

## 高植物蛋白饲料中添加蛋白酶对克氏原螯虾生长、免疫力及消化力的影响

杨文秀<sup>1,2</sup>, 陈效儒<sup>3</sup>, 文华<sup>2</sup>, 吴凡<sup>2</sup>, 胡伟<sup>1</sup>,  
郜卫华<sup>1\*</sup>, 田娟<sup>2\*</sup>, 袁汉文<sup>1</sup>, 徐树德<sup>4</sup>

(1. 长江大学, 涝渍灾害与湿地农业湖北重点实验室, 湖北 荆州 434024;

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;

3. 通威股份有限公司, 水产健康养殖四川省重点实验室, 四川 成都 610041;

4. 广东溢多利生物科技股份有限公司, 广东 珠海 519060)

**摘要:** 为探讨低鱼粉高植物蛋白饲料中蛋白酶的适宜添加范围, 在克氏原螯虾基础饲料中分别添加 0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 g/kg 蛋白酶, 制作成 6 组饲料。选择初始体质量为 (8.18±0.11) g 的克氏原螯虾, 随机分为 6 组, 每组 3 个重复, 每个重复 15 尾虾, 在室内养殖桶中饲养 8 周。结果显示, 随饲料蛋白酶添加量的增加: ①各组间存活率、肝体比、腹部含肉率均无显著差异; 增重率和特定生长率均先升高后降低, 且在蛋白酶添加量为 0.2 g/kg 时达到最大值。当蛋白酶添加量为 0.4 g/kg 时饲料系数最低; 蛋白质效率和蛋白质沉积率分别在添加量为 0.4 和 0.2 g/kg 时达到最高值。经折线回归分析, 增重率、饲料系数、蛋白质效率分别在蛋白酶添加量为 0.16、0.24、0.23 g/kg 时有最佳值。②腹部肌肉和全虾粗蛋白质含量先升高后降低最终趋于平稳, 均在 0.2 g/kg 组有最大值。③肠道及肝胰腺蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活性均先增加后缓慢降低, 均在 0.2 g/kg 组出现最大值, 且显著高于对照组。④血清总蛋白含量在 0.4 g/kg 组出现最大值; 谷草转氨酶及谷丙转氨酶活性先降低后增加, 均在 0.4 g/kg 时出现最小值; 碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性则先增加后降低, 分别在 0.2 和 0.4 g/kg 时达到最大值; 当蛋白酶添加量为 0.2 g/kg 时, 丙二醛含量有最小值。⑤肝胰腺碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性先增加后降低, 当蛋白酶添加量为 0.2 g/kg 时有最大值, 且显著高于对照组。研究表明, 本实验条件下克氏原螯虾饲料蛋白酶添加量为 0.16~0.40 g/kg 时, 可提高其对植物蛋白的利用率。

**关键词:** 克氏原螯虾; 蛋白酶; 生长性能; 消化力; 免疫力

中图分类号: S 963

文献标志码: A

蛋白质是水产动物必需的重要营养素之一, 也是影响饲料成本的主要因素之一。鱼粉因蛋白

质含量高且氨基酸平衡而被公认为是优质的水产饲料蛋白源。然而随着水产养殖业的快速发展,

收稿日期: 2021-07-03 修回日期: 2021-09-14

资助项目: 湖北省技术创新专项重大项目 (2019ABA077); 四川省重点研发项目 (2018NZ0152); 通威股份有限公司产学研合作项目 (TW20181001, 2011259); 湿地生态与农业利用教育部工程研究中心开放课题 (KFT202003; KFT202102); 湖北省教育厅百校联百县项目 (BXLBX0312)

第一作者: 杨文秀 (照片), 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: 2825453691@qq.com; 陈效儒, 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: CHENXR@tongwei.com

通信作者: 郜卫华, 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: gaoweihua@yangtzeu.edu.cn; 田娟, 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: tianjuan@yfi.ac.cn



市场对鱼粉的需求量也逐渐增加,而渔业捕获量却逐渐减少,导致鱼粉资源紧张、价格昂贵<sup>[1]</sup>,从而制约了水产行业的发展。为解决这一问题,一些价格相对低廉的植物蛋白源如豆粕、菜粕、棉粕以及花生粕等被用来替代水产饲料中的鱼粉。但这些植物蛋白源因氨基酸不平衡、适口性差、消化率低且存在抗营养因子等,并不能使水产动物对其实现高效利用<sup>[2]</sup>,造成饲料资源浪费。因此,研究者试图在高植物蛋白源饲料中添加适量外源蛋白酶来提高饲料利用率<sup>[2-4]</sup>。如在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)饲料中添加0.5 g/kg蛋白酶,可以提高生产性能、节约饲料蛋白质,此外,蛋白酶有助于提高水产动物对饲料蛋白质沉积率,从而降低水体中氨和亚硝酸盐含量进而改善水质<sup>[3]</sup>。在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)低鱼粉饲料中添加0.125~0.175 g/kg蛋白酶,可提高蛋白质沉积率<sup>[4]</sup>。在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)低鱼粉饲料中添加0.175 g/kg蛋白酶,能提高其生长性能、消化酶活性以及促进蛋白质的沉积<sup>[2]</sup>。

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)俗称小龙虾,属节肢动物门(Arthropoda)甲壳纲(Crustacea)十足目(Decapoda)螯虾科(Cambarus)原螯虾属,原产于北美地区<sup>[5]</sup>。克氏原螯虾在自然环境中有较强的生存能力和繁殖能力,于20世纪30年代引入我国<sup>[6]</sup>。因其肉质鲜美、营养丰富,特别是蛋白含量高而脂肪含量低,且富含人体必需氨基酸和脂肪酸<sup>[7]</sup>,现已成为我国重要的淡水虾类养殖品种之一。据中国渔业年鉴统计,2020年我国克氏原螯虾养殖总产量达239.37万t<sup>[8]</sup>。目前克氏原螯虾商业饲料中鱼粉的使用量较低,大多数以植物蛋白源满足其蛋白质需求,但是对植物蛋白源利用率并不高<sup>[9]</sup>。本实验通过添加外源酶对其饲料配方进行优化,探讨了蛋白酶在克氏原螯虾高植物蛋白饲料中的适宜添加量,为克氏原螯虾高效饲料的研发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料的配制

