

蛋氨酸和裂壶藻强化对卤虫体内游离氨基酸含量的影响

马 静^{1,2}, 秦帮勇^{1,2}, 王新星¹, 常 青¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 以卤虫(*Artemia parthenogenetica*)无节幼体作为试验材料, 研究蛋氨酸或裂壶藻(*Schizochytrium* sp.)强化对卤虫体内游离氨基酸(FAA)含量的影响。试验分为4组, 分别为蛋氨酸(Met)组、裂壶藻组、蛋氨酸加裂壶藻组以及对照组, 试验进行16 h, 每4 h取样1次。结果显示: 试验结束时, 蛋氨酸组的卤虫体内游离 Met 含量显著高于裂壶藻组($P<0.05$)。除对照组的丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)含量显著高于蛋氨酸+裂壶藻组外($P<0.05$), 其他所有的必需氨基酸及非必需氨基酸含量在16 h时都没有显著差异。试验过程中 FAA 水平随时间的变化趋势为: 对照组和蛋氨酸组基本上呈现先减少再升高的趋势, 且16 h和0 h的含量差别不大; 裂壶藻组和蛋氨酸加裂壶藻组的卤虫, 其体内 FAA 含量基本上呈下降趋势, 或小幅升高后下降, 16 h时的含量大多低于0 h时。试验结果表明: 给卤虫无节幼体强化 Met 可以提高其体内 Met 含量, 对其他种类的 FAA 影响不大。

关键词: 蛋氨酸; 游离氨基酸; 卤虫(*Artemia parthenogenetica*)无节幼体

中图分类号: X55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)06-0077-06

蛋氨酸(Met)又名甲硫氨酸, 是水产动物自身不能合成, 需要从外界食物中补充的十种必需氨基酸之一, 尤其是以豆粕为蛋白源的植物性蛋白饲料的第一限制性氨基酸^[1]。饲料中添加 Met 可以促进鱼体生长发育, 提高鱼体非特异性免疫能力^[2]; Met 还参与肝脏内磷脂的代谢, 具有保肝解毒的功能^[3]; 它还可以直接参与蛋白质的合成, 同时可以在机体内转化成半胱氨酸、活性甲基、肌酸等活性前体物质^[4]。食物中缺乏 Met 会造成鱼体生长缓慢^[5]、白内障等^[6]。

一般而言, 鱼体越小代谢越旺盛, 需要更多的氨基酸合成体蛋白, 维持正常生命活动。Met 对仔稚鱼的生长发育具有重要的生理作用。但是卤虫(*Artemia parthenogenetica*)无节幼体中游离氨基酸(FAA)含量相对较少, 而 Met 的含量很低, 无法满足海水仔鱼的生长需要。通过给卤虫无节幼体强化营养补充必需氨基酸, 使养殖仔稚鱼获得快速的生长是很有必要的。本试验通过直接强化方法给卤虫无节幼体强化 Met, 研究卤虫体内 Met 的含量变化, 并且与工厂化养殖中使用的强化物质裂壶藻(*Schizochytrium* sp.)进行比较, 明晰不同强化物质对卤虫体内 Met 及其他 FAA 组成及含量的影响。研究结果将为进一步研究 Met 营养与半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)仔稚鱼的生长及消化功能之间的关系奠定基础, 对工厂化养殖以及提高苗种成

活率, 具有重要的理论及实践意义。

1 材料与方法

本试验于2011年6月在山东海阳市黄海水产股份有限公司完成。裂壶藻作为海水鱼苗种生产中活饵料常用的营养强化物质, 因此结合生产实际情况, 本试验分为4组: 分别为强化蛋氨酸组、裂壶藻组及蛋氨酸加裂壶藻组、对照组(不添加任何强化物质)。

1.1 卤虫的营养强化

选用孵化24 h的卤虫无节幼体为试验材料。强化在140 L的小方缸中进行, 整个过程中水温维持在25~26℃, 连续大量充气, 持续16 h。强化物质的剂量为蛋氨酸5.3 mmol/L^[7]、裂壶藻100 g/m³(生产中的用量), 准确称量后通过300目筛绢溶于养殖水体中, 卤虫无节幼体的密度为(100~200)个/mL。

