

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00242

饲料中添加水解鱼蛋白对半滑舌鲷稚鱼生长及生理生化指标的影响

柳旭东^{1,3} 梁萌青¹ 张利民² 王际英² 常青¹
王家林¹ Yannis Kotzamanis⁴

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071; 2. 山东省海洋水产研究所, 烟台 264006;
3. 山东升索渔用饲料研究中心, 烟台 265500; 4. 希腊国家海洋研究中心海水养殖研究所, 雅典)

摘要: 试验研究了饲料中添加不同水平(0%、20%、40%和 60%)的水解鱼蛋白(Fish protein hydrolysate, FPH)对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther)稚鱼生长及生理生化指标的影响。28d 饲养实验结束后, 对试验鱼生长指标、鱼体消化酶活性、碱性磷酸酶(AKP)及肠道发育情况进行分析。结果显示: 实验鱼的存活率为 64.44%—78.88%, 其中 20%与 40%添加组存活率显著高于其他两组($P<0.05$); 实验鱼的特定生长率(SGR)随饲料中 FPH 添加水平升高呈下降趋势, 20%添加组特定生长率最高, 显著高于其他 3 组($P<0.05$), 且 60%添加组与对照组(FM)之间无显著差异($P>0.05$); 各试验组鱼体消化酶(脂肪酶、淀粉酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶)的比活力在 14d 与 28d 时的强弱关系不一致。鱼体碱性磷酸酶比活力大小依次为: 20%组>40%组>对照组>60%组, 各组间差异均显著($P<0.05$); 半滑舌鲷肠道微绒毛长度和黏膜厚度均以 20%添加组为最优, 显著优于其他 3 组($P<0.05$)。以上结果表明, 在实验条件下, 饲料中 FPH 的添加水平为 20%时, 能提高半滑舌鲷稚鱼的存活率及生长性能, 并增强其对营养物质的吸收能力。

关键词: 水解鱼蛋白; 半滑舌鲷稚鱼; 消化酶; 碱性磷酸酶; 肠道组织

中图分类号: S963 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)02-0242-08

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther, 1873)属鲽形目、舌鲷科、舌鲷属, 俗名鲷米鱼、舌头鱼、龙利等, 是我国近海底层的大型名贵经济鱼类, 渤海分布数量最多^[1]。半滑舌鲷具有活动范围小、营养等级低、食谱广、生长迅速、个体大、肉质鲜美、市场价值高等一系列优点, 属低级肉食性鱼类^[2], 是理想的人工增殖对象。近几年, 半滑舌鲷规模化人工繁殖技术逐步成熟, 苗种培育、养殖生产也在全国沿海地区不少水产养殖场广泛展开。但在半滑舌鲷仔稚鱼开口期和变态期间仍会出现大量死亡, 主要原因是仔稚鱼的消化系统发育尚不完善, 对饵料的消化吸收能力不强。

水解蛋白主要是各种肽与少量游离氨基酸的混合物^[3,4]。水解蛋白有助于水产动物的消化吸收, 促进生长, 提高成活率^[5,6]。对草鱼^[7-9]、海鲈^[3,10,11]、虾^[4]、鲤鱼^[12]、大西洋鲑^[13,14]、虹鳟^[15]和尼罗罗非鱼^[16]的研究表明: 水解鱼蛋白、水解虾蛋白、水解大豆蛋白、水解酪蛋白和水解羽毛粉等多种水解蛋白饲喂海水鱼虾种类均达到了理想效果。

本实验研究了不同水平水解鱼蛋白替代鱼粉对半滑舌鲷稚鱼生长、消化酶、碱性磷酸酶活性及肠道发育的影响, 探讨半滑舌鲷稚鱼微颗粒饲料中添加水解鱼蛋白的适宜替代水平, 以期研制出高质高效的半滑舌鲷仔稚鱼人工开口饵料提供科学依据。

收稿日期: 2008-11-04; 修订日期: 2009-09-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771660); 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-046-鲆鲽); 国际科技合作项目(2008DFA31720); 青岛市科技计划项目(08-1-3-26-jch)(07-2-3-24-hz); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费专项资金项目资助

作者简介: 柳旭东(1981—), 男, 山东烟台人; 硕士; 主要从事水产动物营养与饲料加工方面的研究。E-mail: liuxudong7118@126.com

通讯作者: 梁萌青, Tel: 0532-85822914; E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物与饲养管理

实验鱼为山东海阳海珍品有限公司人工培育孵化的初始干重为 (6.47 ± 0.38) mg 的半滑舌鳎稚鱼(出苗 30d, 底栖初期)。

实验鱼驯化 7d 后, 随机分于 12 个规格为 50 cm×40 cm×20 cm 的水箱中, 每箱 60 尾。实验共设 4 个处理, 饲料中分别添加 0%、20%、40% 和 60% 水解鱼蛋白(Fish Protein Hydrolysate, FPH)替代鱼粉蛋白, 每个处理设 3 个重复。流水养殖, 水温 $(22 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, 盐度 30—32, 每天投饵 4 次(5:00、10:00、15:00 和 21:00), 投喂量以饱食为准, 流水养殖, 早上清污。

1.2 实验饲料制备

在 25℃ 条件下, 甲酸与酸性蛋白酶(无锡市酶制剂厂生产, 50000 U/g)联合水解鳕鱼肉, 减压浓缩

制得水解鱼蛋白(FPH)。

实验饲料配方参照文献[17]的方法。FPH 在饲料中的添加水平为 0% (FM, 对照组)、20% (FPH-20)、40% (FPH-40)和 60% (FPH-60)。将各种原料粉碎至 88 μm 以下, 按照表 1 配方充分混匀, 添加饲料 1% 的褐藻胶与 4% 的明胶在高水分条件下混匀饲料呈粥状, 50℃ 负压(0.097 mPa)干燥, 破碎, 过筛, 颗粒大小为 180—250 μm, 置于-20℃ 冰箱备用。

