

文章编号:1000 - 0615(2002)03 - 0252 - 07

# 实用饲料补充结晶或包膜赖氨酸对草鱼生长、血清游离氨基酸和肌肉蛋白质合成率的影响

刘永坚<sup>1</sup>, 田丽霞<sup>1</sup>, 刘栋辉<sup>1</sup>, 梁桂英<sup>1</sup>, 赵小奎<sup>1</sup>, 朱选<sup>2</sup>, 阳会军<sup>2</sup>, 关国强<sup>2</sup>

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 广东省畜牧研究所, 广东 广州 510640)

**摘要:** 研究设计4种试验饲料(纯化饲料、实用饲料以及分别补充结晶和包膜赖氨酸的两种实用饲料)。试验草鱼放养在玻璃钢水族箱(100cm ×50cm ×50cm)中, 每箱放养30尾(平均体重 $7.27 \pm 0.5$  g), 每种处理设3个平行组, 饲养9周。试验结果表明, 纯化饲料组的增重率和蛋白质合成率( $K_s$ )明显高于3组实用饲料( $P < 0.05$ )。实用饲料补充包膜赖氨酸与不补充或补充结晶赖氨酸比较, 增重率、蛋白质效率、血清必需氨基酸平衡指数(EAAP)和蛋白质合成率都得到改善。包膜赖氨酸, 是补充饲料蛋白质的一种很好的途径。

**关键词:** 草鱼; 补充赖氨酸; 蛋白质合成率

中图分类号: S963 文献标识码: A

## Influence of practical diet supplementation with free or coated lysine on the growth, plasma free amino acids and protein synthesis rates in the muscle of *Ctenopharyngodon idellus*

LIU Yong-jian<sup>1</sup>, TIAN Li-xia<sup>1</sup>, LIU Dong-hui<sup>1</sup>, LIANG Gui-ying<sup>1</sup>, ZHAO Xiao-kui<sup>1</sup>

Zhu Xuan<sup>2</sup>, Yang Hui-jun<sup>2</sup>, Guan Guo-qiang<sup>2</sup>

(1. School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. Institute of Animal Science, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Four experiment diets were designed (purified diet, practical diet and practical diet with lysine uncoated or coated). Grass carp (mean weight of  $7.27 \pm 0.5$  g) were fed separately in 12 fiberglass tanks (100cm ×50cm ×50cm) with 30 fish per tank. Every experiment diet was taken three repeats. The experiments lasted 9 weeks. Results indicated that grass carp fed with the purified diet showed a significantly higher growth ratio and protein synthesis rate ( $K_s$ ) than fish fed with the practical diet ( $P < 0.05$ ). Practical diet with coated lysine improved the growth rate, feed conversion, balance of essential amino acid in plasma (BEAAp) and protein synthesis rate ( $K_s$ ) in comparison with diet with lysine uncoated or deficiency. Coated lysine, but not free lysine, proved to be a significantly better way of dietary protein supplementation.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idellus*; lysine supplement; protein synthesis rate

收稿日期: 2001-08-02

资助项目: 广东省“九五”科技攻关项目

作者简介: 刘永坚(1956-), 男, 广东增城人, 高级工程师, 主要从事水生动物营养和饲料的研究。Tel: 020-84110789, E-mail: ls59@

zsu.edu.cn

在水产饲料生产实践中,要求饲料氨基酸水平尽可能达到平衡。要满足这个要求,通常是通过饲料原料之间的合理搭配或补充结晶氨基酸来达到。但是,前者往往要添加大量的动物蛋白源而导致成本大大增加,而后者往往又达不到理想的使用效果,所以研究者们试图使用包膜氨基酸达到同样的目的,并为此进行了大量的研究工作。作者也曾对草鱼饲料补充结晶和包膜赖氨酸的生物效应作了初步研究<sup>[1]</sup>,本文在此基础上作了进一步的深入研究,并与纯化饲料比较,对草鱼料中氨基酸水溶性、氨基酸同步吸收和肌肉蛋白质转换率等问题进行了探讨,这对于丰富鱼类营养研究内容和指导生产实践都有一定作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验饲料

