

doi: 10.7541/2019.137

植酸酶对中华绒螯蟹幼蟹生长、消化性能及物质利用率的影响

杨璐¹ 韩凤禄¹ 戚常乐¹ 郭建林² 卢建挺¹ 徐畅¹ 刘爽¹
黄志鹏¹ 王晓丹¹ 陈立侨¹

(1. 华东师范大学生命科学学院, 水生动物营养与水环境健康实验室, 上海 200241; 2. 浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

摘要: 为探讨植酸酶对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)幼蟹生长、消化性能及物质利用率的影响, 设计了6种配合饲料, 以不含植酸和植酸酶的组别为对照组(C), 在含有10 g/kg植酸的饲料中, 分别加入0、500、1000、1500 U/kg的植酸酶, 分别记为P0、P500、P1000、P1500和P2000。投喂初始体重为(4.34±0.05) g的幼蟹, 56d后称重并取样分析。结果发现: P0幼蟹增重率、特定生长率、蛋白质效率低于对照组, 饲料系数则高于对照组($P<0.05$); 幼蟹增重率、特定生长率、蛋白质效率随着饲料中植酸酶含量的增加而升高, 在P2000达到最高, 且该组的饲料系数最低($P<0.05$); P1500和P2000全蟹体磷含量显著高于P0 ($P<0.05$); 在P2000中, 幼蟹肝胰腺中胰蛋白酶、淀粉酶以及肠道胰蛋白酶活力达到最高($P<0.05$); 中华绒螯蟹蛋白质消化率和磷透析率随着饲料中植酸酶含量的增加而逐渐升高, 其中P2000显著高于P0($P<0.05$), 与对照组无显著差异($P>0.05$); P2000幼蟹的氮、磷保留率最高($P<0.05$)。以上结果表明, 在含有植酸的饲料中添加2000 U/kg的植酸酶, 能够显著提高幼蟹的生长和胰蛋白酶活力, 进而提高幼蟹对蛋白质的利用率, 降低饲料系数。此外, 植酸酶的添加也能有效提高幼蟹体磷含量和氮/磷保留率。

关键词: 植酸酶; 中华绒螯蟹; 生长; 消化

中图分类号: S966.16

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2019)06-1164-08

豆粕、棉粕、菜粕等植物蛋白源价格低廉, 产量高, 将其添加到水产配合饲料中替代鱼粉已渐成研究热点和饲料开发的趋势^[1]。然而, 植物原料中存在的抗营养因子如植酸等, 会对动物体的摄食、生长和养殖环境产生不利影响。植酸, 又被称为肌醇六磷酸, 是植物蛋白原料中一种常见的热稳定性抗营养因子, 它是阳离子和高能磷酸基的储存体, 是植物种子和谷物在成熟过程中自然形成的化合物^[2]。植酸在豆粕、菜粕中含量达到1%—5%^[3, 4], 当在饲料中添加高比例植物蛋白源时, 其负面影响就会显露出来^[5]。对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[6]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[7]、大西洋鲑(*Salmo salar* L.)^[8]等动物的研究证实, 饲料中的植酸会降低消化酶活性, 降低生长性能; 此外, 一些水产动物如鱼类及甲壳类等, 其消化道不

能分泌植酸酶^[9], 故对于含有植酸的饲料不能进行有效的分解^[10], 大部分植酸最终排入水体, 除造成矿物质元素的浪费, 甚至还将污染养殖环境。已有研究表明, 植酸的抗营养作用是植物性原料替代鱼粉有待解决的问题之一^[11]。植酸酶, 一种广泛存在于自然界中的细胞外酶^[12], 作为一种磷酸酶它能够专一性的对植酸进行逐级分解, 可消除植酸的负面作用^[13]。在斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[14]的研究中发现, 外源补充植酸酶分解了植酸蛋白化合物, 改善虾体的生长性能、提高对蛋白质的消化利用率。同样的, 在真鲷(*Pagrus major*)^[15]饲料中添加2000 U/kg的植酸酶能够显著降低磷排泄, 经济效益和生态效益显著。植酸酶对植酸的改善作用是近年来水产动物营养的一个研究热点。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*), 俗称河蟹, 是

收稿日期: 2018-11-07; **修订日期:** 2019-05-13

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0900400); 国家虾蟹产业技术体系(CARS-48); 国家自然科学基金项目(31572629); 上海市中华绒螯蟹产业技术体系建设(201804)资助 [Supported by the National Key R & D Program of China (2018YFD0900400); China Agriculture Research System-48 (CARS-48); the National Natural Science Foundation of China (31572629); Agriculture Research System of Shanghai, China (201804)]

作者简介: 杨璐(1994—), 女, 贵州安顺人; 硕士研究生; 研究方向为水生动物营养学。E-mail: 745790332@qq.com

通信作者: 陈立侨(1962—), 教授; E-mail: lqchen@bio.ecnu.edu.cn

我国淡水蟹养殖中产量最高的经济物种。随着中华绒螯蟹配合饲料开发和应用比例的提高, 饲料中植物蛋白原料占比也越来越重^[16], 有效提高植物原料的替代比例, 提高饲料效率, 能够给中华绒螯蟹养殖带来很多更多的经济效益。植酸酶作为一种饲料添加剂所开展的营养研究已成为热点, 但目前有关植酸酶在中华绒螯蟹饲料中的研究还未见报道。本研究参考Nicolasa等^[3], 在饲料中添加10 g/kg植酸钠, 并通过在饲料中添加不同浓度的植酸酶, 探讨其对幼蟹作用特点, 观察其在幼蟹的生长、消化性能及营养物质利用方面产生的影响, 从而确定植酸酶的适宜添加量, 结果为今后中华绒螯蟹饲料配方的制定提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 饲料制作