试验中所用 L-蛋氨酸纯度为99.5%, 产自上海斐雅科技发展有限公司。裂壶藻为美国进口的 BIO-MARINE 品牌藻粉。

收稿日期: 2012-05-02; 修回日期: 2013-03-29

基金项目: 青岛市应用基础项目(08-1-3-26-jch); 国家自然科学基金项目(31101913); 基本科研业务费资助项目(2010-ts-14)

作者简介: 马静(1986-), 女, 内蒙古阿拉善人, 硕士研究生, 主要从事水产动物营养与生理研究, E-mail: majing-1986214@163.com; 常青, 通信作者: E-mail: changqing@ysfri.ac.cn

1.2 取样

整个试验分 5 次取样。第一次取样为试验刚开始时(0 h), 之后的强化过程中每 4 h 取样 1 次, 每次取 3 个平行, 各 2 mL。用海水将卤虫表面的强化物质冲洗干净, 通过 300 目筛绢滤掉多余水分后, 装入 2 mL 冻存管中, 立即放入 -20°C 冷冻保存, 待测定游离氨基酸含量。

1.3 游离氨基酸分析

游离氨基酸分析的前期处理方法参照何桂珍^[8]方法, 稍作改动。卤虫样品经小型匀浆器(Wiggins D-130)匀浆后, 准确称量 1 g 左右, 加入 5 mL 4%浓度的磺基水杨酸溶液, 以 10 000 r/min 的速率 4°C 离心 18 min, 取上清液于 50 mL 容量瓶中, 离心管内再加 5 mL 磺基水杨酸, 将沉淀物搅匀再次离心, 合并上清液并用 0.02 mol/L 浓度的 HCl 溶液定容至 50 mL, 取 1 mL 过 0.45 nm 膜后至进样瓶中。氨基酸分析经日本日立 L-8900 氨基酸分析仪测定。每份样品中的卤虫单独计数, 以计算不同样品中卤虫的浓度, 氨基酸的结果以 pmol/个卤虫来表示。

1.4 统计分析

试验结果经统计学软件 SPSS 16.0 处理, 使用单因素方差分析(One Way-ANOVA)或经对数转换后使用单因素方差分析, 邓肯多重比较(Duncan's multiple range tests), 若方差不齐则使用 Equal Variances Not Assumed 提供的 Tamhane's T2 方法检验。显著水平设为 $P<0.05$, 结果以平均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。

2 结果与分析

2.1 游离蛋氨酸含量变化

表 1 显示了不同取样点, 不同强化物质的卤虫无节幼体内游离 Met 的含量。Met 含量在不同的强化组、不同的取样点变化均不大, 基本保持稳定水平。0~12 h 等 4 个取样点不同强化组均没有显著差异。蛋氨酸组的 Met 水平在 16 h 时升高, 达到 103.83 pmol/个, 较裂壶藻组含量增加了一倍多, 且经统计学检验差异显著 ($P<0.05$), 与对照组及蛋氨酸加裂壶藻组差异不显著。裂壶藻组的 Met 水平始终较低, 且有下降趋势。

表 1 不同强化物质卤虫无节幼体中游离蛋氨酸含量(pmol/个)

Tab. 1 The content of free methionine in *Artemia nauplii* with different enrichment materials (pmol/nauplii)

时间(h)	对照组	蛋氨酸组	裂壶藻组	蛋氨酸加裂壶藻组	P 值	F 值
0	51.21 $\pm$ 10.78 ^a	69.83 $\pm$ 37.31 ^a	48.99 $\pm$ 17.45 ^a	48.57 $\pm$ 12.31 ^a	0.614	0.634
4	43.77 $\pm$ 12.24 ^a	72.96 $\pm$ 23.04 ^a	49.48 $\pm$ 11.26 ^a	61.77 $\pm$ 7.71 ^a	0.149	2.349
8	48.72 $\pm$ 11.83 ^a	65.53 $\pm$ 10.39 ^a	46.91 $\pm$ 15.32 ^a	62.32 $\pm$ 11.69 ^a	0.24	1.721
12	53.67 $\pm$ 11.50 ^a	66.18 $\pm$ 32.86 ^a	38.90 $\pm$ 11.99 ^a	50.01 $\pm$ 7.12 ^a	0.411	1.079
16	55.02 $\pm$ 12.16 ^{ab}	103.83 $\pm$ 44.04 ^b	42.15 $\pm$ 16.02 ^a	60.98 $\pm$ 7.41 ^{ab}	0.015	3.576

