

吉富罗非鱼亮氨酸需求量研究

石亚庆¹, 孙玉轩¹, 罗莉^{1*}, 敬婷¹, 陈拥军¹, 文华²

(1. 西南大学动物科技学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室,
水产科学重庆市市级重点实验室, 重庆 400715;

2. 中国水产科学院长江水产研究所, 淡水生态与健康养殖重点开放实验室, 湖北 武汉 430223)

摘要: 实验以初始体质量为 (53.65 ± 0.05) g 的吉富罗非鱼幼鱼为研究对象, 随机分为 7 个处理组(每个处理 3 个重复, 每个重复 14 尾鱼), 分别饲喂亮氨酸(Leu)水平为 1.11%、1.51%、1.90%、2.29%、2.69%、3.08% 和 3.48% 的 7 种等氮等能(粗蛋白 32%)的半精制饲料 56 d, 旨在评价吉富罗非鱼对 Leu 的最适需求量。结果表明, 以增重率(WGR)、特定生长率(SGR)、饲料系数(FCR)为评价指标, 通过二次回归分析可知, 在投饲率为 4%~6% 时, 罗非鱼饲料中适宜的 Leu 为 2.28%~2.33%。随饲料 Leu 水平的增加, 罗非鱼全鱼粗蛋白和粗脂肪、肌肉粗蛋白和粗脂肪均呈先升后降的趋势, 而全鱼和肌肉水分差异不显著。罗非鱼胃蛋白酶、肠蛋白酶、肠脂肪酶、肠淀粉酶和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性也随饲料 Leu 水平的升高呈先升后降趋势, 除肠脂肪酶活性在 2.69% 水平组最高外, 其他指标均在 2.29% 水平组达到最大值。同时, 罗非鱼肠道表皮生长因子(EGF)、肠道表皮生长因子受体(EGFR)、血清超氧化物歧化酶(SOD)、血清溶菌酶(LZM)和血清碱性磷酸酶(AKP)也均在 Leu 为 2.29% 水平组达到最大值。研究表明, 罗非鱼(50~200 g)饲料 Leu 的最适需求量为 2.28%~2.33% (占饲料蛋白的 7.11%~7.26%), 该 Leu 水平能显著促进肠粘膜的发育, 增强胃肠消化、吸收能力和机体非特异性免疫能力, 从而促进罗非鱼的生长和饲料的转化。

关键词: 吉富罗非鱼; 亮氨酸; 需求量; 酶活性

中图分类号: S 963

文献标志码: A

亮氨酸(Leucine, Leu), 属支链氨基酸(branched-chain amino acid, BCAA), 是水产动物的必需氨基酸之一。Leu 作为体内唯一的生酮氨基酸, 对水产动物的营养作用至关重要, 主要包括氧化供能、调节蛋白质代谢、促进糖异生、提高免疫机能和调节泌乳等作用^[1]。

罗非鱼是我国重要的淡水养殖品种, 目前已普遍推行集约化养殖, 因此对罗非鱼人工配合饲料的研发和生产日益增多。关于罗非鱼的营养需求和氨基酸平衡方面, 国内外学者已做了大量研究^[2-4], 但是研究结果大多是较小规格罗非鱼必需氨基酸的需要, 基于此, 开展在不同生长阶段下吉富罗非鱼(GIFT, *Oreochromis niloticus*)必需氨

基酸平衡模式的研究是很有必要的。

本实验以含有不同 Leu 水平的半精制饲料饲喂吉富罗非鱼幼鱼, 通过研究 Leu 对吉富罗非鱼生长及生理效应的影响, 确定了吉富罗非鱼 Leu 最适需要量, 为研制氨基酸平衡的人工配合饲料提供理论科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验饲料

根据罗非鱼肌肉中氨基酸模式, 以鱼粉、明胶、花生粕和包膜氨基酸(必需氨基酸和非必需氨基酸)混合物(包被材料为卡拉胶、羟甲基纤维素钠、 α -淀粉, 比例为 1:1:1)为主要蛋白源, 豆油为脂肪源,

收稿日期:2014-06-18 修回日期:2014-08-08

资助项目:国家罗非鱼现代产业技术体系建设专项(CARS-49);公益性行业(农业)科研专项(201003020);重庆市自然科学基金(cstc2011jjA80021)

通信作者:罗莉, E-mail:luoli1972@163.com

配制成半精制饲料(表1),包被方法参照 Millamena 等^[5]。基础饲料粗蛋白含量为 30.40%,其他成分及氨基酸组成见表2,通过在基础饲料中添加7组不同水平的 L-Leu(0、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2.0%、2.4%),同时调节 L-甘氨酸(L-Gly)(添加量分别为 2.4%、2.0%、1.6%、1.2%、0.8%、0.4%、0)(即实验饲料中基础饲料占

97.6%,Leu 和 Gly 共占 2.4%),保持饲料氮平衡,设计7组实验饲料 D1~D7,亮氨酸水平分别为 1.11%、1.51%、1.90%、2.29%、2.69%、3.08%、3.48%(实测)。D1~D7 实验饲料粗蛋白实测均值为 32.07%(添加 Leu 和 Gly 后的实测值,范围为 31.89%~32.15%)。饲料加工成 2 mm 大小的颗粒,60 °C 烘干后置冰箱中 -4 °C 保存。

表1 基础饲料配方及主要营养组成(风干基础)

Tab.1 Composition and nutrient level of basal diets(air-dry basis)

原料 ingredient	含量 content	原料 ingredient	含量 content
鱼粉 fish meal	14	磷酸二氢钙 mono-calcium phosphate	2
明胶 gelatin	3	氯化胆碱 choline chloride	0.5
花生粕 peanut meal	10	α-淀粉 α-starch	24.5
氨基酸混合物 amino acid mixture	12	大豆油 soybean oil	5
卡拉胶 carrageenan	0.5	合计	100
羧甲基纤维素钠 carboxymethyl cellulose sodium	0.5	营养组成 proximate composition	
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	10	粗蛋白 crude protein	30.40
小麦淀粉 wheat starch	17	粗脂肪 crude lipid	6.56
复合预混料 compound pre-mixture	1	粗灰分 crude ash	3.25

注:添加剂预混料为每千克全价饲料提供:铁,150 mg;铜,3.2 mg;锌,34.1 mg;锰,13.0 mg;碘,5.7 mg;硒,0.3 mg;钴,12.4 mg;维生素 A,2 000.0 IU;维生素 D,2 000.0 IU;维生素 E,100.0 mg;维生素 K₃,10.0 mg;维生素 B₁,5.0 mg;维生素 B₂,10.0 mg;烟酸,100.0 mg;维生素 B₆,10.0 mg;泛酸钙,40.0 mg;叶酸,5.0 mg;维生素 B₁₂,0.02 mg;生物素,1.0 mg;维生素 C,300 mg;肌醇,100 g

Notes: Additive premixture(provide mg or IU to diet per kg): Fe,150 mg; Cu,3.2 mg; Zn,34.1 mg; Mn,13.0 mg; I,5.7 mg; Se,0.3 mg; Co,12.4 mg; vitamin A,2 000.0 IU; vitamin D,2 000.0 IU; vitamin E,100.0 mg; vitamin K₃,10.0 mg; vitamin B₁,5.0 mg; vitamin B₂,10.0 mg; niacin acid,100.0 mg; vitamin B₆,10.0 mg; calcium pantothenic acid,40.0 mg; folic acid,5.0 mg; vitamin B₁₂,0.02 mg; biotin,1.0 mg; vitamin C,300 mg; inositol 100 g

表2 基础饲料中氨基酸组成分析(干物质)

Tab.2 Analyzed amino acid composition of the basal diets(dry matter)

氨基酸 amino acid	鱼粉-明胶-花生粕-小麦淀粉提供 provided by fish meal-gelatin-peanut meal-wheat starch	氨基酸混合物 provided by AA mixture	32%肌肉氨基酸 amount in 32 g muscle protein	基础饲料(实测) AA in basal diet (measured value)
缬氨酸 valine	0.72	0.7	1.32	1.43
色氨酸 tryptophane	0.18	0.21	0.39	ND*
苏氨酸 threonine	0.57	0.87	1.44	1.46
苯丙氨酸 phenylalanine	0.72	0.59	1.31	1.32
蛋氨酸 methionine	0.32	0.72	1.04	1.00
精氨酸 arginine	1.32	0.62	1.92	1.94
赖氨酸 lysine	0.93	1.8	2.73	2.72
组氨酸 histidine	0.38	0.30	0.74	0.78
亮氨酸 leucine	1.11	0.00	2.67	1.11
异亮氨酸 isoleucine	0.58	0.88	1.46	1.47
丙氨酸 alanine	1.05	0.89	1.94	1.95
丝氨酸 serine	0.57	0.71	1.28	1.29
胱氨酸 cystine	0.16	0.14	0.30	0.30
谷氨酸 glutamic acid	2.76	2.36	5.12	5.15
酪氨酸 tyrosine	0.52	0.5	1.02	1.03
脯氨酸 proline	0.95	0.13	1.08	1.16
天冬氨酸 aspartic acid	1.46	1.68	3.14	3.17

注:*色氨酸没有检测

Notes:* tryptophane was not detected

1.2 实验鱼与饲养管理

实验鱼购自重庆北碚歇马鱼种场,经3%的食盐溶液消毒后,暂养于水族缸中。以药饵投喂3 d,基础饲料驯化10 d后,选取体质健壮、规格整齐、均重为(53.65±0.05)g的罗非鱼294尾,分成7个处理组,每组3个重复,每个重复14尾鱼,随机分配到21个180 L的玻璃水族缸中,随后开始正式实验。饲养实验为期56 d,期间每天按总体质量的4%~6%分3次(8:00、12:00、17:00)进行表观饱食投喂。水源为曝气后的自来水,每天换水,并保持每天12 h光照,水温22~30℃,pH 6.6~7.0,溶氧浓度大于5 mg/L,氨氮浓度小于0.05 mg/L。

1.3 样品采集

养殖实验正式开始前取10尾鱼作为初始样本,测定全鱼常规营养成分。养殖实验结束停食24 h后,测定每缸鱼的总重和饲料投喂量,计算其WGR、SGR、FCR等。从每个处理中随机取22尾鱼,其中6尾鱼用于全鱼常规营养成分的测定;另外8尾鱼测定体质量和体长后,先在冰盘上解剖剥离内脏团、肝胰脏精度称量,用4℃预冷的生理盐水冲洗后,取测线上方背肌,分别放入液氮罐中速冻,然后转入-80℃低温冰箱中保存备用;剩余8尾鱼,尾静脉采血,离心(4℃,3 500 r/min)15 min后取上层血清置于-80℃超低温冰箱保存备用。

1.4 指标测定

生长指标的测定 根据测定的数据计算实验鱼增重率(weight gain rate, WGR)、特定生长率(specific growth rate, SGR)、饲料系数(feed conversion ratio, FCR),计算公式如下:

$$\text{增重率}(\%) = (W_t - W_0) / W_0 \times 100\%$$

$$\text{特定生长率}(\%/d) = (\ln W_t - \ln W_0) / d \times 100\%$$

$$\text{饲料系数}(\%) = F / (W_t - W_0);$$

式中, W_0 为实验开始时鱼体尾均重(g); W_t 为实验结束时鱼体尾均重(g); d 为养殖实验天数; F 为尾均摄食饲料总量(g)。

饲料原料、饲料、鱼体水分含量采用105℃常压干燥法测定;粗蛋白含量采用凯氏定氮法测定;粗脂肪含量采用索氏抽提法测定^[6]。

理化指标的测定 胃蛋白酶活性测定采用Folin-酚法^[7];肠道淀粉酶活性采用碘-淀粉比色法测定;肠道脂肪酶活性测定参照Iijima等^[8]等实验方法。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、血清超氧化物歧化酶(SOD)、血清溶菌酶(LYZ)和碱性磷酸酶(AKP)、考马斯亮蓝组织蛋白质含量等均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行测定。肠道EGF和EGFR分别采用EGF定量检测试剂盒(ELISA)和EGFR定量检测试剂盒(ELISA)测定,以上试剂盒购自上海拜力生物科技有限公司。

1.5 数据处理

实验结果以mean±SD表示,采用SPSS 19.0版本统计软件进行单因子方差分析(One-Way ANOVA),同时进行Turkey多重比较分析实验数据的差异显著性, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 Leu水平对罗非鱼生长性能和饲料利用率的影响

饲料Leu水平能显著影响罗非鱼的生长性能和饲料利用率(表3)。随饲料Leu水平的升高,罗非鱼的WGR、SGR均呈先升后降趋势,且在Leu水平为2.29%时达到最大,与缺乏组(1.11%)相比,分别升高了26.67%、14.62%。FCR呈先降后升趋势,在Leu水平为2.29%时,FCR最低,与缺乏组(1.11%)相比降低了15.91%。

表3 Leu水平对罗非鱼生长性能、饲料利用率的影响

Tab. 3 Effects of dietary Leu level on growth performance and feed utilization of GIFT tilapia

	饲料 Leu 水平/% dietary Leu level						
	1.11	1.51	1.90	2.29	2.69	3.08	3.48
初始尾均重/g IBW	53.65±0.01 ^a	53.59±0.02 ^a	53.67±0.07 ^a	53.57±0.03 ^a	53.68±0.10 ^a	53.65±0.08 ^a	53.72±0.07 ^a
结束尾均重/g FBW	175.96±1.68 ^a	188.66±2.45 ^b	199.65±4.08 ^{cd}	208.60±3.36 ^d	201.63±5.63 ^d	191.71±3.23 ^{bc}	178.61±2.88 ^a
增重率/% WGR	228.46±3.15 ^a	252.16±4.57 ^c	272.67±3.63 ^d	289.38±4.27 ^e	276.38±4.34 ^d	257.86±5.03 ^{bc}	233.40±5.37 ^a
特定生长率/(%/d) SGR	2.12±0.02 ^a	2.25±0.02 ^b	2.35±0.04 ^{cd}	2.43±0.03 ^d	2.37±0.05 ^{cd}	2.28±0.03 ^{bc}	2.15±0.03 ^a
饲料系数/% FCR	1.32±0.03 ^c	1.24±0.04 ^{bc}	1.16±0.02 ^{ab}	1.11±0.05 ^a	1.14±0.05 ^{ab}	1.28±0.05 ^c	1.33±0.02 ^c

注:同行数据肩注字母相同或无字母表示差异不显著($P > 0.05$),同行数据肩注小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),下表同

Notes: In the same row, values with same small letter superscripts or no letter superscripts mean no significant differences ($P > 0.05$), different small letter superscripts mean significant differences ($P < 0.05$). The same as the following

以饲料 Leu 水平为自变量 (X), 分别以罗非鱼 WGR (Y_1)、SGR (Y_2) 和 FCR (Y_3) 进行回归分析, 表明它们之间呈明显的二次回归关系 (图 1 ~ 图 3)。得回归方程为:

$$Y_1 = -37.772X^2 + 176.07X + 79.962 (R^2 = 0.9677), \text{WGR 达极值时 } X = 2.33;$$

$$Y_2 = -0.1930X^2 + 0.9010X + 1.3470 (R^2 = 0.9779), \text{SGR 达极值时 } X = 2.33;$$

$$Y_3 = 0.1455X^2 - 0.6595X + 1.8827 (R^2 = 0.9080), \text{FCR 达极值时 } X = 2.28.$$

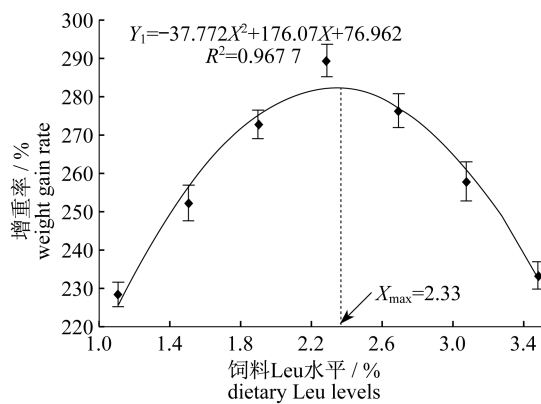


图 1 罗非鱼 WGR 与饲料 Leu 水平的关系
Fig.1 The relationship between WGR and dietary Leu levels of GIFT tilapia

2.2 Leu 水平对罗非鱼体成分的影响

饲料 Leu 水平能显著影响罗非鱼体组成 (表 4)。随着饲料 Leu 水平的增加, 全鱼 (干物质中) 粗蛋白和粗脂肪均呈先升后降趋势, 粗蛋白在 2.29% 和 2.69% 水平组差异不显著, 但显著高于其他组 ($P < 0.05$); 粗脂肪在 1.90% ~ 3.08% 4 个水平组之间差异不显著, 但显著高于其他组 ($P < 0.05$); 全鱼和肌肉水分在各水平组之间无

显著差异 ($P > 0.05$)。肌肉粗蛋白和粗脂肪均呈先升后降趋势, 粗蛋白在 2.29% 水平组达到最大值 ($P < 0.05$), 粗脂肪在 1.90% ~ 3.08% 4 个水平组之间差异不显著, 但显著高于其他组 ($P < 0.05$)。

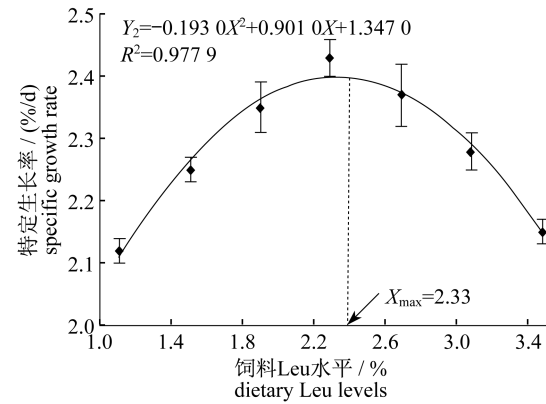


图 2 罗非鱼 SGR 与饲料 Leu 水平的关系
Fig.2 The relationship between SGR and dietary Leu level of GIFT tilapia

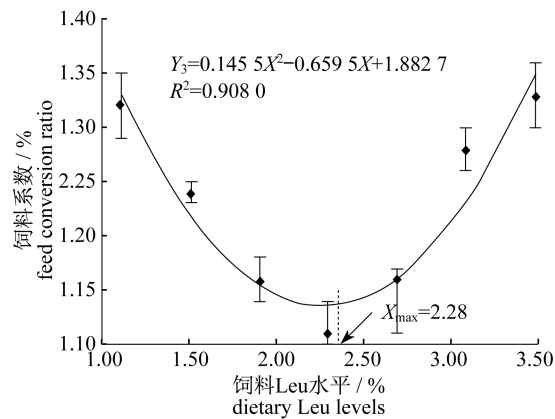


图 3 罗非鱼 FCR 与饲料 Leu 水平的关系
Fig.3 The relationship between feed conversion ratio and dietary Leu level of GIFT tilapia

表 4 Leu 水平对罗非鱼全鱼和肌肉组成的影响

Tab.4 Effect of dietary Leu levels on body and muscle composition of GIFT tilapia

	饲料 Leu 水平 / % dietary Leu level						
	1.11	1.51	1.90	2.29	2.69	3.08	3.48
全鱼 whole fish							
水分 moisture	70.51 ± 0.55 ^a	70.65 ± 0.21 ^a	70.29 ± 0.23 ^a	69.83 ± 0.12 ^a	70.53 ± 0.56 ^a	70.39 ± 0.23 ^a	70.01 ± 0.14 ^a
* 粗蛋白 crude protein	66.64 ± 0.47 ^a	66.87 ± 0.27 ^a	67.54 ± 0.39 ^b	68.67 ± 0.72 ^c	68.45 ± 0.69 ^c	67.79 ± 0.78 ^b	67.40 ± 0.32 ^b
* 粗脂肪 crude lipid	24.38 ± 1.19 ^a	24.80 ± 0.50 ^a	28.82 ± 0.56 ^b	29.15 ± 0.10 ^b	29.74 ± 0.97 ^b	28.56 ± 0.91 ^b	26.12 ± 0.62 ^a
肌肉 muscle							
水分 moisture	78.65 ± 0.82 ^a	78.57 ± 0.17 ^a	78.53 ± 1.00 ^a	78.61 ± 0.40 ^a	78.51 ± 0.41 ^a	78.46 ± 0.31 ^a	78.69 ± 0.30 ^a
* 粗蛋白 crude protein	86.84 ± 0.69 ^a	88.15 ± 0.73 ^b	88.82 ± 0.81 ^d	89.92 ± 0.99 ^e	88.86 ± 0.67 ^d	88.50 ± 0.73 ^c	88.25 ± 0.84 ^{bc}
* 粗脂肪 crude lipid	4.03 ± 0.05 ^a	4.29 ± 0.06 ^{ab}	4.67 ± 0.09 ^{bc}	5.05 ± 0.27 ^c	4.80 ± 0.25 ^c	4.94 ± 0.15 ^c	4.18 ± 0.12 ^a

