

DOI: 10.12264/JFSC2022-0324

饲料中乙醇梭菌蛋白含量对草鱼肌肉品质、抗氧化能力和相关基因表达的影响

刘国庆^{1,2}, 周萌^{1,2}, 解绶启³, 谭青松^{1,2}

1. 华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070;

2. 水产养殖国家级实验教学示范中心, 湖北 武汉 430070;

3. 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072

摘要: 乙醇梭菌蛋白(*Clostridium autoethanogenum* protein, CAP)是一种新型细菌蛋白, 尚未见其对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肌肉品质影响的相关研究。本实验旨在揭示乙醇梭菌蛋白作为草鱼饲料中单一蛋白源时对肌肉品质所产生的影响。设计了 6 组不同乙醇梭菌蛋白含量饲料(蛋白质含量为 24.45%、27.31%、31.82%、35.79%、38.64%和 42.82%, 分别命名为 CAP1、CAP2、CAP3、CAP4、CAP5 和 CAP6), 以初始体重(4.56±0.01) g 的草鱼幼鱼进行 56 d 的养殖实验。结果如下: (1) CAP4 组草鱼空壳率、肌肉 pH 显著提升, 而肌肉蒸煮损失随蛋白质水平上升线性增加($P<0.05$); (2) 肌肉硬度、弹性、凝聚力、黏性、咀嚼力和回复力均随饲料蛋白质水平升高呈现先升高后降低的二次模型趋势($P<0.05$), 根据硬度估计最佳蛋白质水平为 33.53%; (3) 肌肉组织学显示 CAP4 组肌肉密度显著升高($P<0.05$); (4) 肌肉过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和总抗氧化能力(T-AOC)随着饲料蛋白质水平的增加而显著降低, 丙二醛(MDA)含量先下降后上升($P<0.05$); (5) 肌肉中 *myod*、*myog*、*myf5*、*mstn*、*fgf6a*、*fgf6b*、*myhc-2*、*myhc-4*、*tor*、*s6k1*、*nrf2*、*keap1a*、*ck2a*、*igf-I* 和 *igf1r* 的相对表达呈现二次模型变化($P<0.05$), CAP4 组中 *igf-II* 的相对表达水平显著高于 CAP2 组($P<0.05$), *myhc-7* 和 *myhc-I* 基因表达随饲料蛋白质水平呈线性上升趋势($P<0.05$)。本研究表明, 以乙醇梭菌作为蛋白源, 适宜饲料蛋白质水平(33.53%)可改善草鱼肌肉品质。

关键词: 草鱼; 乙醇梭菌; 抗氧化能力; 肌肉质地; 信号通路

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2023)02–0194–12

蛋白质是水产动物饲料中的主要成分, 我国水产饲料中使用的鱼粉和大豆等传统蛋白源严重依赖进口, 并且目前鱼粉和豆粕的价格分别达到约 13000 和 5000 元/t, 蛋白源紧张已限制了水产养殖业发展。为减少传统蛋白源的用量, 新型蛋白源得到广泛研究^[1]。乙醇梭菌蛋白(*Clostridium autoethanogenum* protein, CAP)是一种新型细菌蛋白源, 它是用乙醇梭菌以一氧化碳(CO)为原料通过液体发酵后加工得到^[2]。乙醇梭菌蛋白的粗蛋白含量高(80%以上), 氨基酸均衡, 富含赖氨酸、

蛋氨酸, 且不含抗营养因子, 易于水产动物消化吸收^[1]。并且, 我国每年至少产生 1.2 万亿立方米富含 CO 的工业尾气, 如果利用这些工业尾气则每年可以生产乙醇梭菌蛋白 1000 万 t, 相当于 2800 万 t 进口大豆。但是, 目前对乙醇梭菌蛋白的研究仍处于初步阶段, 尚未大规模应用。

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国重要的淡水养殖鱼类, 其食性广、肉质鲜嫩。随着人们生活水平的提升, 草鱼肉品质受到消费者关注。质地特性、蒸煮损失、pH 和抗氧化能力是重

收稿日期: 2022-09-23; 修订日期: 2022-11-17.

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2019YFD0900200).

作者简介: 刘国庆(1998–), 男, 硕士, 研究方向为水产动物营养与饲料. E-mail: 821457373@qq.com

通信作者: 谭青松, 男, 副教授, 研究方向为水产动物营养与饲料. E-mail: tanqs2000@163.com

要的肉质评价指标^[3-4]。有研究表明,以鱼粉和酪蛋白为蛋白源时,适宜的饲料蛋白质水平不但促进草鱼生长,还可以改善草鱼肌肉质地和抗氧化能力^[5]。当仅使用豆粕为蛋白源时,也发现适宜的蛋白质水平可提升草鱼肌肉品质^[6]。在草鱼中,关于乙醇梭菌蛋白的研究非常有限,魏洪城等^[1]认为添加 5%的乙醇梭菌蛋白替代豆粕可促进草鱼生长,维持草鱼健康^[1]。董立学等^[7]分别使用 CAP 和豆粕作为单一蛋白源对草鱼幼鱼(5.36 g)进行养殖试验,结果表明 CAP 可以达到与豆粕相近的饲料价值。同样,夏世森等^[8]研究发现草鱼(80 g)对 CAP 作为单一蛋白源的饲料利用能力与豆粕和小球藻蛋白相同,并且明显强于棉籽浓缩蛋白和黄粉虫。但是,尚未见 CAP 对草鱼肌肉品质影响的研究。此外,草鱼以 CAP 为单一蛋白源时,其蛋白质水平会如何影响草鱼肌肉品质值得研究,这将为合理使用 CAP 提供参考。

饲料中过量的乙醇梭菌蛋白使用可导致鱼类的氧化应激^[9]。氧化应激产生的自由基会损害肌肉细胞结构、改变新陈代谢和抑制风味前体的形成,对肉质产生不利影响^[10]。因此,以乙醇梭菌作为草鱼饲料白源时,应确定其适宜含量以免影响肌肉品质。使用新型蛋白作为单一蛋白源进行评估可以为水产饲料中的新型蛋白源的合理应用提供理论依据^[8]。并且 CAP 作为一种新型细菌蛋白,对水产动物的肌肉品质影响尚不清楚,所以本研究以 CAP 作为单一蛋白源,探究蛋白质水平对草鱼肌肉组织结构、营养成分、质构特性、抗氧化能力和基因表达的影响,从而评估 CAP 的营养价值,为 CAP 在草鱼饲料中应用提供参考,也为后续更多的研究做出重要铺垫。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

实验饲料配方和营养成分如表 1 所示。以 CAP 为蛋白源,配制 6 种蛋白质水平(24.45%、27.31%、31.82%、35.79%、38.64%和 42.82%)的实验饲料,分别命名为 CAP1、CAP2、CAP3、CAP4、CAP5、CAP6。CAP 由河北首朗新能源科技有限公司提供,含粗蛋白 84.21%、粗脂肪 0.19%、

表 1 不同蛋白质水平实验饲料配方和营养成分(以干物质百分比表示)

Tab. 1 Experimental feed formulations and nutritional components at different protein levels (expressed as percentage in dry matter)

成分 ingredient	饲料配方 feed formulation					
	CAP1	CAP2	CAP3	CAP4	CAP5	CAP6
乙醇梭菌蛋白 ¹ CAP ¹	27.50	31.90	36.33	40.72	45.20	49.55
豆油+鱼油(1 : 1)	6.79	6.79	6.79	6.79	6.79	6.79
soy oil: fish oil (1 : 1)						
玉米淀粉 corn starch	23.90	23.70	23.40	23.20	22.90	22.67
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	38.41	34.21	30.08	25.89	21.71	17.59
预混料 ² premix ²	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
磷酸二氢钙 calcium biphosphate	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80
50%氯化胆碱 choline chloride (50%)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
氧化钇 yttrium oxide	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
营养成分 proximate composition						
水分 moisture	1.92	1.68	2.00	1.76	3.83	3.80
粗蛋白 crude protein	24.45	27.31	31.82	35.79	38.64	42.82
粗脂肪 crude lipid	8.05	8.11	8.09	8.09	8.01	8.07
灰分 ash	3.91	4.14	4.08	3.96	4.29	4.38

