

# 不同浒苔型饲料对幼刺参(*Apostichopus japonicus*) 生长、消化及非特异性免疫的影响\*

李 猛<sup>1,2</sup> 廖梅杰<sup>1</sup> 常 青<sup>1①</sup> 王印庚<sup>1</sup> 李 彬<sup>1</sup>  
荣小军<sup>1</sup> 高 磊<sup>4</sup> 范瑞用<sup>3</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物  
产出过程功能实验室 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;  
3. 青岛瑞滋海珍品发展有限公司 青岛 266400; 4. 蓬莱市大柳行兽医站 烟台 265600)

**摘要** 以浒苔、石莼、豆粕、扇贝边、葡萄糖、贝壳粉、维生素和矿物质预混料为原料配制刺参(*Apostichopus japonicus*)饲料, 利用酿酒酵母菌菌液和碱性蛋白酶制剂对刺参饲料进行 4 种不同的处理, 得到 5 组实验用饲料, 分别为对照组、发酵组、酶解组、复合组和鲜浒苔组。将上述饲料饲喂初始体重为(1.92±0.02) g 的幼刺参 42 d, 每种饲料设 3 个重复, 每个重复 30 头幼刺参。结果显示, 不同的浒苔型饲料对幼刺参的存活率(SR)、增重率(WGR)、特定生长率(SGR)和饲料系数(FC)有显著影响( $P<0.05$ ), 而对其脏壁比(R)无显著性影响( $P>0.05$ )。复合组和鲜浒苔组 SR 要显著高于酶解组( $P<0.05$ ), 而与其他 2 组均无显著性差异( $P>0.05$ )。鲜浒苔组 WGR 远高于其他各组( $P<0.05$ ), 而复合组和发酵组 WGR 显著高于酶解组( $P<0.05$ ), 与对照组差异不显著( $P>0.05$ )。幼刺参的 SGR 规律与 WGR 一致。鲜浒苔组 FC 显著低于对照组、发酵组和酶解组( $P<0.05$ ), 与复合组差异不显著( $P>0.05$ )。随着摄食饲料时间的推移, 对照组、发酵组、复合组和鲜浒苔组淀粉酶(AMS)活力先升高再下降后趋于稳定, 而酶解组一直呈现下降趋势。酶解组纤维素酶(Cellulase)活力呈现一直下降的趋势, 而其他组呈现波动变化, 且均高于初始活力值。随着摄食饲料时间的推移, 除酶解组外, 其余各组胰蛋白酶(TRY)活力前后时间点变化差异不大, 且每个采样点幼刺参 TRY 活力大小顺序始终是对照组>复合组>鲜浒苔组>发酵组>酶解组。不同浒苔型饲料饲喂的幼刺参体腔液中酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和超氧化物歧化酶(SOD)活力均有显著性差异( $P<0.05$ )。鲜浒苔组 ACP 活力最大, 且与复合组无显著性差异( $P>0.05$ ), 而显著高于其他 3 组( $P<0.05$ )。鲜浒苔组和复合组 AKP 活力显著高于酶解组和对照组( $P<0.05$ ), 与发酵组无显著性差异( $P>0.05$ )。复合组 SOD 活力最大, 且显著高于发酵组和酶解组( $P<0.05$ ), 而与对照组和鲜浒苔组均无显著性差异( $P>0.05$ )。由此得出, 幼刺参在摄食先酶解后发酵的饲料后能够得到良好的生长效果, 并可改善自身肠道消化, 维持正常免疫。这为解决刺参饲料原料短缺以及浒苔高值化利用提供了依据和方法。

**关键词** 浒苔; 刺参; 发酵; 酶解; 生长; 消化; 非特异性免疫

中图分类号 S965 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2017)05-0122-08

\* 青岛市战略性新兴产业培育计划项目(13-4-1-65-hy)、青岛市民生科技计划项目(14-9-3-3-hy)和青岛市市南区科技发展资金项目(2014-14-009-SW)共同资助 [This work was financially supported by the Science and Technology Program of Qingdao (13-4-1-65-hy, 14-9-3-3-hy and 2014-14-009-SW)]. 李 猛, E-mail: 1099928621@qq.com

① 通讯作者: 常 青, 研究员, E-mail: changqing@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-05-10, 收修改稿日期: 2016-05-26

浒苔(*Enteromorpha prolifera*)是一种底栖大型经济类绿藻(王晓坤等, 2007), 自然繁殖能力强, 产量大, 在我国南、北方各海域均有分布(张智芳等, 2009), 具有蛋白质种类丰富、碳水化合物含量高及矿物质均衡等特点(徐大伦等, 2003; 李月欣等, 2015), 是一种潜在的优质饲料原料。目前, 由于刺参(*Apostichopus japonicus*)优质的天然饵料鼠尾藻、马尾藻等资源日渐匮乏, 有关浒苔作为刺参饲料添加成分的研究得到了广泛开展。这些研究多集中于浒苔干粉直接替代或对浒苔进行单一预处理等方面(廖梅杰等, 2011; 朱建新等, 2009; 姜燕, 2014<sup>1)</sup>)。本研究通过有效结合微生物发酵技术与碱性蛋白酶(Alkaline protease)酶解技术, 以浒苔为饲料原料, 制作 5 组不同的浒苔型饲料, 研究其对幼刺参的生长、消化和非特异性免疫的影响, 确定了浒苔生物饲料的制备工艺, 为提高浒苔利用率、制作优质刺参配合饲料提供了一定的参考依据和理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验所用浒苔于 2015 年 6 月中旬, 在山东省青岛市第一海水浴场采集获得。鲜浒苔经海水洗涤、去沙处理后, 一部分在 50℃ 下烘干、粉碎、80 目过筛后, -20℃ 下保存备用, 另一部分采用半自动匀浆机进行匀浆, 然后 -20℃ 下保存备用。

