

棉粕蛋白酶解物对异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 消化、生长和胰蛋白酶 mRNA 表达量的影响^{*}

刘文斌 王 恬

(南京农业大学动物科技学院 南京 210095)

摘要 以棉粕蛋白为酶解底物,用枯草杆菌蛋白酶对其进行酶解,以酶解产物 1.5% 和 3.0% 两个梯度等量替代鱼饲料配方中棉粕,在室内流水养殖系统中喂养异育银鲫鱼种 [体重为 (30 ± 2) g] 65 天。测定鱼的生长、营养物质表观消化率、消化蛋白酶活性及肝胰脏中胰蛋白酶 mRNA 表达水平等指标。结果表明,添加 1.5% 和 3.0% 棉粕酶解产物的鱼在饲养 35 天后的特定增长率 (SGR) 分别比对照组高 32.5% 和 56.7%, 且差异显著 ($P < 0.05$); 在饲养 65 天后,两组特定增长率分别比对照组高 8.0% 和 21.0%, 且差异极显著 ($P < 0.01$), 肝胰脏中胰蛋白酶 mRNA 表达水平也随棉粕酶解产物添加梯度提高而相应提高,表明鱼的生长与消化蛋白酶 mRNA 表达水平相关。同时棉粕蛋白酶解物对肠道蛋白酶的活性和营养物质表观消化率都有促进作用,而棉粕蛋白酶解物对鱼肌肉成分并没有改变,这也表明棉粕蛋白酶解物在促进鱼生长、内源酶活性同时并未降低鱼的品质。

关键词 棉粕蛋白酶解物,异育银鲫,消化,生长,胰蛋白酶 mRNA 表达水平
中图分类号 S963

目前,以植物蛋白为酶解底物产生的酶解产物用于生物活性研究大多使用大豆蛋白等进行酶解 (Alaoui *et al.* 1998), 并开发了许多相应的产品投入市场。而以棉粕蛋白质作为酶解底物并研究其酶解产物对鱼类生长和消化机能的影响,至今未见报道。棉粕蛋白是动物饲料中常见的蛋白原料,尤其在鱼用饲料中使用更为普遍 (Robinson *et al.* 1994)。我国棉粕产量很高,每年可生产 500 万吨以上,资源非常丰富,是很好的动物饲料蛋白资源,除了将棉粕直接作为鱼用饲料原料外,寻找更为有效的利用棉粕蛋白的途径和提升棉粕蛋白价值是棉粕蛋白研究方向之一。

本研究中选用枯草杆菌蛋白酶 (AS1.398) 酶解棉粕植物蛋白,并将其酶解产物按不同比例添加至异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 饲料中喂

养鱼类,考察棉粕酶解产物对异育银鲫生长、消化能力、肠道消化酶活性和胰蛋白酶的基因表达量的影响,研究各项生理生化指标之间相互关系,探讨蛋白酶解物的生理功能与作用机制,为今后棉粕蛋白酶解产物在水产饲料中科学应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 棉粕蛋白及酶解产物制备

试验棉粕,粗蛋白含量为 40%, 采自江苏市场。棉粕酶解产物制备步骤为: 首先将棉粕用粉碎机粉碎, 然后过筛 (100 目), 称量的棉粕样品放入烧杯中, 按 1:5 (W/V) 比例加入蒸馏水用磁力搅拌器充分混合, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0 按每克蛋白 2500 IU 的 AS1.398 枯草杆菌蛋白酶的比例将酶和蛋白混匀, 然后将烧杯放入 45°C 振

* 国家 863 项目资助, 2002AA2Z4061 号; 江苏省科技攻关项目资助, PJ2003-39 号。刘文斌, 博士, 副教授, E-mail: wbl@njau.edu.cn

收稿日期: 2005-02-14 收修改稿日期: 2005-09-22

荡水浴锅中进行恒温水浴 5h, 反应结束后, 在 100℃沸水浴中加热灭活 10min, 自然冷却至室温, 用旋转蒸发仪去水干燥即获得棉粕酶解产物, 营养成分见表 1, 放置 -20℃冰箱中冷冻备用。

表 1 棉粕及其蛋白酶解产物营养指标分析 (%)