注: ¹ CAP 营养成分(%): 粗蛋白, 84.21; 粗脂肪, 0.19; 水分, 7.14; 灰分, 3.27; 无氮浸出物, 5.19; 总磷, 0.92; 总能, 24.10 MJ/kg; 其氨基酸组成(%): 蛋氨酸, 2.29; 赖氨酸, 8.70; 精氨酸, 3.40; 胱氨酸, 0.71; 苏氨酸, 4.02; 色氨酸, 0.62; 异亮氨酸, 5.28; 亮氨酸, 6.38; 缬氨酸, 5.44; 组氨酸, 1.68; 苯丙氨酸, 3.30; 甘氨酸, 3.87; 丝氨酸, 3.21; 脯氨酸, 2.40; 丙氨酸, 4.63; 天门冬氨酸, 9.54; 谷氨酸, 9.78; 酪氨酸, 3.14; 氨基酸总和为 78.39。

² 为每千克饲料提供: 维生素 C 磷酸酯(35%), 900 mg; 维生素 E, 450 mg; 肌醇, 225 mg; 烟酰胺, 120 mg; 泛酸钙, 60 mg; 维生素 A, 30 mg; 维生素 K3, 30 mg; 维生素 B2, 22.5 mg; 维生素 B6, 22.5 mg; 维生素 D3, 15 mg; 维生素 B1, 15 mg; 叶酸, 15 mg; 维生素 B12, 120 μg; 生物素, 3 mg; 一水硫酸铁, 300 mg; 一水硫酸锌, 200 mg; 氯化钠, 100 mg; 一水硫酸锰, 25 mg; 五水硫酸铜, 30 mg; 氯化钴(10%钴), 5 mg; 亚硒酸钠(10%硒), 5 mg; 碘酸钾(2.9%), 3 mg; 硫酸镁, 900 mg。

Note: ¹ Nutrient composition (%) of CAP: crude protein, 84.21; crude lipid, 0.19; moisture, 7.14; ash, 3.27; nitrogen-free leachate, 5.19; total phosphorus, 0.92. CAP energy was 24.10 MJ/kg. Amino acid composition (%) of CAP: methionine, 2.29; lysine, 8.70; arginine, 3.40; cystine, 0.71; threonine, 4.02; tryptophan, 0.62; isoleucine, 5.28; leucine, 6.38; valine, 5.44; histidine, 1.68; phenylalanine, 3.30; glycine, 3.87; serine, 3.21; proline, 2.40; alanine, 4.63; aspartic acid, 9.54; glutamic acid, 9.78; tyrosine, 3.14; the total sum of amino acids was 78.39.

² Per kilogram of vitamin and mineral premix containing: L-ascorbate-2-monophosphate (35%), 900 mg; vitamin E, 450 mg; inositol, 225 mg; nicotinamide, 120 mg; calcium pantothenate, 60 mg; vitamin A, 30 mg; vitamin K3, 30 mg; vitamin B2, 22.5 mg; vitamin B6, 22.5 mg; vitamin D3, 15 mg; vitamin B1, 15 mg; folic acid, 15 mg; vitamin B12, 120 μg; biotin, 3 mg; ferrous sulfate monohydrate, 300 mg; zinc sulfate/sulphate monohydrate, 200 mg; Sodium chloride, 100 mg; manganese sulphate, 25 mg; copper (II) sulfate pentahydrate, 30 mg; cobaltous chloride (10% Co), 5 mg; sodium selenite (10% Se), 5 mg; potassium iodate (2.9%), 3 mg; magnesium sulphate, 900 mg.

水分 7.14%、灰分 3.27%、总能 24.10 MJ/kg。将原料粉碎后过 80 目筛, 称重, 用小型混合机(M-256, 华南理工大学实验机械厂)混匀后制成膨化饲料(原料水分为 21%, 膨化温度为 130 °C, 孔径 2.0 mm), 室温干燥后储存在-20 °C。

1.2 实验鱼和养殖试验

草鱼苗购自武汉市新洲渔场, 正式实验前暂养两周以适应试验条件。将 540 尾初始体重(4.56 ± 0.01) g 的草鱼随机分到 18 个缸, 每缸 30 尾鱼。每种饲料随机分配 3 个养殖缸。采用微流水养殖系统(每缸水体 300 L, 换水 1 L/min)养殖 8 周。养殖中采用自然光照, 每天投喂两次(08:30 和 15:30)至饱食, 用气石增氧使溶解氧含量在 6 mg/L 以上, 水温为 27~28 °C, pH 为 7.3。

1.3 样本采集

饲养试验结束时将鱼禁食 24 h。用 MS222 (75 mg/L, 阿拉丁, 上海)麻醉后, 从每缸随机取 5 尾鱼, 称全鱼重和去除内脏后空壳重以计算空壳率[空壳率(%)=100×空壳重/全鱼重], 然后取草鱼背部白肌样品, 一部分在液氮中速冻后储存于-80 °C, 用于 RNA 提取和酶活性测定; 另一部分用 4%多聚甲醛固定用于组织学观察。另取 3 尾鱼的肌肉分析其质构特性、pH 和蒸煮损失。此外, 每缸随机取 5 尾鱼在-20 °C下保存, 用于肌肉营养成分分析。所有操作均在冰上进行。

1.4 样品分析

1.4.1 营养成分测定 水分含量按国标 GB 5009.3 用 105 °C常压干燥法测定; 灰分按国标 GB 5009.4 用马弗炉灼烧法测定; 粗蛋白按 GB 5009.5 采用凯氏定氮仪 K9860 (海能, 济南)测定; 粗脂肪按 GB 5009.6 采用索氏抽提法测定。

1.4.2 背部白肌蒸煮损失、pH 和质构特性测定 用便携式 pH 计(HM-17MX, Toadkk, 日本)测定新鲜肌肉的 pH。根据文献[11]方法测定肌肉蒸煮损失[蒸煮损失(%)=100×(蒸煮后肌肉重-蒸煮前肌肉重)/蒸煮前肌肉重]。肌肉质构分析(TPA)使用 TA.XT Plus 分析仪(Stable Micro Systems, Godalming, 英国)测定, 检测参数如下: 探头为平底圆柱形 P/36R (直径 20 mm), 测试速度为 2 mm/s, 停

留时间为 5 s, 测试后的回程速度为 5 mm/s, 数据采集率为 200 pps。

1.4.3 肌肉组织学观察 固定后的白肌经不同梯度的乙醇脱水、二甲苯透明和石蜡包埋(56~58 °C)后, 用石蜡切片机(Leica RM2135)切成 7 μm 厚的薄片, 用苏木精-伊红(H&E)染色, 在光学显微镜下观察。使用 Image-Pro Plus (Version 6.0)软件测量肌纤维直径, 每个切片统计 4 个视野。

1.4.4 背部白肌抗氧化能力测定 解冻后称取白肌样品 100 mg, 与生理盐水按 1:9 体积混合, 冰浴中匀浆, 在 2500×g, 4 °C下离心 10 min, 收集上清液, 使用试剂盒(建成生物工程研究所, 南京)进行超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、总抗氧化能力(T-AOC)的活性和丙二醛(MDA)含量测定。

1.4.5 白肌基因表达测定 用 Trizol™试剂(Takara, 大连)从肌肉中提取总 RNA。随后, 用去 gDNA 的 PrimeScript RT 试剂盒(Yeasen, 上海)进行 cDNA 合成。参考 NCBI 数据库的序列设计实时定量 PCR (qRT-PCR)引物(表 2), 所有引物的扩增效率均在 90%~110%区间内。qPCR 使用 Unique Aptamer™ qPCR SYBR® Green Master Mix 试剂盒(Novogene, 天津)在 Light Cycler 480II 荧光定量仪(Roche, 瑞士)上进行检测。扩增程序为: 95 °C预变性 5 min, 95 °C变性 10 s, 55 °C退火 20 s 和 72 °C延伸 20 s, 40 个循环。本研究采用双内参法验证 *efl-α* 和 *β-actin* 在肌肉组织内表达稳定性后, 所有目的基因均以 *efl-α* 和 *β-actin* 为内参, 最后利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算基因相对表达量。