本实验中采用的发酵菌种为酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*, 编号为 CICC1251), 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心, 活化培养后经梯度耐盐筛选得到。在液体酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(Yeast extract peptone dextrose medium, YPD)(赵斌等, 2002)中 37℃、140 r/min 的恒温振荡培养 18 h, 所得菌悬液即为实验用发酵菌悬液。

本实验采用的碱性蛋白酶购自诺维信(中国)生物技术有限公司, 活力为 2.4 AU/ml。

### 1.2 实验饲料配方与制备

**1.2.1 基础饲料配方** 采用浒苔粉: 石莼粉: 豆粕: 扇贝边粉: 葡萄糖: 贝壳粉: 维生素预混料: 矿物质预混料为 40: 30: 8: 15: 1: 4: 1: 1 的配比, 制成粗蛋白质为 19.16%、粗脂肪为 1.60%的刺参

配合饲料。

**1.2.2 实验饲料的制备** 对照组: 按照表 1 中的实验配方配制饲料;

酶解组: 添加 8% 的碱性蛋白酶对基础饲料进行酶解(酶解条件: 50℃, 2.5 h)(以干物质计), 在 90℃ 下灭活 15 min。

发酵组: 利用酿酒酵母菌菌液对基础饲料进行发酵(发酵条件: 35℃、24 h、含水量 80%、接种量 16%)。

复合组: 先用碱性蛋白酶对基础饲料进行酶解(8% 剂量, 50℃, 2.5 h)后, 在 90℃ 下灭活 15 min, 再利用酿酒酵母菌菌液对酶解饲料发酵(发酵条件: 35℃、24 h、含水量 80%、接种量 16%)。

表 1 基础饲料组成及营养水平(干物质基础)

Tab.1 Composition and nutrient levels of the basal experimental diets(DM)

原料 Ingredients	含量 Content(%)
浒苔粉 <i>Enteromorpha prolifera</i> powder	40.00
石莼粉 <i>Ulva lactuca</i> powder	30.00
豆粕 Soybean meal	8.00
扇贝边粉 Scallop side powder	15.00
葡萄糖 Glucose	1.00
贝壳粉 Shell powder	4.00
维生素预混料 Vitamin premix <sup>1</sup>	1.00
矿物质预混料 Mineral premix <sup>2</sup>	1.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels	
粗蛋白质 Crude protein	19.16
粗脂肪 Ether extract	1.60

1: 每千克维生素预混料 Containing the following per kg of vitamin premix: V<sub>A</sub> 1200000 IU, V<sub>D</sub> 300000 IU, V<sub>E</sub> 5000 mg, V<sub>B1</sub> 3000 mg, V<sub>B2</sub> 2000 mg, V<sub>B6</sub> 800 mg, V<sub>B12</sub> 5 mg, V<sub>C</sub> 20000 mg, V<sub>K</sub> 33000 mg, 生物素 Biotin 30 mg, 肌醇 Inositol 10 000 mg, 叶酸 Folic acid 300 mg, 泛酸钙 Calcium pantothenate 3000 mg, 烟酸 Nicotinic acid 3 000 mg

2: 每千克矿物质预混料含有 Containing the following per kg of mineral premix: Cu 1500 mg, Se 25 mg, Fe 5000 mg, Co 500 mg, I 150 mg, Zn 2000 mg

鲜浒苔组: 称取 40% 的鲜浒苔匀浆, 再与其他提前配合好的饲料成分(干物质重量比 60%)充分混合; 酶的用量为混合饲料干重的 8%, pH 为 9–11, 含水量 75%, 反应温度为 50℃, 反应时间为 2.5 h; 酶解完成

1) Jiang Y. Study on the processing technology and application of fermentation feed for sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Doctoral Dissertation of Ocean university of China, 2014, 43–72 [姜燕. 刺参(*Apostichopus japonicus*)发酵饲料的制作工艺与应用效果研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2014, 43–72]

后对碱性蛋白酶进行灭活处理。然后进行微生物发酵,酿酒酵母培养液的用量为饲料干重的 16%,发酵基质含水量 80%,反应温度为 35℃,反应时间为 24 h,发酵期间每 2 h 搅拌混匀 1 次,反应结束后-20℃低温保存。