1.3 取样与分析

取样 体长、体重指标测定, 每 7 天取样 1 次; 酶活性指标测定, 每 14 天取样 1 次; 肠道组织光镜材料, 实验结束时(28d)取样 1 次。

蛋白质水解度的测定方法 采用改良的比色法^[18]测定样品中游离 α-amino N, 同时将解冻鳕鱼肉样品经 6 mol/L HCl 在 110℃ 水解 20h 后测定样品中总 α-amino N。蛋白质水解度 $\text{DH} = \frac{\text{游离 } \alpha\text{-amino N}}{\text{总 } \alpha\text{-amino N}} \times 100\%$ 。

表 1 四组实验饲料组成
Tab. 1 Composition of four experimental diets (%)

原料 Ingredients	饲料组 Diet groups			
	FM	FPH-20	FPH-40	FPH-60
白鱼粉 White fishmeal ¹	77	50	25	2
水解鱼蛋白 FPH ²	0	20	40	60
贻贝粉 Mussel meal ³	10	10	10	10
鱼油 Fish oil	6	8	9	9.5
卵磷脂 Lecithin	2	2	2	2
甜菜碱 Betaine	0.3	0.3	0.3	0.3
淀粉 α-Starch	2.6	7.6	11.6	14.1
β-胡萝卜素 β-carotene	0.1	0.1	0.1	0.1
维生素混合物 Vitamin mix ⁴	1	1	1	1
矿物质混合物 Mineral mix ⁵	1	1	1	1
营养成分% Proximate composition				
粗蛋白 Crude protein (CP)	60.43	59.69	60.35	62.43
粗脂肪 Crude fat (CF)	11.11	11.66	11.32	10.59

注: 1. 白鱼粉: 粗蛋白 70.7%; 粗脂肪 5.6% (购自美国 Seafood 公司, 美国阿拉斯加); 2. 水解鱼蛋白: 粗蛋白 91.7%; 水解度 65.45% (选用鳕鱼 *Theragra chaloogramma* 以蛋白酶水解制成); 3. 贻贝粉: 粗蛋白 70%; 粗脂肪 5.6% (由购自市场的新鲜贻贝去壳冷冻干燥后磨成粉末); 4. 混合维生素(IU or mg/kg 饲料): 维生素 B₁, 110 mg; 维生素 B₂, 360 mg; 维生素 B₆, 86 mg; 生物素, 10 mg; 泛酸钙, 507 mg; 叶酸, 54 mg; 维生素 B₁₂, 0.3 mg; 烟酸, 1450 mg; 维生素 K, 10 mg; 维生素 C, 500 mg; 维生素 A 醋酸酯, 6000 IU; 维生素 D₃, 1800 IU; 维生素 E, 15 mg; 5. 混合无机盐(mg/kg 饲料): 硫酸镁, 2230 mg; 氯化钾, 3020 mg; 硫酸铝钾, 12.7 mg; 氯化钴, 40 mg; 硫酸锌, 253 mg; 硫酸铜, 7 mg; 碘化钾, 8 mg; 硫酸锰, 54 mg; 亚硒酸钠, 2.5 mg; 柠檬酸铁, 1.632 mg

Note: 1. White fishmeal: CP, 70.7%; CF, 5.6% (Obtained from American Seafood Company, Alaska, USA); 2. FPH: CP, 91.7%; DH, 65.45% [Made from hydrolysed cod (*Theragra chaloogramma*) muscle with protease]; 3. Mussel meal: CP, 70%; CF, 5.6% (Bought from and made by freeze-drying and ball-mixing whole body tissue without shell); 4. Composition of vitamin premix (IU or mg/kg diet): thiamin-HCL, 110 mg; riboflavin, 360 mg; pyridoxine-HCL, 86 mg; D-biotin, 10 mg; calcium pantothenate, 507 mg; folic acid, 54 mg; cyanocobalamin, 0.3 mg; niacin, 1450 mg; menadione, 10 mg; ascorbic acid, 500 mg; retinyl acetate, 6000 IU; cholecalciferol, 1800 IU; DL-α-tocopherol acetate, 15 mg; 5. Composition of mineral premix (mg/kg diet): MgSO₄, 2230 mg; KCl, 3020 mg; KAl(SO₄)₂, 12.7 mg; CoCl₂, 40 mg; ZnSO₄·7H₂O, 253 mg; CuSO₄·5H₂O, 7 mg; KI, 8 mg; MnSO₄·4H₂O, 54 mg; Na₂SeO₃, 2.5 mg; C₆H₅O₇Fe·5H₂O, 1.632 mg

酶液的制备 参照蔡克瑕等^[19]方法取鱼样腹部, 加入 9 倍体积的冰冻重蒸水, 用玻璃匀浆器匀浆, 取部分匀浆液直接测定脂肪酶的活力, 剩余部分置于冷冻离心机(0—1℃, 10000 r/min)离心 30min, 弃沉淀, 取上清液用于其他各种酶活力的测定。酶液置 4℃冰箱中保存备用, 24h 内测定完毕。

肠道组织切片的制备 取鱼样腹部, 用 Bouin 氏液固定, 乙醇脱水, 石蜡包埋, Leica RM 2135 型切片机连续切片, 切片厚度为 5 μm, H.E 染色, 中性树脂封片, Nikon 显微镜下观察、拍照。