本实验依据中华绒螯蟹营养需求, 以鱼粉、酪蛋白和明胶为主要蛋白源, 鱼油和豆油为脂肪源, 不含植酸和植酸酶的组别作为对照组(C), 处理组在含有10 g/kg植酸的基础上, 添加0、500、1000、1500和2000 U/kg的植酸酶, 分别命名为P0、P500、P1000、P1500和P2000。实验饲料配方组成和化学分析见表1。在所有饲料原料混匀后, 使用F-26双螺杆挤条机(华东理工大学科技实业总厂, 中国)加工成直径为1 mm的条状饲料, 期间监测螺杆最高温度不高于55℃, 保证温度不会影响植酸酶活力。在室温下风干后, 同样利用挤条机将饲料破碎, 使用10目、16目及26目筛子, 将饲料分成不同规格的颗粒, 用自封袋分装好, 每组做好标签并储存于-20℃冰箱保存备用。

1.2 实验动物与饲养管理

养殖试验在浙江省淡水水产研究所八里店综合试验基地进行。幼蟹购自上海崇明岛, 暂养结束后, 将720只附肢完整、健康的幼蟹(4.34±0.05) g随机分入24个水族桶, 水族桶直径1 m, 水深45 cm。共6组, 每组设置4个重复, 每桶30只幼蟹。每个桶中放入6片瓦片及6个由无毒无味的塑料管捆成的躲避物, 供幼蟹藏匿, 以避免相互残杀。每天在6:30、16:30和21:30饱食投喂, 根据幼蟹的摄食情况及时调整投喂量, 确保残饵较少。投喂2h后吸出残饵并烘干、称重、记录, 并根据蟹体大小适当调整投喂饲料的颗粒规格。在实验过程中每天换水量占总水体1/3, 水温维持在(24±2)℃, 溶解氧>7.0 mg/L, 总氨氮<0.2 mg/L。养殖过程中若发现死蟹, 及时捞出并记录日期、重量。养殖试验为期8周。

1.3 样品处理

在8周养殖结束后, 饥饿处理24h后取样。每桶取5只幼蟹用于体组成生化分析, 其余的置于冰上麻醉, 采集肝胰腺、肠道冻存于-80℃冰箱待检。

1.4 消化率实验

消化率试验采用体外消化, 具体参照Huang等^[17]和Liu等^[18]的方法。将幼蟹置于冰上, 取其胃、肝胰腺和肠道, 清除肠道内容物后称量总消化道重量。加入10倍体积预冷生理盐水(4℃, 0.9%), 用电动匀浆机在冰浴条件下匀浆。4℃, 5000 r/min离心10min, 丢弃上层脂质取上清液作为粗酶液, -80℃冻存, 备用。每个处理设置3个平行。将1 g饲料与2.5 mL粗酶液加入透析袋中扎好, 放入100 mL带塞锥形瓶中, 再加入47.5 mL醋酸-醋酸钠缓冲液, 置于37℃的恒温水浴振荡器中, 以50 r/min进行离体酶解消化8h。每个样品3个平行, 每个处理重复2次。

1.5 生化分析

取适宜大小的肝胰腺、肠道组织块, 按1:9 (m:v)的比例加入预冷的生理盐水, 制成10%匀浆液, 2500 r/min离心10min, 取上清液待测。胰蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶及总蛋白含量试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 按具体说明进行检测。其中, 胰蛋白酶: N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE)测定法。一个活力单位定义为在pH 8.0, 37℃条件下, 每毫克蛋白中含有的胰蛋白酶每分钟使吸光度变化0.003; 淀粉酶: 淀粉-碘显色法。一个活力单位定义为每毫克蛋白在37℃与底物作用30min, 水解10 mg淀粉。脂肪酶: 化学比浊法。酶活力定义: 在37℃条件下, 每毫克蛋白在反应体系中与底物反应1min, 每消耗1 μmol底物为一个酶活力单位。总蛋白含量: 考马斯亮兰法, 单位为mg/mL。

全蟹的常规体组生化成分的分析参考 AOAC (1995)的标准方法。水分测定采用 105℃烘干至恒重法, 粗蛋白含量测定采用凯氏定氮法(FOSS, Kjelttec2200, Denmark), 粗脂肪测定采用氯仿甲醇法(CM法), 灰分测定采用马弗炉550℃灼烧恒重称量法, 总磷采用钼黄分光光度法, 植酸磷含量测定采用三氯乙酸法(TCA法)。

1.6 生长、消化性能测定

各指标计算公式如下:

$$\text{存活率(Survival rate, \%)} = 100\% \times (N_0 - N_t) / N_0$$

$$\text{增重率(Weight gain rate, \%)} = 100\% \times (W_t - W_0) / W_0$$

$$\text{特定生长率(Specific growth rate, \% / d)} = 100\% \times (\ln W_t - \ln W_0) / d$$

$$\text{饲料系数(Feed conversion ratio)} = IF / W$$

$$\text{蛋白质效率(Protein efficiency, \%)} = W / IN$$

摄食量(Feed intake, g/crab)= IF/N_0

营养物质保留率(Retention, %)= $100\% \times [(W_f \times N_f) - (W_0 \times N_i)] / (IF \times N_d)$