实验饲料中添加的蛋白酶由广东溢多利生物科技股份有限公司提供,为微生物源蛋白酶,活性为20 000 U/g,适宜pH值范围为5.0~10.0,90℃湿热处理后酶活性保留率达92%。实验配制了6种饲料(表1),其中动物蛋白含量为10%(鱼粉、虾粉含量各为5%),植物蛋白含量43%(小麦蛋白

粉8%、豆粕20%、菜粕15%);以鱼油、豆油为主要脂肪源。所配制饲料的蛋白和脂肪含量均能满足克氏原螯虾生长和免疫的需要<sup>[10-11]</sup>。蛋白酶添加量依次为0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 g/kg,以纤维素配平。将原料粉碎后过孔径为0.3 mm的筛网,准确称量,使用逐级扩大法充分混合,然后加入油料搓揉均匀后再加适量水混匀。放入F-26双螺杆挤条机(广州华工光电科技有限公司)挤压成直径为2 mm的条状,在全封闭烘箱中90℃熟化15 min,将熟化后的饲料在DW带式干燥机(常州苏正干燥设备有限公司)中60℃烘1.5 h,随后用破碎机(郑州微分电机厂)破碎成长度3~4 mm的圆柱形颗粒,放于-20℃冰箱储存备用。

### 1.2 实验步骤

实验所用克氏原螯虾采购于湖北省潜江市某养殖场,养殖实验在中国水产科学研究院长江水产研究所进行。克氏原螯虾先于室内水族箱中暂养2周后,饥饿24 h,取10尾虾用以测定虾体初始基本成分。另外挑选大小均匀一致、螯足完好、体质量为(8.18±0.11) g的克氏原螯虾270尾,随机分到18个养殖箱,每箱15尾。养殖水深0.35 m,体积0.35 m<sup>3</sup>,箱内放置供克氏原螯虾栖息及躲避用的PVC管和塑料遮蔽网<sup>[12]</sup>。每组饲料对应3个养殖箱,每天投喂3次(8:00、14:00和20:00),连续投喂8周。投喂2 h后,捞出残饵,晾干称重,根据饲料残留情况及时调整投喂量。若有死虾,及时捞出,并称重记录。每天换水3次,每次换掉1/3,并保证养殖箱内有干净的循环水(200 L/h)。养殖水温为23~28℃,氨氮低于0.05 mg/L,溶解氧大于5 mg/L, pH为8.3±0.1。

### 1.3 样品采集

正式养殖8周后,禁食24 h,捞出每个养殖箱的所有虾,记尾数并称总质量,用于计算存活率、增重率、特定生长率、饲料系数。从每箱中随机取3尾虾,称重后保存在-20℃冰箱,用于全虾体成分分析。另外每箱取6尾虾,称体质量后用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4 h,然后离心(4℃,12 000 r/min,20 min),吸取上层血清,存放于-80℃冰箱。将获得血样后的克氏原螯虾解剖,取出其肝胰腺和腹部肌肉并称重,用于计算肝体比和腹部含肉率。将腹部肌肉、肝胰腺和肠道分装后放于自封袋中,置于-40℃冰箱

表1 实验饲料基础配方和营养组成(干物质基础)  
Tab.1 Ingredients and proximate composition of experimental diets (dry matter basis) %

原料 ingredients	饲料蛋白酶添加水平/(g/kg) dietary protease levels					
	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
鱼粉 fish meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
虾粉 shrimp meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
小麦蛋白粉 wheat gluten	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
豆粕 soybean meal	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
菜粕 rapeseed mea	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
面粉 flour	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
鱼油 fish oil	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
大豆油 soybean oil	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
大豆磷脂油 soybean phospholipid oil	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
胆固醇 cholesterol	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
酵母膏 yeast extract	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
维生素预混料 <sup>1</sup> vitamin premix	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
无机盐预混料 <sup>2</sup> mineral premix	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
食盐 salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
褐藻酸钠 sodium alginate	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
虾青素 astaxanthin	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
大蒜素 allicin	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	4.11	4.10	4.09	4.07	4.03	3.95
蛋白酶 protease	0.00	0.01	0.02	0.04	0.08	0.16
<b>营养组成 nutrient composition</b>						
干物质 dry matter	94.14	93.89	93.60	93.68	93.52	94.03
粗蛋白质 crude protein	34.42	33.93	34.41	34.53	34.48	34.84
粗脂肪 crude fate	6.65	6.52	6.16	6.33	6.32	6.23
灰分 ash	6.88	6.99	6.94	6.93	6.93	6.97

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<sub>3</sub> 10 g, 维生素B<sub>1</sub> 10 g, 维生素B<sub>2</sub> 10 g, 维生素B<sub>6</sub> 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B<sub>12</sub> 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, 磷酸镁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

Notes: 1. per kg of vitamin premix contains vitamin A 4 g, vitamin D 0.02 g, vitamin E 10 g, vitamin K<sub>3</sub> 10 g, vitamin B<sub>1</sub> 10 g, vitamin B<sub>2</sub> 10 g, vitamin B<sub>6</sub> 20 g, nicotinic acid 40 g, biotin 0.2 g, calcium pantothenate 20 g, folic acid 0.5 g, vitamin B<sub>12</sub> 0.01 g, vitamin C 20 g, inositol 400 g, all ingredients were diluted with micro-cellulose to 1 kg; 2. per kg of mineral premix contains KIO<sub>3</sub> 0.6 g, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.08 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 320 g, MgSO<sub>4</sub> 200 g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 20 g, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 60 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 50 g, NaCl 100 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2 g, all ingredients were diluted with micro-cellulose to 1 kg

冷冻, 用于后续其他指标的测定。

#### 1.4 指标测定

生长性能的测定

增重率 (weight gain rate, WGR, %)=(W<sub>t</sub>-W<sub>0</sub>)/W<sub>0</sub>×100%

存活率 (survival rate, SR, %)=N<sub>t</sub>/N<sub>0</sub>×100%

特定生长率 (specific growth rate, SGR, %/d)=(lnW<sub>t</sub>-lnW<sub>0</sub>)/t×100%

饲料系数 (feed conversion ratio, FCR)=W<sub>f</sub>/

(W<sub>t</sub>N<sub>t</sub>-W<sub>0</sub>N<sub>0</sub>+W<sub>d</sub>)

肝体比 (hepatosomatic index, HIS, %)=W<sub>h</sub>/

W<sub>t</sub>×100%

腹部含肉率 (flesh content, FC, %)=W<sub>m</sub>/W<sub>t</sub>×

100%

蛋白质效率 (protein efficiency ratio, PER, %)=

(W<sub>t</sub>-W<sub>0</sub>)/(W<sub>t</sub>×W<sub>p</sub>)×100%

蛋白质沉积率 (protein deposition rate, PDR, %) $= (W_t \times CP_t - W_0 \times CP_0) / (W_f \times W_p) \times 100\%$

式中,  $W_t$  为终末体质量 (g);  $W_0$  为初始体质量 (g);  $N_t$  为终末尾数;  $N_0$  为初始尾数;  $t$  为实验天数 (d);  $W_f$  为饲料摄入量 (g);  $W_d$  为死亡总重 (g);  $W_h$  为肝胰腺重 (g);  $W_m$  为虾腹部肌肉重 (g);  $W_p$  为饲料粗蛋白质含量 (%);  $CP_t$  为终末全虾粗蛋白质含量 (%);  $CP_0$  为初始全虾粗蛋白质含量 (%)。

**基本成分的测定** 全虾及腹部肌肉水分采用冷冻干燥法 (CHRIST 型冷冻干燥机) 测定; 饲料水分采用 105 °C 恒温干燥失重法 (GB/T 5009.3—2016) 测定; 粗蛋白质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 °C 灼烧法 (GB/T 5009.4—2016) 测定。

**血清生化指标的测定** 使用希森美康全自动生化分析仪 (CHEMIX-800) 测定血清碱性磷酸酶、谷草转氨酶、谷丙转氨酶、酸性磷酸酶的活性, 以及葡萄糖、总胆固醇、总蛋白、白蛋白、甘油三酯的含量, 所用试剂均购买自 Sysmex 公司。使用南京建成生物工程研究所试剂盒测定血清丙二醛含量。

**肝胰腺及肠道消化酶活性的测定** 总蛋白酶活性的测定采用福林酚试剂法; 总蛋白含量、脂肪酶及淀粉酶活性均采用南京建成生物工程研

究所的试剂盒测定。

**肝胰腺生化指标的测定** 酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性以及丙二醛含量均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定。

## 1.5 数据分析

实验数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 用 Tukey 氏均值多重比较法进行差异显著性检验, 结果均以平均值±标准差 (mean±SD) 表示, 当  $P < 0.05$  时表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾生长性能的影响

各组间存活率、肝体比、腹部含肉率均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。增重率和特定生长率均呈现先增加后降低的变化趋势, 且增重率和特定生长率在蛋白酶添加量为 0.2 g/kg 时达到最大值, 并显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。饲料系数先降低后增加, 在蛋白酶添加量为 0.4 g/kg 时有最小值, 并显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。蛋白质效率和蛋白质沉积率均先增后减, 分别在添加量为 0.4 和 0.2 g/kg 时有最高值, 且显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

表 2 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾生长性能的影响

Tab. 2 Effects of dietary protease levels on growth performance of *P. clarkii*

项目 items	饲料蛋白酶添加水平/(g/kg) dietary protease levels					
	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
初始体质量/g IBW	8.18±0.09	8.20±0.08	8.18±0.08	8.17±0.07	8.21±0.17	8.18±0.07
终末体质量/g FBW	18.73±0.21 <sup>a</sup>	19.40±0.53 <sup>ab</sup>	20.13±0.42 <sup>b</sup>	19.84±0.12 <sup>b</sup>	19.38±0.20 <sup>ab</sup>	19.29±0.24 <sup>ab</sup>
增重率/% WGR	128.81±3.18 <sup>a</sup>	136.45±4.34 <sup>ab</sup>	146.20±5.29 <sup>b</sup>	142.94±0.92 <sup>b</sup>	136.05±6.99 <sup>ab</sup>	135.96±4.92 <sup>ab</sup>
存活率/% SR	84.45±3.85	88.89±3.85	91.11±3.85	91.11±3.85	88.89±7.70	86.67±6.67
特定生长率/(%/d) SGR	1.48±0.03 <sup>a</sup>	1.54±0.03 <sup>ab</sup>	1.61±0.04 <sup>b</sup>	1.58±0.01 <sup>b</sup>	1.53±0.05 <sup>ab</sup>	1.53±0.04 <sup>ab</sup>
饲料系数 FCR	1.60±0.06 <sup>c</sup>	1.55±0.04 <sup>bc</sup>	1.46±0.04 <sup>ab</sup>	1.43±0.02 <sup>a</sup>	1.51±0.03 <sup>abc</sup>	1.54±0.06 <sup>abc</sup>
肝体比/% HSI	4.87±0.19	4.75±0.33	5.20±0.36	4.70±0.32	4.96±0.48	4.79±0.26
腹部含肉率/% FC	11.62±1.05	12.08±0.56	12.69±0.22	12.09±0.67	11.78±0.78	11.35±0.54
蛋白质效率/% PER	1.82±0.07 <sup>a</sup>	1.90±0.04 <sup>abc</sup>	2.00±0.06 <sup>c</sup>	2.02±0.03 <sup>c</sup>	1.93±0.03 <sup>abc</sup>	1.87±0.07 <sup>ab</sup>
蛋白质沉积率/% PDR	20.44±0.78 <sup>a</sup>	21.23±0.81 <sup>a</sup>	23.83±0.37 <sup>c</sup>	22.26±0.14 <sup>bc</sup>	21.72±0.57 <sup>ab</sup>	21.29±1.10 <sup>a</sup>

注: 同行数据中上标字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同

Notes: In the same row, values with different superscript letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), the same below



