

外源硒对仿刺参(*Apostichopus japonicus*)重要生理相关酶活性及体内硒含量的影响*

李秀梅^{1,2} 徐涛³ 孙国华^{1①} 杨建敏¹ 李根瑞¹ 李海州⁴

(1. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 烟台 264006;

2. 蓬莱宗哲养殖有限公司 蓬莱 265617; 3. 山东省渔业技术推广站 济南 250002;

4. 山东富瀚海洋科技有限公司 海阳 265114)

摘要 在水温为 16–18℃ 时, 将平均体重为 (60.75 ± 0.32) g 的仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 饲养在 150 cm × 120 cm × 60 cm 的水箱中, 通过在基础饲料中添加富硒酵母, 使 7 组饲料中硒的浓度分别为 0、0.20、0.40、0.80、1.60、3.20 和 6.40 mg/kg, 进行为期 28 d 的生长实验, 并对其体壁、消化道、呼吸树、肌肉等不同组织消化酶活力、免疫酶活力进行测定, 探讨不同水平的外源硒对仿刺参生长、相关酶及体内硒含量的影响, 并用氢化物发生-原子荧光光谱法进行仿刺参体内硒含量分析。结果显示, 添加适宜浓度的硒提高了仿刺参的成活率(最高达 100%)、消化酶和免疫酶的活性, 蛋白酶(35.13 U/mg prot)和淀粉酶(0.51 U/mg prot)的最高活性分别为对照组的 2.45 倍和 2.07 倍。硒浓度为 0.80–1.60 mg/kg 时, 仿刺参各组中的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、碱性磷酸酶(AKP)和酸性磷酸酶(ACP)活性最高, 显著高于其他组; 仿刺参各组中的硒含量均有不同程度的上升, 有机硒的提高倍数大于无机硒, 说明富集到体内的硒以有机硒为主。研究表明, 硒浓度为 0.80–1.60 mg/kg 时, 仿刺参的养殖效果最佳。本研究丰富了仿刺参的营养学内容, 为仿刺参健康、高效、可持续养殖提供了一定的参考依据。

关键词 仿刺参; 富硒酵母; 生理酶活; 硒含量

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)04-0154-10

硒是人体所需要的微量营养元素之一, 具有提高机体免疫力、抗病、排毒解毒等生理功效(史丽英, 2005), 而水产品中的硒是人类获取硒的重要渠道。仿刺参(*Apostichopus japonicus*)为我国海水重要养殖经济种类, 除传统上普遍认知的营养价值之外(沈鸣, 2001), 已成为优良的补硒食品之一。然而, 随着工厂化养殖及养殖规模不断增大, 仿刺参病害频繁发生(王印庚等, 2004), 滥用抗生素类药物和大剂量用药

致使细菌耐药性增强及环境污染等问题日趋严重。因此, 开发有免疫增强效果的免疫增强剂, 提高仿刺参免疫力是减少病害发生的有效途径(Lan *et al.*, 2005)。罗辉等(2006)研究发现, 添加适量外源硒可以增强水生动物的免疫功能, 提高抗病能力, 还可获得富硒水产品。近年来, 主要采用无机硒(亚硒酸钠等)和有机硒(富硒酵母等)作为畜禽和水产饲料中的硒添加剂, 其中, 有机硒具有安全性高、易为机体吸收、生物活

* 山东省自然科学基金面上项目(ZR2013CM029)、烟台市科技发展计划(2014NC054)、山东省良种工程项目和现代农业产业技术体系刺参创新团队(SDAIT-22-02)共同资助[This work was supported by Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2013CM029), Yantai Science and Technology Development Plan Item (2014NC054), Shandong Province Seed Project and Modern Agricultural Industry Technology System *Apostichopus japonicus* Innovation Team (SDAIT-22-02)]. 李秀梅, E-mail: saishangxunmei@163.com

① 通讯作者: 孙国华, 副研究员, E-mail: sgh_smile@163.com

收稿日期: 2016-05-12, 收修改稿日期: 2016-06-16

性高等优点, 其利用效果远远好于无机硒(Bell *et al.*, 1987)。而体内主要存在形式为硒代蛋氨酸(郝素娥等, 1999), 有机硒含量占总硒含量的 80% 以上, 是一种较理想的硒补充剂。

添加硒对养殖仿刺参的影响已有研究, 但主要集中在研究无机硒对仿刺参的生物学影响, 发现不同物种对硒的需要量不同(谢帝芝等, 2010); 也有在饲料中添加有机硒, 如酵母硒、蛋氨酸硒的相关研究(王吉桥等, 2011), 但对各组织中各种酶的活性的详细变化及仿刺参各组织中的硒含量却缺乏研究, 如仿刺参养殖中硒的适宜剂量等。本研究在仿刺参中投喂添加外源硒的饲料, 并测定其成活率、相关酶的活性及仿刺参硒含量, 探索养殖环境中硒对仿刺参健康指标的影响, 确定仿刺参饲料中硒的适宜浓度, 以丰富仿刺参的营养学内容, 以期在健康、高效、可持续养殖仿刺参的同时, 获得富硒仿刺参, 提高刺参的营养价值及养殖效益。

1 材料与方法

1.1 材料

实验于 2014 年 7 月 28 日—8 月 28 日在山东蓬莱宗哲养殖有限公司刺参养殖车间进行, 所用仿刺参取自室内养殖池, 平均体重为(60.75±0.32) g, 暂养 7 d 后, 选择健康、规格整齐的仿刺参随机分到各水箱(150 cm × 120 cm × 60 cm)中, 进行正式实验。养殖实验在常规避光养殖车间内进行, 共进行 28 d。富硒酵母(硒含量标准为 1500 mg/kg)购于安琪酵母股份有限公司, 经测定总硒实际含量为(1408.80±0.47) mg/kg, 其中, 有机硒含量为(1141.13±0.26) mg/kg, 无机硒含量为(267.67±0.58) mg/kg。

1.2 方法

1.2.1 实验设计 暂养后的仿刺参随机放入水箱, 每个水箱 20 头, 共分为 7 组, 每组设 3 个平行。采取逐级放大的方法在基础饲料中添加富硒酵母(饲料中添加 0.20% 明胶增稠剂, 使饲料不易分散), 使各组饲料中硒浓度依次为 0 (空白对照)、0.20、0.40、0.80、1.60、3.20、6.40 mg/kg, 以上各组依次编号为 G0、G1、G2、G3、G4、G5、G6。