1.5 统计分析

数据表示为平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)。使用 SPSS 软件第 26 版(IBM, 美国)进行数据分析。对结果进行正态性和方差齐性检验后, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan's 多重比较来分析各组间的差异。显著性水平为 0.05。此外, 采用正交多项式对比拟合各指标与蛋白质水平的回归模型(以 R^2 判断), 并基于肌肉硬度值的二次函数估计草鱼饲料的适宜蛋白质水平。使用 GraphPad Prism 8 进行绘图。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列
Tab. 2 Real-time PCR primer sequences

基因名称 gene	正向引物 (5'-3') forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') reverse primer (5'-3')	登录号 accession number
<i>myod</i>	ATGGAGTTGTCGGATATTCCTTC	GCGGTCAGCGTTGGTTGTT	MG544985
<i>myog</i>	TTACGAAGGCGGCGATAACTT	TGGTGAGGAGACATGGACAGA	JQ793897
<i>myf5</i>	GTGCCTGTGCCTCATCTCCT	AATGCGTGTTTACCTTCTTCA	GU290227
<i>myf4</i>	TCGCTCCTGTATTGATGTTGATGA	GCTCCTGTCTCGCATTCGTT	KT899334
<i>fgf6a</i>	CGCATACGAGTCTTCCAT	CCTACGAGAACATCCAACA	MK050993
<i>fgf6b</i>	TCCAGTCCGCTTCCGAGTA	AGATGAAACCCGATGCCTACA	MK050992
<i>mstn</i>	CTGACGCCAAGTTCCACATACA	CGACTCTGCTTCAAGTTCTTCTCT	KP719016
<i>myhc-7</i>	AACTGCGCTGTAAACGGTGTA	AGTGTGCCAAACCTGTACT	MW113233
<i>myhc-2</i>	ACAGTGGCCAGCATTGATGA	TCCGCAGAGTTCAAACCCAA	MW113235
<i>myhc-4</i>	ACTCCGCTGACATGCTGAAA	TGTCCAGCACACCAATGAAGA	MW113236
<i>myhc-1</i>	TTCCGTTGTTGTGTCAGGCT	TACTGGATGACGCGTTTGGT	MW113234
<i>tor</i>	TCCCACTTTCCACCAACT	ACACCTCCACCTTCTCCA	JX854449
<i>s6k1</i>	ACATAAAGCAGCCTGACG	TGGAGGAGGTAATGGACG	EF373673
<i>4e-bp1</i>	GCTGGCTGAGTTTGTGGTTG	CGAGTCGTGCTAAAAAGGGTC	KT757305
<i>igf- I</i>	GTGTGGAGACAGGGGCTTTTA	CGTAGGGATCGTGGAGATTG	EU051323
<i>igf- II</i>	TCTGTGGCAGTCCTCAACAAC	TTCCGCAACTTCTTCGCTCTT	EF062860
<i>igf1r</i>	TGTGGTGCGTCTACTGGGC	TGGAGGTGTTCTCAGCGGA	EU816193
<i>nrf2</i>	TGGACGAGGAGACTGGAGAG	TGGTAGGTGGAACGGAAACAT	KF733814
<i>keap1a</i>	GCTTCCAGAGAGTCCAGAGAG	CTTCAGCCAGATGTTCTTCCTC	KF811013
<i>ck2a</i>	GCCAGCCCTTGTGTTGAAT	TGTGAGGTTTGACATCCCGA	KJ729126
β -actin	TATGTTGGTGACGAGGCTCA	GCAGCTCGTTGTAGAAGGTG	M25013
<i>ef1a</i>	TGACTGTGCCGTGCTGAT	CGCTGACTTCCTTGGTGATT	GQ266394

2 结果与分析

2.1 饲料蛋白质水平对草鱼背部白肌营养成分影响

如表 3 所示,乙醇梭菌蛋白作为蛋白源时,饲料蛋白质水平不影响草鱼背部白肌的水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分($P>0.05$)。

2.2 饲料蛋白质水平对草鱼背部白肌空壳率、蒸煮损失和 pH 的影响

如图 1 所示,草鱼白肌空壳率($R^2=0.595$)和 pH ($R^2=0.571$)均随饲料蛋白质水平增加呈二次模型变化,且均在 CAP4 组达到最大值($P<0.05$)。白肌蒸煮损失呈线性上升趋势($R^2=0.816$),CAP6 组显著高于其他组,CAP4 组和 CAP5 组其次($P<0.05$)。

表 3 饲料乙醇梭菌蛋白质水平对草鱼背肌营养成分的影响(以鲜重计)
Tab. 3 Effects of dietary *Clostridium autoethanogenum* protein levels on dorsal muscle proximate composition of *Ctenopharyngodon idellus* (on fresh-weight basis)

项目 item	饲料蛋白质水平 dietary protein level						$n=3; \bar{x} \pm SE; \%$
	CAP1	CAP2	CAP3	CAP4	CAP5	CAP6	
水分 moisture	78.44±0.70	79.26±0.60	79.50±0.59	79.20±0.68	79.83±0.16	79.48±0.41	
粗蛋白 crude protein	18.40±0.76	18.41±0.46	18.24±0.46	18.30±0.50	17.89±0.15	18.07±0.28	
粗脂肪 crude lipid	2.40±0.15	2.57±0.27	2.55±0.04	2.67±0.04	2.56±0.09	2.46±0.33	
灰分 ash	0.45±0.01	0.46±0.03	0.43±0.02	0.41±0.03	0.39±0.01	0.46±0.03	

注: 同行数据无上标表示组间不存在显著差异($P>0.05$).
Note: No superscript in the peer data indicates that there is no significant difference between the groups ($P>0.05$).

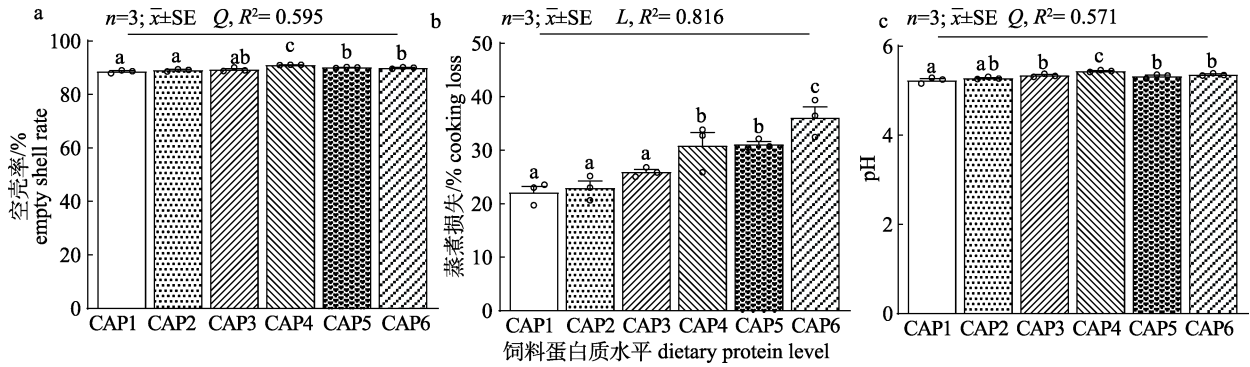


图 1 饲料乙醇梭菌蛋白水平对草鱼空壳率(a)、蒸煮损失(b)和肌肉 pH (c)的影响

不同上标的平均值差异显著($P<0.05$). L 表示线性模型($P<0.05$); Q 表示二次函数模型($P<0.05$).

Fig. 1 Effects of dietary *Clostridium autoethanogenum* protein level on empty shell rate (ESR) (a), cooking loss (b) and muscle pH (c) of *Ctenopharyngodon idellus*. Mean values not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$). L indicates linear model ($P<0.05$); Q indicates quadratic model ($P<0.05$).

