水生生物学报
ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

克氏原螯虾饲料亚麻酸与亚油酸的适宜比值

马世豪 肖文富 解绶启 张健敏 董立学 文华 蒋明 郜卫华 田娟

OPTIMAL RATIO OF LINOLENIC ACID TO LINOLEIC ACID IN THE DIET OF *PROCAMBARUS CLARKII*

MA Shi-Hao, XIAO Wen-Fu, XIE Shou-Qi, ZHANG Jian-Min, DONG Li-Xue, WEN Hua, JIANG Ming, GAO Wei-Hua, TIAN Juan

在线阅读 View online: https://doi.org/10.7541/2024.2024.0222

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

酵母水解物对克氏原螯虾生长性能、消化、抗氧化和免疫能力的影响

DIETARY YEAST HYDROLYSATE ON GROWTH, DIGESTION, ANTIOXIDATION AND IMMUNITY OF RED SWAMP CRAYFISH (*PROCAMBARUS CLARKII*)

水生生物学报. 2024, 48(3): 393-404 https://doi.org/10.7541/2024.2023.0165

双低菜粕替代鱼粉对克氏原螯虾幼虾生长性能、抗氧化能力和消化系统组织形态的影响

REPLACING FISH MEAL WITH RAPESEED MEAL ON GROWTH PERFORMANCE, ANTIOXIDANT CAPACITY AND DIGESTIVE SYSTEM MORPHOLOGY OF JUVENILE *PROCAMBARUS CLARKII*

水生生物学报. 2023, 47(12): 1918-1931 https://doi.org/10.7541/2023.2022.0458

持续高温胁迫对克氏原螯虾生长、消化酶活性与免疫指标的影响

EFFECTS OF SUSTAINED HIGH-TEMPERATURE STRESS ON GROWTH PERFORMANCE, DIGESTIVE ENZYME ACTIVITIES AND IMMUNE INDEXES OF CRAYFISH, *PROCAMBARUS CLARKII*

水生生物学报. 2022, 46(3): 395-402 https://doi.org/10.7541/2022.2021.0207

克氏原螯虾一种新型甲壳素基因的鉴定和抑菌功能研究

IDENTIFICATION OF A NEW CRUSTIN AND STUDY OF ITS ANTIBACTERIAL FUNCTION FROM *PROCAMBARUS CLARKII*

水生生物学报. 2022, 46(2): 248-256 https://doi.org/10.7541/2021.2019.280

饲料中黄曲霉毒素B_1对克氏原螯虾幼虾生长、饲料利用和肝胰腺组织结构的影响

DIETARY AFLATOXIN B_1 ON GROWTH, ANTIOXIDANT CAPACITY AND HISTOLOGY IN HEPATOPANCREAS OF JUVENILE RED SWAMP CRAWFISH (*PROCAMBARUS CLARKII*)

水生生物学报. 2023, 47(2): 279-289 https://doi.org/10.7541/2023.2022.0260

关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2024.2024.0222 CSTR: 32229.14.SSSWXB.2024.0222

克氏原螯虾饲料亚麻酸与亚油酸的适宜比值

马世豪[1] 肖文富[1,2] 解绶启[3] 张健敏[2] 董立学[2] 文 华[2]
蒋 明[2] 郜卫华[1*] 田 娟[1,2*]

(1. 长江大学涝渍灾害与湿地农业湖北省重点试验室, 荆州 434024; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223; 3. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 为探究克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)饲料亚麻酸与亚油酸的适宜比值(ALA/LA), 分别制备ALA/LA为0.14 (R_1)、0.38 (R_2)、0.74 (R_3)、1.28 (R_4)、2.37 (R_5) 和4.54 (R_6)的6种实验饲料, 选取初始体重为(5.99±0.12) g的克氏原螯虾进行为期8周的摄食生长实验。结果显示, R_3组克氏原螯虾增重率、特定生长率和肌肉粗脂肪含量最高, 且饲料系数最低; R_2组性腺指数最高; R_3组肌肉粗脂肪和Σn-6PUFA含量最高; R_6组肌肉粗蛋白含量最高; 血清中谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性均在ALA/LA为0.38—0.74时较其他组显著降低; 饲料ALA/LA显著影响了肝脏和肠道消化酶活性; 肝脏过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性分别在R_3组和R_4组达到最大值; R_3组肝胰腺丙二醛含量最低; 肠道绒毛宽度在R_3组显著升高; 肝胰腺B细胞数量在R_4组较其他组显著升高; ALA/LA为0.38—0.74时显著提高了克氏原螯虾的性腺指数。经折线回归分析, 克氏原螯虾饲料中适宜ALA/LA为0.45—0.46。

关键词: 亚麻酸; 亚油酸; 生长性能; 消化性能; 克氏原螯虾

中图分类号: S963 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2025)03-032511-13

甲壳动物不能由单不饱和脂肪酸合成多不饱和脂肪酸(PUFA), 需要饲料中额外添加特定的n-3和n-6系列PUFA, 才能满足生长、繁殖需要[1, 2]。鱼油富含多不饱和脂肪酸, 且n-3/n-6 PUFA的比例较高, 亚麻籽油则富含较多的n-3 PUFA主要为α-亚麻酸(ALA), 而豆油、玉米油、菜籽油等富含较多的n-6 PUFA主要为亚油酸(LA)。鱼油被认为是水产动物最优质的脂肪源, 但鱼油资源有限、价格昂贵和易氧化, 因此寻找新的脂肪源来替代鱼油成为营养学研究的热点[3]。目前, 价格相对低廉、产量高和可持续生产的植物油已被广泛应用到水产动物饲料中。如菜籽油可以替代大西洋鲑(*Salmo salar*) 饲料中50%的鱼油, 不影响生长性能, 但会降低肌肉营养价值[4]; 大豆油或亚麻籽油100%替代鱼油并未对大菱鲆(*Psetta maxima*)的生长造成显著影响, 但会改变肌肉气味和质地[5]; 棕榈油可替代石斑鱼(*Epinephelus coioides*)饲料中47.1%的鱼油[6]。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)饲料中含有22%鱼粉时, 亚麻籽油或豆油均适合作为鱼油的替代品[7]。豆油和磷脂油替代克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)饲料中鱼油后, 未出现必需脂肪酸缺乏症, 但饲料系数显著增加[8]。上述研究均发现植物油部分或全部替代鱼油后, 会改变鱼体脂肪酸的组成, 对水产动物产生不同影响, 同时也因植物油主要富含n-6 PUFA, 会影响肌肉长链脂肪酸的组成, 致使肌肉中有益于人类健康的n-3 长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)含量较少, 从而降低了其营养价值。同时, 在完全替代鱼油后, 高比例的植物油会导致部分水

收稿日期: 2024-06-03; **修订日期:** 2024-07-22

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFD2402000); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(YFI202404); 湖北省特色淡水产品产业链科技研发项目资助 [Supported by National Key R & D Program of China (2023YFD2402000); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (YFI202404); the R & D Program of Hubei in Characteristic Freshwater Products Industry Chain]

作者简介: 马世豪(1999－), 男, 硕士研究生; 主要从事水产动物营养与饲料学研究。E-mail: msh3211026@163.com

通信作者: 郜卫华, 副教授; 主要从事水产动物营养与饲料学研究。E-mail: gaoweihua@yangzeu.edu.cn 田娟, 副研究员; 主要从事水产动物营养与饲料学研究。E-mail: tianjuan@yfi.ac.cn *共同通信作者

©The Author(s) 2025. This is an open access article under the CC-BY 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

产动物肠道健康受损及肝脏脂质代谢失衡[2]。

在罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)[9]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)[10] 等研究上认为ALA和LA共用相同的去饱和酶、加长酶及乙酰转移酶, 如环氧合酶和脂氧合酶, 因此两者之间存在代谢竞争抑制。也有研究认为n-3和n-6 PUFA在水产动物上存在交互作用, 如饲料中适宜的DHA/EPA比值(2.2∶1)显著提高了拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)养殖经济效益, 增加蟹的营养价值, 有利于消费者健康[11]。饲料ALA/LA比值为1∶3—6可显著提高斑节对虾(*Penaeus monodon*)肌肉中n-3 LC-PUFA含量[12]。综上所述, 确定适宜的ALA/LA对于节约饲料油脂和促进水产动物的生长均有重要作用。

克氏原螯虾俗称小龙虾, 属于北美地区原种[13], 其肉质鲜美、营养丰富, 因高蛋白、低脂肪, 且富含人体必需氨基酸和脂肪酸, 深受消费者喜爱[14]。2023年中国克氏原螯虾年产量为316万吨, 位于全国淡水养殖品种第4位, 是中国重要的淡水虾类养殖品种之一[15], 具有重要的经济价值。然而克氏原螯虾饲料配制技术良莠不齐, 其营养参数存在大量空白。目前研究主要集中于对克氏原螯虾饲料脂肪需求和脂肪源相关方面研究, 其对脂肪的需要量为6%—8%, 适宜的脂肪源为鱼油、豆油和磷脂油[8, 16, 17]。对克氏原螯虾必需脂肪酸的相关研究鲜见报道。虾类的必需脂肪酸为n-3和n-6 PUFA[18]。在生产中, 克氏原螯虾饲料以豆油和磷脂油为主, 富含n-6 PUFA而缺乏n-3 PUFA。因此, 本研究配制了ALA/LA为0.14—4.54的6组饲料, 通过8周养殖实验, 采样分析测定了生长性能、营养组成、抗氧化能力、消化能力及组织形态等指标, 评估饲料ALA/LA对克氏原螯虾生长性能、健康状况及肌肉品质的影响, 以期获得适宜饲料ALA/LA, 为其高效饲料配制提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 实验饲料配制

