

黄颡鱼幼鱼植物性蛋白饲料中添加柠檬酸替代磷酸二氢钠合适水平的研究

程年成, 雷文, 冯美惠, 王春芳*

(华中农业大学水产学院,淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心,湖北 武汉 430070)

摘要: 本实验探究黄颡鱼幼鱼植物性蛋白基础饲料中添加柠檬酸替代磷酸二氢钠的合适水平。共设置 7 个处理组:阳性对照组 DP(只添加 NaH_2PO_4 20 g/kg)和阴性对照组 DN(不添加柠檬酸和 NaH_2PO_4);实验组 D0(柠檬酸 2 g/kg + NaH_2PO_4 20 g/kg)、D25(柠檬酸 2 g/kg + NaH_2PO_4 15 g/kg)、D50(柠檬酸 2 g/kg + NaH_2PO_4 10 g/kg)、D75(柠檬酸 2 g/kg + NaH_2PO_4 5 g/kg)、D100(柠檬酸 2 g/kg)。实验组中柠檬酸替代 NaH_2PO_4 的比例分别为 0%、25%、50%、75% 和 100%,分别饲养初始规格为 (3.5 ± 0.1) g 的黄颡鱼,每个处理组 3 口缸,每缸 50 尾,投喂 8 周。实验结束后,对鱼体生长性能、营养物质的表观消化率、全鱼营养成分、脊椎骨元素含量、抗氧化性能等指标进行分析。结果显示:(1)饲料中添加柠檬酸替代磷酸二氢钠实验组与阴性对照组相比,显著提高了黄颡鱼的末体质量、增重率、特定生长率,降低了饵料系数,但与阳性对照组相比差异不显著。替代比例为 0%~50% 时,生长表现最好;(2)实验组中柠檬酸替代磷酸二氢钠与阴性对照组相比,显著提高了干物质、蛋白质以及磷的表观消化率,降低了粪便 N 和 P 的含量,与阳性对照组相比差异不显著,且替代比例越高,粪便中 N 和 P 含量越低;(3)实验组中添加柠檬酸替代磷酸二氢钠对全鱼水分、粗蛋白、粗脂肪、灰分含量无影响($P > 0.05$);但与阴性对照组相比显著提高鱼体 Ca、Mg、P、Cu 的储积量($P < 0.05$),且随着替代水平的提高呈降低趋势,在 0%~75% 替代水平储积量最高;脊椎骨各元素含量与阴性对照组相比有所提高,但在替代组与对照组间无显著性差异;(4)柠檬酸替代无机磷在 25%~75% 水平与阴性对照组相比,显著增强了过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、碱性磷酸酶的活性,但对丙二醛、免疫球蛋白 M、血磷和血钙的含量无影响。综上所述,为保证鱼体正常生长,减少养殖环境污染,降低饲料成本,在当前基础配方下,黄颡鱼饲料中添加柠檬酸替代磷酸二氢钠的水平可为 25%~50%。

关键词: 黄颡鱼;柠檬酸;磷酸二氢钠;替代水平;磷利用率

中图分类号: S 963.73

文献标志码: A

磷(phosphorus)在鱼体中是一种重要的微量元素,它既是三磷酸腺苷(ATP)、核酸、核苷酸、磷脂、蛋白质以及很多辅酶的重要组成成分,也参与所有细胞内的能量代谢^[1]。磷的缺乏将阻碍鱼体的生长、饵料转化以及骨骼的矿化。由于水体中的磷具有含量很低,且鱼体对磷的吸收率低等特点,饲料中的磷成了养殖鱼类主要的磷源^[2]。但是未被养殖对象利用的磷直接排入水

体,会导致水体的富营养化^[3]。

当前,用植物性蛋白替代动物性蛋白作为饲料蛋白源已成为主流趋势。然而,植物性蛋白源中存在反消化因子(ANFs),如酶抑制剂、非淀粉多糖(NSP)和植酸磷等^[4]。这些反营养因子会阻止鱼体对营养物和氨基酸的消化吸收,对鱼体的生长、饵料系数也产生影响。植物原料中含有丰富的磷源,但是其中 2/3 以上以植酸磷的形式

收稿日期:2015-03-10 修回日期:2015-04-12

资助项目:国家自然科学基金(31172421);中央高校基本科研业务费专项(2013PY076)

通信作者:王春芳,E-mail:cfwang@mail.hzau.edu.cn

存在,不能被鱼体直接利用^[3],同时植酸磷能与铁、钙、锌、镁等不可缺少的元素结合形成螯合物,影响元素的吸收和生物有效性^[5-6]。

酸化剂具有易吸收、无污染、无残留等特点,是畜禽饲料中普遍的添加剂,在水产饲料中也受到了相当的关注。酸化剂的作用主要表现在提高饲料适口性,改善肠道 pH 值,促进矿物质和维生素的消化和吸收,提高机体免疫能力和参与代谢等方面。国内外关于酸化剂在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[7-8]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[9-10]、鲫(*Carassius auratus*)^[11-12]、奥尼罗非鱼(*Oreochromis aureus* ♂ × *O. niloticus* ♀)^[13-14]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[15]等水产养殖对象上的应用显示酸化剂有一定的促进生长的作用。

为促进水产养殖业的可持续发展,必须降低对水域环境的污染以及养殖成本。本实验以黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)作为研究对象,以柠檬酸和磷酸二氢钠作为实验材料,以植物性蛋白饲料作为基础,通过在饲料中添加柠檬酸并逐渐减少无机磷(磷酸二氢钠)的添加量,对黄颡鱼的生长性能、全鱼组成、抗氧化性能、氮磷排放等进行综合分析,来探讨柠檬酸替代无机磷的合适水平。