2.3 饲料蛋白质水平对草鱼背部白肌质构特性的影响

如图 2 所示, 乙醇梭菌蛋白作为蛋白源时, 肉质指标, 包括硬度、弹性、凝聚力、黏性、咀嚼力和回复力, 均随饲料蛋白质水平增加呈先升高后降低的二次模型($P<0.05$, $R^2=0.742$ 、0.567、

0.455、0.864、0.664 和 0.748)。并且, 在 CAP4 组中检测到硬度、弹性、黏性和回复力的最大值, 在 CAP3 组中发现了凝聚力和咀嚼力的峰值。

根据硬度值与饲料蛋白质水平的二次函数关系, 求得肌肉硬度值最大时的饲料蛋白质水平为 33.53% (图 3)。

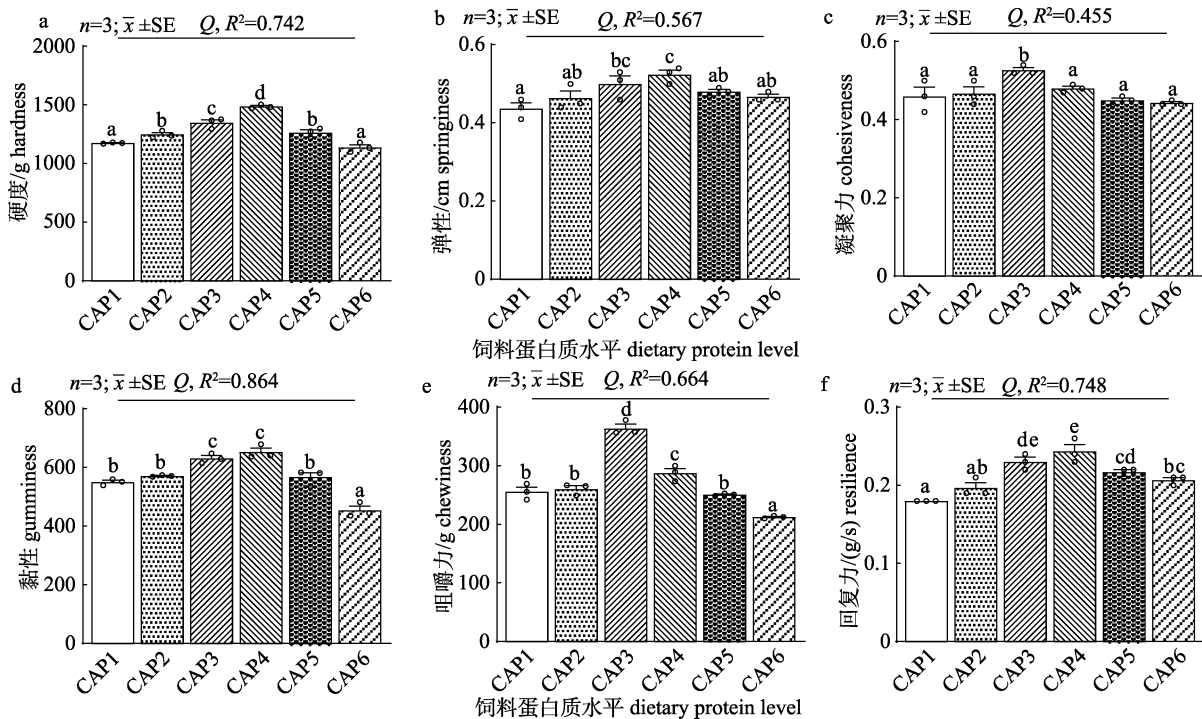


图 2 饲料乙醇梭菌蛋白质水平对草鱼背部白肌质构特性的影响

a-f 依次为硬度、弹性、凝聚力、黏性、咀嚼力和回复力。不同上标的平均值差异显著($P<0.05$). Q 表示二次函数模型($P<0.05$).

Fig. 2 Effects of dietary *Clostridium autoethanogenum* protein levels on the texture properties of dorsal white muscle of *Ctenopharyngodon idellus*

a-f represent hardness, springiness, cohesiveness, gumminess, chewiness and resilience in order. Mean values not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$). Q indicates quadratic model ($P<0.05$).

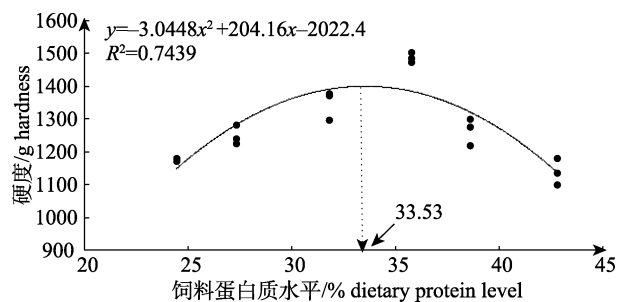


图 3 饲料乙醇梭菌蛋白质水平与草鱼肌肉硬度的回归分析
Fig. 3 Regression analysis of dietary *Clostridium autoethanogenum* protein level and muscle hardness of *Ctenopharyngodon idellus*

2.4 饲料蛋白质水平对草鱼背部白肌组织学的影响

如图 4a 所示, 乙醇梭菌蛋白作为蛋白源时, 饲料蛋白质水平影响草鱼背部白肌微观结构, CAP1、CAP2、CAP5 和 CAP6 组的肌纤维直径较大, 而 CAP3 和 CAP4 组直径较小。且肌纤维直径和肌纤维密度呈现二次模型($P < 0.05$, $R^2 = 0.830$ 和 0.644), CAP4 组检测到最小平均肌纤维直径和最大肌纤维密度(图 4b、c)。

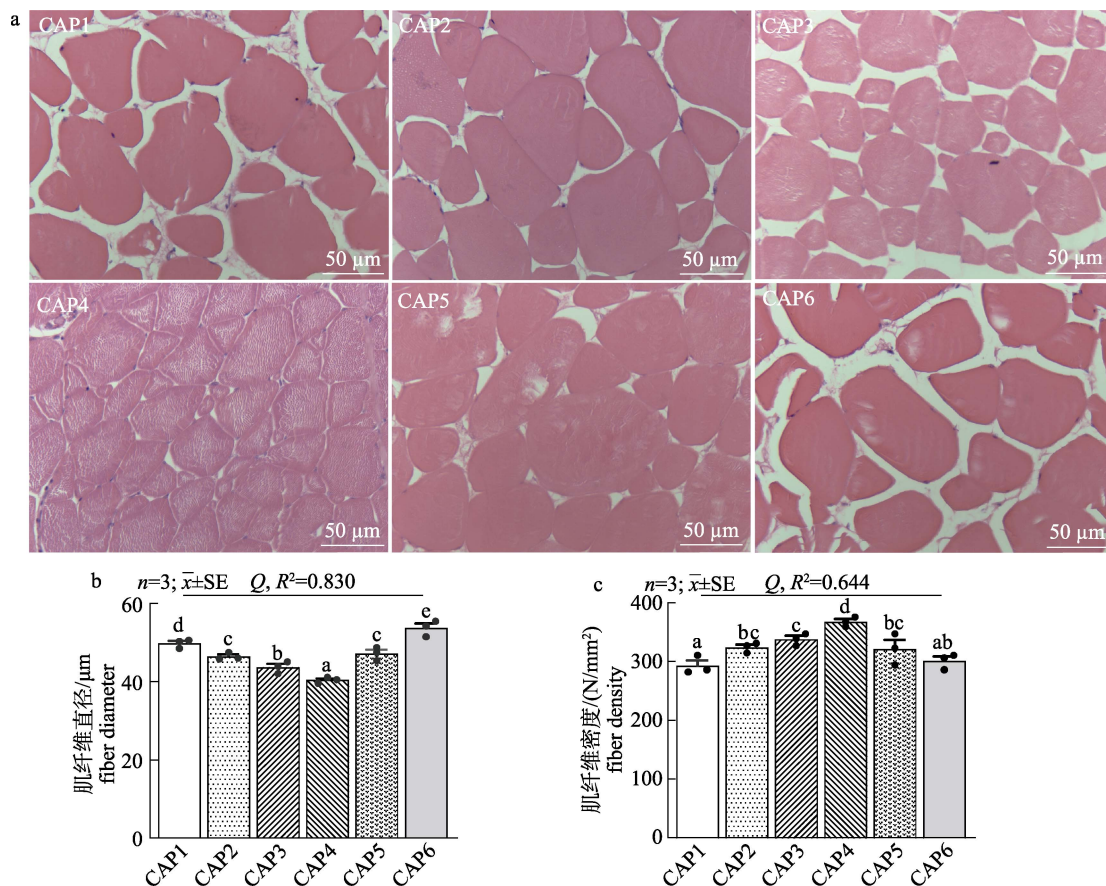


图 4 不同饲料乙醇梭菌蛋白质水平饲喂 8 周后草鱼的肌肉组织形态学

a. 草鱼白肌肌纤维显微结构(苏木精伊红); b. 肌纤维直径(μm); c. 肌纤维密度(N/mm^2). 不共用上标的平均值差异显著($P < 0.05$). Q 表示二次函数模型($P < 0.05$).

