

doi: 10.7541/2013.24

高比例棉粕饲料中补充蛋氨酸对中华绒螯蟹幼蟹 摄食、生长及抗氧化酶活性的影响

孙立梅 陈立侨 李二超 陈彦良 黎明
姜海波 孙盛明 江星 齐霁

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要:以40%棉粕为主的混合蛋白源制成基础饲料, 分别在其中添加0.00%、0.14%、0.28%、0.42%、0.56%蛋氨酸(分别记为0.00%Met、0.14%Met、0.28%Met、0.42%Met和0.56%Met), 配制了5种等氮等能的试验饲料, 以全鱼粉组(64.4%鱼粉)作为对照, 探讨了在高比例棉粕饲料中补充蛋氨酸对中华绒螯蟹幼蟹(0.39±0.02)g的摄食率、生长率和机体抗氧化酶活性的影响。结果表明: 与全鱼粉对照组相比, 0.42%Met组的增重率、特定生长率和饲料系数均无显著差异($P>0.05$), 但其显著高于0.00%Met、0.14%Met和0.28%Met组($P<0.05$); 增重率和特定生长率则显著高于0.56%Met组($P<0.05$); 从幼蟹的摄食量和蛋白质沉积率来看, 0.42%Met和0.28%Met组的摄食量与对照组相似, 当蛋氨酸的补充量低于0.28%或高于0.42%时, 幼蟹的摄食量均有所下降; 统计表明, 对照组的蛋白质沉积率最高(23.20%), 在各试验组中, 0.28%Met和0.42%Met组之间的蛋白质沉积率无显著差异($P>0.05$), 但显著高于0.00%Met、0.14%Met和0.56%Met组($P<0.05$); 分析幼蟹的肠道胰蛋白酶活性, 发现0.42%Met组与对照组之间无显著性差异($P>0.05$), 但均显著高于其他各试验组($P<0.05$); 0.28%Met、0.42%Met和0.56%Met处理组的血清丙二醛含量、超氧化物歧化酶活性和谷胱甘肽过氧化物酶活性与对照组无显著差异($P>0.05$)。结果提示, 在高比例植物蛋白(40%棉粕)的基础饲料中, 补充0.42%Met能够显著提高中华绒螯蟹幼蟹的生长率、消化率和抗氧化酶的活性。

关键词: 中华绒螯蟹; 蛋氨酸; 棉粕替代; 摄食; 生长; 抗氧化酶

中图分类号: S968.25 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)02-0336-08

随着全球养殖业对鱼粉需求量的提高和价格的不断攀升, 以棉粕、豆粕等植物蛋白合理替代鱼粉, 已经成为水产动物营养研究的一个重要内容^[1,2]。由于植物蛋白源中存在多种抗营养因子, 且有些必需氨基酸的量偏低, 因此, 用植物蛋白源替代鱼粉会导致适口性、消化率和蛋白质同化效率的下降, 从而影响水生动物的摄食和生长^[3-5]。为了改善饲料中氨基酸平衡, 提高利用率, 往往需要在基础饲料中添加蛋氨酸等限制性氨基酸, 以优化饲料中氨基酸的比例和含量, 提高其营养价值。蛋氨酸是水生动

物的含硫必需氨基酸, 在体内参与蛋白质的合成, 对动物体的生长发育起重要作用^[6]。研究发现, 日粮中缺乏蛋氨酸时, 会抑制虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[7]、杂交狼鲈(*Morone saxatilis*×*M. chrysops*)^[8]的摄食和生长, 并引起一些生理性病变。外源补充蛋氨酸可显著提高鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[9]、幼印度鲤(*Cirrhinus mrigala*)^[10]和尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)^[11]的摄食效率和生长性能。此外, 蛋氨酸及其衍生物具有鲜肉味, 被认为是一种较好的诱食剂^[12]。有研究表明, 蛋氨酸能够刺激黄颡鱼(*Pelteobagrus*

收稿日期: 2012-07-30; 修订日期: 2012-12-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31172422); 公益性行业(农业)科研专项(No. 201003020, 201203065); 国家基础研究973计划(2009CB118702); “十二五”国家科技支撑计划课题(2012BAD25B00); 上海市中华绒螯蟹现代农业产业技术体系建设和上海市科委重点项目(No.10JC1404100)部分资助

作者简介: 孙立梅(1988—), 女, 山东烟台人; 硕士; 主要从事水生动物营养研究。E-mail: slmei1988@126.com

通信作者: 陈立侨, E-mail: lqchen@bio.ecnu.edu.cn

fulvidraco)^[13]、龙虾(*Panulirus penicillatus*)^[14]和毛虾(*Acetes japonicus*)^[14]等水生动物的嗅觉和味觉, 发挥良好的诱食作用。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)是我国特有的淡水名优养殖品种, 在我国的淡水渔业中占有重要的地位。有关其配合饲料中用植物蛋白替代鱼粉引起氨基酸比例失衡, 导致蟹的适口性和摄食率下降已有一些报道^[15, 16], 而在高比例植物蛋白饲料中补充诱食性氨基酸, 以改善饲料适口性和营养价值的研究尚未见报道。