分别以克氏原螯虾增重率、饲料系数和蛋白质效率为因变量(y), 饲料蛋白酶添加量为自变量(x), 通过折线模型回归分析得出蛋白酶最适添加量分别为0.16、0.24和0.23 g/kg(图1~图3)。

**2.2 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾全虾及腹部肌肉基本成分的影响**

饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾全虾和腹部肌肉的水分、粗脂肪及灰分含量无显著影响(P>0.05)。全虾和腹部肌肉粗蛋白质含量均在蛋白酶添加量为0.2 g/kg时存在最大值, 且显著高于对照组(P<0.05)(表3)。

**2.3 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾肠道及肝胰腺消化酶活性的影响**

在蛋白酶添加量为0.2 g/kg时, 肝胰腺蛋白

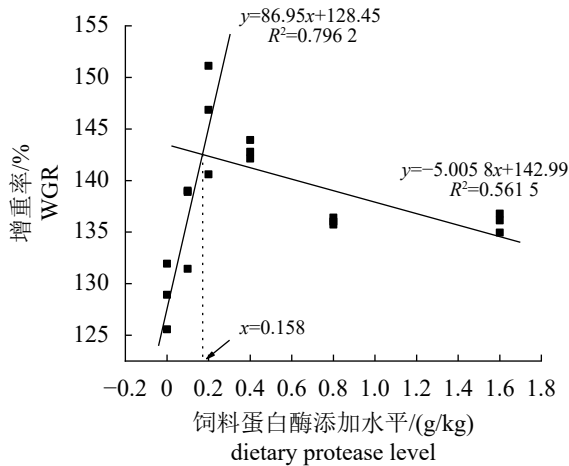


图1 增重率与饲料中蛋白酶添加量的折线回归分析  
Fig. 1 Broken-line analysis between the weight gain rate and dietary protease levels

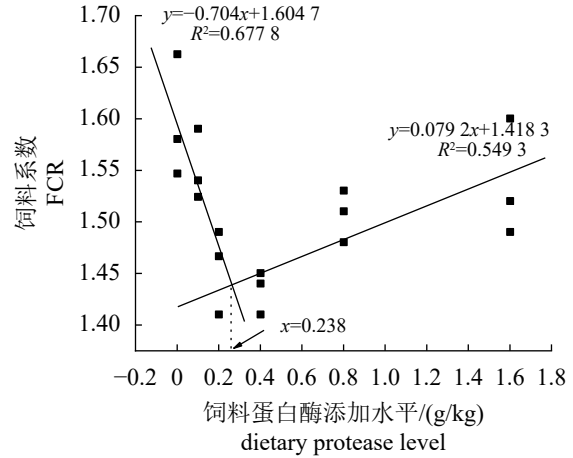


图2 饲料系数与饲料中蛋白酶添加量的折线回归分析  
Fig. 2 Broken-line analysis between the feed conversion ratio and dietary protease levels

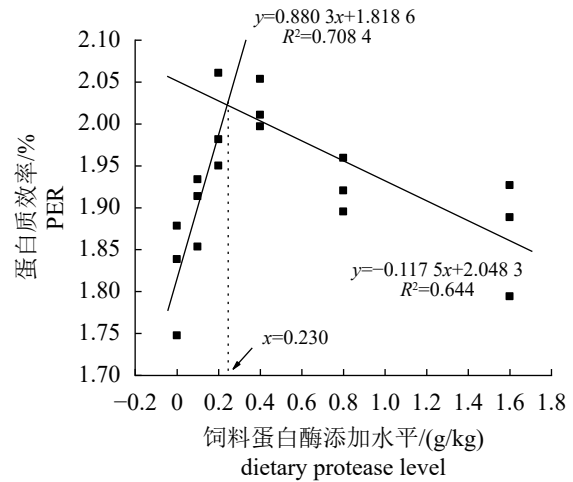


图3 蛋白质效率与饲料中蛋白酶添加量的折线回归分析  
Fig. 3 Broken-line analysis between the protein efficiency and dietary protease levels

表3 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾全虾及腹部肌肉成分的影响

Tab. 3 Effects of dietary protease levels on whole body and abdominal muscle composition of *P. clarkii*

项目 items	饲料蛋白酶添加水平/(g/kg) dietary protease levels					
	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
<b>全虾 whole body</b>						
水分/% moisture	73.73±0.43	73.28±0.40	73.84±0.62	73.97±0.47	74.07±0.29	74.05±0.21
粗蛋白质/% crude protein	9.56±0.04 <sup>a</sup>	9.72±0.21 <sup>a</sup>	10.40±0.28 <sup>b</sup>	10.04±0.26 <sup>ab</sup>	9.84±0.08 <sup>a</sup>	9.79±0.14 <sup>a</sup>
粗脂肪/% crude fat	1.01±0.04	1.05±0.02	1.09±0.10	1.07±0.05	1.07±0.06	1.04±0.11
灰分/% ash	7.95±0.15	8.43±0.39	8.75±0.76	8.55±0.23	8.39±0.62	8.39±1.06
<b>腹部肌肉 abdominal muscle</b>						
水分/% moisture	79.63±0.86	79.14±0.62	78.87±0.55	78.67±0.36	78.91±0.80	78.46±0.23
粗蛋白质/% crude protein	17.37±0.08 <sup>a</sup>	17.55±0.13 <sup>a</sup>	18.36±0.19 <sup>b</sup>	17.99±0.16 <sup>ab</sup>	17.72±0.36 <sup>a</sup>	17.71±0.30 <sup>a</sup>
粗脂肪/% crude lipid	0.34±0.21	0.34±0.16	0.36±0.23	0.36±0.13	0.35±0.17	0.34±0.10
灰分/% ash	1.14±0.02	1.18±0.07	1.20±0.12	1.19±0.12	1.21±0.05	1.19±0.07

酶、淀粉酶及脂肪酶活性有最大值,依次为 48.97 U/g、1.65 U/mg prot、4.55 U/g prot,且显著高于对照组 ( $P < 0.05$ );在蛋白酶添加量为 0.2 g/kg 时,

肠道蛋白酶、淀粉酶及脂肪酶活性有最大值,依次为 24.75 U/g、4.04 U/mg prot、3.60 U/g prot,显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )(表 4)。

