999, 179(1): 195–201
- Refstie S, Olli JJ, Standal H. Feed intake, growth, and protein utilization by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture*, 2004, 239(1–4): 331–349
- Toyoshima Y, Monson C, Duan C, *et al.* The role of insulin receptor signaling in zebrafish embryogenesis. *Endocrinology*, 2008, 149(12): 5996–6005
- Valentinis B, Baserga R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol Pathol*, 2001, 54(3): 133–137
- Zheng KK, Liang MQ, Yao HB, *et al.* Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I levels of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquacult Nutr*, 2012, 18(3): 297–303
- Zheng KK, Liang MQ, Yao HB, *et al.* Effect of size-fractionated fish protein hydrolysate on growth and feed utilization of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquac Res*, 2013, 44(6): 895–902

(编辑 冯小花)

Effects of Small Molecule Weight Fish Protein Hydrolysate in High Plant Protein Diets on the Expression of Liver IGF-I Receptor and the Growth of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.)

MU Yuchao^{1,2}, LIANG Mengqing^{1,3}①, ZHENG Keke¹, WEI Yuliang¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract This experiment was conducted to investigate the effects of small molecule weight fish protein hydrolysate on the growth performance and the expression of insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) mRNA in the liver of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Four isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated and fed to fish with initial weight of (4.16±0.01) g. In the experimental diets, fish meal was replaced with fish protein hydrolysate by 0% (UF-0), 5% (UF-5), 10% (UF-10), and 20% (UF-20) of total dietary protein, respectively. The experiment lasted 12 weeks. The results showed that there were no significant differences in the weight gain rate and specific growth rate among groups UF-0, UF-5 and UF-10 ($P>0.05$), but these groups showed higher values than group UF-20 ($P<0.05$). UF-0 and UF-5 showed similar feeding rate ($P>0.05$), which was significantly lower than that of UF-10 and UF-20 ($P<0.05$). The feed efficiency, protein efficiency, and protein retention efficiency of UF-0 and UF-5 were significantly higher than those of UF-10 and UF-20 ($P<0.05$), and the parameter values of UF-10 were significantly higher than those of UF-20 ($P<0.05$). There were no differences in the contents of crude protein and crude lipid among groups UF-0, UF-5 and UF-10 ($P>0.05$), but the values in these groups were higher than those of UF-20 ($P<0.05$). The content of essential amino acids in the muscle and the ratio of essential amino acids to non-essential amino acids in group UF-5 was higher than those of other groups ($P<0.05$). It was also found that the expression of insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) mRNA in the liver increased with increasing levels of dietary fish protein hydrolysate, and it was higher in UF-20 compared to other three groups ($P<0.05$). These results indicated that low level of small molecule weight fish protein hydrolysate could improve the growth and feed utilization of juvenile turbot. However, higher level may restrain the growth. Furthermore, dietary fish protein hydrolysate could improve the expression of IGF-IR mRNA in the liver of juvenile turbot.

Key words Fish protein hydrolysate; Plant protein; Turbot; Growth; IGF-IR

① Corresponding author: LIANG Mengqing, E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn