

## 蛋白质营养对异育银鲫生长和免疫力的影响

蔡春芳 吴康 潘新法 王永玲 宋学宏

(苏州大学水产学院, 苏州 215151)

**摘要:** 用蛋白质水平和必需氨基酸指数(EAAI)不同的饲料喂养异育银鲫, 每种饲料喂3箱鱼, 各组鱼根据所喂饲料蛋白质水平不同分别称为10%组、20%组、30%组、40%组、50%组, 饲养6周和14周后分别作分析测定。结果表明, 饲养6周后相对增长率随蛋白质含量的增加而升高, 14周后则以40%组相对增长率最高, 30%组、40%组、50%组差异不显著但均显著高于另两组; 14周时10%组和50%组的蛋白质效率(PER)比6周时显著降低, 且以30%组最高。相对增长率和PER均随EAAI下降而下降。免疫力以20%组最高, 20%组和30%组差异不显著, 而且免疫力也随EAAI下降而下降。上述结果说明生长速度最快的鱼其免疫力并不一定最佳。体脂含量的增加与免疫力下降有一定的相关性。

**关键词:** 蛋白质营养; 免疫力; 蛋白质效率; 增长率; 异育银鲫

**中图分类号:** Q493.99 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2001)06-0590-07

早在1968年人们就开始注意到饲料对养殖鱼类抗病力的影响<sup>[1]</sup>, 随着养殖集约化程度的提高, 爆发性病害带来的经济损失将越来越大, 因而通过科学的营养提高养殖鱼类免疫力, 减少病害发生将发挥越来越显著的作用。近年来鱼类免疫学研究取得了长足的进展, 关于鱼类免疫组织和器官、非特异性体液因子、细胞免疫、体液免疫以及影响免疫因答的因素等方面的研究都在不断深入<sup>[2-5]</sup>, 为研究营养与免疫的相关关系提供了可能。本文以异育银鲫为材料, 就蛋白质营养与生长及非特异性免疫力之间的关系作初步探讨。

### 1 材料和方法

**1.1 材料鱼来源及处理** 异育银鲫购自吴县沙湖养殖场, 暂养2个月后将开始实验, 首先挑选规格整齐、体格健壮的异育银鲫用2%食盐水消毒, 然后放入78×40×50(cm)玻璃水族箱驯养, 驯养期间投喂商品饲料, 日投饲率3%, 分2次投喂, 每天上午8:30换水三分之一, 全天充气增氧。平均水温约24℃, 成活率100%, 驯养4周后随机分组, 每个水族箱放养16尾鱼, 另取5尾鱼进行体成分分析, 其中粗蛋白测定用凯氏定氮法, 粗脂肪测定用索氏抽提法, 水分测定用105℃烘干恒重法, 灰分测定用550℃灼烧法<sup>[6]</sup>。

**1.2 蛋白质水平对生长及免疫力的影响** 本实验设计了5个跨度较大的蛋白质梯度, 饲

收稿日期: 2000-05-08; 修订日期: 2001-06-06

基金项目: 江苏省教委自然科学基金资助项目(Q2114905)

作者简介: 蔡春芳(1967—), 女, 江苏海门人; 硕士, 现任苏州大学水产学院教师; 主要从事鱼类营养学研究

料配方如表 1。用试验饲料喂养异育银鲫,每种饲料喂 3 箱鱼,日常管理同前。在饲养 6 周后称重并随机从各箱取 8 尾鱼进行白细胞吞噬试验和溶菌酶、超氧化物歧化酶(SOD)活力测定,其余的鱼饲养 14 周后作同样处理并进行体成分分析。