Fig. 4 Morphological observation of muscle tissue of *Ctenopharyngodon idellus* fed with different *Clostridium autoethanogenum* dietary protein levels for 8 weeks

a. Observation on muscle fiber of white muscle in grass carp (hematoxylin and eosin, $\times 400$); b. The muscle fiber diameter (μm); c. The muscle fiber density (N/mm^2). Mean values not sharing a common superscript are significantly different ($P < 0.05$). Q indicates quadratic model ($P < 0.05$).

2.5 饲料蛋白质水平对草鱼背部白肌抗氧化能力的影响

如图 5 所示。肌肉中过氧化氢酶、超氧化物歧化酶活性和总抗氧化能力随着饲料蛋白质水平增加而线性降低($P < 0.05$, $R^2 = 0.699$ 、0.437 和

0.496)。丙二醛含量呈先下降后上升的二次模型($P < 0.05$, $R^2 = 0.653$)。

2.6 草鱼背部白肌基因表达

如图 6 所示, *myod*、*myog*、*myf5*、*mstn*、*fgf6a*、*fgf6b*、*myhc-2*、*myhc-4*、*tor*、*s6k1*、*nrf2*、*keap1a*、

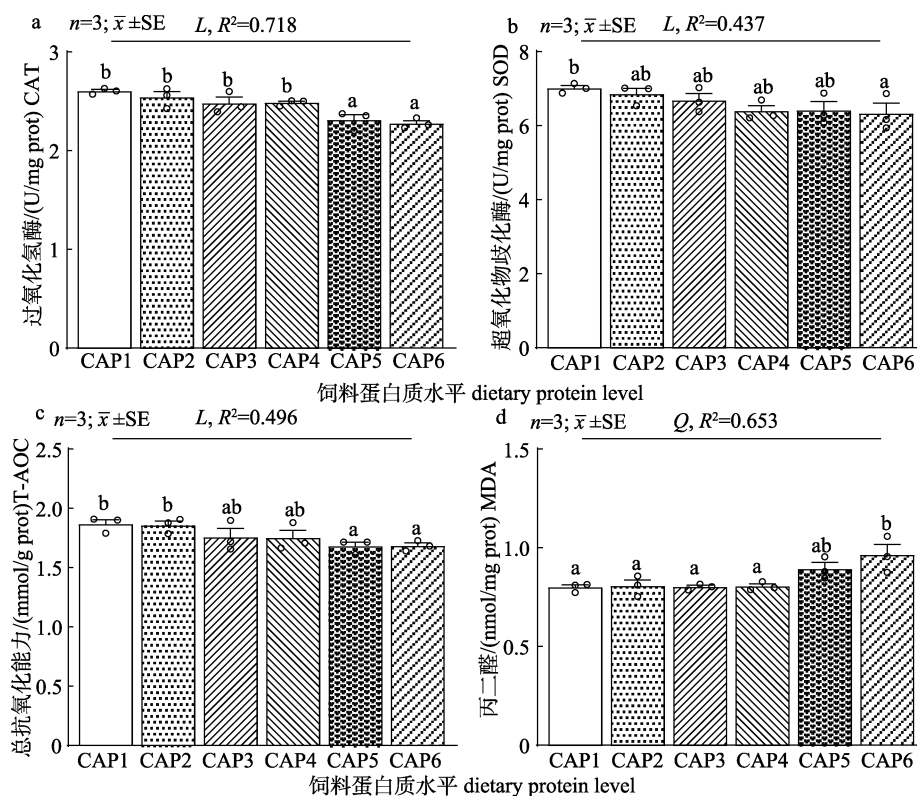


图 5 饲料乙醇梭菌蛋白质水平对草鱼背部白肌抗氧化能力的影响

a. 过氧化氢酶(U/mg prot); b. 超氧化物歧化酶(U/mg prot); c. 总抗氧化能力(mmol/g prot); d. 丙二醛(nmol/mg prot). 不同上标的平均值差异显著($P<0.05$). L 表示线性模型($P<0.05$); Q 表示二次函数模型($P<0.05$).

Fig. 5 Effects of dietary *Clostridium autoethanogenum* protein level on the antioxidant capacity in the dorsal white muscle of *Ctenopharyngodon idellus*

a. Catalase (U/mg prot); b. Superoxide dismutase (U/mg prot); c. Total antioxidant capacity (mmol/g prot); d. Malondialdehyde (nmol/mg prot). Mean values not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$). L indicates linear model ($P<0.05$); Q indicates quadratic model ($P<0.05$).

ck2a、*igf-I* 和 *igf1r* 在肌肉中的表达呈现二次模型变化($P<0.05$, $R^2=0.641$, 0.608 , 0.682 , 0.625 , 0.409 , 0.671 , 0.778 , 0.434 , 0.507 , 0.446 , 0.656 , 0.748 , 0.681 , 0.502 和 0.344)。此外, 在 CAP4 组中检测到 *igf-II* 的相对表达水平显著高于 CAP2 组($P<0.05$)。 *myhc-7* 和 *myhc-1* 基因表达随饲料蛋白质水平呈线性上升趋势($P<0.05$, $R^2=0.499$ 和 0.487), 而各组 *4e-bp1* 和 *mrf4* 表达水平无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 适宜蛋白质水平提高草鱼可食部分比例

近年来, 鱼肉品质越来越受到人们的关注。鱼体的可食部分比例和肌肉营养成分是消费者关注的鱼肉品质特征。本研究中, 空壳率随饲料蛋白质水平增加呈二次模型变化, 适宜饲料蛋白质水平(CAP4, 35.79%)下草鱼空壳率最高, 鱼体可

食用部分比例最高。这与胡毅等^[12]的研究结果相类似, 草鱼的脏体比随饲料中蛋白质水平升高呈降低趋势。众所周知, 肌肉是鱼体可食部分的最主要组成, 鱼体可食用部分增加主要依靠肌肉生长, 包括肌纤维的生成和肥大^[13]。肌源性调节因子 MRFs (包括 *myod*、*myog*、*myf5* 和 *mrf4*) 在卫星细胞活化、成肌细胞增殖和肌纤维肥大中起关键作用^[14-15]。本研究中, 相比于低蛋白饲料组和高蛋白饲料组, CAP4 组草鱼显著上调肌肉中 *myod*、*myf5* 和 *myog* mRNA 表达, 这表明适当的饲料蛋白水平可以通过增加肌细胞增殖和分化来促进肌肉发育。此外, *mstn* 基因是转化生长因子 β 超家族的成员, 主要作用是限制肌肉生长^[16]; 而 *fgf6* 与草鱼肌纤维增殖和肥大密切相关^[11]。本实验中, 草鱼肌肉 *mstn* 基因随蛋白质水平呈先下降后上

