

DOI: 10.3724/PS.J.1118.2011.00110

微胶囊蛋氨酸或晶体蛋氨酸对军曹鱼幼鱼相关酶活性的影响

迟淑艳, 谭北平, 董晓慧, 杨奇慧, 刘泓宇, 许悦娜, 黄红岩

广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025

摘要: 比较研究了低鱼粉饲料中添加微胶囊蛋氨酸或晶体蛋氨酸对军曹鱼(*Rachycentron canadum*)消化酶和蛋白质代谢酶活性的影响。将鱼粉组和减少鱼粉后蛋氨酸缺乏组分别设为正、负对照组, 试验组饲料在负对照组的基础上分别添加晶体蛋氨酸(MET)、羟基蛋氨酸(MHA)、邻苯二甲酸醋酸纤维素微胶囊蛋氨酸(CAP)、丙烯酸树脂微胶囊蛋氨酸(RES)和棕榈酸甘油酯微胶囊蛋氨酸(TPA), 共 7 组等氮等脂饲料。每个处理设 3 个重复, 每个重复放养 20 尾鱼, 初始体质量(5.40 ± 0.07)g, 流水养殖 8 周, 水温 $29 \sim 31$ 。结果显示微胶囊蛋氨酸组的军曹鱼肠道胰蛋白酶活性显著高于正对照组和 MET 组($P < 0.05$), MET 和 TPA 组肝脏谷草转氨酶(GOT)活性显著高于正负对照组($P < 0.05$); MET 组军曹鱼幼鱼摄食后 0.5 h 肠道 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶活性显著高于其他各组($P < 0.05$), 摄食 3 h 后正对照组和 RES 组 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶活性上升, 显著高于 CAP 和 MHA 组($P < 0.05$), 摄食 8 h 后正对照组和微胶囊蛋氨酸组显著高于 MHA 和 MET 组($P < 0.05$)。以上结果表明, 军曹鱼低鱼粉饲料中添加晶体蛋氨酸即可增进氨基酸的代谢和蛋白质的合成, 微胶囊有助于蛋氨酸在肠道中的缓慢释放, 提高肠道内胰蛋白酶活性。[中国水产科学, 2011, 18(1): 110–118]

关键词: 军曹鱼; 蛋氨酸; 微胶囊; 消化酶; 蛋白质代谢酶

中图分类号: S963

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)01-0110-09

添加氨基酸可以解决由于鱼粉蛋白源被其他动植物蛋白源替代而产生的氨基酸不平衡问题。改善蛋白源利用率, 改善饲料的氨基酸平衡和减少蛋白质用作能量的消耗, 是提高蛋白质利用率的有效措施^[1-6]。然而, 对于不同鱼类, 氨基酸的添加效果并非一致。某些海水仔稚鱼在早期生长阶段, 能够优先利用饲料中游离氨基酸(FAA)而不是多肽和蛋白质^[7-9]; 而对于虹鳟(*Salmo gairdneri*)^[10-11]、鲤(*Cyprinus carpio* Linnaeus)^[12-13]和罗非鱼^[14-15], 饲料中的 FAA 不能像结合蛋白质中的氨基酸那样促进鱼体生长^[16]。FAA 不能被有效利用的原因之一是其吸收速度较快, 导致过剩的氨基酸被降解, 利用效率下降^[16]。其次, FAA 在水中的溶失也是影响其利用率的因素之一^[17]。Cowey 等^[18]通过测定鱼类摄食后经鳃和肾排出的

含氮物质发现, 摄食晶体氨基酸(CAA), 饲料中有约 36% 氨基酸排入水中; 摄食 CAA 和酪蛋白混合物, 饲料中的 CAA 有 12.8% 排入水中; 而摄食明胶—酪蛋白, 饲料仅有 1% 的 CAA 排入水中。其三, 不同发育阶段消化道的组织结构和消化酶活性可能会影响鱼类对氨基酸的利用效果^[19]。因此, 可以通过降低 FAA 的溶失率和减缓其在肠黏膜处的吸收速度来改善 FAA 的利用率。

微胶囊和微包被技术被引入用于改善水生动物饲料中 FAA 的使用^[20], 鲤摄食包被的氨基酸改善了蛋白质的合成和利用^[21]。蛋氨酸是鱼饲料中的第一限制性氨基酸^[22]。本实验通过在军曹鱼(*Rachycentron canadum*)幼鱼饲料中添加晶体蛋氨酸和自制的微胶囊蛋氨酸, 比较研究军曹鱼幼鱼在摄食低鱼粉饲料时, 不同形式的蛋氨酸对其消

收稿日期: 2010-01-12; 修订日期: 2010-05-07.

基金项目: 广东省教育厅引进人才专项资金(0909030); 广东海洋大学自然科学基金项目资助(0612188); 广东海洋大学自然科学研究项目(0812173).