1 材料与方法

1.1 实验设计和饲料

设计 7 组饲料,包括阳性对照组 DP(只添加 NaH_2PO_4 20 g/kg)和阴性对照组 DN(不添加柠檬酸和 NaH_2PO_4);实验组 D0(柠檬酸 2 g/kg + NaH_2PO_4 20 g/kg)、D25(柠檬酸 2 g/kg + NaH_2PO_4 15 g/kg)、D50(柠檬酸 2 g/kg + NaH_2PO_4 10 g/kg)、D75(柠檬酸 2 g/kg + NaH_2PO_4 5 g/kg)、D100(柠檬酸 2 g/kg)。实验组中柠檬酸替代 NaH_2PO_4 的比例分别为 0%、25%、50%、75% 和 100%(柠檬酸由上海国药集团化学试剂有限公司提供)。饲料配方见表 1。所有原料先经粉碎,过 40 目筛。按配方表称取原料,在混匀器中混匀;将柠檬酸用研钵研碎,称取所需柠檬酸溶于占饲料干重 30% 的水中,充分混匀后用绞肉机加工成颗粒状饲料。用电扇风吹干,保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰柜中备用。

1.2 生长实验

实验黄颡鱼购自湖北省黄冈市团风县百荣渔场,初始体质量为 (3.5 ± 0.1) g,实验在华中农业

大学水产学院地下室养殖循环系统(单个缸容积为 300 L)中进行,实验系统装有智能溶氧、温度、pH 检测系统。实验前先驯化 2 周,投喂基础料以适应实验环境。每个处理设 3 个重复,每个重复选取体型、规格相近的黄颡鱼幼鱼 50 尾。

每天于 8:30 和 15:30 投喂 2 次,饱食投喂。养殖实验持续 8 周,每天投喂前换去 1/3 的水。实验期间温度为 $(24.3 \pm 0.3)\text{ }^\circ\text{C}$,溶氧为 (6.59 ± 0.15) mg/L, pH 为 8.03 ± 0.01 , $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为 (0.13 ± 0.03) mg/L, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为 (5.6 ± 0.1) mg/L, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 为 (0.013 ± 0.002) mg/L,水循环速度约为 3.4 L/min。

1.3 样品采集与分析

采用虹吸法收集残饵和粪便。残饵的收集在每次投饵半小时后进行,60 $^\circ\text{C}$ 烘干称重,计算总摄食量;在养殖实验开始半个月后收集新鲜、完整的粪便,60 $^\circ\text{C}$ 烘干称重。实验期间溶氧(DO)、pH、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 用水质分析仪器(YSI, Ohio, USA)测定;亚硝氮和总氮分别采用气相分子吸收光谱法(HJ/T 197-2005)和碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法(HJ 636-2012)测定。

养殖实验结束时,禁食 24 h,经 MS-222(200 mg/L)麻醉后,称取每缸鱼的末体质量。每缸随机取 10 尾保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 用于全鱼生化成分和组成元素分析,另每缸随机抽取 5 尾取血,血浆经 3 000 r/min,10 min 离心分离并分存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$,血液指标用试剂盒测定(购自中国南京生物工程研究所)。每缸随机取 20 尾鱼麻醉(MS 222,200 mg/L)用于骨骼样品的测定:将鱼样放在微波炉中加热 2 分钟,然后轻轻剔去脊椎骨周围的组织和肌肉,并用蒸馏水洗净,在 105 $^\circ\text{C}$ 烘 6 h。用氯仿甲醇溶液(体积比 1:1)提取 12 h,除去脂肪并烘干,备用。

先将饲料样和全鱼样品粉碎、过筛。生化成分采用标准方法(AOAC)^[16]测定。粗蛋白(N × 6.25)用凯氏定氮法在自动凯氏定氮仪(1030-Auto. analyzer)中进行测定,粗脂肪采用石油醚浸提法在索氏抽提仪(Soxtec system HT6)中进行测定。干物质通过在 105 $^\circ\text{C}$ 烘 24 h 测定,脊椎骨、粪便、全鱼粉在马弗炉中 550 $^\circ\text{C}$ 下烧 24 h 炭化,再加入硝酸溶液(硝酸:双蒸水体积比为 1:1)消化,定容;以电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP)测定元素的含量。饲

料中植酸磷的测定参照王永真等^[17]方法测定; 采用磷钼蓝分光光度法测定; 饲料 pH 值的测定无机磷的测定将样品用盐酸和硝酸处理, 过滤, 参考 Radecki^[18] 等的方法。

表 1 实验饲料配方及化学组成

Tab.1 Formulation and chemical composition of experimental diets

	diets						
	DN	DP	D0	D25	D50	D75	D100
原料组成 ingredients (g/kg 饲料 feed)							
鱼粉 fish meal ¹	250	250	250	250	250	250	250
豆粕 soybean meal ¹	250	250	250	250	250	250	250
菜粕 rapeseed meal ¹	150	150	150	150	150	150	150
棉粕 cottonseed meal ¹	100	100	100	100	100	100	100
小麦粉 wheat flour ¹	100	100	100	100	100	100	100
豆油 soybean oil	40	40	40	40	40	40	40
维混物 vitamin premix ²	10	10	10	10	10	10	10
多矿预混物(不含磷) mineral premix(P free) ³	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5	27.5
维生素 C vitamin C	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
氯化胆碱 choline chloride	5	5	5	5	5	5	5
三氧化二钇 Y ₂ O ₃	1	1	1	1	1	1	1
羧甲基纤维素 carboxymethyl cellulose	20	20	20	20	20	20	20
磷酸二氢钠 NaH ₂ PO ₄	0	20	20	15	10	5	0
柠檬酸 citric acid	0	0	2	2	2	2	2
大蒜素 allicin	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
α-纤维素 α-cellulose	36.5	16.5	14.5	19.5	24.5	29.5	34.5
化学组成 (g/kg 干物质) chemical compositions (dry matter)							
水分 moisture	79.8	59.6	92.2	91.6	64.5	76.3	77.0
粗脂肪 crude lipid	104	134	126	124	102	113	123
粗蛋白 crude protein	448	443	454	451	451	452	440
灰分 ash	122	118	131	123	124	121	117
钙 Ca	16.31	16.33	16.34	16.26	16.18	16.40	16.15
钾 K	8.22	8.80	9.15	8.75	9.21	8.80	9.18
锌 Zn	0.13	0.14	0.14	0.13	0.14	0.13	0.13
镁 Mg	2.99	2.88	2.89	2.92	2.95	2.96	2.88
钇 Y	0.62	0.61	0.67	0.69	0.69	0.60	0.63
植酸磷 phytate phosphorus	11.71	11.48	11.52	11.64	11.58	11.57	11.50
无机磷 inorganic phosphorus	3.09	8.32	8.26	6.98	5.70	4.31	3.05
总磷 total phosphorus	14.80	19.80	19.78	18.62	17.28	15.88	14.55
酸碱度 pH	5.8	5.8	5.8	5.7	5.6	5.6	5.6