1.4 指标检测

生长性能计算 特定生长率 SGR (%/d) = $(\ln W_t - \ln W_0) / T \times 100\%$ 。式中, W_0 为实验开始时体重; W_t 为实验结束时体重; T 为实验天数。

生理生化指标的测定 脂肪酶活性的测定采用南京建成生物工程研究所脂肪酶测试盒方法测定。定义: 在 37℃, 1min 催化产生 1 μg 分子脂肪酸的酶量为 1 个脂肪酶活力单位(U)。

淀粉酶活性的测定 参照《工具酶的活性测定》中的方法^[20]经适当修改。定义: 在 37℃ 反应条件下, 1min 催化淀粉生成 1 μg 葡萄糖的酶量为 1 个淀粉酶活力单位(U)。

胃蛋白酶的测定 采用福林-酚试剂法^[21]。定义: 在 37℃, 1min 水解干酪素产生 1 μg 酪氨酸的酶量为 1 个胃蛋白酶活力单位(U)。

胰蛋白酶的测定 将上述胃蛋白酶的测定方法中的柠檬酸缓冲溶液改为 pH10.0 的硼砂-氢氧化钠缓冲溶液, 其他均同胃蛋白酶的测定方法。

碱性磷酸酶的测定 采用南京建成生物工程研究所碱性磷酸酶试剂盒测定方法进行测定。定义: 在 37℃, 1 g 组织蛋白与基质作用 15min 产生 1 mg 酚为 1 个碱性磷酸酶活力单位(U)。

酶液蛋白浓度的测定 采用南京建成生物工程研究所试剂盒的测定方法-考马斯亮蓝法进行测定。

定义 1 mg 粗酶液的酶活性单位数为酶的比活力; 本实验测定的酶活性指标均采用比活力。

肠道组织指标测定 每个肠道组织切片 5 个最长肠微绒毛长度及最厚黏膜厚度, 观察肠道褶皱程度。

1.5 数据分析

实验数据采用 SPSS11.5 软件进行单因子方差分析(one-way ANOVA), 多重比较采用 Duncan's 检验方法, 以 $P < 0.05$ 为显著水平; 实验数据采用(平均

值±标准差)表示。

2 结果

2.1 FPH 对半滑舌鲷稚鱼生长和存活的影响

实验鱼的生长性能(表 2)。特定生长率: FPH-20 > FPH-40 > 对照组 > FPH-60, FPH-60 组与对照组差异不显著($P > 0.05$), 而 FPH-20、FPH-40 组与对照组(FM)差异均显著($P < 0.05$); 存活率: FPH-20 > FPH-40 > 对照组 > FPH-60, FPH-60 组比对照组降低了近 3%, 差异不显著($P > 0.05$), FPH-20、FPH-40 组存活率比对照组(FM)分别提高了 11%、9%, 差异显著($P < 0.05$)。

表 2 实验 28d 半滑舌鲷稚鱼的生长和存活情况
Tab. 2 The growth and survival parameters of tongue fish post-larvae cultured for 28d

生长指标 Growth parameters	组别 Groups			
	FM	FPH-20	FPH-40	FPH-60
特定生长率 SGR (%/d)	2.31±0.13 ^a	2.84±0.06 ^c	2.57±0.15 ^b	2.24±0.10 ^a
存活率 Survival rate (%)	67.22±3.46 ^a	78.88±0.96 ^b	76.11±0.96 ^b	64.44±2.54 ^a

注: 表中同行不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Means in a row with a different superscript letter indicate difference at $P < 0.05$

2.2 FPH 对半滑舌鲷稚鱼消化酶和碱性磷酸酶活性的影响

消化酶活性的变化情况(图 1)。由 A 图可见, 脂肪酶活性: 实验 14d, 对照组 > FPH-60 > FPH-40 > FPH-20, 各组间差异显著($P < 0.05$), 水解蛋白组脂肪酶活性随水解蛋白水平升高而增强; 28d 时, 对照组 > FPH-60 > FPH-20 > FPH-40, 对照组与 FPH-60 组显著高于 FPH-20 与 FPH-40 ($P < 0.05$)。

由 B 图可见, 淀粉酶活性: 实验 14d, 对照组 > FPH-40 > FPH-20 > FPH-60, 各组间差异显著($P < 0.05$), 对照组淀粉酶活性最高, 水解蛋白组淀粉酶活性比较接近; 28d 时, 淀粉酶活性: FPH-60 > FPH-40 > FPH-20 > 对照组, 各组间差异显著($P < 0.05$), 对照组淀粉酶活性最低, 水解蛋白组淀粉酶活性随水解蛋白水平增大而增强。

由 C 图可见, 胃蛋白酶活性: 实验 14d, 对照组 > FPH-60 > FPH-40 > FPH-20, 各组间差异显著($P < 0.05$), 水解蛋白组胃蛋白酶活性随水解蛋白水平增大而增强; 28d 时, 对照组 > FPH-60 > FPH-20 >

FPH-40, 胃蛋白酶活性比 14d 均有所降低, 各组间差异显著($P<0.05$)。

由 D 图可见, 胰蛋白酶活性: 实验 14d, FPH-60 > 对照组 > FPH-20 > FPH-40, FPH-60 组胰蛋白酶活性显著高于对照组、FPH-20 组及 FPH-40 组($P<0.05$); 28d 时, 对照组 > FPH-20 > FPH-40 > FPH-60, 胃蛋白酶活性比 14d 均有所上升, 对照组与 FPH-20 上升幅度较大。