实验室的前期工作发现^[17], 以20%、40%和66%不同棉粕水平为主的混合植物蛋白源替代含64.4%鱼粉的饲料, 饲喂0.06 g 中华绒螯蟹的结果表明, 当饲料中棉粕占20%时, 对幼蟹的摄食和生长性能有一定的不良影响, 当棉粕的比例升高到40%时, 幼蟹的生长性能和消化酶活性均显著低于全鱼粉组(64.4%鱼粉), 但其影响幼蟹摄食和生长的具体原因尚不清楚。为此, 本研究以40%的高比例棉粕为主的复合蛋白源制成基础饲料, 从改善适口性和补充氨基酸两方面入手, 探讨外源补充蛋氨酸对中华绒螯蟹幼蟹摄食、生长率和抗氧化酶活性的影响, 以期为提高植物蛋白的利用效率, 完善中华绒螯蟹的人工饲料配方提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验饲料

本试验以鱼粉和复合植物蛋白为蛋白源, 鱼油和豆油(1:1)为脂肪源配制基础饲料(棉粕占40%) (表1)。分别在其中添加0.00%、0.14%、0.28%、0.42%、0.56%蛋氨酸作为试验饲料, 并以全鱼粉组(鱼粉占64.4%)作为对照, 以不同比例的植物蛋白源调节总氮平衡, 以鱼油和豆油平衡脂肪和总氮, 共制备等氮(粗蛋白, 44%)等能(总氮, 21 kJ/g)的6组饲料(表1)。在饲料中添加0.5%的Cr₂O₃作为指示剂。将大料粉碎后过80目筛, 然后将预混料、羧甲基纤维素钠和蛋氨酸等微量原料进行预混合, 再加入原料中逐级充分混匀。加入油脂和适量水, 用绞肉机挤压成直径为2 mm的颗粒饲料, 风干至水分含量小于10%, 于-20℃冰箱保存备用。

1.2 试验动物驯化、分组与管理

试验用中华绒螯蟹幼蟹购自上海崇明养殖场。幼蟹暂养两周后, 随机挑取规格相似, 平均体重

表1 基础配方组成及营养分析

Tab. 1 Formulation and proximate analysis of the basal diets (%)

成分 Ingredients	全鱼粉组 FM group	补充蛋氨酸组 Met group
鱼粉 Fish meal	64.4	15
棉粕 Cottonseed meal	0	40
豆粕 Soybean meal	0	14.8
花生粕 Peanut cake	0	8
菜粕 Rapeseed meal	0	4
玉米淀粉 Cornstarch	15.4	1.5
纤维素 Cellulose	9.7	3
豆油 Soybean oil	1	2.6
鱼油 Fish oil	1	2.6
卵磷脂 Lecithin	0.5	0.5
胆固醇 Cholesterol	0.5	0.5
复维 Vitamin premix	2	2
复矿 Mineral premix	3	3
粘合剂 Binder	2	2
Cr ₂ O ₃	0.5	0.5
营养成分 Nutritional composition (%)		
蛋氨酸 Methionine	0.92	0.36
赖氨酸 Lysine	3.84	2.67
粗蛋白 Crude protein	44.37	44.20
粗脂肪 Crude lipid	8.05	8.00
总能 Gross energy (kJ/g)	21.46	21.45

注: ¹ 矿物质混合物组成 Mineral mixture (%): NaH₂PO₄·2H₂O, 13.00; KH₂PO₄, 21.50; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 24.733; CaCO₃, 14.665; Ca-lactate, 16.5; MgSO₄, 4.88; AlCl₃, 0.945; ZnSO₄·7H₂O, 0.511; Fe-citrate, 0.061; MnSO₄·H₂O, 0.108; KI, 0.058; CuCl₂·2H₂O, 0.0647; CoCl₂·6H₂O, 0.176; KCl, 2.8; ² 维生素混合物组成 Vitamin mixture (mg/100g 混合物): 维生素 A Vitamin A, 420000 IU; 维生素 C Vitamin C, 6000 mg; 维生素 E Vitamin E, 2000 mg; 维生素 D₃ Vitamin D₃, 120000 IU; 维生素 K Vitamin K, 1000 mg; 维生素 B₁ Vitamin B₁, 1000 mg; 维生素 B₂ Vitamin B₂, 1000 mg; 维生素 B₆ Vitamin B₆, 1600 mg; 维生素 B₁₂ Vitamin B₁₂, 2mg; 烟酸 Niacin, 5000 mg; 叶酸 Folic acid, 400 mg; 肌醇 Inositol, 6000 mg; 生物素 Biotin, 10 mg; 泛酸钙 Calcium pantothenic, 3500 mg

(0.39±0.02) g 的个体用于试验。试验共设6个处理组, 每组5个平行, 随机将幼蟹放入聚乙烯塑料水族箱(规格为80 cm×60 cm×60 cm), 每箱30只。水箱中放置数片拱形瓦片供蟹栖息藏匿, 水族箱有效养殖水体约100 L。试验期间, 采用饱食投喂法, 每天上午8:00和下午16:30投喂2次。投喂前收集粪便, 投喂2h后回收残饵, 每天统计死亡情况, 及时将死蟹取出并称重。补充经充分曝气、除氯处理的养殖用水, 每日换水1/3—1/2, 试验为期6周。养殖期间, 水温为23.0—28.5℃, 溶解氧为6.28—8.75 mg/L, 总氮<0.01 mg/L, pH为8.0±0.4。