表 4 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾肠道及肝胰腺消化酶活性的影响

Tab. 4 Effects of dietary protease levels on intestine and hepatopancreas digestive enzymes activities of *P. clarkii*

项目 items	饲料蛋白酶添加水平/(g/kg) dietary protease levels					
	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
<b>肝胰腺 hepatopancreas</b>						
蛋白酶/(U/g) protease	36.13±0.91 <sup>a</sup>	41.17±1.32 <sup>ab</sup>	48.97±1.06 <sup>c</sup>	46.25±2.00 <sup>bc</sup>	40.42±2.71 <sup>ab</sup>	38.23±1.07 <sup>a</sup>
淀粉酶/(U/mg prot) amylase	1.24±0.03 <sup>a</sup>	1.53±0.01 <sup>c</sup>	1.65±0.09 <sup>d</sup>	1.53±0.02 <sup>c</sup>	1.49±0.04 <sup>c</sup>	1.37±0.01 <sup>b</sup>
脂肪酶/(U/g prot) lipase	2.43±0.14 <sup>a</sup>	3.57±0.21 <sup>b</sup>	4.55±0.33 <sup>c</sup>	4.47±0.13 <sup>c</sup>	3.84±0.23 <sup>b</sup>	3.56±0.14 <sup>b</sup>
<b>肠道 intestine</b>						
蛋白酶/(U/g) protease	18.76±1.13 <sup>a</sup>	19.49±1.45 <sup>ab</sup>	24.75±0.87 <sup>c</sup>	22.72±1.90 <sup>bc</sup>	20.12±1.19 <sup>ab</sup>	20.79±1.35 <sup>ab</sup>
淀粉酶/(U/mg prot) amylase	3.65±0.04 <sup>a</sup>	3.87±0.09 <sup>ab</sup>	4.04±0.10 <sup>c</sup>	3.83±0.13 <sup>ab</sup>	3.77±0.10 <sup>a</sup>	3.72±0.03 <sup>a</sup>
脂肪酶/(U/g prot) lipase	2.12±0.15 <sup>a</sup>	3.40±0.16 <sup>b</sup>	3.60±0.14 <sup>b</sup>	3.55±0.17 <sup>b</sup>	3.20±0.29 <sup>b</sup>	2.52±0.13 <sup>a</sup>

## 2.4 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾血清生化指标的影响

当蛋白酶添加量为 0.2 g/kg 时,血清碱性磷酸酶活性最大,丙二醛含量最低,均与对照组存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。在蛋白酶添加量为 0.4 g/kg

时,谷丙转氨酶和谷草转氨酶活性均最低,总蛋白含量和酸性磷酸酶活性达到最大值,且均与对照组存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。总胆固醇、白蛋白和甘油三酯含量各组间均无显著差异 ( $P > 0.05$ )(表 5)。

表 5 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾血清生化指标的影响

Tab. 5 Effects of dietary protease levels on hemolymph biochemical indices of *P. clarkii*

项目 items	饲料蛋白酶添加水平/(g/kg) dietary protease levels					
	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
谷草转氨酶/(U/L) AST	64.33±1.15 <sup>c</sup>	61.31±1.13 <sup>b</sup>	55.29±0.98 <sup>a</sup>	54.67±0.87 <sup>a</sup>	56.00±1.00 <sup>a</sup>	59.21±1.07 <sup>b</sup>
谷丙转氨酶/(U/L) ALT	44.70±0.87 <sup>c</sup>	43.00±1.01 <sup>bc</sup>	39.63±1.16 <sup>a</sup>	38.52±0.85 <sup>a</sup>	41.31±0.72 <sup>ab</sup>	43.94±0.63 <sup>bc</sup>
碱性磷酸酶/(U/L) ALP	15.00±1.00 <sup>a</sup>	17.33±0.58 <sup>abc</sup>	19.00±1.00 <sup>c</sup>	18.67±1.53 <sup>bc</sup>	18.33±0.58 <sup>bc</sup>	15.67±1.53 <sup>ab</sup>
酸性磷酸酶/(U/L) ACP	9.23±0.61 <sup>a</sup>	10.10±0.61 <sup>ab</sup>	11.37±0.58 <sup>b</sup>	11.75±0.89 <sup>b</sup>	10.10±0.45 <sup>ab</sup>	9.62±0.50 <sup>a</sup>
总胆固醇/(mmol/L) T-CHO	3.77±0.15	3.71±0.09	3.87±0.05	3.67±0.05	3.68±0.05	3.67±0.01
白蛋白/(g/L) ALB	2.67±0.58	2.67±0.58	2.33±0.58	3.33±0.58	2.67±0.58	2.72±0.57
总蛋白/(g/L) TP	61.00±1.00 <sup>a</sup>	63.67±0.58 <sup>a</sup>	71.00±1.00 <sup>b</sup>	72.67±1.15 <sup>b</sup>	72.33±1.53 <sup>b</sup>	72.33±1.15 <sup>b</sup>
甘油三酯/(mmol/L) TG	0.88±0.03	0.90±0.02	0.94±0.06	0.96±0.08	0.83±0.01	0.92±0.10
丙二醛/(nmol/mL) MDA	10.77±0.19 <sup>c</sup>	9.74±0.40 <sup>ab</sup>	9.17±0.29 <sup>a</sup>	9.42±0.16 <sup>a</sup>	9.81±0.3 <sup>ab</sup>	10.38±0.33 <sup>bc</sup>

## 2.5 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾肝胰腺生化指标的影响

肝胰腺丙二醛含量在蛋白酶添加量为 0.2 g/kg 时最低,且与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ );碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性在蛋白酶添加量为 0.2 g/kg 时有最大值,且显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )(表 6)。

## 3 讨论

### 3.1 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾生长性能的影响

在克氏原螯虾低鱼粉高植物蛋白饲料中添加 0.16~0.40 g/kg 蛋白酶,其生长性能得到了显著改善。类似地,在凡纳滨对虾低鱼粉饲料中添加

表 6 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾肝胰腺生化指标的影响

Tab. 6 Effects of dietary protease levels on hepatopancreas biochemical indices of *P. clarkii*