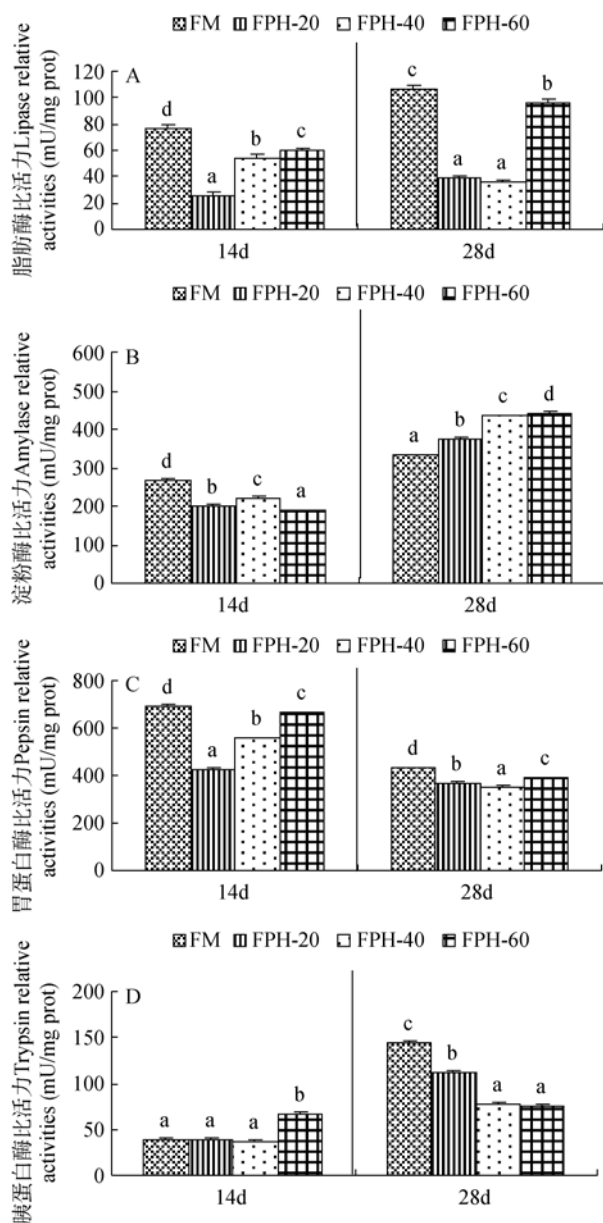


图1 水解鱼蛋白对半滑舌鲷稚鱼消化酶比活力的影响

Fig. 1 Effect of FPH on digestive enzymes relative activities in tongue fish post-larvae

A. 脂肪酶; B. 淀粉酶; C. 胃蛋白酶; D. 胰蛋白酶

A. Lipase; B. Amylase; C. Pepsin; D. Trypsin

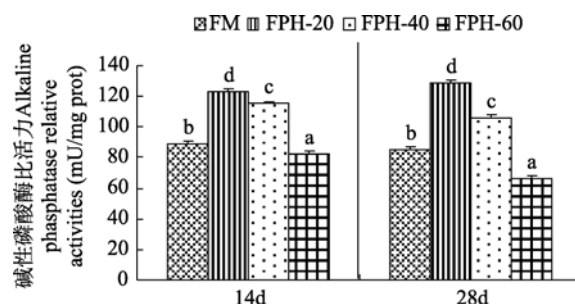


图2 水解鱼蛋白对半滑舌鲷稚鱼碱性磷酸酶比活力的影响

Fig. 2 Effect of FPH on alkaline phosphatase relative activities in tongue fish post-larvae

由图2可见, 碱性磷酸酶活性: 实验 14d 及 28d, 均为 FPH-20 > FPH-40 > 对照组 > FPH-60, 各组间差异显著($P<0.05$); 28d 时, 除 FPH-20 外, 其他 3 组碱性磷酸酶活性比 14d 时都出现不同程度降低。

2.3 FPH 对半滑舌鲷稚鱼肠道发育的影响

各组实验鱼肠道发育情况(图 3、表 3)。FPH-20、FPH-40 组肠道褶皱的数量及高度明显优于对照组(FM 组), 而 FPH-60 组肠道褶皱出现低矮萎缩现象, 发育程度远不如对照组(图 3)。肠道黏膜厚度以 FPH-20 组最厚, 对照组与 FPH-40 组次之, FPH-60 组最薄; 肠道微绒毛长度也以 FPH-20 组最长, 其他 3 组长度相当且差异不显著($P>0.05$), 为对照组 > FPH-40 > FPH-60(表 3)。肠道褶皱高度与密集程度(图 3), FPH-20 组最优。

3 讨论

3.1 FPH 对半滑舌鲷稚鱼生长和存活的影响

水解鱼蛋白富含可溶性小肽^[22,23]。小肽是由两个以上氨基酸组成, 作为蛋白质的主要消化产物, 在氨基酸消化吸收以及动物营养代谢中起着重要作用。小肽能提高鱼类成活率、增重率, 促进鱼类生长^[24]。

从实验鱼特定生长率看, FPH-20 组、FPH-40 组比对照组分别提高了 22.9%、11.3%, FPH-60 组增重效果不及对照组。水解蛋白的促生长作用在虾^[4]、鲤鱼^[12]、鲫鱼^[25]、草鱼^[26]、虹鳟^[27]、海鲈^[3,10]、欧鳗^[28]及大西洋鲑^[13,14]等多种水生动物已得到证实。分析其原因可能与水解蛋白中小肽的结构及氨基酸残基序列有关, 小肽比游离氨基酸的吸收具有耗能低、转运速度快、载体不易饱和等优点, 甚至肽载体吸收能力可能高于各种氨基酸载体吸收能力的总和^[29]; 另一个原因可能是水解过程中释放出的某些游离氨基酸增强了诱食效果。但是, 高添加量的水

