



大鲵幼体蛋白质的需求量

王双¹, 李战福¹, 李虹², 黎学练³, 雷登华³,
朱成科⁴, 林仕梅¹, 陈拥军¹, 罗莉^{1*}

(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, 重庆 400716;

2. 重庆市水产技术推广总站, 重庆 400000;

3. 重庆市开州区水产技术推广站, 重庆 405400;

4. 西南大学动物科学学院, 重庆 402460)

摘要: 为评定大鲵幼体对饲料蛋白质的需求量, 以鱼粉为主要蛋白源配制6种蛋白质水平(干样基础)的实验饲料: D1(43.7%)、D2(47.1%)、D3(51.3%)、D4(55.7%)、D5(59.9%)和D6(64.4%), 饲喂初始体质量为(20.99±0.15)g的大鲵幼体92 d。结果显示, ①饲料蛋白质水平对大鲵增重率有显著影响, 在D4组达到最大值, 较D1组增加了276.4%, 且全鲵蛋白质沉积率和肌肉RNA、RNA/DNA值、胃蛋白酶、H⁺-K⁺-ATPase、胰蛋白酶、脂肪酶和Na⁺-K⁺-ATPase、肝脏超氧化物歧化酶(SOD)均在D4组达到最佳, 而肝脏和肠道丙二醛(MDA)在该组均达到最低; ②随饲料蛋白质水平增加, 肌肉粗蛋白线性增加, 全鲵脂肪线性下降, 全鲵水分和粗灰分在各组间差异不显著, 全鲵粗蛋白先增加后趋于稳定, 在D4组达到最大; ③大鲵皮肤胶原蛋白含量在D4组达到最高, 较D1组增加了27.83%。研究表明, 以增重率、肌肉RNA/DNA值、蛋白质沉积率和皮肤胶原蛋白含量为评价指标, 通过二次回归方程分析得到大鲵幼体饲料的最适蛋白质水平为55.9%~58.3%(干样基础), 该饲料蛋白质水平能显著提高大鲵幼体胃的泌酸能力、机体消化吸收和抗氧化能力, 增加鲵体营养素的沉积, 从而促进生长和饲料的转化; 而低蛋白质水平饲料显著抑制大鲵的生长。

关键词: 大鲵; 蛋白质; 体组成; RNA/DNA值; 消化; 抗氧化

中图分类号: S 963.3

文献标志码: A

大鲵(*Andrias davidianus*)俗称“娃娃鱼”, 是世界上现存最大的两栖动物, 属两栖纲(Amphibia)、有尾目(Urodela)、隐鳃鲵科(Cryptobranchidae)、大鲵属(*Andrias*), 为国家二级野生保护动物, 已被列入世界自然保护联盟红色名录和华盛顿公约(CITES)附录 I 中^[1]。大鲵肉嫩鲜美, 药用、食用价值极高, 具有一定的经济价值和养殖潜力。目前大鲵的人工繁育和养殖技术逐渐成熟^[2], 但其专用配合饲料研发滞后, 成为了产业发展的

技术新瓶颈, 其营养需求参数亟待评定。蛋白质作为动物生长的第一营养素, 决定着生长和饲料成本, 其水平过高或过低都会对机体和环境产生不良影响^[3-4]。基于此, 本实验采用半纯化日粮设计, 配制6种不同蛋白质水平的饲料饲喂大鲵, 研究蛋白质水平对大鲵生长、体组成、蛋白质合成、消化吸收和抗氧化机能的影响, 确定大鲵幼体蛋白质的最适需求量, 为其专用配合饲料的研发提供重要营养参数和科学依据。

收稿日期: 2018-11-13 修回日期: 2019-03-30

资助项目: 重庆市社会民生科技创新专项(cstc2016shmszx80084); 重庆市生态渔产业技术体系(2019)

通信作者: 罗莉, E-mail: luoli1972@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

本实验所选用的大鲵购于陕西省汉中市绿源大鲵养殖场。

1.2 实验饲料

以大鲵肌肉氨基酸模式为参考^[5], 配制以鱼粉为主要蛋白源, 大豆油为脂肪源, 配制成6组

等脂(粗脂肪6.85%)的实验饲料, 饲料蛋白质水平(干物质)实测分别为D1(43.7%)、D2(47.1%)、D3(51.3%)、D4(55.7%)、D5(59.9%)、D6(64.4%)。实验饲料配方及基本营养组成见表1。饲料原料均过60目筛, 用软颗粒饲料制粒机(四川棉丰农业机械制造厂9FZ-35C型)制成直径4 mm左右的饲料, 烘箱40 °C烘干后用双层塑料袋包装并封口。

表1 实验饲料配方及主要营养物质
Tab. 1 Formulation and nutritional components of the experimental diets %

	饲料蛋白质水平 dietary protein levels					
	D1 (43.7%)	D2 (47.1%)	D3 (51.3%)	D4 (55.7%)	D5 (59.9%)	D6 (64.4%)
原料 ingredients						
鱼粉 fish meal	15.0	21.0	27.0	33.5	40.0	46.0
复合蛋白粉 compound protein ¹	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
酪蛋白 casein	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
明胶 gelatin	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
面粉 wheat flour	28.0	22.6	17.2	11.6	5.5	0.4
α -预糊化淀粉 α -pregelatinized starch	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0
大豆油 soybean oil	4.8	4.2	3.6	2.8	2.3	1.4
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
氯化胆碱 choline chloride	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
复合预混料 premix ²	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
合计 total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
营养组成(实测干样基础) nutrient composition (measured on dry basis)						
粗蛋白 crude protein	43.7	47.1	51.3	55.7	59.9	64.4
粗脂肪 crude lipid	6.84	6.85	6.80	6.83	6.84	6.89
粗灰分 crude ash	10.7	10.3	10.2	10.0	10.1	10.9
粗纤维 crude fiber	0.66	0.65	0.65	0.65	0.65	0.64
无氮浸出物 nitrogen free extract	23.8	20.7	17.6	14.4	10.9	8.1

注: 1. 复合蛋白质粉: 涉及专利保护; 2. 预混料含多维、多矿、功能性添加剂和载体, 多维、多矿的组成参照肉食性鱼类^[6]

Notes: 1. compound protein, involving patent protection; 2. premix contains multi-vitamins, complex mineral, functional additives and carrier, for multi-vitamin and complex mineral, refer to carnivorous fishes^[6]

1.3 实验饲养管理

正式实验前, 先将大鲵用浓度为1%的食盐溶液消毒后, 在室内的养鱼池暂养, 使用课题组创制的初期配合饲料(干物质粗蛋白46%)驯化3周。选择144尾体质量均匀(20.99±0.15) g、体质健壮的大鲵, 随机分成6组, 每组设置3个重复, 每个重复8尾大鲵。实验大鲵饲养于西南大学动