表 1 不同蛋白质水平的饲料配方

Tab. 1 Formulation of experimental diets with different protein level

蛋白质水平 Protein level	10%	20%	30%	40%	50%
配方 Ingredients					
鱼粉 Fish meal <sup>1</sup>	14.5	28.9	43.4	57.8	72.3
鱼油 Fish oil	6.38	4.79	3.19	1.60	0
维生素预混料 Vit premix <sup>2</sup>	1	1	1	1	1
无机盐预混料 Min premix <sup>2</sup>	5	5	5	5	5
糊精 Dextrin	15	15	15	15	15
粘合剂 Binder	3	3	3	3	3
纤维素 Fiber	55.1	42.3	29.4	16.6	3.7
分析 Analysis					
粗蛋白 Crude protein	10.06	20.15	30.02	40.49	50.33
粗脂肪 Crude lipid	7.96	7.95	7.95	7.96	7.97

注:1) 鱼粉粗蛋白含量为 69.2%,脂肪含量为 11.02%

2) 维生素预混料参考 halver 配方,无机盐预混料参考获野配方<sup>[1]</sup>,下同

**1.2.1 吞噬试验** 用肝素湿润注射器并干燥处理,从尾动脉取血后用 pH7.2 Hanks 稀释至 3 倍体积。向试管中加入 80% 的淋巴细胞分离液 1mL,取 2mL 稀释血轻轻滴加于分离液液面,4000r/min 离心 20min,取有白色絮状物的中间层用 Hanks 洗 2 次,所得白细胞再用 Hanks 稀释至  $1 \times 10^7$ /mL。取 2 倍浓度的灭活白色念珠菌悬液与白细胞同体积混合,在 28℃ 恒温振荡培养箱中孵育 30min,0.25% 戊二醛固定,涂片,Gimesa-Wrights 染色,镜检并计数吞噬率,吞噬一个细菌或粘附 2 个细菌及其以上的细胞数占白细胞的百分率为吞噬率,每次计数 200 个细胞。

**1.2.2 超氧化物歧化酶(SOD 酶)活力测定** 往盛有 4.5mL 50mmol/L pH8.3 的磷酸缓冲液内加入待测血清 10 $\mu$ L 及 50mmol/L 连苯三酚 10 $\mu$ L,迅速摇匀,在 325nm 波长下每隔 20s 测 A 值一次,按下式计算 SOD 酶活性。

$$\text{酶活性} = \frac{0.07 - A_{325}/\text{min}}{0.07 \times 50\%} \times 100\% \times \text{反应液体积} \times \frac{\text{样品的稀释倍数}}{\text{样液体积}}$$

**1.2.3 溶菌酶活力测定** 将活化的大肠杆菌接种于培养基内,在 35℃ 下振荡培养 48h,用 PBS 洗涤两次后稀释至  $A_{570} = 0.3$ 。测酶活性时取菌液 3mL 于试管内,加入 50 $\mu$ L 待测血清后迅速测  $A_0$  值,然后将试管于 37℃ 水浴中作用 30min,终止反应后测 A 值。溶菌活力 =  $(A_0 - A)/A_0$ 。

**1.3 必需氨基酸指数(Essential amino acid index, EAAI)对生长及免疫力的影响** 实验将鱼粉与大豆蛋白按一定比例混合,如表 2,使其蛋白质含量保持在 30%,但由于大豆蛋白氨基酸不平衡,就使各种饲料 EAAI 不同,如表 3。用这些饲料喂养异育银鲫,同样每种饲

料喂 3 箱鱼, 分别于 6 周和 14 周后, 从各箱取鱼称重, 并从尾动脉取血进行吞噬试验、SOD 酶和溶菌酶活性测定以及体成分分析, 方法同上。

**1.4 数据处理** 所有数据经方差分析后, Duncan 新复极差检验; 体脂与免疫力、EAAI 与免疫力间回归关系用 CASIO fx-3600PV 计算器计算, 蛋白质水平与免疫力间关系用矩阵进行多态回归计算, 回归显著性用方差分析 ( $P < 0.05$ )。

表 2 不同 EAAI 的饲料配方

Tab 2 Formulation of experimental diets with different EAAI

组别 Groups	1	2	3	4
鱼粉 Fish meal	43.4	28.9	14.5	—
大豆组织蛋白 Soybean tissue protein	—	19.5	38.9	58.4
鱼油 Fish oil	0	1.60	3.18	4.77
维生素预混料 Vit Premix	1	1	1	1
无机盐预混料 Min premix	5	5	5	5
糊精 Dextrin	20	20	20	20
粘合剂 Binder	3	3	3	3
纤维素 Fiber	27.6	21.0	14.4	7.8