作者简介: 迟淑艳(1977-), 博士, 主要从事水产动物营养与饲料的研究. E-mail: chishuyan@yahoo.com.cn

化酶活性和蛋白质代谢相关酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 试验饲料

以鱼粉、豆粕和肉骨粉作为基础饲料的蛋白源, 配制出 7 种等氮等脂的实验饲料(表 1)。以高鱼粉组(48%)为正对照组, 以低鱼粉(24%)不添加蛋氨酸组为负对照组, 添加的蛋氨酸形式分别为晶体蛋氨酸(MET)、邻苯二甲酸醋酸纤维素包被

蛋氨酸(CAP)、棕榈酸甘油酯包被蛋氨酸(TPA)、树脂包被蛋氨酸(RES)、羟基蛋氨酸(MHA)5 种形式。饲料配制前, 所有原料经粉碎后过 60 目筛。将所有粉碎好的饲料原料按表 1 配方混合均匀, 于双螺杆制粒机[F-26(), 华南理工大学监制]中将饲料挤压成直径 2 mm(前 4 周)和 3 mm(后 4 周)的条状, 在 60 ℃ 恒温下干燥 1 h, 阴干后破碎, 置 -20 ℃ 冰箱备用。经测定正对照组蛋氨酸含量 1.1%, 负对照组蛋氨酸含量 0.72%。蛋氨酸添加

表 1 各处理组饲料配方和化学成分分析表
Tab. 1 Formulation and proximate composition of diets of each treatment group

原料 ingredient	% DW		
	正对照 positive control	负对照 negative control	实验组 test
鱼粉 fish meal	48	24	24
豆粕 soybean	22.2	28.5	28.5
肉骨粉 meat and bone meal		24.4	24.4
鱿鱼内脏粉 squid visceral meal	3	3	3
磷脂 lecithin	2	2	2
鱼油 fish oil	6	6	6
氯化胆碱 choline chloride	0.6	0.6	0.6
多维 ^a vitamin premix ^a	2	2	2
多矿 ^b mineral premix ^b	2	2	2
维生素C ^c vitamin C ^c	0.1	0.1	0.1
磷酸二氢钙 calcium dihydrogen phosphate	0.3	0.3	0.3
诱食剂 attractant	0.3	0.3	0.3
蛋氨酸 ^d methionine ^d			0.3
褐藻酸钠sodium alginate	3	3	3
纤维素 cellulose	10.5	3.8	3.5
化学成分 chemical composition			
粗蛋白 crude protein	46.55	46.51	46.71
粗脂肪 crude fat	12.48	12.83	12.97
粗灰分 crude ash	10.88	11.13	11.11

注: a. 多维(g/100g): 硫胺素 0.14, 核黄素 0.31, VB₆ 0.11, 泛酸钙 0.34, 尼克酸 1.12, 生物素 0.33, 叶酸 0.14, VB₁₂ 0.06, 肌醇 4.49, 维生素K₃ 0.22, 维生素A 0.18, 维生素D₃ 0.03, 维生素E 0.66, 糊精 91.89. b. 多矿(g/100 g): 六水合氯化钴 1.02, 五水合硫酸铜 1.09, 柠檬酸铁 1.86, 七水合硫酸镁 13.32, 一水合硫酸锰 0.93, 碘酸钾 0.01, 亚硒酸钠 0.01, 七水合硫酸锌 2.10, 六水合三氯化铝 2.03, 氯化钠 5.00, 沸石粉 72.64. c. 维生素C单聚磷酸酯. D. 添加的 5 种蛋氨酸, 分别为: 晶体蛋氨酸(MET, 安迪苏, 法国), 羟基蛋氨酸钙(MHA, 诺伟司, 上海), 邻苯二甲酸醋酸纤维素微胶囊蛋氨酸, (CAP, Fluka); 棕榈酸三酰甘油酯微胶囊蛋氨酸(TPA, Fluka), 丙烯酸树脂微胶囊蛋氨酸(RES, 元升实业股份有限公司, 连云港).

Note: a. premix(g/100g): thiamin 0.14, riboflavin 0.31, pyrodoxine 0.11, DL Ca-Pantothenate 0.34, nicotinic acid 1.12, biotin 0.33, folic acid 0.14, vitamin B₁₂ 0.06, inositol 4.49, menadione 0.22, vitamin A acetate (500 000 IU/g) 0.18, vitamin D₃ (500 000 IU/g) 0.03, dl-alphatocopherol acetate (500 IU/g) 0.66, dextrine 91.89. b. premix(g/100g): cobalt chloride hexahydrate 1.02, cupric sulfate pentahydrate 1.09, ferric citrate 1.86, magnesium sulfate heptahydrate 13.32, manganous sulfate monohydrate 0.93, potassium iodate 0.01, sodium selenite 0.01, zinc sulfate heptahydrate 2.10, aluminum trichloride hexahydrate 2.03, sodium chloride 5.00, filler 72.64. c. L-Ascorbate-2-monophosphate (35%). d. methionine additive including crystalline L-methionine, MET (Adisseo, France); hydroxyl-methionine calcium, MHA (Alimet, Novus International, Inc. Shanghai, China); cellulose-acetate-phthalate coated methionine, CAP (Fluka); tripalmitin-polyvinyl alcohol coated methionine, TPA (Fluka) and resin coated methionine, RES (Eudragit II, Yuansheng Industrial Co. Ltd. Lianyungang, Jiangsu, China), respectively.