1.2.2 饲养管理 实验采用低温井水, 水温为 16–18℃, 溶解氧为 6–8 mg/L, 24 h 持续充气, pH 为 7.8–8.2, 盐度为 31.0–32.0。每天吸除粪便, 换水 1/3–1/2, 每 2 d 全部换水 1 次。每天定时测定水温、pH 和盐度, 及时观察仿刺参的摄食、活力及健康情

况, 做好记录。每日 07:00 和 16:00 投喂 2 次, 投喂量为体重的 4%–5%, 并依摄食情况而定。停止投喂添加富硒酵母的饲料 7 d 后取样。

1.2.3 测定项目与方法 实验结束时, 统计各组仿刺参的个数, 公式如下:

$$\text{存活率(Survival rate, SR, \%)} = \frac{\text{最终存活数}}{\text{初始总头数}} \times 100$$

从每组随机取出的 15 头刺参, 用生理盐水冲洗并用滤纸吸干水分。在冰盘上的培养皿里, 用注射器抽取体液(1.5 ml)及剪取少量外壁、内壁、呼吸树、消化道、肌肉组织(1 g 左右), 保存于 2 ml 冻存管中, 迅速放入液氮罐中, 运回实验室进行酶活性分析。体腔液离心后直接测定酶活性, 而其他各组织需要用玻璃匀浆器冰浴研磨, 离心后对蛋白酶、淀粉酶及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、碱性磷酸酶(AKP)和酸性磷酸酶(ACP)活性进行测定(采用南京建成生物工程研究所的试剂盒)。仿刺参各组织粗酶液中的蛋白浓度采用南京建成生物工程研究所的考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒进行测定。每组其余 35 头仿刺参解剖取各组织, 经冷冻干燥后, 用 10 ml 浓硝酸(浓硝酸–高氯酸)消解, 用氢化物发生–原子荧光法测定硒的含量。

1.2.4 数据处理与分析 所测得的数据用平均值±标准差(Mean±SD)表示, 用 Excel 2007 和 SPSS 19.0 软件进行处理、制作图表和进一步统计分析。所有数据进行单因子方差分析(One-way ANOVA)后, 并进行 Duncan 组间多重比较。 $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 不同硒水平对仿刺参成活率及消化酶活性的影响

从表 1 可以看出, 各实验组仿刺参的成活率在 85% 以上。随着硒浓度的增加, 仿刺参的生长速度增加, 成活率显著增加, 但当硒浓度超过 1.60 mg/kg 时, 成活率又呈降低趋势, 仿刺参出现了化皮现象。

表 1 不同硒浓度水平下各组仿刺参的成活率

Tab.1 The survival rates of sea cucumber fed the diets containing different levels of selenium (%)

项目 Items	组别 Groups						
	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6
初始总头数 Initial No.	60	60	60	60	60	60	60
最终成活数 Final No.	58	59	60	60	60	56	51
存活率 Survival rate	96.67	98.33	100.00	100.00	100.00	93.33	85.00

硒水平为 0.40–1.60 mg/kg 饲料组无仿刺参死亡,成活率最高为 100%; 硒水平为 6.40 mg/kg 的 G6 组成活率最低。

仿刺参消化道内消化酶活力见图 1。从图 1 可以看出,各实验组蛋白酶活力(图 1-A)、淀粉酶活力(图 1-B)均先升高后降低,而蛋白酶活力变化趋势较平

缓,淀粉酶活力变化幅度较大。G3 组蛋白酶、淀粉酶活力分别达到最高,为 35.13 U/mg prot、0.51 U/mg prot,分别为对照组的 2.45 倍和 2.07 倍。各组蛋白酶活力均与对照组有显著差异($P < 0.05$)。在硒添加浓度为 6.40 mg/kg 的高硒组仿刺参的蛋白酶和淀粉酶活力均显著低于对照组($P < 0.05$)。

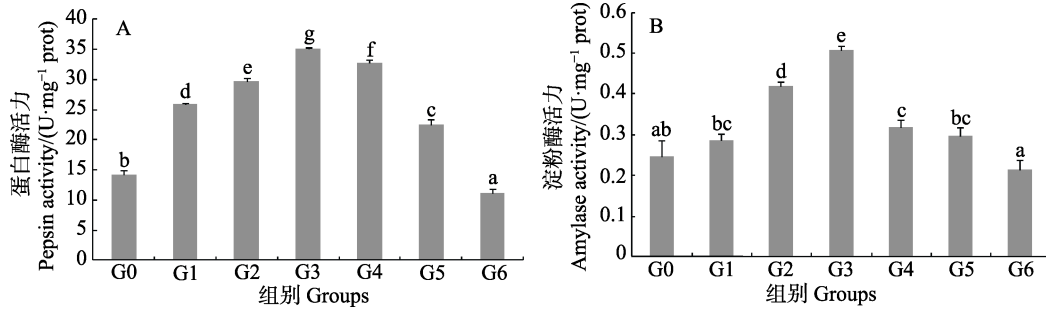


图 1 不同硒浓度水平下各组仿刺参消化道消化酶的活性

Fig.1 The activities of digestive enzymes in sea cucumber fed the diets containing different levels of selenium

数据中不同字母表示组间存在显著差异($P < 0.05$). 下同

Histogram bars with different letters indicated significant difference ($P < 0.05$). The same as below

2.2 不同硒水平对仿刺参免疫相关酶活力的影响

2.2.1 硒对 SOD 活性的影响

图 2-A—图 2-F 依次为外壁、内壁、呼吸树、消化道、肌肉及体液中的 SOD 活力。仿刺参各组织中 SOD 活性均随硒浓度增加呈先升高后降低的变化趋势。在投喂较低硒浓度(0.20 mg/kg)时,仿刺参各组中 SOD 活性变化很小,在适宜硒浓度(0.40–3.20 mg/kg)时均高于对照组,在投喂高硒浓度(6.40 mg/kg)饲料时,远远低于对照组(体液中的 SOD 活性除外) ($P < 0.05$); 外壁、内壁及体腔液中 SOD 的活性变化幅度较大,分别在硒浓度为 1.60 mg/kg 时达到最高,为 67.75 U/mg prot、55.22 U/mg prot 和 158.04 U/100 ml,而其他 3 个组织中的 SOD 活性则相对平稳,分别在硒浓度为 0.80 mg/kg 时达到最高。除 G3 组与 G4 组外,其余各组间外壁组织中 SOD 活性均差异显著($P < 0.05$),且各组间内壁及体液组织中的 SOD 活性均差异显著($P < 0.05$)。