实验饲料以谷朊粉、豆粕、酪蛋白和明胶为蛋白源, 面粉为糖源, 亚麻籽油为亚麻酸源, 大豆油为亚油酸源。亚麻籽油购自上海源叶生物科技有限公司(上海, 中国), 豆油购自益海嘉里金龙鱼粮油食品股份有限公司(天津, 中国)。豆油添加量分别为50、40、30、20、10和0 g/kg, 亚麻籽油添加量分别为0、10、20、30、40和50 g/kg, 亚麻酸与亚油酸的实测比值(ALA/LA)分别为0.14 (R_1)、0.38 (R_2)、0.74 (R_3)、1.28 (R_4)、2.37 (R_5)和4.54 (R_6)。饲料配方和饲料脂肪酸组成如表 1和表 2所示。原料经粉碎过80目筛, 准确称量后采用逐级扩大法混匀, 用F-26双螺旋压条机(广州华工光机电科技有限公司, 中国广州)制成直径为2 mm的条状饲料, 在全封闭的电热烘箱(DHG-9140A, 武汉德力祥仪器设备有限公司, 中国武汉)中90℃熟化20min后, 经履带式饲料干燥机(常州苏正干燥设备有限公司)干燥(60℃, 2h), 用破碎机将饲料破碎成3—4 mm的圆柱形颗粒, 将其置于–20℃的冰箱备用。水中浸泡2h, 饲料水中溶失率为10.57%。

1.2 实验虾与养殖管理

实验所用克氏原螯虾购于湖北省潜江市, 在中国水产科学研究院长江水产研究所室内微流水养殖系统中暂养1周, 期间投喂对照组饲料以适应实验环境。在正式养殖实验前, 将克氏原螯虾禁食24h后, 随机取20尾虾用以测定实验虾的初始营养成分; 另外选取规格均匀、螯足完整、活力好、初始体重为(5.99±0.12) g的克氏原螯虾324尾, 随机分到18个养殖箱中, 每箱18尾。每个养殖箱(110 cm×80 cm×45 cm)内放置遮蔽管和遮蔽网以防止虾体互残且帮助蜕壳。养殖实验持续8周, 每天投喂2次(8:00和18:00), 根据虾的摄食情况及水温等环境因素及时调整投喂量, 投食率2%—4%, 每次投喂2h后收集残饵, 置于–20℃冰箱保存, 养殖实验结束后, 将残饵烘干、称量并换算为绝对干重。每天早晚换水1/3, 通过虹吸管清理粪便, 养殖微流水速率保持为100 L/h。每天记录养殖水温、虾的摄食情况和死亡数量。在养殖期间, 水温为24—28℃, 氨氮小于0.05 mg/L, 溶解氧大于5 mg/L, pH为8.1—8.3。

1.3 样品采集

在养殖实验结束后, 将克氏原螯虾禁食24h, 记录每桶尾数和总质量, 计算成活率、增重率、特定生长率和饲料系数; 每桶随机选取2尾虾用于测定全虾营养成分; 另每桶随机选取9尾虾, 用1 mL注射器从头胸甲处刺入围心腔, 抽取血淋巴置于1.5 mL离心管中, 4℃下静置4h, 离心(4℃, 14400×g, 20min)取上清液, 于–80℃保存血清待测。取出肝胰腺、腹部肌肉及性腺并称质量用以计算肝体比、腹部含肉率和性腺指数。将称重后的肌肉、肝胰腺和整肠分装后放于自封袋中, 置于–40℃, 用于后续其他指标的测定。最后, 每桶分别取1尾虾的肝胰腺(0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm)和中肠(0.5 cm)置于4%多聚甲醛中, 用于组织学观察。

1.4 指标测定

生长性能指标的测定 根据以下公式, 计算生长性能指标:

存活率(Survival rate, SR, %)=$N_t/N_0\times100$

增重率(Weight gain rate, WGR, %)=$(W_t-W_0)/W_0\times100$

特定增长率(Specific growth rate, SGR, %/d)=$(\mathrm{Ln}W_t-\mathrm{Ln}W_0)/t\times100$

摄食率(Feeding rate, FR, %)=$W_f/[t\times(W_0+W_t)/2]\times100$

饲料系数(Feed conversion ratio, FCR)=$W_f/(W_tN_t-W_0N_0+W_d)$

肝体比(Hepatosomatic index, HSI)=$W_h/W_t\times100$

腹部含肉率(Muscle rate, MR, %)=$W_m/W_t\times100$

性腺指数(Gonadosomatic index, GI)=$W_g/W_t\times100$

式中, N_t为终末尾数; N_0为初始尾数; W_t为终末体质

表 1　饲料配方及营养水平(干物质, g/kg)

Tab. 1　Feed formulation and nutrient level (dry matter, g/kg)

原料Ingredient (g/kg饲料)	亚麻酸/亚油酸 (ALA/LA)					
	0.14 (R_1)	0.38 (R_2)	0.74 (R_3)	1.28 (R_4)	2.37 (R_5)	4.54 (R_6)
谷阮粉Wheat gluten	70	70	70	70	70	70
豆粕Soybean meal	170	170	170	170	170	170
酪蛋白Casein	140	140	140	140	140	140
明胶Gelatin	35	35	35	35	35	35
面粉Wheat flour	300	300	300	300	300	300
豆油Soybean oil	50	40	30	20	10	0
亚麻籽油Flaxseed oil	0	10	20	30	40	50
大豆卵磷脂Soybean lecithin	10	10	10	10	10	10
胆固醇 Cholesterol	5	5	5	5	5	5
鱼溶浆Fish dissolved pulp	50	50	50	50	50	50
磷酸二氢钙$Ca(H_2PO_4)_2$	23	23	23	23	23	23
维生素预混料Vitamin premix[1]	10	10	10	10	10	10
矿物质预混料Mineral premix[2]	10	10	10	10	10	10
氯化胆碱Choline chloride	2	2	2	2	2	2
维生素C Vitamin C	3	3	3	3	3	3
虾青素Astaxanthin	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
大蒜素Allicin	1	1	1	1	1	1
纤维素Microfiber	80.1	80.1	80.1	80.1	80.1	80.1
蜕壳素Chitosan	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
二甲基溴化硫Trisiodophenylamine	3	3	3	3	3	3
褐藻酸钠Sodium alginate	10	10	10	10	10	10
膨润土Bentonite	20	20	20	20	20	20
苏氨酸L-Thr	4	4	4	4	4	4
蛋氨酸L-Met	2	2	2	2	2	2
营养成分Nutritional level						
干物质Dry matter	961.0	958.9	957.6	960.8	950.2	957.9
粗蛋白Crude protein	391.1	387.9	395.9	390.8	385.2	371.2
粗脂肪Crude lipid	63.6	62.7	63.8	65.4	65.2	65.3
灰分Ash	65.7	65.7	65.5	65.5	64.9	63.4
能量Gross energy (kJ/g)	19.4	19.3	19.1	19.2	19.1	19.3

注: [1]每千克维生素预混料包括: 维生素A 4 g, 维生素D 0.02 g, 维生素E 10 g, 维生素K_3 10 g, 维生素B_1 10 g, 维生素B_2 10 g, 维生素B_6 20 g, 烟酸40 g, 生物素0.2 g, 泛酸钙20 g, 叶酸0.5 g, 维生素B12 0.01 g, 维生素C 20 g, 肌醇400 g, 再用微晶纤维素添加至1 kg; [2]每千克矿物质预混料包括: 碘酸钾0.6 g, 亚硒酸钠0.08 g, 磷酸二氢钾320 g, 硫酸镁200 g, 一水硫酸锰20 g, 二水氯化铜2 g, 七水硫酸锌60 g, 七水硫酸亚铁50 g, 氯化钠100 g, 六水氯化钴2 g, 再用微晶纤维素添加至1 kg

Note: [1]Per kg of vitamin premix contains vitamin A 4 g, vitamin D 0.02 g, vitamin E 10 g, vitamin K_3 10 g, vitamin B_1 10 g, vitamin B_2 10 g, vitamin B_6 20 g, nicotinic acid 40 g, biotin 0.2 g, calcium pantothenate 20 g, folic acid 0.5 g, vitamin B_{12} 0.01 g, vitamin C 20 g, inositol 400 g, all ingredients are diluted with micro-cellulose to 1 kg. [2]Per kg of mineral premix contains KIO_3 0.6 g, $Na_2SeO_3\cdot5H_2O$ 0.08 g, KH_2PO_4 320 g, $MgSO_4$ 200 g, $MnSO_4\cdot H_2O$ 20 g, $CuCl_2\cdot2H_2O$ 2 g, $ZnSO_4\cdot7H_2O$ 60 g, $FeSO_4\cdot7H_2O$ 50 g, NaCl 100 g, $CoCl_2\cdot6H_2O$ 2 g, and all ingredients are diluted with micro-cellulose to 1 kg

量(g); W_0为初始体质量(g); t为实验天数(d); W_f为饲料摄入质量(g); W_d为死亡虾体质量(g); t为养殖时间(d); W_h为肝胰腺质量(g); W_m为虾尾部肌肉质量(g); W_g为性腺质量(g)。

基本成分的测定 饲料水分含量采用105℃恒温干燥失重法(GB/T 5009.3-2016)测定; 全虾和肌肉的水分含量采用冷冻干燥法(CHRIST型冷冻干燥机, 干燥72h)测定; 粗蛋白含量采用凯氏定氮法(GB/T 5009.5-2016)测定; 粗脂肪含量采用索氏抽提法(GB/T 5009.6-2016)测定; 灰分含量采用马弗炉550℃灼烧法(GB/T 5009.4-2016)测定。

脂肪酸的测定 将冷冻干燥后的肌肉样品(0.4 g)和烘干恒重的饲料样品(0.5 g), 加入4 mL异辛烷, 涡旋混匀30s, 置于25℃摇床中震荡过夜浸提。浸提液中加入8 mL 2%氢氧化钠甲醇溶液, 微沸40min后, 加入7 mL 15%三氟化硼甲醇溶液, 微沸20min。加入20 mL正庚烷, 微沸1min。再加入饱和氯化钠溶液, 静置分层。吸取上层正庚烷提取溶液5 mL, 加入5 g无水硫酸钠, 振摇1min, 静置5min, 吸取上层溶液到进样瓶中, 用气相色谱仪 (Agilent 7890A, 加利福尼亚州, 美国) 测定脂肪酸谱。脂肪酸的浓度根据不同的脂肪酸峰面积与内参标准(C11∶0)峰面积的比率来计算。

血清生化指标的测定 血清葡萄糖(GLU)、总胆固醇(T-CHO)、甘油三酯(TG)、总蛋白(TP)和白蛋白(ALB) 含量分别采用己糖激酶法、CHOD-PAP 法、GK-GPO-POD 法、二聚脲法和BCG 法测定。分别采用LDH-UV 法、MDH-UV法和NPP-

表 2 实验饲料脂肪酸组成(g/kg 绝干饲料)

Tab. 2 Fatty acids composition of the experimental diet (g/kg dry diet)

脂肪酸Fatty acid	亚麻酸/亚油酸 (ALA/LA)					
	0.14 (R_1)	0.38 (R_2)	0.74 (R_3)	1.28 (R_4)	2.37 (R_5)	4.54 (R_6)
饱和脂肪酸SFA						
C14∶0	0.62	0.62	0.62	0.67	0.68	0.69
C16∶0	9.80	9.84	9.92	10.18	9.51	9.86
C18∶0	2.89	2.90	2.82	2.83	2.84	2.73
C20∶0	0.31	0.31	0.31	0.31	0.30	0.32
C22∶0	0.30	0.33	0.34	0.35	0.34	0.31
C24∶0	0.84	0.89	0.82	0.85	0.90	0.94
ΣSFA	14.77	14.90	14.82	15.20	14.57	14.85
单不饱和脂肪酸MUFA						
C14∶1	0.05	0.04	0.05	0.06	0.05	0.05
C16∶1	0.72	0.74	0.72	0.75	0.78	0.79
C18∶1	13.80	14.25	14.68	15.40	16.12	16.32
C20∶1	0.50	0.52	0.51	0.55	0.56	0.58
C22∶1	0.13	0.17	0.20	0.16	0.21	0.16
ΣMUFA	15.20	15.73	16.16	16.91	17.72	17.90
n-6 fatty acids						
亚油酸C18∶2	27.25	22.97	18.89	14.27	10.35	6.35
C20∶2	0.15	0.16	0.16	0.15	0.14	0.16
C20∶4	0.16	0.18	0.17	0.15	0.13	0.16
Σn-6 PUFA	27.56	23.31	19.22	14.57	10.63	6.67
n-3 fatty acids						
亚油酸C18∶3	3.75	8.78	14.04	18.29	24.53	28.82
C20∶3	0.10	0.10	0.12	0.13	0.12	0.08
C22∶6	1.09	1.10	1.03	0.98	1.13	1.08
Σn-3 PUFA	4.94	9.98	15.19	19.40	25.78	29.99
ΣFA	62.47	63.92	65.39	66.08	68.70	69.41
Σn-3/Σn-6 PUFA	0.18	0.43	0.79	1.33	2.43	4.50
ALA/LA	0.14	0.38	0.74	1.28	2.37	4.54

注: ΣSFA. 饱和脂肪酸总量; ΣMUFA. 单不饱和脂肪酸总量; Σn-6 PUFA. n-6多不饱和脂肪酸总量; Σn-3 PUFA. n-3多不饱和脂肪酸总量; ΣFA. 脂肪酸总量

Note: ΣSFA. total saturated fatty acids; ΣMUFA. total monounsaturated fatty acids; Σn-6 PUFA. total n-6 polyunsaturated fatty acids; Σn-3 PUFA. total n-3 polyunsaturated fatty acids; ΣFA. total fatty acids

AMP法测定天门冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)和碱性磷酸酶(ALP)活性。血清生化指标采用自动生化分析仪(BX-3010, Sysmex Corporation, 日本)进行测定。以上所用试剂均购自Sysmex公司。高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)采用双试剂直接法测定。所用试剂均购自南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

肝胰腺和肠道消化酶活性的测定　准确称取肝胰腺(0.5 g)和肠道(0.2 g), 按照质量 (g)∶体积(mL)=1∶9加入0.85%的生理盐水, 冰水浴条件下匀浆30s, 制成10%的匀浆液, 离心(3000×*g*, 10min, 4℃)后取上清液待测。以酪蛋白为底物, 采用福林酚法测定肝胰腺和肠道蛋白酶活性, 甲基试卤灵底物法测定脂肪酶活性, 淀粉碘显色法测定淀粉酶活性, 考马斯亮蓝法测定上清液蛋白质含量。所用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所试剂盒。

肝胰腺抗氧化性能的测定　样品前处理与测定消化酶活性样品前处理相同。采用比色法测定总抗氧化力(T-AOC), 硫代巴比妥酸(TBA)法测定丙二醛(MDA)含量, 过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性分别采用钼酸铵法和水溶性四唑盐1(WST-1)法测定。均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

肌肉质地的测定　将虾尾肌肉切成小方块(1.00 cm×1.00 cm×1.00 cm), 使用质构分析仪(Stable Micro systems, Ltd., UK) 测定肌肉硬度、弹性、咀嚼性、回复性和内聚力。测量参数: 选用圆柱形铝探针(直径50 mm), 测试前和测试后的速度分别设定为2.5和5 mm/s, 变形量为肌肉厚度的50%。每个样品被按压2次, 每次30s。

肝胰腺和肠道组织切片　取肝胰腺和中肠组织样本, 用多聚甲醛固定液常温浸泡24h后, 储存于70%乙醇中。经乙醇梯度脱水、石蜡包埋、切片(Longer Pump YZⅡ25, 5 μm)、苏木精−伊红染色、中性树胶封片后, 在光学显微镜(OLYMPUS DP73, 日本)观察组织学特征并拍照。运用图像分析系统(Image Pro Plus 6.0)测量肠道绒毛长度和宽度, 统计计算肝胰腺细胞发生率(B细胞和R细胞)及测量肝小体直径。

1.5　数据分析

实验数据统计分析采用SPSS 26.0 (IBM, USA)软件进行。结果均以平均值±标准差(X±SD)表示。所有数据首先采用 Shapiro-Wilk 和 Levene's equal variance tests 进行正态分布检验和方差齐性分析, 随后采用单因素方差分析(One-way ANOVA), Tukey氏均值多重比较法进行差异显著性检验。P<0.05时表示差异显著。回归分析图采用Origin 2019 (OriginLab Company, Massachusetts, USA)绘制。

2　结果

2.1　饲料ALA/LA对克氏原螯虾生长性能的影响

饲料ALA/LA对克氏原螯虾成活率、肝体比和腹部含肉率无显著影响(P>0.05)。随饲料ALA/LA升高, 终末体质量、增重率和特定生长率均呈现先增后降的趋势, 在R_3组达到最大值, 较R_1组显著升高(P<0.05); 饲料系数则与之相反, 在R_3组有最小值, 较R_1组显著降低(P<0.05)。R_2和R_3组性腺指数最高, 较R_1组显著提高20% (P<0.05; 表 3)。

分别以克氏原螯虾的增重率和饲料系数为因变量(Y), 饲料ALA/LA为自变量(X), 通过回归分析得出最适ALA/LA分别为0.46和0.45 (图 1), 对应的最适亚油酸和亚麻酸水平分别为19.58—20.97和

表 3　饲料ALA/LA对克氏原螯虾生长性能的影响

Tab. 3　Effects of dietary ALA/LA on growth performance of *P. clarkii*

项目Item	亚麻酸/亚油酸 (ALA/LA)					
	0.14 (R_1)	0.38 (R_2)	0.74 (R_3)	1.28 (R_4)	2.37 (R_5)	4.54 (R_6)
初始体质量IBW (g)	5.99±0.05	5.99±0.03	5.99±0.02	5.98±0.04	5.98±0.02	5.99±0.02
终末体质量FBW (g)	24.47±0.47^{a}	26.03±1.31^{ab}	27.36±0.93^{b}	25.89±0.61^{ab}	25.38±0.63^{ab}	25.46±0.59^{ab}
增重率WGR (%)	308.30±8.33^{a}	334.45±20.27^{ab}	356.51±15.58^{b}	332.78±10.95^{ab}	324.11±9.59^{ab}	324.79±9.05^{ab}
特定生长率SGR (%/d)	1.43±0.02^{a}	1.50±0.05^{ab}	1.55±0.04^{b}	1.49±0.02^{ab}	1.47±0.02^{ab}	1.48±0.02^{ab}
成活率SR (%)	87.04±3.21	88.89±5.56	87.03±6.41	92.59±8.49	87.04±8.48	79.63±3.20
摄食率FR (%)	1.89±0.04	1.95±0.15	1.90±0.11	1.97±0.13	1.92±0.06	1.93±0.12
饲料系数FCR	0.97±0.02^{b}	0.92±0.02^{ab}	0.83±0.03^{a}	0.92±0.02^{ab}	0.97±0.03^{ab}	1.01±0.08^{ab}
肝体比HSI	7.10±0.08	7.29±0.16	7.49±0.15	7.43±0.18	7.34±0.23	7.20±0.23
腹部含肉率MR (%)	13.90±0.30	14.15±0.62	14.49±0.42	14.82±0.90	13.89±0.72	13.65±0.37
性腺指数GI	0.30±0.02^{a}	0.36±0.02^{b}	0.36±0.01^{b}	0.32±0.02^{ab}	0.31±0.01^{a}	0.31±0.02^{a}

注: 同行上标字母不同代表显著差异(P<0.05), 以下各表同

Note: Different superscript letters in the same row indicate significant difference (P<0.05). The same applies below

11.00—12.39 g/kg。

2.2 饲料亚麻酸/亚油酸对克氏原螯虾基本成分的影响

随饲料ALA/LA升高, 肌肉粗蛋白含量呈上升趋势, R_6组较 R_1组显著增加3.73% (P<0.05); 肌肉粗脂肪含量呈现先增后降的趋势, 在R_3组达到最大值(P<0.05); 全虾灰分含量呈现先降后增的趋势, 在R_3组达到最小值(P<0.05)。饲料ALA/LA对克氏原螯虾全虾水分、粗蛋白、粗脂肪含量及肌肉水分和灰分含量无显著影响(P>0.05; 表 4)。

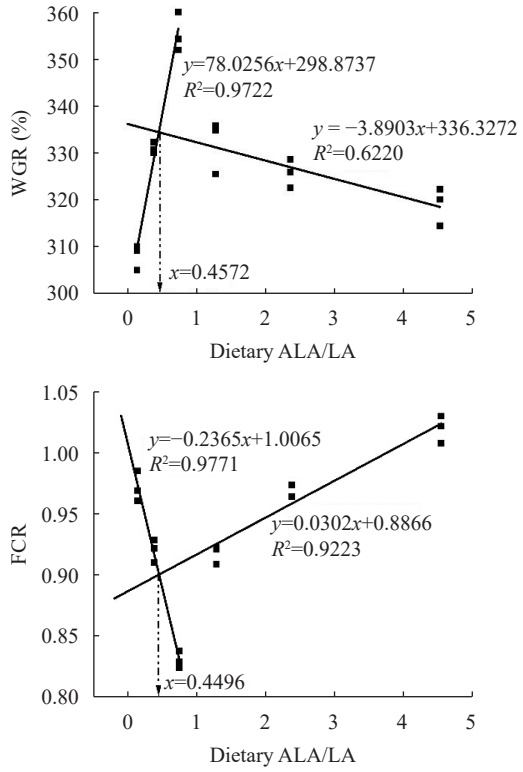

图 1 饲料ALA/LA与克氏原螯虾增重率(A)和饲料系数(B)的回归分析

Fig. 1 Broken-line model analysis of weight gain rate (A) and feed conversion ratio (B) of red swamp crayfish

2.3 饲料ALA/LA对克氏原螯虾肌肉脂肪酸组成的影响

本实验分析了克氏原螯虾肌肉中15种脂肪酸的浓度, 包括饱和脂肪酸(SFA) 5种, 单不饱和脂肪酸(MUFA) 4种, n-6系列PUFA和n-3系列PUFA各3种(表 5)。在SFA含量方面, 随饲料ALA/LA的升高, C16:0含量逐渐下降, R_2组C18∶0和C24∶0含量最低, 且ΣSFA含量较R_4组显著降低(P<0.05); 各组C20∶0和C22∶0含量无显著性差异(P>0.05)。饲料ALA/LA对克氏原螯虾肌肉MUFA含量无显著影响(P>0.05)。在n-6 PUFA含量方面, 随饲料ALA/LA升高, C18∶2和∑n-6呈先增后降的趋势, 且均在R_3组达到最大值。在n-3 PUFA方面, C18∶3含量随饲料ALA/LA升高而升高, 其他n-3 PUFA含量均无显著差异(P>0.05)。

2.4 饲料ALA/LA对克氏原螯虾血清生化指标的影响

随饲料ALA/LA升高, 血清AST和ALT活性呈现先降后升的趋势, 在R_2和R_3组显著降低(P<0.05); GLU含量呈现先增后降的趋势, 在R_4组达到最大值(P<0.05)。饲料ALA/LA对血清TP、ALB、TG、TCHO含量和ALP活性无显著影响(P>0.05; 表 6)。

2.5 饲料ALA/LA对克氏原螯虾消化酶活性的影响

随饲料ALA/LA升高, 肝胰腺蛋白酶活性在R_5组达到最大值(P<0.05); 肠道蛋白酶活性呈现先增后降的趋势, 在R_2组达到最大值(P<0.05)。肝胰腺脂肪酶活性呈现先降后升的趋势, 在R_4组达到最小值(P<0.05); 肠道脂肪酶活性在R_4组达到最大值, 较R_1组显著提高25% (P<0.05)。肠道淀粉酶活性呈现先增后降的趋势, 在R_4组达到最大值(P<0.05); 饲

表 4 饲料ALA/LA对克氏原螯虾基本成分的影响 (g/kg湿重)

Tab. 4 Effects of dietary ALA/LA on basic components of *P. clarkii* (g/kg wet weight)

项目Item	亚麻酸/亚油酸(ALA/LA)					
	0.14 (R_1)	0.38 (R_2)	0.74 (R_3)	1.28 (R_4)	2.37 (R_5)	4.54 (R_6)
全虾Whole body						
水分Moisture	661.31±9.48	670.22±12.68	673.98±24.98	662.88±7.31	659.62±7.24	674.32±9.14
粗蛋白Crude protein	118.26±1.65	120.90±1.33	120.18±0.56	118.73±2.51	120.40±2.00	120.91±3.03
粗脂肪Crude lipid	29.76±2.77	29.94±0.53	30.66±1.10	30.50±1.78	29.66±1.13	30.02±0.27
灰分Ash	78.71±0.33^{b}	76.57±1.67^{ab}	75.05±0.35^{a}	76.78±1.25^{ab}	78.02±0.80^{b}	77.71±0.75^{ab}
肌肉Muscle						
水分Moisture	778.18±3.42	777.42±5.28	775.29±2.94	776.39±1.26	774.98±1.89	776.40±7.62
粗蛋白Crude protein	177.04±4.34^{a}	181.24±1.46^{ab}	181.49±1.10^{ab}	179.23±1.13^{ab}	182.70±0.53^{ab}	183.65±1.76^{b}
粗脂肪Crude lipid	3.83±0.08^{b}	4.09±0.08^{bc}	4.17±0.12^{c}	3.50±0.17^{ab}	3.37±0.18^{ab}	3.17±0.18^{a}
灰分Ash	13.92±0.20	13.88±0.29	13.94±0.31	13.71±0.14	13.97±0.30	13.78±0.34

料ALA/LA对肝胰腺淀粉酶活性无显著影响(P>0.05; 表 7)。

2.6　饲料ALA/LA对克氏原螯虾肝胰腺抗氧化性能的影响

随饲料ALA/LA升高, T-AOC其余各组均较R_1组显著升高(P<0.05), SOD和CAT活性呈现先增后降的趋势, 分别在R_4和R_3组有最大值 (P<0.05); MDA含量呈现先减后增的趋势, 在R_3组达到最小值(P<0.05; 表 8)。

2.7　饲料ALA/LA对克氏原螯虾肌肉质构的影响

饲料ALA/LA对克氏原螯虾肌肉弹性无显著影响(P>0.05); 随饲料ALA/LA升高, 肌肉的硬度、咀嚼性、回复性和内聚力均呈现先降后升的趋势, 在R_4组达到最小值 (P<0.05; 表 9)。

表 5　饲料ALA/LA对克氏原螯虾肌肉脂肪酸组成的影响(g/kg湿重)

Tab. 5　Effects of dietary ALA/LA on muscle fatty acid composition of *P. clarkii* (g/kg wet weight)

脂肪酸 Fatty acid	亚麻酸/亚油酸(ALA/LA)					
	0.14 (R_1)	0.38 (R_2)	0.74 (R_3)	1.28 (R_4)	2.37 (R_5)	4.54 (R_6)
饱和脂肪酸SFA						
C16:0	0.143±0.017^{b}	0.126±0.005^{ab}	0.137±0.011^{ab}	0.135±0.014^{ab}	0.138±0.002^{ab}	0.113±0.007^{a}
C18:0	0.398±0.019^{b}	0.358±0.016^{a}	0.375±0.014^{ab}	0.404±0.006^{b}	0.398±0.017^{b}	0.394±0.003^{b}
C20:0	0.040±0.005	0.039±0.003	0.039±0.002	0.046±0.004	0.048±0.006	0.046±0.004
C22:0	0.029±0.005	0.030±0.001	0.034±0.002	0.035±0.004	0.034±0.002	0.037±0.003
C24:0	0.615±0.021^{ab}	0.577±0.031^{a}	0.608±0.026^{ab}	0.645±0.038^{b}	0.649±0.005^{b}	0.634±0.016^{ab}
Σ SFA	1.231±0.048^{ab}	1.136±0.049^{a}	1.199±0.045^{ab}	1.249±0.051^{b}	1.273±0.022^{b}	1.231±0.012^{ab}
单不饱和脂肪酸MUFA						
C16:1	0.143±0.017	0.126±0.005	0.137±0.011	0.135±0.014	0.138±0.002	0.113±0.007
C18:1	1.112±0.054	1.031±0.033	1.113±0.039	1.112±0.095	1.163±0.035	1.164±0.019
C20:1	0.052±0.004	0.049±0.001	0.050±0.001	0.052±0.005	0.055±0.003	0.050±0.002
C22:1	0.020±0.002	0.020±0.001	0.023±0.001	0.023±0.001	0.023±0.001	0.022±0.000
Σ MUFA	1.328±0.074	1.226±0.039	1.319±0.030	1.317±0.111	1.388±0.039	1.351±0.027
n-6 PUFA						
亚油酸C18:2	0.910±0.005^{bc}	0.944±0.014^{c}	1.077±0.021^{d}	0.875±0.022^{b}	0.822±0.021^{a}	0.787±0.004^{a}
C20:2	0.067±0.000^{c}	0.064±0.000^{b}	0.061±0.001^{a}	0.072±0.001^{d}	0.071±0.001^{d}	0.072±0.000^{d}
C20:4	0.146±0.012	0.133±0.009	0.138±0.010	0.147±0.012	0.147±0.014	0.154±0.005
Σn-6 PUFA	1.123±0.010^{c}	1.141±0.019^{c}	1.276±0.016^{d}	1.094±0.011^{b}	1.040±0.009^{a}	1.013±0.003^{a}
n-3 PUFA						
亚油酸C18:3	0.127±0.001^{a}	0.134±0.003^{b}	0.152±0.003^{e}	0.144±0.001^{cd}	0.147±0.001^{d}	0.140±0.001^{c}
C20:3	0.015±0.004	0.018±0.002	0.022±0.004	0.017±0.004	0.021±0.001	0.021±0.001
C22:6 (DHA)	0.284±0.020	0.262±0.013	0.261±0.002	0.288±0.036	0.296±0.026	0.277±0.003
Σn-3PUFA	0.450±0.017	0.439±0.012	0.459±0.005	0.476±0.036	0.490±0.024	0.467±0.005
Σn-3/Σn-6 PUFA	0.401±0.014^{ab}	0.385±0.017^{a}	0.360±0.007^{a}	0.436±0.037^{bc}	0.471±0.020^{c}	0.461±0.006^{c}

表 6　饲料ALA/LA对克氏原螯虾血清生化指标的影响

Tab. 6　Effects of dietary ALA/LA on serum biochemical indices of *P. clarkii*

项目Item	亚麻酸/亚油酸(ALA/LA)					
	0.14 (R_1)	0.38 (R_2)	0.74 (R_3)	1.28 (R_4)	2.37 (R_5)	4.54 (R_6)
总蛋白TP (g/L)	64.95±4.86	66.89±2.74	64.78±0.70	64.95±4.86	64.82±2.10	66.50±0.82
白蛋白ALB (g/L)	0.93±0.14	0.93±0.02	0.92±0.02	0.92±0.05	0.91±0.08	0.93±0.03
谷草转氨酶AST (U/L)	5.67±0.58^{ab}	5.33±0.58^{a}	5.33±1.53^{a}	6.33±0.58^{ab}	6.67±1.53^{ab}	8.33±0.58^{b}
谷丙转氨酶ALT (U/L)	42.33±1.53^{b}	30.00±1.00^{a}	30.33±1.53^{a}	51.00±2.00^{c}	47.33±0.58^{c}	69.00±2.00^{d}
碱性磷酸酶ALP (U/L)	4.00±1.00	3.67±0.58	3.67±0.58	4.00±1.00	4.67±2.52	3.33±0.58
甘油三酯TG (g/L)	0.45±0.03	0.46±0.07	0.47±0.04	0.56±0.09	0.50±0.05	0.49±0.03
总胆固醇T-CHO (mmol/L)	0.08±0.01	0.07±0.01	0.08±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01	0.08±0.01
葡萄糖GLU (mmol/L)	1.21±0.20^{a}	1.26±0.17^{ab}	1.33±0.18^{ab}	2.01±0.23^{b}	1.81±0.52^{ab}	1.63±0.28^{ab}

2.8 饲料ALA/LA对克氏原螯虾肝胰腺、肠道组织结构的影响

由图 2和图 3可见, R_4组肝胰腺管腔正常、细胞间隙清楚, R_1组肝小管管腔扩张。此外, 随饲料ALA/LA升高, 克氏原螯虾肠道绒毛长度和绒毛宽度分别在R_4和R_3组达到最大值($P<0.05$); 肝胰腺组织R细胞数量在R_4组达到最大值($P<0.05$; 表 10)。

3 讨论

3.1 饲料ALA/LA对克氏原螯虾生长性能的影响

本研究发现, 克氏原螯虾饲料中最适ALA/LA为0.45—0.46, 对应的最适亚油酸和亚麻酸水平分别为19.58—20.97和11.00—12.39 g/kg, 且ALA/LA为 0.38—0.74时, 性腺指数最高。在中国对虾研究发现, 饲料ALA/LA为0.40—0.56时可显著提高增重率和存活率[19]; 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)[20]和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)[21] 饲料中ALA/LA分别为1.03和0.45时增重率和饲料效率最高, 且饲料ALA/LA偏高或偏低都会抑制水生动物的生长, 上述结果与本实验结果相似。可能由于ALA和LA分别代表n-3和n-6系列PUFA, ALA/LA比值偏低, 意味着克氏原螯虾摄入过高的n-6 PUFA, 会导致内源性合成的n-3PUFA不足以满足水产动物生长需要, 且n-6 PUFA含量过高会促进炎症反应, 从而影响健康水平; ALA/LA比值偏高时, 意味着摄入过高的n-3PUFA, 会导致过氧化反应易发生, 产生内源性过氧化物毒素, 从而影响健康水平[2, 3]。另有研究表明, 饲料ALA/LA对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的生长性能无显著影响, 但显著影响了繁殖力[22]。类似结果在草鱼[20]、银鲑(*Puntius goniono-tus*)[23]、大盖巨脂鲤(*Colossoma macropomum*)[24]和吉富罗非鱼[25]上也有报道。这说明饲料ALA/LA对水产动物生长性能的影响存在差异, 可能与实验对象的种类、规格有关。

表 7 饲料ALA/LA对克氏原螯虾消化酶活性的影响

Tab. 7 Effects of dietary ALA/LA on digestive enzyme activities of *P. clarkii* (U/g prot)

项目Item	亚麻酸/亚油酸(ALA/LA)					
	0.14 (R_1)	0.38 (R_2)	0.74 (R_3)	1.28 (R_4)	2.37 (R_5)	4.54 (R_6)
肝胰腺Hepatopancreas						
蛋白酶Protease	45.04±0.56^{a}	43.17±1.04^{a}	47.51±3.21^{a}	47.61±2.02^{a}	53.09±0.76^{b}	46.03±0.77^{a}
脂肪酶Lipase	0.64±0.03^{c}	0.60±0.04^{bc}	0.56±0.01^{ab}	0.53±0.01^{a}	0.55±0.01^{ab}	0.57±0.02^{ab}
淀粉酶Amylase (U/mg prot)	0.54±0.03	0.52±0.00	0.51±0.01	0.53±0.01	0.52±0.02	0.51±0.00
肠道Intestine						
蛋白酶Protease	33.34±1.19^{ab}	34.13±0.82^{b}	32.05±0.84^{ab}	33.04±0.37^{ab}	32.50±0.31^{ab}	31.36±0.93^{a}
脂肪酶Lipase	0.48±0.01^{a}	0.55±0.02^{b}	0.56±0^{bc}	0.60±0.03^{c}	0.49±0.02^{a}	0.48±0.01^{a}
淀粉酶Amylase (U/mg prot)	0.28±0.02^{ab}	0.30±0.01^{bc}	0.29±0.01^{bc}	0.33±0.01^{c}	0.28±0.02^{ab}	0.25±0.01^{a}

表 8 饲料ALA/LA对克氏原螯虾肝胰腺抗氧化性能的影响

Tab. 8 Effects of dietary ALA/LA on the antioxidant properties of hepatopancreas of *P. clarkii* (U/mg prot)

项目Item	亚麻酸/亚油酸(ALA/LA)					
	0.14 (R_1)	0.38 (R_2)	0.74 (R_3)	1.28 (R_4)	2.37 (R_5)	4.54 (R_6)
总抗氧化能力T-AOC	19.46±0.70^{a}	26.62±1.33^{bc}	25.96±1.85^{b}	29.25±1.3^{bc}	28.58±1.01^{bc}	29.80±1.13^{c}
超氧化物歧化酶SOD	0.45±0.02^{a}	0.50±0.03^{ab}	0.58±0.03^{cd}	0.60±0.02^{d}	0.52±0.02^{bc}	0.46±0.01^{a}
过氧化氢酶CAT	2.40±0.34^{a}	6.03±0.37^{b}	17.36±1.78^{d}	8.56±0.56^{bc}	8.83±0.48^{c}	9.96±1.26^{c}
丙二醛MDA (nmol/mg prot)	8.55±0.74^{bc}	6.66±0.54^{a}	6.33±0.54^{a}	6.92±0.31^{ab}	9.27±0.43^{c}	15.05±0.89^{d}