组以各种形式的蛋氨酸含量计,在负对照组基础上各添加 0.3%后和正对照组蛋氨酸含量一致。

1.2 饲养管理

养殖实验在广东恒兴集团国家 863 计划海水养殖种子工程南方基地进行,选择健康鱼苗用商业饲料(台湾全兴饲料)暂养 2 周后进行分组。每个处理 3 个重复,每个重复放养 20 尾鱼[初始体质量(5.40 ± 0.07)g]于 500 L 玻璃钢养殖桶中,每天投喂 2 次,投喂时间 8:00、16:00,每天记录投喂量,根据残饵情况变动投喂量。养殖期间,24 h 供氧,盐度 30~34,溶解氧 8~8.5 mg/L,水温 29~31 , pH 7.8~8.0,养殖实验持续 60 d。

1.3 酶活性测定

实验结束前 1 天,早 8:00 投料后,分别于 0.5 h、3 h、6 h、8 h 和 12 h 从各处理组随机取样 3 尾鱼的肠道冷冻,双蒸水匀浆用于测定 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶活性。饲养试验结束时,禁饲 24 h,从每个平行组中随机选取 5 尾鱼,取样血清测定 γ -L-谷氨酰转肽酶(γ -GT),取胃测定胃蛋白酶,肝和肠测定胰蛋白酶、淀粉酶,肝脏测谷草转氨酶和谷丙转氨酶。肝脏和肠道用预冷的双蒸水冲洗干净后,用预冷的磷酸缓冲液(pH 7.8)10 000 g 离心,取上清液制成 1%的匀浆,用于测定酶活性。每次取样前用适量丁香酚麻醉,减少对鱼的刺激。

胰蛋白酶活性测定采用 N-苯甲酰-L-Arg 乙酯(BAEE)为底物,采用参考施韦尔特-竹中法^[23],用 BAEE 作为底物溶于含有氯化钙的 Tris-HCl (pH 值 7.6)缓冲液中,25℃水浴下进行反应,立即混合于 253 nm 处测吸光值,在连续 5 min 内每隔 1 min 读取吸光度,直至每分钟吸光度增大值达恒定为止。活力单位定义为:以 BAEE 为底物, pH 值 7.6, 25℃, 反应体积 3.0 mL, 光程 1 cm 的条件下,每分钟使 ΔA_{253} 增加 0.001, 反应液中所增加的酶量为 1 个 BAEE 单位。胰蛋白酶酶活力(BAEE 单位/mL)的计算公式为:

$$\frac{\Delta A_{253} / \text{min} \times \text{稀释倍数}}{0.001 \times 0.2}$$

ΔA_{253} : 1 min 内 253 nm 处吸光度增大值($=\Delta A_{\text{样/min}}$)

$-\Delta A_{\text{空/min}}$)

比活力 $[\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} (\text{pro})] = \text{酶活力} / [\text{蛋白含量}(\text{mg/mL}) \times 0.2]$

淀粉酶以可溶性淀粉为底物,采用碘-淀粉法,在 660 nm 波长下测吸光度。酶活力单位定义:100 mL 血清中的淀粉酶,在 37 , 15 min 水解 5 mg 淀粉为 1 个酶活力单位^[24]。

胃蛋白酶, Na^+ 、 K^+ -ATP 酶, γ -L-谷氨酰转肽酶、谷草转氨酶和谷丙转氨酶的测定采用南京建成公司生产的试剂盒进行测定。蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法^[25]。

1.4 数据分析

各处理的数据采用单因素方差分析法(ANOVA)进行分析,当处理之间差异显著($P < 0.05$)时,用 LSD 检验法进行均值间多重比较。统计分析所用的软件为 SPSS11.5。结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示。

2 结果与分析

2.1 军曹鱼幼鱼消化酶活性

MHA 组肝脏胰蛋白酶活性显著高于其他各组($P < 0.05$),而肠道的胰蛋白酶活性则显著低于微胶囊蛋氨酸组,与正对照组和 MET 组差异不显著($P > 0.05$);各处理组肝脏和肠道中淀粉酶的活性差异不显著($P > 0.05$);RES 组胃蛋白酶和正对照无显著差异,但是显著高于其他组($P < 0.05$)(表 2)。

2.2 军曹鱼幼鱼转氨酶、转肽酶和 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶活性

由表 3 可见,TPA 组和 MET 组谷草转氨酶(GOT)活性显著高于各处理组($P < 0.05$),TPA 组和 RES 组的谷丙转氨酶(GPT)活性显著高于 MET 组($P < 0.05$),MET 组和微胶囊 TPA 组 GOT/GPT 显著高于各实验组($P < 0.05$);MET 组、CAP 组和 TPA 组转肽酶活性显著高于正对照组、RES 组和 MHA 组($P < 0.05$)。

由表 4 可以看出,军曹鱼幼鱼摄食后 0.5 h 肠道 ATP 酶活性 MET 组显著高于其他各处理组($P < 0.05$),3 个微胶囊蛋氨酸处理组显著高于负对照组和 MHA 组($P < 0.05$),与正对照组差异不显著

表 2 微胶囊或晶体蛋氨酸对军曹鱼幼鱼消化酶活性

Tab.2 Effects of supplementation of microencapsulation or crystalline methionine on digestive enzyme activities of juvenile cobia