注: * 干物质中含量

Notes: * The content of dry matter

2.3 Leu 水平对罗非鱼胃肠消化吸收能力的影响

饲料 Leu 水平能显著影响罗非鱼消化吸收能力(表 5)。随饲料 Leu 水平的升高,胃蛋白酶、肠蛋白酶、肠淀粉酶和肠 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性均呈先升后降趋势,饲料 Leu 水平为 2.29% 时,胃蛋白酶、肠蛋白酶和肠 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性显著高

于其他组 ($P < 0.05$),与缺乏组相比分别增加了 43.96%、234.60% 和 63.89%;饲料 Leu 水平在 1.90%~2.69% 3 个水平组之间时,肠淀粉酶活性差异不显著,但显著高于其他组 ($P < 0.05$);肠脂肪酶活性也呈先升后降趋势,饲料 Leu 水平在 2.29% 和 2.69% 时,肠脂肪酶活性差异不显著,且显著高于其他组 ($P < 0.05$)。

表 5 Leu 水平对罗非鱼胃肠消化酶和肠道 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性的影响
Tab.5 Effect of dietary Leu level on digestive enzyme of stomach and intestine and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ enzyme activity of GIFT tilapia

	饲料 Leu 水平/% dietary Leu level						
	1.11	1.51	1.90	2.29	2.69	3.08	3.48
胃蛋白酶/(U/mg prot)	4.80 ± 0.14 ^a	5.09 ± 0.13 ^a	6.30 ± 0.40 ^b	6.91 ± 0.23 ^c	6.21 ± 0.05 ^b	5.77 ± 0.14 ^b	5.08 ± 0.10 ^a
肠蛋白酶/(U/gprot)	3.67 ± 0.53 ^a	7.22 ± 0.99 ^{bc}	8.58 ± 0.56 ^c	12.28 ± 0.77 ^d	8.47 ± 2.16 ^c	6.18 ± 0.12 ^{ab}	4.75 ± 0.28 ^{ab}
肠脂肪酶/(U/gprot)	1.90 ± 0.29 ^a	3.12 ± 0.66 ^{abc}	4.49 ± 0.72 ^{cd}	5.56 ± 0.89 ^{de}	7.03 ± 0.64 ^e	3.86 ± 0.08 ^{bc}	2.34 ± 0.25 ^{ab}
肠淀粉酶/(U/mg prot)	1.10 ± 0.20 ^a	1.42 ± 0.12 ^{ab}	1.77 ± 0.49 ^{bc}	2.08 ± 0.19 ^c	1.72 ± 0.86 ^{bc}	1.42 ± 0.76 ^b	1.31 ± 0.18 ^a
肠 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶/(U/mg prot)	16.92 ± 0.55 ^b	21.32 ± 0.80 ^{cd}	22.81 ± 0.94 ^{de}	27.73 ± 0.39 ^f	23.98 ± 0.38 ^e	19.98 ± 1.25 ^c	12.67 ± 0.56 ^a

2.4 Leu 水平对罗非鱼肠道表皮生长因子及受体、抗氧化及非特异性免疫的影响

随饲料 Leu 水平升高,罗非鱼肠道表皮生长因子(EGF)、肠道表皮生长因子受体(EGFR)、血清 SOD、AKP 和 LZM 含量均呈先升后降趋势,饲料 Leu 水平为 2.29% 时,EGF、EGFR、AKP 显著

高于其他组 ($P < 0.05$),与缺乏组相比分别增加了 40.89%、146%、52.75%。饲料 Leu 水平为 1.90% 时,LZM 含量显著高于其他组 ($P < 0.05$),与缺乏组相比增加了 248.63%。饲料 Leu 水平为 1.51%~2.69% 4 个水平组时,血清 SOD 含量差异不显著,但显著高于其他组 ($P < 0.05$)。

表 6 Leu 水平对罗非鱼肠道 EGF、EGFR 和血清 SOD、AKP 和 LZM 活性的影响
Tab.6 Effect of dietary Leu level on intestine EGF,EGFR,serum SOD,AKP and LZM activity of GIFT tilapia