### 1.3 养殖实验分组与管理

**1.3.1 养殖实验分组** 实验用幼刺参由山东青岛瑞滋海珍品发展有限公司提供,为当年 3 月中旬同批次繁育的苗种,挑选出体格健壮、活力良好、平均体重为(1.92±0.02) g/头的刺参,随机分为 5 组,每组设 3 个重复,每个重复 30 头,称重之后放入 40 L 塑料水槽中暂养。

**1.3.2 养殖实验管理** 实验于 2015 年 8 月 14 日-2015 年 9 月 25 日在青岛瑞滋海珍品发展有限公司水族车间内进行,共计 42 d。实验期间的海水盐度为 30-32,溶氧浓度为 5.6-6.0 mg/L, pH 为 7.5-8.0,连续充气,水温变化见图 1。每天 08:00 换水 1/4-1/2,09:30 将饲料与海泥按 1:1 (以干重计)的比例混合、浸泡;16:30 左右,将浸泡后的混合料充分搅拌、均匀泼洒,投喂量按刺参总重量的 3% 计算,并根据刺参摄食情况及养殖用水透明度适时调整。定期观察刺参摄食情况,并检查充氧设施工作状况。整个实验期间,每 2 d 吸底 1 次;每天记录水温、饲料投喂量、刺参摄食状况和死亡数目。

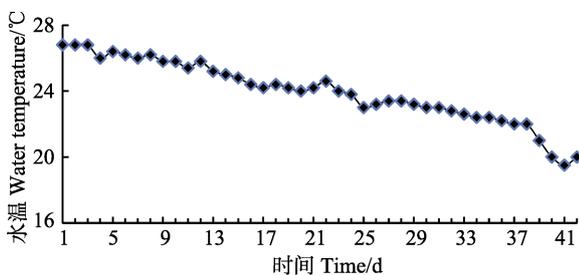


图 1 实验期间水温变化趋势

Fig.1 The variation of the water temperature during the experiment

### 1.4 样品采集与测定

**1.4.1 样品的采集与处理** 在实验 0 d 时随机取出 4 头幼刺参,14 d、28 d、42 d 时各组随机取 3 头幼刺参,解剖后取出肠道,并将肠道内容物清理干净,进行淀粉酶(Amylase, AMS)、纤维素酶(Cellulase)和胰蛋白酶(Trypsin, TRY)活力的测定。实验结束后,取体壁、内脏团称重,用于计算脏壁比(Ratio of viscera to body wall, R);抽取体腔液用于酸性磷酸酶(Acid phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)

活力的测定。

**1.4.2 指标测定** 计算幼刺参的成活率(Survival rate, SR)、增重率(Weight gain rate, WGR)、特定生长率(Specific growth rate, SGR)、饲料系数(Food coefficient, FC)和脏壁比(R)。各指标计算公式如下:

$$SR(\%)=100 \times \text{终末刺参头数} / \text{初始刺参头数};$$

$$WGR(\%)=100 \times (\text{终末平均体重} - \text{初始平均体重}) / \text{初始平均体重};$$

$$SGR(\%/d)=100 \times (\ln \text{终末平均体重} - \ln \text{初始平均体重}) / \text{养殖天数};$$

$$FC=\text{饲料投喂量} / \text{增重量};$$

$$R(\%)=100 \times \text{内脏团重量} / \text{体壁重量}$$

粗蛋白质含量的测定采用凯氏定氮法(VELP, UDK-142 Automatic Distillation Unit, 意大利);粗脂肪含量的测定采用索氏抽提法(石油醚为抽提液)(FOSS 脂肪测定仪 SOXTEC-2050, 瑞士)。

样品 ACP、AKP、SOD、AMS 活力和蛋白质浓度,采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定,酶活力以比活力表示;TRY 活力的测定参照 Erlanger 等(1961)的方法;纤维素酶活力的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法(中山大学生物化学教研室,1978)。

### 1.5 数据处理与分析

实验数据先采用 Excel 2010 进行数据统计与分析,再采用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan 氏多重比较进行统计分析,设定显著水平为  $P < 0.05$ 。实验结果以平均值±标准误(Mean±SE)表示。

## 2 结果

### 2.1 不同浒苔型饲料对幼刺参生长性能的影响

由表 2 可知,不同的浒苔型饲料对幼刺参的 SR、WGR、SGR 和 FC 有显著性影响( $P < 0.05$ ),而对幼刺参的 R 影响不显著( $P > 0.05$ )。复合组与鲜浒苔组中幼刺参的 SR 显著高于酶解组( $P < 0.05$ ),而与其他 2 组均无显著性差异( $P > 0.05$ )。鲜浒苔组中幼刺参的 WGR 远高于其他各组( $P < 0.05$ ),而复合组与发酵组的 WGR 显著高于酶解组( $P < 0.05$ ),与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。幼刺参的 SGR 规律与 WGR 相一致。鲜浒苔组中幼刺参的 FC 显著低于对照组、发酵组和复合组( $P < 0.05$ ),与复合组差异不显著( $P > 0.05$ )。

### 2.2 不同浒苔型饲料对幼刺参消化酶活力的影响

由图 2 可知,随着摄食饲料时间的推移,对照组、发酵组、复合组和鲜浒苔组中幼刺参肠道 AMS 活力先升高再下降后趋于稳定,而酶解组中一直呈现下降

表 2 不同的浒苔型饲料对刺参生长性能的影响

Tab.2 Effects of different *E. prolifera*-diets on the growth performance of *A. japonicus*