注: 同行标有不同字母表示差异显著, $P<0.05$ (表 2, 表 3 同)

2.2 试验组其他氨基酸含量

经过 16 h 的强化, 卤虫无节幼体体内的必需氨

基酸含量和非必需氨基酸含量分别见表 2 和表 3。由表 2 和表 3 可见, 经过 16 h 的营养强化, 蛋氨酸和对照组的卤虫体内 FAA 含量基本都高于裂壶藻组和蛋

表 2 16 h 后不同强化物质强化的卤虫体内必需游离氨基酸含量 (pmol/个)

Tab. 2 The content of essential free amino acids in *Artemia nauplii* with different enrichment materials after 16 h (pmol/nauplii)

必需游离氨基酸	对照组	蛋氨酸组	裂壶藻组	蛋氨酸加裂壶藻组	P 值	F 值
Thr	144.47 $\pm$ 45.16 ^a	133.45 $\pm$ 52.50 ^a	106.86 $\pm$ 33.28 ^a	88.56 $\pm$ 17.45 ^a	0.356	1.243
Val	131.23 $\pm$ 14.82 ^a	132.01 $\pm$ 50.06 ^a	102.49 $\pm$ 21.65 ^a	91.13 $\pm$ 14.20 ^a	0.286	1.504
Ile	84.28 $\pm$ 19.49 ^a	80.34 $\pm$ 34.71 ^a	62.02 $\pm$ 18.68 ^a	50.49 $\pm$ 7.89 ^a	0.258	1.509
Leu	143.71 $\pm$ 39.03 ^a	139.06 $\pm$ 64.19 ^a	100.58 $\pm$ 28.13 ^a	83.22 $\pm$ 13.90 ^a	0.270	1.575
Phe	112.62 $\pm$ 39.31 ^a	117.71 $\pm$ 62.40 ^a	81.53 $\pm$ 31.79 ^a	70.49 $\pm$ 17.70 ^a	0.461	0.951
Lys	202.21 $\pm$ 27.04 ^a	208.08 $\pm$ 79.12 ^a	151.29 $\pm$ 22.89 ^a	133.40 $\pm$ 11.95 ^a	0.172	2.153
His	46.63 $\pm$ 8.66 ^a	45.40 $\pm$ 17.36 ^a	36.68 $\pm$ 10.71 ^a	31.89 $\pm$ 4.54 ^a	0.380	1.170
Arg	230.36 $\pm$ 30.79 ^a	248.70 $\pm$ 94.39 ^a	176.94 $\pm$ 28.56 ^a	157.37 $\pm$ 12.00 ^a	0.183	2.070

表 3 16 h 后不同强化方法强化的卤虫体内非必需游离氨基酸含量(pmol/个)

Tab. 3 The content of non-essential free amino acids in *Artemia nauplii* with different enrichment materials after 16 h (pmol/nauplii)

非必需游离氨基酸	对照组	蛋氨酸组	裂壶藻组	蛋氨酸加裂壶藻组	P 值	F 值
Asp	89.69±15.26 ^a	86.46±31.76 ^a	59.40±5.76 ^a	53.61±2.78 ^a	0.085	3.177
Ser	164.23±9.40 ^b	148.70±44.51 ^{ab}	131.36±19.11 ^{ab}	109.61±8.53 ^a	0.011	2.635
Glu	313.71±19.17 ^b	304.04±69.80 ^{ab}	253.31±20.58 ^{ab}	233.62±13.17 ^a	0.034	3.097
Gly	165.41±5.06 ^b	154.64±34.35 ^{ab}	142.03±19.30 ^{ab}	126.43±9.66 ^a	0.049	2.023
Ala	284.72±35.53 ^a	282.75±96.00 ^a	212.97±30.70 ^a	190.86±16.71 ^a	0.140	2.428
Cys	35.73±24.71 ^a	48.20±29.85 ^a	41.74±12.95 ^a	47.74±11.53 ^a	0.873	0.230
Tyr	87.41±20.43 ^a	71.94±38.34 ^a	68.25±20.94 ^a	57.66±6.96 ^a	0.544	0.767
Pro	222.02±22.39 ^a	215.65±45.41 ^a	195.28±16.75 ^a	176.33±14.82 ^a	0.247	1.686

