

柠檬酸对罗非鱼生长、体成分和消化酶活性的影响

潘庆¹, 谭永刚¹, 毕英佐¹, 郑石轩²

(1. 华南农业大学 动物科学学院水产养殖系, 广东 广州 510642; 2. 湛江粤海饲料有限公司, 广东 湛江 542002)

摘要:研究了饲料中添加不同水平柠檬酸(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%)对奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)幼鱼(初始平均体重约2.0 g)生长、饲料利用、体成分和消化酶活性的影响。共设5组试验饲料,每一饲料组设3个重复水族箱,每箱随机放鱼15尾,投喂率为6%,自然光周期,循环过滤水系统饲养9周,每周称重1次并相应调节投喂量。结果表明:随着柠檬酸添加量的增大,饲料pH值呈下降趋势;添加0.2%柠檬酸的试验组罗非鱼的特定生长率显著高于对照组($P < 0.05$, LSD多重比较,下同);饲料效率在0.3%柠檬酸组显著高于对照组($P < 0.05$);罗非鱼血清葡萄糖含量在0.4%组显著低于对照组,0.1%组和0.3%组($P < 0.05$);0.2%组和0.3%组血清甘油三酯含量最高,但组间差异不显著($P > 0.05$);全鱼水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量在组间差异不显著($P > 0.05$);胃蛋白酶、胰蛋白酶和肠蛋白酶活性随柠檬酸添加量增加呈先上升后下降的趋势,0.2%组的最高,但组间差异不显著($P > 0.05$);肝胰脏和肠淀粉酶活性分别在0.2%和0.3%组最高,组间差异亦不显著($P > 0.05$)。结果提示,饲料中适量添加柠檬酸,能提高罗非鱼幼鱼消化酶活性,提高饲料利用率,促进罗非鱼生长,对鱼体营养成分没有影响。

关键词:奥尼罗非鱼;柠檬酸;生长;消化酶活性

中图分类号:Q959.483 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)04-0344-05

柠檬酸作为饲料添加剂有着较广泛的用途,它可作为酸味剂提高饲料的适口性,降低饲料的pH值,激活消化酶,提高饲料转化率,又可作为防腐剂 and 抗氧化剂保持饲料品质;同时作为代谢调节剂直接被机体吸收,参与体内的物质代谢,为动物提供能量。畜禽生产中应用柠檬酸,添加量一般在0.5%~1.5%^[1]。有研究表明,酸化剂能够促进鲤鱼、罗非鱼、虹鳟等鱼类的生长^[2-5],添加量在不同的鱼种有所不同,但关于酸化剂对鱼类促生长作用机制的探讨较少。

本研究旨在通过生长实验确定罗非鱼幼鱼饲料中柠檬酸的适宜添加量,及添加柠檬酸对鱼体营养成分和消化酶活性的影响,进一步较深入探讨酸化剂的作用机制,为罗非鱼饲料生产中合理应用柠檬酸提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

共设5组实验饲料,以基础饲料为对照,分别在基础饲料中添加基础饲料重的0.1%、0.2%、0.3%、0.4%的柠檬酸(分析纯,天津市大茂化学试

剂厂),柠檬酸以等量替代次粉的方式添加,先溶解于水中,再添加到饲料原料混合物中。实验饲料原料组成及化学组成见表1。

1.2 实验过程

奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)由广州鱼苗场提供,运回实验室后在室内循环过滤水族箱中驯养,2周后选用225尾平均体重2.03 g的罗非鱼,随机分成5组,每组3个重复,共15个水族箱,每箱15尾鱼。整个饲养期间,每天分别在9:00、14:30和20:00投喂饲料,投喂率为6%,同时观察鱼只健康状况,记录死亡情况,每周称重1次,并相应调节投喂量,饲养周期共9周。实验期间水温26~30℃,pH 7.5, NH_4^+ 水平低于0.02 mg/L,亚硝酸盐水平低于0.1 mg/L,溶氧高于5 mg/L(据中国科学院南海海洋研究所研制的海马牌水质快速测试剂测定)。饲养结束次日,于喂料后2 h每箱随机取2尾鱼,打开腹腔,取出胃、肝脏和全肠,小心冲洗胃、肠内容物,用滤纸轻轻吸去水分,迅速称重后置于液氮中速冻,在-80℃冰箱中保存备用。另随机取3~4尾鱼从尾静脉取血,做一混样,离心后取血清置于4℃冰箱保存,于当天测定葡萄糖、甘油三

收稿日期:2003-09-30; 修订日期:2003-12-29.