注:1. 鱼粉(g/kg 干物质):粗蛋白 624,粗脂肪 149,灰分 223;豆粕(g/kg 干物质):粗蛋白 481,粗脂肪 68.1,灰分 72.3;菜粕(g/kg 干物质):粗蛋白 393,粗脂肪 66.2,灰分 112;棉粕(g/kg 干物质):粗蛋白 506,粗脂肪 72.4,灰分 90.1;小麦粉(g/kg 干物质):粗蛋白 128,粗脂肪 711,灰分 11.2。(由中国武汉高龙饲料提供)。2. 维生素预混物(每 kg 饲料中)含:维生素 K₃ 20 mg,烟酸 250 mg,维生素 B₂ 50 mg,维生素 B₆ 25 mg,维生素 B₁ 25 mg,泛酸钙 100 mg,维生素 H 1.5 mg,叶酸 10 mg,维生素 B₁₂ 0.125 mg,维生素 C 250 mg,肌糖,750 mg,维生素 A 17 500 IU,维生素 D₃ 2 500 IU,维生素 E 175 IU。3. 多矿预混物(不含磷)(每 kg 饲料中)含:NaCl 275 mg,MgSO₄ · 7H₂O 4 125 mg,Na₂SO₄ 6 270 mg,K₂SO₄ 5 638 mg,CaCl₂ · 2H₂O 3 218 mg,FeSO₄ 688 mg,calcium lactate 963 mg,ZnSO₄ · 7H₂O 97 mg,MnSO₄ · 4H₂O 45 mg,CuSO₄ · 5H₂O 8.53 mg,CoSO₄ 0.28 mg,KI 0.83 mg

Notes:1. fish meal(g/kg dry matter): crude protein 624, crude lipid 149, ash 223; Soybean meal(g/kg dry matter): crude protein 481, crude lipid 68.1, ash 72.3; rapeseed meal(g/kg dry matter): crude protein 393, crude lipid 66.2, ash 112; cottonseed meal(g/kg dry matter): crude protein 506, crude lipid 72.4, ash 90.1; wheat flour(g/kg dry matter): crude protein 128, crude lipid 711, ash 11.2. (Gaolong Feed Company, Wuhan, China). 2. vitamin premix(per kg of diet): vitamin K₃ 20 mg, niacin 250 mg, riboflavin 50 mg, pyridoxine 25 mg, thiamin 25 mg, D-calcium pantothenate 100 mg, biotin 1.5 mg, folacin 10 mg, vitamin B₁₂ 0.125 mg, ascorbic acid 250 mg, inositol 750 mg, vitamin A 17 500 IU, vitamin D₃ 2 500 IU, vitamin E 175 IU. 3. mineral premix(P free)(per kg of diet): NaCl 275 mg, MgSO₄ · 7H₂O 4 125 mg, Na₂SO₄ 6 270 mg, K₂SO₄ 5 638 mg, CaCl₂ · 2H₂O 3 218 mg, FeSO₄ 688 mg, calcium lactate 963 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 97 mg, MnSO₄ · 4H₂O 45 mg, CuSO₄ · 5H₂O 8.53 mg, CoSO₄ 0.28 mg, KI 0.83 mg

计算公式:

(1) 增重率 (WGR, %) = (末体质量 - 初始体质量) / 初始体质量 × 100;

(2) 特定生长率 (SGR, %/d) = 100 × (ln 末平均体质量 - ln 初始平均体质量) / 养殖天数。

(3) 饵料系数 (FCR) = 总摄食量 / 鱼体总增重量

(4) 表观消化率 (%) = 100 × [1 - (饲料中 Y_2O_3 / 粪便中 Y_2O_3) × (粪便中元素含量 / 饲料中元素含量)]

(5) 干物质表观消化率 (%) = 100 × [1 - (粪便中 Y_2O_3 / 饲料中 Y_2O_3)]

1.4 数据分析与处理

实验所得数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 同时进行 Tukey 多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著。所有数据均以“平均值 ± 标准差” (mean ± SD) 表示。

2 结果

2.1 生长性能、营养物质表观消化率及粪便中的氮磷

饲料中添加柠檬酸的实验组提高了黄颡鱼生长性能, 但与阳性对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$) (表 2)。与阴性对照组相比, 替代 0% (D0)、25% (D25)、50% (D50) 的实验组末体质量 (final average body weight, FBW)、增重率 (weight gain rate, WGR)、特定生长率 (specific growth rate, SGR) 均显著增高 ($P < 0.05$), 饵料系数 (feed conversion ratio, FCR) 显著下降 ($P < 0.05$); 替代 75% (D75)、100% (D100) 的实验组各指标与阴性对照组相比, 差异不显著 ($P > 0.05$) (表 2)。饲料中添加柠檬酸替代磷酸二氢钠的实验组与阴性对照组相比, 显著增高饲料 P、蛋白质、干物质的表观消化率 ($P < 0.05$); 显著降低粪便中营养元素 N 和 P 的含量 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 2 不同比例柠檬酸替代磷酸二氢钠对黄颡鱼生长性能的影响
Tab. 2 The effects of different replacement ratios of NaH_2PO_4 with citric acid on growth performance of yellow catfish

	DN	DP	D0	D25	D50	D75	D100
初始体质量/g IBW	3.49 ± 0.01	3.48 ± 0.02	3.49 ± 0.03	3.49 ± 0.01	3.49 ± 0.03	3.49 ± 0.01	3.49 ± 0.01
末体质量/g FBW	13.8 ± 0.4 ^a	16.5 ± 0.2 ^b	16.6 ± 0.7 ^b	16.3 ± 0.6 ^b	16.1 ± 0.4 ^b	15.5 ± 0.4 ^{ab}	14.7 ± 0.4 ^{ab}
增重率/% WGR	295 ± 12 ^a	373 ± 6 ^b	375 ± 18 ^b	366 ± 15 ^b	362 ± 14 ^b	344 ± 12 ^{ab}	321 ± 14 ^{ab}
特定生长率/(%/d) SGR	2.45 ± 0.05 ^a	2.78 ± 0.02 ^b	2.78 ± 0.07 ^b	2.75 ± 0.06 ^b	2.73 ± 0.06 ^b	2.66 ± 0.05 ^{ab}	2.57 ± 0.06 ^{ab}
饵料系数 FCR	1.63 ± 0.08 ^b	1.30 ± 0.01 ^a	1.29 ± 0.04 ^a	1.32 ± 0.04 ^a	1.33 ± 0.09 ^{ab}	1.35 ± 0.04 ^{ab}	1.47 ± 0.09 ^{ab}

注: 数据是来自 3 个平行缸的平均值 ± 标准误, $P < 0.05$ 时有显著性差异, 下同

Notes: Datas are the means of three replicate mean ± SE. significant ($P < 0.05$), the same as the following

表 3 不同比例柠檬酸替代磷酸二氢钠对黄颡鱼表观消化率以及粪便氮、磷的影响
Tab. 3 The effects of different replacement ratios of NaH_2PO_4 with citric acid on apparent digestibility coefficients, fecal N and P of yellow catfish

组别 treatments	表观消化率/% apparent digestibility			粪便元素 (g/kg 干物质) fecal nutrients (dry matter)	
	磷 phosphorus	蛋白质 protein	干物质 dry matter	氮 nitrogen	磷 phosphorus
DN	41.32 ± 1.14 ^a	47.34 ± 3.42 ^a	45.68 ± 1.11 ^a	2.62 ± 0.04 ^b	2.17 ± 0.05 ^a
DP	49.71 ± 2.72 ^b	54.9 ± 3.82 ^b	55.13 ± 2.37 ^b	2.60 ± 0.05 ^b	2.07 ± 0.06 ^a
D0	55.81 ± 2.71 ^d	58.82 ± 6.34 ^{bc}	57.18 ± 1.49 ^b	2.44 ± 0.01 ^a	1.87 ± 0.09 ^b
D25	57.01 ± 1.26 ^d	65.87 ± 2.66 ^c	57.42 ± 2.16 ^b	2.41 ± 0.05 ^a	1.73 ± 0.09 ^b
D50	52.67 ± 2.24 ^c	60.79 ± 4.19 ^{bc}	59.56 ± 1.24 ^b	2.37 ± 0.04 ^a	1.65 ± 0.13 ^{bc}
D75	53.13 ± 1.88 ^c	56.48 ± 2.13 ^b	61.86 ± 0.38 ^b	2.30 ± 0.02 ^a	1.62 ± 0.04 ^{bc}
D100	52.31 ± 1.97 ^c	58.01 ± 2.58 ^{bc}	59.65 ± 1.41 ^b	2.31 ± 0.03 ^a	1.57 ± 0.09 ^c

2.2 全鱼组成及脊椎骨元素

与 2 个对照组相比, 饲料中添加柠檬酸替代

磷酸二氢钠的实验组对黄颡鱼全鱼水分、粗脂肪、粗蛋白和灰分含量均没有显著性差异 ($P > 0.05$)

(表 4)。与阴性对照组相比,实验组显著提高全鱼 Ca、Mg、P、Cu 含量 ($P < 0.05$)。与阳性和阴性对照组相比,实验组添加柠檬酸替代磷酸二氢钠

使黄颡鱼脊椎骨 Ca、P 的含量均有所提高但差异不显著 ($P > 0.05$);对脊椎骨 Mg 的含量无影响 ($P > 0.05$) (表 4)。

表 4 不同比例柠檬酸替代磷酸二氢钠对黄颡鱼全鱼组成、脊椎骨元素的影响
Tab. 4 The effects of different replacement ratios of NaH_2PO_4 with citric acid on proximate composition of yellow catfish

	DN	DP	D0	D25	D50	D75	D100
全鱼/% (占湿重的百分比) whole body (of wet weight)							
水分 moisture	76.2 ± 0.2	75.6 ± 0.3	76.2 ± 0.2	75.8 ± 0.3	76.1 ± 0.2	75.8 ± 0.3	76.3 ± 0.1
粗脂肪 crude lipid	5.47 ± 0.37	5.67 ± 0.05	5.30 ± 0.39	5.32 ± 0.23	5.30 ± 0.35	5.70 ± 0.24	5.06 ± 0.29
粗蛋白 crude protein	14.8 ± 0.1	15.1 ± 0.1	14.6 ± 0.4	15.5 ± 0.2	15.0 ± 0.1	14.9 ± 0.2	15.1 ± 0.1
灰分 ash	3.81 ± 0.06	3.75 ± 0.13	3.92 ± 0.07	3.85 ± 0.08	3.73 ± 0.04	3.75 ± 0.05	3.67 ± 0.07
全鱼(干重) whole body (dry matter)							
钙/(g/kg) Ca	51.6 ± 2.0 ^a	65.4 ± 4.7 ^b	69.3 ± 3.1 ^b	67.7 ± 2.1 ^b	67.0 ± 2.4 ^b	65.4 ± 2.0 ^b	62.7 ± 4.0 ^b
镁/(g/kg) Mg	1.70 ± 0.05 ^a	2.14 ± 0.12 ^b	2.24 ± 0.10 ^b	2.23 ± 0.08 ^b	2.19 ± 0.07 ^b	2.20 ± 0.09 ^b	2.15 ± 0.13 ^b
磷/(g/kg) P	29.5 ± 1.1 ^a	36.7 ± 2.0 ^b	38.4 ± 1.4 ^b	37.9 ± 1.0 ^b	37.3 ± 1.2 ^b	37.2 ± 1.0 ^b	36.4 ± 1.0 ^b
铜/(mg/kg) Cu	16.7 ± 0.3 ^a	22.1 ± 0.5 ^b	22.3 ± 0.6 ^b	22.4 ± 0.7 ^b	22.1 ± 0.7 ^b	21.4 ± 0.5 ^b	22.1 ± 0.6 ^b
骨骼元素/% (占干重的百分比) vertebrae minerals (of dry vertebrae)							
镁 Mg	0.409 ± 0.011	0.434 ± 0.023	0.433 ± 0.021	0.387 ± 0.011	0.399 ± 0.034	0.406 ± 0.016	0.398 ± 0.019
磷 P	9.17 ± 0.19	9.34 ± 0.19	9.61 ± 0.10	9.66 ± 0.19	9.56 ± 0.12	9.57 ± 0.29	9.49 ± 0.11
钙 Ca	19.4 ± 0.4	19.7 ± 0.2	20.0 ± 0.1	20.4 ± 0.5	19.6 ± 0.2	19.7 ± 1.3	19.7 ± 0.4

2.3 血液生理生化指标

饲料中添加柠檬酸的实验组与阴性对照组相比,显著提高过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、碱性磷酸酶 (AKP) 的活力 ($P < 0.05$),但与阳性对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$) (表 5);丙二醛 (MDA)、免疫球蛋白 (IgM)

的含量在对照组和所有处理组间没有显著差异 ($P > 0.05$)。饲料中添加柠檬酸对血液中磷的含量与阴性对照组相比有所提升,但与两组对照组相比差异不显著;血钙的含量在各实验组和对照组间均无差异 ($P > 0.05$) (表 5)。

表 5 柠檬酸替代无机磷酸二氢钠对黄颡鱼血液指标的影响
Tab 5 The effects of replacing NaH_2PO_4 with citric acid on serum biochemical indicators of yellow catfish

	DN	DP	D0	D25	D50	D75	D100
过氧化氢酶/(U/mg prot) CAT	16.08 ± 3.32 ^a	20.25 ± 10.5 ^b	24.24 ± 4.41 ^b	25.78 ± 2.24 ^b	26.24 ± 2.31 ^b	26.99 ± 1.84 ^b	23.63 ± 7.02 ^b
超氧化物歧化酶/(U/mg prot) SOD	10.46 ± 0.96 ^a	17.67 ± 2.22 ^b	20.61 ± 0.88 ^b	19.92 ± 0.34 ^b	19.24 ± 0.68 ^b	17.71 ± 1.11 ^b	16.36 ± 0.76 ^b
碱性磷酸酶/(U/g prot) AKP	2.91 ± 0.28 ^a	4.59 ± 0.16 ^b	4.79 ± 0.22 ^b	4.66 ± 0.31 ^b	4.81 ± 0.12 ^b	4.52 ± 0.14 ^b	4.17 ± 0.73 ^b
丙二醛/(nmol/mg prot) MDA	15.26 ± 1.59	14.79 ± 2.79	14.14 ± 3.51	15.46 ± 1.60	15.33 ± 5.94	15.33 ± 2.60	14.28 ± 3.38
免疫球蛋白 M/(mg/mL) IgM	0.65 ± 0.03	0.65 ± 0.03	0.63 ± 0.06	0.62 ± 0.04	0.68 ± 0.04	0.64 ± 0.03	0.66 ± 0.03
血磷/(mmol/L) serum phosphorus	1.45 ± 0.05	1.58 ± 0.13	1.65 ± 0.21	1.60 ± 0.10	1.51 ± 0.14	1.55 ± 0.05	1.61 ± 0.27
血钙/(mmol/L) serum calcium	3.04 ± 0.01	3.07 ± 0.02	3.08 ± 0.07	3.07 ± 0.01	3.07 ± 0.02	3.06 ± 0.02	3.01 ± 0.04

3 讨论

本实验中,阳性对照组和柠檬酸替代磷酸二氢钠水平分别为 0%、25% 和 50% 实验组黄颡鱼末体质量、增重率、特定生长率表现最好,饵料系数最低,且相互间无显著差异,这可能是因为在

替代水平内,饲料中可利用磷含量满足了鱼体的最快生长需求;而在替代水平为 75% 和 100% 时,各生长指标与替代水平为 0% ~ 50% 的处理组相比呈降低趋势,表明在此水平处理下,饲料中可利用磷含量不能满足鱼体的正常需求,阻碍了鱼体的快速生长。有研究显示柠檬酸有促进肌醇六磷

酸脱磷酸作用^[19],Partenen等^[20]指出提高营养物质利用率主要看有机酸的添加水平。饲料中添加柠檬酸可以促进有益菌的增殖,抑制有害微生物繁殖,减少营养物质的消耗和抗生长毒素的产生;而且某些有机酸是能量代谢的中间产物,可直接参与代谢,提供能量^[21]。本实验结果表明,添加柠檬酸的实验组提高了鱼体的增重率、特定生长率,降低了饵料系数。这与草鱼^[7]、奥尼罗非鱼^[14,22-23]、鲫^[12]、虹鳟^[24]、鲤^[10]、黄颡鱼^[25]等的研究结果相同。

