

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00481

不同添加方式植酸酶处理豆粕对牙鲆生长和饲料利用率的影响

陈京华^{1,2} 麦康森¹

(1. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 青岛 266003; 2. 青岛农业大学水产动物营养与饲料学实验室, 青岛 266109)

摘要: 以初始平均体重(2.02 ± 0.02) g 的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)为实验对象, 进行为期 70 d 的摄食生长实验, 研究不同添加方式的植酸酶对牙鲆生长和饲料利用的影响。在 5000.0 g 豆粕中添加 2.5 g 植酸酶, 然后用产朊假丝酵母(*Candida utilis*)进行发酵预处理, 得到植酸酶预处理豆粕。共制作 4 种等氮等能(粗蛋白 49.7%、总能 20.9 kJ/g)饲料, 对照饲料主要以鱼粉为蛋白源; 在对照饲料的基础上, 用豆粕蛋白替代 45% 的鱼粉蛋白配制成豆粕组饲料; 在每千克豆粕组饲料中添加 1000 IU 植酸酶, 配制成植酸酶组饲料; 用植酸酶预处理豆粕蛋白替代 45% 的鱼粉蛋白配制成植酸酶预处理豆粕组饲料。结果表明, 与对照组相比较, 用豆粕蛋白替代饲料中 45% 的鱼粉蛋白, 若不添加植酸酶则显著降低牙鲆的特定生长率($P < 0.01$)、饲料效率、蛋白质效率和氮贮积率($P < 0.05$); 直接添加植酸酶组、植酸酶预处理豆粕组牙鲆的特定生长率、饲料效率、蛋白质效率和氮贮积率与鱼粉对照组相比较没有出现显著差异($P > 0.05$); 与不添加植酸酶的豆粕组相比较, 在含豆粕饲料中添加 1000 IU/kg 饲料的植酸酶显著提高牙鲆的特定生长率($P < 0.01$)、氮贮积率($P < 0.05$)和磷贮积率($P < 0.01$), 显著降低氮排放率($P < 0.05$)和磷排放率($P < 0.01$), 但饲料效率和蛋白质效率没有显著变化($P > 0.05$); 在豆粕中添加植酸酶进行发酵预处理, 降低了豆粕中植酸含量, 在饲料中添加植酸酶预处理豆粕显著提高牙鲆的特定生长率($P < 0.01$)、饲料效率、蛋白质效率和氮贮积率($P < 0.05$), 显著降低氮($P < 0.05$)、磷和钙的排放率($P < 0.01$)。

关键词: 牙鲆; 豆粕; 植酸酶; 生长; 饲料利用

中图分类号: S963 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)03-0481-08

植酸又名肌醇六磷酸, 是植物蛋白源中主要抗营养因子之一, 广泛存在于植物性饲料中^[1]。植酸容易与饲料中的磷结合形成植酸磷, 从而使鱼类无法吸收饲料中的磷, 导致大量的磷排入水体, 使水体富营养化^[2]。植酸能与钙、铁、锰、锌等金属离子螯合, 形成不溶性络合物, 从而降低鱼类对这些矿物元素的利用率^[3]。植酸还能与蛋白质作用形成难溶的植酸-蛋白质络合物, 降低鱼类对蛋白质的利用率^[4]。植酸是热稳定性因子, 很难通过加热的方法将其去除, 鱼类消化系统又缺乏内源性植酸酶, 因而在饲料中使用外源性植酸酶被认为是降解植酸的有效方法^[5,6]。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus* Temminck et Schlegel)

是我国重要的海水经济鱼类之一。有关牙鲆营养需求的研究已有一些报道, 在其饲料中添加较高含量的豆粕会降低牙鲆的生长和饲料利用率, 因此限制了植物性蛋白源在其饲料中的添加量^[7,8]。本实验通过在含豆粕饲料中直接添加植酸酶和用植酸酶对豆粕进行预处理, 研究不同添加方式的植酸酶对牙鲆生长和饲料利用率的影响, 以期植酸酶在牙鲆配合饲料中合理使用提供依据。

1 材料与方法

1.1 植酸酶预处理豆粕

发酵菌种 实验用产朊假丝酵母 AS 2.120 由中国科学院微生物所提供。接种于酵母琼脂斜面培

收稿日期: 2008-12-18; 修订日期: 2009-09-23

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30371120, 30800848); 青岛农业大学高层次人才启动基金(编号: 630741)资助

作者简介: 陈京华(1978—), 男, 山东海阳人; 博士; 主要从事水产动物营养学研究。E-mail: Chen_jinghua@163.com

通讯作者: 麦康森, E-mail: kmai@ouc.edu.cn

培养基上, 于28℃培养5d, 4℃保存, 每2—3个月接种一次。

培养基 酵母琼脂斜面培养基: 酵母提取物 10 g、蛋白胨 20 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g, 调 pH 6.0, 105℃高压灭菌 20min。种子培养基: 在 5000 mL 广口瓶中加入 450 g 豆粕和 450 mL 水, 自然 pH, 105℃高压灭菌 20min。