表 9 饲料ALA/LA对克氏原螯虾肌肉质构的影响

Tab. 9 Effects of dietary ALA/LA on muscle texture of *P. clarkii*

项目Item	亚麻酸/亚油酸(ALA/LA)					
	0.14 (R_1)	0.38 (R_2)	0.74 (R_3)	1.28 (R_4)	2.37 (R_5)	4.54 (R_6)
硬度Hardness	1351.67±165.14^{b}	1151.00±135.13^{ab}	1010.67±105.75^{a}	972.67±82.31^{a}	990.00±23.58^{a}	1098.33±54.68^{ab}
咀嚼性Chewiness	415.28±14.87^{c}	343.74±9.53^{b}	228.61±15.68^{a}	215.58±5.27^{a}	220.89±9.15^{a}	308.84±17.75^{b}
弹性Springiness	0.51±0.020	0.50±0.02	0.52±0.04	0.51±0.03	0.51±0.04	0.50±0.04
回复性Resilience	0.36±0.02^{d}	0.34±0.01^{cd}	0.33±0.02^{bc}	0.29±0.01^{a}	0.30±0.01^{ab}	0.33±0.01^{bc}
内聚性Cohesiveness	0.53±0.02^{c}	0.52±0.02^{bc}	0.49±0.02^{abc}	0.48±0.01^{a}	0.48±0.01^{a}	0.49±0.01^{ab}

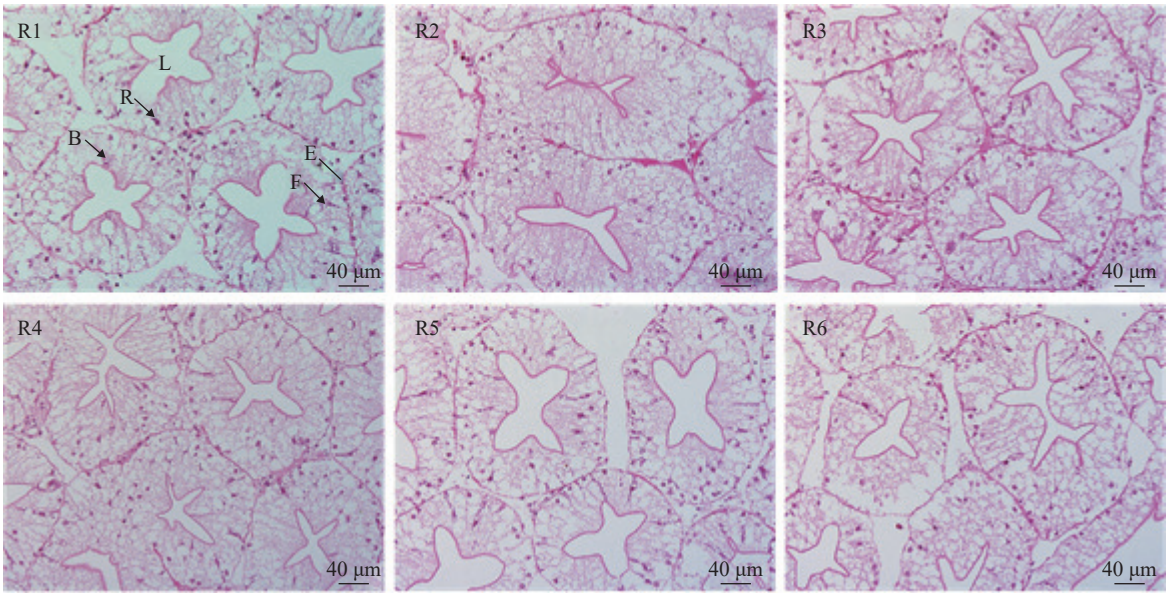

图 2　饲料ALA/LA对克氏原螯虾肝胰腺微结构的影响

Fig. 2　Effects of dietary ALA/LA on the hepatopancreas microstructure of *P. clarkia*

B. B细胞(分泌细胞); E. E 细胞(胚细胞); F. F 细胞(纤维细胞); R. R 细胞(吸收细胞); L. 星形管腔; 放大倍数: 200×; 比例尺: 40 μm

B-cells (B); E-cells (E); F-cells (F); R-cells (R); L. stellate lumen; The magnification is 200 ×; Scale bar=40 μm

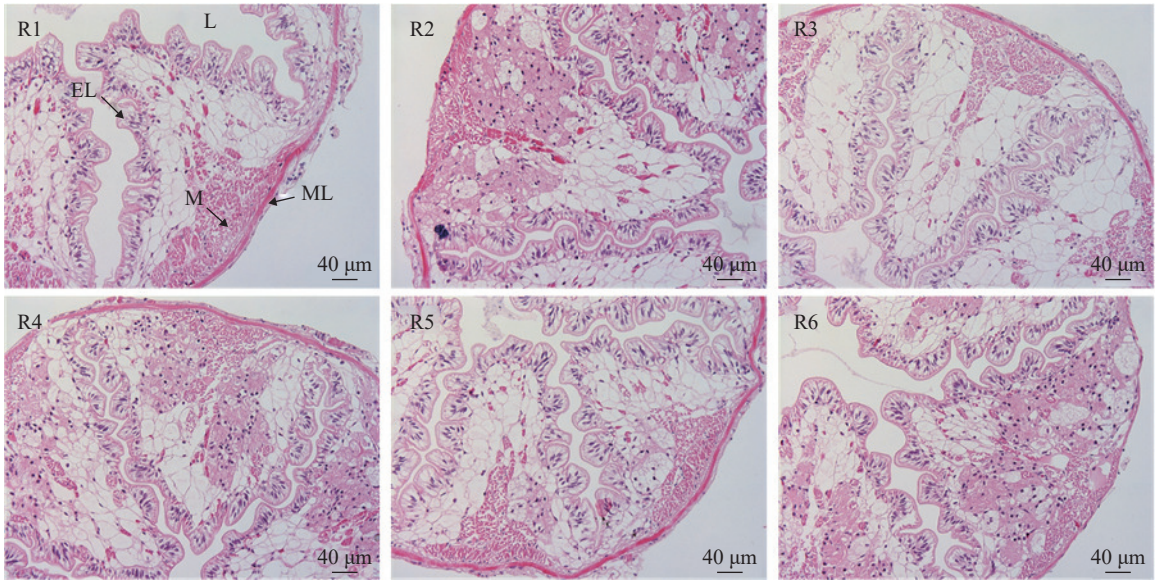

图 3　饲料ALA/LA对克氏原螯虾肠道微结构的影响

Fig. 3　Effects of dietary ALA/LA on intestinal microstructure of *P. clarkia*

L. 管腔; EL. 上皮层; M. 肌肉束; ML. 肌层; 放大倍数: 200×; 比例尺: 40 μm

L. lumen; EL. epithelium; M. muscle bundle; ML. muscle layer; The magnification is 200 ×; Scale bar=40 μm

表 10　饲料ALA/LA对克氏原螯虾肝胰腺、肠道组织结构的影响

Tab. 10　Effects of dietary ALA/LA on hepatopancreas and intestinal tissue structure of *P. clarkii*

项目Item	亚麻酸/亚油酸(ALA/LA)					
	0.14 (R_1)	0.38 (R_2)	0.74 (R_3)	1.28 (R_4)	2.37 (R_5)	4.54 (R_6)
肠道Hepatopancreas						
肠绒毛长Intestinal villi length (μm)	394.06±22.45^{a}	519.31±24.19^{b}	544.94±16.18^{b}	546.95±19.57^{b}	557.30±14.22^{b}	454.42±35.74^{a}
肠绒毛宽Intestinal villi width (μm)	446.58±21.60^{a}	516.26±29.82^{ab}	546.95±19.57^{b}	517.07±26.04^{ab}	521.24±37.31^{ab}	499.10±26.55^{ab}
肝胰腺Hepatopancreas						
R细胞数No. of R cells (个)	8.67±1.53^{a}	12.33±1.53^{ab}	17.33±2.52^{b}	30.33±3.06^{d}	28.00±1.73^{cd}	24.33±0.58^{c}

3.2 饲料ALA/LA对克氏原螯虾营养品质影响

在本研究中, 饲料ALA/LA对克氏原螯虾全虾、肌肉水分和肌肉灰分含量无显著影响, 全虾灰分含量存在差异可能是由于克氏原螯虾蜕壳不同步等因素造成的。在本研究中, 随饲料ALA/LA的升高, 肌肉蛋白质含量呈上升趋势, 脂肪含量呈先增后降的趋势, 说明适当ALA/LA可提高肌肉蛋白质和脂肪的积累, 类似结果在凡纳滨对虾[7]、大盖巨脂鲤[24]、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)[26]、印度对虾(*Penaeus indicus H. Milne Edwards*)[27]、鳜(*Siniperca chuatsi*)[28]等研究中也有报道, 如大盖巨脂鲤饲料ALA/LA为0.94时可以显著提高脂肪合成基因的表达[24]。肌肉脂肪酸的组成与饲料脂肪酸组成正相关[2], 本实验研究发现, 肌肉LA和 ALA水平均在饲料ALA/LA为0.74时有最大值, 而Σn-3/Σn-6 PUFA比值有最低值, ∑SFA∶∑MUFA∶∑PUFA为1∶1.1∶1.4, 反映出饲料适宜ALA/LA对肌肉PUFA脂肪酸沉积有正面作用。在本研究中, 饲料ALA/LA为1.35时肌肉硬度、咀嚼性、回复性和内聚力最小, 可能是由于肌肉脂肪含量升高让肌肉硬度等质构特性降低, 且低硬度易咀嚼的克氏原螯虾肌肉适合婴幼儿和老年人食用[14]。