项目 items		饲料蛋白酶添加水平/(g/kg) dietary protease levels					
		0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
丙二醛/(nmol/mg prot)	MDA	18.85±0.11 <sup>c</sup>	18.11±0.77 <sup>c</sup>	16.74±0.24 <sup>a</sup>	17.08±0.22 <sup>ab</sup>	17.90±0.30 <sup>bc</sup>	18.83±0.11 <sup>c</sup>
碱性磷酸酶/(U/g prot)	ALP	6.74±0.68 <sup>a</sup>	7.28±0.49 <sup>ab</sup>	8.25±0.24 <sup>b</sup>	7.80±0.18 <sup>ab</sup>	6.77±0.26 <sup>a</sup>	7.00±0.60 <sup>a</sup>
酸性磷酸酶/(U/g prot)	ACP	9.67±0.45 <sup>a</sup>	10.91±0.64 <sup>abc</sup>	11.72±0.38 <sup>c</sup>	11.69±0.40 <sup>bc</sup>	10.00±1.14 <sup>abc</sup>	9.89±0.61 <sup>ab</sup>

0.175 g/kg 的蛋白酶(一种由细菌产生的碱性蛋白酶, 最适酸碱度为 8.5, 活性为 35 000 U/g), 其增重率显著提高, 饲料系数显著降低<sup>[13]</sup>, 蛋白质效率显著升高<sup>[2]</sup>。在尼罗罗非鱼饲料中添加 0.5 g/kg 的蛋白酶(活性为 6 000 000 U/g) 也获得与之类似的结果<sup>[3]</sup>。这可能是添加外源蛋白酶可钝化或消除饲料中的一些抗营养因子, 如豆粕球蛋白、豆粕蛋白酶抑制因子等<sup>[14]</sup>, 促进水产动物对植物蛋白的吸收利用, 从而促进生长、提高饲料利用<sup>[13]</sup>。然而当饲料中添加过量蛋白酶时, 克氏原螯虾的生长性能却受到抑制, 这可能是由于所摄入蛋白底物缺乏, 导致蛋白酶将体蛋白作为底物进行水解<sup>[2]</sup>。与之不同的是, 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 高植物蛋白饲料中添加单一酶制剂(如蛋白酶等) 并不能改变虹鳟增重率<sup>[15]</sup>。这可能是和实验养殖对象的种类或蛋白酶添加量、酶解时间、酶解温度以及饲料加工方式等有关, 如在凡纳滨对虾膨化饲料和硬颗粒饲料中添加等量蛋白酶, 结果显示在硬颗粒饲料中的效果明显优于膨化饲料<sup>[16]</sup>。

### 3.2 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾全虾及腹部肌肉基本成分的影响

在克氏原螯虾高植物蛋白饲料中添加蛋白酶对全虾和腹部肌肉的水分、粗脂肪以及灰分含量均无显著影响, 与 Song 等<sup>[2]</sup> 及刘鼎云等<sup>[17]</sup> 的研究结果一致。全虾和腹部肌肉粗蛋白质含量随着蛋白酶添加水平的增加呈先增后减的变化趋势, 全虾粗蛋白质含量在添加量为 0.2 g/kg 时有最大值, 达 10.40%。腹部肌肉粗蛋白质含量在添加量为 0.2 g/kg 时有最大值, 达 18.36%, 这与凡纳滨对虾低鱼粉饲料中添加 0.175 g/kg 蛋白酶可显著提高腹部肌肉粗蛋白质含量的研究结果类似<sup>[2]</sup>。这可能是外源蛋白酶提高了饲料转化率以及蛋白质效率, 从而增加了全虾和腹部肌肉蛋白沉积。蛋白质沉积率与蛋白质的合成代谢有关<sup>[18]</sup>, 当蛋白酶添加量为 0.2~0.4 g/kg 时, 蛋白质效率和蛋白质

沉积率较对照组显著升高。进一步证明, 在高植物蛋白饲料中添加蛋白酶可促进克氏原螯虾体蛋白合成。

### 3.3 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾肠道及肝胰腺消化酶活性的影响

消化酶与水产动物消化机能密切相关, 消化酶活性高低会直接影响水产动物对营养物质的消化吸收<sup>[19]</sup>。在凡纳滨对虾低鱼粉饲料中添加 0.175 g/kg 蛋白酶, 显著提高了肝胰腺蛋白酶、脂肪酶以及淀粉酶活性<sup>[2]</sup>。在奥尼罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) 饲料中添加 1 g/kg 耐高温酶制剂(主要含量为蛋白酶), 其前肠蛋白酶活性较对照组显著提高了 16.83%, 肝胰腺以及前肠淀粉酶活性分别显著提高了 32.24% 和 31.80%<sup>[19]</sup>。在虹鳟低鱼粉饲料中添加 0.175 g/kg 蛋白酶可显著提高其肠和胃蛋白酶活性<sup>[20]</sup>。本实验肝胰腺及肠道消化酶活性随着蛋白酶添加水平的增加呈先增后减的变化趋势, 且均在蛋白酶添加量为 0.20 g/kg 时活性最高, 与上述研究结果基本一致。这可能是添加适宜外源蛋白酶促进机体内源消化酶的分泌, 进而提高机体对脂肪和糖类的利用率, 最终促进机体的生长, 节约了饲料蛋白质, 提高了体蛋白的合成<sup>[13]</sup>。

### 3.4 饲料蛋白酶添加水平对克氏原螯虾血清和肝胰腺生化指标的影响

血清甘油三酯和总胆固醇是监测心血管健康的主要指标<sup>[21]</sup>, 本实验各组间血清甘油三酯和总胆固醇均无显著差异, 与在异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 低鱼粉饲料中添加 0.075~0.600 g/kg 中性蛋白酶的实验结果一致<sup>[22]</sup>。谷草转氨酶和谷丙转氨酶是与氨基酸代谢有关的氨基转移酶, 当肝脏等器官受损时, 血清中这些转氨酶活性将升高<sup>[11]</sup>。在尼罗罗非鱼高鱼粉及低鱼粉饲料中添加蛋白酶均可显著降低血清谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性<sup>[23]</sup>。本实验血清谷草转氨酶和谷丙转氨酶