添加植酸酶发酵豆粕 实验用植酸酶由上海罗氏公司提供(酶的活性为 5000 IU/g)。豆粕由山东六和集团有限公司提供, 含有 50.2%粗蛋白和 0.8%粗脂肪。在 3500.0 mL 经过曝气的自来水中加入 500.0 g 产阮假丝酵母发酵种子、5000.0 g 豆粕和 2.5 g 植酸酶(相当于植酸酶的添加量为 1000 IU/kg 饲料), 混合均匀后进行固态发酵。发酵初始时豆粕温度为 23℃, 随着发酵的进行, 温度逐渐升高, 最高升至 46℃, 发酵时间为 19h。发酵完毕后, 将豆粕烘干, 冷却至室温, 粉碎, 过 80 目筛, 得到植酸酶预处理豆粕(PP-SBM)。取样测定该发酵豆粕中植酸含量。

1.2 实验饲料

共制作 4 种等氮等能(粗蛋白 49.7%、总能 20.9 kJ/g)饲料(表 1)。全鱼粉对照组饲料主要以鱼粉(购自六和集团有限公司, 粗蛋白 68.3%, 粗脂肪 10.4%)为蛋白源。在对照饲料的基础上, 用豆粕蛋白替代 45%的鱼粉蛋白配制成豆粕组饲料。在每千克豆粕组饲料中添加 1000 IU 植酸酶, 配制成植酸酶组饲料。在对照饲料的基础上, 用植酸酶预处理豆粕蛋白替代 45%的鱼粉蛋白配制成植酸酶预处理豆粕组饲料。

1.3 实验用鱼和饲养管理

实验用鱼为当年人工繁殖的同一批牙鲆鱼苗(中国水产科学研究院黄海水产研究所提供), 正式实验前以对照饲料饱食驯养 2 周。养殖实验在中国海洋大学小麦岛流水养殖系统中进行, 养殖单位为 50 L 的玻璃钢桶, 水流流速为 100 L/h。实验共设 4 个处理, 每个处理 3 个重复, 每桶放养 28 尾牙鲆, 平均初始体重为(2.02 ± 0.02) g。实验周期为 70d。实

表 1 实验饲料配方及营养组成(%干重)

Tab. 1 Formulation and proximate chemical composition of trial diets (% dry matter)

饲料 Diets	鱼粉对照组 Fish meal	豆粕组 SBM	植酸酶组 SBM+Phytase	植酸酶预处理豆粕组 PP-SBM
鱼粉 Fish meal	68.00	37.40	37.40	37.40
豆粕 Soybean meal (SBM)	0.00	39.80	39.80	0.00
植酸酶预处理豆粕 Phytase- pretreated soybean meal	0.00	0.00	0.00	39.21
植酸酶 Phytase	0.00	0.00	0.02	0.00
面粉 Wheat meal	19.30	7.24	7.22	7.75
鱼油 Fish oil	0.50	3.68	3.68	3.68
豆油 Soybean oil	1.00	0.68	0.68	0.76
鱿鱼膏 Squid visceral oil	4.00	4.00	4.00	4.00
维生素混合物 Vitamin premix ^[7]	2.20	2.20	2.20	2.20
矿物质混合物 Mineral premix ^{[1][7]}	1.00	1.00	1.00	1.00
大豆卵磷脂 Soy lecithin	2.50	2.50	2.50	2.50
海藻酸钠 Sodium Alginate	0.50	0.50	0.50	0.50
诱食剂 Feeding attractant ²	1.00	1.00	1.00	1.00
粗蛋白 Crude protein	50.15	49.47	49.28	49.71
粗脂肪 Crude lipid	11.76	11.98	11.99	12.27
灰分 Ash	17.80	14.00	14.50	14.10
能量 Energy (kJ/g)	20.60	21.04	20.97	21.13
总磷 Total phosphorus	1.65	1.16	1.17	1.16
可利用磷 Available phosphorus	0.99	0.63	0.65	0.70

注: 1. 矿物质混合物中不包含 Ca(H₂PO₄)₂; 2. 复合诱食剂(g/kg 饲料): 甜菜碱 6.6 g 和 DMPT(硫代甜菜碱, 二甲基-β-丙酸噻亭)

3.4 g

Note: 1. Mineral premix without Ca(H₂PO₄)₂; 2. Compound feeding attractant (g/kg diet): betaine 6.6 g, dimethyl-β-propiothetin 3.4 g

验期间系统水温保持在 22.5—25.5℃ 之间, 盐度为 29.5—32.0, 溶解氧含量不低于 7.0 mg/L。采取饱食投喂方式, 每天投喂 2 次(08:00 和 16:00)。每次投喂时间为 1h, 投喂至桶底出现残饵且牙鲆不再摄食为止, 投喂完毕后收集残饵, 烘干称重, 计算每天摄食饲料量。