Tab. 1 Nutrient analysis of cottonseed meal and protein hydrolysates (%)

营养指标	粗蛋白	粗脂肪	可溶性非氨基酸氮	游离氨基酸氮
棉粕	41.3	1.44	20.4	4.9
棉粕酶解物	41.3	1.44	38.1	18.9

1.2 鱼类养殖试验

选择规格一致的 1 龄异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 鱼种 108 尾, 体重 (30 ± 2) g, 随机分为 3 组, 每组设 3 个重复试验, 共 9 个水族箱 (规格为 0.85m × 0.45m × 0.55m), 每箱 12 尾试验鱼。每组分别投喂 1、2、3 组饲料, 各组试验饲料配方见表 2, 各组饲料能量相等、蛋白含量相等。3 组饲料逐级混和均匀, 再加水拌匀, 用小型绞肉机制成颗粒, 自然晾干后放入 -20℃冰箱中储藏备用。

异育银鲫驯化养殖 7 天后开始投喂试验饲料, 每天投喂 2 次, 时间分别为 8:30、16:30 投喂适量, 鱼类自由采食, 30min 后观察记录吃食情况, 投喂 2h 后有剩饵吸出烘干计算扣除。试验是在室内流水养殖系统内进行的, 每天测溶氧和水温, 饲养过程中平均水温为 (26 ± 2)℃, 溶解氧 5mg/L 以上, 每天喂料前各吸污一次。鱼类共饲养 72 天, 其中, 前期驯化 7 天, 正式试验 65 天, 分别在 0、35、65 天称重。

表 2 各组试验饲料配方与营养水平 (%)

Tab. 2 Formulation and nutrition levels of the diets for *C. auratus gibelio* (%)

配 方	对照组	试验组 1	试验组 2
豆粕	18	18	18
棉粕	16	14.5	13
菜粕	26	26	26
花生粕	11	11	11
次粉	18	18	18

续表

配 方	对照组	试验组 1	试验组 2
预混料*	1	1	1
磷酸二氢钙	1.8	1.8	1.8
氟石粉	2.5	2.5	2.5
玉米蛋白粉	1.7	1.7	1.7
棉粕酶解物	0	1.5	3
鱼粉	2	2	2
鱼油	2	2	2
营养水平	对照组	试验组 1	试验组 2
干物质	88.82	88.82	88.82
粗蛋白	35.16	35.16	35.16
粗脂肪	4.45	4.45	4.45
灰分	12.68	12.68	12.68
有效磷	0.89	0.89	0.89
钙	0.91	0.91	0.91
蛋氨酸 + 胱氨酸	1.13	1.13	1.13
赖氨酸	1.58	1.58	1.58

* 注: 1kg 预混料含有: CuSO₄·5H₂O 2.5g, FeSO₄·7H₂O 28g, ZnSO₄·7H₂O 22g, MnSO₄·4H₂O 9g, Na₂SeO₃ 0.045g, KI 0.026g, CoCl₂·6H₂O 0.1g, V_A 900000IU, V_D 250000IU, V_E 4500mg, V_{K₃} 220mg, V_{B₁} 320mg, V_{B₂} 1090mg, V_{B₅} 2000mg, V_{B₆} 500mg, V_{B₁₂} 1.6mg, Pantothenate 1000mg, Folicacid 165mg

1.3 表观消化率测定

投喂试验日粮 30 天后, 用含 1% C₂O₃ 指示剂试验日粮投喂 7 天, 每天喂料 2h 后收集粪便, 收集 6 天左右。收集时用捞网捞起条状粪便, 用镊子选择新鲜、外表带有包膜、尽可能完整粪便放在干净培养皿中, 在 60℃ 的烘箱中烘干, 保存在 -26℃ 冰箱中待测干物质、粗蛋白表观消化率。C₂O₃ 含量采用二苯胺基脲比色法测定; 干物质测定用烘箱烘干 (105℃) 法; 蛋白质采用凯氏定氮法。