总消化率(%)= $(m - m_1) / m \times 100\%$

蛋白质消化率(%)= $(m \times N_d - m_1 \times L_p) / (m \times N_d) \times 100\%$

饲料中磷/钙的透析率(%)= $[m_2 / (m \times N_d)] \times 100\%$

其中 N_0 和 N_i 分别为实验开始和结束时蟹的个数; W_0 和 W_f 分别为幼蟹初始和终末重量(g); W 为蟹

体总增重(g); IF 为试验期间总摄食饲料干重(g);

IN 为试验期间总摄食饲料蛋白质质量(g); d 为试验天数; N_i/N_f 为蟹体初始/最终某营养成分含量(%); N_d 为饲料某营养成分含量(%); m 为饲料样品质量(mg); m_1 为滤渣质量(mg); L_p 为滤渣粗蛋白含量(%); m_2 为透析液中可透析磷/钙质量(mg)。

1.7 数据分析

实验数据均以平均值±标准误(Mean±SE)表示,

表 1 饲料配方及成分分析(风干基础, %)

Tab. 1 Diet formulation and analyzed chemical composition (air dry basis, %)

原料Ingredient	组别Group					
	C	P0	P500	P1000	P1500	P2000
鱼粉Fish meal	20	20	20	20	20	20
明胶Gelatin	6	6	6	6	6	6
酪蛋白Casein	24	24	24	24	24	24
玉米淀粉Corn starch	24	24	24	24	24	24
鱼油Fish oil	2	2	2	2	2	2
豆油Soybean oil	2	2	2	2	2	2
大豆卵磷脂Soy Lecithin	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
胆固醇Cholesterin	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
复合维生素Vitamin premix ¹	2	2	2	2	2	2
复合矿物质Mineral premix ²	3	3	3	3	3	3
粘合剂Binder	2	2	2	2	2	2
氯化胆碱Choline chloride	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
纤维素Cellulose	10.4	9.38	9.37	9.36	9.35	9.34
甜菜碱Betaine	3	3	3	3	3	3
植酸钠Sodium phytate ³ (98%)	0	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02
植酸酶Phytase ³	0	0	0.01	0.02	0.03	0.04
氧化钇Inert marker, Y ₂ O ₃	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
合计Total	100	100	100	100	100	100
营养水平Nutrient levels						
水分Moisture	9.23	10.05	10.34	10.53	10.38	10.62
粗蛋白Crude protein	39.55	39.24	39.94	39.59	41.17	38.74
粗脂肪Crude fat	5.46	5.37	5.25	5.62	5.17	5.41
总磷Total phosphorus	1.02	1.18	1.17	1.17	1.19	1.19
植酸磷Phytate phosphorus	0	0.19	0.14	0.16	0.14	0.13
有效磷Available phosphorus	1.02	0.99	1.03	1.01	1.05	1.06
钙Calcium	0.57	0.53	0.53	0.59	0.53	0.60

注: 1. 维生素混合物(每100 g): VA, 0.043 g; VB₁, 0.15 g; VB₂, 0.0625 g; 泛酸钙, 0.3 g; 烟酰胺, 0.3 g; VB₆, 0.225 g; VC, 0.5 g; 生物素, 0.005 g; 叶酸, 0.025 g; VD₃, 0.0075 g; VE, 0.5 g; VK₃, 0.05 g; 肌醇, 1 g。所有的组分由纤维素填充到100 g; 2. 矿物质混合物(每100克): KH₂PO₄, 21.5 g; NaH₂PO₄, 10 g; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 26.5 g; CaCO₃, 10.5 g; KCl, 2.8 g; MgSO₄·7H₂O, 10 g; AlCl₃·6H₂O, 0.024 g; ZnSO₄·7H₂O, 0.476 g; MnSO₄·6H₂O, 0.143 g; KI, 0.023 g; CuCl₂·2H₂O, 0.015 g; CoCl₂·6H₂O, 0.14 g; 乳酸钙, 16.5 g; 柠檬酸铁, 1 g; 所有的组分均用纤维素填充至100 g; 3. 植酸钠、植酸酶: 购于上海源叶生物有限公司。植酸酶: 酸性植酸酶, 5 U/mg; 最适pH: 4.8—5.2; 最适温度: 55—60℃

Note: 1. Vitamin mixture (per 100 g premix): vitamin A, 0.043 g; vitamin B₁, 0.15 g; vitamin B₂, 0.0625 g; calcium pantothenate, 0.3 g; nicotinamide, 0.3 g; vitamin B₆, 0.225 g; vitamin C, 0.5 g; Biotin, 0.005 g; folic acid, 0.025 g; vitamin D₃, 0.0075 g; vitamin E, 0.5 g; vitamin K₃, 0.05 g; inositol, 1 g. All ingredients are diluted with α-cellulose to 100 g; 2. Mineral mixture (per 100 g premix): KH₂PO₄, 21.5 g; NaH₂PO₄, 10 g; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 26.5 g; CaCO₃, 10.5 g; KCl, 2.8 g; MgSO₄·7H₂O, 10 g; AlCl₃·6H₂O, 0.024 g; ZnSO₄·7H₂O, 0.476 g; MnSO₄·6H₂O, 0.143 g; KI, 0.023 g; CuCl₂·2H₂O, 0.015 g; CoCl₂·6H₂O, 0.14 g; Ca(CH₃CHOHHOOC)₂·5H₂O, 16.5 g; FeC₆H₅O·nH₂O, 1 g. All ingredients are diluted with α-cellulose to 100 g; 3. Sodium phytate, phytase: purchased from Shanghai Yuanye Biological Co., Ltd. Phytase: Acid phytase, 5 U/mg. Optimal pH: 4.8—5.2; Optimum temperature: 55—60℃