组别 Groups	成活率 SR (%)	脏壁比 R (%)	增重率 WGR (%)	特定生长率 SGR (%/d)	饲料系数 FC
对照组 Control group	93.33±1.93 <sup>ab</sup>	0.52±0.01	0.75±0.09 <sup>ab</sup>	1.45±0.10 <sup>ab</sup>	1.77±0.11 <sup>b</sup>
发酵组 Fermented group	93.33±1.93 <sup>ab</sup>	0.55±0.07	0.79±0.03 <sup>b</sup>	1.69±0.04 <sup>b</sup>	1.65±0.08 <sup>b</sup>
酶解组 Hydrolyzed group	91.11±1.11 <sup>a</sup>	0.41±0.05	0.55±0.06 <sup>a</sup>	1.27±0.13 <sup>a</sup>	2.53±0.21 <sup>a</sup>
复合组 Composite group	97.78±2.22 <sup>b</sup>	0.49±0.07	0.83±0.01 <sup>b</sup>	1.68±0.07 <sup>b</sup>	1.53±0.03 <sup>bc</sup>
鲜浒苔组 Fresh group	97.78±1.11 <sup>b</sup>	0.51±0.01	1.17±0.09 <sup>c</sup>	1.99±0.11 <sup>c</sup>	1.12±0.04 <sup>c</sup>

注: 同列数据肩标不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同

Note: Values in the same column with different letter superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ ). The same as below

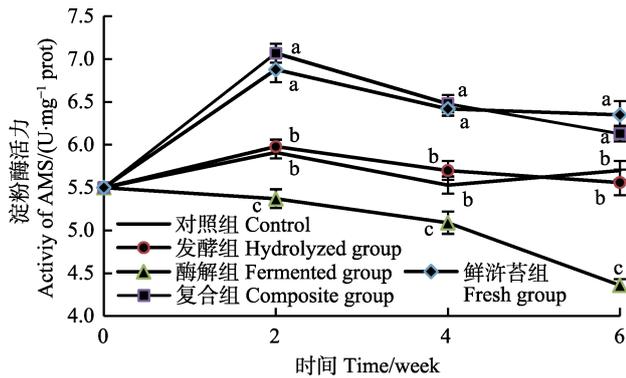


图 2 幼刺参肠道淀粉酶活力的变化

Fig.2 The variation of the intestinal AMS activity of juvenile *A. japonicus*

趋势。第 2 周, 发酵组中幼刺参的 AMS 活力与对照组无显著差异( $P > 0.05$ ), 均显著高于酶解组( $P < 0.05$ ), 且显著低于鲜浒苔组和复合组( $P < 0.05$ ), 二者之间无显著性差异( $P > 0.05$ )。在第 4、6 周, 各组中幼刺参的 AMS 活力的变化与第 2 周时相一致。

由图 3 可知, 酶解组幼刺参肠道纤维素酶活力呈现一直下降的趋势, 而其他组呈现波动变化, 且均高于初始活力值。第 2 周, 复合组中幼刺参肠道纤维素酶活力最高, 显著高于酶解组和对照组( $P < 0.05$ ), 而与鲜浒苔组和发酵组无显著性差异( $P > 0.05$ )。第 4 周, 发酵组幼刺参纤维素酶活力最高, 而各组中的肠道纤维素酶活力之间的规律与第 2 周基本相一致。第 6 周, 复合组中幼刺参肠道纤维素酶活力最高, 且显著高于其他各组( $P < 0.05$ ), 而鲜浒苔组、发酵组和对照组之间无显著差异( $P > 0.05$ ), 但均显著高于酶解组( $P < 0.05$ )。

由图 4 可知, 随着摄食饲料时间的推移, 除酶解组外, 其余各组中幼刺参肠道 TRY 活力前后时间点变化差异不大, 且在 3 个时间点上幼刺参肠道 TRY 活力大小顺序始终是对照组>复合组>鲜浒苔组>发酵组>酶解组。而在第 2 周, 各组之间的 TRY 活力无显著性差异( $P > 0.05$ )。第 4 周, 发酵组中的肠道 TRY 活力显著高于酶解组( $P < 0.05$ ), 但显著低于其他 3 组

( $P < 0.05$ ), 且其余 3 组之间均无显著性差异( $P > 0.05$ )。第 6 周, 鲜浒苔组中肠道 TRY 活力显著低于对照组( $P < 0.05$ ), 与复合组之间无显著性差异( $P > 0.05$ ), 但显著高于发酵组和酶解组( $P < 0.05$ )。