$n=3; \bar{x} \pm SD; U \cdot mg^{-1}$

处理组 group	胃蛋白酶 pepsin	胰蛋白酶 trypsin		淀粉酶 amylase	
	胃 stomach	肝脏 liver	肠道 intestine	肝脏 liver	肠道 intestine
正对照组 positive control	62.30±8.28 ^a	230.91±70.83 ^b	47.23±0.56 ^c	2.02±0.70 ^a	4.42±0.83 ^a
负对照组 negative control	24.30±3.45 ^{bcd}	469.25±23.31 ^b	75.82±0.10 ^b	1.96±0.62 ^a	5.40±0.11 ^a
晶体蛋氨酸 MET	36.06±3.92 ^b	560.39±215.05 ^b	63.91±10.95 ^{bc}	1.67±0.55 ^a	4.43±0.28 ^a
羟基蛋氨酸 MHA	35.43±4.14 ^{bc}	970.71±336.56 ^a	50.29±17.81 ^c	1.65±0.58 ^a	5.32±0.32 ^a
邻苯二甲酸酐纤维素包被蛋氨酸 CAP	21.36±0.03 ^{cd}	536.73±8.61 ^b	86.10±15.27 ^{ab}	2.34±0.39 ^a	4.46±0.19 ^a
树脂包被蛋氨酸 RES	58.94±2.94 ^a	258.46±87.39 ^b	81.58±12.57 ^{ab}	2.27±0.57 ^a	4.75±1.07 ^a
棕榈酸甘油酯包被蛋氨酸 TPA	19.62±12.94 ^d	190.52±96.05 ^b	100.62±7.13 ^a	2.15±0.28 ^a	4.75±0.83 ^a

注：同列数值肩标字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Values in the same column sharing different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

表 3 微胶囊或晶体蛋氨酸对军曹鱼幼鱼肝脏转氨酶和血清转氨酶活力

Tab.3 Effects of supplementation microencapsulation or crystalline methionine on transaminase activities in liver and γ -GT activities in serum of juvenile cobia

$n=3; \bar{x} \pm SD$

处理组 group	谷草转氨酶	谷丙转氨酶	GOT/GPT	转氨酶
	/(U·mg ⁻¹)GOT	/(U·mg ⁻¹)GPT		/(U·mg ⁻¹) γ -GT
正对照组 positive control	75.53±11.09 ^b	25.87±11.02 ^{ab}	2.33±0.34 ^c	21.01±2.55 ^c
负对照组 negative control	45.60±4.21 ^b	23.86±0.86 ^{ab}	2.75±1.428 ^c	22.88±4.95 ^{bc}
晶体蛋氨酸 MET	161.06±37.03 ^a	19.24±0.41 ^b	8.35±1.75 ^a	38.60±6.07 ^a
羟基蛋氨酸 MHA	43.02±1.68 ^b	31.62±6.96 ^{ab}	1.46±0.20 ^c	19.65±4.03 ^c
邻苯二甲酸酐纤维素包被蛋氨酸 CAP	49.53±25.46 ^b	27.96±14.40 ^{ab}	1.77±0.00 ^c	30.66±4.43 ^{ab}
树脂包被蛋氨酸 RES	65.26±32.52 ^b	41.05±7.03 ^a	1.54±0.53 ^c	21.69±6.80 ^c
棕榈酸甘油酯包被蛋氨酸 TPA	228.60±53.51 ^a	40.10±8.72 ^a	5.69±0.10 ^b	33.12±1.68 ^a

注：同列数值肩标字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Values in the same column sharing different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

($P>0.05$)；摄食 3 h 后正对照组和 RES 组 ATP 酶活性上升，显著高于 CAP 和 MHA 组 ($P<0.05$)；到摄食 6 h 时各处理组差异不显著；摄食 8 h 后 MHA 组和 MET 组无显著差异 ($P>0.05$)，但是显著低于其他处理组 ($P<0.05$)；摄食 12 h 后正对照组 ATP 酶活性下降，显著低于 MET 和 RES 组 ($P<0.05$)。表 5 表示各处理组在不同时间点时的 Na^{+} 、 K^{+} -ATP 酶活性。正对照组在摄食 0.5 h 和 12 h 后，肠道 Na^{+} 、 K^{+} -ATP 酶活性显著高于摄食后 3 h 和 6 h ($P<0.05$)，负对照组、CAP、MHA 和 RES 组在摄食 12 h 后 Na^{+} 、 K^{+} -ATP 酶活性上升到最高，MET 组和 TPA 组的变化趋势和正对照组相似。

3 讨论

3.1 军曹鱼幼鱼消化酶活性

蛋白质分解酶主要位于消化道的 3 个不同部

位，胃(分泌胃蛋白酶)、胰腺(分泌胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰肽酶等)和肠道(分泌黏膜和泡液酶)，主要降解蛋白质和多肽链^[26]。饲料中游离氨基酸和蛋白质结合态氨基酸在对肠道特定消化酶的刺激方面存在差异^[27]。本实验中 RES 组胃蛋白酶活性和正对照组差异不显著，却显著高于其余各组。Segovia- Quintero 等^[28]通过 ³⁵S 放射性活性测定显示，MET 组尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)在摄食 1 h 后胃部的放射性活性显著高于 TPA 和 CAP，但是随投喂时间的延长，处理组间没有差异。本实验中，胃的取样点是在空腹 24 h 后，因此认为在此时微胶囊蛋氨酸和晶体蛋氨酸处理对胃蛋白酶影响较小。但实验结果表明并非如此，MET 组胃蛋白酶活性显著高于 CAP 和 TPA 2 个微胶囊处理组，却显著低于 RES 组，可能与微胶囊壁材对芯材的缓释能力有关。包被壁材对芯材