1.4 样品采集与分析

实验开始和结束时实验鱼分别饥饿 24h, 用吸水纸吸干鱼体体表水分后称量体重(精确至 0.01 g)。

实验结束后每桶随机抽取 6 尾牙鲆测定鱼体常规成分。鱼体水分、粗蛋白、粗脂肪、灰分和能量依次采用恒温干燥法(105℃)、凯氏定氮法、索氏抽提法、灼烧法和氧弹仪测定^[9]。饲料和鱼体中氮含量采用凯氏定氮法测定, 磷和钙含量通过等离子发射光谱仪(ICP-OES; VISTA-MPX, VARIAN)测定, 样品测定之前用高氯酸硝化 20min。豆粕中的植酸用 10%硫酸钠和 1.2%的盐酸溶液提取, 用阴离子交换树脂将植酸吸附, 使之与杂质分离, 用氯化钠溶液洗脱, 洗脱液中的植酸与三氯化铁-磺基水杨酸混合液作用, 产生褪色反应, 植酸含量与褪色程度成正比, 用分光光度计在波长 500 nm 处测定吸光度, 计算样品植酸含量^[10]。

1.5 计算和统计分析

牙鲆的特定生长率、摄食率、蛋白质效率、饲料效率、贮积率和排放率参照以下公式计算:

$$\text{特定生长率} = (\ln W_t - \ln W_0)/t \times 100\%$$

$$\text{摄食率}(\text{g/d-ind}) = \sum(W_{fd}/N)/t^{[7]}$$

$$\text{蛋白质效率} = (W_t - W_0)/(W_f \times C_p)$$

$$\text{饲料效率} = (W_t - W_0)/W_f$$

$$\text{贮积率} = N_g/N_i \times 100$$

$$\text{排放率}(\text{g/kg}) = (N_i - N_g)/(W_t - W_0) \times 1000$$

式中, W_t 为牙鲆终末平均体重(g), W_0 为牙鲆初始平均体重(g), t 为实验天数(d), W_{fd} 为每桶每天摄食饲料干重(g), N 为每桶养殖鱼的数量, W_f 为摄食饲料干重(g), C_p 为饲料蛋白质质量分数(%), N_g 为牙鲆贮存某营养成分的重量(g), N_i 为牙鲆摄入某营养成分的重量(g)。

实验数据(平均数±标准误)用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析, 当差异显著时($P < 0.05$), 进行 Tukey 多重比较。

2 结果

经测定, 实验用豆粕中植酸含量为 9.95 g/kg, 植酸酶预处理豆粕中植酸含量为 3.64 g/kg, 植酸含量降低了 63.4%。

2.1 不同添加方式植酸酶对牙鲆成活率、摄食、生长、饲料效率、蛋白质效率和鱼体常规成分的影响

各处理组的成活率和摄食率相比较没有出现显著差异($P > 0.05$, 表 2)。

与鱼粉对照组比较, 用豆粕蛋白替代饲料中 45% 的鱼粉蛋白显著降低牙鲆的特定生长率($P < 0.01$)。而植酸酶组和植酸酶预处理豆粕组牙鲆的特定生长率与鱼粉对照组比较没有出现显著差异

表 2 不同添加方式植酸酶对牙鲆特定生长率、成活率、摄食率、饲料效率和蛋白质效率的影响(平均数±标准误)^{1,2}

Tab. 2 Effects of different supplemental methods of phytase on specific growth rate, survival, feed intake, feed efficiency ratio and protein efficiency ratio of Japanese flounder (Mean ± S.E.M.)^{1,2}

饲料 Diets	初始体重 Initial body weight (g)	终末体重 Final body weight (g)	特定生长率 Specific growth rate (%)	成活率 Survival (%)	摄食率 Feed intake (g/d-ind)	饲料效率 Feed efficiency ratio	蛋白质效率 Protein efficiency ratio
鱼粉对照组 Fish meal	2.02 ± 0.03	32.92 ± 0.59 ^a	3.99 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00	0.44 ± 0.01	1.00 ± 0.02 ^a	1.91 ± 0.04 ^a
豆粕组 SBM	2.11 ± 0.06	26.40 ± 0.40 ^b	3.61 ± 0.04 ^b	94.05 ± 2.38	0.42 ± 0.01	0.82 ± 0.03 ^b	1.58 ± 0.05 ^b
植酸酶组 SBM+Phytase	2.01 ± 0.02	31.28 ± 0.88 ^a	3.92 ± 0.03 ^a	96.43 ± 0.00	0.45 ± 0.01	0.94 ± 0.02 ^{ab}	1.80 ± 0.04 ^{ab}
植酸酶预处理豆粕组 Phytase-pretreated SBM	1.99 ± 0.02	32.20 ± 0.69 ^a	3.98 ± 0.02 ^a	98.81 ± 1.19	0.44 ± 0.02	0.97 ± 0.03 ^a	1.85 ± 0.06 ^a
One-way ANOVA ³							
<i>F</i>	1.80	19.75	48.11	3.93	0.69	8.70	8.55
<i>P</i>	0.23	0.00	0.00	0.05	0.58	0.01	0.01

注: 1. 表中所给数据为平均数及 3 个重复的标准误; 2. 同一列中平均数后不同的上标表示差异显著($P < 0.05$); 3. One-way ANOVA 表示单因素方差分析, 下同

Note: 1. Values are means and standard errors of three replicates; 2. Means with different superscripts within the same column have significant differences ($P < 0.05$); 3. One-way ANOVA: One-way analysis of variance, the same below

($P>0.05$), 二者之间比较也没有出现显著差异 ($P>0.05$), 但均显著高于未添加植酸酶的豆粕组 ($P<0.01$, 表 2)。

与鱼粉对照组比较, 未添加植酸酶的豆粕组饲料效率和蛋白质效率均显著降低 ($P<0.05$)。植酸酶组的饲料效率和蛋白质效率与鱼粉对照组和豆粕组相比较均没有出现显著差异 ($P>0.05$)。植酸酶预处理豆粕组的饲料效率和蛋白质效率显著高于未添加植酸酶的豆粕组 ($P<0.05$), 与鱼粉对照组比较无显著差异 (表 2)。

从表 3 可知, 牙鲆鱼体的水分和能量在各组间比较差异不显著 ($P>0.05$)。与鱼粉对照组比较, 豆粕组鱼体的粗蛋白 ($P<0.05$) 和粗脂肪 ($P<0.01$) 含量显著降低, 而植酸酶组和植酸酶预处理豆粕组鱼体的粗蛋白和粗脂肪含量与对照组比较差异不显著 ($P>0.05$)。豆粕组、植酸酶组和植酸酶预处理豆粕组鱼体的粗灰分含量显著高于鱼粉对照组 ($P<0.05$)。植酸酶组和植酸酶预处理豆粕组鱼体的常规成分相比较没有出现显著差异 ($P>0.05$)。

2.2 不同添加方式植酸酶对氮、磷、钙的贮积率和排放率的影响

从表 4 可知, 与鱼粉对照组比较, 豆粕组氮贮积率显著降低 ($P<0.05$), 而氮排放率显著升高 ($P<0.05$)。与豆粕组比较, 植酸酶组和植酸酶预处理豆粕组显著提高了氮贮积率 ($P<0.05$), 而显著降低了氮排放率 ($P<0.05$)。

植酸酶组和植酸酶预处理豆粕组磷贮积率有升高的趋势, 而磷排放率有降低的趋势 (表 4)。豆粕组磷排放率显著低于鱼粉对照组 ($P<0.01$), 磷贮积率与鱼粉组比较差异不显著 ($P>0.05$)。与鱼粉组和豆粕组相比较, 植酸酶组和植酸酶预处理豆粕组磷贮积率均显著升高 ($P<0.01$), 而磷排放率均显著降低 ($P<0.01$), 且两组之间没有表现出显著差异 ($P>0.05$)。

钙贮积率和排放率的变化趋势与磷相似, 但植酸酶组和豆粕组没有表现出显著差异 ($P>0.05$)。与鱼粉组、豆粕组和植酸酶组相比较, 植酸酶预处理豆粕组钙贮积率显著升高, 而钙排放率显著降低 ($P<0.01$)。

表 3 不同添加方式植酸酶对牙鲆鱼体常规成分的影响 (平均数±标准误)

Tab. 3 Effects of different supplemental methods of phytase on the whole-body composition of Japanese flounder (Mean ± S.E.M.)

饲料 Diets	水分 Moisture (%)	粗蛋白 Crude protein (%)	粗脂肪 Crude lipid (%)	灰分 Ash (%)	能量 Energy (%)
鱼粉对照组 Fish meal	73.91 ± 0.26	18.42 ± 0.18 ^a	4.64 ± 0.05 ^a	2.46 ± 0.02 ^b	5.93 ± 0.03
豆粕组 SBM	74.59 ± 0.14	17.62 ± 0.10 ^b	4.16 ± 0.02 ^b	2.73 ± 0.03 ^a	5.74 ± 0.04
植酸酶组 SBM+Phytase	73.96 ± 0.27	18.25 ± 0.19 ^{ab}	4.54 ± 0.05 ^a	2.66 ± 0.06 ^a	5.92 ± 0.06
植酸酶预处理豆粕组 Phytase-pretreated SBM	74.37 ± 0.17	17.78 ± 0.12 ^{ab}	4.65 ± 0.03 ^a	2.70 ± 0.04 ^a	5.80 ± 0.08
One-way ANOVA					
<i>F</i>	2.25	6.12	36.68	9.22	2.62
<i>P</i>	0.16	0.02	0.00	0.01	0.12

表 4 不同添加方式植酸酶对氮、磷、钙贮积率和排放率的影响 (平均数±标准误)

Tab. 4 Effects of different supplemental methods of phytase on the retention and load of nitrogen, phosphorus and calcium for Japanese flounder (Mean ± S.E.M.)