氨酸加裂壶藻组,但是统计结果显示并没有因强化物质的不同,而使卤虫体内 FAA 含量表现出显著差异。

2.3 氨基酸含量变化趋势

图 1~图 4 分别显示了对照组、蛋氨酸组、裂壶

藻组及蛋氨酸加裂壶藻组 FAA 含量在 5 个取样点的变化趋势。由图 1~图 4 可以看出,不同强化组之间,FAA 含量的变化趋势是不同的,对照组和蛋氨酸组的 FAA,基本上呈先减少再升高的趋势,且 16 h 和 0 h

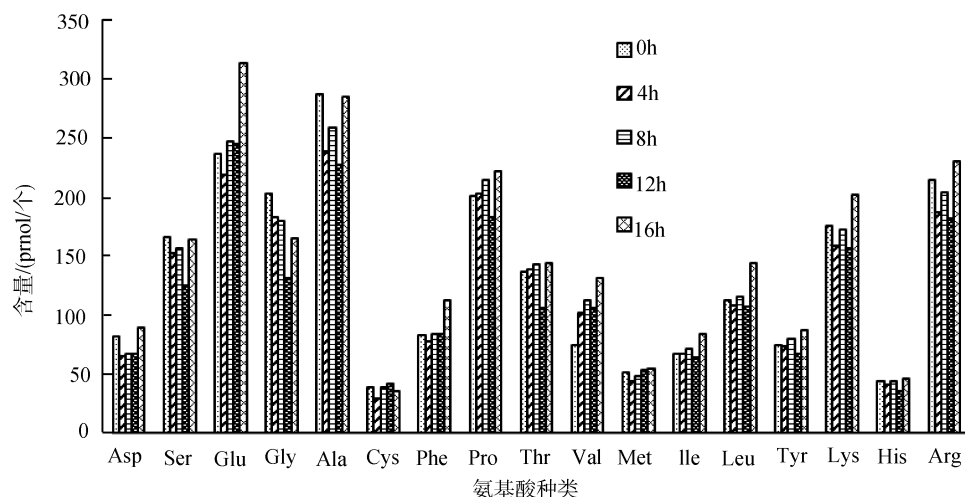


图 1 对照组卤虫体内游离氨基酸含量变化

Fig. 1 Variation of the free amino acid content in control group

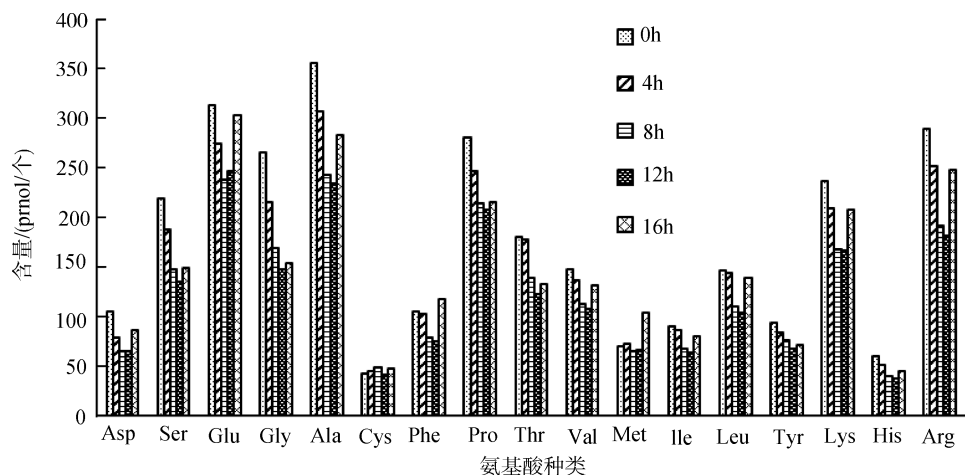


图 2 蛋氨酸组卤虫体内游离氨基酸含量变化