1.4 蛋白酶活性测定

试验结束时, 投喂饲料 3h 后称重, 计算增重率, 然后每组取 9 尾 (每组 3 个水族箱中各取 3 尾) 异育银鲫于冰盘上解剖, 取出肠道, 剔除脂肪组织, 用 4℃ 冷却的去离子水冲洗, 然后用滤纸轻轻吸干水分。标号后于 4℃ 冰箱中保存, 24h 内测完。蛋白酶活性测定方法参照 Bradford (1976)。

1.5 RQ-PCR 测定胰蛋白酶 mRNA 表达量

取异育银鲫敲击脑部, 致使鱼类昏迷, 快速

解剖提取胰腺脏中胰管周围的组织 200mg左右, 加入 1ml Trizol Reagent 快速匀浆, 15—30℃静置 5min, 加入 0.2ml 颠倒 15s, 15—30℃静置 3min, 4℃离心 (1500r/min) 15min, 取上清液 0.5ml 加入 0.5ml 异丙醇混匀, 15—30℃静置 10min, 4℃离心 (1500r/min) 10min, 弃上清液, 加入 1ml 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀, 4℃离心 (10000r/min) 5min, 弃上清液, 将沉淀 RNA 真空干燥 5min, 以 20 μ l DEPC 处理水溶解。将 RNA 溶液稀释为 0.5 μ g/ml 立即用于后续反应。

设计三对引物进行筛选, 即 A1: agcccatcag-gtgtctct; A2: gagtcgttggtgatgtttagg; B1: cctcagcttgat-cagcatga; B2: gggctccctcagcttgat; C1: gagcgtggctacte-cttcaq; C2: acaggctcttacggattcg。经实验, A1、A2对引物扩增的结果经电泳分析条带单一、产量大, 为目标条带, 其他两对引物产物条带不清晰, 最后确定 A1、A2引物对本实验用引物。

定量 PCR 扩增采用 SYBR Green I 定量 PCR 体系, 参照王梁燕等 (2004), 反应体系和热循环参数如下: Taq DNA 聚合酶: 0.2 μ l 10 \times buffer 2.5 μ l Mg²⁺ (25mmol/L): 2 μ l dNTP (10mmol/L): 2 μ l 引物 1/引物 2 (10 μ mol/L): 各 1 μ l 模板 DNA: 1 μ l SYBR Green I (1/500) 1 μ l 加水到 25 μ l 反应程序: 95℃预变性, 3min; 94℃变性, 30s; 54℃退火, 30s; 72℃延伸, 30s 45个循环。

以克隆的已知浓度的人基因组 DNA 为模板, 梯度稀释后用 SYBR Green I 体系进行扩增。根据 RQ-PCR 的原理制作出来标准曲线, 并拟合

以下公式: $\lg Q = 10.50 - 0.26Ct$, Q 为起始拷贝数, Ct 为循环阈值。

1.6 数据统计与分析

数据用 SPSS11.5 软件统计, 用单因子方差分析和 Duncan's 多重比较进行差异显著性检验, 结果用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。

2 结果与分析

2.1 棉粕蛋白酶解产物对异育银鲫消化酶活性和表观消化率影响

由表 3 可知, 蛋白质的表观消化率以添加棉粕蛋白酶解产物 3% 的试验组较高, 比对照高 1.42%, 其差异显著 ($P < 0.05$), 添加 1.5% 棉粕酶解物的试验组, 蛋白质的表观消化率与对照相比也高 0.67%, 但两者差异不显著 ($P > 0.05$)。干物质的表观消化率三组之间均无显著性差异, 结果表明, 棉粕蛋白酶解能提高蛋白质的消化吸收率, 而对干物质吸收无明显影响。

肠道组织中蛋白酶活性以添加棉粕蛋白酶解产物 3% 的试验组最高, 比对照组高 43.81%, 且差异显著 ($P < 0.05$), 添加 1.5% 棉粕酶解物的试验组比对照组高 6.5%, 但差异并不显著 ($P > 0.05$), 肠道中食糜蛋白酶活性也是以 3% 的试验组最高, 而添加 1.5% 棉粕酶解物和对照组差别不大, 并且三组之间均无显著差异。表明棉粕蛋白酶解物对肠道组织中蛋白酶影响较明显。而对食糜中蛋白酶活性影响较小, 从表 3 可知, 各组食糜中蛋白酶活性比肠道组织中的蛋白酶活性均较高。