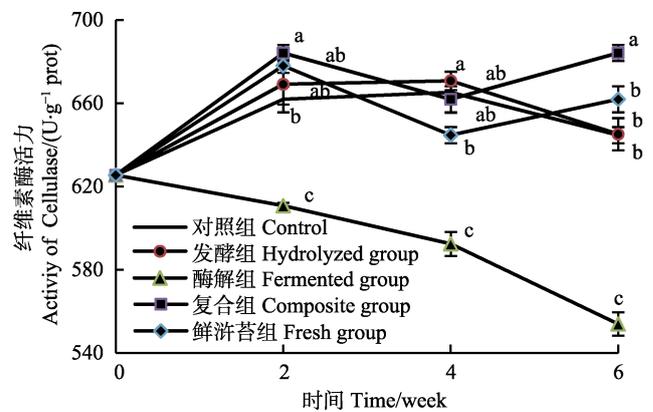


图 3 幼刺参肠道纤维素酶活力的变化

Fig.3 The variation of the intestinal cellulase activity of juvenile *A. japonicus*

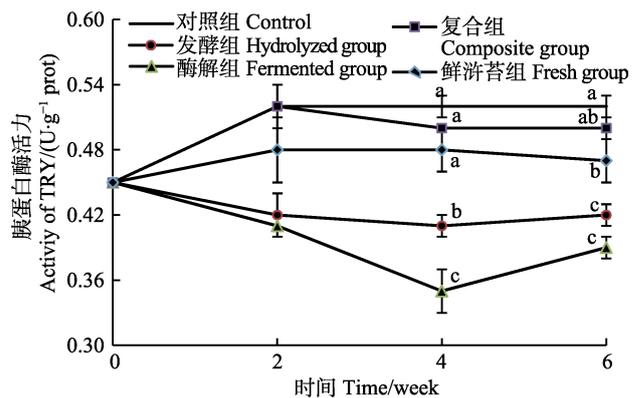


图 4 幼刺参肠道胰蛋白酶活力的变化

Fig.4 The variation of the intestinal TRY activity of juvenile *A. japonicus*

### 2.3 不同浒苔型饲料对幼刺参体腔液非特异性免疫酶活力的影响

由表 3 可知, 不同浒苔型饲料饲喂的幼刺参体腔液中 ACP、AKP 和 SOD 活力均有显著性差异( $P < 0.05$ )。

表3 不同的浒苔型饲料对幼刺参体腔液非特异性免疫酶活力的影响  
Tab.3 Effects of different *E. prolifera*-diets on non-specific immune enzyme activities in the coelomic fluid of juvenile *A. japonicus*

组别 Groups	酸性磷酸酶 ACP (U/100 ml)	碱性磷酸酶 AKP (金氏单位/100 ml)	超氧化物歧化酶 SOD (U/ml prot)
对照组 Control group	2.12±0.09 <sup>b</sup>	1.34±0.08 <sup>b</sup>	2.60±0.16 <sup>ab</sup>
发酵组 Fermented group	2.22±0.14 <sup>b</sup>	1.50±0.11 <sup>ab</sup>	2.30±0.16 <sup>bc</sup>
酶解组 Hydrolyzed group	2.13±0.13 <sup>b</sup>	1.22±0.15 <sup>b</sup>	2.14±0.12 <sup>c</sup>
复合组 Composite group	2.60±0.26 <sup>ab</sup>	1.69±0.09 <sup>a</sup>	2.73±0.07 <sup>a</sup>
鲜浒苔组 Fresh group	2.91±0.14 <sup>a</sup>	1.79±0.08 <sup>a</sup>	2.36±0.08 <sup>abc</sup>

在各组的 ACP 中, 鲜浒苔组的活力最大, 且与复合组无显著性差异( $P>0.05$ ), 而显著高于其他 3 组( $P<0.05$ ), 酶解组的活力最小。在各组的 AKP 中, 鲜浒苔组和复合组 AKP 活力显著高于酶解组和对照组( $P<0.05$ ), 与发酵组无显著性差异( $P>0.05$ )。而在各组的 SOD 中, 复合组的活力最大, 且显著高于发酵组和酶解组( $P<0.05$ ), 而与对照组和鲜浒苔组均无显著性差异( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 不同浒苔型饲料对幼刺参生长性能的影响

目前, 浒苔在刺参饲料中的应用已开展了大量的研究, 主要集中在浒苔纯粉直接投喂或经单一预处理后配合其他饲料成分进行投喂, 且得到了一定的效果。而本实验是结合微生物发酵与碱性蛋白酶水解技术对浒苔型配合饲料进行不同处理后, 对幼刺参开展投喂实验。

在本研究中, 酶解组的幼刺参生长性能指标整体最差, 可能有两方面的原因。一是在酶解反应的过程中, 蛋白质的相对分子量逐渐变小, 并转化为肽或者氨基酸, 更易于消化吸收(Arai *et al.*, 1970), 但碱性蛋白酶作为一种内肽酶, 作用于蛋白质分子内部肽键, 生成小分子肽段而产生苦味(林敏刚, 2009), 从而影响到酶解组饲料的适口性; 二是由于刺参饲料投喂的方式为泼洒投喂, 降解后小分子物质比例增加, 水溶性增强, 造成饲料营养物质不足或失衡等, 导致酶解组刺参的生长性能低下, 这与王黎(2010)<sup>1)</sup>微胶团饲料对刺参生长影响的现象相符。而复合组刺参生长性能优于对照组和酶解组, 但与发酵组之间的差异不显著, 这可能是浒苔饲料经过酶解之后, 其中的小分子物质所占的比例变大, 促进了酿酒酵母菌发酵初期的生长与繁殖速率, 这与熊子书(2002)关于中国酿酒酵