2.2.2 硒对 GSH-Px 活性的影响

图 3-A—图 3-F 依次为外壁、内壁、呼吸树、消化道、肌肉及体液中的 GSH-Px 活力。结果显示,添加不同水平硒后,7 组仿刺参各组织中 GSH-Px 活性均明显提高。饲料硒水平为 0–1.60 mg/kg 时,仿刺参各组织中的 GSH-Px 活性随着硒添加浓度的增加而提高并趋于平缓,硒添加量为 1.60 mg/kg 时达到最高,而当硒添加量超过 1.60 mg/kg 时, GSH-Px 活性明显下降。G0 组

与 G5 组仿刺参肌肉组织 GSH-Px 活力差异不显著($P > 0.05$),其余各组间均差异显著($P < 0.05$); 其余各组织中的 GSH-Px 活力均差异显著($P < 0.05$)。

2.2.3 硒对 AKP 和 ACP 活性的影响

图 4-A—图 4-F 及图 5-A—图 5-F 依次为外壁、内壁、呼吸树、消化道、肌肉及体液中的 AKP、ACP 活力。投喂含不同浓度硒饲料的仿刺参各组的 AKP 和 ACP 活性均随硒浓度增加呈先升高后降低的趋势,但 AKP 的活性提高幅度更大。当硒浓度为 0.80、1.60 mg/kg 时,仿刺参各组织 AKP、ACP 活性均显著高于对照组($P < 0.05$)。消化道中 AKP 活性最高达到 47.83 U/g prot, 是对照组的 3.93 倍,体液中 AKP 活性提高倍数最高,是对照组的 10.78 倍; 在硒浓度为 0.80 mg/kg 时,消化道组织(25.73 U/g prot)及体液(124.41 U/100 ml)中的 ACP 活性最高,分别是对照组的 1.69 倍和 2.81 倍; 当硒浓度为 6.40 mg/kg 时,各组仿刺参不同组织 AKP、ACP 活性最低。

2.3 富硒酵母对仿刺参硒含量分布规律及硒含量的影响

7 组仿刺参各组织(干样)中的总硒及有机硒含量均呈先升高后降低的变化趋势,无机硒则呈先升高后降低又升高的变化趋势(表 2)。G3 组仿刺参肌肉及体壁中的总硒(图 6-A)及有机硒(图 6-B)含量最高,均显著高于其他组($P < 0.05$); 而 G6 组的总硒含量最低,

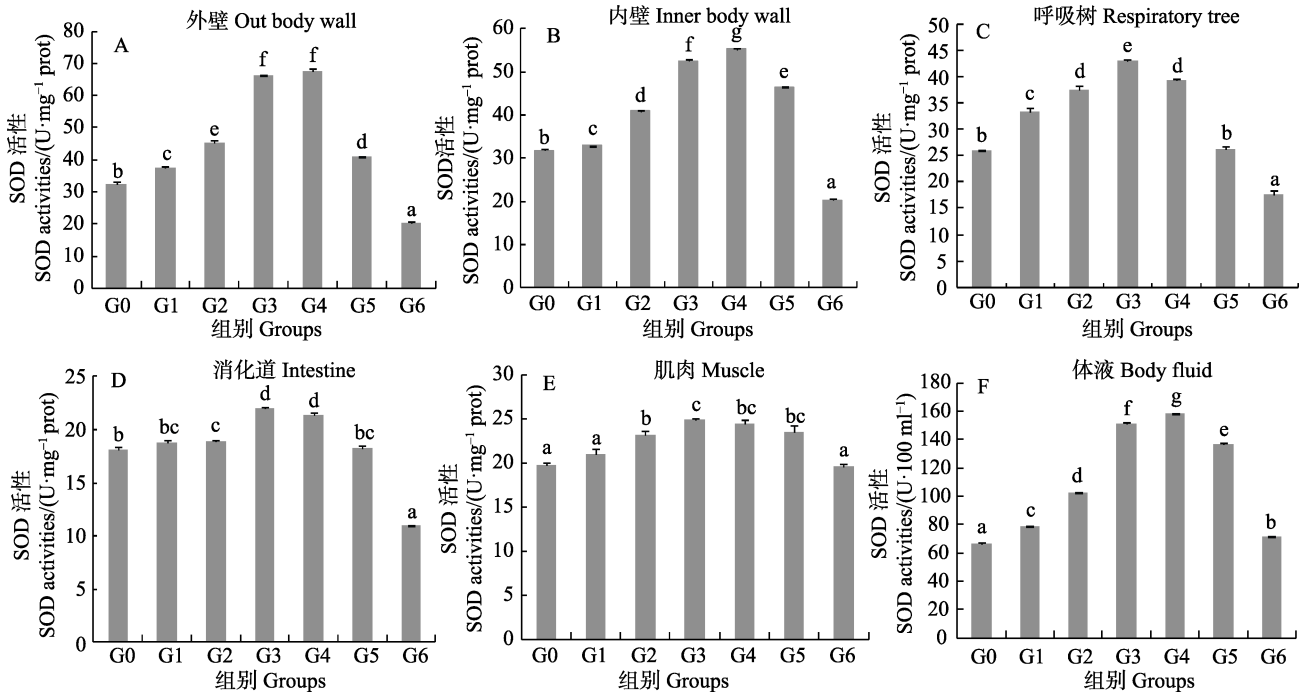


图 2 添加硒对仿刺参各组织中 SOD 活性的影响

Fig.2 Effects of dietary Se on SOD activities in different tissues of sea cucumber fed the diets containing different levels of selenium