先用SPSS19.0进行单因素方差(One-way ANOVA)分析,若存在显著差异($P<0.05$),则采用Duncan法进行多重比较。

2 结果

2.1 植酸酶对中华绒螯蟹幼蟹生长和饲料利用的影响

如表 2 所示,幼蟹的初始体重无显著性差异($P>0.05$)。随着饲料中植酸酶含量的增加,幼蟹终末体重、增重率、特定生长率逐渐升高, P2000 显著高于 P0 ($P<0.05$), 对照组与各处理组无显著差异 ($P>0.05$); 各处理组蛋白质效率都高于 P0, P2000 及对照组显著高于 P0 ($P<0.05$); 饲料系数方面则是 P0 显著高于 P2000 ($P<0.05$), 其余组之间无显著差异 ($P>0.05$); 各实验组之间的存活率、摄食量等无显著差异 ($P>0.05$)。

2.2 植酸酶对中华绒螯蟹体成分的影响

如表 3 所示,随着植酸酶含量增加,全蟹体磷含量逐渐升高,其中 P1500 及 P2000 显著高于 P0 ($P<0.05$),其余各处理组之间没有出现显著性的差别 ($P>0.05$); 各实验组在水分、粗蛋白、粗脂肪、粗灰分及钙含量方面无显著性差异 ($P>0.05$)。

2.3 植酸酶对中华绒螯蟹消化道消化酶的影响

在肝胰腺中, P0 胰蛋白酶活力与 P500 差异不显著 ($P>0.05$), 但显著低于其他各组 ($P<0.05$); 淀粉酶

活力则是 P2000 显著高于其他各组 ($P<0.05$); 脂肪酶活力各实验之间差异性不显著 ($P>0.05$)。在肠道中, P2000 胰蛋白酶活力与对照组差异不显著, 但显著高于其他各组 ($P<0.05$); 脂肪酶和淀粉酶活力各实验组之间差异性不显著 ($P>0.05$, 表 4)。

2.4 植酸酶对中华绒螯蟹幼蟹体外消化率的影响

各实验组在干物质消化率及钙透析率方面差异性不显著 ($P>0.05$); 蛋白质消化率随植酸酶含量的升高而逐渐升高, P2000 显著高于 P0 ($P<0.05$), 但与对照组没有显著性差异 ($P>0.05$); 磷透析率有同样的升高趋势, 在 P1000、P1500 及 P2000 显著性地高于 P0 ($P<0.05$), P2000 显著性高于对照组 ($P<0.05$, 表 5)。

2.5 氮磷保留率

结果显示, 各实验组幼蟹对氮、磷摄入量差异不显著 ($P>0.05$); 与 P0 相比, 添加植酸酶提高了幼蟹氮、磷保留率。P2000 氮保留率显著高于各处理组 ($P<0.05$); P2000 磷保留率显著高于 P0 组 ($P<0.05$), 与其余组没有显著的差异 ($P>0.05$, 表 6)。

3 讨论

已有研究表明, 植物蛋白源能否有效替代优质的鱼粉, 前提是要先消除其抗营养因子的不利影响。然而, 热稳定性抗营养因子采用常规方法往往难以去除, 例如植酸等。已有研究证实, 由于其特

表 2 植酸酶对中华绒螯蟹幼蟹生长性能的影响

Tab. 2 Effects of phytase on the growth performance of the juvenile crab *Eriocheir sinensis*

组别Group	初始体重Initial body weight (g)	终末体重Final body weight (g)	存活率 SR (%)	增重率 WGR (%)	特定生长率 SGR (%/d)	摄食量FI (g/crab)	饲料系数 FCR	蛋白质效率 PER (%)
C	4.32±0.03	6.74±0.29 ^{ab}	85.83±4.98	57.55±7.28 ^{ab}	0.78±0.08 ^{abc}	4.50±0.01	1.95±0.32 ^{ab}	140.55±3.13 ^{cd}
P0	4.32±0.03	6.3±0.1 ^a	83.33±5.44	47.21±2.81 ^a	0.67±0.03 ^a	4.46±0.02	2.22±0.15 ^b	104.40±6.31 ^a
P500	4.34±0.02	6.71±0.08 ^{ab}	81.67±3.47	54.66±2.32 ^a	0.75±0.03 ^{ab}	4.41±0.02	1.86±0.08 ^{ab}	127.49±4.94 ^{bc}
P1000	4.35±0.03	6.8±0.05 ^{ab}	84.17±2.85	55.02±1.24 ^a	0.76±0.01 ^{ab}	4.41±0.04	1.83±0.05 ^{ab}	123.65±3.34 ^b
P1500	4.35±0.01	6.8±0.1 ^{ab}	86.67±3.60	56.45±2.07 ^{ab}	0.77±0.02 ^{abc}	4.44±0.04	1.83±0.08 ^{ab}	119.65±5.28 ^b
P2000	4.34±0.04	7.31±0.09 ^b	79.17±4.79	66.83±2.25 ^b	0.88±0.02 ^c	4.47±0.02	1.53±0.05 ^a	147.09±4.08 ^d