Fig. 2 Variation of the free amino acid content in methionine group

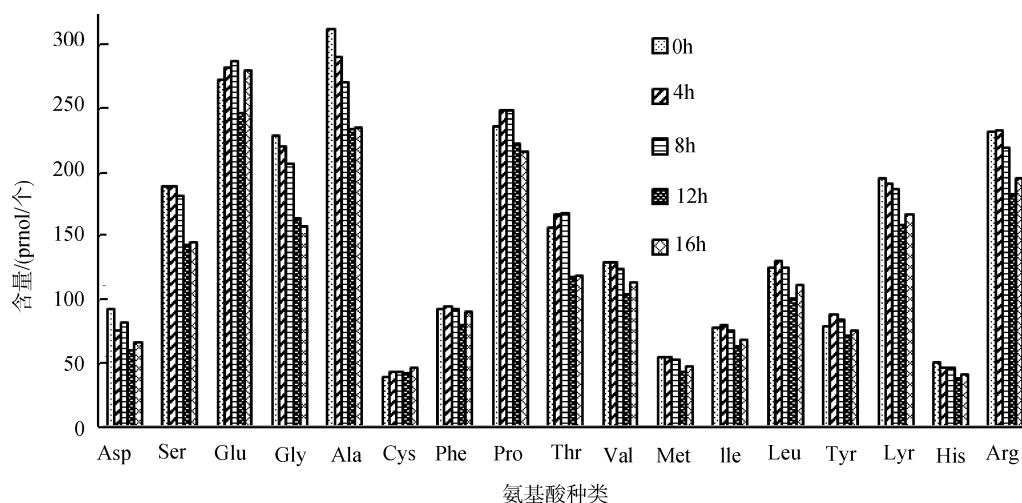


图3 裂壶藻组卤虫体内游离氨基酸含量变化

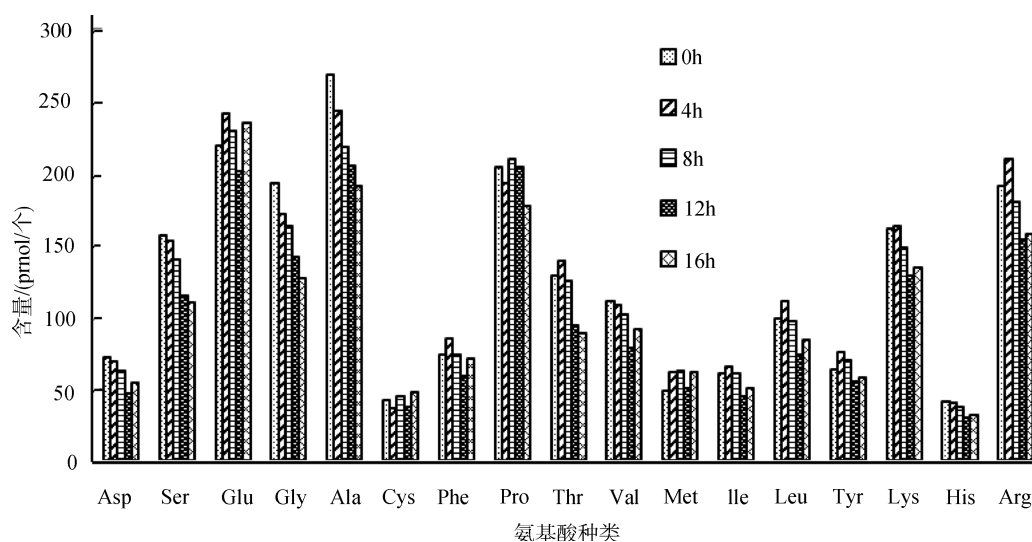
Fig. 3 Variation of the free amino acid content in *Schizochytrium* group

图4 蛋氨酸加裂壶藻组卤虫体内游离氨基酸含量变化

Fig. 4 Variation of the free amino acid content in methionine plus *Schizochytrium* group

时的含量差别不大。裂壶藻组和蛋氨酸加裂壶藻组的卤虫,其体内 FAA 含量基本上呈下降趋势,或小幅升高后下降,16 h 时的含量大多低于 0h,部分种类 FAA 在 8 h 时含量最低。