试验饲料为1组纯化饲料和3组实用饲料,共4组(表1)。饲料原料全部经粉碎,过40目筛,按表1饲料配方称重,均匀混合,挤压成直径1.5mm的颗粒,置-20℃冰箱备用。表2为试验饲料个别必需氨基酸与总必需氨基酸的比(A/E,实测值),与纯化饲料比较,第2组实用饲料赖氨酸的A/E值较低,3组和4组通过补充赖氨酸后,赖氨酸的A/E值有所提高。

表1 试验饲料配方及组成(%干物质)

Tab. 1 Formulation and composition of experimental diets [g (100g)<sup>-1</sup> dry diet]

配方原料 material composition	纯化饲料 <sup>(1)</sup> purified diet	配方原料 material composition	实用饲料 practical diets		
			2	3	4
酪蛋白 casein	32	豆粕 soybean meal	20	20	20
明胶 gelatin	8	菜籽粕 rapeseed meal	15	15	15
玉米淀粉 corn starch	30	次粉 wheat middling	35	35	35
纤维素 cellulose	12	啤酒糟 beer lees	15	15	15
植物油 plant oil	3	玉米 corn meal	11.5	11.1	11.1
动物油 fish oil	3	矿物质 minerals	2.5	2.5	2.5
矿物质 minerals	8	纤维素 cellulose	0.5	0.5	0.5
维生素 vitamins	4	粘合剂 bond	0.5	0.5	0.5
		结晶赖氨酸 crystal lysine	-	0.4	-
		包膜赖氨酸 coated lysine	-	-	0.4
营养成分 nutrient composition					
蛋白质 protein	35.64		24.83	25.34	25.11
脂肪 lipid	5.50		2.51	2.64	2.70
总氨基酸 total amino acids (TAA)	35.49		21.55	22.02	21.99
赖氨酸 lysine	2.44		1.13	1.47	1.23
必需氨基酸指数 (EAAI)	100		60.01	62.30	62.16

注:结晶赖氨酸为味之素产品,赖氨酸实测值为79.0%;包膜赖氨酸自制,壁材为硬脂酸,赖氨酸含量为30.0%。

Notes: Crystal lysine (79.0%) was produced by Weizhisu Co. Ltd. Coated lysine (30.0%) was got in lab, and stearic acid was used for clothing.

### 1.2 赖氨酸溶出率测定

4组试验饲料分别取10g,置于100mL水中10min,期间每隔2min搅动一次,取10mL水溶液测定赖氨酸等含量。本试验重复3次。

### 1.3 饲养和管理

试验草鱼苗为当年培育,取自本研究室实验场,平均体重(7.27±0.5)g。试验鱼放养在室内循环流水玻璃钢水族箱(100cm×50cm×50cm)中,每箱放30尾,水源为曝气自来水。试验鱼适应环境1周

表2 试验饲料的 A/E 值  
Tab.2 A/E ratio of the experimental diets

饲料号 group	饲料 diets	苏氨酸 Thr	缬氨酸 Val	蛋氨酸 Met	异亮氨酸 Ile	亮氨酸 Leu	脯氨酸 Phe	赖氨酸 Lys	组氨酸 His	精氨酸 Arg
1	纯化饲料 purified diet	7.16	13.52	4.48	10.40	18.57	10.22	15.20	5.36	10.09
2	实用饲料(空白) practical diet	8.42	12.47	3.24	10.5	17.95	11.26	11.46	5.58	14.81
3	实用饲料 + 结晶 Lys practical diet added crystal lysine	8.03	12.49	3.10	10.26	17.23	1.84	14.23	5.42	14.41
4	实用饲料 + 包膜 Lys practical diet added coated lysine	8.17	12.64	3.21	10.31	17.32	10.89	12.94	5.45	14.69

后,称重,开始投喂试验饲料,日投喂率为体重的 3%~5%,每天于 9:00 和 17:00 投喂两次。每两周称重 1 次,调整投饲量。每天早上清除箱内粪便,并换水 1/3。饲养时间为 9 周。试验期间水温为 (28.4 ± 0.8) °C, pH 值为 7.64 ± 0.3,溶解氧为 (6.20 ± 0.6) mg L<sup>-1</sup>,氨氮为 (0.03 ± 0.004) mg L<sup>-1</sup>。