母菌的研究结果一致。而酿酒酵母菌会利用饲料中的营养物质满足自身生长代谢需要, 并能够生成一些呈味物质, 比如有机酸, 还原糖等(熊子书, 2002)。微生物发酵还可以提高饲料中菌体蛋白的含量, 为水产动物生长提供高品质的蛋白质(丁理法等, 2008)。而鲜浒苔组中的刺参生长性能最优, 可能与饲料的物理性状有较大的关系。鲜浒苔组饲料是将鲜浒苔通过匀浆之后, 再混合其他饲料原料而得, 其粒径较大, 在水中的吸附作用增强, 小分子营养物质能够被有效吸附, 且研究证实浒苔作为吸附剂能发挥良好的作用(程凤莲等, 2011); 此外, 鲜浒苔作为饲料原料能够有效保持藻体的鲜味, 促进刺参摄食行为。

#### 3.2 不同浒苔型饲料对幼刺参消化酶活力的影响

刺参肠道中常见的消化酶有淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶等, 消化酶活力的大小可以反映出刺参的摄食效果。淀粉酶是刺参肠道中最主要的内源性消化酶之一, 对刺参消化吸收淀粉等物质有很大作用(秦博等, 2015)。

本研究发现, 除酶解组的淀粉酶活力下降之外, 随着时间的推移, 其他组刺参的淀粉酶活力变化先升高后下降, 最后趋于稳定, 这与吴垠等(2003)在中国对虾(*Penaeus chinensis*)中的研究一致。吴永恒等(2012)认为造成这种现象的原因可能是刺参消化道内的消化酶活性与饲料改变后的应激反应有关, 随着投喂饲料时间的延长, 刺参通过神经调节内分泌系统使淀粉酶的分泌趋于稳定, 且本实验中的纤维素酶和胰蛋白酶活力的变化同样符合此规律。除酶解组外, 其他各组中的纤维素酶活力一致处于较高的水平, 分析原因可能是浒苔和石莼均属大型藻类, 其纤维素等大分子碳水化合物比重大, 可以促进刺参消化道分泌更多的纤维素酶。Kao 等(1996)研究认为, 纤维素酶活

1) Wang L. Effects of micro-mixed bolus feeds on the growth of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* and water quality. Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2010 [王黎. 微胶团饲料对刺参生长和水质的影响研究. 大连理工大学硕士研究生学位论文, 2010]

力不仅与自身的内分泌调节有关,同时会受到外源性因素(饲料、环境等)的影响。从图 4 中可以看出,刺参肠道内胰蛋白酶活力与饲料蛋白质含量、分子量大小有关:对照组中的蛋白质未经酶解处理,也未被酿酒酵母利用,因此,该组的刺参需要提高蛋白酶的分泌量来完成消化过程;而复合组和鲜浒苔组中,由于微生物在增殖过程中会合成大量的菌体蛋白,提高了饲料中蛋白质的储备量,因此,两组的胰蛋白酶活力与对照组无显著差异。酶解组由于蛋白质水解程度大,在水中的溶失增大,因而被刺参摄食吸收的量小,其胰蛋白酶活力最低。而酶解组的营养物质散失在水中的比例大,刺参摄食营养不足,导致其没有足够的营养物质供给合成消化酶。

### 3.3 不同浒苔型饲料对幼刺参体腔液非特异性免疫酶活力的影响

刺参体腔液中的非特异性免疫酶活力可以反映出刺参对所处内环境与外环境的调节能力。SOD 是重要的抗氧化酶之一,在清除活性氧自由基、防止生物分子损伤方面有十分重要的作用,对增强吞噬细胞的吞噬能力和整个机体的免疫功能也起着重要作用(陈竞春等,1996)。ACP 和 AKP 是 2 种重要的水解酶,在刺参抵抗疾病、免疫反应和细胞损伤与修复过程中具有重要的生物学意义(张明等,2004; Cajaravile *et al.*, 2000; Rajalakshmi *et al.*, 2005)。本研究中,复合组与鲜浒苔组刺参体腔液中的 SOD、ACP 和 AKP 活力略高于其他 3 组,可能是微生物发酵饲料中的益生菌容易在养殖水体中扩散,不仅可以改善水环境和底质,而且被养殖动物摄食后可维持肠道菌群平衡(李豫红等,2003)。且 Gill 等(2000)研究证实,发酵微生物生长代谢中产生的一些代谢产物可在一定程度上抑制或杀死病原菌,预防或降低疾病的发生,增强动物的免疫力。

## 4 结论

本研究中,幼刺参在摄食鲜浒苔组的浒苔生物饲料后,获得良好的生长效果,适当改善肠道消化酶活力,维持正常生理免疫功能。同时,该结果证明了鲜浒苔作为刺参饲料成分的可靠性,从而为减轻处理浒苔工作量、提高浒苔利用率提供了理论依据和实践方法。