1.3 样品收集和分析

养殖试验结束时, 禁食 24h 后称重, 统计幼蟹存活率。每个水族箱随机选取 5 只蟹保存于 -20°C 冰箱, 用于体成分分析。另随机选取 10 只蟹, 冰浴麻醉, 用未涂抹肝素的 1 mL 注射器取血淋巴, 4°C 静置过夜, 5000 r/min 离心 10min, 取血清保存于 -80°C 待测。取血后的蟹解剖取肠道, -80°C 保存备用。

全蟹的常规体生化成分分析参考 AOAC^[18] 的标准方法。粗蛋白测定采用凯氏定氮法(FOSS, Kjeltac 2200, Denmark), 水分测定采用 105°C 烘干法(24h), 粗脂肪测定采用索氏抽提法(FOSS, SoxtecTM 2043, Denmark), 灰分测定采用马弗炉 550°C 灼烧法(14h)。指示剂 Cr_2O_3 的测定采用湿式酸消解法^[19]。

粗酶液的制备: 用电子天平准确称取肠道重, 按质量体积比 1 : 9 加入预冷磷酸缓冲液(PBS, pH 7.0, 1.0 mol/L)制成 10% 匀浆液, 2500 r/min 离心 10min, 取上清液待测。用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定胰蛋白酶活性, 定义在 pH 8.0, 37°C 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 为一个酶活性单位。蛋白含量采用考马斯亮兰法。

丙二醛含量、超氧化物歧化酶活性和谷胱甘肽过氧化物酶活性均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。丙二醛含量的测定采用 TBA 法, 基于过氧化脂质降解产物中的丙二醛(MDA)可与硫代巴比妥酸(TBA)缩合, 形成红色产物, 在 532 nm 处有最大吸收峰; 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定是依据抑制 NBT(硝基蓝四氮唑)减少 50% 时所需要的超氧化物歧化酶含量, 在 550nm 处测定吸光度, 超氧化物歧化酶活性表示为每毫升反应液中 SOD 抑制力达 50% 时所对应的 SOD 量为一个酶活性单位(U/mL)。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的活性以过氧化氢催化 GSH(还原型谷胱甘肽)的反应速度来表示, 在 421 nm 处测定吸光度, 定义每 0.1 mL 血清在 37°C 反应 5min, 扣除非酶促反应作用, 使反应体系中 GSH 浓度降低 $1\ \mu\text{mol/L}$ 为一个酶活性单位(U/mL)。

1.4 计算方法

幼蟹的生长指标和表观消化率参照以下计算公式:

$$\text{增重率(Weight gain, \%)} = (W_f - W_i) / W_i \times 100\%$$

$$\text{特定生长率(Specific growth rate, \% / d)} = (\text{Ln}W_f - \text{Ln}W_i) / d \times 100\%$$

$$\text{摄食量(Feed intake, g/crab)} = IT / N_f$$

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

$$\text{蛋白质沉积率(Protein retention, \%)} = IP / IN \times 100\%$$

$$\text{营养组分的表观消化率(\%)} = 100 \times [1 - (\text{饲料中 } \text{Cr}_2\text{O}_3\% \times \text{粪便中营养组分\%}) / (\text{粪便中 } \text{Cr}_2\text{O}_3\% \times \text{饲料中营养组分\%})];$$

$$\text{干物质的表观消化率(\%)} = 100 - (100 \times \text{饲料中 } \text{Cr}_2\text{O}_3\% / \text{粪便中 } \text{Cr}_2\text{O}_3\%)$$

其中 N_f 、 N_i 为试验结束和开始时的蟹个体数; W_f 、 W_i 为试验结束和开始时蟹体平均湿重(g); W 为试验结束后蟹总重与试验前蟹总重之差(总增重); IT 为试验期间蟹总摄食饲料干重; IN 为试验期间蟹总摄食饲料蛋白质干重; IP 为试验期间蟹蛋白质增加量; d 为试验天数(42d)

1.5 数据分析

实验数据均以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示, 经 SPSS17.0 分析软件分析单因素方差(One-way ANOVA)后, 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 补充蛋氨酸对幼蟹的生长性能和饲料系数的影响

在饲料中补充蛋氨酸对中华绒螯蟹幼蟹的生长性能和饲料系数的影响(表 2)。从表 2 可见, 0.00%Met 组幼蟹的成活率显著低于其他各处理组($P < 0.05$)。随着饲料中蛋氨酸水平的升高, 幼蟹的增重率和特定生长率先升高后降低, 至补充 0.42%Met 时达到最高值, 该处理组的增重率和特定生长率分别为 725.13% 和 5.02%/d, 与全鱼粉对照相比无显著性差异($P > 0.05$), 而 0.56%Met 组的增重率和特定生长率则显著低于 0.42%Met 组。0.28%Met 和 0.42%Met 组幼蟹的摄食量和蛋白质沉积率无显著性差异($P > 0.05$), 但两者均显著高于 0.00%Met、0.14%Met 和 0.56%Met 组($P < 0.05$)。饲料系数却在 0.42%Met 组达到最低值 1.87, 显著低于 0.00%Met、0.14%Met、0.28%Met 组($P < 0.05$), 且与对照组无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 蟹体的生化组成