#### 1.4 取样及样品制备

饲养结束后称鱼总重,每箱取 2 尾鱼作全鱼样品,另取 2 尾鱼的肌肉和肝胰脏作样品,其余的鱼禁食 1 天后,每箱取 2 尾鱼于静脉窦取血,静置 2h,以 10 000r·min<sup>-1</sup> 的转速离心 10min,得到空腹血清样品,置 -20 °C 冰箱待用。然后投喂饲料,在鱼摄食 20min 后清除残饵,分别在摄食后 1、3、5、7、12h 从每箱中取 2 尾鱼采血,同样制得血清样品。饲料氨基酸含量和血清游离氨基酸含量采用日立 835-50 氨基酸分析仪,水分含量采用 105 °C 常压干燥法测定,凯氏定氮法测定蛋白质,索氏抽提法测定脂肪,550 °C 灼烧法测定灰分。血清必需氨基酸平衡指数(BEAA<sub>p</sub>)按如下公式计算:

$$BEAA_p = \sqrt[10]{(100a/A) \times (100b/B) \times (100c/C) \times \dots \times (100j/J)}$$

公式中, a、b、c……j 为摄食实用饲料血清必需氨基酸的 A/E 值, A、B、C……J 为摄食纯化饲料血清必需氨基酸的 A/E 值。

#### 1.5 L-<sup>2,6</sup>H-苯丙氨酸示踪试验

水族箱的试验鱼用同样的饲料继续饲养 50d, 体重为 80~90g。每试验组取投喂后 2h 的草鱼 10 尾, 用 MS-222 麻醉, 腹腔注射 L-<sup>2,6</sup>H-苯丙氨酸 10μCi·(100g)<sup>-1</sup> 体重 (标记苯丙氨酸用生理盐水稀释 10 倍, 即 0.1mL·(100g)<sup>-1</sup> 体重), 注射后置 1L 水中洗涤 0.5min, 取 1mL 水样测定放射活度。注射后 2min 和 45min, 将鱼处死。在 5min 内取背部肌肉 1g 左右, 用液氮冷冻, 置 -20 °C 冰箱待用, 每尾鱼取两个样品。

将肌肉组织匀浆 (1:1, w/v), 加 3mL 2% (v/v) HClO<sub>4</sub> 溶液沉淀蛋白质, 于 2 800g 下离心 15min, 取上清液测定放射活度, 沉淀物用 96% 乙醇洗涤两次, 再用乙醚洗 1 次。将沉淀物再溶于 10mL 0.3mol L<sup>-1</sup> 的 NaOH 溶液中, 于 37 °C 恒温水浴 1h, 用 2mL 20% HClO<sub>4</sub> 溶液沉淀溶于 NaOH 中的蛋白质, 离心后再用 5mL 2% HClO<sub>4</sub> 溶液洗两次。将提纯后的蛋白质样品置于液闪瓶内, 加入 2mL 水解液 (浓甲酸 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1:1) 和 1 滴辛醇, 于 60 °C 下水解直至变为清亮的液体, 冷却后测定放射活度。

蛋白质合成率 (K<sub>s</sub>) 按下式计算:

$$K_s = (100 / (t_2 - t_1)) \times ((SB_{t_2} - SB_{t_1}) / SA(t_2 - t_1))$$

SBt<sub>2</sub> 和 SBt<sub>1</sub> 分别是注射后 2min (t<sub>1</sub>) 和 45min (t<sub>2</sub>) 以蛋白质结合的放射活度。SA (t<sub>2</sub> - t<sub>1</sub>) 是注射后 2min 和 45min 平均游离氨基酸的放射活度。

## 1.6 数据分析

数据分析采用 Duncan 氏多重比较法,显著水平采用 0.05。

## 2 结果

试验鱼经 9 周的饲养,成活率达 100%,增重率、饲料系数、蛋白质效率和蛋白质合成率列于表 3。

纯化饲料和实用饲料的增重率有显著差异,而实用饲料之间,补充包膜赖氨酸组显著高于不补充或补充结晶赖氨酸组 ( $P < 0.05$ )。饲料系数 4 个试验组之间以纯化饲料最低,其次为补充包膜赖氨酸组,最高是不补充赖氨酸和补充结晶赖氨酸的两个实用饲料组,并有显著差异 ( $P < 0.05$ )。蛋白质效率实用饲料 3 个组之间以添加包膜赖氨酸组为好,但没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 3 纯化饲料及实用饲料补充结晶和包膜赖氨酸对草鱼增重率、饲料系数、蛋白质效率、蛋白质合成率的影响