表 4 微胶囊或晶体蛋氨酸对军曹鱼幼鱼肠道 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性在相同时间点的变化Tab.4 Effects of supplementation microencapsulation or crystalline methionine on changes of Na^+ , K^+ -ATP enzyme activities of juvenile cobia at the same time $n=3$; $\bar{x} \pm \text{SD}$; $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$

处理组 group	摄食后时间/h time after feeding				
	0.5	3	6	8	12
正对照组 positive control	1.71±0.16 ^{bc}	1.14±0.19 ^a	0.28±0.16 ^a	1.56±0.44 ^a	1.81±0.60 ^b
负对照组 negative control	1.27±0.36 ^c	1.06±0.47 ^{ab}	0.36±0.22 ^a	1.84±0.33 ^a	2.84±0.50 ^{ab}
晶体蛋氨酸 MET	3.51±0.95 ^a	0.90±0.32 ^{abc}	0.39±0.18 ^a	1.25±0.10 ^{ab}	3.99±1.20 ^a
羟基蛋氨酸 MHA	1.08±0.10 ^c	0.47±0.29 ^{bc}	0.45±0.08 ^a	0.48±0.48 ^b	1.92±0.42 ^b
邻苯二甲酸醋酸纤维素包被蛋氨酸 CAP	2.36±0.21 ^b	0.32±0.22 ^c	0.25±0.08 ^a	1.47±0.14 ^a	2.98±0.20 ^{ab}
树脂包被蛋氨酸 RES	1.82±0.25 ^{bc}	1.25±0.78 ^a	0.23±0.09 ^a	1.49±0.66 ^a	3.45±0.37 ^a
棕榈酸甘油酯包被蛋氨酸 TPA	2.24±0.43 ^b	0.98±0.19 ^{abc}	0.37±0.01 ^a	1.67±0.36 ^a	2.79±0.57 ^{ab}

注: 同列数值肩标字母不同表示差异显著($P<0.05$).Note: Values in same column sharing different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).表 5 微胶囊或晶体蛋氨酸对军曹鱼幼鱼肠道 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性在不同时间点的变化Tab.5 Effects of supplementation microencapsulation or crystalline methionine on changes of Na^+ , K^+ -ATP enzyme activities at different time of juvenile cobia $n=3$; $\bar{x} \pm \text{SD}$; $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$

处理组 group	摄食后时间/h time after feeding				
	0.5	3	6	8	12
正对照组 positive control	1.71±0.16 ^a	1.14±0.19 ^b	0.28±0.16 ^c	1.56±0.44 ^{ab}	1.81±0.60 ^a
负对照组 negative control	1.27±0.36 ^{bc}	1.06±0.47 ^{bc}	0.36±0.22 ^c	1.84±0.33 ^b	2.84±0.50 ^a
晶体蛋氨酸 MET	3.51±0.95 ^a	0.90±0.32 ^b	0.39±0.18 ^b	1.25±0.10 ^b	3.99±1.20 ^a
羟基蛋氨酸 MHA	1.08±0.10 ^b	0.47±0.29 ^b	0.45±0.08 ^b	0.48±0.48 ^b	1.92±0.42 ^a
邻苯二甲酸醋酸纤维素包被蛋氨酸 CAP	2.36±0.21 ^b	0.32±0.22 ^d	0.25±0.08 ^d	1.47±0.14 ^c	2.98±0.20 ^a
树脂包被蛋氨酸 RES	1.82±0.25 ^b	1.25±0.78 ^{bc}	0.23±0.09 ^c	1.49±0.66 ^b	3.45±0.37 ^a
棕榈酸甘油酯包被蛋氨酸 TPA	2.24±0.43 ^{ab}	0.98±0.19 ^{cd}	0.37±0.01 ^d	1.67±0.36 ^{bc}	2.79±0.57 ^a

注: 同行数值肩标字母不同表示差异显著($P<0.05$).Note: Values in same line sharing different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

蛋氨酸的释放速度能够影响消化道内总氨基酸的浓度, 进而可能影响胃蛋白酶对蛋白质的消化效率, 晶体蛋氨酸溶解速度快于包被组导致消化道内氨基酸的浓度高于其他各组。

胰蛋白酶由胰腺分泌到肠道发挥作用, 表 2 显示正对照组肠道胰蛋白酶活性显著低于微胶囊组, 甚至显著低于负对照组。鱼类幼体胰腺对胰蛋白酶的分泌受到缩胆囊素的调节^[29], 但是这一过程又间接受到饲料蛋白质水平和多肽链长度的调控^[30]。饲料蛋白源替代虽然是在等氮等能的基础上, 但是鱼粉被其他蛋白源替代后必然导致饲料中蛋白源质量的差异, 尽管补充氨基酸可以平衡鱼体的营养需求, 但是在一定程度由于蛋白源质量和多肽链长度发生变化而导致酶作用的底物

发生改变。负对照组的胰蛋白酶活性显著高于正对照组, 可能与原料组成不同有关, 蛋氨酸添加组、负对照组和正对照组在饲料原料上的差异主要是豆粕和肉骨粉含量的不同, 不同的蛋白源导致酶作用的底物和切割位点的不同。