	饲料 Leu 水平/% dietary Leu level						
	1.11	1.51	1.90	2.29	2.69	3.08	3.48
EGF/(ng/L)	65.85 ± 0.77 ^b	72.45 ± 1.14 ^c	88.87 ± 0.89 ^f	92.77 ± 0.99 ^g	82.10 ± 1.05 ^e	78.71 ± 0.60 ^d	49.33 ± 0.53 ^a
EGFR/(ng/L)	1.77 ± 0.34 ^a	2.65 ± 0.04 ^{bc}	3.88 ± 0.09 ^d	4.36 ± 0.06 ^f	4.15 ± 0.04 ^e	2.71 ± 0.05 ^c	2.53 ± 0.05 ^b
血清/(U/mL) SOD	44.37 ± 18.57 ^a	72.67 ± 1.28 ^c	74.80 ± 1.21 ^c	73.01 ± 2.14 ^c	66.21 ± 3.04 ^{bc}	47.68 ± 0.88 ^{ab}	46.83 ± 0.53 ^{ab}
血清/(U/mL) AKP	33.59 ± 1.36 ^{ab}	36.34 ± 0.90 ^{abc}	41.62 ± 2.01 ^c	51.31 ± 2.61 ^d	39.67 ± 3.42 ^{bc}	34.93 ± 1.19 ^{abc}	29.78 ± 3.79 ^a
血清/(U/mL) LZM	145.45 ± 9.50 ^a	220.20 ± 9.25 ^b	507.08 ± 30.50 ^d	438.38 ± 9.62 ^c	428.28 ± 9.26 ^c	151.52 ± 6.06 ^a	149.50 ± 9.62 ^a

3 讨论

Leu 是水产动物的必需氨基酸之一,在机体的代谢过程中起着至关重要的作用。本实验以 WGR、SGR 和 FCR 为观测指标,通过二次回归分析确定吉富罗非鱼 Leu 的最适需求量为 2.28%~2.33% (占饲料蛋白的 7.11%~7.26%),该值低于本研究中 7 个组的肌肉 Leu (占蛋白的 8.11%~8.37%),与团头鲂 Leu 需求(占饲料蛋白的 6.98%)相近。但高于普通鲤 (*Cyprinus carpio*)、印度鲮 (*Cirrhinus mrigala*)、虹鳟

(*Oncorhynchus mykiss*)、斑点叉尾鲟 (*Ictalurus punctatus*)、遮目鱼 (*Chanos chanos*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)、鲈 (*Lateolabrax japonicus*)^[9-15] 等水产动物 (3.3%~5.67% 蛋白)。不同鱼类对 Leu 需求量有一定差异,这可能随着饲料蛋白来源、鱼的生长阶段、参考蛋白和氨基酸模式以及评价方法等不同而有所差异。

饲料中 Leu 影响水产动物的生长和饲料转化。Choo 等^[11]在虹鳟的研究中发现适宜的 Leu 促进生长,而随着 Leu 水平进一步升高,生长性能则没有显著影响。而伍曦^[16]在建鲤的研究中发

现,饲料中 Leu 的缺乏或过量都将导致建鲤的生长性能降低,饲料转化效率受阻。本实验在饲料中添加不同水平的 Leu,发现罗非鱼的生长和饲料的转化在缺乏和过量水平均受到抑制,与上述研究结果相一致。氨基酸的缺乏和过量都将破坏整体氨基酸之间的平衡,降低动物机体的蛋白质合成,从而抑制生长^[17]。同时过量 Leu 在体内氧化产生酮或其他代谢产物,引起了毒害作用,也能影响鱼类的生长^[18-19]。本实验通过在饲料中添加适宜的 Leu,有效地促使饲料氨基酸达到平衡,使蛋白质更易消化和吸收,进而提高了罗非鱼的生长性能。

饲料中 Leu 影响水产动物的体组成。Imtiaz 等^[10]对印度鲮和本实验对罗非鱼的研究证明,饲料中适宜的 Leu 水平具有提高鱼体肌肉蛋白含量的作用。其原因是 Leu 通过激活 mTOR 途径,促进吸收进入体内的氨基酸进行蛋白质合成,减少蛋白质分解代谢,从而促进蛋白质的沉积,提高鱼体蛋白质含量^[20-21]。同时,Cheng 等^[22]的研究表明,机体 Leu 缺乏时,脂肪组织解偶联蛋白 1 (UCP-1)和脂肪内激素敏感性脂肪酶(HSL)被激活,增加脂肪脂解,产热增加,使机体脂肪含量减少,本研究也证明了这点,过高和过低的 Leu 水平,罗非鱼全鱼和肌肉脂肪含量减少,适宜的 Leu 具有提高鱼体脂肪含量的作用。另外,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[23]、鲈^[17]等的研究表明,随饲料 Leu 水平的变化,体组成中水分的含量差异不显著,本研究也得到了相同的结果。综上所述,饲料中适宜的 Leu 能提高罗非鱼体蛋白质、脂肪的含量,而不影响水分含量。

水产动物肠道的消化吸收能力与肠粘膜结构完整性和功能完整性密切相关^[24]。本实验通过在饲料中添加适宜的 Leu 发现,肠道中 EGF 和 EGFR 表达活性上调。研究发现,EGF 通过与 EGFR 结合来产生一系列的与细胞生长增殖有关的生理生化反应,促进肠粘膜绒毛的发育^[25-26],同时 BCAA 在代谢过程中能够给谷氨酰胺提供氮源和碳源,而谷氨酰胺为肠道粘膜细胞的发育提供能量^[27-28],并且 Leu 的代谢产物 β -羟基- β -甲基戊二烯二酰 CoA 又是胆固醇的前体物质,胆固醇可以保持细胞膜的流动性,有利于保持肠上皮细胞的完整性^[29]。综上所述,饲料中添加适宜的 Leu,罗非鱼胃蛋白酶、肠蛋白酶、肠脂肪酶和