饲料 Diets	氮贮积率 Nitrogen retention (%)	氮排放率 N load (g/kg)	磷贮积率 P retention (%)	磷排放率 P load (g/kg)	钙贮积率 Ca retention (%)	钙排放率 Ca load (g/kg)
鱼粉对照组 Fish meal	35.14 ± 1.06 ^a	54.50 ± 2.15 ^b	37.08 ± 1.39 ^b	11.83 ± 0.53 ^a	42.75 ± 1.29 ^b	11.64 ± 0.53 ^a
豆粕组 SBM	27.87 ± 1.14 ^b	73.28 ± 3.61 ^a	39.51 ± 0.91 ^b	9.56 ± 0.44 ^b	48.78 ± 1.99 ^b	8.58 ± 0.61 ^b
植酸酶组 SBM+Phytase	32.86 ± 1.12 ^a	59.79 ± 2.48 ^b	50.16 ± 1.80 ^a	7.05 ± 0.43 ^c	48.25 ± 1.64 ^b	7.58 ± 0.43 ^b
植酸酶预处理豆粕组 Phytase-pretreated SBM	32.88 ± 0.78 ^a	58.18 ± 2.39 ^b	53.59 ± 2.11 ^a	6.39 ± 0.46 ^c	65.73 ± 1.56 ^a	4.72 ± 0.35 ^c
One-way ANOVA						
<i>F</i>	8.84	9.10	24.64	28.36	36.77	33.71
<i>P</i>	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00

3 讨 论

3.1 不同添加方式植酸酶对牙鲆生长、饲料效率和蛋白质效率的影响

在鱼类营养上, 已经证明植酸能够降低鱼类的生长和饲料效率^[3]。从本实验的生长数据可知, 饲料中 45% 的鱼粉蛋白被豆粕蛋白替代后, 若不添加外源植酸酶, 则显著降低了牙鲆的特定生长率, 这与已有的研究结果相一致^[7]。若在饲料中补充 1000 IU/kg 饲料的植酸酶, 牙鲆的特定生长率显著提高, 并与鱼粉对照组没有显著差异。这与尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[6]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[11-13]、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)^[14]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[15] 和条纹鲈 (*Morone saxatilis*)^[16,17] 等的研究结果相一致。在这些鱼类的饲料中添加一定量的植酸酶, 均显著提高了其生长率。这表明植酸酶能够降解饲料中的植酸^[5], 降低植酸对牙鲆的抗营养作用, 从而提高其生长速度^[18]。然而也有一些研究报道, 在饲料中直接添加植酸酶并不能提高鱼类的生长^[18-21]。在大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*) 的饲料中直接添加植酸酶, 尽管提高了磷的利用率, 降低了磷的排放率, 但不能提高其摄食率和生长^[22]。同样, 在许氏平鲷 (*Sebastes schlegeli*) 饲料中直接添加 1000 IU/kg 饲料的植酸酶, 也不能提高其生长^[23]。出现这种差异的主要原因有(1)微生物植酸酶具有热不稳定性, 饲料加工过程中的高温能够降低该酶的活性^[24]; (2)并不是所有鱼类消化道的环境条件都适合外源植酸酶发挥作用^[14]。因此, 一些研究认为用外源植酸酶对植物性蛋白源进行体外预处理, 降低植酸的含量, 更有利于提高鱼类的生长和饲料利用率^[23,25]。在虹鳟饲料中添加脱植酸化的豆粕显著提高其生长率和饲料效率, 并且显著提高了蛋白质、磷、钙、镁和锌的利用率^[26]。Yoo, *et al.* 报道用植酸酶预处理的豆粕显著提高许氏平鲷的生长^[23]。本研究在饲料中直接添加植酸酶和用植酸酶对豆粕进行发酵预处理均显著提高了牙鲆的生长, 且二者之间没有表现出显著差异, 表明两种方式添加的植酸酶对牙鲆的生长都有促进作用。然而与不添加植酸酶的豆粕组相比较, 植酸酶组并没有显著提高饲料效率和蛋白质效率, 而植酸酶预处理豆粕组显著提高了饲料效率和蛋白质效率, 表明用植酸酶对豆粕进行预处理更有利于提高牙鲆对饲料的利