表 3 棉粕蛋白酶解产物对异育银鲫表观消化率和肠道蛋白酶活性影响

Tab. 3 Effect of cottonseed meal protein hydrolysates on apparent digestibility coefficient (ADC) and intestine proteolytic activity of *C. auratus gibelio*

组 别	对照组	试验组 1	试验组 2
蛋白质表观消化率 (%)	88.33 \pm 0.63 ^a	88.92 \pm 0.50 ^a	89.58 \pm 0.78 ^b
干物质表观消化率 (%)	66.85 \pm 0.84 ^a	66.27 \pm 0.88 ^a	66.78 \pm 1.72 ^a
肠道组织蛋白酶活性 (U)	494.02 \pm 30.67 ^a	526.46 \pm 75.39 ^a	710.47 \pm 32.53 ^b
肠道食糜蛋白酶活性 (U)	785.75 \pm 54.83 ^a	790.64 \pm 44.47 ^a	833.75 \pm 47.65 ^a

注: 同一行小写字母上标不同者为差异显著 ($P < 0.05$), 上标相同者为差异不显著 ($P > 0.05$), 下同。干物质表观消化率 = $(1 - \text{饲料 } C_2O_3 \text{ 含量} / \text{粪便 } C_2O_3 \text{ 含量}) \times 100\%$ 。粗蛋白表观消化率 = $[1 - (\text{饲料 } C_2O_3 \text{ 含量} \times \text{粪便粗蛋白含量}) / (\text{粪便 } C_2O_3 \text{ 含量} \times \text{饲料粗蛋白含量})] \times 100\%$ 。蛋白酶活性单位定义: 1g 食糜或组织在 30℃、pH 7.0 的条件下, 每分钟水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸的酶量为 1 个蛋白酶活力单位 (U)

2.2 棉粕蛋白酶解产物对异育银鲫胰蛋白酶 mRNA 表达量的影响

由表 4 可知,胰蛋白酶 mRNA 起始拷贝数代表胰蛋白酶 mRNA 表达水平,试验各组在鱼类饲养 35 天后,异育银鲫胰蛋白酶 mRNA 表达水平均以添加 3.0% 棉粕蛋白酶解物试验组最高 ($P < 0.05$),其次为添加 1.5% 棉粕蛋白酶解物试验组

($P < 0.05$)。鱼类饲养 65 天后,各组的胰蛋白酶 mRNA 表达水平的趋势与 35 天一致,也是以试验 2 组最高 ($P < 0.05$),并且各组在 65 天后表达量比饲养 35 天时均有增加。表明随棉粕蛋白酶解物使用时间延长、鱼类体重增长,胰蛋白酶 mRNA 表达水平也在逐渐提高。

表 4 各组异育银鲫胰蛋白酶 mRNA 起始拷贝数

Tab 4 Initial copy quantity of trypsin mRNA from hepatopancreas of *C. auratus gibelio* in three groups

饲养时间 (d)	对照组	试验组 1	试验组 2
35	569.5 ± 363.5 ^a	1884.1 ± 564.1 ^a	4367.5 ± 1155.4 ^b
65	1719.5 ± 506.6 ^a	2277.8 ± 593.2 ^a	5010.1 ± 1553.8 ^b

2.3 棉粕蛋白酶解产物对异育银鲫生长的影响

由表 5 可知,添加 1.5% 和 3.0% 棉粕酶解产物两个试验组鱼类的增重率经 35 天、65 天饲养均比对照组高,在饲养 35 天后,两组特定生长率分别比对照组高 32.5% 和 56.7%,且三组间差异均显著 ($P < 0.05$),在饲养 65 天后,两组特定生长率分别比对照组高 8% 和 21%,与对照组比试验 1 组差异不显著,试验 2 组差异显著 ($P < 0.05$),试验 2 组与试验 1 组相比,增重率也明显提高,且差异显著 ($P < 0.05$),表明在异育银鲫饲料中添加棉粕蛋白酶解产物对鱼类均有促生长作用,且随添加量增加效果更为显著。