在饲料中补充蛋氨酸对中华绒螯蟹幼蟹蟹体的水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量的影响(表 3)。0.00%Met 组幼蟹的体粗蛋白含量显著低于其他各

处理组($P<0.05$), 随着饲料蛋氨酸水平的升高, 蟹体蛋白上升至 12.36%后趋于稳定。其中, 0.28%Met、0.42%Met 和 0.56%Met 组之间无显著差异($P>0.05$)。从表 3 可见, 补充不同水平蛋氨酸, 对幼蟹蟹体的水分、粗脂肪和灰分含量无显著的影响($P>0.05$)。

2.3 营养物质的表观消化率和肠道胰蛋白酶活性

试验结果表明, 干物质和粗脂肪表观消化率在 0.14%Met、0.28%Met、0.42%Met 和 0.56%Met 组之间无显著差异($P>0.05$), 且均显著高于 0.00%Met 组($P<0.05$)(表 4); 粗蛋白的表观消化率与幼蟹肠道胰蛋白酶活性的变化趋势相同, 均在 0.42%Met 组达到最高值, 分别为 91.41%和 930.16 U/mg prot, 显著高于 0.00%Met、0.14%Met、0.28%Met、0.56%Met 组($P<0.05$), 与对照组相比则无显著性差异($P>0.05$)。

2.4 血清的抗氧化酶活性和脂质过氧化程度

表 5 显示了补充不同水平蛋氨酸对幼蟹血清丙

二醛含量、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响。其中, 0.28% Met、0.42%Met、0.56%Met 组的血清丙二醛含量和全鱼粉组之间无显著差异($P>0.05$), 但均显著低于 0.00%Met 和 0.14%Met 组($P<0.05$)。但是, 分析幼蟹血清的超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性, 发现当饲料中补充 0.28%—0.56% Met 时, 上述两种酶的活性显著高于 0.00% Met 组($P<0.05$), 与对照组相比则差异不明显($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 补充蛋氨酸对中华绒螯蟹幼蟹生长、饲料利用和体成分的影响

水生动物摄取食物主要通过嗅觉或味觉来辨认食物的方位和特征, 其摄食行为很大程度上取决于食物本身化学溶出物的信息特征, 诱食剂就是根据这一特征而确定的^[20]。本研究发现, 在棉粕占 40%

表 2 不同蛋氨酸水平对中华绒螯蟹生长性能和饲料利用的影响
Tab. 2 Growth performance, feed utilization of *E. sinensis* fed on the experimental diets

项目 Item	试验处理 Treatment					
	全鱼粉组 FM	0.00%Met	0.14%Met	0.28%Met	0.42%Met	0.56%Met
增重率 Weight gain rate (%)	728.65±7.08 ^a	580.34±14.26 ^d	632.48±20.97 ^c	669.47±10.97 ^{bc}	725.13±5.78 ^a	652.38±11.06 ^b
特定生长率 Specific growth rate (%/d)	5.03±0.02 ^a	4.57±0.05 ^d	4.74±0.07 ^c	4.86±0.04 ^{bc}	5.02±0.02 ^a	4.80±0.04 ^{bc}
摄食量 Feed intake (g/crab)	5.05±0.09 ^a	4.71±0.07 ^c	4.89±0.05 ^b	5.07±0.06 ^a	5.06±0.08 ^a	4.87±0.07 ^b
饲料系数 Feed efficiency ratio	1.87±0.08 ^{cd}	2.13±0.08 ^a	1.98±0.09 ^b	1.94±0.08 ^{bc}	1.79±0.05 ^d	1.83±0.07 ^{cd}
蛋白质沉积率 Protein retention (%)	23.20±0.83 ^a	14.68±0.59 ^e	16.60±0.68 ^d	20.60±0.65 ^b	20.64±0.65 ^b	19.59±0.54 ^e
成活率 Survival rate (%)	90.67±1.63 ^a	80.00±1.49 ^b	85.33±0.82 ^a	87.33±1.25 ^a	88.00±2.71 ^a	86.67±2.36 ^a

注: 表中同一行右上角小写字母不同表示差异显著($P<0.05$); 下同

Note: Values with different subscripts in the same row indicate significant difference ($P<0.05$) between groups; the same applies bellow

表 3 不同蛋氨酸水平对中华绒螯蟹全蟹体组成的影响
Tab. 3 Whole body composition of *E. sinensis* fed on the experimental diets

项目 Item	试验处理 Treatment					
	全鱼粉组 FM	0.00%Met	0.14%Met	0.28%Met	0.42%Met	0.56%Met
水分 Moisture (%)	72.69±0.87	73.24±1.23	72.62±1.02	72.97±0.97	72.38±0.98	72.29±1.26
粗蛋白 Crude protein (%)	12.60±0.11 ^a	11.65±0.19 ^c	12.10±0.07 ^b	12.36±0.11 ^{ab}	12.53±0.08 ^a	12.21±0.17 ^{ab}
粗脂肪 Crude lipid (%)	3.46±0.13	3.57±0.22	3.39±0.20	3.48±0.16	3.61±0.08	3.84±0.17
灰分 Ash (%)	11.25±0.02	11.53±0.05	11.89±0.05	11.18±0.03	11.47±0.02	11.66±0.08