## 参 考 文 献

Aria S, Yamashifa M, Kato H, *et al.* Applying proteolytic

- enzymes on soybean. *Agricultural Biological Chemistry*, 1970, 34: 729
- Cajaravile MP, Bebianno MJ, Blasco J, *et al.* The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the *Iberian peninsula*: A practical approach. *Science of the Total Environment*, 2000, 247(2/3): 295–311
- Chen JC, Shi AJ. Malacozoa immunobiology research: A review. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20(1): 74–78 [陈竞春, 石安静. 贝类免疫生物学研究概况. *水生生物学报*, 1996, 20(1): 74–78]
- Cheng FL, Meng FP, Zhou Y, *et al.* Large seaweed *Enteromorpha* to alkaline dye adsorption properties of methylene blue. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2011, 5(1): 887–891 [程凤莲, 孟范平, 周游, 等. 大型海藻浒苔对碱性染料亚甲基蓝的吸附性能. *化工进展*, 2011, 5(1): 887–891]
- Ding LF, Ye J. The study of biotechnology in the aquatic animal nutrition and feed applications. *Fisheries Science and Technology Information*, 2008, 35(5): 229–232 [丁理法, 叶婧. 生物技术在水产动物营养与饲料研究中的应用. *水产科技情报*, 2008, 35(5): 229–232]
- Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1961, 95(2): 271–278
- Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, *et al.* Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *British Journal of Nutrition*, 2000, 83(2): 167–176
- He Q. Evaluation on nutrition components of *Enteromorpha linza*. *Marine Sciences*, 2006, 30(1): 34–38 [何清. 东海绿藻缘管浒苔营养成分分析及评价. *海洋科学*, 2006, 30(1): 34–38]
- Kao C, Blaha J H, Skarkowa L. Estimation of the enzyme preparation required to obtain optimum nutrient utilization and growth performance in young broiler chicks fed on barley diets. *Zivocisna Vyroba*, 1996, 41(1): 18–19
- Liao MJ, Hao ZK, Shang DR, *et al.* Nutrition components analysis of *Enteromorpha prolifera* and its preliminary study on feeding *Apostichopus japonicas*. *Fishery Modernization*, 2011, 38(4): 32–36 [廖梅杰, 郝志凯, 尚德荣, 等. 浒苔营养成分分析与投喂刺参试验. *渔业现代化*, 2011, 38(4): 32–36]
- Lin MG. Application of alkaline protease in hydrolysis of vegetable protein. *China Oils and Fats*, 2009, 34(12): 30–33 [林敏刚. 碱性蛋白酶在水解植物蛋白中的应用. *中国油脂*, 2009, 34(12): 30–33]
- Li YH, Gao F. Introduction to the aquaculture microorganisms living bacteria preparation. *Hebei Fisheries*, 2003(1): 6–7

- [李豫红, 高峰. 浅谈水产养殖中的微生物活菌制剂. 河北渔业, 2003(1): 6-7]
- Li YX, Liu N, Zhou DQ. Effects of complex enzymes extraction on adsorption capabilities of dietary fiber from *Enteromorpha* sp.. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(4): 146-149 [李月欣, 刘楠, 周德庆. 复合酶提取法对浒苔 (*Enteromorpha* sp.) 膳食纤维吸附能力的影响. 渔业科学进展, 2015, 36(4): 146-149]
- Qin B, Chen SQ, Chang Q, et al. Effects of *Enteromorpha prolifera* on growth, digestion and non-specific immunity of juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). Journal of Fisheries of China, 2015, 39(4): 66-75 [秦搏, 陈四清, 常青, 等. 饲料中浒苔添加量以及处理方法对幼刺参生长、消化率、消化酶和非特异性免疫酶的影响. 水产学报, 2015, 39(4): 66-75]
- Rajalakshmi S, Mohandas A. Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2005, 62(1): 140-143
- Sun Yat-sen University Biochemistry Teaching and Research Section. Introduction to the biochemical technology. Beijing: People's Education Press, 1978: 53-55 [中山大学生物化学教研室. 生化技术导论. 北京: 人民教育出版社, 1978, 53-55]
- Wang XK, Ma JH, Ye DC, et al. Preliminary study on the life history of *Enteromorpha prolifera*. Marine Science Bulletin, 2007, 26(5): 112-116 [王晓坤, 马家海, 叶道才, 等. 浒苔 (*Enteromorpha prolifera*) 生活史的初步研究. 海洋通报, 2007, 26(5): 112-116]
- Wu Y, Sun JM, Zhou ZC, et al. The effects of dietary protein levels on the growth and activities of digestive enzymes in shrimp, *Penaeus chinensis*. Journal of Dalian Fisheries University, 2003, 18(4): 258-262 [吴垠, 孙建明, 周遵春等. 饲料蛋白质水平对中国对虾生长和消化酶活性的影响. 大连水产学院学报, 2003, 18(4): 258-262]
- Wu YH, Wang QY, Feng ZF, et al. The effect of dietary protein on the enzymes and intestinal structure of *Apostichopus japonicus*. Marine Sciences, 2012, 36(1): 36-41 [吴永恒, 王秋月, 冯政夫, 等. 饲料组蛋白含量对刺参消化酶及消化道结构的影响. 海洋科学, 2012, 36(1): 36-41]
- Xiong ZS. Research on liquor-making yeasts in China-records on screening of varieties of yeast and their applications continuous. Liquor-Making Science and Technology, 2002(5): 19-21 [熊子书. 中国酿酒酵母菌的研究——不同酒类酵母筛选与应用纪实(下). 酿酒科技, 2002(5): 19-21]
- Xu DL, Huang XC, Yang WG, et al. Analysis of nutrition composition of *Enteromorpha prolifera*. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2003, 22(4): 318-320 [徐大伦, 黄晓春, 杨文鸽, 等. 浒苔营养成分分析. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2003, 22(4): 318-320]
- Zhang M, Wang L, Guo ZY, et al. Effect of lipopolysaccharide and *Vibrio anguillarum* on the activities of phosphatase, superoxide dismutase and the content of hemocyanin in the serum of *Fenneropenaeus chinensis*. Marine Sciences, 2004, 28(7): 22-25 [张明, 王雷, 郭振宇, 等. 脂多糖和弧菌对中国对虾血清磷酸酶、超氧化物歧化酶和血蓝蛋白的影响. 海洋科学, 2004, 28(7): 22-25]
- Zhang ZF, Lin WT, Chen CK. Study on extraction process of water-soluble polysaccharide from *Enteromorpha prolifera*. Food and Nutrition in China, 2009(3): 39-41 [张智芳, 林文庭, 陈灿坤. 浒苔水溶性多糖提取工艺研究. 中国食物与营养, 2009(3): 39-41]
- Zhao B, He SJ. Experiment of microbiology. Beijing: Science Press, 2002, 67-72 [赵斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002, 67-72]
- Zhu JX, Qu KM, Li J, et al. Growth of young sea cucumber *Apostichopus japonicus* fed on processed *Enteromorpha prolifera*. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(5): 108-112 [朱建新, 曲克明, 李健, 等. 不同处理方法对浒苔饲喂稚幼刺参效果的影响. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 108-112]