用效率。Schafer, *et al.* 曾报道外源植酸酶能在鱼类的消化道中表现出一定的活性^[14], 但由于养殖水温低于植酸酶发生反应的最佳温度, 限制了植酸酶的活性, 植酸酶需要更长的反应时间才能达到降解植酸的效果^[18]。本研究用产朊假丝酵母对豆粕进行发酵预处理, 使豆粕温度达到 40—46℃, 给植酸酶提供较高的温度条件, 则更有利于植酸酶发挥作用^[18]。由于发酵时间较短, 仅在豆粕表层长有酵母, 豆粕并未充分发酵, 因此发酵本身对豆粕蛋白质的可利用性和豆粕的适口性可能产生较小的影响^[26]。

3.2 不同添加方式植酸酶对氮、磷、钙的贮积率和排放率的影响

植酸能够抑制一些消化酶的活力, 包括胃蛋白酶、胰蛋白酶和 α -淀粉酶, 从而降低蛋白质的消化率^[27,28], 并且能够无选择性的螯合蛋白, 降低蛋白质的溶解性^[4]。张璐等报道在每千克饲料中添加 200 mg 的植酸酶, 显著提高鲈鱼胃和肠道蛋白酶的活性, 从而提高鲈鱼对蛋白质的消化吸收率^[29]。从本研究的结果可知, 用豆粕部分替代饲料中的鱼粉降低了氮的贮积率, 提高了氮的排放率, 而在饲料中直接添加植酸酶或用植酸酶预处理豆粕均能够提高氮的贮积率, 降低其排放率。这表明通过两种方式添加的植酸酶均能够降低植酸对蛋白质消化吸收产生的抗营养作用^[4,24]。

磷是水产养殖环境中主要的污染源, 过量的排放能够导致水环境恶化。植酸容易与饲料中的磷结合形成植酸磷, 从而使鱼类无法吸收饲料中的磷, 导致大量的磷排入水体, 使水体富营养化^[2]。本研究在饲料中添加 45% 的豆粕蛋白, 与全鱼粉组相比较, 降低了磷的排放率, 这主要因为豆粕是低磷蛋白源, 豆粕组总磷的水平 (1.17%) 比鱼粉组 (1.65%) 低^[24,30,31]。张春晓等报道在磷的需求被满足之前, 鱼体吸收的所有磷都会在体内累积, 不会影响磷的排放率; 当鱼体吸收的磷达到其最适需求量后, 随着外源磷的摄入, 磷的排放率将会增加^[32]。这表明在饲料中适当添加植物性蛋白源, 降低饲料中总磷的水平, 有利于降低磷的排放率, 从而减少磷对水环境的污染^[31]。而在饲料中添加植酸酶则进一步降低了磷的排放率, 提高了磷的贮积率, 这与在虹鳟^[11-13,20]和条纹鲈^[17]上的研究结果相一致。这表明添加到饲料中的植酸酶能够降解植物性蛋白源中的植酸磷, 释放无机磷, 有利于提高磷的利用率, 降

低磷的排放率,从而降低鱼类饲料中无机磷的添加量^[14,22]。本实验通过两种方式添加的植酸酶对磷贮积率和排放率的影响没有显著差异,表明植酸酶在牙鲆的体内和体外均能够发挥降解植酸磷的作用^[20]。

植酸还能与钙、铁、锰、锌等金属离子螯合,从而降低鱼类对这些矿物元素的利用率。从钙贮积率和排放率的结果可知,植酸酶组和豆粕组钙贮积率和排放率并没有显著差异,表明直接在饲料中添加植酸酶并不能有效提高牙鲆对钙的利用率,较低鱼体温度及植酸酶的热不稳定性是限制其提高钙利用率的主要因素^[24]。而植酸酶预处理豆粕组钙贮积率最高,排放率最低,这表明用植酸酶预处理豆粕更有利于提高钙的利用率^[26]。用植酸酶对豆粕进行预处理,使豆粕提前脱植酸化,能有效提高磷的贮积率和蛋白质效率,从而有利于提高钙在鱼体内的贮积率,减少其排放率^[24,26]。

本研究结果表明,用豆粕蛋白替代饲料中 45% 的鱼粉蛋白,若不添加植酸酶则显著降低牙鲆的特定生长率、饲料效率、蛋白质效率和氮贮积率;在含豆粕饲料中添加 1000 IU/kg 饲料的植酸酶显著提高牙鲆的特定生长率、氮和磷贮积率,显著降低氮和磷排放率,但饲料效率和蛋白质效率没有显著变化;在豆粕中添加植酸酶进行发酵预处理,能降低豆粕中植酸含量,在饲料中添加植酸酶预处理豆粕显著提高牙鲆的特定生长率、饲料效率、蛋白质效率和氮贮积率,显著降低氮、磷和钙的排放率。

参考文献:

- [1] Mahgoub S E O, Elhag S A. Effect of milling, soaking, malting, heat-treatment and fermentation on phytate level of four Sudanese sorghum cultivars [J]. *Food Chemistry*, 1998, **61**: 77—80
- [2] Sugiura S H, Raboy V, Young K A, *et al.* Availability of phosphorus and trace elements in low phytate varieties of barley and corn for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Aquaculture*, 1999, **170**: 285—296
- [3] National Research Council. Nutrient requirement of fish [M]. Washington DC: National Academy Press. 1993
- [4] Elangovan A, Shim K F. The influence of replacing fish meal partially in the diet with soybean meal on growth and body composition of juvenile tin foil barb *Barbodes altus* [J]. *Aquaculture*, 2000, **189**: 133—144
- [5] Liebert F, Portz L. Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase [J]. *Aquaculture*, 2005, **248**: 111—119
- [6] Storebakken T, Refstie S, Ruyter B. Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture [A]. In: Drackley J K (Eds.), *Soy in Animal Nutrition* [C]. USA: Federation of Animal Science Societies. 2000, 127—170
- [7] Chen J H, Zhang W B, Mai K S, *et al.* Effects of a compound feeding attractant on feed intake and growth of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus* Temminck et Schlegel) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, **13**: 959—965 [陈京华, 张文兵, 麦康森, 等. 复合诱食剂对牙鲆摄食生长的影响. *中国水产科学*, 2006, **13**: 959—965]
- [8] Kikuchi K. Use of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in diets of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 1999, **179**: 3—11
- [9] AOAC. Official methods of Analysis of AOAC International [M]. Vol. I. Agriculture Chemical; Contaminants, Drug. 16th ed. AOAC International, Arlington, VA. 1995
- [10] Ellis R, Morris E R. Improved ion-exchange phytate method [J]. *Cereal Chemistry*, 1983, **60**: 121—124
- [11] Lanari D, Agaro E D, Turri C. Use of nonlinear regression to evaluate the effects of phytase enzyme treatment of plant protein diets for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Aquaculture*, 1998, **161**: 345—356
- [12] Rodehutsord M, Pfeffer E. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Water Science and technology*, 1995, **31**: 143—147
- [13] Vielma J, Lall S P, Koskela J, *et al.* Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Aquaculture*, 1998, **163**: 309—323
- [14] Schafer A, Koppe W M, Meyer-Burgdorff K H, *et al.* Effect of a microbial phytase on the utilization of native phosphorus by carp in a diet based on soybean meal [J]. *Water Science and technology*, 1995, **31**: 149—155
- [15] 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**: 309—313
- [16] Hughes K P, Soares J H. Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass *Morone saxatilis* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 1998, **4**: 133—140
- [17] Papatryphon E, Howell R A, Soares J H. Growth and mineral absorption by striped bass *Morone saxatilis* fed a plant feed-stuff based diet supplemented with phytase [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1999, **30**: 161—173

- [18] Masumoto T, Tamura B, Shimeno S. Effects of phytase on bioavailability of phosphorus in soybean meal—based diets for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Fisheries Science*, 2001, **67**: 1075—1080
- [19] Forster I, Higgs D A, Dosanjh B S, *et al.* Potential for dietary phytase to improve the nutritive value of canola protein concentrate and decrease phosphorus output in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* held in 11°C fresh water [J]. *Aquaculture*, 1999, **179**: 109—125
- [20] Vielma J, Makinen J T, Ekholm P, *et al.* Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and algal availability of phosphorus load [J]. *Aquaculture*, 2000, **183**: 349—362
- [21] Yan W, Reigh R C, Xu Z. Effects of fungal phytase on utilization of dietary protein and minerals, and dephosphorylation of phytic acid in the alimentary tract of channel catfish *Ictalurus punctatus* fed an all-plantprotein diet [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2002, **33**: 10—22
- [22] Sajjadi M, Carter C G. Dietary phytase supplementation and the utilization of phosphorus by Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a canola-meal-based diet [J]. *Aquaculture*, 2004, **240**: 417—431
- [23] Yoo G Y, Wang X J, Choi S, *et al.* Dietary microbial phytase increased the phosphorus digestibility in juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* fed diets containing soybean meal [J]. *Aquaculture*, 2005, **243**: 315—322
- [24] Storebakken T, Shearer K D, Roem A J. Availability of protein, phosphorus and other elements in fish meal, soy protein concentrate and phytase treated soy protein concentrate based diets to Atlantic salmon, *Salmo salar* [J]. *Aquaculture*, 1998, **161**: 365—379
- [25] Cain K D, Garling D L. Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery effluents [J]. *Progressive Fish-Culturist*, 1995, **57**: 114—119
- [26] Vielma J, Ruohonen K, Peisker M. Dephosphorylation of two soy proteins increases phosphorus and protein utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Aquaculture*, 2002, **204**: 145—156
- [27] Caldwell R A. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1992, **40**: 43—47
- [28] Singh M, Krikorian A D. Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1982, **30**: 799—800
- [29] Zhang L, Ai Q H, Mai K S, *et al.* Effects of phytase and non-starch polysaccharide enzyme supplementation in diets on growth and digestive enzyme activity for Japanese Seabass, *Lateolabrax japonicus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(1): 82—88 [张璐, 艾庆辉, 麦康森, 等. 植酸酶和非淀粉多糖酶对鲈鱼生长和消化酶活性的影响. 水生生物学报, 2009, **33**(1): 82—88]
- [30] Ketola H G, Harland B F. Influence of phosphorus in rainbow trout diets on phosphorus discharges in effluent water [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1993, **122**: 1120—1126
- [31] Satoh S, Hernandez A, Tokoro T, *et al.* Comparison of phosphorus retention efficiency between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a commercial diet and a low fish meal based diet [J]. *Aquaculture*, 2003, **224**: 271—282
- [32] Zhang C X, Mai K S, Ai Q H, *et al.* Effects of exogenous enzymes on ammonia nitrogen and soluble phosphorus excretion in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and Japanese seabass (*Lateolabrax Japonicus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(2): 231—236 [张春晓, 麦康森, 艾庆辉, 等. 饲料中添加外源酶对大黄鱼和鲈氮磷排泄的影响. 水生生物学报, 2008, **32**(2): 231—236]