表 4 不同蛋氨酸水平对试验饲料干物质、粗蛋白、粗脂肪表观消化率和幼蟹肠道胰蛋白酶活性的影响
Tab. 4 Apparent digestion coefficients of dry matter, protein, and lipid and intestinal trypsinase activities in juvenile *E. sinensis* fed on the experimental diets

项目 Item	试验处理 Treatment					
	全鱼粉组 FM	0.00%Met	0.14%Met	0.28%Met	0.42%Met	0.56%Met
干物质 Dry matter (%)	82.48±0.78 ^a	80.53±1.06 ^b	81.88±0.56 ^a	82.31±1.00 ^a	82.57±1.00 ^a	82.84±0.85 ^a
粗蛋白 Crude protein (%)	91.20±0.93 ^{ab}	85.61±0.81 ^c	87.43±1.32 ^b	90.12±1.10 ^b	91.41±0.86 ^a	88.43±0.56 ^b
粗脂肪 Crude lipid (%)	85.97±0.58 ^a	83.38±0.90 ^b	86.58±0.92 ^a	85.81±1.05 ^a	86.04±0.73 ^a	86.25±0.90 ^a
肠胰蛋白酶活力 Trypsinase in intestine (U/mg prot)	945.29±10.99 ^a	642.55±9.26 ^e	767.17±7.98 ^d	900.15±12.25 ^b	930.16±5.39 ^a	808.47±12.46 ^c

表 5 不同蛋氨酸水平对中华绒螯蟹血清 MDA 含量、SOD 活性和 GSH-PX 活性的影响
Tab. 5 Contents of serous MDA, specific activity of serous SOD and GSH-PX of *E. sinensis* fed on the experimental diets

项目 Item	试验处理 Treatment					
	全鱼粉组 FM	0.00%Met	0.14%Met	0.28%Met	0.42%Met	0.56%Met
丙二醛含量 Malondialdehyde (mmol/mL)	16.88±0.85 ^b	26.66±0.57 ^a	24.06±0.82 ^a	17.39±0.97 ^b	18.37±0.81 ^b	18.44±1.34 ^b
超氧化物歧化酶活性 Superoxide dismutase (U/mL)	114.05±5.09 ^a	85.16±1.54 ^c	99.8±3.44 ^b	105.94±3.24 ^{ab}	110.45±4.96 ^{ab}	103.6±2.68 ^{ab}
谷胱甘肽过氧化物酶活性 Glutathione peroxidase (U/mL)	121.61±3.08 ^{ab}	105.25±3.33 ^c	127.02±2.19 ^a	124.5±1.58 ^a	122.2±2.88 ^{ab}	125.21±2.22 ^a

的饲料中补充蛋氨酸后, 中华绒螯蟹的摄食量明显升高, 说明蛋氨酸对中华绒螯蟹幼蟹有良好的诱食作用。Ache^[14]研究发现蛋氨酸对龙虾和毛虾有良好的诱食作用, 特别是对毛虾的诱食效果尤为显著; 何利君等^[13]采用玻璃迷宫和二道生理记录仪对黄颡鱼进行研究, 结果显示 0.1 mol/L 蛋氨酸组黄颡鱼咬啄试球的次数最多, 促进摄食的效果最显著。以上结果表明, 蛋氨酸可以改善植物蛋白源饲料的适口性, 促进水生动物的摄食。蛋氨酸是一种 β -含硫氨基酸, 与牛磺酸相似, 可能是其中含有的硫原子可以改善饲料的适口性, 从而促进了摄食活动, 但具体的诱食过程和机理还需进一步研究。

适量补充蛋氨酸在改善饲料适口性的同时, 还有提高幼蟹的生长性能和饲料利用的作用。从棉粕的氨基酸组成来看, 除精氨酸、苯丙氨酸含量较多外, 其他氨基酸(包括蛋氨酸)的含量均低于鱼和虾蟹的生长需要^[21]。而蛋氨酸缺乏会导致饲料中氨基酸不平衡, 降低蛋白质合成速率, 抑制机体生长。对南亚野鲮(*Labeo rohita*)的研究结果显示, 在缺乏蛋氨酸的饲料中补充外源晶体蛋氨酸, 可有效提高蛋白质的利用率, 促进动物的生长^[22]。叶金云等^[23]研究表明, 2.027 g 中华绒螯蟹对蛋氨酸的适宜需求量为 1.12 g/(100 g 饲料), 本研究基础饲料(含 40%棉粕)中蛋氨酸的含量仅为 0.36%, 明显低于幼蟹对蛋氨酸的需要量。因此, 用棉粕等植物蛋白源替代鱼粉时, 适当补充蛋氨酸既可促进摄食, 还能提高蛋氨酸含量、优化饲料中必需氨基酸的比例。蛋氨酸的促生长作用在水生动物中已有大量报道, 以酪蛋白为蛋白源(蛋白质含量为 35%)的饲料中添加蛋氨酸, 可以显著提高尼罗罗非鱼的增重率^[11]; 在蛋氨酸缺乏(0.49%)的饲料中补充蛋氨酸, 可以显著提高鲤鱼的增重率^[24]; 饲料中蛋氨酸从 0.05% 提高到 1.00%, 印度幼鲤的饲料系数可从 3.00 降低到 1.45^[10]。本试