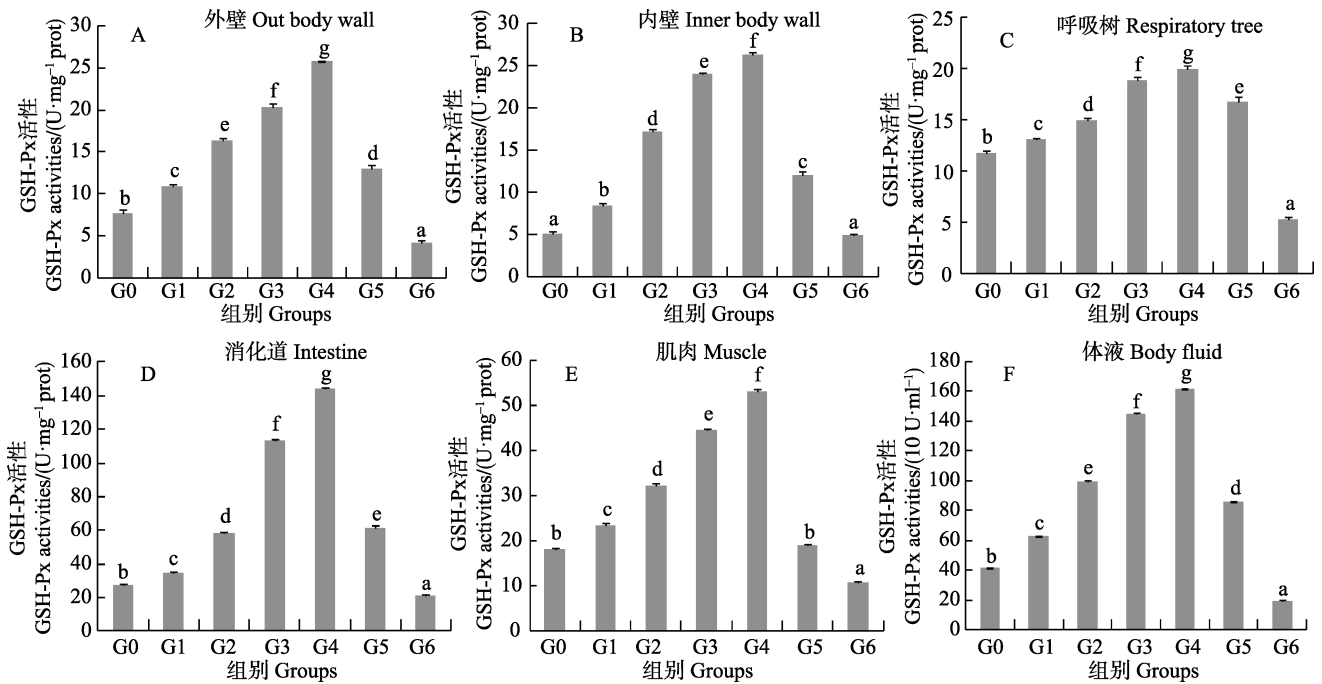


图 3 添加硒对仿刺参各组织 GSH-Px 活性的影响

Fig.3 Effects of dietary Se on GSH-Px activities in different tissues of sea cucumber fed the diets containing different levels of selenium

显著低于对照组($P < 0.05$); 仿刺参消化道中总硒及有机硒含量的变化趋势基本与体壁及肌肉中的硒含量变化相似, 但不同的是, 消化道中硒含量变化幅度较大; 呼吸树组织内的总硒及有机硒含量变化相对平

缓, 各组间值较接近。

不同硒水平条件下仿刺参各组的总硒及有机硒含量存在较大差异, 各组总硒与有机硒含量呈显著增长, 无机硒却呈先降低后增高的变化趋势(图 6-C),

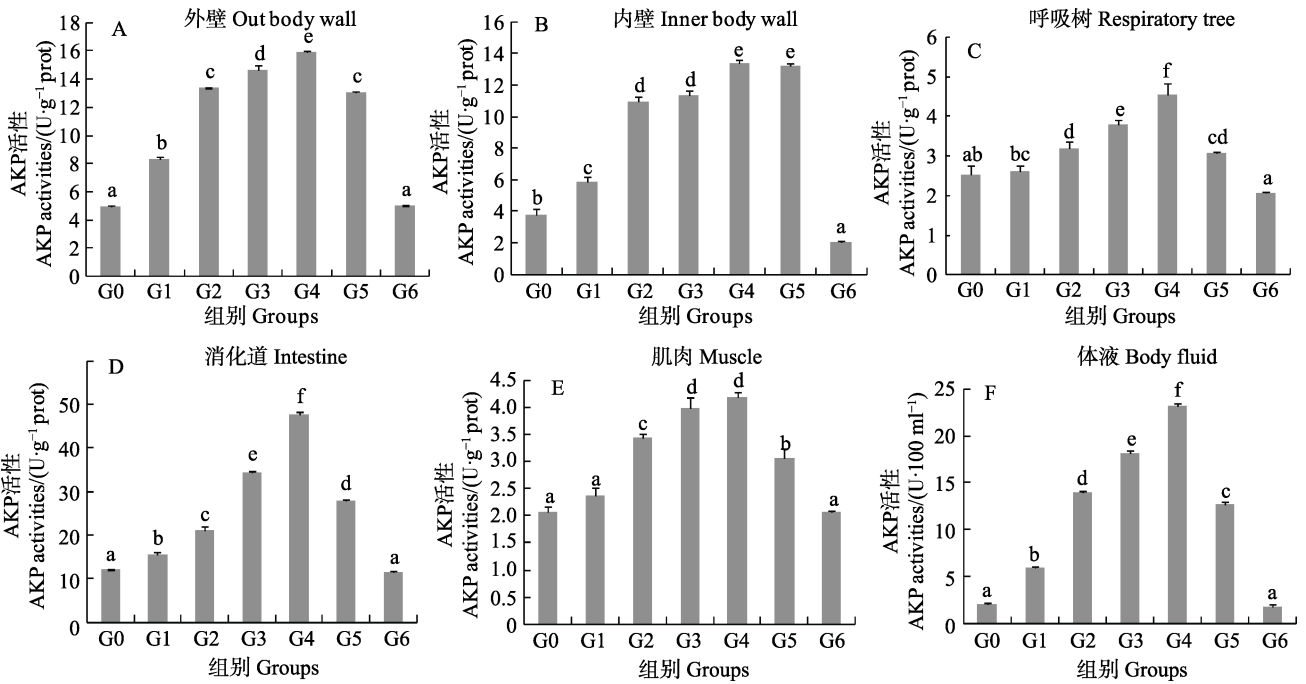


图 4 添加硒对仿刺参各组织 AKP 活性的影响

Fig.4 Effects of dietary Se on AKP activities in different tissues of sea cucumber fed the diets containing different levels of selenium