作者简介:潘庆(1969-),女,博士,副教授,从事鱼类营养与饲料科学研究。Tel:020-85283529, E-mail:qpian@scnu.edu.cn

酯含量。再随机取2尾鱼,使其窒息而死,烘至绝干重,测定水分含量,并留样备测其他常规营养成分。

1.3 测定指标与方法

各组饲料和全鱼体成分中的水分、粗蛋白、粗脂肪、粗灰分、粗纤维、钙和磷含量,根据国标方法测定^[7];饲料总能采用半自动氧弹式测热计测定;饲料pH值的测定参考Radecki^[8]的方法;胃酶液的制备:取出冷冻的胃,按W/V为1:10加4℃去离子水,在冰浴下匀浆,匀浆液在12 000 g/min、4℃条件下离心15 min,取出上清液等分若干在-20℃下保存,供作酶活和蛋白含量的测定。肠酶液的制备:取出冷冻的肠,按W/V为1:5加4℃磷酸缓冲液(pH 7.5),在冰浴下匀浆,同胃酶液上清液一样制备保

存,供作酶活和蛋白含量的测定;肝胰脏消化酶液的制备:取出冷冻的肝胰脏,按W/V为1:5加4℃磷酸缓冲液(pH 7.5),在冰浴下匀浆,同胃酶液上清液一样制备保存,供作酶活和蛋白含量的测定;酶液蛋白质含量和肠蛋白酶活性测定采用Folin-酚法^[9];胃蛋白酶活性采用DAB9法^[10];肝胰脏蛋白酶活性采用Worthington法^[10];肠淀粉酶活性采用碘-淀粉比色法^[11],血清葡萄糖含量采用氧化酶法(参照上海荣盛生物技术公司试剂盒使用说明书);血清甘油三酯含量采用甘油磷酸氧化酶-过氧化物酶法(参照上海荣盛生物技术有限公司试剂盒说明书)。

表1 实验饲料原料组成及化学组成

Table 1 Ingredients and chemical composition of test diets

实验饲料 Test diets	对照组 Control	0.1%组 0.1% group	0.2%组 0.2% group	0.3%组 0.3% group	0.4%组 0.4% group
原料组成 Ingredients					
基础饲料 Basal diet *	100	99.9	99.8	99.7	99.6
柠檬酸 Citric acid	-	0.1	0.2	0.3	0.4
化学组成 Chemical composition					
水分 Moisture, Moist.	8.74	8.77	8.79	8.85	8.84
粗蛋白 Crude protei, CP	32.37	32.42	32.37	32.31	32.46
粗脂肪 Crude lipid, EE	3.24	3.26	3.30	3.22	3.29
粗纤维 Crude fibre, CF	5.44	5.82	5.52	5.14	5.38
灰分 Ash	7.37	7.59	7.41	7.38	7.46
总能/(kJ·g ⁻¹) General energe, GE	17.79	18.05	17.75	17.57	18.14
钙 Calcium, Ca	0.78	0.84	0.81	0.83	0.85
磷 Phosphorus, P	1.21	1.24	1.20	1.23	1.23
pH	5.48	5.39	5.33	5.31	5.27

注:1. 基础饲料:鱼粉13%,豆粕23%,花生粕5.5%,麦麸24%,次粉26.5%,酵母5.0%,玉米油1.0%,磷酸二氢钙1.5%,预混无机盐0.2%,预混维生素0.3%。

2. 预混无机盐和预混维生素配方参照文献[6]。

Notes: 1. fish meal 13%, soybean meal 23%, peanut meal 5.5%, wheat bran 24%, wheat middlings 26.5%, yeast 5.0%, corn oil 1.0%, Ca(H₂PO₄)₂ 1.5%, mineral premix 0.2%, vitamin premix 0.3%.