物科技学院水产养殖系统的塑料方形箱中, 规格为70.0 cm×45.0 cm×17.5 cm, 水深5.0 cm, 水源为曝气自来水, 每天早晚换水1次。因大鲵消化食物时间较长, 故连续投喂2 d(投喂当天下午5:00投喂1次, 投喂率0.3%~1.0%)后停食1 d, 2 h后捞取残余饲料, 每隔3周对实验大鲵进行称重1次, 然后根据实验大鲵的增重情况调整投喂量, 正式实验时间92 d。饲养期间无光照, 水温

19~23 °C, 溶解氧含量>6.0 mg/L, 氨氮含量<0.10 mg/L, 亚硝酸盐含量<0.10 mg/L, pH 6.5~7.0。

1.4 样品采集

养殖实验结束后, 将大鲵停食4 d达到空腹后, 对每组每个重复的重量和尾数进行记录, 对生长数据进行统计; 每组每个重复随机选取5尾测量体长、体高、体质量后, 在冰盘中解剖, 取出内脏和肝脏并称重, 同时分离胃、肠道、背部肌肉及皮肤, 胃(中间部位)和肠道(距胃5 cm处)分别取1 cm左右长度置于多聚甲醛中固定, 其余样品液氮速冻后置于-80 °C冰箱中备用。

1.5 指标测定

生长及形体指标测定 养殖实验结束后, 停食4 d, 准确称量各组大鲵和饲料重, 计算其生长指标, 计算公式:

增重率(weight gain rate, WGR, %)=($W_t - W_0$)/ $W_0 \times 100\%$;

特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d)=($\ln W_t - \ln W_0$)/ $D \times 100\%$;

饲料系数(feed conversion ratio, FCR)= $W_f / (W_t - W_0)$;

式中, W_0 : 大鲵初始尾均重(g); W_t : 大鲵终末尾均重(g); D : 养殖实验天数; W_f : 尾均干物质摄食量(g)。

实验饲料、全鱼及肌肉常规营养成分的测定 水分、粗蛋白(CP)、粗脂肪(CL)、粗灰分(CA)和粗纤维(CF)含量分别采用105 °C烘箱干燥法(GB/T 6435-2006)、凯氏定氮法(GB/T 6432-1994)、索氏抽提法(GB/T 6433-1994)、550 °C灼烧法(GB/T 6438-1992)、酸碱消煮法(GB/T 5009.10-1985)测定, 无氮浸出物(NFE)计算方法如下:

$NFE(\%) = 100\% - (\text{水分}\% + CP\% + CL\% + CA\% + CF\%)$

饲料营养成分沉积率测定 干物质、蛋白质、脂肪、灰分沉积率(RR)=($W_t \times CN_i - W_0 \times CO_i$)/($F \times CF_i$) $\times 100\%$;

式中, CN_i 为终末鲵体物质、蛋白质、脂肪和灰分含量; CO_i 为初始鲵体干物质、蛋白质、脂肪和灰分含量; CF_i 为饲料干物质、蛋白质、脂肪和灰分含量; i 为不同营养成分。

肌肉胶原蛋白及RNA、DNA含量的测定 胶原蛋白含量通过检测羟脯氨酸含量(GB/T 9695.23-2008)再乘于系数11.0进行计算; RNA、

DNA含量的测定采用Buckley^[7]方法进行。

消化酶指标的测定 胃蛋白酶和 $H^+ - K^+ - ATPase$, 肠蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 的总活性均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定。

抗氧化指标的测定 超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的总活性均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定。

胃、肠道石蜡组织切片 由武汉塞维尔生物科技有限公司代制, 切片用H. E染色法进行染色, 在显微镜(麦克奥迪SK210)下测定胃皱褶数量、高度、空腔面积比例和肠道绒毛数量、长度、空腔面积比例。

1.6 数据处理

实验结果用SPSS 22.0软件对数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 用Duncan氏多重比较分析组间差异显著性程度, 显著水平为($P < 0.05$), 数据用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)的形式表示。

2 结果

2.1 饲料蛋白质水平对大鲵幼体生长性能和饲料利用率的影响

饲料蛋白质水平能显著影响大鲵的生长性能和饲料利用率($P < 0.05$)。随饲料蛋白质水平的增加, 大鲵的终末尾均重(FBM)、增重率(WGR)、特定生长率(SGR)和摄食量(FI)均呈先增加后降低的趋势, 在D4组(55.7%)达到最大, 显著高于其他蛋白水平组, 与D1组(43.7%)相比WGR和FI分别增加了276.4%、178.0%。而FCR呈先降低(D1~D4)后趋于稳定, D4、D5和D6组间差异不显著($P > 0.05$)(表2)。

2.2 饲料蛋白质水平对大鲵幼体肌肉RNA、DNA和RNA/DNA值的影响

饲料蛋白质水平显著影响大鲵肌肉RNA、DNA和RNA/DNA值($P < 0.05$)。RNA、DNA和RNA/DNA值均随饲料蛋白质水平的增加而增加后趋于稳定(D4~D6), 与饲料蛋白质水平呈二次曲线关系, 相关系数分别为0.950 0、0.959 9和0.882 4($Y_{RNA} = -0.009 1X^2 + 1.087 9X - 25.385$; $Y_{DNA} = -0.001 4X^2 + 0.177 6X - 2.475 8$; $Y_{RNA/DNA} = -0.002 2X^2 + 0.256 7X - 5.172 9$)(表3)。

表2 饲料蛋白质水平对大鲵幼体生长性能和饲料利用的影响

Tab. 2 Effects of dietary protein level on the growth performance and feed utilization of juvenile *A. davidianus*

	饲料蛋白质水平 dietary protein level					
	D1 (43.7%)	D2 (47.1%)	D3 (51.3%)	D4 (55.7%)	D5 (59.9%)	D6 (64.4%)
初始尾均重/g IBW	21.18±0.41	20.98±0.12	21.12±0.23	20.83±0.38	20.81±0.23	21.02±0.24
终末尾均重/g FBW	30.15±3.25 ^a	35.50±1.11 ^b	46.72±5.10 ^c	54.03±3.07 ^d	48.05±1.20 ^c	47.46±0.88 ^c
增重率/% WGR	42.41±3.11 ^a	69.19±4.64 ^b	122.01±5.55 ^c	159.62±8.61 ^d	130.90±4.04 ^c	125.84±4.85 ^c
摄食量/g FI	6.09±0.88 ^a	9.88±2.00 ^b	15.10±0.48 ^c	16.93±0.59 ^d	11.82±0.44 ^b	11.91±0.21 ^b
特定生长率/(%/d) SGR	0.42±0.27 ^a	0.53±0.21 ^{ab}	0.79±0.14 ^{abc}	1.06±0.05 ^d	0.91±0.02 ^c	0.88±0.02 ^c
饲料系数 FCR	0.67±0.02 ^{bc}	0.64±0.03 ^{bc}	0.59±0.06 ^{bc}	0.51±0.07 ^{ab}	0.43±0.01 ^a	0.45±0.01 ^a

注：同行无字母或数据肩标相同字母表示差异不显著($P>0.05$)，不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)；下同

Notes: In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$); the same below

表3 饲料蛋白质水平对大鲵幼体肌肉RNA、DNA和RNA/DNA值的影响

Tab. 3 Effects of dietary protein level on RNA、DNA and RNA/DNA ratio of juvenile *A. davidianus*

	饲料蛋白质水平 dietary protein level					
	D1 (43.7%)	D2 (47.1%)	D3 (51.3%)	D4 (55.7%)	D5 (59.9%)	D6 (64.4%)
RNA/(mg/g)	5.04±0.17 ^a	5.35±0.18 ^{ab}	6.70±0.18 ^b	7.23±0.10 ^c	7.14±0.06 ^c	7.08±0.11 ^c
DNA/(mg/g)	2.66±0.13 ^a	2.77±0.25 ^{ab}	3.04±0.07 ^{bc}	3.06±0.36 ^{bc}	3.24±0.06 ^c	3.20±0.09 ^{bc}
RNA/DNA	1.90±0.16 ^{ab}	1.92±0.30 ^{ab}	2.20±0.04 ^{bc}	2.36±0.05 ^c	2.27±0.24 ^{bc}	2.21±0.08 ^{bc}

2.3 饲料蛋白质水平对大鲵幼体体成分的影响

饲料蛋白质水平显著影响大鲵体组成($P<0.05$)。随饲料蛋白质水平的增加，全鲵粗蛋白先增加(D1~D4)后趋于稳定(D4~D6)，在D4组达到最大值；全鲵粗脂肪不断下降，与饲料蛋白质水平呈负相关线性关系($Y=-0.1719X+27.009$, $R^2=0.9442$) (图1)，与饲料中无氮浸出水平呈正相关线性关系($Y=4.2031X-58.604$, $R^2=0.9106$) (图2)。随饲料蛋白质水平的增加，全鲵水分和粗灰分在各组间差异不显著($P>0.05$)；肌肉粗蛋白含量线性增加($Y=0.5296X+58.166$, $R^2=0.8487$) ($P<0.05$)，肌肉粗脂肪和水分含量均呈先下降后升高的趋势，在D4组达到最低。皮肤胶原蛋白含量随着饲料蛋白质水平的增加呈先增加后降低的趋势，在D4组(55.7%)达到最高，显著高于其他各组($P<0.05$)，较低蛋白组(D1)增加了27.8%，较高蛋白组(D6)增加了15.2% (表4)。

2.4 饲料蛋白质水平对大鲵幼体营养物质沉积率的影响

饲料蛋白质水平显著影响大鲵营养物质沉积率($P<0.05$)。蛋白质沉积率随饲料蛋白质水平

的升高呈先增加后降低的趋势，在D4组达到最高；灰分沉积率随饲料蛋白质水平升高呈先增加(D1~D4)后趋于稳定的趋势，D4、D5和D6组间差异不显著；脂肪沉积率随蛋白质水平的升高而增加，与饲料蛋白质水平呈正相关线性关系($Y=2.3491X+29.949$, $R^2=0.9527$)，在D6组达到最高($P<0.05$) (表5)。

2.5 饲料蛋白质水平对大鲵幼体胃肠消化吸收功能的影响

随着饲料蛋白质水平的增加，胃蛋白酶和胃 $H^+-K^+-ATPase$ 呈先增加后降低的趋势，在D3组和D4组达到较高；肠道胰蛋白酶、脂肪酶和 $Na^+-K^+-ATPase$ 随着饲料蛋白质水平的增加呈先增加后降低的趋势，均在D4组达到最高，而淀粉酶含量随蛋白质水平的增加D1~D3组逐渐下降，D4、D5和D6组间差异不显著($P>0.05$) (表6)。

2.6 饲料蛋白质水平对大鲵幼体胃肠结构形态的影响

与低蛋白组(D1)相比，生长性能最佳组(D4)的大鲵胃的黏膜上皮发育更完整，空腔率显著降低($P<0.05$)，绒毛高度D4组显著高于D1组，

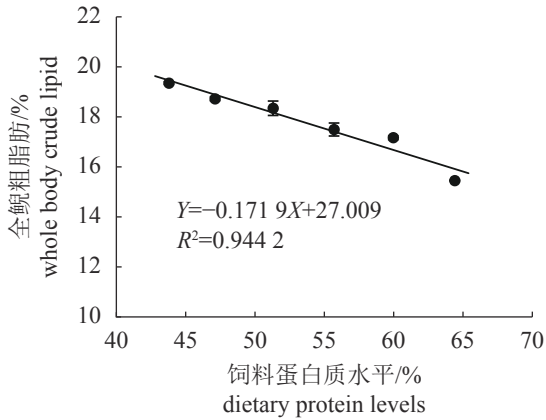


图 1 全鲵粗脂肪与饲料蛋白质水平的关系

Fig. 1 Relationship between whole body crude lipid and dietary protein level of juvenile *A. davidianus*

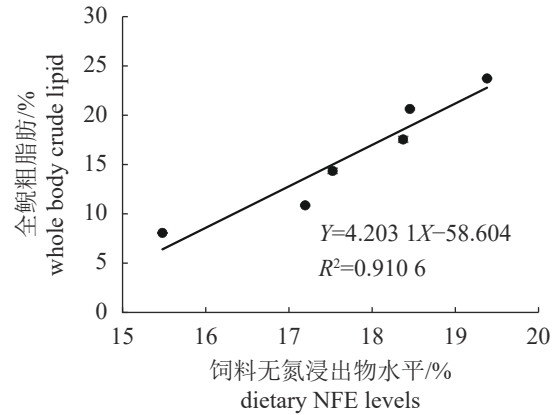


图 2 全鲵粗脂肪与饲料无氮浸出物的关系

Fig. 2 Relationship between whole body crude lipid and dietary NFE level of juvenile *A. davidianus*

表 4 饲料蛋白质水平对大鲵幼体体组成和皮肤胶原蛋白含量的影响

Tab. 4 Effects of dietary protein level on body composition and skin collagen content of juvenile *A. davidianus* %

	饲料蛋白质水平 dietary protein level					
	D1 (43.7%)	D2 (47.1%)	D3 (51.3%)	D4 (55.7%)	D5 (59.9%)	D6 (64.4%)
全鲵 whole body						
水分 moisture	81.26±0.14	81.24±1.29	81.28±0.79	81.20±0.91	81.64±0.60	81.83±0.64
粗蛋白* crude protein	69.39±0.80 ^a	70.71±0.14 ^{ab}	71.19±0.90 ^b	73.98±1.75 ^c	73.84±1.00 ^c	72.57±0.62 ^{bc}
粗脂肪* crude lipid	19.38±0.05 ^d	18.45±0.08 ^e	18.37±0.29 ^e	17.52±0.26 ^b	17.19±0.08 ^b	15.47±0.02 ^a
粗灰分* crude ash	10.78±0.05	10.54±0.34	10.24±0.74	10.66±0.43	10.81±0.76	10.67±0.48
肌肉 muscle						
水分 moisture	85.63±0.99 ^c	84.59±0.61 ^{bc}	83.9±0.11 ^{ab}	83.4±0.18 ^a	83.59±0.33 ^{ab}	85.21±0.87 ^c
粗蛋白* crude protein	82.23±0.25 ^a	84.09±0.69 ^{ab}	84.43±0.64 ^{ab}	85.63±0.61 ^{ab}	88.4±1.12 ^c	90.79±4.47 ^c
粗脂肪* crude lipid	7.13±0.20 ^c	6.50±0.15 ^b	5.96±0.03 ^a	5.93±0.13 ^a	6.15±0.74 ^{ab}	6.22±0.12 ^{ab}
皮肤 skin						
胶原蛋白 collagen	5.03±0.09 ^a	5.27±0.23 ^b	5.27±0.01 ^b	6.43±0.15 ^c	5.97±0.06 ^d	5.58±0.04 ^c

注: *.干样基础
Notes: *. on dry matter basis

细胞排列整齐, 胃腺开口较多, 毛细血管和小血管较丰富(图3-a~b, 黑色箭头)。在肠道组织中, 低蛋白组(D1)和适宜组(D4)大鲵的绒毛数量和绒毛高度无显著差异($P>0.05$), 但D1组肠道绒毛稀疏, 发育不完整, 空腔率较高, D4组大鲵肠道绒毛排列更整齐紧密, 空腔率较D1组降低了69.1%($P<0.05$)(表7)。

2.7 饲料蛋白质水平对大鲵幼体抗氧化能力的影响

随着饲料蛋白质水平的增加, 肠道SOD逐

渐上升, 而肝脏SOD呈先升高后降低的趋势。肠道、肝脏MDA呈先降后升的趋势, 在D4组达到最低, 与D1组相比分别下降了43.7%和77.8%, 与D6组相比分别下降了15.2%和81.8%(表8)。

2.8 部分指标与饲料蛋白质水平间的二次回归分析

以饲料蛋白质水平为自变量(X), 分别以大鲵幼体WGR(Y_1)、肌肉RNA/DNA值(Y_2)、蛋白质沉积率(Y_3)和皮肤胶原蛋白含量(Y_4)进行回归分析, 表明它们之间呈明显的二次回归关系(图4~

表 5 饲料蛋白质水平对大鲵幼体营养素沉积率的影响
Tab. 5 Effects of dietary protein level on nutrient retention of juvenile *A. davidianus* %

	饲料蛋白质水平 dietary protein level					
	D1 (43.7%)	D2 (47.1%)	D3 (51.3%)	D4 (55.7%)	D5 (59.9%)	D6 (64.4%)
蛋白质沉积率 PRR	63.15±0.68 ^a	65.46±1.54 ^{ab}	70.19±1.78 ^b	75.31±2.38 ^c	75.26±2.02 ^c	66.08±3.14 ^{ab}
脂肪沉积率 LRR	134.72±10.06 ^a	144.51±19.82 ^{ab}	143.65±13.42 ^{ab}	157.87±20.01 ^{abc}	171.07±7.56 ^{bc}	184.43±17.83 ^c
灰分沉积率 ARR	4.67±0.30 ^a	5.11±0.82 ^{ab}	5.63±0.05 ^b	6.90±0.12 ^c	7.10±0.58 ^c	7.09±0.50 ^c

表 6 饲料蛋白质水平对大鲵幼体胃肠消化吸收功能的影响
Tab. 6 Effects of dietary protein level on gastrointestinal digestion and absorption function of juvenile *A. davidianus*

	饲料蛋白质水平 dietary protein level					
	D1 (43.7%)	D2 (47.1%)	D3 (51.3%)	D4 (55.7%)	D5 (59.9%)	D6 (64.4%)
胃 stomach						
胃蛋白酶/(U/mg) pepsin	38.24±0.57 ^a	43.85±0.28 ^b	47.59±0.19 ^d	47.08±1.30 ^d	45.25±0.52 ^c	43.36±1.08 ^b
H ⁺ -K ⁺ -ATPase/(U/mg)	5.49±0.22 ^a	6.05±0.45 ^a	7.48±0.19 ^b	7.35±0.58 ^b	5.68±0.26 ^a	5.50±0.30 ^a
肠 intestine						
胰蛋白酶/(U/mg) trypsin	354.1±33.88 ^a	407.4±8.91 ^b	450.7±9.98 ^c	491.7±5.06 ^d	472.5±11.55 ^c	355.7±37.68 ^a
脂肪酶/(U/mg) lipase	151.4±11.23 ^a	171.2±4.32 ^b	188.1±9.91 ^{bc}	200.7±17.71 ^c	189.6±2.16 ^c	151.4±14.98 ^a
淀粉酶/(U/mg) amylase	0.200±0.020 ^c	0.183±0.002 ^b	0.172±0.002 ^{ab}	0.167±0.002 ^a	0.169±0.003 ^a	0.170±0.006 ^a
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase/(U/mg)	5.43±0.28 ^a	5.73±0.31 ^{ab}	6.04±0.83 ^{abc}	6.86±0.53 ^c	6.77±0.13 ^c	6.49±0.67 ^{bc}

图7)。得回归方程： $Y_1 = -0.552 1X^2 + 63.902X - 1 702.9$ ($R^2 = 0.933 2$)； $Y_2 = -0.002 2X^2 + 0.256 7X - 5.172 9$ ($R^2 = 0.882 4$)； $Y_3 = -0.086 9X^2 + 9.712 4X - 197.16$ ($R^2 = 0.833 8$)； $Y_4 = -0.006 9X^2 + 0.781 6X - 16.153$ ($R^2 = 0.873 5$)，WGR、肌肉RNA/DNA值、蛋白质沉积率和皮肤胶原蛋白含量达到极值时， X 分别为57.9%、58.3%、55.9%、56.6%。

3 讨论

3.1 饲料蛋白质水平对大鲵生长性能和饲料转化的影响

水产动物的生长实质是体内蛋白质的合成，外观上表现为体长和体质量的增加，内在表现为组织体积的增加、细胞数量的增多以及营养物质和能量的积累，饲料蛋白质水平是决定水产动物生长的关键因素，其水平过高或过低均会对水产动物生长产生不利的影响^[6, 8-9]。饲料蛋白质水平过低抑制生长主要有2方面原因：一是因为蛋白质水平过低难以满足鱼体的最低生长需求导致生长缓慢；二是因为低蛋白质水平饲料中糖含量较高，大鲵是肉食性动物，已有研究表明肉食性动物对高糖饲料的耐受能力

较差，高糖饲料的摄入可能会导致体内代谢紊乱，进而抑制其生长。而饲料蛋白质水平过高又会增加鱼体的代谢负担，营养物质利用率下降，饲料成本增加，甚至会引引起氨中毒^[10]。在本实验中，随着饲料蛋白质水平增加，WGR、FI和FCR均不断增加且在D4组达到最佳，当饲料蛋白质水平超过55.7%后，FCR无显著变化，但WGR和FI显著降低，表明饲料蛋白质水平过低或过高均会对大鲵的摄食量或饲料转化效率产生不利影响，从而降低大鲵的WGR。同时，本研究还发现大鲵的饲料系数为0.43~0.67，低于一般养殖鱼类，这可能是与大鲵活动缓慢，喜静不喜动，摄食饵料大部分用于生长消耗相关。

以增重率、特定生长率、蛋白质效率和肌肉RNA/DNA值为观测指标，通过二次回归分析确定大鲵幼体对蛋白质最适需求量为55.9%~58.3% (干样基础)，若折算为风干样基础(10%水分)，对蛋白质最适需求量为50.3%~52.5%，在养殖肉食性鱼类(40%~55%，风干样)属偏高范围。

3.2 饲料适宜蛋白质水平对大鲵营养组成和蛋白质沉积的影响

在蛋白质合成过程中，RNA是重要的参与

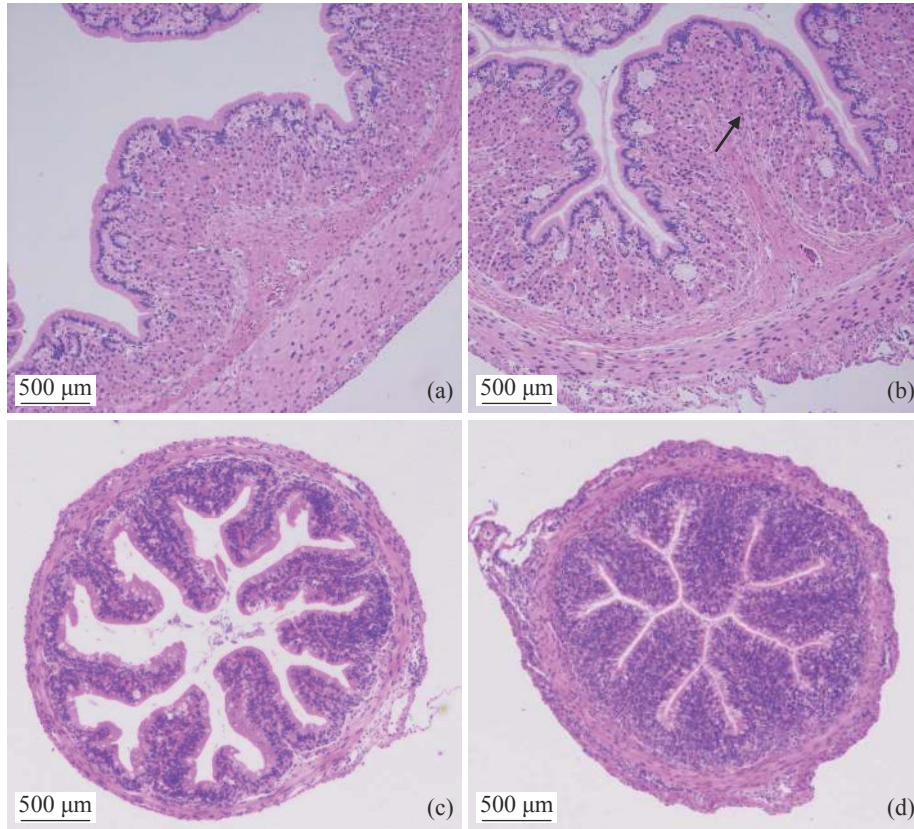


图 3 饲料蛋白质水平对大鲵胃和小肠组织结构的影响

(a)D1组大鲵胃(20×); (b)D4组大鲵胃(20×); (c)D1组大鲵小肠(20×); (d)D4组大鲵小肠(20×)

Fig. 3 Effects of dietary protein level on stomach and intestine structure of juvenile *A. davidianus*

(a)stomach of *A. davidianus* in D1(20×); (b)stomach of *A. davidianus* in D4(20×); (c)intestine of *A. davidianus* in D1(20×); (d)intestine of *A. davidianus* in D4(20×)

表 7 饲料蛋白质水平对大鲵幼体胃肠结构形态的影响

Tab. 7 Effects of dietary protein level on stomach and intestine index of juvenile *A. davidianus*

		饲料蛋白质水平 dietary protein level	
		D1 (43.7%)	D4 (55.7%)
胃 stomach			
空腔率*/% cavity rate		44.24±6.56 ^b	12.93±4.84 ^a
皱褶数量/个 fold number		7.33±1.53	6.00±1.00
皱褶高度/μm fold height		109.39±6.69 ^a	140.29±11.60 ^b
肠 intestine			
空腔率*/% cavity rate		18.67±4.56 ^b	5.76±2.84 ^a
绒毛数量/个 villus number		13.00±2.65	11.00±1.00
绒毛高度/μm villus height		54.02±6.39	46.98±2.76

注: *空腔率=S_{胃、肠道空腔}/S_{胃、肠道}

Notes: *. cavity rate=S_{cavity of stomach, intestine}/S_{stomach, intestine}

者, DNA含量反映了细胞的有丝分裂速率, 而 RNA/DNA值则与细胞效率, 即单个细胞合成蛋白质的速率成正相关, 核酸浓度(DNA、RNA含量)和RNA/DNA值已经在前人研究中得到了较多应用^[7, 11-12]。本研究发现, 饲料蛋白质水平过低会显著降低大鲵肌肉中DNA、RNA含量和RNA/DNA值, 说明饲料蛋白质水平不足会明显抑制肌肉有丝分裂速率, 降低细胞的蛋白质合成速率。大鲵肌肉DNA、RNA含量和RNA/DNA值均在D4组达到最佳, 全鱼、肌肉蛋白质含量和蛋白质沉积率均在该组达到最佳, 表明适宜的饲料蛋白质水平可以通过加快肌肉细胞的有丝分裂和蛋白质沉积速率, 增加鲵体的蛋白质含量, 进而促进生长。

胶原蛋白是一种高分子蛋白质, 含有丰富的甘氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸, 水解产物还含有丰富的活性肽, 这些特征使其在医疗、保健等方面具有良好的应用前景^[13]。目前研究报道了

表 8 饲料蛋白质水平对大鲵幼体抗氧化能力的影响

Tab. 8 Effects of dietary protein level on antioxidant ability of juvenile *A. davidianus*

		饲料蛋白质水平 dietary protein level					
		D1 (43.7%)	D2 (47.1%)	D3 (51.3%)	D4 (55.7%)	D5 (59.9%)	D6 (64.4%)
肠 intestine							
超氧化物歧化酶/(U/mg)	SOD	88.04±0.22 ^a	89.77±0.29 ^b	90.31±0.42 ^b	91.99±1.19 ^c	98.5±1.49 ^d	99.14±1.62 ^d
丙二醛/(mmol/L)	MDA	8.93±2.53 ^c	7.73±1.96 ^{bc}	6.23±0.68 ^{ab}	5.03±1.61 ^a	5.63±0.42 ^{ab}	5.93±0.76 ^{ab}
肝脏 liver							
超氧化物歧化酶/(U/mg)	SOD	35.12±1.05 ^b	38.25±0.46 ^c	38.79±0.80 ^c	38.79±0.71 ^c	35.66±2.6 ^b	26.75±0.58 ^a
丙二醛/(mmol/L)	MDA	5.04±0.70 ^{bc}	3.91±0.66 ^b	1.96±0.69 ^a	1.12±0.06 ^a	4.11±0.75 ^b	6.16±1.14 ^c

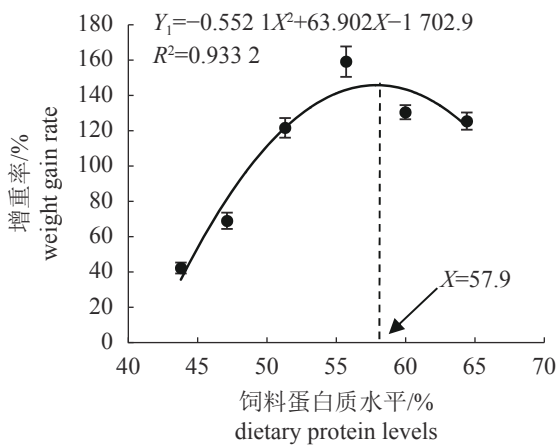


图 4 饲料蛋白质水平与增重率的关系

Fig. 4 Relationship between dietary protein level and weight gain rate of juvenile *A. davidianus*

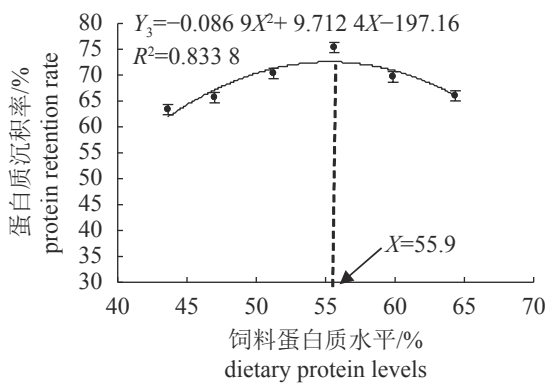


图 6 饲料蛋白质水平与蛋白质沉积率的关系

Fig. 6 Relationship between dietary protein level and protein retention rate of juvenile *A. davidianus*

杜仲^[14]、α-硫辛酸^[15]等添加剂对水产动物胶原蛋白含量的影响，但饲料蛋白质水平对水产动物胶原蛋白含量的影响鲜见报道。大鲵胶原蛋白含量高，被视为名贵的滋补品，因此把胶原蛋

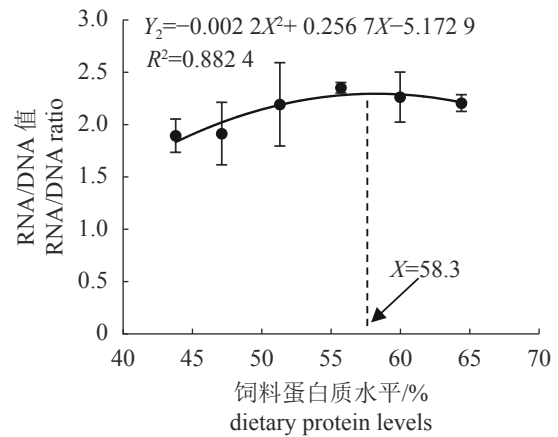


图 5 饲料蛋白质水平与肌肉RNA/DNA值的关系

Fig. 5 Relationship between dietary protein level and muscle RNA/DNA of juvenile *A. davidianus*

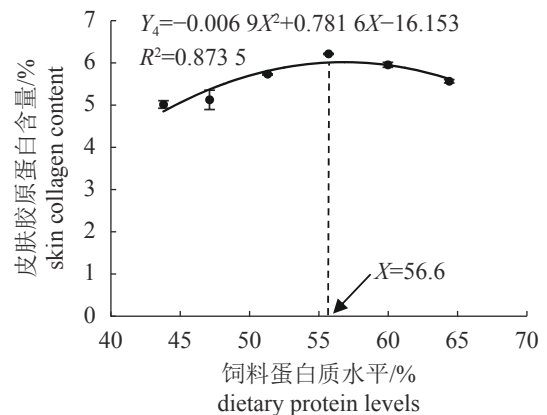


图 7 饲料蛋白质水平与皮肤胶原蛋白含量的关系

Fig. 7 Relationship between dietary protein level and skin collagen content of juvenile *A. davidianus*

白指标作为大鲵蛋白质需求的营养评价指标。本研究发现，适宜的饲料蛋白质水平(55.7%)可以显著提高大鲵的皮肤胶原蛋白含量，D4组较低蛋白D1组和高蛋白D6组分别增加了27.8%和

15.2%, 原因可能是适宜的饲料蛋白质水平可以提供适量的脯氨酸和赖氨酸, 促进机体羟基化反应, 使脯氨酸和赖氨酸转化成构成胶原蛋白的羟脯氨酸和羟赖氨酸, 进而提高胶原蛋白含量, 至于蛋白质水平过高或过低对胶原蛋白含量影响的具体机理还有待进一步研究。

3.3 饲料适宜蛋白质水平对大鲵胃肠功能的影响

大鲵胃腺为管泡状腺, 有独立的主细胞(分泌胃蛋白酶原)和壁细胞(分泌盐酸)^[16], 胃 H^+K^+ -ATPase是分泌盐酸的关键酶, 可作为离子交换器, 将胞浆内的水解离产生的氢离子“泵”入小管腔, 同时与通过小管膜上特异性氯离子通道进入小管腔的氯离子形成HCL。盐酸可激活胃蛋白酶原, 使其转变为有活性的胃蛋白酶, 对饲料蛋白质进行化学消化。大量研究表明, 饲料的化学组成可以影响消化酶活性, Wang等^[17]、孙海涛等^[18]在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)和匙吻鲟(*Polyodon spathula*)中的研究发现随着饲料蛋白质水平的增加, 胃蛋白酶活性得到增强, 但饲料蛋白质水平过高会抑制胃蛋白酶活性, 本研究与上述结果相似, 胃蛋白酶和 H^+K^+ -ATPase活性均在D3组、D4组达到最佳。通过大鲵胃的组织显微结构观察, 适宜的饲料蛋白质水平可以促进大鲵胃的发育更完整, 胃腺开口更多。表明适宜的饲料蛋白质水平可以通过促进大鲵胃的发育, 提高大鲵胃的泌酸能力, 增强胃蛋白酶的活性来提高对饲料蛋白的消化, 而低蛋白和高蛋白饲料均不利于胃酸的分泌和胃蛋白酶的激活。

经胃初步消化的食物进入小肠, 小肠中的胰液及肠粘膜细胞分泌的多种蛋白酶及肽酶共同作用于蛋白质。胰液中的蛋白酶主要分为外肽酶和内肽酶, 胰蛋白酶(重要的内肽酶之一)先以酶原的形式由胰腺细胞分泌进入肠道, 经肠激酶激活生成胰蛋白酶后, 再激活其他酶, 所以胰蛋白酶起核心作用。在本研究中, 胰蛋白酶活性在生长最佳的D4组(55.7%)达到最高, 且该组大鲵肠道空腔率较低, 绒毛排列整齐、紧密, 柱细胞和壁细胞数量较多, 说明适宜的饲料蛋白质水平可以通过促进大鲵小肠绒毛发育, 增加消化面积, 同时诱导胰蛋白酶的产生, 提高对营养物质的消化, 改善生长性能。关于饲料蛋白质水平对脂肪酶和淀粉酶活性的

研究, Debnath等^[19]研究表明饲料蛋白质水平对肠道淀粉酶和脂肪酶活性并无显著影响, 而Kawai等^[20]、钱前等^[21]在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和岩原鲤(*Procypris rabaudi*)中的研究发现淀粉酶和脂肪酶活性受饲料蛋白质水平的影响, 本实验发现随着饲料蛋白质水平的增加, 淀粉酶活性先下降后趋于稳定, 脂肪酶活性则呈先增后降的趋势, 在D4组达到最高。该差异可能是由于饲料蛋白质水平不断增加, 为了保持等脂, 饲料无氮浸出物含量不断下降造成的。 Na^+K^+ -ATPase是一种镶嵌在细胞膜上的蛋白质, 可通过水解ATP酶为离子转运提供能量^[22], 从而增强肠道的氨基酸、葡萄糖等营养物质的主动转运吸收能力。本研究中肠道 Na^+K^+ -ATPase活性在生长最佳组D4组达到最高, 低蛋白D1组显著低于D4组, 说明适宜的饲料蛋白质水平可通过增强肠道的吸收能力, 提高对营养物质的摄取, 进而促进大鲵生长。

3.4 饲料适宜蛋白质水平对大鲵抗氧化机能的影响

适宜的饲料蛋白质水平可以增强水产动物的抗氧化能力。SOD作为水产动物抗氧化系统中重要的抗氧化酶, 可以有效清除体内超氧阴离子自由基、游离氧和 H_2O_2 等活性氧物质。本研究发现, 饲料蛋白质水平由43.7%增加到55.7%, 肝脏和肠道SOD均呈上升趋势, 当饲料蛋白质水平超过55.7%后, 肝脏SOD活性显著下降, 而肠道SOD显著增加, 出现这一结果可能是因为肝脏是抗氧化酶产生的主要场所, 当肝脏抗氧化能力降低时, 氧化压力会向全身扩散, 导致肠道抗氧化酶活性增强, 以抵抗氧化损伤^[23]。MDA水平不仅可以判定机体脂质过氧化程度, 也可间接反映自由基侵害的程度、生物活性及抗氧化能力的强弱。本实验发现, 饲料蛋白质水平对肝脏和肠道MDA均有显著影响($P<0.05$), 说明适宜的蛋白质水平可以增强机体去除MDA的能力, 在云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)^[23]和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[24]的研究中也得到了相同的结果。

4 结论

大鲵幼体饲料适宜的蛋白质水平为55.9%~58.3%(干样基础)。该饲料蛋白质水平可以明显

促进大鲵幼体生长, 增加胶原蛋白含量和蛋白质沉积, 增强胃的泌酸能力、消化能力及肠道消化、吸收能力, 提高机体抗氧化机能。饲料低蛋白质水平显著抑制大鲵生长。

参考文献:

- [1] Wang X M, Zhang K J, Wang Z H, *et al.* The decline of the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* and implications for its conservation[J]. *Oryx*, 2004, 38(2): 197-202.
- [2] 阳爱生, 刘国钧. 大鲵人工繁殖的初步研究[J]. 淡水渔业, 1979, 9(2): 1-5.
Yang A S, Liu G J. Preliminary study on artificial breeding of Chinese giant salamander[J]. *Freshwater Fisheries*, 1979, 9(2): 1-5(in Chinese).
- [3] Deng D F, Ju Z Y, Dominy W, *et al.* Optimal dietary protein levels for Juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) fed diets with two levels of lipid[J]. *Aquaculture*, 2011, 316(1-4): 25-30.
- [4] Wang J T, Jiang Y D, Li X Y, *et al.* Dietary protein requirement of juvenile red spotted grouper (*Epinephelus akaara*)[J]. *Aquaculture*, 2016, 450: 289-294.
- [5] 陈德经. 大鲵黏液、皮肤及肉中氨基酸分析[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 375-376.
Chen D J. Analysis of amino acids in mucus, skin and flesh of giant salamander[J]. *Food Science*, 2010, 31(18): 375-376(in Chinese).
- [6] Coutinho F, Peres H, Guerreiro I, *et al.* Dietary protein requirement of sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) juveniles[J]. *Aquaculture*, 2012, 356-357: 391-397.
- [7] Buckley L J. Relationships between RNA-DNA ratio, prey density, and growth rate in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Larvae[J]. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1979, 36(12): 1497-1502.
- [8] Bansemer M S, Qin J G, Harris J O, *et al.* Age-dependent response of digestive enzyme activities to dietary protein level and water temperature in greenlip abalone (*Haliotis laevis*)[J]. *Aquaculture*, 2016, 451: 451-456.
- [9] Pinto D F H, Mansano C F M, De Stéfani M V, *et al.* Optimal digestible protein level for bullfrog tadpoles[J]. *Aquaculture*, 2015, 440: 12-16.
- [10] Lee J K, Cho S H, Park S U, *et al.* Dietary protein requirement for young turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2003, 9(4): 283-286.
- [11] Ali M, Iqbal R, Rana S A, *et al.* Effect of feed cycling on specific growth rate, condition factor and RNA/DNA ratio of *Labeo rohita*[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5(17): 1551-1556.
- [12] Ciji A, Sahu N P, Pal A K, *et al.* Effect of dietary gelatinized starch level and rearing temperature on fatty acid profile and DNA:RNA ratio of *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings[J]. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah*, 2013, 64: 836-841.
- [13] 傅燕凤, 沈月新, 杨承刚, 等. 淡水鱼鱼皮胶原蛋白的提取[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(2): 146-150.
Fu Y F, Shen Y X, Yang C G, *et al.* Isolation of collagen from freshwater fish skin[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2004, 13(2): 146-150(in Chinese).
- [14] 许晓莹, 李小勤, 孙文通, 等. 杜仲对草鱼生长、肌肉品质和胶原蛋白基因表达的影响[J]. 水产学报, 2018, 42(5): 787-796.
Xu X Y, Li X Q, Sun W T, *et al.* Effects of dietary *Eucommia ulmoides* on growth, flesh quality, and collagen gene expression of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(5): 787-796(in Chinese).
- [15] El-Senousey H K, Fouad A M, Yao J H, *et al.* Dietary alpha lipoic acid improves body composition, meat quality and decreases collagen content in muscle of broiler chickens[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2013, 26(3): 394-400.
- [16] 肖汉兵, 刘鉴毅, 林锡芝, 等. 大鲵消化系统的解剖学观察[J]. 动物学杂志, 1995, 30(6): 33-36.
Xiao H B, Liu J Y, Lin X Z, *et al.* Anatomical observation on digestive system of Chinese giant salamander[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1995, 30(6): 33-36(in Chinese).
- [17] Wang C F, Xie S Q, Zhu X M, *et al.* Effects of age and dietary protein level on digestive enzyme activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae[J]. *Aquaculture*, 2006, 254(1-4): 554-562.
- [18] 孙海涛, 吉红. 饲料蛋白水平对匙吻鲟幼鱼肌肉营养成分及消化酶活力的影响[J]. 水产科学, 2011, 30(12): 721-725.
Sun H T, Ji H. Effects of dietary protein levels on muscle composition and digestive enzyme activities in juvenile
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- paddlefish *Polyodon Spathula*[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(12): 721-725(in Chinese).
- [19] Debnath D, Pal A K, Sahu N P, *et al.* Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 146(1): 107-114.
- [20] Kawai S I, Ikeda S. Studies on digestive enzymes of fishes-IV: development of the digestive enzymes of carp and black sea bream after hatching[J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1973, 39(8): 877-881.
- [21] 钱前, 罗莉, 白富瑾, 等. 岩原鲤幼鱼的蛋白质需求量[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(12): 2934-2942.
- Qian Q, Luo L, Bai F J, *et al.* Dietary protein requirement of juvenile rock carp (*Procypris rabaudi*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(12): 2934-2942(in Chinese).
- [22] Gorini A, Canosi U, Devecchi E, *et al.* ATPases enzyme activities during ageing in different types of somatic and synaptic plasma membranes from rat frontal cerebral cortex[J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2002, 26(1): 81-90.
- [23] 张晨捷, 彭士明, 陈超, 等. 饲料蛋白和脂肪水平对云纹石斑鱼幼鱼免疫和抗氧化性能的影响[J]. *海洋渔业*, 2016, 38(6): 634-644.
- Zhang C J, Peng S M, Chen C, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels on immune and antioxidant function of juvenile *Epinephelus moara*[J]. *Marine Fisheries*, 2016, 38(6): 634-644(in Chinese).
- [24] 杨弘, 徐起群, 乐贻荣, 等. 饲料蛋白质水平对尼罗罗非鱼幼鱼生长性能、体组成、血液学指标和肝脏非特异性免疫指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2012, 24(12): 2384-2392.
- Yang H, Xu Q Q, Yue Y R, *et al.* Effects of dietary protein level on growth performance, body composition, hematological indexes and hepatic non-specific immune indexes of Juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(12): 2384-2392(in Chinese).

Dietary protein requirement of juvenile giant salamander (*Andrias davidianus*)

WANG Shuang¹, LI Zhanfu¹, LI Hong², LI Xuelian³, LEI Denghua³,
ZHU Chengke⁴, LIN Shimei¹, CHEN Yongjun¹, LUO Li^{1*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Reproduction and Development, College of Animal Science and
Technology, Southwest University, Ministry of Education, Chongqing 400716, China;

2. Chongqing Fishery Technology Promotion Station, Chongqing 400000;

3. Fisheries Technical Extension Station of Kaizhou District, Chongqing 405400;

4. College of Animal Science, Southwest University, Chongqing 402460, China)

Abstract: In order to determine the dietary protein requirement of juvenile giant salamander, 6 isolipidic diets were formulated to contain graded levels of D1(43.7%), D2(47.1%), D3(51.3%), D4(55.7%), D5(59.9%) and D6(64.4%) crude protein(dry matter) to feed juvenile giant salamander with initial weight (20.99±0.15)g for 92 days. The results show that: ① Dietary protein levels had significant effects on weight gain rate of giant salamander, and it reached the highest in the D4 group, which is 276.4% higher than group D1, and the whole body protein deposition rate and muscle RNA, RNA/DNA ratio, pepsin, H⁺-K⁺-ATPase in stomach, trypsin, lipase and Na⁺-K⁺-ATPase in intestine, liver superoxide dismutase (SOD) reached the best in the group D4, and the malondialdehyde (MDA) in liver and intestine were both the lowest in group D4. ② The content of muscle crude protein increased linearly with the increase of dietary protein level, while the fat content in giant salamanders declined linearly, and there was no significant difference in moisture and crude ash of whole body between different groups, and whole body crude protein increased first and then tended to be stable, reached the highest in the group D4. ③ The skin collagen content in group D4 reached the highest, increasing by 27.8% compared with D1. With weight gain rate, muscle RNA/DNA ratio, protein deposition rate, and skin collagen content as evaluation indexes, the optimum dietary protein level of the giant salamander was 55.9%-58.3%(based on dry mater), and this dietary protein level can significantly improve gastric acid secretion, the digestion and absorption, and antioxidant capacity, and increase the nutrient deposition, thus promote growth and feed conversion; While low protein level diet significantly inhibited the growth of *A. davidianus*.

Key words: *Andrias davidianus*; protein; body composition; RNA/DNA ratio; digestion; antioxidant

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

Funding projects: Science and Technology Innovation of Social and People's Livelihood in Chongqing (cstc2016shmszx80084); Chongqing Ecological Fishery Industry Technical System (2019)