表 3 试验饲料的必需氨基酸含量和 EAAI

Tab.3 Essential amino acid composition and EAAI of the experimental diets

组别 Groups	鱼肌肉 Fish muscle	1(鱼粉 Fish meal)	2	3	4(大豆组织蛋白 Soybean tissue protein)
赖氨酸 Lys	6.21	5.84	4.72	3.61	2.49
组氨酸 His	1.90	1.42	1.29	1.17	1.04
精氨酸 Arg	4.69	4.34	3.86	3.37	2.89
亮氨酸 Leu	5.25	5.27	4.49	3.72	2.94
异亮氨酸 Ile	2.46	2.96	2.59	2.22	1.85
蛋氨酸 Met	1.97	2.05	1.59	1.12	0.66
苯丙氨酸 Phe	2.93	2.78	2.56	2.34	2.12
苏氨酸 Thr	3.17	2.91	2.50	2.00	1.51
缬氨酸 Val	3.05	3.51	3.00	2.50	1.99
∑	31.63	31.16	26.6	22.05	17.49
EAAI	100	98.12	83.99	69.62	54.56

注: 鱼肌肉和鱼粉中氨基酸含量由分析而得, 大豆组织蛋白必需氨基酸含量参考陈乃松等<sup>[6]</sup>, 2、3 组饲料必需氨基酸含量由计算而得, 色氨酸未检测

## 2 结果与讨论

### 2.1 蛋白质营养对增重率及蛋白质效率 (Protein efficiency rate, PER) 的影响

由表 4 可见, 经 6 周饲养, 相对增长率随蛋白质水平的提高而提高。当蛋白质水平从 10% 增加到 30% 时, 各组间相对增长率差异显著, 但当蛋白质水平进一步增加到 50% 时, 相对增长率不再显著增加。而饲养至 14 周时, 相对增长率以 40% 组最高, 多重比较结果

与6周的相同。从蛋白质效率来看,6周饲养结果表明蛋白质含量低于30%时,PER均较高,蛋白质含量超过30%时,PER依次降低,而14周饲养结果与此有所不同,当蛋白质水平低于30%时,PER随蛋白质水平的提高而提高,当蛋白质含量进一步增加时,PER依次降低。造成这一结果的可能原因是能量与蛋白质失调,由计算可知,不同蛋白质含量的各组饲料其能量蛋白比分别为808.2、522.3、427.0、379.3、350.7。在饲养的前6周,由于鱼体内原来脂肪积累较少,当摄入高能饲料时,由于对蛋白质的节约作用,PER较高。并且将大量能量以脂肪形式积累在体内<sup>[2]</sup>,从而使蛋白质水平较低时相对生长率较高,PER相应提高。而用高蛋白饲料喂养的鱼,由于代谢负荷加重,尤其是由于特殊动力作用增加了热能消耗(特殊动力作用消耗的能量一般占饲料总能的10%—30%),从而降低了能量利用率和PER<sup>[9]</sup>。饲养至14周时,10%组和50%组PER较6周时显著降低,20%组和30%组PER显著高于10%组、40%组和50%组。其原因可能是10%组鱼由于摄入能量相对过剩,脂肪积累不断增加,对饲料中营养素和能量利用率就不如前期高,从而使PER较前期有所下降。50%组则可能由于蛋白质水平过高,异育银鲫长时间超负荷代谢使相对生长率有所降低,PER则显著降低。

表4 蛋白质营养作用对增重率及蛋白质效率的影响

Tab.4 Effects of protein nutrition on body weight gain rate and protein efficiency rate