2. Composition of mineral and vitamin premixes were the same as Ref[6].

特定生长率(Specific growth rate, SGR) = [(ln 末重 - ln 初重)/饲养时间(天)] × 100%

饲料效率(Feed efficiency, FE) = (鱼总净增重量/总摄食量) × 100%

1.4 数据的统计学分析

采用SPSS11.0统计软件,对数据作单因素方差分析,若组间差异显著,则做LSD多重比较,显著水平P采用0.05。实验数据用(平均数 ± 标准误差)表示。

2 结果

2.1 柠檬酸对饲料pH值的影响

各饲料组pH值见表1。结果表明,添加柠檬酸降低饲料的pH值,随柠檬酸添加量梯度增大,饲料酸度降低的趋势越明显。

2.2 各饲料组罗非鱼的生长和饲料利用

各饲料组罗非鱼特定生长率、饲料效率见表2。结果表明,饲料中添加不同水平的柠檬酸均能提高罗非鱼幼鱼特定生长率和饲料效率,柠檬酸添加量

为0.2%时可以显著提高罗非鱼幼鱼的增重($P < 0.05$);柠檬酸添加量为0.3%时可以显著提高饲料效率($P < 0.05$)。

2.3 各饲料组罗非鱼全鱼体成分

各饲料组罗非鱼全鱼体成份见表3。由表3可知,饲料中添加柠檬酸对全鱼水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分的含量都没有显著影响($P > 0.05$)。

表2 各饲料组罗非鱼体重、特定生长率和饲料效率

Table 2 Body weight, specific growth rate and feed efficiency in fish fed test diets

$\bar{x} \pm SD$

组别 Group	初始平均体重/g Average initial body weight	终末平均体重/g Average final body weight	特定生长率/(%·d ⁻¹) Specific growth rate	饲料效率/% Feed efficiency
对照组 Control	2.03 ± 0.01	29.25 ± 2.83 ^b	4.23 ± 0.16 ^b	71.49 ± 5.33 ^b
0.1%组 0.1% group	2.04 ± 0.01	28.64 ± 1.59 ^{ab}	4.19 ± 0.10 ^{ab}	72.73 ± 3.49 ^{ab}
0.2%组 0.2% group	2.03 ± 0.02	34.92 ± 2.25 ^a	4.52 ± 0.12 ^a	76.96 ± 4.34 ^{ab}
0.3%组 0.3% group	2.05 ± 0.02	33.74 ± 2.19 ^{ab}	4.45 ± 0.10 ^{ab}	84.29 ± 8.82 ^a
0.4%组 0.4% group	2.01 ± 0.04	31.29 ± 5.30 ^{ab}	4.34 ± 0.24 ^{ab}	74.51 ± 6.40 ^{ab}

注:同列的数据肩注字母有相同的表示组间差异不显著($P > 0.05$)。

Note: Values within a column with the same superscript letters don't differ significantly among groups ($P > 0.05$).

表3 各饲料组罗非鱼全鱼体成份

Table 3 Composition of whole body of fish fed test diets

% , FB

成分 Composition	组别 Group				
	对照组 Control	0.1%组 0.1% group	0.2%组 0.2% group	0.3%组 0.3% group	0.4%组 0.4% group
水分 Moisture	74.17 ± 0.70	74.03 ± 0.17	74.02 ± 0.04	73.69 ± 0.22	73.48 ± 0.84
粗蛋白 CP	16.06 ± 0.12	15.99 ± 0.13	16.31 ± 0.01	16.10 ± 0.16	16.36 ± 0.46
粗脂肪 EE	6.13 ± 0.45	5.99 ± 0.24	6.01 ± 0.11	6.42 ± 0.22	6.54 ± 0.57
灰份 Ash	3.45 ± 0.08	3.54 ± 0.10	3.55 ± 0.02	3.45 ± 0.07	3.52 ± 0.12

注:同行的数据肩注字母有相同的表示组间差异不显著($P > 0.05$)。

Note: Values within a column with the same superscript letters mean without significant difference among groups ($P > 0.05$).