验还发现, 0.28%Met 和 0.42%Met 组幼蟹的蛋白质沉积率显著高于 0.00%Met 组, 说明饲料中补充蛋氨酸可以有效提高幼蟹的蛋白质沉积率。对奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*)的研究中同样发现, 在蛋氨酸缺乏的饲料中补充一定量的蛋氨酸, 鱼体蛋白质沉积量可以从 29.05% 提高到 36.12%^[25]。可见当基础饲料中蛋氨酸偏低时, 合理补充蛋白质合成所需的必需氨基酸, 可以有效提高氨基酸的利用率, 减少因脱氨基作用所造成的损失, 使饲料中的氮更多用于动物体蛋白的增长。

补充外源蛋氨酸对中华绒螯蟹幼蟹水分、粗脂肪和灰分含量无显著影响, 但可显著提高体组织的粗蛋白含量。Schwarz, *et al.*^[24]研究鲤鱼对蛋氨酸的需求量, 发现随着饲料中蛋氨酸含量的增加, 鲤鱼体组织蛋白的含量逐渐升高然后趋于稳定。同样, Carter^[26]研究表明, 当饲料中蛋氨酸含量低于草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的最适需要量时, 补充适量蛋氨酸可以提高草鱼肝脏、肌肉和整体蛋白质的合成速度, 从而提高蛋白质的绝对合成量。但是, 对日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)的研究发现补充微囊蛋氨酸未对体成分产生影响^[27], 这可能是由于试验动物种类、蛋氨酸的剂型和添加量等不同有关。

3.2 补充蛋氨酸对幼蟹消化能力的影响

本研究发现, 补充蛋氨酸后, 中华绒螯蟹幼蟹对饲料中干物质、粗蛋白和粗脂肪的表观消化率与 0.00%Met 组相比均有所提高。Nordrum, *et al.*^[28]对大西洋鲑(*Salmo salar*)的研究也发现, 低鱼粉饲料中补充蛋氨酸可以提高其对饲料中脂肪的消化率, 从而使营养物质在体内的分配与利用更加合理。和其他水生动物一样, 甲壳动物消化酶活性受饲料营养素的质和量的影响, 消化酶能够顺利合成的关键, 是机体能为消化腺提供合适数量和配比的氨基酸。但机体所需的氨基酸不足时, 外源补充适量的氨基

酸能够促进消化酶的合成和分泌^[29]。对 0.81 g 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的研究发现, 随着养殖时间的增加, 饲料中补充一定量微囊蛋氨酸有助于提高幼虾肝胰腺总蛋白酶和淀粉酶活性^[30]。本试验结果显示, 补充蛋氨酸能够显著提高幼蟹肠道胰蛋白酶的活性, 这与前面有关蛋白质表观消化率的结果是一致的, 这也是导致幼蟹蛋白质沉积率和体粗蛋白含量上升的一个可能原因。

3.3 补充蛋氨酸对幼蟹抗氧化酶活性和脂质过氧化程度的影响

丙二醛是脂质过氧化的产物, 根据其含量高低可以间接判断机体细胞所承受氧自由基损伤的程度。超氧化物歧化酶是抗氧化体系中首先被激活的酶类, 能够清除机体内的超氧阴离子, 将其转化为过氧化氢。谷胱甘肽过氧化物酶作为过氧化氢的下游酶类, 主要作用是催化还原型谷胱甘肽, 以清除细胞呼吸代谢过程中产生的过氧化氢和脂质过氧化产物, 进而减轻细胞膜多不饱和脂肪酸的过氧化作用, 保护细胞膜结构和功能完整^[31]。在本试验中, 补充蛋氨酸试验组的丙二醛含量低于 0.00%Met 组, 超氧化物歧化酶活性和谷胱甘肽过氧化物酶活性则显著高于 0.00%Met 组, 提示补充蛋氨酸可以提高幼蟹的抗氧化能力, 对幼建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)的研究支持了本试验结果^[32], 有学者认为, 由于蛋氨酸代谢产生的半胱氨酸参与了抗氧化物质还原型谷胱甘肽的合成, 而还原型谷胱甘肽是细胞内主要的溶解性抗氧化剂, 因而能够增强机体免疫能力^[33]。

4 结论

在高比例植物蛋白饲料中适当补充外源蛋氨酸, 可以明显改善饲料适口性, 有效提高中华绒螯蟹幼蟹对饲料的摄食和利用, 促进幼蟹的生长。试验结果表明, 在植物蛋白棉粕占 40%的饲料中, 蛋氨酸的适宜补充水平为 0.42%。

参考文献:

- [1] Du L, Niu C J. Effects of dietary substitution of soya bean meal for fish meal on consumption, growth, and metabolism of juvenile giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2003, **9**(2): 139—143
- [2] Hansen A C, Rosenlund G, Karlsen Ø, *et al.* The inclusion of plant protein in cod diets, its effects on macronutrient digestibility, gut and liver histology and heat shock protein transcription [J]. *Aquaculture Research*, 2006, **37**(8): 773—784
- [3] Takea M, Takii K. Fish Chemoreception Gestation and Nutrition in Fishes [M]. London: Hara T J Chapman & Hall. 1992, 271—287
- [4] Refstie S, Svihus B, Shearer K D, *et al.* Nutrient digestibility in Atlantic salmon and broiler chickens related to viscosity and non-starch polysaccharide content in different soybean products [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1999, **79**(4): 331—345
- [5] Glencross B, Evans D, Rutherford N, *et al.* The influence of the dietary inclusion of the alkaloid gramine, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth, feed utilization and gastrointestinal histology [J]. *Aquaculture*, 2006, **253**(1—4): 512—522
- [6] National Research Council. Nutrient Requirements of Fish [M]. The National Academy of Science. 1993, 6—12
- [7] Dabrowski K, Poczyczynski P, Ktiek G, *et al.* Effect of partly or totally replacing fish meal protein by soybean meal protein on growth, food utilization and proteolytic enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). New *in vivo* test for exocrine pancreatic secretion [J]. *Aquaculture*, 1989, **77**(1): 29—49
- [8] Mukhopadhyay N, Ray A K. Effects of amino acid supplementation on the nutritive quality of fermented linseed meal protein in the diets of rohu, *Labeo rohita*, fingerlings [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2001, **17**(5): 220—226
- [9] Nose T. Summary Report on the Requirements of Essential Amino Acids for Carp [M]. Berlin: Tiew Heenemann. 1979, 145—156
- [10] Ahmed I, Khan M A, Jafri A K. Dietary methionine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) [J]. *Aquaculture International*, 2003, **11**(5): 449—462
- [11] Teshima S, Kanazawa A, Uchiyama Y. Effect of several protein sources and other factors on the growth of *Tilapia nilotica* [J]. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1986, **52**(3): 525—530
- [12] Yin H F, Han Y. The application of amino acid in aquatic feeds [J]. *China Fisheries*, 2000, **2**: 68—69 [尹海富, 韩英. 单体氨基酸在水产饲料中的应用. *中国水产*, 2000, **2**: 68—69]
- [13] He L J, Mo S J, Shi X J, *et al.* Study on food attractants for *Pseudobagrus Fulridraco* [J]. *Journal of Southwest Agriculture University*, 2005, **27**(3): 416—419 [何利君, 莫绍橘, 施新建, 等. 黄颡鱼摄饵促进物质的研究. *西南农业大学学报*, 2005, **27**(3): 416—419]
- [14] Ache B W. Chemoreception and Thermoreception [M]. London: Academic Press. 1982, 369—393
- [15] Chen L Q, Du N S, Lai W. Evaluation of soybean cake as a substitute for partial fish meal in formulated diets for juve-