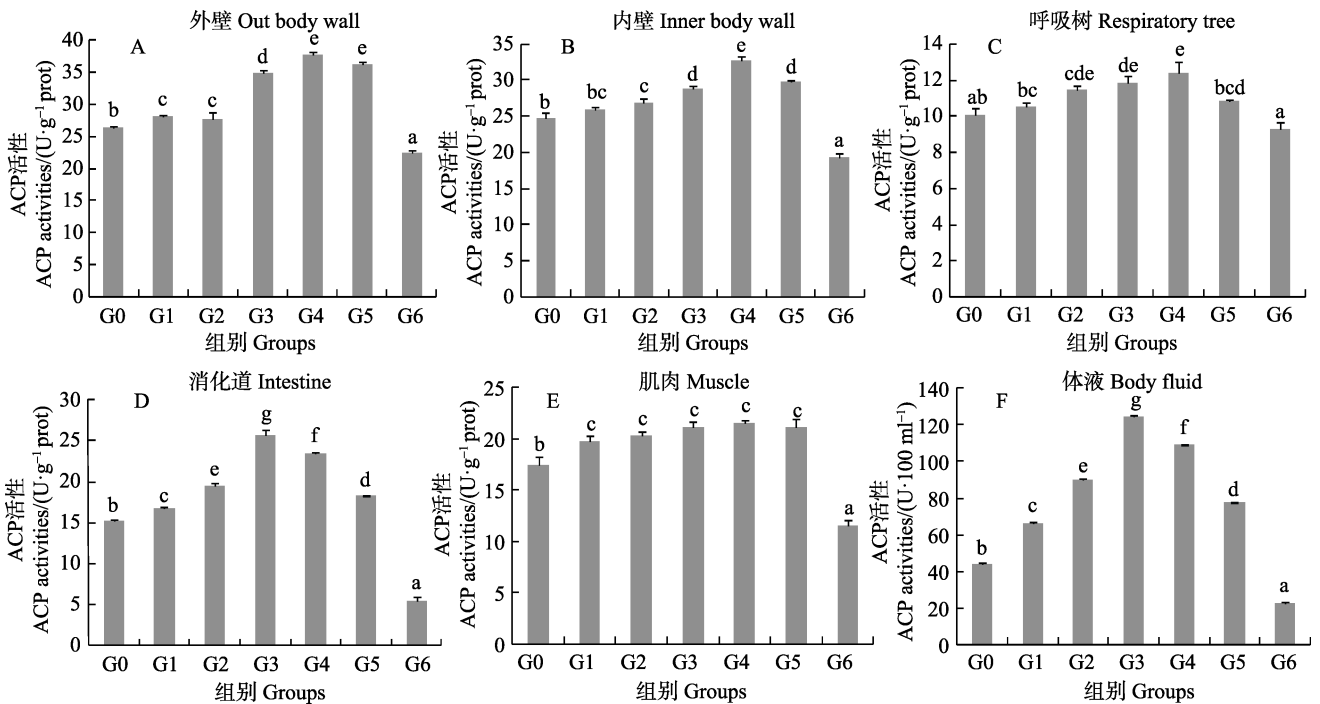


图 5 添加硒对仿刺参各组织 ACP 活性的影响

Fig.5 Effects of dietary Se on ACP activities in different tissues of sea cucumber fed the diets containing different levels of selenium

有机硒含量远远高于无机硒的含量。消化道为硒含量变化幅度最大的组织；肌肉为硒含量最高的组织，G0组(对照组)肌肉总硒、有机硒及无机硒含量分别为10.64、9.33、1.31 mg/kg，有机硒为无机硒的7.13倍，

经过富硒养殖后 G3 组中总硒及有机硒含量增加至26.44、25.17 mg/kg，无机硒降低至1.26 mg/kg，有机硒为无机硒的19.93倍，富硒倍率提高至2.49、2.70、0.97倍，有机硒富硒倍率为无机硒富硒倍率的2.80

表 2 不同硒水平对仿刺参不同组织内的各形态硒含量(mg/kg, 干重)
Tab.2 Effects of dietary Se on selenium content on physiological changes of different tissues of sea cucumber fed the diets containing different levels of selenium (mg/kg, dry weight)