肠 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 等酶的活性均得到提高,其根本原因是饲料中 Leu 使得肠道粘膜细胞结构和功能的完整性得到维护,从而使得肠道消化吸收酶活性增加。

另外,本研究还表明,饲料 Leu 影响罗非鱼抗氧化和非特异性免疫能力。关于 Leu 对鱼类非特异性免疫影响机制的相关报道较少,仅有 Koch^[30]等研究发现,分解 BCAA 的支链 α -酮酸脱氢酶和脱羧酶存在于人类的免疫器官中。也有研究表明,Leu 可作为免疫细胞主要的能源物质^[31]。Leu 对鱼类抗氧化和非特异性免疫能力的影响机制有待进一步研究。

4 结论

罗非鱼 50 ~ 200 g 生长阶段的饲料 Leu 需求量为 2.28% ~ 2.33%,占饲料蛋白质的 7.11% ~ 7.26%,该 Leu 水平能显著促进肠粘膜的发育,增强胃肠消化和吸收能力和机体非特异性免疫能力,从而促进罗非鱼的生长和饲料的转化。

参考文献:

- [1] Xie X L, Wang M Q. Research advance of branched-chain amino acids in animal nutrition [J]. China Feed, 2009(11): 11 - 14. [谢小利,王敏奇.支链氨基酸在动物营养中的研究进展.中国饲料,2009(11): 11 - 14.]
- [2] Abdel-Tawwab M, Ahmad M H, Khattab Y A, et al. Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L [J]. Aquaculture, 2010, 298 (3): 267 - 274.
- [3] Chou B S, Shiau S Y. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* \times *Oreochromis aureus* [J]. Aquaculture, 1996, 143(2): 185 - 195.
- [4] Wang Y, Liu Y J, Tian L X. Effects of dietary carbohydrate level on growth and body composition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* \times *O. aureus* [J]. Aquaculture Research, 2005, 36 (14): 1408 - 1413.
- [5] Millamena O M, Bautista-Teruel M N, Kanazawa A. Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius [J]. Aquaculture, 1996, 143(3): 403 - 410.
- [6] Gui Y M. Aquatic animal functional experiment

- [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004. [桂远明. 水产动物机能学实验. 北京: 中国农业出版社, 2004.]
- [7] Department of Biochemistry, Department of Biology, Peking University. Biochemical experiments to guide [M]. Shang Hai: People's Education Press, 1980. [北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导. 上海: 人民教育出版社, 1980.]
- [8] Iijima N, Tanaka A, Ota Y. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major* [J]. Physiology and Biochemistry, 1998, 18(1): 385 - 400.
- [9] Nose T. Summary report on the requirements of essential amino acids for carp [J]. Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, 1978, 36(1): 145 - 156.
- [10] Imtiaz A, Mukhtar A K. Dietary branched-chain amino acid valine, isoleucine and leucine requirements of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) [J]. British Journal of Nutrition, 2006, 96(3): 450 - 460.
- [11] Choo P S, Smith T K, Cho C Y, et al. Dietary excess of leucine influence growth and body composition of rainbow trout [J]. The Journal of Nutrition, 1991, 121(12): 1932 - 1939.
- [12] Wilson R P, Poe W E, Robinson E H. Leucine, Isoleucine, Valine and Histidine Requirements of Fingerling Channel Catfish [J]. The Journal of Nutrition, 1980, 110(4): 627 - 633.
- [13] Borlongan I G, Coloso R M. Requirements of Juvenile Milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) for essential Amino Acids [J]. The Journal of Nutrition, 1993, 123(1): 125 - 132.
- [14] Kaushik S J. 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 [J]. Aquat Living Resour, 11(5): 355 - 358.
- [15] Li Y. Optimal requirements of branch chain amino acids and histidine in diets of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* and large yellow croaker *Pesudiscaena crocea* R [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010. [李燕. 鲈鱼和大黄鱼支链氨基酸与组氨酸营养生理的研究. 青岛: 中国海洋大学, 2010.]
- [16] Wu X. Effects of leucine on growth performance and immune of juvenile jian crap (*Cyprinus carpio*. Jian) [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2011. [伍曦. 亮氨酸对幼建鲤生长性能和免疫功能的影响. 雅安: 四川农业大学, 2011.]
- [17] Shang X D, Luo L, Wen H, et al. Study on isoleucine requirement for juvenile grass carp, *Cenopharyngodon idellus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(5): 813 - 822. [尚晓迪, 罗莉, 文华, 等. 草鱼幼鱼对异亮氨酸的需要量. 水产学报, 2009, 33(5): 813 - 822.]
- [18] Teshima S, Alam M S, Koshio S, et al. Assessment of requirement values for essential amino acids in prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate) [J]. Aquaculture Research, 2002, 33(6): 395 - 402.
- [19] Milamena O M, Teruel M B, Kanazawa A, et al. Quantitative dietary requirements of postlarval shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan [J]. Aquaculture, 1999, 179(1): 169 - 179.
- [20] Guertin D A, Guntur K V, Bell G W, et al. Functional genomics identifies TOR-regulated genes that control growth an division [J]. Current Biology, 2006, 16(10): 958 - 970
- [21] Fumiaki Y. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2004, 313(2): 417 - 422.
- [22] Cheng Y, Meng Q, Wang C, et al. Leucine deprivation decrease fat mass by stimulation of lipolysis in white adipose tissue and upregulation of uncoupling protein 1 (UCP1) in brown adipose tissue [J]. Diabetes, 2010, 59(1): 17 - 25.
- [23] Wang Y L. Study on the requirements of threonine, leucine, tryptophan and valine for juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013. [王用黎. 凡纳滨对虾幼虾对苏氨酸、亮氨酸、色氨酸和缬氨酸需要量的研究. 湛江: 广东海洋大学, 2013.]
- [24] Chen M Y, Zhang X M. Development of the digestive system in larval, Juvenile and young turbot *scophthalmus maximus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(2): 236 - 240. [陈慕雁, 张秀梅. 大菱鲆仔稚鱼消化系统发育的组织学研究. 水生生物学报, 2006, 30(2): 236 - 240.]
- [25] Dvorak B, Kolinska J, Mewilliam D L. The expression of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha mRNA in the small intestine of suckling rats: Organ culture study [J]. Febs Letter, 1998, 435(1): 119 - 124.
- [26] Liu S J, Xu Z W, Qi K K, et al. Regulation of