(编辑 冯小花)

## Effects of Different Diets Containing *Enteromorpha prolifera* on Growth, Digestion and Non-Specific Immunity of Juvenile Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*)

LI Meng<sup>1,2</sup>, LIAO Meijie<sup>1</sup>, CHANG Qing<sup>1①</sup>, WANG Yingeng<sup>1</sup>,  
LI Bin<sup>1</sup>, RONG Xiaojun<sup>1</sup>, GAO Lei<sup>4</sup>, FAN Ruiyong<sup>3</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

3. Qingdao Ruizi Seafood Development Co., Ltd, Qingdao 266400; 4. Penglai Daluohang Veterinary Station, Yantai 265600)

**Abstract** In this study, the diets for sea cucumbers (*Apostichopus japonicus* Selenka) were formulated with *Enteromorpha prolifera*, *Ulva lactuca*, soybean meal, glucose, scallop side, shell powder, vitamins premix and mineral premix, and processed in four ways using Brewer's yeast and alkaline protease. The final products were 5 groups of experimental diets including the control group, the fermented group, the hydrolyzed group, the composite group and the fresh-group. Each diet was randomly given to 3 replicates of 30 sea cucumbers of which the average body weight was (1.92±0.02) g. The results were described as follows. *E. prolifera*-diets had significant different effects on the survival rate (SR), the weight gain rate (WGR), the specific growth rate (SGR) and the feed coefficient (FC) ( $P<0.05$ ). The SR in the composite group and the fresh group was higher than that in the hydrolyzed group ( $P<0.05$ ), but was not significantly different from other groups ( $P>0.05$ ). The WGR in the fresh group was higher than that in other groups ( $P<0.05$ ). The FC in the fresh group was lower than in all other groups except for the composite group. Over the feeding time, the intestinal amylase activity (AMS) showed an increasing-decreasing-stabilized pattern in the control group, the fermented group, the composite group and the fresh group; however, AMS had been constantly declining in the hydrolyzed group. The intestinal cellulase activity in the hydrolyzed group tended to decrease over time, and in other groups, it was higher than the initial values and had been fluctuating. Except for the hydrolyzed group, the trypsin activity in all other groups showed no significant change. *E. prolifera*-diets also affected the activities of acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP) and superoxide dismutase (SOD) in the coelomic fluid to different extents ( $P<0.05$ ). ACP in the fresh group was the highest and was significantly higher than all other groups ( $P<0.05$ ) except for the composite group ( $P>0.05$ ). SOD in the composite group was the highest and was significantly higher than the hydrolyzed group and the fermented group. These results suggested that juvenile sea cucumbers could benefit from the diets of the composite group and the fresh group in terms of the growth performance, the intestinal digestion and immunity. Our study also provided information on solving the shortage in raw dietary materials for sea cucumbers and making good use of *E.prolifera*.

**Key words** *Enteromorpha prolifera*; Sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka); Fermentation; Enzymolysis; Growth; Digestion; Non-specific immune

① Corresponding author: CHANG Qing, E-mail: changqing@ysfri.ac.cn