形态 Forms	组织 Tissues	组别 Groups						
		G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6
总硒 Total selenium	外壁 Outer body wall	2.47±0.28 ^a	5.94±0.99 ^c	6.70±0.14 ^c	8.64±0.44 ^e	7.70±0.38 ^d	5.99±0.06 ^c	4.85±0.20 ^b
	内壁 Inner body wall	2.29±0.60 ^a	5.40±0.27 ^c	5.78±0.10 ^c	7.73±0.04 ^e	6.77±0.24 ^d	5.73±0.32 ^c	3.96±0.20 ^b
	呼吸树 Respiratory tree	0.33±0.04 ^a	0.68±0.06 ^{bc}	0.94±0.17 ^d	1.21±0.13 ^e	0.92±0.07 ^d	0.84±0.11 ^{cd}	0.57±0.07 ^b
	消化道 Intestine	0.34±0.05 ^a	1.63±0.18 ^c	1.96±0.14 ^d	1.97±0.15 ^d	1.63±0.27 ^c	1.20±0.08 ^b	1.05±0.06 ^b
有机硒 Organic selenium	肌肉 Muscle	10.64±0.30 ^a	17.80±0.88 ^d	21.48±0.43 ^e	26.44±0.37 ^f	22.99±0.56 ^f	15.02±0.05 ^c	12.37±0.41 ^b
	外壁 Outer body wall	2.14±0.30 ^a	5.15±0.87 ^c	5.85±0.12 ^c	7.68±0.41 ^d	6.98±0.39 ^d	5.38±0.43 ^c	3.74±0.12 ^b
	内壁 Inner body wall	1.99±0.46 ^a	4.69±0.38 ^c	5.07±0.25 ^c	6.88±0.50 ^e	6.14±0.17 ^d	5.04±0.13 ^c	3.10±0.13 ^b
	呼吸树 Respiratory tree	0.23±0.03 ^a	0.57±0.11 ^{bc}	0.82±0.15 ^d	1.08±0.14 ^e	0.83±0.05 ^d	0.66±0.06 ^{cd}	0.44±0.06 ^b
无机硒 Inorganic selenium	消化道 Intestine	0.29±0.05 ^a	1.42±0.21 ^d	1.73±0.09 ^e	1.74±0.17 ^e	1.34±0.16 ^d	0.91±0.07 ^c	0.66±0.05 ^b
	肌肉 Muscle	9.33±0.23 ^a	16.19±0.18 ^d	20.04±0.66 ^e	25.17±0.29 ^f	21.77±0.51 ^f	14.03±0.12 ^c	11.14±0.44 ^b
	外壁 Outer body wall	0.33±0.02 ^a	0.79±0.36 ^{bc}	0.85±0.05 ^{bc}	0.97±0.04 ^{bc}	0.72±0.20 ^{bc}	0.61±0.38 ^{ab}	1.11±0.09 ^c
	内壁 Inner body wall	0.30±0.26 ^a	0.71±0.14 ^{ab}	0.71±0.15 ^{ab}	0.86±0.46 ^b	0.63±0.19 ^{ab}	0.69±0.21 ^{ab}	0.85±0.09 ^b
	呼吸树 Respiratory tree	0.10±0.01 ^a	0.11±0.05 ^{ab}	0.13±0.04 ^{ab}	0.13±0.04 ^{ab}	0.10±0.02 ^a	0.18±0.07 ^b	0.12±0.03 ^{ab}
	消化道 Intestine	0.05±0.00 ^a	0.21±0.04 ^b	0.23±0.07 ^b	0.23±0.08 ^b	0.29±0.14 ^{bc}	0.28±0.02 ^{bc}	0.39±0.01 ^c
	肌肉 Muscle	1.31±0.08 ^a	1.61±0.73 ^a	1.44±0.28 ^a	1.26±0.12 ^a	1.22±0.16 ^a	0.99±0.07 ^a	1.23±0.30 ^a

注: 同行数据中不同字母表示差异性显著($p<0.05$)

Note: Histogram bars with different letters indicated significant difference ($p<0.05$)

倍;呼吸树中总硒及有机硒含量最低。外壁与内壁组织中总硒、有机硒含量较接近,低于肌肉组织,可食用部分体壁和肌肉组织含量高于呼吸树和消化道。总之,28 d后,各实验组仿刺参各组织中的总硒及有机硒含量变化规律为肌肉>外壁>内壁>消化道>呼吸树。

3 讨论

3.1 不同硒水平对仿刺参成活率及消化酶的影响

本研究结果表明,中间硒浓度组的仿刺参成活率最高(100%),低硒浓度 G1 组的成活率高于对照组,而高硒浓度 G6 组的成活率低于对照组。按 Weinberg 原理,动物对硒的营养需要有适宜剂量范围,超过这个范围,动物会患硒缺乏症缓慢、急性中毒,成活率降低。Bell 等(1987)研究表明,饲喂补硒饲料的大西洋鲑(*Salmon salar*)增重率和成活率均高于缺硒组。王吉桥等(2011)研究发现,摄食添加硒饲料仿刺参的成活率高于摄食对照饲料的刺参,以上研究结果均与本研究结果一致。

在低硒浓度范围内,随着硒浓度的增加,消化酶

活力逐渐升高;相反,在高硒浓度条件下,消化酶的活力随着硒浓度的增加而逐渐降低,但仍然高于对照组。硒浓度为 6.4 mg/kg 时,消化酶活性最低,说明添加适宜浓度硒可提高刺参的消化能力,高浓度硒反而有毒性,影响刺参的生长。有关硒对水产动物消化酶活性影响的研究甚少。金明昌等(2008)、苏传福等(2007)研究表明,硒可提高其他水产动物的消化酶活性,促进生长。外源硒之所以能改善水产动物体内消化酶的活性,可能是因为硒可以提高机体内代谢活性,相应的消化能力也增强。冯丹等(2014)发现,饲料中添加蛋白有利于提高仿刺参的蛋白酶活性;刘曼西等(1985)研究表明,硒酵母中有机硒主要为硒蛋白,所以仿刺参体内蛋白酶变化很明显。而淀粉酶活力变化幅度则较大,这可能是由于淀粉酶对富硒酵母的适应性不如蛋白酶好。由仿刺参的存活率和消化酶活力综合判断,硒添加量在 0.80 mg/kg 时,最适合仿刺参生长。