3.3 饲料ALA/LA对克氏原螯虾消化能力的影响

消化酶活性通常直接反映动物消化吸收能力, 从而影响对饲料的利用和生长性能[18]。在本研究中, 饲料中适宜的ALA/LA显著提高了克氏原螯虾肝胰脏及肠道蛋白酶、肠道脂肪酶和肠道淀粉酶活性, 表明适宜的ALA/LA可以提高克氏原螯虾的消化能力。草鱼[20]饲料中ALA/LA为0.68—1.76时能够显著提高肝胰腺和肠道胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性, 其中最佳比值为1.03, 这与本研究结果相似。斑节对虾饲料中ALA和LA含量分别为10和15 g/kg时能够提高脂肪消化率[12], 与上述结果相似。饲料中脂肪酸主要在肝胰腺消化吸收, 本研究中肝胰腺脂肪酶活性呈先降后增的趋势, 与之前对草鱼的研究结果不一致, 可能由于食性不同，有待进一步研究。

肝胰腺是甲壳动物重要的消化吸收器官。肝小管包含B细胞(分泌细胞)、R细胞(存储细胞)、F细胞(纤维细胞)和E细胞(胚细胞), 其B细胞和R细胞数量较多[29]。在本研究中, 饲料ALA/LA过高或偏低时, 肝小管管腔均会扩张, 不利于肝胰腺健康，进而说明适宜ALA/LA可以保护肝胰腺组织结构。R细胞被认为是肝胰腺组织中营养储备的主要场所[29]。在本研究中, 肝胰腺R细胞数在饲料ALA/LA为1.28时最高, 此时肝胰腺营养物质储存能力最强。肠道是营养物质分解和吸收的重要器官, 绒毛长度和宽度增加会增强吸收消化营养物质的能力, 从而提高动物生长性能[30]。在本研究中, 随饲料ALA/LA升高, 肠绒毛长度和宽度均呈先增后减的趋势, 与肠道消化酶活性相对应, 说明适宜ALA/LA可以改善克氏原螯虾肠道健康，从而提高营养物质消化吸收, 相似结果在凡纳滨对虾[31]中也有报道。

3.4 饲料ALA/LA对克氏原螯虾健康的影响

血清生化指标常常被用于评价水产动物的健康状况、营养水平和对环境的适应性等。AST和ALT是反映肝脏健康的两个重要指标。在组织受到损伤或病变时, 组织细胞坏死, 导致大量转氨酶进入血液, 引起血清AST和ALT活性升高[17, 32]。研究表明, 凡纳滨对虾[31]和松浦镜鲤(*Cyprinus carpio Songpu mirror*)[32]血清AST和ALT活性并不受饲料ALA/LA的影响, 而罗非鱼[25]饲料中添加ALA可以显著降低血清AST和ALT活性。本研究中ALA/LA为0.38—0.74时, ALT活性较对照组显著下降, 但过高的ALA/LA (4.54)却显著提高了血清AST和ALT活性。这说明饲料中适宜ALA/LA对克氏原螯虾的肝胰腺健康具有保护作用, 但过高水平的n-3PUFA可能会损坏肝脏。具体机理在肝脏抗氧化性能部分会进一步讨论。血清TG和TCHO含量往往反映机体脂肪代谢水平的状况[17], 研究表明ALA具有降脂功能[32], 在本研究中, 可能由于饲料脂肪含量并未添加过高, ALA/LA不影响血清TG和TCHO含量。

甲壳动物主要依靠细胞免疫和体液免疫来抵抗外界不良刺激, 维持健康状态[33]。肝胰腺是主要的抗氧化器官, 在非特异性免疫中起着不可替代的作用。T-AOC是机体内抗氧化能力的整体表现, 包含SOD和CAT酶促体系和含谷胱甘肽、维生素和葡萄糖的非酶促体系[34]。SOD是清除体内超氧阴离子的重要酶类, 也是机体内以超氧阴离子为反应底物的酶, 其作用是通过催化超氧阴离子歧化为H_2O和O_2, 维持机体处于最佳状态[34]。MDA是氧自由基引发脂质过氧化作用形成的最终有害产物, MDA含量的高低反映机体内脂质过氧化的强弱, 间接反映机体细胞受到氧自由基攻击后的受损程度, 其含量越高说明机体损伤越严重[34]。本研究中T-AOC、SOD和CAT在ALA/LA为0.74—2.37均显著升高, MDA含量在ALA/LA为0.38—0.74时显著降低, 这表明适宜比例的ALA/LA可提高机体抗氧化性能, 但当ALA/LA过高时, 意味着饲料中含有高比例的n-3 PUPA。n-3 PUPA易受氧或其他自由基的攻击, 产生对机体有害的过氧化产物, 继而损害

机体抗氧化能力, 会对肝脏造成损伤, 让机体处于亚健康状态, 相似结果在日本沼虾[35]、凡纳滨对虾[36]和大黄鱼[21]中均有报道。上述结果进一步说明适宜的ALA/LA有利于肝细胞的氧化与抗氧化平衡, 但脂肪酸被氧化的量一旦超过这种调节能力, 肝脏就可能受到损伤, 使机体处于亚健康状态。

4 结论

适宜饲料ALA/LA通过提高免疫能力、消化能力和改善肝胰腺、肠道健康, 促进克氏原螯虾生长, 且可以提高肌肉营养价值和口感。综合分析, 建议克氏原螯虾饲料中ALA/LA为0.45—0.46, 此时饲料中对应的亚油酸和亚麻酸水平分别为19.58—20.97和11.00—12.39 g/kg。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

[1] Sui L, Wille M, Cheng Y, *et al*. The effect of dietary n-3 HUFA levels and DHA/EPA ratios on growth, survival and osmotic stress tolerance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* larvae [J]. *Aquaculture*, 2007, **273**(1): 139-150.

[2] Xu H, Turchini G M, Francis D S, *et al*. Are fish what they eat? A fatty acid's perspective [J]. *Progress in Lipid Research*, 2020(80): 101064.

[3] Tocher D R. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective [J]. *Aquaculture*, 2015(449): 94-107.

[4] Bell J G, McEvoy J, Tocher D R, *et al*. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism [J]. *The Journal of Nutrition*, 2001, **131**(5): 1535-1543.

[5] Regost C, Arzel J, Robin J, *et al*. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*) [J]. *Aquaculture*, 2003, **217**(1/2/3/4): 465-482.

[6] Qin Y, He L, Wang Y, *et al*. Growth performance, fatty acid composition, and lipid metabolism are altered in groupers (*Epinephelus coioides*) by dietary fish oil replacement with palm oil [J]. *Animal Nutrition*, 2022, **8**(1): 102-113.

[7] Zhang H, Liu M, Shao R, *et al*. The effects of different lipid sources on the growth, intestinal health, and lipid metabolism of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Aquaculture*, 2022(548): 737655.

[8] Wu F, Gu Z, Chen X, *et al*. Effect of lipid sources on growth performance, muscle composition, haemolymph biochemical indices and digestive enzyme activities of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2021, **27**(6): 1996-2006.

[9] Tian J, Tu W, Wen H, *et al*. Optimal dietary linoleic acid requirement for the advanced juvenile GIFT strain of nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, **23**(1): 104-116. [田娟, 涂玮, 文华, 等. 吉富罗非鱼对饲料亚油酸的需要量 [J]. 中国水产科学, 2016, **23**(1): 104-116.]

[10] Yang Z, Guo Z, Ji L, *et al*. Cloning and tissue distribution of a fatty acyl Δ6-desaturase-like gene and effects of dietary lipid levels on its expression in the hepatopancreas of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 2013, **165**(2): 99-105.

[11] Wang X, Jin M, Cheng X, *et al*. Lipidomic profiling reveals molecular modification of lipids in hepatopancreas of juvenile mud crab (*Scylla paramamosain*) fed with different dietary DHA/EPA ratios [J]. *Food Chemistry*, 2022(372): 131289.

[12] Glencross B D, Smith D M, Thomas M R, *et al*. The effect of dietary n-3 and n-6 fatty acid balance on the growth of the prawn *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2002, **8**(1): 43-51.

[13] Xu L, Chen X, Wen H, *et al*. Dietary phosphorus requirement of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. *Aquaculture Research*, 2022, **53**(4): 1293-1303.

[14] Tian J, Xu Q Q, Tian L, *et al*. The muscle composition analysis and flesh quality of *Procambarus clarkia* in the Dongting Lake [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, **41**(4): 870-877. [田娟, 许巧情, 田罗, 等. 洞庭湖克氏原螯虾肌肉成分分析及品质特性分析 [J]. 水生生物学报, 2017, **41**(4): 870-877.]

[15] Yu X J, Hao X J, Yang L K, *et al*. China crayfish industry development report (2023) [J]. *China Fisheries*, 2023, **572**(7): 26-31. [于秀娟, 郝向举, 杨霖坤, 等. 中国小龙虾产业发展报告(2023) [J]. 中国水产, 2023, **572**(7): 26-31.]