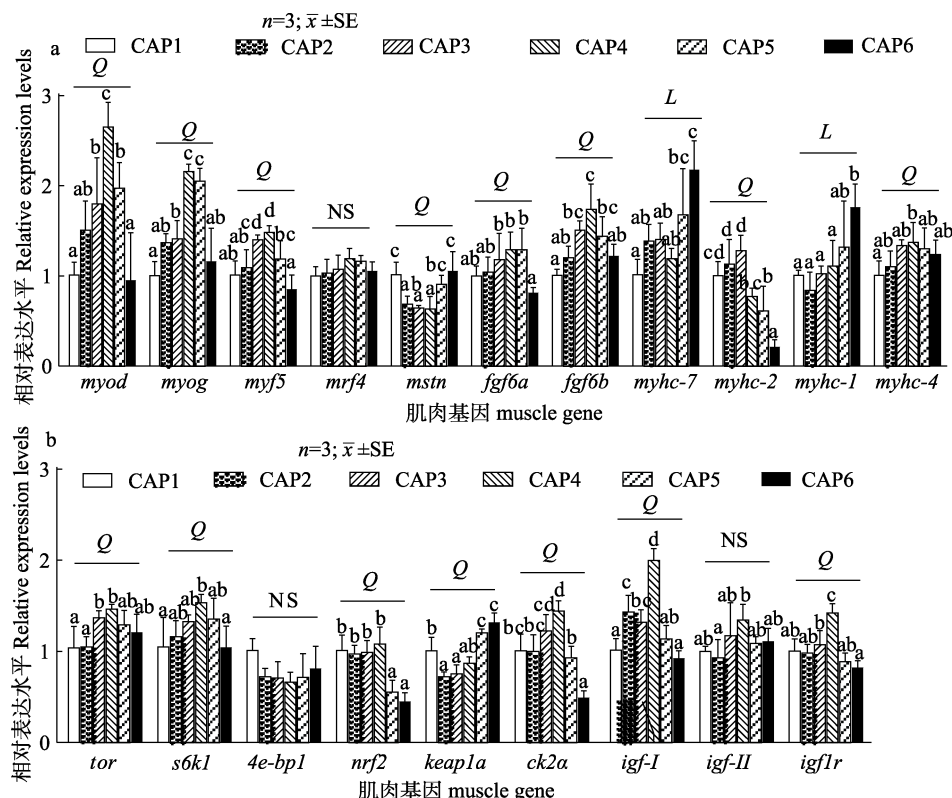


图6 不同饲料乙醇梭菌蛋白质水平饲喂8周后草鱼肌肉基因表达情况

a. 肌源性调节因子(*myod*、*myog*、*myf5* 和 *mrf4*)、*mstn*、*fgf6a*、*fgf6b* 和肌球蛋白重链(*myhc-7*、*myhc-2*、*myhc-1* 和 *myhc-4*)的基因表达。b. *tor*、*s6k1*、*4e-bp1*、*nrf2*、*keap1a*、*ck2a*、*igf-I*、*igf-II*、*igf1r* 的基因表达。用于检测基因 *myhc-2* 和 *myhc-4* 的 cDNA 稀释 180 倍, 其他稀释 6 倍。不同上标的平均值差异显著 ($P < 0.05$)。

Ns 表示无模型 ($P > 0.05$); L 表示线性模型; Q 表示二次函数模型。

Fig. 6 Muscle genes expression of *Ctenopharyngodon idellus* fed with different dietary *Clostridium autoethanogenum* protein levels for 8 weeks

a. Gene expression of myogenic regulatory factors (*myod*, *myog*, *myf5*, and *mrf4*), *mstn*, *fgf6a*, *fgf6b*, and myosin heavy chain (*myhc-7*, *myhc-2*, *myhc-1*, and *myhc-4*) in muscle. b. Gene expression of *tor*, *s6k1*, *4e-bp1*, *nrf2*, *keap1a*, *ck2a*, *igf-I*, *igf-II*, *igf1r* in muscle. The cDNAs used to detect genes *myhc-2* and *myhc-4* were diluted 180 times, and others were diluted 6 times. Means values not sharing a common superscript are significantly different ($P < 0.05$).

Ns indicates no structure ($P > 0.05$); L indicates linear model; Q indicates quadratic model.

升的趋势, 而 *fgf6* 则呈相反趋势, 这进一步表明 CAP4 (35.79%) 蛋白质水平对肌肉生长的促进作用。这与 Wang 等^[6]使用豆粕作为单一蛋白源时研究结果相一致。

肌肉生长还依赖于一些信号通路的激活。Pozios 等^[17]发现, *igf-I* 和 *igf-II* 在斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 中通过与 *igf1r* 结合促进肌肉生长。同时, Zhao 等^[13]研究表明 *Igf-I* 可以激活促进肌肉蛋白质合成的 AKT-TOR-S6K1 通路。在本研究中, 肌肉中 *igf* (*igf-I*、*igf-II*、*igf1r*)、*tor* 和 *s6k1* 的基因表达呈现出相似的先上升后下降的表达谱, 这表明适宜水平乙醇梭菌蛋白 (CAP4, 35.79%) 促进草鱼肌肉生长可能是通过上调 *igf* 进而激活 *tor* 相关

通路。这一具体分子调节机制值得进行深入研究。

本研究中, 以乙醇梭菌蛋白为蛋白源时, 饲料蛋白质水平对草鱼肌肉营养成分无显著影响。这与 Xu 等^[5]使用鱼粉和酪蛋白作为蛋白源时的研究结果相一致。

3.2 适宜蛋白质水平提升草鱼肌肉持水性和质构特性

低蒸煮损失意味着肌肉具有良好的持水能力和多汁性^[18]。本研究中, 蒸煮损失随蛋白质水平升高线性增加。这与 Dong 等^[19]的结果相一致。但是, Wang 等^[6]的研究结果表明, 蒸煮损失与饲料蛋白质水平呈抛物线关系。上述结果表明, 蒸煮损失随蛋白质水平的变化趋势会受到饲料蛋白

质类型的影响,其具体作用机理还有待进一步研究。此外,本实验中蒸煮损失整体上高于 Wang 等^[6]使用豆粕、Dong 等^[19]使用混合蛋白源时不同饲料蛋白质水平处理下草鱼肌肉的蒸煮损失(分别为 14.84%~20.20%以及 22.78%~26.86%)。由此推测,乙醇梭菌蛋白相对于传统蛋白源会增加肌肉的蒸煮损失。同时,这些结果也说明可以通过饲料蛋白质水平和蛋白源类型来调控肌肉的持水能力和多汁性。

肌肉 pH 也是重要的肉质参数^[20]。由肌糖原储备厌氧水解产生的乳酸积累,会降低肌肉 pH^[21],增加烹饪损失^[22-23],从而不利于水产品的口感和储存。关于蛋白质水平对肌肉 pH 的影响研究尚不多见。Wang 等^[6]研究表明以豆粕作为饲料蛋白源时,肌肉 pH 在适宜饲料蛋白水平(32.26%)可以提升至 5.36 左右。本研究中,肌肉 pH 在 CAP4 组中达到最大值(5.44),这表明适当的乙醇梭菌蛋白水平(35.79%)同样可以通过提高 pH 改善草鱼肉质,并且效果可能优于豆粕。

质构特性是评价水产品品质的重要参数。肌肉硬度是研究人员和消费者最关注的一项肌肉质构参数^[24]。较高的鱼肉硬度代表水产品肉质的改善^[4,25],而硬度降低会影响消费者的满意程度和选择性^[3]。本研究中,相对于其他处理组,CAP4 组的硬度、弹性、黏性和回复力均为最大值,且硬度高达 1487.1 g。这一数值高于 Wang 等^[6]使用豆粕作为蛋白源时得到的草鱼肌肉硬度最高值(877.81 g),同样高于 Xu 等^[15]使用蚕豆作为蛋白源时得到的脆草鱼肌肉硬度值(660.44 g)。这在一定程度上表明适当的 CAP 水平对于肌肉质地提升的效果优于豆粕和蚕豆。当然,这还有可能受到鱼体规格、养殖环境等因素的影响,这些都有待进一步探索。根据肌肉硬度值与饲料蛋白质水平进行回归分析得出,本研究中的草鱼饲料适宜蛋白质水平为 33.53%。众所周知,通过喂食蚕豆可以得到肌肉硬度极高的脆草鱼,其形成的主要机制是蚕豆中含有的 L-3,4-二羟基苯丙氨酸会对机体造成损伤,而草鱼在不断的对抗氧化损伤过程中肌肉得到了脆化^[26]。本研究中草鱼肌肉硬度的提升是否通过相似的脆化机制值得研究。值得注