3.2 硒对免疫相关酶的影响

本研究中,仿刺参摄食不同添加量的富硒酵母饲

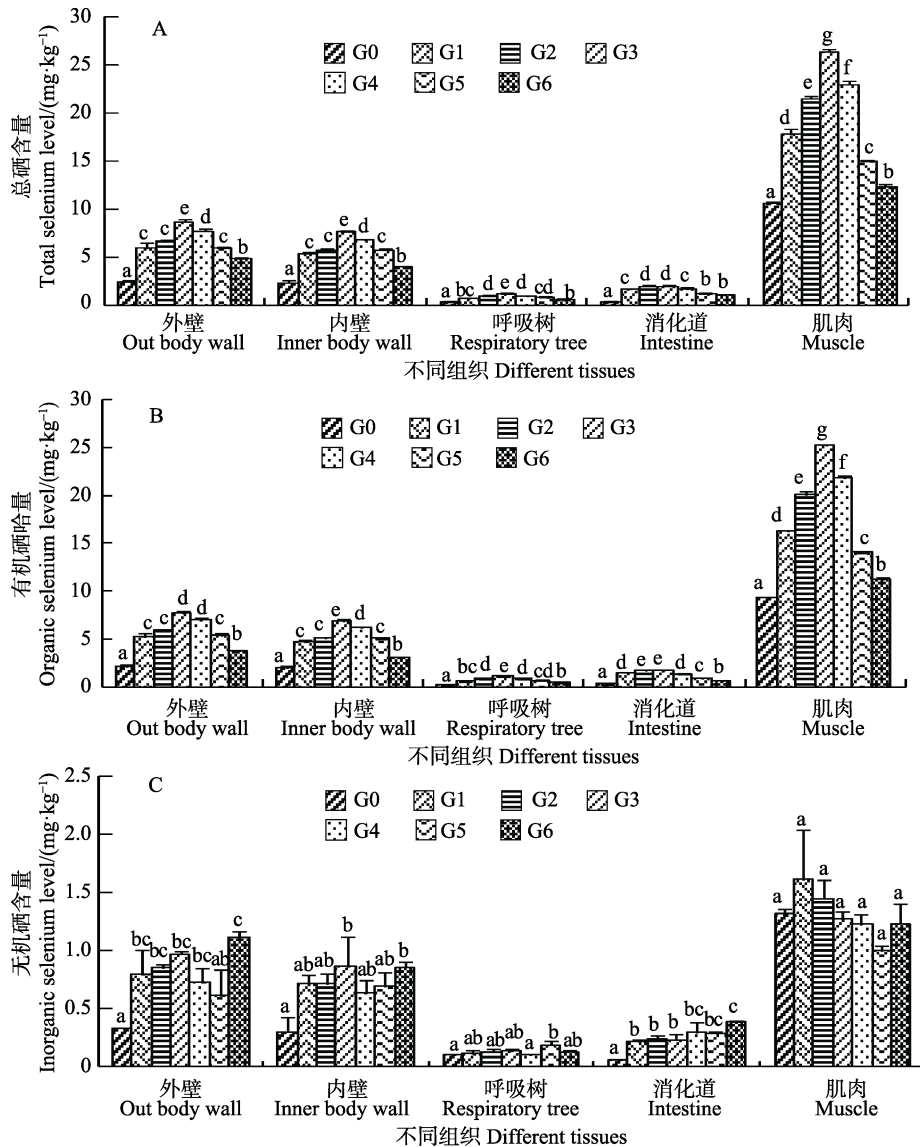


图 6 不同硒浓度条件下仿刺参不同组织内不同形态硒含量的差异比较

Fig.6 Differences in selenium content in different tissues of sea cucumber fed the diets containing different levels of selenium

料时,各组织中的 SOD 活力显著不同,尤其是体腔液中 SOD 活力显著提高,均呈现先升高后下降的趋势,说明仿刺参体腔液中的 SOD 在免疫过程中发挥重要作用。王吉桥等(2011)研究表明,饲料中添加硒可显著提高仿刺参体腔液中的 SOD 活性,有效地抵抗氧化损害。此外,王宏伟等(2005)发现,中华米虾 (*Caridina denticulata sinensis*)体内 SOD 的活性随着饲料中硒添加量的增加先上升后下降。硒能提高仿刺参体内 SOD 活力、增强机体抗氧化能力,推测可能与硒的抗免疫、抗氧化作用有一定相关性。

徐辉碧等(1991)、Avanzo 等(2001)、Sarada 等(2002)研究发现, GSH-Px 是机体内的一种抗氧化酶和硒代谢库,其活力可以在一定程度上反映机体硒水平。本研究表明,添加外源硒能提高 GSH-Px 的活性,

且在不同组织中各异。另有研究表明, GSH-Px 活性在不同鱼类、不同组织中不同(Trenzado *et al.*, 2006)。梁萌青等(2006)、谈枫等(2015)研究表明,鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*)体内 GSH-Px 的活性随饲料中硒添加量的增加呈先上升后下降的趋势,这与本研究结果相似。侯江文等(1996)发现,畜禽体内 GSH-Px 活力随饲料中硒含量的增加而升高,严重缺硒时,组织中 GSH-Px 活性下降到很低的水平。总之,硒的添加水平会影响仿刺参的 GSH-Px 活性和抗氧化能力、生长及存活。

本研究结果显示,仿刺参体壁中 AKP 和 ACP 活性变化趋势类似,随着硒浓度的升高,呈现先增高后降低的趋势,与磷酸酶可以被外源刺激物激活的研究结果相一致(詹付凤等, 2007; 谢帝芝等, 2010)。磷

酸酶不但可以被硒激活,还具有剂量依赖性,高硒浓度条件下仿刺参的酶活力降低,推测硒产生了一定的毒性。在最适硒浓度范围内,磷酸酶活性差别不大,甚至出现持平现象,推测仿刺参体内的磷酸酶活性随着时间的延长不断变化,或者可能与“免疫疲劳”有关(白楠, 2010)¹⁾。总之,在适宜浓度范围内,增加硒的含量对提高仿刺参磷酸酶的活力有一定的协同作用,但高剂量的硒会抑制磷酸酶的活力。

3.3 硒水平对硒含量分布规律及硒含量的影响

本研究中,饲料中硒含量在一定的范围内,仿刺参各组织(干样)中硒的含量都随饲料中硒含量的增加而增加,说明仿刺参可将外源硒转化为体内硒,与饲料中添加硒可提高动物体内硒含量的研究结果相符(沈梅等, 2001)。仿刺参各组织中的总硒及有机硒含量在一定范围内随富硒酵母添加量的增加而逐渐增加,当硒含量为 0.8 mg/kg 时达到最高点,但超过该范围后,硒含量变化与对照组相比增加缓慢,且与最高值相比反而降低了,这说明动物对硒元素的代谢吸收存在适宜的剂量范围,即硒的剂量-效应关系曲线超过这个范围,硒的利用程度会降低,具体表现为消化道中无机硒比例显著上升,其他各组织中有机硒比例明显降低。而仿刺参体内无机硒呈先升高后降低又升高的变化趋势,可能是酵母硒中存在少量无机硒,在缺硒条件下加强了仿刺参对硒的吸收利用,在适宜浓度范围内,仿刺参可以充分将无机硒转化为体内的有机硒,但当毒性效应产生后,仿刺参对硒的代谢吸收能力迅速降低,无机硒的积累程度增大。