组别 groups	蛋白质水平 Protein content					EAAI				
	10%	20%	30%	40%	50%	98.12	83.99	69.62	54.56	
IBW	14.53	14.69	14.57	14.22	14.83	14.71	14.68	14.50	14.59	
FBW 6周	18.1	21.48	24.87	25.23	24.98	22.52	40.51	39.64	33.05	
14周	21.79	30.52	40.95	26.57	23.48	22.31	39.49	36.21	31.05	
TF 6周	20.26	20.42	20.30	20.03	20.57	20.47	20.41	20.23	20.31	
14周	52.07	50.75	53.96	50.01	51.00	52.61	51.32	47.81	45.36	
WGR 6周	24.56 <sup>a</sup>	46.24 <sup>b</sup>	70.72 <sup>a</sup>	77.43 <sup>a</sup>	79.18 <sup>a</sup>	69.80 <sup>a</sup>	59.94 <sup>a</sup>	55.37 <sup>a</sup>	52.93 <sup>a</sup>	
14周	49.93 <sup>a</sup>	107.74 <sup>b</sup>	181 <sup>a</sup>	184.85 <sup>a</sup>	166.24 <sup>a</sup>	169.43 <sup>a</sup>	146.59 <sup>b</sup>	127.89 <sup>c</sup>	111.65 <sup>d</sup>	
PER 6周	1.75 <sup>a</sup>	1.66 <sup>b</sup>	1.76 <sup>a</sup>	1.37 <sup>b</sup>	1.14 <sup>c</sup>	1.67 <sup>a</sup>	1.43 <sup>b</sup>	1.32 <sup>b</sup>	1.27 <sup>b</sup>	
14周	1.39 <sup>b</sup>	1.56 <sup>a</sup>	1.63 <sup>a</sup>	1.30 <sup>b</sup>	0.97 <sup>c</sup>	1.58 <sup>a</sup>	1.40 <sup>b</sup>	1.29 <sup>c</sup>	1.20 <sup>d</sup>	

注:1) IBW:初重 Initial body weight(g); FBW:末重 Final body weight(g); TF:投饲量 Total feeding(g); WGR:相对生长率 Weight gain rate; PER:蛋白质效率 Protein efficiency rate

2) 同行上标相同表示差异不显著,上标不同表示差异显著,下同

这一结果与饲养结束后鱼体体成分分析结果一致。由表5可见,饲料蛋白质水平过高或过低,均使体脂含量增加。摄食水平的提高会显著增加体脂含量<sup>[10]</sup>,饲料中脂肪吸收后主要在肠、肠系膜等处沉积,而高蛋白饲料显著增加肝胰脏脂肪含量。长期摄食高能或高蛋白饲料会导致营养性脂肪肝,这将对生长不利。本实验虽未对肝胰脏、肠等处脂肪含量作分别测定,但从全鱼脂肪含量可见,能量蛋白比太高或蛋白质水平过高,全鱼脂肪含量均显著增加。由此可以推测肝胰脏脂肪沉积过多导致相对生长率和蛋白质效率下降。

从表4还可看出,相对生长率和蛋白质效率随EAAI下降依次降低,这一结果与能势

关于虹鳟、侯文璞等关于对虾的研究结果一致。此外, EAAI 对异育银鲫体组成也有一定影响, 随着 EAAI 降低, 鱼体粗蛋白显著降低, 脂肪含量相应增加。

表 5 蛋白质营养作用对体成分的影响

Tab.5 Effects of protein nutrition on body composition

	实验前 Before experiment	实 验 后 After experment								
		蛋白质水平 Protein level					EAAI			
		10%	20%	30%	40%	50%	98.12	83.99	69.62	54.56
粗蛋白 Crude protein	14.0	14.1	13.8	14.3	14.1	14.2	14.4 <sup>A</sup>	14.3 <sup>A</sup>	13.9 <sup>B</sup>	14.0 <sup>B</sup>
粗脂肪 Crude lipiol	3.5	4.4 <sup>A</sup>	4.1 <sup>Ad</sup>	3.6 <sup>B</sup>	3.9 <sup>Ab</sup>	4.2 <sup>A</sup>	3.8 <sup>B</sup>	4.0 <sup>B</sup>	4.4 <sup>A</sup>	4.3 <sup>A</sup>
灰分 Ash	3.1	3.0	3.1	2.9	3.0	2.9	3.1	3.1	3.0	2.9
水分 Moisture	78.4	77.8	78.3	78.1	77.9	77.3	77.5	77.3	78.1	78.3