分和总干物质含量均有所提高,表明棉粕蛋白酶解产物对营养物质在鱼体肌肉中存积有明显促进作用,这也从鱼类生长速度表现出来,在蛋白质中的氨基酸组成及其比例中,两试验组必需氨基酸和总氨基酸含量与对照组相比无明显变化,而游离氨基酸含量有明显提高,与对照组相比分别提高了 10.27% 和 8.65%,添加 3% 棉粕蛋白酶解产物组的鱼肉中呈味氨基酸比例与对照组相比所有提高,而添加 1.5% 无明显变化。总体而言,添加棉粕蛋白酶解产物饲养异育银鲫,虽然它们的生长速度有明显提高,而它们的肌肉品质并未下降,在添加 3% 棉粕蛋白酶解产物组,鱼类肌肉有的指标还有所提高。

表 5 棉粕蛋白酶解产物对异育银鲫特定生长率 (SGR) 的影响

Tab 5 Effect of cottonseed meal protein hydrolysates on the specific growth rate (SGR) of *C. auratus gibelio*

饲养时间 (d)	对照组	试验组 1	试验组 2
0—35	1.20 ± 0.03 ^a	1.59 ± 0.04 ^b	1.88 ± 0.03 ^c
35—65	2.29 ± 0.05 ^a	2.34 ± 0.05 ^a	2.63 ± 0.06 ^b
0—65	1.70 ± 0.02 ^a	1.93 ± 0.01 ^a	2.22 ± 0.03 ^b

注:特定生长率 (SGR) 计算公式: $SGR = 100 \times (\ln W_1 - \ln W_0) \times D^{-1}$, 其中, W_0 和 W_1 分别为鱼类初始体均重和最终体均重, D 为试验鱼类饲养天数

2.4 棉粕蛋白酶解产物对异育银鲫肌肉成分的影响

由表 6 可知,试验 1 组和试验 2 组中的鱼肌肉水分含量明显降低,而粗蛋白、粗脂肪和粗灰

表 6 棉粕蛋白酶解产物对异育银鲫肌肉成分的影响 (%)

Tab 6 Effect of cottonseed meal protein hydrolysates on muscle composition of *C. auratus gibelio* (%)

肌肉成分	对照组	试验组 1	试验组 2
常规成分			
水分	77.08	76.10	75.74
干物质	22.92	23.90	24.26
粗蛋白	18.30	18.63	19.06
粗脂肪	2.87	3.27	3.14
粗灰分	0.92	1.10	1.23
粗蛋白中			
天门冬氨酸★	7.79	7.70	7.70
苏氨酸◆	3.42	3.41	3.38

续表

肌肉成分	对照组	试验组 1	试验组 2
丝氨酸	3.18	3.19	3.18
谷氨酸★	13.34	12.95	13.23
甘氨酸★	4.35	4.64	4.74
丙氨酸★	4.75	4.81	4.86
胱氨酸	0.60	0.62	0.63
缬氨酸◆	3.72	3.65	3.70
蛋氨酸◆	2.17	2.19	2.18
异亮氨酸◆	3.30	3.22	3.21
亮氨酸◆	6.24	6.13	6.12
酪氨酸	2.36	2.25	2.30
苯丙氨酸◆	3.23	3.16	3.12
赖氨酸◆	6.86	6.87	6.85
组氨酸	2.06	2.21	2.18
精氨酸	5.07	5.08	5.12
脯氨酸	2.66	2.82	2.84
总氨基酸	75.10	74.93	75.34
必需氨基酸	28.94	28.67	28.56
必需氨基酸比例 EAA/TAA (%)	38.54	38.26	37.91
呈味氨基酸	30.23	30.10	30.53
呈味氨基酸比例 DAA/TAA (%)	40.25	40.17	40.52
游离氨基酸	1.85	2.04	2.01