Tab.3 Influence of pure diet and practical diets containing free and coated lysine on weight gain(WG), feed conversion(FC), protein efficiency ration( PER) and protein-synthesis rate( PSR) of grass carp

饲料 diets	纯化饲料 purified diet	实用饲料 practical diet	实用饲料 + 结晶赖氨酸 practical diet added crystal lysine	实用饲料 + 包膜赖氨酸 practical diet added coated lysine
始重(g) initial wt	7.23 ±0.023	7.24 ±0.03	7.30 ±0.03	7.32 ±0.04
末重(g) final wt	31.61 ±2.7	21.16 ±2.6	21.41 ±0.33	23.57 ±1.2
增重率(%) WG <sup>1</sup>	337.2 ±36.7	192.3 ±14.5 <sup>a</sup>	193.3 ±8.2 <sup>a</sup>	222.0 ±15.4 <sup>b</sup>
饲料系数 FC <sup>2</sup>	1.64 ±0.16 <sup>a</sup>	2.68 ±0.16 <sup>c</sup>	2.68 ±0.07 <sup>c</sup>	2.40 ±0.13 <sup>b</sup>
蛋白质效率 PER <sup>3</sup>	1.72 ±0.18 <sup>a</sup>	1.46 ±0.11 <sup>b</sup>	1.41 ±0.04 <sup>b</sup>	1.60 ±0.09 <sup>ab</sup>
蛋白质合成率 K <sub>s</sub>	0.0822 ±0.017 <sup>a</sup>	0.0478 ±0.012 <sup>b</sup>	0.0464 ±0.014 <sup>b</sup>	0.0598 ±0.013 <sup>b</sup>

注:1. 增重率(%) = 100 {末重(g) - 始重(g)} / 始重(g); 2. 饲料系数 = 饲料摄入量(g) / 净增重(g); 3. 蛋白质效率 = 净增重(g) / 蛋白质摄入量(g)。同行数据后有不同字母者表示有显著性差异。

Notes: 1. WG(%) = 100 {final wt(g) - initial wt(g)} / initial wt(g); 2. FC = diets intaked(g) / net weight gain(g); 3. PER = net weight gain(g) / protein intaked(g). Within the same row, values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

在本文中蛋白质合成率(K<sub>s</sub>)表示为草鱼摄食后 2h 每 g 肌肉组织 2~45min 内以蛋白质结合的放射度与游离氨基酸的放射度的比值。纯化饲料 PSR 值明显高于实用饲料组 ( $P < 0.05$ )。实用饲料组间 K<sub>s</sub> 值以添加包膜赖氨酸组为最高,但 3 个试验组之间没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

添加结晶和包膜赖氨酸制成颗粒试验饲料,取一定量饲料测定赖氨酸溶出率,其结果为添加结晶赖氨酸组溶出率为(13.22 ±3.5)%,而添加包膜赖氨酸组溶出率为(4.81 ±0.8)%,两组比较溶出率有明显差别。

试验结束后,分别在投喂前和投喂后 1、3、5、7 和 12h 测定血清游离氨基酸水平。结果见图 1~图 5。Val, Leu 和 Ile 水平随时间的变化见图 1,实用饲料组有相同的变化规律,在投喂后 3h 达到高峰,纯化饲料组变化不大,Val 和 Ile 在 7h 达到高峰,Leu 则在 3h 达到最大。Phe, Trp 和 Met 的变化规律见图 2, Phe 和 Met 水平 4 个试验组有相同的变化规律,3h 达到高峰,Trp 水平纯化饲料组 5h 达到高峰,实用饲料则在 3h。Thr 水平变化规律如图 3,实用饲料在 3h 有最大峰,而纯化饲料则在 5h 出现最