## 2.2 蛋白质营养对溶菌酶、SOD 酶活性及白细胞吞噬率的影响

由表 6 可见, 饲养 6 周后异育银鲫 SOD 酶活性按 10% 组、20% 组、30% 组依次升高, 并在蛋白质含量进一步提高至 40%、50% 时逐渐下降; 饲养 14 周后 SOD 酶活性以 20% 组最高, 40% 组显著低于 20% 组, 10% 组和 50% 组又显著低于 40% 组。随着 EAAI 下降 SOD 活性也依次下降。异育银鲫白细胞吞噬率在饲养 6 周时以 20% 组最高, 30% 组次之, 10% 组、40% 组、50% 组差异不显著, 并明显低于前两组。14 周时 20% 组吞噬率仍最高, 30% 组、40% 组次之, 10% 组和 50% 组显著降低, 吞噬率也随着 EAAI 下降而降低。

表 6 蛋白质营养作用对免疫力的影响

Tab.6 Effects of protein nutrition on immunological activity

组别 Groups		蛋白质水平 Protein level					EAAI			
		10%	20%	30%	40%	50%	98.12	83.99	69.62	54.56
溶菌酶活力	6 周	0.244	0.247	0.240	0.247	0.237	0.248	0.239	0.241	0.233
Activity of lysozyme	14 周	0.226	0.233	0.235	0.236	0.229	0.238	0.224	0.231	0.234
SOD 酶活力	6 周	113.1 <sup>B</sup>	148.5 <sup>A</sup>	149.4 <sup>A</sup>	131.9 <sup>Ab</sup>	110.0 <sup>B</sup>	155.5 <sup>A</sup>	152.8 <sup>AB</sup>	141.4 <sup>B</sup>	127.9 <sup>C</sup>
Activity of SOD	14 周	126.3 <sup>A</sup>	157.1 <sup>A</sup>	153.7 <sup>A</sup>	142.5 <sup>B</sup>	121.9 <sup>C</sup>	159.0 <sup>A</sup>	148.6 <sup>A</sup>	146.4 <sup>A</sup>	119.3 <sup>B</sup>
吞噬率(%)	6 周	5.62 <sup>B</sup>	6.81 <sup>A</sup>	6.33 <sup>Ad</sup>	5.74 <sup>B</sup>	5.56 <sup>B</sup>	6.58	6.63	6.12	6.24
Phagocytic index	14 周	5.84 <sup>A</sup>	6.98 <sup>A</sup>	6.27 <sup>Ad</sup>	6.44 <sup>B</sup>	5.82 <sup>C</sup>	6.90 <sup>A</sup>	6.38 <sup>B</sup>	6.35 <sup>B</sup>	6.18 <sup>B</sup>

溶菌酶各组差异不显著。一般认为溶菌酶在免疫中的作用主要是水解细菌细胞壁中的粘多糖而使之死亡或裂解。但多数非致病菌并不能被溶菌酶所裂解<sup>[11]</sup>。王伟庆等<sup>[12]</sup>报道不同处理的中国对虾血清对副溶血弧菌和溶藻弧菌的杀菌活力具显著差异, 而对大肠杆菌的杀菌活力无显著差异, 并因此推测其原因可能在于大肠杆菌不是对虾敏感的致病菌。本实验中溶菌酶活性各组差异不显著, 一种可能是溶菌酶活性不是对蛋白质营养敏感的免疫力指标, 也有可能因为大肠杆菌不是异育银鲫敏感的致病菌。

前面已讨论过蛋白质含量不足或过剩导致相对生长率和蛋白质效率下降的原因可能在于这些饲料能量相对过剩, 这些过量摄入的能量如能被鱼类利用则主要以脂肪形式沉积于体内, 尤其是内脏器官。脂肪过量沉积与免疫力下降是否存在关系呢? 由表 7 可见,