注: ◆为必需氨基酸, ★为呈味氨基酸, 色氨酸未测定

3 讨论

生物活性肽是指具有特殊生物活性的肽类。蛋白质酶解产物是生物活性肽的来源之一 (Vique et al, 1999), 无论是动物蛋白还是植物蛋白经过酶解后产生的肽类和游离氨基酸均有可能对动物生长、免疫有促进作用。Lee等 (1998) 分别从贝类蛋白酶酶解产物中分离出抗艾滋病毒酶的肽类抑制因子。洪鹏志等 (2002) 用枯草杆菌蛋白酶、胃蛋白酶水解胎肉蛋白的产物不仅营养丰富, 价值提升, 且对小鼠肿瘤有抑制作用。本研究结果表明, 棉粕蛋白酶解物对异育银鲫促生长效果非常明显, 在两个棉粕蛋白酶解物添加梯度中, 以添加量 3% 棉粕蛋白酶解物替代棉粕效果更好, 按粗蛋白质量计算, 相当于将饲料中

1.23% 棉粕蛋白质被替代成蛋白酶解产物, 这与 Anggawati等 (1990) 报道在对虾饲料中用 3% 鱼蛋白酶解产物替代鱼粉就可以达到促进鱼类生长的效果的结果很相似。Berge等 (1996) 认为适度的鱼蛋白酶解产物即 3.3% 可较好促进大西洋鲑幼鱼的生长。Cavalhoa等 (2004) 研究表明, 酶解酪蛋白可促进鲤鱼幼鱼生长, 而高含量反而对生长产生出现负面影响, 同样 Cahu等 (1999) 在对 (鲈) 幼体研究中也得到同样的结论。而在本研究中蛋白酶解物添加量只有 1.5% 和 3.0% 两个梯度, 并未出现负效应的现象, 适宜添加量筛选有待进一步研究。

Juli等 (2002) 报道蛋白酶解产物不仅促进南美白对虾生长, 还可以提高对虾内源消化酶活性和表观消化率, 并且在体外进行消化试验, 高生长组的虾类体内酶活力也同样较高, 说明蛋白酶解产物促进体内的内源酶活性, 并与虾的生长呈正相关。Zambonino-Infante等 (1997) 研究也表明, 蛋白酶解产物可促进幼鱼食糜蛋白酶活性。本研究结果表明, 异育银鲫的生长性能即生长速度与鱼类消化道酶活性、营养物质表观消化率均呈正相关, 而消化道酶活性营养物质表观消化率与肝脏胰腺中胰蛋白的基因表达量也成正比, 从而表明, 棉粕蛋白酶解产物不仅影响鱼类的生长性能, 而且影响鱼类的生理机能, 并且很可能通过提高消化酶活性等消化功能而促进鱼类生长。Adriana等 (2003) 认为, 南美白对虾消化道中蛋白酶活性受胰腺中蛋白酶基因表达量调节, 高浓度小肽反而会抑制虾类生产性能, 这一结果在 Cahu等 (1999) 研究中也得到证实。究其原因, 可能是由于饲料中高含量游离氨基酸和小分子肽存在, 减少了消化酶所作用底物的浓度, 尤其消化酶作用位点被提前水解, 所以高含量氨基酸和小肽会降低内源酶需要量, 从而反馈调节胰腺中胰蛋白酶的表达式。许多鱼类的肠道, 饵料成分的变化会改变肠道消化酶的活性, 原因可能是相关酶蛋白的分泌量受饵料成分变化的诱导而改变。

Shah (2000) 报道肽类可以提高饲料中矿物质生物效价。添加棉粕蛋白酶解产物的试验组鱼类的肌肉中总的干物质、粗蛋白、粗脂肪等均有提高, 表明肽类可促进营养物质平衡吸收。尤其是灰分含量试验组鱼类提高更为明显, 分别比对照组提高 19.57% 和 33.69%。这可能与蛋

白酶解产物中肽类作为矿物元素的运输载体有关。在本研究中,随饲养鱼类摄食蛋白酶解物的时间延长,对鱼类生长性能和生理机能促进作用表明越明显。并且有持续效应,饲养 65 天比饲养 35 天效果要更好,这无论从增重率还是胰蛋白酶基因表达量的数据均可以得到证明。