3.2 军曹鱼幼鱼肝脏转氨酶和血清 γ -转肽酶活性

转氨酶是催化氨基酸氧化分解时将氨基转移到 α -酮酸的酶, GOT和GPT都主要存在于肝胰脏, 正常情况下主要存在于肝细胞内, 二者参与氨基酸的分解和合成。肝脏GOT活性升高, 尤其是GOT/GPT比值的升高表明氨基酸代谢旺盛, 蛋白质分解下降, 而合成代谢加强, 有利于氮在体内的蓄积^[31]。本实验MET组肝脏GOT活性显著高于正对照组和负对照组($P<0.05$), TPA微胶囊组则显

著高于MET和RES、CAP 2 个微胶囊蛋氨酸组 ($P<0.05$), 与正对照组差异不显著 ($P>0.05$), 表明本实验中添加MET和TPA均促进了氨基酸代谢和蛋白质合成, 氨基酸的添加形式在军曹鱼的养殖过程中似乎并不重要。MET组的GPT酶活性显著低于RES和TPA组 ($P<0.05$), GOT/GPT的变化趋势和GOT相同, 同样也符合军曹鱼幼鱼肌肉中蛋白质的沉积趋势^[32]。幼建鲤肝脏GOT活性并未因添加稳定化蛋氨酸或者DL-MET而产生显著性变化, 但是显著高于未添加组^[33], 和本实验结果类似。邓君明^[31]认为与未添加氨基酸组相比, 饲料中添加晶体氨基酸(CAA)或CAP-AA对牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)肝脏GOT和GPT活性均没有显著影响; 尽管GOT/GPT比值统计上差异也不显著, 但提高趋势比较明显。本实验的结果也证明饲料中补充晶体蛋氨酸即可促进蛋白质周转代谢, 有利于蛋白质沉积。

血清中的 γ -转氨酶主要来源于肝细胞中, 是肝脏损伤的重要指示酶, 当肝脏受损伤时, 血清中该酶活性上升^[34]。本实验中MET组的血清转氨酶活性和蛋氨酸包被组(CAP和TPA)相比未见显著性差异, MET组酶活性虽然最高, 但是在解剖时未发现该组肝脏在体积、颜色和外观上有别于其他组。提示血清 γ -转氨酶的活性仍然处于正常范围。邓君明^[31]对牙鲈饲喂不同氨基酸包被处理的饲料发现, 牙鲈血浆 γ -转氨酶无显著性变化。而本实验中RES组转体酶活性显著低于其他蛋氨酸微胶囊组, 提示该微胶囊处理可减缓肝脏中 γ -转氨酶向血中释放, 对肝脏有保护作用。

晶体氨基酸不能被有效利用的原因之一是其吸收速度较快, 导致过剩的氨基酸被氧化, 影响蛋白质利用效率和机体健康。可以通过减缓游离氨基酸在肠黏膜处的吸收速度来改善其利用率, 进而提高蛋白质的利用效率。可以考虑将蛋氨酸进行微胶囊化, 促使其吸收达到和结合态氨基酸同步。从转氨酶和转肽酶的活性分析, 军曹鱼幼鱼的养殖过程中添加晶体蛋氨酸即可满足其蛋白质氨基酸代谢需求, 若添加RES更有利于保护

肝脏。

3.3 军曹鱼幼鱼 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性

氨基酸的转运是通过与 Na^+ 和蛋白质识别结合由细胞外转运至细胞内, 为了维持细胞内 Na^+ 的低浓度, 再由钠泵将 Na^+ 泵出细胞, 并消耗ATP。在脊椎动物中, 这种转运与激活离子转运偶联, 依赖于 Na^+ 、 K^+ -ATP酶^[35], 鱼类氨基酸转运的能量来源主要依赖 Na^+ 浓度梯度^[36]。细胞内 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性的降低, 可能会引起细胞的离子跨膜转运障碍, 能量代谢和物质代谢的紊乱, 严重时会引起细胞的凋亡。蛋氨酸的吸收除了受到氨基酸侧链的影响以外, 还受到 Na^+ 离子浓度的影响^[37], 因此, Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性在一定程度上反映了蛋氨酸的吸收转运程度。

本实验中在不同时间点检测的 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性显示, 各处理组在12 h时 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性均达最高, 正对照组、MET组和TPA组在摄食0.5 h后 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性都显著升高, 而负对照组、CAP组、MHA组和RES组在0.5 h后该酶活性虽未到最高, 但是均高于3 h、6 h和8 h 这3个时间点, 提示无论军曹鱼幼鱼摄食的是鱼粉饲料还是添加微胶囊或晶体蛋氨酸的肉骨粉-豆粕饲料, 在摄食0.5 h后各处理组氨基酸的吸收均可达到峰值。

表4显示, 在相同时间点各处理组 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性变化有显著性差异。在0.5 h时MET组 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性显著高于其他各处理组, 提示晶体蛋氨酸的吸收比结合蛋白质快, Segovia-Quintero等^[28]指出尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)摄食0.5 h后前肠晶体蛋氨酸³⁵S放射性显著高于TPA和CAP包被的蛋氨酸, 与本实验结果相似; 在3 h时RES组和TPA组 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性上升, 提示微胶囊蛋氨酸的释放和吸收刺激了 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性; 在6 h时各处理组 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性都降低到最低值, 且差异不显著; 随后 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性逐渐升高, 12 h时达最高, 虽然各组间差异不显著, 但是微胶囊和晶体蛋氨酸处理组数值上均高于正对照组。这与尼罗罗非