活性均随着蛋白酶添加量的递增呈现先减后增的变化趋势,说明添加适量蛋白酶有助于改善克氏原螯虾的肝胰腺健康<sup>[11]</sup>。

酸性磷酸酶被认为是巨噬细胞中溶酶体的标志性酶,也是直接参与磷酸基转移的溶酶体酶的重要组成部分<sup>[2]</sup>。由于克氏原螯虾等较低等的水产动物缺乏特异性免疫系统,因此只能靠非特异性免疫来形成有效免疫,如细胞免疫和体液免疫,其中就包括酸性磷酸酶和碱性磷酸酶<sup>[24]</sup>。在凡纳滨对虾低鱼粉饲料中添加 0.125~0.175 g/kg 蛋白酶,血清酸性磷酸酶活性较对照组显著升高;添加量为 0.150~0.175 g/kg 时,血清碱性磷酸酶活性显著升高<sup>[24]</sup>。本实验血清以及肝胰腺酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性均随着蛋白酶添加量的升高呈先增后减的变化趋势,说明在克氏原螯虾高植物蛋白饲料中添加适量蛋白酶有助于提高其免疫力。

丙二醛被视为生物体内氧化应激水平的指示器,是细胞和组织脂质过氧化的最终产物<sup>[25]</sup>。本实验血清和肝胰腺丙二醛含量均有所降低,因此进一步证明添加蛋白酶可以增强克氏原螯虾的免疫力。血清总蛋白包括白蛋白和球蛋白,球蛋白与机体免疫应答有关,白蛋白与维持血浆胶体渗透压有关<sup>[26]</sup>。本实验结果显示,血清总蛋白含量在蛋白酶添加量为 0.4 g/kg 时有最大值,而各組间白蛋白含量无显著差异,因此推测总蛋白的升高可能主要是由于球蛋白含量的升高所致,由此进一步证明,添加适量蛋白酶可能在一定程度上改善了克氏原螯虾的免疫力。

#### 4 结论

由增重率、饲料系数、蛋白质效率与蛋白酶添加水平的折线回归模型得出,蛋白酶适宜添加量分别为 0.16、0.24、0.23 g/kg。在克氏原螯虾高植物蛋白饲料中添加 0.2~0.4 g/kg 蛋白酶还提高了克氏原螯虾的免疫力和肠道及肝胰腺消化酶活性,从而使植物蛋白被充分利用。因此,建议克氏原螯虾高植物蛋白饲料中蛋白酶适宜添加量为 0.16~0.40 g/kg。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Froehlich H E, Jacobsen N S, Essington T E, *et al.* Avoiding the ecological limits of forage fish for fed  
<https://www.china-fishery.cn>

- aquaculture[J]. *Nature Sustainability*, 2018, 1(6): 298-303.
- [2] Song H L, Tan B P, Chi S Y, *et al.* The effects of a dietary protease-complex on performance, digestive and immune enzyme activity, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei* fed high plant protein diets[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(5): 2550-2560.
- [3] Saleh E S E, Tawfeek S S, Abdel-Fadeel A A A, *et al.* Effect of dietary protease supplementation on growth performance, water quality, blood parameters and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2022, 106(2): 419-428.
- [4] Chowdhury M A K, Zhu J, Cai C, *et al.* Dietary protease modulates nutrient retention efficiency and hepatopancreatic protease activity in juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2018, 24(2): 911-917.
- [5] Huner J V. *Procambarus* in North America and elsewhere[M]//Holdich D M, Lowery R S. *Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation*. Portland: Timber Press, 1988: 239-261.
- [6] Yue G H, Li J L, Bai Z Y, *et al.* Genetic diversity and population structure of the invasive alien red swamp crayfish[J]. *Biological Invasions*, 2010, 12(8): 2697-2706.
- [7] 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.
- 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 (in Chinese).
- [8] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
- Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Promotion Station, China Fisheries Society. *China Fishery Statistical Yearbook*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021 (in Chinese).
- [9] 杨长庚, 苏富强, 文华, 等. 不同蛋白源饲料对克氏原螯虾生长及胰岛素生长因子受体基因表达的影响[J]. *淡水渔业*, 2019, 49(5): 86-92.
- Yang C G, Su F Q, Wen H, *et al.* Effects of different protein sources feed on growth and IGF1R mRNA expression of *Procambarus clarkia*[J]. *Freshwater Fish*  
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