注: 同列无字母数据表示差异不显著 ($P>0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$); 下表同

Note: Values without superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), values with same superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), values with different superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same applies below

表 3 植酸酶对中华绒螯蟹幼蟹全蟹体成分的影响

Tab. 3 Effects of phytase on the composition of whole crabs of the juvenile crab *Eriocheir sinensis* (%)

组别Group	水分Moisture	粗蛋白Crude protein	粗脂肪Crude lipid	粗灰分Crude ash	磷Phosphorus	钙Calcium
C	61.68±0.30	13.39±0.24	2.82±0.33	15.34±0.14	0.68±0.02 ^{ab}	2.36±0.06
P0	61.67±0.52	13.38±0.29	3.21±0.54	15.32±0.36	0.58±0.05 ^a	2.31±0.07
P500	62.03±0.64	13.40±0.15	2.90±0.25	15.20±0.06	0.65±0.02 ^{ab}	2.29±0.03
P1000	63.10±0.12	13.55±0.03	2.86±0.20	14.63±0.48	0.64±0.05 ^{ab}	2.36±0.03
P1500	62.08±0.96	13.59±0.25	3.24±0.23	14.73±0.15	0.73±0.06 ^b	2.26±0.02
P2000	62.04±0.23	13.62±0.15	3.09±0.18	15.13±0.26	0.75±0.04 ^b	2.29±0.06

表 4 植酸酶对中华绒螯蟹幼蟹消化酶活力的影响

Tab. 4 Effects of phytase on digestive enzymes of the juvenile crab *Eriocheir sinensis* (U/g prot)

组别Group	胰蛋白酶Trypsase		脂肪酶Lipase		淀粉酶Amylase	
	肝胰腺	肠道	肝胰腺	肠道	肝胰腺	肠道
C	650.45±92.50 ^c	3.54±0.31 ^{ab}	2.48±0.91	0.61±0.09	0.93±0.05 ^a	0.22±0.02
P0	192.71±45.64 ^a	2.09±0.37 ^a	2.38±0.26	0.57±0.07	0.92±0.07 ^a	0.22±0.02
P500	318.20±33.72 ^{ab}	2.77±0.36 ^a	3.22±0.39	0.51±0.06	0.91±0.05 ^a	0.22±0.02
P1000	488.98±74.23 ^{bc}	2.35±0.33 ^a	2.93±1.08	0.52±0.07	0.96±0.04 ^a	0.23±0.01
P1500	582.35±116.74 ^{bc}	2.48±0.78 ^a	3.49±0.94	0.38±0.05	1.08±0.07 ^a	0.18±0.01
P2000	652.84±128.54 ^c	3.95±0.88 ^b	3.50±1.11	0.49±0.06	1.26±0.07 ^b	0.24±0.03

表 5 植酸酶对中华绒螯蟹幼蟹体外消化率的影响 (%)

Tab. 5 Effects of phytase on the *in vitro* digestibility of the juvenile crab *Eriocheir sinensis* (%)

组别 Group	干物质消化率 Dry matter digestibility	蛋白质消化率 Protein digestibility	磷透析率 Phosphorus dialysis rate	钙透析率 Calcium dialysis rate
C	62.32±1.52	74.20±2.64 ^{ab}	34.22±1.32 ^{ab}	32.74±0.78
P0	60.36±0.72	67.19±1.83 ^a	30.97±2.53 ^a	30.50±0.74
P500	59.91±0.03	69.28±1.66 ^{ab}	33.45±2.48 ^{ab}	30.22±0.80
P1000	64.89±1.23	70.06±1.16 ^{ab}	36.67±0.54 ^{bc}	32.20±1.61
P1500	60.54±0.86	69.72±1.42 ^{ab}	37.30±1.21 ^{bc}	32.28±1.19
P2000	64.41±1.75	74.16±1.45 ^b	39.60±1.18 ^c	32.79±1.12

表 6 植酸酶对中华绒螯蟹幼蟹氮磷保留的影响

Tab. 6 Effects of phytase on nitrogen and phosphorus retention of the juvenile crab *Eriocheir sinensis*

组别 Group	氮摄入N intake (g)	氮保留N retention (%)	磷摄入P intake (g)	磷保留P retention (%)
C	9.41±0.02	21.29±0.83 ^b	1.53±0.02	33.34±2.06 ^{ab}
P0	9.33±0.05	18.47±0.96 ^a	1.49±0.01	20.89±4.87 ^a
P500	9.32±0.35	21.87±0.53 ^b	1.53±0.03	27.58±2.87 ^{ab}
P1000	9.41±0.10	21.70±0.09 ^b	1.49±0.03	29.13±6.90 ^{ab}
P1500	9.47±0.29	21.28±0.86 ^b	1.50±0.01	34.16±1.79 ^{ab}
P2000	9.30±0.06	25.78±0.55 ^c	1.48±0.01	41.29±3.26 ^b