EFFECTS OF DIFFERENT SUPPLEMENTAL METHODS OF PHYTASE TO SOYBEAN MEAL ON GROWTH AND FEED UTILIZATION OF JAPANESE FLOUNDER (*PARALICHTHYS OLIVACEUS*)

CHEN Jing-Hua^{1,2} and MAI Kang-Sen¹

(1. The Key Laboratory of Mariculture, Education Ministry of China, Ocean University of China, Qingdao 266003;

2. College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

Abstract: A study was conducted to evaluate the effects of different supplemental methods of phytase on growth and feed utilization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). The phytase-pretreated soybean meal (PP-SBM) was obtained by fermentation with *Candida utilis*. Four isonitrogenous (49.7% crude protein) and isocaloric (20.9 kJ/g) diets were formulated. The control diet contained 68.0% fish meal (FM) as the main protein source. In soybean meal (SBM) diets with 0 and 1000 IU/kg phytase, 45% of FM protein was replaced by SBM protein. The PP-SBM diet was formulated in which phytase-pretreated soybean meal protein replaced 45% of FM protein. Each diet was randomly fed to triplicate groups of Japanese flounder with initial weight (2.02 ± 0.02) g/fish. Fish were fed to apparent satiation twice daily (08:00 and 16:00). During the experiment, water temperature fluctuated from 22.5 to 25.5°C, salinity from 29.5 to 32.0 and dissolved oxygen was not less than 7.0 mg/L. At the end of the 10-week feeding trial, survival and feed intake showed no significant difference among dietary treatments ($P > 0.05$). The specific growth rate (*SGR*), feed efficiency ratio (*FER*), protein efficiency ratio (*PER*), nitrogen retention ($P < 0.05$), phosphorus load and calcium load ($P < 0.01$) of fish fed the SBM diet without phytase were significantly lower than those in control ($P > 0.05$). The *SGR*, *FER*, *PER* and nitrogen retention showed no significant difference among fish fed the SBM diet supplemented phytase, PP-SBM diet and control diet ($P > 0.05$). Comparing with the SBM diet without phytase, the fish fed the SBM diet supplemented phytase showed significantly higher *SGR* ($P < 0.01$), nitrogen retention ($P < 0.05$) and phosphorus retention ($P < 0.01$), and significantly lower nitrogen load ($P < 0.05$) and phosphorus load ($P < 0.01$). The *FER* and *PER* showed no significant difference between the treatments of SBM diets with and without phytase ($P > 0.05$). The content of phytate in phytase-pretreated SBM was lower than that in SBM. The fish fed the diet contained phytase-pretreated SBM exhibited significantly higher *SGR* ($P < 0.01$), *FER*, *PER* and nitrogen retention ($P < 0.05$), and significantly lower nitrogen load ($P < 0.05$), phosphorus load and calcium load ($P < 0.01$) than the fish fed the SBM diet without phytase. The whole-body moisture and energy were not affected significantly by different supplemental methods of phytase ($P > 0.05$). The whole-body crude protein ($P < 0.05$) and crude lipid ($P < 0.01$) in group of the SBM diet without phytase were significantly lower than those in control. The whole-body crude protein and crude lipid showed no significant difference among fish fed the SBM diet with phytase, PP-SBM diet and control diet ($P > 0.05$). The ash in fish fed the SBM diet without phytase, SBM diet supplemented phytase and PP-SBM diet was significantly higher than that in fish fed FM diet ($P < 0.05$). The results indicate that supplementation of phytase to the SBM diet can improve growth response and utilization of nitrogen and phosphorus, and the pretreatment of soybean meal with 1000 IU/kg diet phytase can improve the growth responses and feed utilization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Key words: Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*; Soybean meal; Phytase; Growth; Feed utilization