[16] Gao F, Liu M, Tang J, *et al*. Partial replacement of dietary fish oil by beef tallow does not impair antioxidant capacity and innate immunity of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Aquaculture Research*, 2021, **52**(7): 3310-3321.

[17] Peng D, Chen X R, Wen H, *et al*. Effects of dietary lipid levels on growth performance, muscle composition, reproductive performance and hemolymph biochemical indices of *Procambarus clarkii* broodstock [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, **43**(10): 2175-2185. [彭迪, 陈效儒, 文华, 等. 饲料脂肪水平对克氏原螯虾亲虾生长性能、肌肉成分、繁殖性能以及血淋巴生化指标的影响 [J]. 水产学报, 2019, **43**(10): 2175-2185.]

[18] The National Research Council of the National Academies. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp [M]. Washington D C: National Academies Press, 2011.

[19] Wang S S, Zhu H J, Wang J Y. Nutritional requirements of penaeus orient alis for linoleic acid and linolenic acid

[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1993, **17**(1): 1-6. [王树森, 朱会杰, 王剑英. 中国对虾对亚油酸、亚麻酸的营养需要量 [J]. 水产学报, 1993, **17**(1): 1-6.]

[20] Zeng Y Y, Jiang W D, Liu Y, *et al*. Optimal dietary alpha-linolenic acid/linoleic acid ratio improved digestive and absorptive capacities and target of rapamycin gene expression of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2016, **22**(6): 1251-1266.

[21] Zuo R, Mai K, Xu W, *et al*. Dietary ALA, but not LNA, increase growth, reduce inflammatory processes, and increase anti-oxidant capacity in the marine finfish *Larimichthys crocea*: dietary ALA, but not LNA, increase growth, reduce inflammatory processes, and increase anti-oxidant capacity in the large yellow croaker [J]. *Lipids*, 2015, **50**(2): 149-163.

[22] Fei S, Liu C, Xia Y, *et al*. The effects of dietary linolenic acid to linoleic acid ratio on growth performance, tissues fatty acid profile and sex steroid hormone synthesis of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Aquaculture Reports*, 2020(17): 100361.

[23] Nayak M, Giri S S, Pradhan A, *et al*. Effects of dietary α-linolenic acid/linoleic acid ratio on growth performance, tissue fatty acid profile, serum metabolites and Δ6 fad and elovl5 gene expression in silver barb (*Puntius gonionotus*) [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, **100**(4): 1643-1652.

[24] Paulino R R, Pereira R T, Fontes T V, *et al*. Optimal dietary linoleic acid to linolenic acid ratio improved fatty acid profile of the juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) [J]. *Aquaculture*, 2018(488): 9-16.

[25] Orlando T M, Fontes T V, Paulino R R, *et al*. Effects of the dietary linoleic acid to linolenic acid ratio for nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) breeding females [J]. *Aquaculture*, 2020(516): 734625.

[26] Luo N, Ding Z, Kong Y, *et al*. An evaluation of increasing linolenic acid level in the diet of *Macrobrachium nipponense*: Lipid deposition, fatty acid composition and expression of lipid metabolism-related genes [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2018, **24**(2): 758-767.

[27] Chandge M S, Paulraj R. Requirements of linoleic and linolenic acid in the diet of Indian white prawn *Penaeus indicus*, (H Milne Edwards) [J]. *Indian Journal of Marine Sciences*, 1998(27): 402-406.

[28] Li L, Liang X F, Cai W, *et al*. Dietary with proper ratio of alpha-linolenic acid to linoleic acid enhanced the unsaturated fatty acids deposition of Chinese perch (*Siniperca Chuatsi*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2021, **27**(S1): 73-85.

[29] Huang Y, Guo Y Z, Lou G G, *et al*. Dietary aflatoxin B_1 on growth, antioxidant capacity and histology in hepatopancreas of juvenile red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, **47**(2): 279-289. [黄莹, 郭雅哲, 娄格格, 等. 饲料中黄曲霉毒素B_1对克氏原螯虾幼虾生长、饲料利用和肝胰腺组织结构的影响 [J]. 水生生物学报, 2023, **47**(2): 279-289.]

[30] Wang Y Y, Cheng Y X, Li C L, *et al*. Effects of desiccation on survival, metabolism-related enzymes and histological structure of adult red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. *South China Fisheries Science*, 2021, **17**(5): 34-44. [王源源, 成永旭, 李晨露, 等. 干露对克氏原螯虾成虾存活、相关代谢酶及组织结构的影响 [J]. 南方水产科学, 2021, **17**(5): 34-44.]

[31] Liu S H, Cao J M, Huang Y H, *et al*. Effects of different dietary linolenic acid/linoleic acid ratios on growth performance and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, **22**(5): 1413-1421. [刘穗华, 曹俊明, 黄燕华, 等. 饲料中不同亚麻酸/亚油酸比对凡纳滨对虾幼虾生长性能和脂肪酸组成的影响 [J]. 动物营养学报, 2010, **22**(5): 1413-1421.]

[32] Peng X H, Xu T, Lin S M, *et al*. Effects of different linseed oil level on liver function and lipid metabolism of *Oreochromis niloticus* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2016, **46**(1): 73-79. [彭祥和, 徐韬, 林仕梅, 等. 不同水平亚麻籽油对罗非鱼肝功能和脂质代谢的影响 [J]. 淡水渔业, 2016, **46**(1): 73-79.]

[33] Tian J J, Lei C X, Ji H. Influence of dietary linoleic acid (18: 2n-6) and α-linolenic acid (18∶3n-3) ratio on fatty acid composition of different tissues in freshwater fish Songpu mirror carp, *cyprinus Carpio* [J]. *Aquaculture Research*, 2016, **47**(12): 3811-3825.

[34] Zhang Y, Li Z, Kholodkevich S, *et al*. Cadmium-induced oxidative stress, histopathology, and transcriptome changes in the hepatopancreas of freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. *The Science of the Total Environment*, 2019(666): 944-955.

[35] Luo N, Ding Z L, Zhang Y X, *et al*. Effects of dietary linolenic acid content on growth, antioxidant capacity, non-specific immunity and anti-ammonia-nitrite stress ability of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, **29**(1): 134-146. [罗娜, 丁志丽, 张易祥, 等. 饲料亚麻酸含量对日本沼虾生长、抗氧化能力、非特异性免疫性能及抗氨氮胁迫能力的影响 [J]. 动物营养学报, 2017, **29**(1): 134-146.]

[36] Li E, Chen L, Zeng C, *et al*. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities [J]. *Aquaculture*, 2008, **274**(1): 80-86.

OPTIMAL RATIO OF LINOLENIC ACID TO LINOLEIC ACID IN THE DIET OF *PROCAMBARUS CLARKII*

MA Shi-Hao[1], XIAO Wen-Fu[1, 2], XIE Shou-Qi[3], ZHANG Jian-Min[2], DONG Li-Xue[2], WEN Hua[2], JIANG Ming[2], GAO Wei-Hua[1] and TIAN Juan[1, 2]

(1. *Hubei Key Laboratory of Waterlogging Disaster and Agricultural Use of Wetland*, *Yangtze University*, *Jingzhou* 434024, *China*; 2. *Yangtze River Fisheries Research Institute*, *Chinese Academy of Fishery Sciences*, *Wuhan* 430223, *China*; 3. *Institute of Hydrobiology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Wuhan* 430072, *China*)

Abstract: Aquatic animals are unable to synthesize n-3 and n-6 series of polyunsaturated fatty acids (PUFA) *de novo*, and mainly obtain PUFA from feed to support growth and reproduction. The proportion of essential fatty acids in diet is crucial to meet these dietary fatty acid requirements. To investigate the ratio of linolenic acid to linoleic acid (ALA/LA) in diet of *Procambarus clarkii*, six experimental diets were formulated with ALA/LA ratios of 0.14 (R_1), 0.38 (R_2), 0.74 (R_3), 1.28 (R_4), 2.37 (R_5), and 4.54 (R_6). *P. clarkii* with an initial body weight of (5.99±0.12) g were selected for an 8-week feeding and growth experiment. The results showed that the weight gain rate, specific growth rate, and muscle crude fat content were the highest in the R_3 group, which also had the lowest feed coefficient. The gonad index was the highest in the R_2 group. The R_3 group exhibited the highest muscle crude fat and Σn-6 PUFA content, while the R_6 group exhibited the highest muscle protein content. The serum glutamic oxalacetic transaminase and glutamic pyruvic transaminase activities were significantly lower in groups with an ALA/LA ratio between 0.38 and 0.74. The dietary ALA/LA ratio significantly affected hepatopancreas and intestinal digestive enzyme activities. The activities of catalase and superoxide dismutase in hepatopancreas reached the maximum in the R_3 and R_4 groups, respectively. The R_3 group had the lowest malondialdehyde content in the hepatopancreas. Additionally, intestinal villus width was significantly increased in the R_3 group, and the number of hepatopancreas B cells was significantly higher in the R_4 group than that in the other groups. The gonadosomatic index of *P. clarkii* was significantly increased with an ALA/LA ratio between 0.38 and 0.74. The broken-line regression analysis indicated that the optimal dietary ALA/LA ratio for *P. clarkii* was between 0.45 and 0.46.

Key words: Linolenic acid; Linoleic acid; Growth performance; Digestibility; *Procambarus clarkii*