意的是,肌肉密度与肌纤维直径呈负相关关系^[27]。本研究通过切片观察和肌纤维统计发现,高、低蛋白质水平均募集了更多的大直径肌纤维进而降低肌纤维密度;而在 CAP4 组(35.79%)可能通过增加新肌纤维的增生,募集更多的小直径肌纤维进而增加了肌纤维密度。而肌肉硬度受到肌纤维密度的影响,与肌纤维密度呈正相关^[19,24]。这也说明,本研究中适当的蛋白质水平(35.79%)可能正是通过这种减小肌纤维平均直径、增加肌纤维密度的机制,从而改善肌肉硬度。这与 Wang 等^[6]和 Dong 等^[19]有关草鱼肌肉品质的研究结果相一致。

3.3 适宜蛋白质水平缓解草鱼肌肉氧化损伤

肌肉抗氧化能力是与水产品肉质相关的重要指标^[6,20]。抗氧化能力下降会引起氧化损伤,导致体内自由基的积累,影响肌肉细胞结构、新陈代谢和风味前体的形成,从而降低肉质^[10]。CAT、SOD 和 T-AOC 酶活性是评估抗氧化能力的重要参数,而 MDA 含量是反映机体氧化损伤的指标^[6]。Nrf2 信号通路可以调节抗氧化酶的基因表达,Nrf2 易位进入细胞核,启动抗氧化酶的基因转录^[28]。而 Keap1 是一种细胞质 Nrf2 结合蛋白,Keap1 与 Cul3 形成泛素 E3 连接酶复合物,并使 Nrf2 泛素化,进而通过蛋白酶体系统快速降解 Nrf2,从而抑制抗机体氧化酶系统^[29]。本实验发现,nrf2 及其下游靶基因的转录变化和酶活性随饲料蛋白质变化的规律存在差异,在酶水平上,饲料蛋白质水平与肌肉抗氧化酶的活性呈负相关;但 MDA 并未线性增加,而是在 CAP4 组表现最低,相应地,在转录水平上,适宜蛋白质水平(CAP4)显著上调肌肉 nrf2 通路相关基因表达。这可能意味着适宜蛋白质水平激活了 nrf2 通路试图改善抗氧化酶性能,而相关酶和蛋白质的反应可能相对滞后。这与 Bao 等^[30]的研究结果相类似,当食蚊鱼(*Gambusia affinis*)暴露于双氯芬酸 168 h 时,诱导 nrf2 下游基因 cat 和 sod2 试图发挥防御作用,但相应的酶活性在 168 h 时没有显著变化。本研究中,适宜蛋白质水平通过上调 nrf2 相关通路来缓解氧化损伤,从而降低 CAP4 组的 MDA 含量,而过量的饲料蛋白质处理组通过高表达 keap1,从而下调 nrf2 相关基因、削弱了抗氧化能力,导致肉质变

差。这与 Xu 等^[5]和 Wang 等^[6]的研究结果相一致。此外, Okouchi 等^[31]研究表明 mTOR 可以调节人类细胞中 Nrf2 的表达; Bliesath 等^[32]证明 *ck2* 具有激活 *mtor* 通路的作用。这也进一步说明, 本研究中 *tor* 和 *ck2a* 高表达可能在促进 CAP4 组草鱼肌肉生长的同时, 还改善了草鱼肌肉的抗氧化能力, 从而提升草鱼肉质。

3.4 适宜蛋白质水平通过肌球蛋白重链影响草鱼肉质

肌球蛋白重链异构体(myosin heavy chain isoforms, myhcs)与肉品质具有密切联系。在水产动物中发现, IIB 型重链基因(*myhc-4*)表达水平与肌肉硬度呈正相关关系^[6]。本实验中 CAP4 组草鱼肌肉硬度最大, 且肌肉 II 型肌纤维中 IIX 型(*myhc-1*)和 IIB 型(*myhc-4*)基因相对表达量较高, 与前述正相关结果相符合。这种基因表达模式的变化意味着适宜饲料蛋白质水平可促进 II 型肌纤维的表达, 进而提高肌肉硬度。值得注意的是, Kong 等^[27]研究发现, 在草鱼饲料中使用 20.6% 的干酒糟及其可溶物(DDGS)替代棉籽粕时, 虽然促进了 *myhc-1* 和 *myhc-4* 的基因转录水平, 但肌纤维密度和肌肉硬度同时降低。这些差异结果表明, 肌肉硬度的影响因素是多方面的和多途径的, 肌纤维类型只是其中的一个因素, 且存在各种影响因素的作用强弱差异。总体来说, 肌纤维类型与鱼肉品质关系的研究还很有限。关于营养对于鱼肉品质的调节作用, 后期还值得从肌球蛋白重链影响鱼类肉质的机制方面进行深入的研究。

4 结论

本研究表明, 乙醇梭菌作为蛋白源时, 适宜饲料蛋白质水平(35.79%)可通过提高 pH、肌肉质地和肌纤维相关基因表达, 降低脂质过氧化物含量, 进而改善草鱼肌肉品质。根据肌肉硬度与饲料蛋白质水平进行回归分析, 估计最佳蛋白质水平为 33.53%。

参考文献:

[1] Wei H C, Yu H H, Chen X M, et al. Effects of soybean meal replaced by *Clostridium autoethanogenum* protein on growth performance, plasma biochemical indexes and hepatopancreas and intestinal histopathology of grass carp (*Ctenopharyngodon*

idllus)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(10): 4190-4201. [魏洪城, 郁欢欢, 陈晓明, 等. 乙醇梭菌蛋白替代豆粕对草鱼生长性能、血浆生化指标及肝胰脏和肠道组织病理的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(10): 4190-4201.]

[2] Jiang X R, Yao W X, Yang H, et al. Dietary effects of *Clostridium autoethanogenum* protein substituting fish meal on growth, intestinal histology and immunity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) based on transcriptome analysis [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021, 119: 635-644.

[3] Cheng J H, Sun D W, Han Z, et al. Texture and structure measurements and analyses for evaluation of fish and fillet freshness quality: A review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2014, 13(1): 52-61.

[4] Johnston I A, Li X J, Vieira V L A, et al. Muscle and flesh quality traits in wild and farmed Atlantic salmon[J]. Aquaculture, 2006, 256(1-4): 323-336.

[5] Xu J, Feng L, Jiang W D, et al. Different dietary protein levels affect flesh quality, fatty acids and alter gene expression of Nrf2-mediated antioxidant enzymes in the muscle of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Aquaculture, 2018, 493: 272-282.

[6] Wang X Y, Liu G Q, Xie S Q, et al. Growth and meat quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) responded to dietary protein (soybean meal) level through the muscle metabolism and gene expression of myosin heavy chains[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 833924.

[7] Dong L X, Xie S Q, Zhou L, et al. Dietary protein source and stocking density on growth performance, body composition and serum biochemical parameters of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2023, 47(2): 217-226. [董立学, 解绍启, 周亮, 等. 饲料蛋白源和养殖密度对草鱼生长性能、体成分和血清生化指标的影响[J]. 水生生物学报, 2023, 47(2): 217-226.]

[8] Xia S S, Dong L X, Lu X, et al. Comparative study on the utilization efficiency of grass carp to five non-grain protein sources at different feeding frequencies[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(10): 1860-1871. [夏世森, 董立学, 陆星, 等. 不同投喂频率下草鱼对 5 种非粮蛋白源利用效率的比较[J]. 水产学报, 2022, 46(10): 1860-1871.]

[9] Chen Y, Sagada G, Xu B Y, et al. Partial replacement of fishmeal with *Clostridium autoethanogenum* single-cell protein in the diet for juvenile black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*)[J]. Aquaculture Research, 2020, 51(3): 1000-1011.

[10] Bekhit A E D A, Hopkins D L, Fahri F T, et al. Oxidative processes in muscle systems and fresh meat: Sources, markers, and remedies[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2013, 12(5): 565-597.