鱼相似, 尼罗罗非鱼在摄食含有L- ^{35}S -蛋氨酸的饲料 12 h, 后晶体蛋氨酸组和CAP组中肠和后肠放射活性显著高于TPA组, 并且中肠和后肠 12 h 时的 ^{35}S 放射活性均高于 0.5 h、1 h、3 h和 6 h^[28]。所不同的是, 6 h时 ^{35}S 的放射活性并不是最低点, Segovia-Quintero等^[28]认为这是TPA包被蛋氨酸吸收较慢的体现, 本实验中通过 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性的测定, 也观察到类似的趋势, 即晶体蛋氨酸的 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性在 0.5 h和 12 h时均高于微胶囊蛋氨酸。提示晶体蛋氨酸吸收速度快于微胶囊蛋氨酸, 进而影响了该酶的活性, 证明了微胶囊蛋氨酸的缓释作用。

4 结论

本实验在军曹鱼低鱼粉饲料中添加晶体蛋氨酸即可满足其蛋白质氨基酸代谢需求, 而根据 Na^+ 、 K^+ -ATP酶活性测定结果显示, 微胶囊有助于蛋氨酸在肠道中的缓慢释放, 提高肠道内胰蛋白酶活性。游离氨基酸对鱼类应用是否有效不能一概而论, 因其影响因素较多。应该进一步进行剂量效应关系的研究, 从蛋白水平、能量水平、蛋白源和氨基酸添加形式着手分析, 调整游离氨基酸添加量和饲料蛋白质水平的关系, 改善游离氨基酸的利用效率, 充分发挥游离氨基酸的作用, 建立有效的蛋白质节约机制。

参考文献:

- [1] Craig S R, Gatlin D M III. Dietary lysine requirement of red drum (*Sciaenops ocellatus*) [J]. J World Maricult Soc, 1992, 23: 133–137.
- [2] Lall S P, Kaushik S J, Le Bail P Y, et al. Quantitative arginine requirement of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in sea water [J]. Aquaculture, 1994, 124: 13–25.
- [3] Li M H, Robinson E H. Effects of supplemental lysine and methionine in low protein diets on weight gain and body composition of young channel catfish *Ictalurus punctatus* [J]. Aquaculture, 1998, 163: 295–305.
- [4] Shiau S Y. Nutrient requirements of penaeid shrimp [J]. Aquaculture, 1998, 164: 77–93.
- [5] Alam M S, Teshima S, Koshio S, et al. Arginine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* estimated by growth and biochemical parameters [J]. Aquaculture, 2002, 205: 127–140.
- [6] Takagi S, Shimeno S, Hosokawa H, et al. Effect of lysine and methionine supplementation to a soy protein concentrate diet for red sea bream *Pagrus major* [J]. Fish Sci, 2001, 67: 1088–1096.
- [7] Rust M B, Hardy R W, Stickney R R. A new method for force-feeding larval fish [J]. Aquaculture, 1993, 116: 341–351.
- [8] Rust M B. Quantitative aspects of nutrient assimilation in six species of fish larvae [D]. Seattle: University of Washington, 1995.
- [9] Cahu C L, Zambonino Infante J L. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae [J]. Aquaculture, 2001, 200: 161–180.
- [10] Rumsey G L, Ketola H G. Amino acid supplementation of casein in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry and of soybean meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fingerlings [J]. J Fish Res Board Can, 1975, 32: 422–426.
- [11] Kaushik S J, Luquet P. Influence of bacterial protein incorporation and of sulphur amino acid supplementation to such diets on growth of rainbow trout [J]. Aquaculture, 1980, 19: 163–175.
- [12] Aoe H, Masuda I, Abe I, et al. Nutrition of protein in young carp: I. Nutritive value of free amino acids [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1970, 36: 407–413.
- [13] Pongmaneerat J, Watanabe T, Takeushi T, et al. Use of different protein meals as partial or total substitution for fish meal in carp diets [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1987, 59: 1249–1257.
- [14] Mazid M A, Tanaka Y, Katayama T, et al. Metabolism of amino acids in aquatic species: III. Indispensable amino acids for *Tilapia zillii* [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1978, 44: 739–742.
- [15] Viola S, Angeoni H, Lahav E. Present limits of protein sparing by amino acid supplementation of practical carp and tilapia feeds [J]. J Aquac Bamidgheh, 1994, 46: 203–211.
- [16] Lovell T. Nutrition of aquaculture species [J]. J Anim Sci, 1991, 69: 4193–4200.
- [17] Murai T, Ogata H, Hirasawa Y, et al. Portal absorption and hepatic uptake of amino acids in rainbow trout force-fed complete diets containing casein or crystalline amino acids [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1987, 53: 1847–1859.
- [18] Cowey C B, Luquet P. Physiological basis of protein re-