- epidermal growth factor on intestinal functions[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(3): 565-570. [刘淑杰,徐子伟,齐珂珂,等.表皮生长因子对肠道功能调控的研究.动物营养学报,2014,26(3):565-570.]
- [27] Chen L X, Li P, Wang J J, *et al.* Catabolism of nutritionally essential amino acids in developing porcine enterocytes[J]. Amino Acids, 2009, 37(1): 143-152.
- [28] Ye Y T, Wang Y L, Cai C F, *et al.* Effects of the L-glutamine on the absorption of L-leucine, L-proline and the protein synthesis in intestine of grass carp [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2007, 19(1): 28-32. [叶元土,王永玲,蔡春芳,等.谷氨酰胺对草鱼肠道 L-亮氨酸、L-脯氨酸吸收及肠道蛋白质合成的影响.动物营养学报,2007,19(1): 28-32.]
- [29] Wang J Y. Biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 2005: 251-253. [王镜岩.生物化学.北京:高等教育出版社,2005:251-253.]
- [30] Koch B, Schroder M T, Schafer G, *et al.* Comparison between transport and degradation of leucine and glutamine by peripheral human lymphocytes exposed to concanavalin A [J]. Cell Physiol, 1990, 143(1): 94-99.
- [31] Phillip C. Branched-chain amino acids and immunity [J]. The Journal of Nutrition, 2006, 136(1): 288-293.

Dietary leucine requirement of tilapia (*GIFT Oreochromis niloticus*)

SHI Yaqing¹, SUN Yuxuan¹, LUO Li^{1*}, JING Ting¹, CHEN Yongjun¹, WEN Hua²

(1. College of Animal and Technology of Southwest University, Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, Chongqing 400715, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Ecology and Aquaculture, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China)

Abstract: To determine dietary leucine (Leu) requirement of tilapia (*GIFT Oreochromis niloticus*), tilapias with an initial body weight (53.65 ± 0.05) g were randomly divided into seven treatments in triplicates with 14 fishes per repetition. Seven isonitrogenous (crude protein 32%) and isoenergetic semi-purified diets containing different levels (1.11%, 1.51%, 1.90%, 2.29%, 2.69%, 3.08% and 3.48%) of dietary Leu were fed to tilapias at the feeding rate of 4%–6% for 56 d. Quadratic regression analysis showed that the optimal dietary Leu levels of tilapia were 2.28%–2.33% base on weight gain rate (WGR), specific growth rate (SGR), feed conversion ratio (FCR). With an increase of dietary Leu level, the crude protein and crude lipid content of whole body and muscle initially increased and then decreased, but there were no significant differences in moisture content of muscle. With an increase of dietary Leu level, activities of intestinal amylase activity, intestinal protease, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ initially increasing and then decreased, and the lipase activity get maximum at 2.69% level and the others got maximum at 2.29% level. With the increase of dietary Leu level, the concentrations of EGF and EGFR, and the activities of SOD, LZM and AKP also initially increased and then decreased, all got maximum at 2.29% level. In conclusion, the optimal dietary Leu level for 50–200 g *GIFT* tilapia was 2.28%–2.33% (or 7.11%–7.26% of dietary protein). This Leu level can significantly promote the development of intestinal mucosa, enhance gastro-intestinal digestion and absorption capacity, thus improve the body's nonspecific immunity, and then promote the growth and utilization of tilapia.

Key words: *GIFT Oreochromis niloticus*; leucine; requirement; enzyme activity

Corresponding author: LUO Li. E-mail: luoli1972@163.com