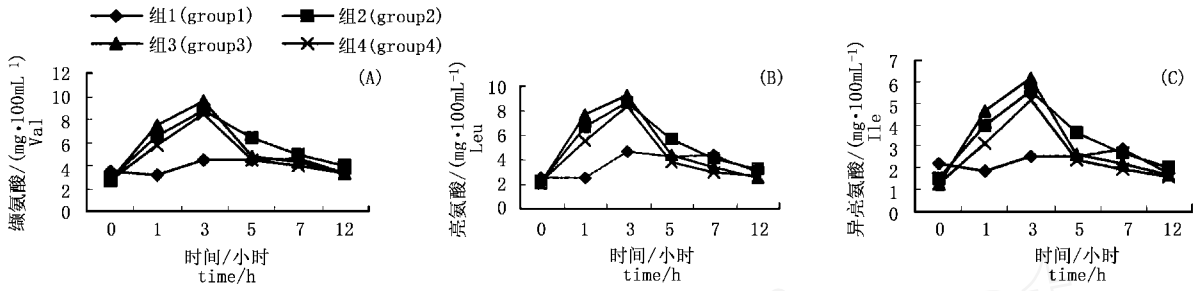


图1 4个试验组血清游离 Val, Leu 和 Ile 水平随时间的变化

Fig.1 Change in the level of plasma free Val, Leu and Ile of grass carp at various time intervals after feeding the experimental diets

(A) 缬氨酸 Val; (B) 亮氨酸 Leu; (C) 异亮氨酸 Ile

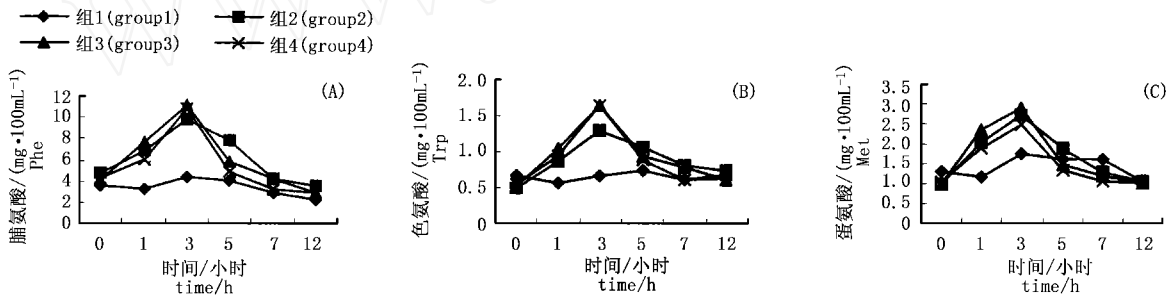


图2 4个试验组血清游离 Phe, Trp 和 Met 水平随时间的变化

Fig.2 Change in the level of plasma free Phe, Trp and Met of grass carp at various time intervals after feeding the experimental diets

(A) 脯氨酸 Phe; (B) 色氨酸 Trp; (C) 蛋氨酸 Met

大峰值。Lys, Arg 和 His 水平变化规律见图 4, His 水平 4 个试验组有相同的变化规律, 且都在 3h 达到高峰。Lys 和 Arg 水平, 实用饲料组在 1h 出现高峰, 纯化饲料组则在 3h 出现高峰。

必需氨基酸平衡指数 (BEAAp) 见表 4, 本指数是与纯化饲料比较的结果。10 种 EAA 与纯化饲料比较, BEAAp 值在 3 个实用饲料组之间没有明显差异。取饲料中 A/E 值 (表 2) 与纯化饲料差异较大的 Lys 和 Met 作比较, 在 5~7h BEAAp 指数在 3 个实用饲料组间有一定差异, 添加包膜赖氨酸组为最高。

### 3 讨论

本研究表明, 在实用饲料中补充包膜赖氨酸, 可以改善饲料效率, 提高增重率。许多研究者也得到了相同的结果<sup>[4,5]</sup>。究其原因, 从本研究结果看, 饲料中赖氨酸的溶失是原因之一, 这与其它的一些研究结果相同。Wilson 等<sup>[6]</sup>在叉尾鮰, Chhom<sup>[7]</sup>在范氏对虾的试验中均观察到试验饲料中的结晶氨基酸溶失于水中而导致生长差。从本研究的血清游离氨基酸水平随时间的变化可以看到, 纯化饲料组多种必需氨基酸在 3~5h 达到高峰, 而实用饲料组往往在 1~3h 已达到高峰, 特别是补充结晶赖氨酸组, 吸收不同步, 可能是导致各试验组之间生长差别的另一原因, 这与 Cowey 等<sup>[8]</sup>的观点是一致的。