SOD酶活性与体脂含量呈强相关,白细胞吞噬率虽然与体脂含量相关性不显著,但相关系数较大,因而很有可能与内脏脂肪如肝脂含量等具有显著相关性,这还有待于进一步确证。实验证实:免疫力对饲料蛋白质含量和EAAI回归关系显著,蛋白质含量在28%左右时异育银鲫免疫力最强。

综上所述,蛋白质水平和EAAI对异育银鲫免疫力有显著的影响,蛋白质水平在28%左右时,异育银鲫免疫力最强;蛋白质水平进一步提高至40%以上时,虽然仍保持较高的相对生长率,但免疫力和蛋白质效率显著下降;蛋白质水平太低不仅导致生长速度太慢,也使鱼体免疫力下降。在相对适宜的蛋白质水平条件下,AA全面平衡不仅使鱼获得较快的生长速度,而且免疫力也有所增强。

#### 参考文献:

- [1] 杨顺德. 营养与鱼类之抗病力[J]. 养鱼世界, 1983(9): 23—26
- [2] 李爱杰. 水产动物营养与饲料学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 8—107
- [3] 聂品. 鱼类非特异性免疫研究的新进展[J]. 水产学报, 1997, 21(1): 69—73
- [4] 杨先乐. 鱼类免疫学研究的进展. 水产学报[J], 1989, 13(3): 271—284
- [5] 卢全章. 草鱼头肾免疫细胞超微结构的观察[J]. 水生生物学报, 1997, 21(2): 152—155
- [6] 中山大学生物系生化教研室. 生化技术导论[M]. 北京: 人民教育出版社, 1979, 9—58
- [7] 王道尊. 鱼用配合饲料[M]. 北京: 农业出版社, 1995, 113, 124
- [8] 陈乃松. 欧洲鳊配合饲料中大豆蛋白替代鱼粉的研究[J]. 水产学报, 1998, 22(3): 283—287
- [9] 刘家寿. 体重和摄食水平对鳊鱼和乌鳢身体的生化组成和能值的影响[J]. 水生生物学报, 2000, 24(1): 19—24
- [10] 曹俊明. 饲料蛋白质、脂肪、碳水化合物水平对草鱼生长和组织营养成分组成的影响[J]. 水产科技情报, 1997, 24(2): 56—60
- [11] 余灏等编. 临床免疫技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982, 4
- [12] 王伟庆. 一种药物饲料对中国对虾免疫功能的影响[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1998, 189—200

## THE EFFECTS OF PROTEIN NUTRITION ON GROWTH AND IMMUNOLOGICAL ACTIVITY OF ALLOGYNOGENETIC SILVER CRUCIAN CARP

CAI Chun-fang, WU Kang, PAN Xin-fa, WANG Yong-ling and SONG Xue-hong

(*Fisheries College, Suzhou University, Suzhou, 215151*)

**Abstract:** Diets containing different level of crude protein and essential amino acids index (EAAI) were fed respectively to allogynogenetic silver crucian carp. Each diet was fed to three aquaria and there were 10% group, 20% group, 30% group, 40% group and 50% group in accordance with the protein content of diets fed the fish. The analysis and determination were carried out respectively in six weeks later and fourteen weeks later. Results indicated that the weight gain rate increased with the protein level elevating in six weeks later, While the 40% group is the highest in fourteen weeks later. There were no significant difference among 30% group, 40% group and 50% group, but 10% group and 20% group decreased markedly. Protein efficiency rate (PER) of 10% group and 50% group in fourteen weeks later depressed significantly than that in six weeks later, and that of 30% group is the highest in fourteen weeks later. Both weight gain rate and PER depressed with the EAAI decreasing. There were no significant difference in immunological activities between 20% group and 30% group, with the 20% group is the highest. Immunological activities depressed with the EAAI decreasing too. All those indicate that fish in great weight gain rate were not often with the strongest immunological activities. Further more, there were marked relation between immunological activity and body lipid content. ( $P < 0.05$ )

**Key words:** Protein nutrition; Immunological activity; Weight gain rate; Protein efficiency rate; Allogynogenetic Silver crucian carp