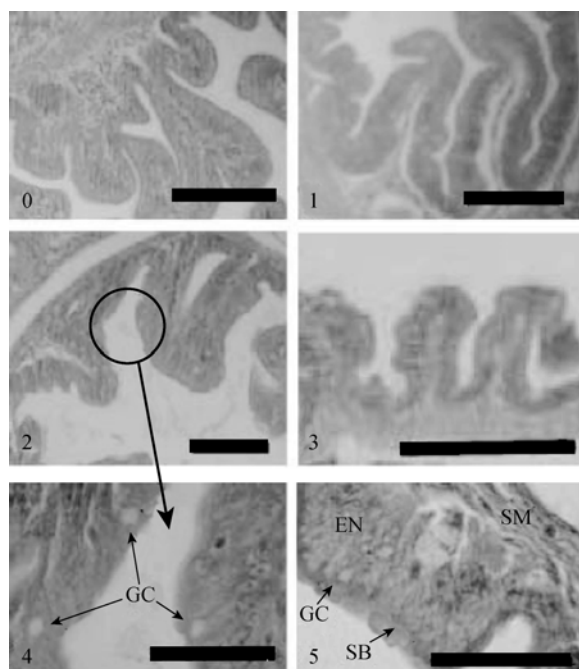


图3 水解鱼蛋白对半滑舌鲷稚鱼肠道组织的影响

Fig. 3 Effect of FPH on intestine structure in tongue fish post-larvae

0. 对照组(FM)肠道组织纵切(标尺为 100 μm); 1. FPH-20 组肠道组织纵切(标尺为 100 μm); 2. FPH-40 组肠道组织纵切(标尺为 100 μm); 3. FPH-60 组肠道组织纵切(标尺为 100 μm); 4. 杯状细胞的分布, 上述 2 的部分放大图(标尺为 25 μm); 5. 肠道黏膜层纵切(标尺为 50 μm)

0. Longitudinal sagittal section of intestine structure of tongue fish post-larvae in control group (bar=100 μm); 1. Longitudinal sagittal section of intestine structure of tongue fish post-larvae in FPH-20 group (bar=100 μm); 2. Longitudinal sagittal section of intestine structure of tongue fish post-larvae in FPH-40 group (bar=100 μm); 3. Longitudinal sagittal section of intestine structure of tongue fish post-larvae in FPH-60 group (bar=100 μm); 4. Distribution of goblet cell, partial enlargement of the above No.2 (bar=25 μm); 5. Longitudinal sagittal section of intestinal mucosa of tongue fish post-larvae (bar=50 μm)

EN: 肠上皮细胞 Enterocytes; GC: 杯状细胞 Goblet Cell; SB: 纹状缘 Striated Border; SM: 纵环行肌层 Longitudinal and circular smooth muscle layers

表3 实验 28d 半滑舌鲷稚鱼肠道的显微结构指标

Tab. 3 The intestinal microscopic structure parameters of tongue fish post-larvae cultured for 28d

肠道指标 Gut parameters	组别 Groups			
	FM	FPH-20	FPH-40	FPH-60
黏膜厚度 Mucosa thickness (μm)	42.73 $\pm$ 3.57 ^b	57.88 $\pm$ 2.09 ^c	42.60 $\pm$ 3.74 ^b	29.40 $\pm$ 3.01 ^a
微绒毛长度 Villus height (μm)	3.38 $\pm$ 0.49 ^a	5.44 $\pm$ 0.58 ^b	3.23 $\pm$ 0.39 ^a	3.09 $\pm$ 0.13 ^a

注: 表中同行不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: Means in a row with a different superscript letter indicate difference at $P<0.05$

解蛋白会对鱼类生长会产生负面作用, 推测原因是仔稚鱼难以控制大量的游离氨基酸和短肽迅速通过肠壁, 使得这些营养物质在消化系统中流失严重^[30], 进而导致仔稚鱼的生长受到抑制。

有研究发现, 投喂 75%水解蛋白替代组的鲢鱼仔鱼存活率显著低于鱼粉组和 25%替代组^[31]。本研究中, 各组实验鱼存活率都在 60%以上, FPH-60 组存活率比对照组(FM)降低了近 3%, FPH-20、FPH-40 组则比对照组分别提高了 11%、9%, 与前者研究结果相一致。这说明适宜含量的水解蛋白可提高半滑舌鲷稚鱼的存活率, 但过高含量时会导致存活率下降。原因可能是水解蛋白中的游离氨基酸和小肽有利于稚鱼的吸收, 弥补了稚鱼消化系统发育尚不十分完善的缺陷。水解蛋白含量适宜时, 鱼类对营养物质的吸收速度在其生理功能的可控范围内, 保持营养物质的平衡吸收, 从而对促进各个器官的发育形成了良性循环, 整体上增强了稚鱼体质, 进而提高了存活率。反之, 水解蛋白含量过高时, 会引起游离氨基酸转运机制的饱和与竞争^[32], 不仅导致了营养吸收失衡, 而且对稚鱼消化系统的组织结构有一定损害(见 2.3), 这些是高含量水解蛋白导致半滑舌鲷稚鱼存活率下降的主要原因。

3.2 FPH 对半滑舌鲷稚鱼消化酶和碱性磷酸酶活性的影响

水产动物消化吸收所摄入的饲料, 需经消化系统的机械处理和酶的消化分解, 逐步达到可吸收状态而被消化道上皮吸收。可见, 酶活性的高低在一定程度上反映水产动物的消化能力。