2.4 各饲料组罗非鱼血清葡萄糖和甘油三酯含量

各饲料组罗非鱼血清葡萄糖和甘油三酯含量见表4。结果表明,0.4%组罗非鱼血清葡萄糖含量显著低于对照组、0.1%组和0.3%组($P < 0.05$);随着饲料中柠檬酸添加量增加,血清甘油三酯含量呈升高趋势,添加量为0.4%时下降,但差异不显著($P > 0.05$)。

表4 各饲料组罗非鱼血清中葡萄糖和甘油三酯含量

Table 4 Concentration of serum glucose and triglyceride in fish fed test diets

组别 Group	葡萄糖/(mmol·L ⁻¹) Glucose	甘油三酯/(mg·dL ⁻¹) Triglyceride
对照组 Control	5.14 ± 0.09 ^a	182.47 ± 11.03
0.1%组 0.1% group	5.33 ± 0.36 ^a	206.58 ± 23.33
0.2%组 0.2% group	4.62 ± 0.37 ^{ab}	223.93 ± 11.69
0.3%组 0.3% group	5.40 ± 0.12 ^a	223.03 ± 12.50
0.4%组 0.4% group	4.09 ± 0.35 ^b	157.44 ± 27.54

注:同列数据肩注字母有相同的表示组间差异不显著($P > 0.05$)。

Note: Values within a column with the same superscript mean without significant difference among groups ($P > 0.05$).

2.5 各饲料组罗非鱼的消化酶活性

各饲料组罗非鱼幼鱼胃、全肠和肝胰脏蛋白酶活性见表5。柠檬酸添加组罗非鱼胃蛋白酶和肠蛋白酶活性较对照组有提高,其中0.2%组胃蛋白酶和肠蛋白酶活性都最高,但差异不显著($P > 0.05$);胰蛋白酶活性在组间差异不显著($P > 0.05$)。各饲料组罗非鱼幼鱼全肠和肝胰脏淀粉酶活性见表6。结果表明,肠淀粉酶活性与对照组没有显著差异($P > 0.05$);0.2%添加组肝胰脏淀粉酶活最高,但组间差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

柠檬酸促生长作用效果受到许多因素的影响,其中鱼的种类,生长阶段,添加量和饲料的营养水平与系酸力是较为主要的因素。已有研究表明,对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)鱼种,饲料中添加0.01 mol/L的柠檬酸,增重率和饲料转化率提高最大^[12];在鲤鱼饲料中添加0.2%的柠檬酸,可提高增重率12.3%^[3];罗非鱼饲料中添加不同水平的柠

柠檬酸饲喂,其中添加0.3%、0.45%柠檬酸同对照组相比,分别提高增重率12.5%和11.2%,降低饲料系数8.2%和7.6%^[4];但革胡子鲶饲料中添加2%和4%的柠檬酸无明显的促生长作用^[13]。本研究结果表明,在饲料蛋白水平为32%时,饲料中添加0.2%和0.3%的柠檬酸,罗非鱼的生长和对饲料的利用都显著提高,这一结果与其他研究者在奥尼罗非鱼中得到的一致^[4]。

表5 各饲料组罗非鱼胃、全肠和肝胰脏蛋白酶比活力

Table 5 Specific activities of gastrointestinal and pancreatic protease in fish fed test diets

组别 Group	U/(g protein · min), $\bar{X} \pm SD$		
	胃蛋白酶 Pepsin	胰蛋白酶 Trypsin	肠蛋白酶 Intestinal protease
对照组 Control	15.25 ± 1.81	0.72 ± 0.03	27187 ± 4316
0.1%组 0.1% group	18.75 ± 1.33	0.95 ± 0.20	38603 ± 11509
0.2%组 0.2% group	19.24 ± 1.82	0.92 ± 0.11	58699 ± 9639
0.3%组 0.3% group	16.91 ± 0.70	0.72 ± 0.05	41276 ± 8725
0.4%组 0.4% group	15.22 ± 2.61	0.82 ± 0.16	47688 ± 17909