- eries, 2019, 49(5): 86-92 (in Chinese).
- [10] Lu X, Peng D, Chen X R, *et al.* Effects of dietary protein levels on growth, muscle composition, digestive enzymes activities, hemolymph biochemical indices and ovary development of pre-adult red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 18: 100542.
- [11] 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. 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 (in Chinese).
- [12] Xu L, Tian J, Wen H, *et al.* Dietary calcium requirement of red swamp crayfish (*Procambarus clarkia*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, 27(1): 153-162.
- [13] Yao W X, Li X Q, Chowdhury M A K, *et al.* Dietary protease, carbohydrase and micro-encapsulated organic acid salts individually or in combination improved growth, feed utilization and intestinal histology of Pacific white shrimp[J]. *Aquaculture*, 2019, 503: 88-95.
- [14] Palliyeguru M W C D, Rose S P, Mackenzie A M. Effect of trypsin inhibitor activity in soya bean on growth performance, protein digestibility and incidence of sub-clinical necrotic enteritis in broiler chicken flocks[J]. *British Poultry Science*, 2011, 52(3): 359-367.
- [15] Farhangi M, Carter C G. Effect of enzyme supplementation to dehulled lupin - based diets on growth, feed efficiency, nutrient digestibility and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. *Aquaculture Research*, 2007, 38(12): 1274-1282.
- [16] Li X Q, Chai X Q, Liu D Y, *et al.* Effects of temperature and feed processing on protease activity and dietary protease on growths of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2016, 22(6): 1283-1292.
- [17] 刘鼎云, 冷向军, 卢永红, 等. 饲料中添加蛋白酶 Aquagrow 对鲤生长和蛋白质消化酶活性的影响[J]. *淡水渔业*, 2007, 37(5): 50-52. Liu D Y, Leng X J, Lu Y H, *et al.* Effects of adding protease (Aquagrow) in diet on growth and digestive protease activities of common carp[J]. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37(5): 50-52 (in Chinese).
- [18] Árnason T, Björnsson B, Steinarsson A, *et al.* Effects of temperature and body weight on growth rate and feed conversion ratio in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Aquaculture*, 2009, 295(3-4): 218-225.
- [19] 乌兰, 齐景伟, 谢骏. 耐高温酶制剂对奥尼罗非鱼生长和消化酶活性的影响[J]. *水产科学*, 2009, 28(10): 579-582. Wu L, Qi J W, Xie J. Effects of thermostable enzymes on growth performance, digestive enzymatic activities of Hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*[J]. *Fisheries Science*, 2009, 28(10): 579-582 (in Chinese).
- [20] 张娟娟, 李小勤, 冷向军, 等. 外源蛋白酶对虹鳟生长和肠道组织结构的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(6): 534-538. Zhang J J, Li X Q, Leng X J, *et al.* Effects of supplemental protease on growth and intestinal tissue structure in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(6): 534-538 (in Chinese).
- [21] Austin M A, Hokanson J E, Edwards K L. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor[J]. *The American Journal of Cardiology*, 1998, 81(4 Suppl): 7B-12B.
- [22] Liu W, Wu J P, Li Z, *et al.* Effects of dietary coated protease on growth performance, feed utilization, nutrient apparent digestibility, intestinal and hepatopancreas structure in juvenile Gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2018, 24(1): 47-55.
- [23] Hassaan M S, Mohammady E Y, Adnan A M, *et al.* Effect of dietary protease at different levels of malic acid on growth, digestive enzymes and haemato-immunological responses of Nile tilapia, fed fish meal free diets[J]. *Aquaculture*, 2020, 522: 735124.
- [24] Yeh S P, Chen Y N, Hsieh S L, *et al.* Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(4): 582-588.
- [25] Liu X L, Xi Q Y, Yang L, *et al.* The effect of dietary panax ginseng polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 495-500.
- [26] Chatzifotis S, Panagiotidou M, Papaioannou N, *et al.* Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles[J]. *Aquaculture*, 2010, 307(1-2): 65-70.

## Effects of dietary protease supplementation in high-plant-protein diets on the growth, immunity and digestion of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)

YANG Wenxiu<sup>1,2</sup>, CHEN Xiaoru<sup>3</sup>, WEN Hua<sup>2</sup>, WU Fan<sup>2</sup>, HU Wei<sup>1</sup>,  
GAO Weihua<sup>1\*</sup>, TIAN Juan<sup>2\*</sup>, YUAN Hanwen<sup>1</sup>, XU Shude<sup>4</sup>

(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. Healthy Aquaculture Key Laboratory of Sichuan Province, Tongwei Co., Ltd., Chengdu 610041, China;

4. Guangdong VTR Bio-tech Co., Ltd, Zhuhai 519060, China)

**Abstract:** To investigate the optimal supplementation of dietary exogenous protease in plant-based diets of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*), crayfish [initial mean weight (9.25±0.20) g] were fed six isonitrogenous and isoenergetic diets which were formulated to contain graded protease levels (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 g/kg protease, respectively) for 8 weeks. Each diet was fed to triplicate tanks with 15 per crayfish in each tank. The results showed that, with the increase of dietary protease supplementation: ① There were no significant difference in survival rate, hepatosomatic index and flesh content among groups. The weight gain rate firstly increased and then decreased, and reached the maximum when dietary protease supplementation level was 0.2 g/kg. The feed conversion ratio reached the lowest value when dietary protease supplementation level was 0.4 g/kg. The protein efficiency and protein deposition rate reached the highest in shrimp fed the diet with 0.4 and 0.2 g/kg protease, respectively. Broken-line model analysis in terms of the weight gain rate, feed conversion ratio and protein efficiency indicated that optimal dietary protease supplement of crayfish was 0.16, 0.24 and 0.23 g/kg, respectively. ② The crude protein contents in muscle and whole shrimp firstly increased and then decreased, and the maximum occurred at the shrimp fed the diet with 0.2 g/kg protease. ③ The activities of protease, lipase and amylase in intestine and hepatopancreas all reached the maximum at the shrimp fed the diet with 0.2 g/kg protease, which was significantly higher than the control shrimp. ④ The maximum content of total protein in serum were observed in shrimps fed the diets with 0.4 g/kg protease; the activities of glutamic oxaloacetic transaminase and glutamic pyruvic transaminase firstly decreased and then increased, with the lowest value occurs at the shrimp fed the diet with 0.4 g/kg protease; the activities of alkaline phosphatase and acid phosphatase firstly increased and then decreased, and reached the maximum in 0.2 g/kg group and 0.4 g/kg group, respectively. The content of malondialdehyde had the minimum value at the shrimp fed the diet with 0.2 g/kg protease. ⑤ The activities of alkaline phosphatase and acid phosphatase in hepatopancreas firstly increased and then decreased, and reached the maximum at the shrimp fed the diet with 0.2 g/kg protease, which was significantly higher than the control shrimp. In conclusion, under this experimental condition, the appropriate supplementation of dietary protease in red swamp crayfish is from 0.16 to 0.40 g/kg.

**Key words:** *Procambarus clarkii*; protease; growth performance; digestion; immunity

**Corresponding authors:** GAO Weihua. E-mail: gaoweihua@yangtzeu.edu.cn;

TIAN Juan. E-mail: tianjuan@yfi.ac.cn

**Funding projects:** Major Projects of Hubei Province Technical Innovation Special Program (2019ABA077); Key Research and Development Project of Sichuan Province (2018NZ0152); Industry-university-research Cooperation of Tongwei Co. Project (TW2018I001, 2011259); Engineering Research Center of Ecology and Agricultural Use of Wetland, Ministry of Education (KFT202003, KFT202102); Hundred of Schools and Counties Project from Department of Education of Hubei Province (BXLBX0312)