[11] Abouel Azm F R, Kong F S, Tan Q S, et al. Effects of

- replacement of dietary rapeseed meal by distiller's dried grains with solubles (DDGS) on growth performance, muscle texture, health and expression of muscle-related genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 533: 736169.
- [12] Hu Y, Chen Y F, Zhang D H, et al. Effects of different dietary carbohydrate and protein levels on growth, intestinal digestive enzymes and serum indexes in large-size grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(5): 777-786. [胡毅, 陈云飞, 张德洪, 等. 不同碳水化合物和蛋白质水平膨化饲料对大规格草鱼生长、肠道消化酶及血清指标的影响[J]. *水产学报*, 2018, 42(5): 777-786.]
- [13] Zhao Y, Li J Y, Jiang Q, et al. Leucine improved growth performance, muscle growth, and muscle protein deposition through AKT/TOR and AKT/FOXO3a signaling pathways in hybrid catfish *Pelteobagrus vachelli* × *Leiocassis longirostris*[J]. *Cells*, 2020, 9(2): 327.
- [14] Watabe S. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish[J]. *Journal of Fish Biology*, 1999, 55(sa): 1-18.
- [15] Xu W H, Guo H H, Chen S J, et al. Transcriptome analysis revealed changes of multiple genes involved in muscle hardness in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fed with faba bean meal[J]. *Food Chemistry*, 2020, 314: 126205.
- [16] Rodgers B D, Weber G M, Sullivan C V, et al. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(4): 1412-1418.
- [17] Pozios K C, Ding J, Degger B, et al. IGFs stimulate zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinase-signaling pathways[J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2001, 280(4): R1230-R1239.
- [18] Joo S T, Kim G D, Hwang Y H, et al. Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics [J]. *Meat Science*, 2013, 95(4): 828-836.
- [19] Dong M, Zhang L, Wu P, et al. Dietary protein levels changed the hardness of muscle by acting on muscle fiber growth and the metabolism of collagen in sub-adult grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2022, 13(1): 109.
- [20] Wang B, Liu Y, Feng L, et al. Effects of dietary arginine supplementation on growth performance, flesh quality, muscle antioxidant capacity and antioxidant-related signalling molecule expression in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Food Chemistry*, 2015, 167: 91-99.
- [21] Rasmussen R S. Quality of farmed salmonids with emphasis on proximate composition, yield and sensory characteristics [J]. *Aquaculture Research*, 2001, 32(10): 767-786.
- [22] Dunajski E. Texture of fish muscle[J]. *Journal of Texture Studies*, 1980, 10(4): 301-318.
- [23] Wei Y T, Wang X X, Xie F L, et al. Influences of replacing dietary fish meal by Antarctic krill meal on growth performance, immunity and muscle quality of white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 25: 101256.
- [24] Johnston I A, Alderson R, Sandham C, et al. Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Aquaculture*, 2000, 189(3-4): 335-349.
- [25] Lin W L, Zeng Q X, Zhu Z W. Different changes in mastication between crisp grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* C.et V) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) after heating: The relationship between texture and ultrastructure in muscle tissue[J]. *Food Research International*, 2009, 42(2): 271-278.
- [26] Shao T. Quality changes and mechanism of crisp grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* C.et V) during crispness formation process[D]. Chongqing: Southwest University, 2022. [邵婷. 脆肉鲩脆化过程中品质变化规律与机制[D]. 重庆: 西南大学, 2022.]
- [27] Kong F S, Abouel Azm F R, Wang X Y, et al. Effects of replacement of dietary cottonseed meal by distiller's dried grains with solubles on growth performance, muscle texture, health and expression of muscle-related genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2021, 27(4): 1255-1266.
- [28] Zhang M J, An C R, Gao Y Q, et al. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection[J]. *Progress in Neurobiology*, 2013, 100: 30-47.
- [29] Mercado N, Kizawa Y, Ueda K, et al. Activation of transcription factor Nrf2 signalling by the sphingosine kinase inhibitor SKI-II is mediated by the formation of Keap1 dimers[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88168.
- [30] Bao S, Nie X P, Ou R K, et al. Effects of diclofenac on the expression of Nrf2 and its downstream target genes in mosquito fish (*Gambusia affinis*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 188: 43-53.
- [31] Okouchi M, Okayama N, Alexander J S, et al. NRF2-dependent glutamate-L-cysteine ligase catalytic subunit expression mediates insulin protection against hyperglycemia-induced brain endothelial cell apoptosis[J]. *Current Neurovascular Research*, 2006, 3(4): 249-261.
- [32] Bliesath J, Huser N, Omori M, et al. Combined inhibition of EGFR and CK2 augments the attenuation of PI3K-Akt-mTOR signaling and the killing of cancer cells[J]. *Cancer Letters*, 2012, 322(1): 113-118.

Effects of dietary *Clostridium autoethanogenum* protein level on muscle quality, antioxidant capacity, and gene expression of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

LIU Guoqing^{1,2}, ZHOU Meng^{1,2}, XIE Shouqi³, TAN Qingsong^{1,2}

1. Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. National Demonstration Center for Experimental Aquaculture Education, Wuhan 430070, China;
3. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

Abstract: The experiment aimed to reveal the effect of *Clostridium autoethanogenum* protein (CAP) as the sole protein source in the diet on the muscle texture properties, tissue structure, antioxidant capacity, and gene expression of grass carp. Six groups of CAP gradient protein diets (with protein contents of 24.45%, 27.31%, 31.82%, 35.79%, 38.64%, and 42.82%, named CAP1, CAP2, CAP3, CAP4, CAP5, and CAP6, respectively) were designed. Juvenile grass carp with an initial body weight of (4.56±0.01) g were cultured for 56 days. The results are as follows: (1) Dietary protein level did not significantly affect the moisture, crude protein, crude lipid, and ash content of the dorsal white muscle of grass carp ($P>0.05$). (2) The CAP4 group significantly increased the empty shell rate and muscle pH of grass carp, and the cooking loss of muscle increased linearly with the protein level ($P<0.05$). This suggests that optimal dietary protein level increases the edible portion of grass carp and improves muscle quality through pH regulation. (3) Muscle texture is an important parameter for evaluating the quality of aquatic products. Muscle hardness, springiness, cohesiveness, gumminess, chewiness, and resilience were all consistent with a quadratic model; they first increased and then decreased with the dietary protein level ($P<0.05$). Also, the maximum values of hardness, springiness, cohesiveness, and chewiness were detected in the CAP4 group, and the peak values of gumminess and resilience were found in the CAP3 group, suggesting that optimal dietary protein levels can improve muscle texture. According to the relationship between muscle hardness and dietary protein level, a quadratic function was fitted and the optimal protein level was estimated to be 33.53%. (4) The CAP1, CAP2, CAP5, and CAP6 groups had larger muscle fiber diameters, while the CAP3 and CAP4 groups had smaller muscle fiber diameters. Statistically, muscle fiber diameter and muscle fiber density were fitted by a quadratic model ($P<0.05$), and the smallest mean muscle fiber diameter and maximum muscle fiber density were detected in the CAP4 group, suggesting that optimal dietary protein level can improve muscle texture by increasing muscle fiber density. (5) The activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and total antioxidant capacity (T-AOC) in muscle significantly decreased in response to increasing dietary protein in a linear model ($P<0.05$). The MDA content significantly decreased in the CAP4 group ($P<0.05$), indicating that appropriate protein levels can alleviate oxidative damage and reduce MDA content. (6) The relative expression of *myod*, *myog*, *myf5*, *mstn*, *fgf6a*, *fgf6b*, *myhc-2*, *myhc-4*, *tor*, *s6k1*, *nrf2*, *keap1a*, *ck2a*, *igf-I* and *igf1r* in muscle were also consistent with a quadratic model ($P<0.05$); the relative expression level of *igf-II* in the CAP4 group was significantly higher than that in the CAP2 group ($P<0.05$) and the expression of *myhc-7* and *myhc-1* genes showed a linear increasing trend with dietary protein levels ($P<0.05$). This result suggests that optimal dietary protein could promote muscle growth and alleviate oxidative damage to muscle through related gene expression, which was consistent with other muscle quality parameters observed in this study. Overall, this study revealed the effects of dietary protein level on parameters related to muscle quality in grass carp using a novel bacterial protein (CAP) and provided a theoretical basis for evaluating the value of *Clostridium autoethanogenum* protein and regulating muscle quality by nutritional means.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; *Clostridium autoethanogenum*; antioxidant capacity; muscle texture; signaling pathway

Corresponding author: TAN Qingsong. E-mail: tanqs2000@163.com