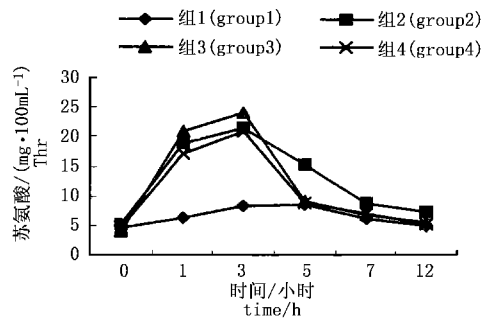


图3 4个试验组血清游离 Thrp 水平随时间的变化

Fig.3 Change in the level of plasma free Thrp of grass carp at various time intervals after feeding the experimental diets

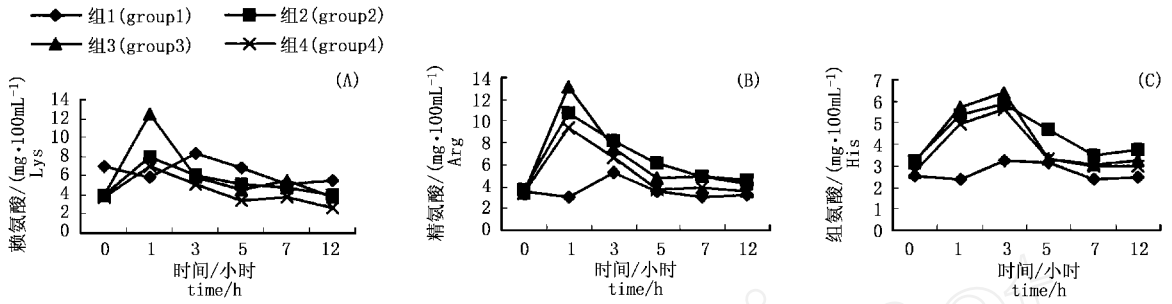


图 4 4 个试验组血清游离 Lys, Arg 和 His 水平随时间的变化

Fig. 4 Change in the level of plasma free Lys, Arg and His of grass carp at various time intervals after feeding the experimental diets

(A) 赖氨酸 Lys; (B) 精氨酸 Arg; (C) 组氨酸 His

表 4 不同时间血清必需氨基酸平衡指数

Tab. 4 Balance of essential amino acids in the plasma (BEAAp)

饲料组 diets	0	1	3	5	7	12	
10 种 EAA (the amount of 10 EAA)	实用饲料 practical diet	95.06	89.26	94.02	96.80	98.00	99.01
	实用饲料 + 结晶 Lys practical diet added crystal lysine	98.92	88.05	94.25	99.86	99.00	99.99
	实用饲料 + 包膜 Lys practical diet added coated lysine	98.95	89.60	94.65	99.90	97.78	100.00
Lys 和 Met the amount of Lys and Met	实用饲料 practical diet	71.53	65.81	59.62	63.85	72.60	70.44
	实用饲料 + 结晶 Lys practical diet added crystal lysine	78.70	71.77	53.66	68.22	76.26	74.46
	实用饲料 + 包膜 Lys practical diet added coated lysine	82.77	70.27	58.46	72.48	79.95	73.9

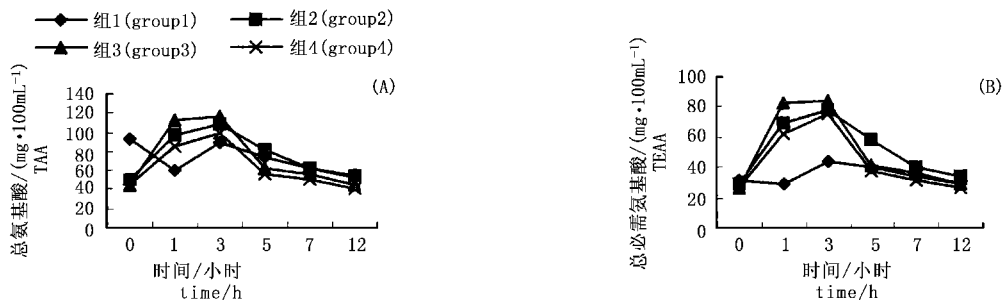


图 5 4 个试验组血清游离总氨基酸和总必需氨基酸水平随时间的变化

Fig. 5 Change in the level of plasma free total amino acids and essential amino of grass carp at various time intervals after feeding the experimental diets