表6 各饲料组罗非鱼全肠和肝胰脏淀粉酶比活力

Table 6 Specific activities of amylase in fish fed test diets

组别 Group	U/(g protein · min ⁻¹), $\bar{X} \pm SD$	
	肠淀粉酶 Intestinal amylase	肝胰脏淀粉酶 Hepatopancreatic amylase
对照组 Control	12763 ± 989	33292 ± 7931
0.1%组 0.1% group	13799 ± 566	43094 ± 7208
0.2%组 0.2% group	13530 ± 351	53304 ± 1651
0.3%组 0.3% group	15715 ± 1613	42976 ± 2955
0.4%组 0.4% group	13871 ± 1613	45862 ± 3985

酸制剂促进生长的作用机理与其降低饲料酸碱性,提高消化酶活性有关。在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*),摄食延胡索酸酸化的饲料,胃中食糜的pH值显著受到饲料酸化的影响^[14],肠内食糜pH值随着饲料中甲酸浓度的增加而下降^[15]。目前尚未见柠檬酸对鱼类消化酶活性影响的报道,相近的研究表明,虹鳟饲料中添加1.0%~2.5%的酸化剂,盐酸对生长和消化道任何部位的蛋白酶活性没有影响,甲酸抑制生长且降低消化道任何部位的蛋白酶活性,硫酸的作用与甲酸相似,但对胃蛋白酶活性没有影响,结果提示,饲料酸度过低,可能反而抑制消化酶活性,或强酸对消化道表面造成损伤,鱼处于应激状态^[16]。本研究中,随着柠檬酸添加量的增大,饲料pH值呈下降趋势(表1),胃蛋白酶、胰蛋白酶

和肠蛋白酶活性呈先上升后下降的趋势,0.2%组的最高;肠和肝胰脏淀粉酶活性在柠檬酸添加量为0.2%和0.3%组最高,这与0.2%和0.3%组罗非鱼特定生长率和饲料效率最高相一致,说明罗非鱼幼鱼摄食酸化饲料能增强胃环境的酸度,促进胃蛋白酶原的激活,酸性食糜进入肠道,刺激胰液和肠液分泌。适量添加柠檬酸,可通过提高消化酶活性,提高饲料消化利用率,促进罗非鱼生长,添加量过大,则起到抑制作用,从0.4%组罗非鱼血清葡萄糖含量显著降低也说明了这一点。

本实验中,没有发现生长率高的饲料组罗非鱼体成分与其他饲料组的差异显著(表3),说明饲料中添加柠檬酸不会影响鱼的品质。

本研究中基础实验饲料不是根据特定要求配制的,因此,若改变饲料原料组成及其配比将可能改变饲料的pH值,添加柠檬酸对饲料pH值的影响也会有不同。有研究表明,添加酸的促生长效果还受到饲料系酸力的影响^[17],矿物质和高蛋白饲料的酸结合力比谷类饲料强,被消化时需要较多的酸。因此,进一步实验准备研究在饲料原料组成发生变化时,罗非鱼对酸化饲料的生长反应。

参考文献:

- [1] 张 力,郑中朝. 饲料添加剂手册[M]. 北京:化学工业出版社,2000. 214~215, 233~234.
- [2] Balamurali R S, Aravindan C M. Citric acid as a feed stimulant [J]. Fish Technol Soc Fish Technol India, 1997, 34(1): 9~12.
- [3] 夏长青,刘豫宁,符冬岩. 饲料中添加柠檬酸促进鲤鱼生长的试验[J]. 上海水产大学学报,1998(7): 406~408.
- [4] 冷向军,钟 炜,黄春萍,等. 饲料添加柠檬酸对罗非鱼的生长效果分析[J]. 广西农业生物科学,2001(4): 262~265.
- [5] 常 青. 柠檬酸对鱼饲料鱼粉中矿物元素有效性的影响[J]. 饲料工业,1999(1): 22~26.
- [6] 潘 庆,毕英佐,颜惜玲,等. 有机铬对奥尼罗非鱼生长和糖利用的影响[J]. 水生生物学报,2002, 26(4): 393~399.
- [7] 崔淑文,陈必芳. 饲料标准资料汇编[S]. 北京:中国标准出版社,1991. 254~280.
- [8] 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]. J Animal Sci, 1988, 66: 2598~2605.
- [9] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京:人民教育出版社,1980. 151~154.
- [10] 施特尔马赫·B. 酶的测定方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,1992. 262~265.
- [11] 朱忠勇,马立人,王艾丽,等. 实用医学检验学[M]. 北京:人民军医出版社,1992. 381~383.
- [12] Balamurali R S, Aravindan C M. Citric acid as a feed stimulant

- [1]. Fish Technol Soc Fish Technol India. 1997, 34(1): 9-12.
- [13] 戴振炎, 刘淑述, 肖调义. 添加麦饭石和柠檬酸投喂革胡子鲶的试验研究[J]. 内陆水产, 1997(3): 4-6.
- [14] Amerio M, Cadamartiri E, Moietta A. Acidified diets in the feeding of rainbow trout: effect on some digestive indices[J]. Aquac Nutrit, 1992, 14(137): 63-72.
- [15] Vielma J, Lall S P. Dietary Fumaric acid enhances apparent digestibility of minerals in rainbow trout[J]. Aquac Nutrit 1997, 4: 265-268.
- [16] Rungruangsak K, Utne F. Effect of different acidified wet feeds on protease activities in the digestive tract and on growth rate of rainbow trout[J]. Aquaculture, 1981, 22(1): 67-79.
- [17] 陈军, 刘孝淳, 刘康柱, 等. 仔猪饲料中添加柠檬酸效果的研究[J]. 西北农业大学学报, 1995, 23(1): 49-53.

Effects of citric acid on growth, whole body composition and activities of digestive enzymes in hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*

PAN Qing¹, TAN Yong-gang¹, BI Yin-zuo¹, ZHENG Shi-xuan²

(1. Department of Aquaculture, School of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. Yuehai Feed Company Ltd., Zhanjian 524002, China)

Abstract: A 9-week feeding experiment was conducted to investigate the effects of different levels of citric acid supplement on growth, feed utilization, body composition and digestive enzymatic activities in juvenile hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* (average body weight was about 2.0 g). The basal diet was applied as control, in which 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% of citric acid were added into basal diets as test diets, respectively. Each test diet was applied for triplicate tanks and 15 fish were stocked randomly in each tank. Feeding rate was 6% (wet body weight). The fish were reared in part of recirculating filtrated water system under natural photoperiod and collectively weighed every week. Daily rations were adjusted accordingly. The results showed that dietary pH values accordingly decreased with the increment of citric acid supplement. Significantly higher ($P < 0.05$) specific growth rate and feed efficiency were observed in the fish fed diets with 0.2% and 0.3% of citric acid, respectively. The concentration of serum glucose in the fish fed diet with 0.4% citric acid was significantly lower than those fed basal diet and diets with 0.1% and 0.3% of citric acid. The concentrations of serum triglyceride in fish fed diets with 0.2% and 0.3% of citric acid were the highest. However, the differences among the treatments were not significant ($P > 0.05$). No significant differences of moisture, crude protein, crude lipid and ash in whole body were observed among the treatments. The activities of pepsin, trypsin and intestinal protease showed an increasing and then decreasing trend with the increment of citric acid supplement, which were the highest in 0.2% group. However, no significant differences were observed among the treatments. The amylase activities in hepatopancreas and intestine were the highest in 0.2% and 0.3% groups, respectively. However, significant differences were not observed among treatments. The results suggest that certain levels of dietary citric acid supplements increase the digestive enzymatic activities and feed utilization, and growth of juvenile tilapia subsequently, and have no reverse effect on nutritional composition of whole fish body.

Key words: *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*; citric acid; growth; digestive enzymatic activities