- nile Chinese mitten-handed crab [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1994, **18**(1): 24—31 [陈立桥, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹种配饵中豆饼替代部分鱼粉的适宜含量. 水产学报, 1994, **18**(1): 24—31]
- [16] Jiang H B, Chen L Q, Li E C, *et al.* Partial or total replacement of soybean meal by cottonseed meal in practical diets for Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*: effects on oxygen consumption, ammonia excretion, O₂ N ratio and amino transferases activities [J]. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2012, **12**(3): 547—554
- [17] Chen L. Effect of Dietary Cottonseed meal level on growth, some physiological and biochemical indices related in juvenile Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* [D]. Thesis for Master of Science. East China Normal University, 2010 [陈亮. 不同棉籽粕水平饲料对中华绒螯蟹幼蟹生长和相关生理生化指标的影响. 硕士学位论文, 2010]
- [18] AOAC. Official Methods of Analysis: 930.15, 930.29, 920.39c [M]. 16th ed. Arlington, VA: AOAC, 1995
- [19] Furukawa A, Tsukahara H. On the acid digestion method for determination of chromic oxide as index substance in the study of digestibility in fish feed [J]. *Bulletin of Japanese Society of Fishers Science*, 1996, **32**(6): 502—506
- [20] Zeng D, Yang C G. Feeding chemoreceptor of aquatic animal and the development and application of aquatic attractant [J]. *China Feed*, 2002, **23**: 15—17 [曾端, 杨春贵. 水产动物的摄食化学感受器及水产诱食剂的开发应用. 中国饲料, 2002, **23**: 15—17]
- [21] Robinson E H, Li M H. 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 [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1994, **25**(2): 271—276
- [22] Mukhopadhyay N, Ray A K. Improvement of quality of sesame (*Seasamum indicum*) seed meal protein with supplemental amino acids in feeds for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings [J]. *Aquaculture Research*, 1999, **30**(8): 549—557
- [23] Ye J Y, Guo J L. Lysine, methionine and arginine requirements of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [A]. The Seventh Symposium World's Chinese Scientists on Nutrition and Feeding of Finfish Shellfish (Abstracts) [C]. Beijing. 2008, 43 [叶金云, 郭建林. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)幼蟹对赖氨酸, 蛋氨酸及精氨酸的需要量研究. 第七届世界华人鱼虾营养大会(摘要集). 北京. 2008, 43]
- [24] Schwarz F J, Manfred K, Ute D. Studies on the methionine requirement of carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Aquaculture*, 1998, **161**(124): 121—129
- [25] Lin S M, Mai K S, Tan B P. Influence of practical diet supplementation with free D-methionine on the growth and body composition in *Tilapia Oreochromis Niloticus* × *O. Aureus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(5): 741—749 [林仕梅, 麦康森, 谭北平. 实用饲料中添加结晶蛋氨酸对罗非鱼生长和体组成的影响. 水生生物学报, 2008, **32**(5): 741—749]
- [26] Carter C G. Protein synthesis in grass carp, *Ctenop haryngodon idella*, and its relation to diet quality, Fish nutrition in practice: 4th international symposium on fish nutrition and feeding. Biarritz, France, June 24—27, 1991 (edited by kaushik S J, Luquet). 1993, 673—680
- [27] Md S A, Shin-ichi T, Shunsuke K, *et al.* Supplemental effects of coated methionine and/or lysine to soy protein isolate diet for juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 2005, **248**(1—4), 13—19
- [28] Nordrum S, Krogdahlb S R, Nordrum S, *et al.* Effects of methionine, cysteine and medium chain triglycerides on nutrient digestibility, absorption of amino acids along the intestinal tract and nutrient retention in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under pair feeding regime [J]. *Aquaculture*, 2000, **186**(3—4): 341—360
- [29] Lin S M, Luo L, Ye Y T, *et al.* Effects of dietary protein to energy ratio and N-Phy-P levels on nitrogen and phosphorus excretion and activities of GOT and GPT in *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, **8**(4): 62—66 [林仕梅, 罗莉, 叶元土, 等. 饲料蛋白能量比、非植酸磷水平对中华绒螯蟹氮、磷排泄和转氨酶活性的影响. 中国水产科学, 2001, **8**(4): 62—66]
- [30] Chi S Y, Lin H Z, Tan B P, *et al.* Effects of microcapsules or crystalline methionine in lower fishmeal diets on digestive enzyme activity of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, 2010, **11**: 308—310 [迟淑艳, 林黑着, 谭北平, 等. 低鱼粉饲料中添加微胶囊或晶体蛋氨酸对凡纳滨对虾消化酶活性的影响. 现代农业科技, 2010, **11**: 308—310]
- [31] Ana F, Venturin O, Ana M. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2007, **88**(2): 134—142
- [32] Xiao W W, Feng L, Liu Y, *et al.* A comparative study of feeding effects of equal-sulfur supplementation with DL-methionine and methionine hydroxy analogue free acid in juvenile Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, **22**(4): 1122—1130 [肖伟伟, 冯琳, 刘扬, 等. 日粮中等硫添加 DL-蛋氨酸和蛋氨酸羟基类似物游离酸在幼建鲤上饲喂效果的比较研究. 动物营养学报, 2010, **22**(4): 1122—1130]
- [33] Cheng Z J, Hardy R W, Blair M. Effects of supplementing methionine hydroxy analogue in soybean meal and distiller's dried grain-based diets on the performance and nutrient retention of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) [J]. *Aquaculture Research*, 2003, **34**(14): 1303—1310

EFFECTS OF DIETARY METHIONINE SUPPLEMENTATION ON FEEDING, GROWTH AND ANTIOXIDANT ABILITY OF JUVENILE CHINESE MITTEN CRAB, *ERIOCHEIR SINENSIS*

SUN Li-Mei, CHEN Li-Qiao, LI Er-Chao, CHEN Yan-Liang, LI Ming,
JIANG Hai-Bo, SUN Sheng-Ming, JIANG Xing and QI Ji
(College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: This study was conducted to evaluate the effects of dietary methionine supplementation in cottonseed meal-based diets on the growth performance, digestibility and antioxidant ability of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Five diets were formulated using a basic diet, in which cottonseed meal accounted for 40%, supplemented with 0.00%, 0.14%, 0.28%, 0.42%, and 0.56% methionine, respectively. Another diet was full fish meal-based (fish meal accounted for 64.4%) and served as the control. Each diet was fed to juvenile *E. sinensis* [(0.39±0.02) g] of five replicates for 6 weeks. The results showed that weight gain, specific growth rate and feed conversion ratio in crabs fed 0.42%Met diet did not differ from those of the control group ($P>0.05$). Crabs fed with 0.28%Met and 0.42% Metdiets exhibited higher food intake and protein deposition rate than those fed diets with 0.00%Met, 0.14%Met, 0.56%Met ($P<0.05$). There were no significant differences in whole body moisture, lipid, and ash ($P>0.05$) among all treatments. However, compared with the 0.00% Met diets group, crude protein contents in crab fed with methionine supplemented diets were significantly higher ($P<0.05$). Dry matter, protein, lipid digestibility, and trypsinase activity of crabs fed with 0.42% Metdiets did not differ from those of the control ($P>0.05$). No differences were found in malondialdehyde content, serum superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in crabs fed with the control diet and those fed with 0.28% Met, 0.42%Met and 0.56% Metdiets ($P>0.05$). The results suggest that 0.42%Met added to the diet (cottonseed meal accounted for 40%) could significantly accelerate the growth performance, digestibility and antioxidant ability of juvenile *E. sinensis*.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Methionine; Cottonseed meal; Feeding; Growth; Antioxidant