(A) 总氨酸 TAA; (B) 总必需氨基酸 TEAA

关于试验饲料的评价,除采用增重率、蛋白质效率、饲料系数、氨基酸溶出率之外,本研究还采用了 EAAI、A/E、BEAAp、Ks 4 项指标,并归纳在表 5 中。

EAAI 指数与增重率的相关性,在不考虑补充单体氨基酸的情况下是密切的 ( $R = 0.98$ )。赖氨酸的 A/E 值,纯化饲料、实用饲料和添加结晶赖氨酸的纯化饲料 3 组比较与增重率相关性不强 ( $R = 0.7$ ),而纯化饲料、实用饲料和添加包膜赖氨酸的纯化饲料比较与增重率密切相关 ( $R = 0.98$ )。

表 5 试验饲料的评价

Tab.5 Evaluation of the experimental diets

试验饲料 diets	增重率 WG	必需氨基酸指数 EAAI	必需氨基酸指数* EAAI	个别必需氨基酸与 总必需氨基酸之比 A/E	必需氨基酸 平衡指数 BEAAp	蛋白质合成率 Ks
纯化饲料 purified diet	337.2	100	49.78	15.20	100	3.61
实用饲料 practical diet	192.3	60.01	29.87	11.46	63.85	2.01
实用饲料 + 结晶 Lys practical diet added crystal lysine	193.3	62.30	31.01	14.23	68.22	1.95
实用饲料 + 包膜 Lys practical diet added coated lysine	222.0	62.16	31.18	12.94	72.48	2.69

\*以草鱼全卵蛋白作标准 \*Grass carp egg protein was used as evaluation standard

本研究表明,10种必需氨基酸的BEAAp指数,实用饲料达到纯化饲料的95%以上,试验组之间没有差别,但以限制性Lys和Met为BEAAp指数,与增重率有密切的相关性( $R = 0.99$ )。蛋白质合成率Ks与增重率之间有密切的相关性( $R = 0.98$ ),但相对于其它评价指标而言,Ks更能体现增重的本质。

#### 参考文献:

- [1] Liu Y J, Liu D H, Tian L X, et al. Effect of fish food with coating and crystalline lysine on *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Journal of Fisheries of China, 1999, 23 (suppl.): 52 - 53. [刘永坚, 刘栋辉, 田丽霞, 等. 草鱼饲料中结晶和包膜赖氨酸的生物效应[J]. 水产学报, 1999, 23 (增刊): 52 - 53.]
- [2] Cao J M, Guan G Q, Zheng W H, et al. Effect of different dietary levels of protein on lipid fatty acid composition of hepatopancreas in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 1997, 36 (5): 64 - 68. [曹俊明, 关国强, 郑文晖, 等. 饲料蛋白质水平影响草鱼肝胰脏脂肪酸组成[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1997, 36 (5): 64 - 68.]
- [3] Huang Y T, Liu Y J. The study of mineral requirement of grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1989, 13 (2): 134 - 151. [黄耀桐, 刘永坚. 草鱼多种无机盐需要量研究[J]. 水生生物学报, 1989, 13 (2): 134 - 151.]
- [4] Takeshi M, Toshio A. Effect of coating amino acids with casein supplemental to gelatin diet on plasma free amino acid of carp [J]. Bull Sap Soc Sci Fish, 1982, 48 (5): 703 - 710.
- [5] M de la Higuera, A Garzón. Influence of temperature and dietary-protein supplementation with free or coated lysine on the fractional protein turnover rates in the white muscle of carp [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1998, 18: 85 - 95.
- [6] Wilson R P, Poe W E, Robinsin E H. Leucine, isoleucine, valine and histidine requirements of fingerling channel catfish [J]. J Nutr, 1980, 110: 627.
- [7] Chhom L. Effect of dietary pH on amino acid utilization by shrimp [A]. Advance of the studies on nutrition of finfish and shellfish [M]. Guangzhou: Zhongshan University Publishing House, 1995. 287 - 300.
- [8] Cowey C B, Luques P. Physiological basis of protein requirement of fishes. Critical analysis of requirements [A]. Protein metabolism and nutrition. Vol. : INRA [M]. 365 - 384.