在本实验结果中,实验组 D100(柠檬酸替代磷酸二氢钠的水平为 100%)与阴性对照组 DN(不添加柠檬酸和磷酸二氢钠)相比,显著提高了磷的表观消化率,同时降低了粪便中磷的含量。这说明,在植物性蛋白饲料中添加柠檬酸有促进黄颡鱼幼鱼对磷的吸收、提高磷利用率的作用。这与有关异育银鲫^[12]、奥尼罗非鱼^[22]等的研究结果一致。Sugiura^[26]等关于虹鳟的实验表明,饲料中添加 5% 的柠檬酸,磷的表观消化率从 68.3% 提高到 84.4%,粪便磷含量从 32 000 $\mu\text{g/g}$ 降低到 14 300 $\mu\text{g/g}$ 。伴随着营养物质利用率的提高,氮、磷的排泄量降低。饲料中添加柠檬酸,所有替代比例的实验组均显著性提高了饲料中磷、蛋白质以及干物质的表观消化率,且表观消化率呈现先升高后降低的趋势。这是因为柠檬酸作为饲料添加剂,可降低有胃鱼类(如虹鳟^[27-29])胃液的 pH,增强胃中的酸性环境,提高胃蛋白酶的活性^[30]。综合表观消化率和粪便氮、磷含量考虑,柠檬酸适宜替代水平为 25%~75%。此外,添加柠檬酸的各实验组与对照组相比,鱼体水分、粗蛋白、粗脂肪、灰分均无显著性差异,这与添加柠檬酸对罗非鱼营养成分无影响相似^[22,31]。

酸化剂对动物体成分的影响主要集中在对矿物元素的利用上,通常矿物元素在碱性环境中容易形成不溶性的盐而难以吸收。酸化剂既增强肠道的酸性环境,又具有螯合作用,有利于后部肠道对矿物元素的吸收^[15,32]。Vielma等^[29]认为柠檬酸在消化道内产生的微酸性环境有利于矿物盐的溶解和吸收;柠檬酸的金属配位性与矿物元素螯合提高了生物效价,进而提高体内灰分、磷等的含量。Vielma等^[28]指出虹鳟饲料中添加的柠檬酸与钙、磷螯合,增加了钙、磷的可溶性,同时也提高了其他矿物质的可利用性。在本次实验中,添加

柠檬酸的实验组全鱼的矿物质元素显著增高,类似的结果在其他研究中也提到^[33]。当提高柠檬酸替代磷酸二氢钠的水平时,全鱼钙、镁、磷的含量下降,这可能是因为柠檬酸的促进作用不能抵消饲料中活性磷添加水平的降低量,导致饲料可利用磷缺乏,从而抑制了生长。

柠檬酸的抗氧化作用包括 2 个方面:①柠檬酸作为抗氧化的协同剂,促进相应抗氧化剂的抗氧化活性;②柠檬酸可以螯合具有促氧化剂作用的金属离子,形成没有氧化活性的螯合物,切断金属离子引发的脂质过氧化物自由基链式反应^[34]。柠檬酸是羟基三羧酸化合物,是很好的供氢体,而且能够高效地螯合 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 等金属离子,在食品和饲料中常被用作金属螯合剂。在鱼饲料中加入柠檬酸能够提高肌肉的抗氧化能力,有效阻止脂类过氧化^[35]。柠檬酸是超氧阴离子的清除剂,能抑制鳕鱼肌肉的组织微粒体脂质氧化^[36]。有研究报道矿物质元素在水产动物中抗氧化性能的作用,包括硒^[37]、铁^[38]、锌^[39]、磷^[40]。氧化应激是由环境压力造成的细胞损伤^[41],抗氧化剂是生物抵御环境氧化压力的重要生物防御^[42]物质。本实验中,综合抗氧化各指标,发现阴性对照组的抗氧化性能低于实验组,该对照组的实验鱼处于氧化应激状态,分析原因可能是因为该组饲料中有效磷缺乏,导致饲料磷不足,成为氧化应激源。添加柠檬酸的实验组均能不同程度地提高黄颡鱼血清中 CAT、SOD 和 AKP 等酶的含量,这与尚卫敏等^[7]关于草鱼的实验结果类似,这可能与酸化剂的杀菌作用和抗氧化作用有关。

4 结论

本实验中,综合考虑生长性能、表观消化率、粪便氮和磷含量、全鱼组成以及抗氧化性能等指标考虑,在当前基础饲料配方下柠檬酸替代磷酸二氢钠的水平为 25%~50% 时,不会给鱼类生长带来不利影响,还有助于降低环境成本。

参考文献:

- [1] National Research Council (NRC). Nutrient requirements of fish[M]. Washington, DC: National Academy Press, 1993.
- [2] Yang Y H, Guo Q, Huang J S, et al. The requirement of phosphorus in *Cyprinus carpio* diet[J]. Journal of