脂肪酶是一类特殊的酯解水解酶, 能催化天然底物油脂(甘油三酯)水解, 产生脂肪酸和甘油, 在水解过程中存在中间产物甘油单酯和甘油二酯, 存在于消化系统的各个部分, 胰脏是它的主要来源, 在中性与弱碱性条件下均具有较强活性^[33]。本实验 4 组饲料的脂肪含量相当, 28d 实验过程中, 对照组、FPH-60 组的脂肪酶活性明显高于 FPH-20 组与 FPH-40 组。有学者报道, 饲料中成分的变化有可能影响到与其消化无关的消化酶活性^[34]。在不添加水解蛋白组与添加较高量水解蛋白组脂肪酶活性最高, 可能是在对照组中稚鱼的消化系统发育逐步完善, 其脂肪酶活性也增高, 而水解蛋白大量替代会导致消化紊乱^[6]。

对照组实验鱼的胃蛋白酶活性在实验 14d、28d

时均为 4 组最高, 28d 时整体明显比 14d 时对应组酶活性低; 而胰蛋白酶活性相反, 在 28d 时整体明显比 14d 时对应组性酶活性高, 表明这两种蛋白酶的活性受到了饲料中水解蛋白含量的影响。推测原因是水解蛋白组饲料的 pH 值比对照组偏酸性, 仔鱼吸收后增强了胃肠的酸性生理环境, 引起胃蛋白酶较高的活性, 从而减少机体胃蛋白酶的分泌量, 而胰蛋白酶则相反。

碱性磷酸酶(AKP)也叫正磷酸单酯磷酸水解酶, 能在碱性介质中分解磷酸酯键。主要存在于鱼类前肠上皮细胞的浅部和纹状缘上, 与脂类、维生素 D、钙、氨基酸、葡萄糖等多种物质的吸收有关^[35], 随黏膜细胞分化成熟, 肠碱性磷酸酶逐渐增强, 因此常作为水生动物肠黏膜发育成熟度的标识酶^[36], 碱性磷酸酶活性的高低在一定程度上反映了动物小肠吸收功能的强弱^[37]。实验 14d 与 28d, 4 组实验鱼的碱性磷酸酶活性强弱趋势相同, 各组的波动幅度不大。以 FPH-20 组碱性磷酸酶活性最高, 而 FPH-60 组不及对照组。有研究发现水解蛋白部分替代鱼粉蛋白, 能显著提高海鲈肠碱性磷酸酶活性, 甚至可提高 1 倍^[3,6]。本研究与前述报道一致, 说明饲料中添加适量的水解鱼蛋白可影响半滑舌鲷稚鱼肠细胞分化和成熟, 以添加 20%水解鱼蛋白最佳。

3.3 FPH 对半滑舌鲷稚鱼肠道发育的影响

微绒毛长度、黏膜厚度增加可使小肠吸收面积扩大, 有利于营养物质的吸收^[38,39]。有学者以大鼠肠道的微绒毛长度、黏膜厚度和碱性磷酸酶活性为指标, 推断出半乳甘露寡糖、壳寡糖和半乳甘露寡糖+乳酸菌均能改善大鼠肠道黏膜结构, 增强小肠吸收功能^[37]。半滑舌鲷肠道的微绒毛长度和黏膜厚度均以 FPH-20 组为最优, 明显优于对照组在内的其他 3 组, 而 FPH-60 组不及对照组(表 3), 这表明 FPH-20 组实验鱼的肠道吸收功能最发达, 添加高含量的水解鱼蛋白会对半滑舌鲷稚鱼肠道发育产生了负面影响。

在具有吸收功能的上皮细胞中, 如肾近曲小管的刷状缘、小肠绒毛上皮中吸收细胞表面的纹状缘均富含碱性磷酸酶^[40]。从图 3 肠道褶皱的数量及高度看, 肠道的发达程度以 FPH-20 组最优, FPH-40 与对照组相当, FPH-60 组最差, 表明添加饲料干物质 20%的水解鱼蛋白促进了半滑舌鲷稚鱼肠道的发育。

4 小 结

综合本研究中半滑舌鲷稚鱼的生长、存活率、消化酶、碱性磷酸酶活性及肠道发育情况, 在本实验条件下, 饲料中 20%水解鱼蛋白的替代为最佳。

参考文献:

- [1] Li S Z, Wang H M. Fauna Sinica Ostichthyes Pleuronectiformes [M]. Beijing: China Science Press. 1995, 68 [李思忠, 王惠民. 中国动物志硬骨鱼纲鲆形目. 北京: 科学出版社. 1995, 68]
- [2] Deng J Y, Meng T X, Ren S M, et al. Species composition, abundance and distribution of fishes in the Bohai Sea [J]. *Marine Fisheries Research*, 1988, 9: 11—90 [邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布. 海洋水产研究, 1988, 9: 11—90]
- [3] Zambonino-Infante J L, Cahu C L and Peres A. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development [J]. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127(4): 608—614
- [4] Cordova-Murueta J H and Garcia-Carreno F L. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed [J]. *Aquaculture*, 2002, 210: 371—384
- [5] Jany K D. Studies on the digestive enzymes of the stomachless bonefish *Carassius auratus Gibelio* endopeptidases [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1976, 53: 31—38
- [6] Cahu C L, Zambonino-Infante J L, Quazuguel P, et al. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae [J]. *Aquaculture*, 1999, 171: 109—119
- [7] Feng J, Liu D H. Effects of oligopeptides on the growth of grass carp fry [J]. *Guangdong Feed*, 2003, 12(1): 23—25 [冯健, 刘栋辉. 小肽对幼龄草鱼生长性能的影响. 广东饲料, 2003, 12(1): 23—25]
- [8] Feng J, Liu D H. Effect of dietary small peptides on growth performance of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(1): 21—26 [冯健, 刘栋辉. 草鱼日粮中小肽对幼龄草鱼生长性能的影响. 水生生物学报, 2005, 29(1): 21—26]
- [9] Yu H, Feng J, Liu D H, et al. Effect of small peptides from casein on growth and feed utilization in juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(5): 71—75 [于辉, 冯健, 刘栋辉, 等. 酪蛋白小肽对幼龄草鱼生长和饲料利用的影响. 水生生物学报, 2004, 28(5): 71—75]
- [10] Cahu C L, Zambonino-Infante J L. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: response of pancreatic enzymes and intestinal peptides [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1995, 14: 209—214