有的螯合性质,配合饲料中的植酸会降低动物体对饲料的消化利用率和物质保留率,从而抑制机体的生长速度^[19]。饲料中植酸含量超过13 g/kg时,日本牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼的摄食量和增重率都会显著降低^[20]。本实验发现10 g/kg植酸对中华绒螯蟹生长有抑制作用,并会降低蛋白质效率,导致饲料系数升高,植酸对幼蟹的负面效应突显。而这种阻抑作用可随着植酸酶添加而得到缓解,表现为幼蟹的生长性能逐渐得到改善和提高,当植酸酶含量添加到2000 U/kg时,中华绒螯蟹的增重率、特定生长率都有显著的提高。与本研究相似,当凡纳滨对虾摄食2000 FTU/kg植酸酶预处理的大豆粉时,增重率可达到不添加植酸酶的1.39倍^[21],表明元饲料中添加适量植酸酶有利于提高虾、蟹类甲壳

动物的生长性能。究其原因,植酸酶能够有效地作用于植酸,使植酸逐步去磷酸化生成一系列低肌醇磷酸酯,并最终产生自由肌醇与无机磷的过程^[22],由此消除植酸对矿质磷及其他营养物质的螯合作用,这无疑有利于甲壳动物对钙、磷等矿物元素的吸收利用。实验同时发现,在添加合理剂量的植酸酶后,中华绒螯蟹的饲料系数显著降低,同时蛋白质效率显著提高。在大西洋鲑^[23]的实验中也发现同样结果,加入植酸酶后饲料系数从0.84降低至0.75。饲料系数、蛋白质效率是衡量水产动物对饲料利用效率的重要依据^[24],由此可见,添加植酸酶提高了饲料的利用率,促进了机体的物质积累,有效改善了生长性能。

中华绒螯蟹是一种杂食偏肉食性动物,在其分泌的消化酶中,胰蛋白酶完成大部分蛋白质的水解作用,起到主要的消化功能,淀粉酶、脂肪酶活性略低^[25]。饲料中的植酸会显著降低中华绒螯蟹胰蛋白酶活性,因为植酸对金属离子有强烈的螯合特性,植酸会与酶蛋白争夺辅因子而致使消化酶活力下降。同时,饲料中的蛋白质也会被作为植酸的优选结合底物^[26],被植酸络合后无法完全有效供给动物体吸收利用^[19],这样就会降低中华绒螯蟹对蛋白质的利用。实验发现当植酸酶添加量达到2000 U/kg时,中华绒螯蟹肝胰腺胰蛋白酶活力明显升高,且达到与对照组相当的水平,表明该植酸酶剂量能有效缓解了植酸对消化酶的抑制,提高机体对蛋白质的消化利用率。此外,肝胰腺中淀粉酶活力的提高可能与植酸酶释放的金属离子Ca²⁺有关^[19],相关的具体过程和内在机制尚有待进一步研究。

甲壳动物的生长伴随着蜕壳而实现,这一过程中将会伴随一些矿物质元素的损失,所以饲料中钙磷含量,以及两者之间的比例对于维持体壁结构起重要作用^[27]。为了保证蜕壳的顺利完成,甲壳动物会在蜕壳期储存磷,这些磷主要来源于肝胰腺和血淋巴,饲料中磷的缺乏会造成蜕壳延缓或蜕壳不遂,最终导致生长受阻,甚至死亡^[28]。本实验所用矿物

质配方参考Ma等^[29]和Cui等^[30], 且符合陈立侨等^[31]对中华绒螯蟹饲料中钙磷比的研究: 当饵料中含钙量为0.5%、Ca/P比为1:1.9时, 幼蟹获得最大生长率和较高蛋白质利用率, 满足中华绒螯蟹对矿物质磷的基本需求。有学者报道, 当罗氏沼虾饲料中植酸含量超过21.45 g/kg时, 虾体总磷含量显著的降低^[6]。但当南美白对虾(*Litopenaeu vannamei*)饲料中添加2000 U/kg植酸酶时, 磷的消化率由37%有效提高至47%^[32]。植酸酶还能有效降低动物体磷的排泄量, 显示出效用价值^[33]。饲料中的植酸会螯合矿物质磷, 而甲壳动物这类单胃动物基本无法消化植酸磷。在本研究中, 饲料中植酸酶分解植酸, 提高有效磷含量, 进而也提高了中华绒螯蟹对磷的消化利用。磷保留率由20.89%显著上升到41.29%, 有效降低了元素的损失率。

有研究指出, 植物蛋白源替代鱼粉可能会损失更多的氮元素, 当水生动物摄食氨基酸不平衡的饲料, 会分解不能利用的氨基酸, 导致 $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 的过多排泄^[34]。水体中氨氮大部分来源于动物体自身排泄, 若氨氮含量过高, 非离子氨会通过鳃渗入血液, 对动物体产生毒害作用, 致使代谢异常, 甚至死亡^[35]。本实验结果表明, 由于植酸螯合物的不可消化性, 中华绒螯蟹在摄入氮元素相同的情况下, 植酸添加组中华绒螯蟹的氮保留率较低。而在添加植酸酶后, 饲料中氮物质的利用得以提高, 蟹体氮保留率由18.47%显著上升至25.78%。提示植酸酶能够有效消除植酸对氮营养物质的结合作用, 促使植酸释放出一些氨基酸、以及大分子蛋白质物质, 供给动物体有效消化吸收和利用, 从而降低饲料氮的排泄, 这对于养殖水环境的保护也是有益的^[10]。