- quirements of fishes [M]// Arnal M, Pion R, Bonin D. Protein metabolism and nutrition Vol. I, Paris: INRA, 1983: 365–384.
- [19] Rønnestad I, Conceição L E C, Aragão C. et al. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in post-larval Senegal sole (*Solea senegalensis*) [J]. J Nutr, 2000, 130: 2809–2812
- [20] Villamar D, Langdon C J. Delivery of dietary components of larval shrimp (*Penaeus vannamei*) by means of complex micro capsules [J]. Mar Biol, 1993, 115: 635–642.
- [21] De la Higuera M, Garzón A, Hidalgo M C, et al. Influence of temperature and dietary-protein supplementation either with free or coated lysine on the fractional protein turnover rates in the white muscle of carp [J]. Fish Physiol Biochem, 1998, 18: 85–95.
- [22] Lovell T. Nutrition and Feeding of Fish [M]. New York: Van Nostrand-Reinhold, 1989: 260.
- [23] Stellmach B. Best immungs methoden enzyme. [M]. 钱嘉渊译. 北京:中国轻工业出版社, 1992: 329
- [24] Bernfeld P. Amylase [M]//Colowick S P, Kaplan N O. Methods in Enzymology. New York: Academic Press, 1955: 149–158.
- [25] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248–254.
- [26] Zambonino Infanta J L, Cahu C L. Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation [J]. Aquaculture, 2007, 268: 98–105.
- [27] Chiji H, Harayama K, Kiriya S. Effects of feeding rats low protein diets containing casein or soy protein isolate supplemented with methionine or oligo-L-methionine [J]. J Nutr, 1990, 120: 166–171.
- [28] Segovia-Quintero M A, Reigh R C. Coating crystalline methionine with tripalmitin-polyvinyl alcohol slows its absorption in the intestine of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Aquaculture, 2004, 238: 355–367.
- [29] Kurokawa T, Suzuki T, Andoh T. Development of cholecystokinin and pancreatic polypeptide endocrine systems during the larval stage of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Gen Comp Endocrinol, 2000, 120: 8–16.
- [30] Cahu C L, Rønnestad I, Grangier V, et al. Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolysed dietary protein; involvement of cholecystokinin [J]. Aquaculture, 2004, 238: 295–308.
- [31] 邓君明. 动植物蛋白源对牙鲆摄食、生长和蛋白质及脂肪代谢的影响[D].青岛: 中国海洋大学. 2006.
- [32] 迟淑艳. 低鱼粉饲料中添加微胶囊蛋氨酸或晶体蛋氨酸对军曹鱼和凡纳滨对虾生长性能的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [33] 帅柯. 蛋氨酸对幼建鲤消化功能和免疫功能的影响[D].雅安: 四川农业大学, 2006.
- [34] 李涛, 张永强, 刘利兵, 等. 腺苷蛋氨酸对大鼠乙醇肝损伤的预防作用[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(23): 2136–2137
- [35] Palacín M, Estévez R L, Bertran J B, et al. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid [J]. Physiol Rev, 1998, 78: 969–1054.
- [36] Balocco C, Bogé G, Roche H. Neutral amino acid transport by marine fish intestine: role of the side chain [J]. J Comp Physiol, 1993, 163B: 340–347.
- [37] Bogé G, Roche H, Balocco C. Amino acid transport by intestinal brush border vesicles of a marine fish, *Boops salpa* [J]. J Comp Biochem Physiol, 2002, 131B: 19–26.

Effect of supplementation microcapsule or crystalline methionine in diets on related enzyme activity of cobia (*Rachycentron canadum*)

CHI Shuyan, TAN Beiping, DONG Xiaohui, YANG Qihui, LIU Hongyu, XU Yuena, HUANG Hongyan

Laboratory of Aquatic Economic Animal Nutrition and Feed, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China

Abstract: The present study was conducted to compare the effect of microcapsule methionine or crystalline methionine in low-fishmeal diets on protein metabolism and digestive enzyme activities in cobia (*Rachycentron canadum*). Seven iso-nitrogen and iso-lipid diets, including fishmeal (positive control), low-fishmeal (negative control) and five types of methionine supplementation of crystalline L-methionine(MET), hydroxyl-methionine calcium(MHA), cellulose-acetate-phthalate coated methionine(CAP), resin coated methionine (RES) and tri-palmitin-polyvinyl alcohol coated methionine(TPA), respectively were prepared to investigate utilization of coated and crystalline methionine in intestine of juvenile cobia. Each treatment was randomly assigned to triplicate groups of 20 fish with initial weight of (5.40 ± 0.07) g per aquarium. Fish were maintained in flow-through aquaria for eight weeks at water temperature ranged from 29 to 31 °C. The results showed that trypsin activities of intestine of fish fed microcapsule methionine were significantly higher than those of fish fed crystalline methionine and the positive control diet ($P < 0.05$). Compared to positive and negative groups, fish fed the diets with MET and TPA had significant difference in liver GOT activities ($P < 0.05$). After feeding 0.5 h, Na^+ , K^+ -ATP activities in intestine of fish fed MET were significantly higher than those of fish in other groups ($P < 0.05$). After feeding 3 h, Na^+ , K^+ -ATP activities of fish fed RES and positive control diet increased and was higher than those of fish fed CAP and MHA, and those activities of fish fed positive control diets and microcapsule methionine were significantly higher than those of fish fed MHA and MET after feeding 8 h ($P < 0.05$). It could be concluded that cobia fed low fishmeal diet with crystalline methionine could improve their metabolism of amino acid and synthesis of protein. Microcapsule could contribute to control methionine release in intestine and enhance the activities of intestinal protease. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 110–118]

Key words: *Rachycentron canadum*; methionine; microcapsule; digestive enzyme; protein metabolism enzyme