- [11] Gomes da Silva J, Oliva-Teles A. Apparent digestibility coefficients of feedstuffs in seabass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Aquatic Living Resources*, 1998, **11**(3): 187—191
- [12] Wong M H, Tang L Y, Kwok F S L. The use of enzyme-digested soybean residue for feeding common carp [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 1996, **9**(4): 418—423
- [13] Berge G, Storebakken T. Fish protein hydrolysate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry [J]. *Aquaculture*, 1996, **145**: 205—212
- [14] Refstie S, Olli J J and Standal H. Feed intake, growth and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet [J]. *Aquaculture*, 2004, **239**(1-4): 331—338
- [15] Gomes E F, Rema P, Gouveia A, *et al.* Replacement of fish meal by plant proteins in diets for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effect of the quality of the fishmeal based control diets on digestibility and nutrient balances [J]. *Water Science and Technology*, 1995, **31**(10): 205—211
- [16] Gaber M M A. Partial and complete replacement of fish meal by poultry by-product and feather meal in diets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Annals Agriculture Scientific Moshtohor*, 1996, **1**: 203—214
- [17] Chang Q, Liang M Q, Wang J L, *et al.* Growth and survival of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther, 1873) larvae fed a compound diet with different protein sources [J]. *Aquaculture Research*, 2006, **37**: 643—646
- [18] Directorate of Fisheries. The quality handbook of institute of nutrition [M]. Bergen: Scandinavian University Press. 1996
- [19] Cai K X, Wang C G, Chen P J, *et al.* Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval and juvenile *Plectorhynchus cinctus* [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2000, **19**(2): 201—204 [蔡克瑕, 王重刚, 陈品健, 等. 花尾胡椒鲷仔稚鱼期消化酶活性的变化. 台湾海峡, 2000, **19**(2): 201—204]
- [20] Jiang C K, Jin C D, Wu R L, *et al.* Activity Determination of Tool Enzymes [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. 1982 [蒋传葵, 金承德, 吴仁龙, 等. 工具酶的活性测定. 上海: 上海科学技术出版社. 1982]
- [21] Liu Y M, Zhu J Z, Wu H Y, *et al.* Studies on digestive enzyme and amino acid of larval and post larval stages of *Penaeus chinensis* [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 1991, **22**(6): 571—575 [刘玉梅, 朱谨钊, 吴厚余, 等. 中国对虾幼体和仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究. 海洋与湖沼, 1991, **22**(6): 571—575]
- [22] Hertrampf J W and Piedad-Pascual F. Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds [M]. Kluwer Academic Publishers (Dordrecht). 2000
- [23] Liasset B, Lied E, Espe M. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, **80**: 581—589
- [24] Xiang X, Zhou X H, Tang L B. Small peptide nutrition and its application in aquaculture [J]. *Feed Research*, 2002, **8**: 16—219 [向泉, 周兴华, 唐龙碧. 小肽的营养及在水产养殖上的应用. 饲料研究, 2002, **8**: 16—19]
- [25] Szlaminska M, Escaffre A M, Charlon N, *et al.* Preliminary data on semisynthetic diets for goldfish *Carassius auratus* L. larvae [J]. *Fish Nutrition in Practice Biarritz*, 1991, **61**: 607—612
- [26] Feng J, Jia G, Yang C P. The effect of small peptides in hydrolytic fish meal on growth performance of grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, **29**(2): 222—226 [冯健, 贾刚, 杨长平. 鱼粉水解物中小肽对幼龄草鱼生长性能的影响. 水产学报, 2005, **29**(2): 222—226]
- [27] Barrias C, Oliva-Teles A. The use of locally produced fish meal and other dietary manipulations in practical diets for rainbow trout [J]. *Aquaculture Research*, 2000, **31**: 213—218
- [28] Wang B L, Xu J R, Qian X Q. Effect of small peptides on growth characteristics in European eel [J]. *Freshwater Fisheries*, 2001, **31**(2): 42—43 [王碧莲, 徐加锐, 钱雪桥. 小肽制品对欧鳗生长特征的影响. 淡水渔业, 2001, **31**(2): 42—43]
- [29] Daniel H, Boll M, Wenzel U. Physiological importance and characteristics of peptide transport in intestinal epithelial cells [C]. In: Souffrant W B, Hagemeister H (Eds.), the 6th international symposium on digestive physiology in pig. *Dummerstorf Pub.* 1994, **1**(80): 1—7
- [30] Kolkovski S, Tandler A. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2000, **6**(1): 11—15
- [31] He F, Pan Q, Wang X D, *et al.* Effects of enzymatically hydrolyzed protein on growth performance and nutritional physiology in mud carp larvae [A]. Abstracts of the sixth Symposium of World's Chinese Scientists on Nutrition and Feeding of Finfish and Shellfish, Qingdao [C]. 2006, 84—85 [何芬, 潘庆, 汪小东, 等. 酶水解蛋白替代鱼粉对鲢鱼仔鱼生长性能及营养生理的影响. 第六届世界华人鱼虾营养学术研讨会摘要集, 青岛. 2006, 84—85]
- [32] Plakas S M, Katayama T. Apparent digestibilities of amino acids from three regions of the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio*) after ingestion of a protein and a corresponding free amino acid diet [J]. *Aquaculture*, 1981, **24**: 309—314
- [33] Xu Y, Qu K M, Ma S S. The current research and prospect of digestive enzymes of turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Marine Fisheries Research*, 2005, **26**(5): 86—91 [徐勇, 曲克明, 马绍赛. 大菱鲆消化酶研究现状与展望. 海洋水产研究, 2005, **26**(5): 86—91]
- [34] Li J S, Li J L, Wu T T. Effects of feed composition and environmental temperature on activities of digestive enzyme of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, **11**(6): 585—588 [黎军