4 总结

与不添加植酸酶处理组相比, 随着饲料中植酸酶的添加, 中华绒螯蟹肝胰腺中胰蛋白酶、对磷与蛋白质的消化利用率逐渐提高。饲料中添加2000 U/kg植酸酶能显著提高幼蟹的增重率, 提高机体的磷含量、氮/磷保留率和饲料效率。

参考文献:

[1] Cui Y Y, Zhang N N, Ma Q Q, *et al.* Effects of four plant proteins on growth performance, amino acid deposition rate and antioxidant enzyme activity of young crabs from *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Aquatic Biology*, 2017, **41**(1): 146—154 [崔燕燕, 张南南, 马倩倩, 等. 四种植物蛋白对中华绒螯蟹幼蟹生长性能、氨基酸沉积率和抗

氧化酶活性的影响. *水生生物学报*, 2017, **41**(1): 146—154]

[2] Kumar V, Sinha A K, Makkar H P, *et al.* Phytate and phytase in fish nutrition [J]. *Journal of Animal Physiology & Animal Nutrition*, 2012, **96**(3): 335

[3] Nicolasa D, Lawrence J. Fate of phytic acid in producing soy protein ingredients [J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2007, **84**(4): 369—376

[4] Uppström B, Svensson R. Determination of phytic acid in rapeseed meal [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2010, **31**(7): 651—656

[5] He J J, Wang P, Feng J, *et al.* Effects of replacing fish meal with corn gluten meal on the growth, serum biochemical indices and liver histology of large yellow croaker *Larimichthys crocea* [J]. *Journal of Aquatic Biology*, 2017, **41**(3): 506—515 [何娇娇, 王萍, 冯建, 等. 玉米蛋白粉替代鱼粉对大黄鱼生长、血清生化指标及肝脏组织学的影响. *水生生物学报*, 2017, **41**(3): 506—515]

[6] Rasid R, Brown J H, Pratoomyot J, *et al.* Growth performance, nutrient utilisation and body composition of *Macrobrachium rosenbergii* fed graded levels of phytic acid [J]. *Aquaculture*, 2017, **479**(1): 850—856

[7] Liu L, Liang X F, Li J, *et al.* Feed intake, feed utilization and feeding-related gene expression response to dietary phytic acid for juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Aquaculture*, 2014, **424**(2): 201—206

[8] Heiland S, Denstadli V, Witten P E, *et al.* Hyper dense vertebrae and mineral content in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with graded levels of phytic acid [J]. *Aquaculture*, 2006, **261**(2): 603—614

[9] Jackson L S, Li M H, Robinson E H. Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets to improve utilization of phytate phosphorus [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, **27**(3): 309—313

[10] Overturf K, Raboy V, Cheng Z J, *et al.* Mineral availability from barley low phytic acid grains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2015, **9**(4): 239—246

[11] Medaka A. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds [J]. *Aquaculture Research*, 2010, **38**(6): 551—579

[12] Olukosi O A. Biochemistry of phytate and phytases: applications in monogastric nutrition [J]. *Biokemistri*, 2012, **24**(2): 58—63

[13] Lemos D, Tacon A G J. Use of phytases in fish and shrimp feeds: a review [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2017, **9**(3): 266—282