- Northeast Agricultural University, 2006, 37(1): 48 - 51. [杨雨虹, 郭庆, 黄金善, 等. 鲤鱼饲料磷的需要量研究. 东北农业大学学报, 2006, 37(1): 48 - 51.]
- [3] Jackson L S, Li M H, Robinson E H. Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets to improve utilization of phytate phosphorus [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1996, 27(3): 309 - 313.
- [4] Ai Q H, Mai K S, Zhang W B, *et al.* Effects of exogenous enzymes (phytase, non-starch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2007, 147(2): 502 - 508.
- [5] Lee K J, Dabrowski K, Blom J H, *et al.* A mixture of cottonseed meal, soybean meal and animal byproduct mixture as a fish meal substitute: Growth and tissue gossypol enantiomer in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Animal Physiology and Animal Nutrition, 2002, 86(7 - 8): 201 - 213.
- [6] Papatryphon E, Howell R A, Soares J H. Growth and mineral absorption by striped bass *Morone saxatilis* fed a plant feedstuff based diet supplemented with phytase [J]. Journal of The World Aquaculture Society, 1999, 30(2): 161 - 173.
- [7] Shang W M, Zhu G T, Chen R X, *et al.* Effects of acidifiers on the growth performance and non-specific immunity of *Ctenopharyngodon idella* [J]. Freshwater Fisheries, 2011, 41(5): 56 - 61. [尚卫敏, 朱根廷, 陈任孝, 等. 酸化剂对草鱼生长和非特异性免疫能力的影响. 淡水渔业, 2011, 41(5): 56 - 61.]
- [8] Xiao S Y. Effects of feed phosphorus source, phosphorus levels and acidifier on the growth and physiology of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [D]. Soochow; Suzhou University, 2011. [肖顺应. 饲料磷源、磷水平及酸化剂对草鱼生长、生理的影响. 苏州: 苏州大学, 2011.]
- [9] Wang J T, Li H T, Song J Y, *et al.* Effects of acidifier on growth and digestive enzyme activity of common carp *Cyprinus carpio* [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2009, 29(1): 21 - 25. [王纪亭, 李海涛, 宋憬愚, 等. 复合酸化剂对鲤生长及消化酶活性的影响. 广东海洋大学学报, 2009, 29(1): 21 - 25.]
- [10] Zhou K Y, Liu C Z, Zhou X H. Effects of compound acidifiers on growth performance of Common Carp [J]. Jiangxi Feed, 2006, 5: 5 - 9. [周克勇, 刘长中, 周兴华. 复合酸化剂对鲤鱼生长性能的影响. 江西饲料, 2006, 5: 5 - 9.]
- [11] Xiang X, Zhou X H, Chen J, *et al.* Effects of lactic acid levels in feed on growth performance and feed utilization of *Carassius auratus* [J]. Chinese Feed, 2009, 11: 40 - 41. [向泉, 周兴华, 陈建, 等. 乳酸对鲫鱼的生长及饲料利用率的影响. 中国饲料, 2009, 11: 40 - 41.]
- [12] Leng X J, Lun F, Li X Q, *et al.* Effects of citric acid on growing performance and nutrients digestibility of allogynogenetic crucian carp [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 15(2): 178 - 181. [冷向军, 伦锋, 李小勤, 等. 柠檬酸对异育银鲫生长及营养物质消化率的影响. 上海水产大学学报, 2006, 15(2): 178 - 181.]
- [13] Pan Q, Tan Y G, Bi Y Z, *et al.* Effects of acid supplements on growth and feed utilization in tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. Aureus* [J]. Journal of fisheries of China, 2004, 28(6): 682 - 688. [潘庆, 谭永刚, 毕英佐, 等. 酸制剂对罗非鱼生长和饲料利用的影响. 水产学报, 2004, 28(6): 682 - 688.]
- [14] Pan Q, Tan Y G, Bi Y Z, *et al.* Effects of citric acid on growth, body compositions and digestive enzyme activity of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*) [J]. Journal of fishery Science of China, 2004, 11(4): 344 - 348. [潘庆, 谭永刚, 毕英佐, 等. 柠檬酸对罗非鱼生长、体成分和消化酶活性的影响. 中国水产科学, 2004, 11(4): 344 - 348.]
- [15] Vielma J, Ruohonen K, Lall S P. Supplement citric acid and particle size of fish bonemeal influence the availability of mineral in rainbow trout [J]. Aquaculture Nutrition, 1999, 5(1): 65 - 71.
- [16] AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical [M]. Arlington, VA, USA: AOAC International, 1995.
- [17] Wang Y Z, Cui S W, Wu X Q, *et al.* Determination method of phytic acid phosphorus in feed and grain [J]. China feed Industry, 1991, 6: 28 - 31. [王永真, 崔淑文, 吴秀琴, 等. 饲料和谷物中植酸磷测定方法研究. 中国饲料, 1991, 6: 28 - 31.]
- [18] Radecki S V, Juhl M R, Miller E R. Fumaric and citric acids as feed additives in starter pig diets: Effect on performance and nutrient balance [J]. Journal of Animal Sciences, 1988, 66(10): 2598 - 2605.
- [19] Zyla K, Ledoux D R, Garcia A, *et al.* Anin vitro