- 胜, 李建林, 吴婷婷. 饲料成分与环境温度对奥尼罗非鱼消化酶活性的影响. 中国水产科学, 2004, 11(6): 585—588]
- [35] Malagelada J R, Linscheer W G, Fishman W H. The effect of fatty acid perfusion on intestinal alkaline phosphatase: Studies on the rat [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 1977, 22: 516—523
- [36] Cuvier-Péres A, Kestemont P. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 24: 279—285
- [37] He Y N, She R P, Wu J, *et al.* Effects of galacto-mannooligosaccharides and oligochitosan on the structure of gut mucosa and the activity of AKP in rats [J]. *Science Technology and Engineering*, 2006, 6(2): 131—135 [何亚男, 余锐萍, 吴襟, 等. 半乳甘露寡糖和壳寡糖对大鼠肠黏膜结构、碱性磷酸酶活性影响的动态观察. 科学技术与工程, 2006, 6(2): 131—135]
- [38] Otake T, Hirokawa J, Fujimoto H, *et al.* Fine structure and function of the gut epithelium of pike eel [J]. *Journal of Fish Biology*, 1995, 47: 126—142
- [39] Lin H R. Fish Physiology [M]. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press. 1999, 35—55 [林浩然. 鱼类生理学. 广州: 广东高等教育出版社. 1999, 35—55]
- [40] Yu C Y, He M Q, Zheng D C. Qualitative and spot study of the cellular alkaline phosphatase (AKP) for the broiler chicks fed a microbial feed additive (NO.8901) [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 1994, 12(suppl.): 596—601 [余成瑶, 何明清, 郑德成. 肉用仔鸡饲喂鸡微生物饲料添加剂(8901)细胞碱性磷酸酶(AKP)定性、定位研究. 四川农业大学学报, 1994, 12(增刊): 596—601]

EFFECT OF FISH PROTEIN HYDROLYSATE LEVELS ON GROWTH PERFORMANCE AND BIOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS IN TONGUE SOLE (*CYNOGLOSSUS SEMILAEVIS* GÜNTHER, 1873) POST-LARVAE

LIU Xu-Dong^{1,3}, LIANG Meng-Qing¹, ZHANG Li-Min², WANG Ji-Ying²,
CHANG Qing¹, WANG Jia-Lin¹ and YANNIS Kotzamanis⁴

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Marine Fisheries Research Institute of Shandong Province, Yantai 264006; 3. Shengsuo Fishery Culture Feed Research Centre of Shandong Province, Yantai 265500; 4. Hellenic Centre for Marine Research, Athens)

Abstract: This study evaluated the effects of fish protein hydrolysate inclusion in the diet of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther, 1873) post-larvae on growth performance, the activities of alkaline phosphatase (AKP) and the digestive enzymes: pepsin, trypsin, lipase and amylase and intestine development in the fish. Four experimental diets were formulated by supplementing 0% (FM), 20% (FPH-20), 40% (FPH-40) and 60% (FPH-60) of FPH in the diet. Each diet was randomly assigned to triplicate groups of fish, and each group was stocked with 60 tongue sole post-larvae (30 days post-hatching, with an initial dry weight of 6.47 ± 0.38 mg) in 12 fiberglass tanks (50 cm×40 cm×20 cm). Fish were fed four times daily (05:00, 10:00, 15:00 and 21:00) to visual satiation for 28 days. During the feeding trial, water temperature and salinity were maintained at $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ and 30—32, respectively. At the end of the 28-day growth experiment, survivals of the fish were relatively high and ranged from 64.44% to 78.88%. Fish fed diets with 20% and 40% FPH showed significantly higher survival rates than other two groups ($P < 0.05$). Compared to the control, 20% FPH supplementation in the diet improved growth of the tongue larvae while high dose of FPH depressed that concerning the values of specific growth rate (SGR); the activities of digestive enzymes, such as lipase, amylase, pepsin and trypsin showed no obvious trends among all treatments between 14 and 28 d, respectively; the AKP activity in all groups were ordered as follows ($P < 0.05$): 20% FPH > 40% FPH > 0% FPH > 60% FPH; fish fed the diet with 20% FPH showed significantly higher intestinal villus and thicker mucosa than the other three groups ($P < 0.05$). In this study, the diet with 20% of the FPH gave the best results in terms of growth, survival and intestinal development in tongue sole post-larvae, indicating FPH had a nutritional value equivalent to fish meal (FM).

Key words: Fish protein hydrolysate; *Cynoglossus semilaevis* Günther post-larvae; Digestive enzymes; Alkaline phosphatase; Intestinal structure