3 讨论

卤虫无节幼体中 FAA 含量及不饱和脂肪酸含量都不如野生桡足类^[9-10],桡足类比卤虫更适合作为海水仔稚鱼的活饵料。然而野生的桡足类很难保证有足够的数量,而且也增加了养殖鱼遭受疾病的风险,这些都限制了海水鱼苗种养殖中桡足类的使用。因此,大部分海水鱼苗种培育都以轮虫(*Brachionus rotundiformis*)和卤虫无节幼体作为早期的饵料。然而,

卤虫无节幼体含有的营养成分可能不能完全满足早期快速生长的仔稚鱼的需要,因此,通过强化方法将营养物质传递给卤虫无节幼体,从而改变其营养组成、使养殖仔稚鱼能得到快速的生长发育是很有必要的。

裂壶藻作为海水鱼苗种生产中常用的营养强化物质,其不仅含有丰富的多不饱和脂肪酸、FAA、维生素等营养物质,而且较鱼油等更易储存,不易被氧化,是生产中较为理想的强化材料^[11]。用裂壶藻强化卤虫无节幼体 16 h,可以增加其体内多不饱和脂肪酸含量,尤其是二十二碳六烯酸(DHA),达到 17.52 mg/g,显著高于对照组(马静等,未发表资料)。DHA 是海水仔稚鱼自身不能合成,必须通过食物获

取的必需脂肪酸之一,而且其对于视觉器官视网膜的形成及神经细胞的健全发育具有重要作用^[11]。本试验选择所有鱼类的必需氨基酸之一的蛋氨酸作为研究目标,通过直接强化方法研究蛋氨酸营养对于卤虫无节幼体体内游离蛋氨酸及其他 FAA 含量的影响及变化,同时与生产中常用卤虫强化物质裂壶藻进行对比,研究不同强化物质及联合强化策略对其体内 FAA,尤其是蛋氨酸的影响。

结果表明,经过 16h 的营养强化,蛋氨酸组的卤虫体内 Met 含量显著升高,证明卤虫无节幼体可以被成功强化蛋氨酸。这与其他一些学者对于卤虫营养强化的试验结果一致^[12-14],说明卤虫体内的营养组成可以通过人为方式有所改善,而更加符合养殖需求。前 12h 的强化, Met 含量没有显著增加,有可能是由于部分 Met 被转化为半胱氨酸、活性甲基、肌酸等物质^[2],参与正常生理代谢。

Helland 等^[13]研究认为,藻类强化卤虫,不仅可以使卤虫体内不饱和脂肪酸含量升高,同时也可以提高 FAA 含量。但是裂壶藻强化的卤虫其 FAA 含量并没有显著的优于其他组,这与马静^[15]的试验结果不一致,可能是由于不同批次的卤虫卵品质不同,也有可能是水温、盐度及其他试验条件对卤虫自身代谢的影响,从而导致了结果不一致。30℃水温下卤虫无节幼体每小时饮用海水的量约为体质量的 10.8%,这些 FAA 集中于肠道中^[16]。用蛋氨酸和裂壶藻联合强化的卤虫,其体内蛋氨酸及其他 FAA 也并没有明显变化,说明联合强化策略对于其 FAA 影响也较小,这可能是由于卤虫肠道内容量有限,其通过无选择性滤食吞入的营养物质也有限^[17],不足以改变体内 FAA 组成。所有试验组的卤虫体内 FAA 含量都不是一成不变的,而是始终处于一个动态的变化中,这是由于 FAA 库与蛋白库之间保持着动态的关系,而且卤虫无节幼体含有大量的卵黄,其中蛋白质含量达到 74.1%^[18],FAA 库含量的变化有可能是其卵黄蛋白质水解与自身代谢综合作用的结果。

参考文献:

- [1] 陈涛,黄凯,麻艳群,等.豆粕型饲料中添加蛋氨酸对江黄颡鱼生长的影响[J].水产科学,2010,29(2):99-101.
- [2] 马建忠,周恒永,周洁,等.大口黑鲈对饲料中蛋氨酸需求量的评定[J].水产学报,2010,34(8):1244-1253.
- [3] 周洵,杜刚,王世恒,等.渔用饲料中科学使用单体氨基酸[J].渔业经济研究,2006,3:41-42.
- [4] 张小玲,张书汁.蛋氨酸在水产饲料中的应用[J].河南水产,2011,1:19-20.
- [5] 王蕾蕾,邵庆均.饲料中添加蛋氨酸对鱼类生长的影响[J].水利渔业,2007,27(1):108-110.
- [6] Poston H A. Response of rainbow trout to source and level of supplemental dietary methionine[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1986, 83(4): 739-744.
- [7] Tonheim S, Koven, W, Rønnestad I. Enrichment of *Artemia* with free methionine[J]. Aquaculture, 2000, 190(3-4): 223-235.
- [8] 何桂珍.游离氨基酸和脂肪酸分析的应用[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2001,22(3):162-163.
- [9] Bell J G, McEvoy L A, Estevez A, et al. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae[J]. Aquaculture, 2003, 227(1-4): 211-220.
- [10] Helland S, Terjesen B F, Berg L. Free amino acid and protein content in the planktonic copepod *Temora longicornis* compared to *Artemia franciscana*[J]. Aquaculture, 2003, 215(1-4): 213-228.
- [11] 陈家鑫.裂壶藻及其制品在水产苗种培育中的应用[J].科学养鱼,2002,6:53.
- [12] Naz M, Türkmen M. Changes in the digestive enzymes and hormones of gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*, L. 1758) fed on *Artemia* nauplii enriched with free lysine[J]. Aquaculture International, 2009, 17(6): 523-535.
- [13] Helland S, Triantaphyllidis G V, Fyhn H J, et al. Modulation of the free amino acid pool and protein content in populations of the brine shrimp *Artemia* sp.[J]. Marine Biology, 2000, 137(5): 1005-1016.
- [14] Naz M, Türkmen M. The changes in digestive enzymes and hormones of gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*, L 1758) fed on *Artemia* nauplii enriched with free methionine[J]. Aquaculture International, 2009, 17(3): 243-256.
- [15] 马静,邹安革,王新星,等.不同强化物质对卤虫体内游离氨基酸含量的影响[J].渔业科学进展,2011,33(1):102-108.
- [16] Navarro J C, Ireland J, Tytler P. Effect of temperature

- on permeability and drinking rates of the metanauplii of the brine shrimp *Artemia* sp.[J]. Mar Biol, 1993, 116(2): 247-250.
- [17] 黄旭雄, 王瑞, 吕耀平, 等. 不同强化饵料对卤虫必需脂肪酸组成的影响[J]. 水产科学, 2005, 24(10): 1-4.
- [18] Warner A H, Puodziukas J G, Finamore F J. Yolk platelets in brine shrimp embryos: Site of biosynthesis and storage of the diguanosine nucleotides[J]. Experimental Cell Research, 1972, 70(2): 365-375.

Effects of enrichment on the free amino acid content in *Artemia* nauplii using methionine or *Schizochytrium*

MA Jing^{1, 2}, QIN Bang-yong^{1, 2}, WANG Xin-xing¹, CHANG Qing¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Aquatic and Life School, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Received: May, 2, 2012

Key words: methionine; FAA; *Artemia* nauplii

Abstract: Effects of different enrichment materials on the free amino acid content in *Artemia* nauplii were studied. The experiment was carried with 4 groups, including methionine group, *Schizochytrium* group, methionine plus *Schizochytrium* group and control group. The experiment lasted 16 hours, and was sampled every 4 hours. The results showed that the content of free methionine of *Artemia* nauplii in methionine group was significantly higher than that in *Schizochytrium* group ($P<0.05$). No significant differences were observed for all essential amino acids and nonessential amino acids except that Ser, Glu and Gly content in control group was significantly higher than those in methionine plus *Schizochytrium* group at the end of the experiment ($P<0.05$). The variation trends of the FAA level in the control group was similar to the methionine group: the content of FAA declined at first and then increased, and the content was similar between 0 and 16h. But in methionine plus *Schizochytrium* group and *Schizochytrium* group, the content of these FAA in *Artemia* nauplii mainly declined during the experiment or slightly increased first, and then declined, and the content of most FAA at 16 h was lower than that at 0 h. The results point that enriching *Artemia* nauplii with methionine is feasible and could increase the content of methionine but there is little influence on FAA profile.

(本文编辑: 谭雪静)