[14] Rachmawati D, Samidjan I. Effect of phytase enzyme on

- growth boost in the artificial feed made of plant protein to shorten production time of giant tiger prawn [*Penaeus Monodon*, (Fabricus 1798)] [J]. *Aquatic Procedia*, 2016, 7(1): 46—53
- [15] Biswas A K, Kaku H, Ji S C, *et al.* Use of soybean meal and phytase for partial replacement of fish meal in the diet of red sea bream, *Pagrus major* [J]. *Aquaculture*, 2007, 267(1): 284—291
- [16] Czerniejewski P, Rybczyk A, Wawrzyniak W. Diet of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards, 1853, and potential effects of the crab on the aquatic community in the River Odra/Oder estuary (N. - W. Poland) [J]. *Crustaceana*, 2010, 83(2): 195—205
- [17] Huang Y J, Zhang N N, Fan W J, *et al.* Soybean and cottonseed meals are good candidates for fishmeal replacement in the diet of juvenile *Macrobrachium nipponense* [J]. *Aquaculture International*, 2018, 26(1): 309—324
- [18] Liu J, Ledoux D R, Veum T L. In vitro procedure for predicting the enzymatic dephosphorylation of phytate in corn-soybean meal diets for growing swine [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1997, 45(7): 2612—2617
- [19] Urbano G, Lópezjurado M, Aranda P, *et al.* The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function [J]. *Journal of Physiology & Biochemistry*, 2000, 56(3): 283—294
- [20] Asda L, Rexf T, Moe T, *et al.* Influence of dietary phytic acid on growth, feed intake, and nutrient utilization in juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, 41(5): 746—755
- [21] Cheng W, Chiu C S, Guu Y K, *et al.* Expression of recombinant phytase of *Bacillus subtilis* E20 in *Escherichia coli* HMS 174 and improving the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, juveniles by using phytase-pretreated soybean meal-containing diet [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2013, 19(2): 117—127
- [22] Baruah K, Sahu N P, Pal A K, *et al.* Dietary phytase: an ideal approach for a cost effective and low-polluting aquafeed [J]. *Naga, Worldfish Center Quarterly*, 2004, 27(3): 15—19
- [23] Storebakken T, Shearer K D, Roem A J. Availability of protein, phosphorus and other elements in fish meal, soy-protein concentrate and phytase-treated soy-protein-concentrate-based diets to Atlantic salmon, *Salmo salar* [J]. *Aquaculture*, 1998, 161(1): 365—379
- [24] Árnason T, Björnsson B, Steinarrsson A, *et al.* Effects of temperature and body weight on growth rate and feed conversion ratio in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Aquaculture*, 2009, 295(3): 218—225
- [25] Liu L H, Chen L Q, Zhou Y K, *et al.* Study on digestive enzymes of crustaceans [J]. *Feed Industry*, 2006, 27(18): 56—62 [刘立鹤, 陈立侨, 周永奎, 等. 甲壳动物消化酶的研究. *饲料工业*, 2006, 27(18): 56—62]
- [26] Cowieson A J, Acamovic T, Bedford M R. Phytic acid and phytase: implications for protein utilization by poultry [J]. *Poult Science*, 2006, 85(5): 878—885
- [27] Ambasankar K, Ahamad A S. Effect of dietary phosphorus on growth and phosphorus excretion in Indian white shrimp [J]. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 2002, 17(2): 119—126
- [28] Chen Y T, Yang X, Ye J Y, *et al.* The requirement of phosphorus in feed for young crabs of *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Huzhou Teachers College*, 2014, 36(8): 25—29 [陈宇腾, 杨霞, 叶金云, 等. 中华绒螯蟹幼蟹对饲料中磷的需要量. *湖州师范学院学报*, 2014, 36(8): 25—29]
- [29] Ma Q Q, Chen Q, Shen Z H, *et al.* The metabolomics responses of Chinese mitten-hand crab (*Eriocheir sinensis*) to different dietary oils [J]. *Aquaculture*, 2017, 479(1): 188—199
- [30] Cui Y, Ma Q, Limbu S M, *et al.* Effects of dietary protein to energy ratios on growth, body composition and digestive enzyme activities in Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(5): 2243—2252
- [31] Chen L Q, Du N S, Lai W. Effects of calcium and phosphorus contents in water and compound feed on the growth of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Freshwater Fisheries*, 1994, 24(1): 13—15 [陈立侨, 堵南山, 赖伟. 水体和配合饲料中钙、磷含量对河蟹生长的影响. *淡水渔业*, 1994, 24(1): 13—15]
- [32] Qiu X, Davis D A. Effects of dietary phytase supplementation on growth performance and apparent digestibility coefficients of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2017, 23(5): 942—951
- [33] Kornegay E T. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity [J]. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, 2001, 10(1): 237—271
- [34] Tantikitti C, Sangpong W, Chiavareesajja S. Effects of defatted soybean protein levels on growth performance and nitrogen and phosphorus excretion in Asian seabass (*Lates calcarifer*) [J]. *Aquaculture*, 2005, 248(1): 41—50
- [35] Miron D D S, Moraes B, Becker A G, *et al.* Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) [J]. *Aquaculture*, 2008, 277(3): 1—196

EFFECTS OF PHYTASE ON GROWTH, DIGESTION AND NUTRIENT UTILIZATION OF JUVENILE CHINESE MITTEN CRABS (*ERIOCHEIR SINENSIS*)

YANG Lu¹, HAN Feng-Lu¹, QI Chang-Le¹, GUO Jian-Lin², LU Jian-Ting¹, XU Chang¹, LIU Shuang¹, HUANG Zhi-Peng¹, WANG Xiao-Dan¹ and CHEN Li-Qiao¹

(1. Laboratory of Aquaculture Nutrition and Environment Health, School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China; 2. Zhejiang Freshwater Aquatic Research Institute, Huzhou 313001, China)

Abstract: To investigate the effects of phytase on the growth, digestibility and nutrient utilization of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*, six diets were designed that included the control group with no phytic acid (C) and phytase and five experimental groups with 10 g/kg of phytic acid and 0, 500, 1000, 1500 or 2000 U/kg phytase that were named as P0, P500, P1000, P1500 and P2000, respectively. Juvenile crabs with an initial body weight of (4.33 ± 0.05) g were fed with these diets for 56 days. The results showed that the weight gain rate, specific growth rate and protein efficiency of the juvenile crabs in P0 group were lower than those of the C group, and the feed coefficient was higher than that of the C group ($P < 0.05$). The weight gain rate, specific growth rate and protein efficiency of juvenile crab increased with the increased phytase with the highest one in P2000 that had the lowest feed coefficient ($P < 0.05$). Phosphorus content of whole crabs of P1500 and P2000 was significantly higher than that of P0 ($P < 0.05$). P2000 had the highest trypsin activity, amylase activity in the hepatopancreas and trypsin activity in the intestine of juvenile crabs ($P < 0.05$). The protein digestibility and phosphorus dialysis rate of *Eriocheir sinensis* increased gradually with the increased phytase. P2000 had the highest nitrogen and phosphorus retention rates ($P < 0.05$). These results indicated that 2000 U/kg phytase in the diet can significantly increase the growth, protein utilization rate and trypsin activity, and reduce the feed coefficient of juvenile crabs fed the diets containing phytic acid, and promote nitrogen/phosphorus deposition rate of juvenile crabs.

Key words: Phytase; *Eriocheir sinensis*; Growth; Digestion