- procedure for studying enzymic dephosphorylation of phytate in maize-soybean feeds for turkey poult[J]. British Journal of Nutrition, 1995, 74(1) : 3 - 17.
- [20] Partenen K H, Mroz Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets[J]. Nutrition Research Reviews, 1999, 12(1) : 117 - 145.
- [21] Shang W M. Application research progress of acidifier in aquatic feed[J]. China Feed, 2010, 20: 26 - 28. [尚卫敏. 酸化剂在水产饲料中的应用研究进展. 中国饲料, 2010, 20: 26 - 28.]
- [22] Li H T, Hu Y H, Wang Y D. Effects of acidifier on growth performance and feed utilization in hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* × *O. niloticus*) [J]. South China Fisheries Science, 2009, 5(5) : 67 - 71. [李海涛, 胡云华, 王银东. 酸化剂对奥尼罗非鱼生长性能和饲料利用的影响. 南方水产, 2009, 5(5) : 67 - 71.]
- [23] Leng X J, Zhong W, Huang C P, et al. Effects of adding citric acid on the growth of tilapia[J]. Journal of Guangxi Agriculture and biologic Science, 2001, 20(4) : 262 - 265. [冷向军, 钟炜, 黄春萍, 等. 饲料中添加柠檬酸对罗非鱼的养殖效果分析. 广西农业生物科学, 2001, 20(4) : 262 - 265.]
- [24] Cheng Z J, Hardy R W, Blair M. Effects of supplementing methionine hydroxyl analogue in soybean meal and distiller's dried grain-based diets on the performance and nutrient retention of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Aquaculture Nutrition, 2003, 34(14) : 1303 - 1310.
- [25] Zhu Y, Ding Q L, Chan J, et al. The effects of concurrent supplementation of dietary phytase, citric acid and vitamin D3 on growth and mineral utilization in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Aquaculture, 2015, 436 : 143 - 150.
- [26] Sugiura S H, Dong F M, Rathebone C K, et al. Effects of dietary supplements on the availability of minerals in fish meal; preliminary observations[J]. Aquaculture, 1998, 160(3 - 4) : 283 - 303.
- [27] Pandey A, Satoh S. Effects of organic acid on growth and phosphorus utilization in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Fisheries Science, 2008, 74(4) : 867 - 874.
- [28] Vielma J, Lall S P. Dietary formic acid enhances apparent digestibility of minerals in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. Aquaculture Nutrition, 1997, 3(4) : 265 - 268.
- [29] Vielma J, Ruohonen K, Lall S P. Supplement citric acid and particle size of fish bone-meal influence the availability of mineral in rainbow trout [J]. Aquaculture Nutrition, 1999, 5(1) : 65 - 71.
- [30] Li J S, Li J L, Wu T T. Effects of exogenous enzyme and citric acid on activities of endogenous digestive enzyme of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2005, 28(3) : 97 - 101. [黎军胜, 李建林, 吴婷婷. 外源酶和柠檬酸对奥尼罗非鱼内源消化酶活性的影响. 南京农业大学学报, 2005, 28(3) : 97 - 101.]
- [31] Balamurali R S, Arayindan C M. Citric acid as a feed stimulant[J]. Fishery Technology, 1997, 34(1) : 9 - 12.
- [32] Chang Q. Effects of citric acid on effectiveness of the mineral elements of fish feed fishmeal [J]. Feed Industry Magazine, 1999, (1) 22 - 26. [常青. 柠檬酸对鱼饲料鱼粉中矿物元素有效性的影响. 饲料工业, 1999, 20(1) : 22 - 26.]
- [33] Hossain A M, Pandey A, Satoh S. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*[J]. Fisheries Science, 2007, 73(6) : 1309 - 1317.
- [34] Choe E, Min D B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2009, 8(4) : 345 - 358.
- [35] Vareltzis P, Hultin H O, Autio W R. Hemoglobin-mediated lipid oxidation of protein isolates obtained from cod and haddock white muscle as affected by citric acid, calcium chloride and pH [J]. Food Chemistry, 2008, 108(1) : 64 - 74.
- [36] Vareltzis P, Hultin H O. Effect of low pH on the susceptibility of isolated cod (*Gadus morhua*) microsomes to lipid oxidation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(24) : 9859 - 9867.
- [37] Lin Y H, Shiau S Y. Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus* [J]. Aquaculture, 2005, 250(1 - 2) : 356 - 363.
- [38] Andersen F, Lygren B, Maage A, et al. Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts [J]. Aquaculture, 1998, 161(1 - 4) : 437 - 451.
- [39] Kucukbay Z, Yazlak H, Sahin N, et al. Zinc picolinate supplementation decreases oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 2006, 257(1 - 4) : 465 - 469.

- [40] Tang Q, Wang C F, Xie C X, *et al.* Dietary available phosphorus affected growth performance, body composition, and hepatic antioxidant property of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *The Scientific World Journal*, 2012, 987570. doi:10.1100/2012/987570
- [41] Okamoto O K, Colepicolo P. Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine Dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1998, 119 (1): 67 - 73.
- [42] Ahmad I, Hamid T, Fatima M, *et al.* Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1523(1): 37 - 48.

Replacement of inorganic phosphorus by citric acid for juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* fed with plant-protein based diets

CHENG Niancheng, LEI Wen, FENG Meihui, WANG Chunfang*

(*Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*)

Abstract: A feeding trial was conducted to evaluate the optimum ratio at which dietary sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) was replaced with citric acid in the diets of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Seven diets were formulated: positive control group (DP) that contained only 2% NaH_2PO_4 and negative control group (DN) that consisted of neither NaH_2PO_4 nor phytase; and five treatment groups supplemented with 2 g/kg citric acid and 20, 15, 10, 5, 0 g/kg concentrations of NaH_2PO_4 . Thus, dietary NaH_2PO_4 was replaced with citric acid at ratios of 0%, 25%, 50%, 75%, and 100%, respectively. The groups were designated as D0, D25, D50, D75, and D100. Triplicate tanks were each filled with 50 juvenile ind. (3.5 ± 0.1) g, which were fed with one of the seven experimental diets. After eight weeks, growth performance, apparent digestibility, body proximate composition, vertebra minerals and antioxidative capacity were investigated. The results showed that: (1) Citric acid supplementation enhanced weight gain and specific growth rate, reduced the feed conversion ratio compared with the negative group, but there were no significant differences with the positive group; (2) Citric acid supplementation significantly enhanced the apparent digestibility of dry matter, protein and phosphorus and decreased fecal phosphorus and nitrogen content compared with negative group, while no significant difference with the positive group. The content of fecal nutrients decreased with the increasing of replacing level; (3) there were no differences among control groups and treatment groups in body moisture, crude protein, crude lipid and ash ($P > 0.05$). Compared with the negative control, citric acid supplementation significantly improved the retention of Ca, Mg, P and Cu in the whole body. The highest retention of these nutrients was observed between 25% and 75% replacement levels. (4) Antioxidant enzymes activity (CAT, AKP and SOD) reached the highest between 25% and 75% replacement levels compared with the negative group while no differences were observed in serum MDA and IgM content. In conclusion, in order to reduce nitrogen and phosphorus output in the aquaculture water bodies, the replacing level of sodium dihydrogen phosphate with citric acid in yellow catfish diet between 25% and 50% will not affect fish growth performance and will help to improve nutrients utilization under the current conditions.

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; citric acid; sodium dihydrogen phosphate; replacing level; phosphorus utilization

Corresponding author: WANG Chunfang. E-mail: cfwang@mail.hzau.edu.cn