参 考 文 献

- 王梁燕,洪奇华,张耀州,2004 实时定量 PCR 技术及其应用. 细胞生物学杂志, 26(1): 61—66
- 洪鹏志,章超桦,杨文鸽等,2002 翡翠贻贝肉酶解动物蛋白营养评价及其生理活性初探. 水产学报, 26(1): 85—89
- Adriana Muhlia-Inazán, Fernando L García-Carré^o, 2003 Effects of dietary protein on the activity and mRNA level of trypsin in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 135: 373—383
- Alkoua A Chourj, Wang Zhang Xu Shiying, 1998 Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succinylation on the functional properties of resulting protein hydrolysates. Food Research International, 31(9): 617—623
- Anggawati A M, Murtini J T, Heruwati E S, 1990 The use of hydrolyzed protein concentrate in practical diets for *Penaeus monodon* juveniles. Research Institute for Fish Technology Palmerah Jakarta, 1—12
- Beige G, Storebakken T, 1996 Fish protein hydrolysate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. Aquaculture, 145: 205—212
- Bradford M, 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. Anal Biochem, 72: 248—254
- Cahu C L, Zambonino Infante J L, Quazigue I P *et al*, 1999 Protein hydrolysate vs fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture, 171: 109—119
- Carvalho A P, Sa'a R, Oliva-Teles A *et al*, 2004 Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus capio*) during early larval stages. Aquaculture, 234: 319—333
- Julio Humberto Córdova-Murueta, Fernando Luis García-Carré^o, 2002 Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. Aquaculture, 210(1—4): 371—384
- Lee Tae-Gee, Susumu Maruyama, 1998 Isolation of HIV-1 protease-inhibiting peptides from thermolysin hydrolysate of oyster proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications, 253(3): 604—608
- Robinson E H, Li M H, 1994 Use of plant proteins in catfish feeds: replacement of soybean meal with cottonseed meal and replacement of fish meal with soybean meal and cottonseed meal. JWorl Aquac Soc, 25: 271—276
- Shah N P, 2000 Effects of milk-derived bioactives: an overview. Br J Nutr, 84(S1): 3—10
- Vente-Spreuwenberg M A, Verdonk J M, Koninkx J F *et al*, 2004 Dietary protein hydrolysates vs the intact proteins do not enhance mucosal integrity and growth performance in weaned piglets. Liv Prod Sci, 85: 151—164
- Vioque J, Sánchez-Vioque R, Clemente A *et al*, 1999 Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. Journal of the American Oil Chemical Society, 76: 819—823
- Zambonino-Infante J L, Cahu C, Peres A, 1997 Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. J Nutr, 127: 608—614

EFFECT OF HYDROLYSATES OF COTTONSEED MEAL PROTEIN ON THE DIGESTIBILITY, GROWTH AND EXPRESSION LEVEL OF TRYPSINOGEN mRNA OF CARP *CARASSIUS AURATUS GIBELIO*

LU Wen-Bin, WANG Tin

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095)

Abstract To learn the effect of cottonseed meal protein hydrolysates(CMPH) in diets on the growth of carp *Carassius auratus gibelio*, intestine proteolytic activity and expression level of trypsinogen mRNA, and to study the relationship of intestine proteolytic activity and the production performance and biochemistry index of the carp, ASI. 398 neutrase was used to hydrolyze cottonseed meal protein under proper conditions and CMPH was obtained. After that, in 65 days, the carps [weight(30 ± 2) g] were fed with the diet containing 1.5% and 3.0% CMPH in a recirculation aquaculture system. At the end, indices were measured including growth index, apparent digestibility coefficient(ADC) of nutrient, proteinase activity and the expression level of trypsinogen mRNA. The result showed that the specific growth rate(SGR) of the fish in 35 days fed with 1.5% and 3.0% of CMPH were 32.5% and 56.7% higher than the control(fed with regular diet) respectively; 8.0% and 21.0% in 65 days. The expression levels of trypsinogen mRNA were also enhanced. All the data suggest that the 3.0% CMPH group showed better performance in farming and positively related to the growth, intestine proteolytic activity and the expression level, and the fish muscle quality remained unchanged. In conclusion, the hydrolysates could accelerate the growth and enhance obviously their physiological function and biological performance with high value of nutrition.

Key words Cottonseed meal protein hydrolysates; Carp *Carassius auratus gibelio*; Digestibility; Growth; Expression level of trypsinogen mRNA