仿刺参各组织均具有较强的富集硒能力,不同形态硒的富硒倍率明显不同,与李秀梅等(2015)的研究结果一致。仿刺参消化道中硒含量变化幅度较大,可能是因为随着硒的不断添加,有机硒在消化道中持续吸收,在其他组织中硒代谢较缓慢。仿刺参体壁及肌肉中硒的含量均高于消化道,说明消化道吸收的硒已通过新陈代谢在体壁及肌肉中积累。Zhou 等(2009)发现,肌肉是动物体内的硒库之一,硒在动物体内最终以硒代氨基酸的形式稳定储存在肌肉中。本研究中,仿刺参肌肉中总硒及有机硒含量最高,与此结论一致。韩华(2011)发现,仿刺参体壁的胶原蛋白中蛋氨酸和半胱氨酸的比例较低,所以仿刺参体壁中硒蓄

积量低于肌肉中。本研究中,摄食添加酵母硒的仿刺参肌肉及体壁中硒含量明显高于对照组,说明饲料中的硒是仿刺参肌肉及体壁中硒的重要来源,提高了可食用部分的有机硒含量,满足人类对硒的需求。有关仿刺参中硒营养的研究可从两方面着手:进一步深入探究硒的代谢机理;深入到分子水平研究硒蛋白及其他与硒生物学作用相关功能蛋白和基因表达的内在调控机制。

参 考 文 献

- Avanzo JL, de Mendonoga CXJ, Pugine SMP, *et al.* Effect of vitamin E and selenium on resistance to oxidative stress in chicken superficial pectoralis muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 2001, 129(2): 163-173
- Bell JG, Cowey CB, Adron JW, *et al.* Some effects of selenium deficiency on enzyme activities and indices of tissue peroxidation in Atlantic salmon parr (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 1987, 65(1): 43-54
- Feng D, Gao QF, Dong SL. Effect of feeds with different protein contents on the growth of sea cucumbers *Apostichopus japonicus* and activity of their digestive enzymes. *Preiodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2014, 44 (2): 35-40 [冯丹, 高勤峰, 董双林. 不同蛋白水平饲料对刺参生长和消化酶活性的影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2014, 44 (2): 35-40]
- Han H. Analysis and evaluation of nutritive composition in body walls for different age *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Marine Environmental Science*, 2011, 30(3): 404-408 [韩华. 不同年龄刺参体壁营养成分分析及评价. *海洋环境科学*, 2011, 30(3): 404-408]
- Hao SE, Teng B. Determination of content of organic selenium and selenium amino acids in selenium yeasts. *Journal of Instrumental Analysis*, 1999, 18(3): 72-74 [郝素娥, 滕冰. 硒酵母中有机硒及硒代氨基酸含量的测定方法. *分析测试学报*, 1999, 18(3): 72-74]
- Hou JW, Han B. The influence of natural selenium-enriched feed on peroxidase activity of animal blood glutathione. *Shanxi Journal of Agricultural Sciences*, 1996(3): 15-16 [侯江文, 韩斌. 天然富硒饲料对畜禽全血谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响. *陕西农业科学*, 1996(3): 15-16]
- Jin MC, Wang KY. Effect of selenium on performance and

1) Bai N. The research on frequency of administration of immunostimulants and immunity fatigue for white shrimp *Litopenaeus vannamei* and sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2010 [白楠. 凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei*、仿刺参 *Apostichopus japonicus* 免疫增强剂使用频率和免疫疲劳的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2010]

- immune function of Juvenile carp. Chinese Journal of Animal Science, 2008, 44(5): 32–36 [金明昌, 汪开毓. 不同硒水平对幼鲤生产性能和免疫功能的影响. 中国畜牧杂志, 2008, 44(5): 32–36]
- Lan B, Roy AD. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish and Shellfish Immunology, 2005, 19(5): 457–472
- Li XM, Sun GH, Yang JM, *et al.* Analysis of total selenium and inorganic selenium in *Apostichopus japonicus* from different regions by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. Food Science, 2015, 36(12): 113–118 [李秀梅, 孙国华, 杨建敏, 等. 氢化物原子荧光法分析不同地区刺参总硒和无机硒含量及分布规律. 食品科学, 2015, 36(12): 113–118]
- Liang MQ, Wang JL, Chang Q, *et al.* Effects of dietary Se on growth performance and activities of related enzymes in juvenile Japanese seabass *Lateolabrax japonicus*. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 17–22 [梁萌青, 王家林, 常青, 等. 饲料中硒的添加水平对鲈鱼生长性能及相关酶活性的影响. 中国水产科学, 2006, 13(6): 17–22]
- Liu MX, Yu XZ, Sun XJ, *et al.* Research on the composition of selenium yeast. Journal Huazhong College of Science and Technology, 1985, 13(3): 115–119 [刘曼西, 于秀芝, 孙宪洁, 等. 硒酵母成分的研究. 华中工学院学报, 1985, 13(3): 115–119]
- Luo H, Zhou XQ. The relationship between selenium and aquatic immune function. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2006, 18(S1): 378–382 [罗辉, 周小秋. 硒与水生动物免疫功能的关系. 动物营养学报, 2006, 18(S1): 378–382]
- Sarada SK, Sairam M, Dipti P, *et al.* Role of selenium in reducing hypoxia-induced oxidative stress: An *in vivo* study. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2002, 56(4): 173–178
- Shen M, Ma AD. The impact of selenium content in the feed stuff on the animal serum selenium concentration. Guangdong Trace Elements Science, 2001, 8(11): 44–46 [沈梅, 马安德. 饲料中含硒量的差异对动物体内硒含量的影响. 广东微量元素科学, 2001, 8(11): 44–46]
- Shen M. Investigation on component and pharmacology of sea cucumber. Chinese Traditional Patent Medicine, 2001, 23(10): 758–761 [沈鸣. 海参的化学成分和药理研究进展. 中成药, 2001, 23(10): 758–761]
- Shi LY. Essential trace element—selenium. Studies of Trace Elements and Health, 2005, 22(6): 1–3 [史丽英. 人体必需微量元素——硒. 微量元素与健康研究, 2005, 22(6): 1–3]
- Su CF, Luo L, Wen H, *et al.* Effects of dietary selenium on growth performance quality and digestive enzyme activities of grass carp. Journal of Shanghai Fisheries University, 2007, 16(2): 124–129 [苏传福, 罗莉, 文华, 等. 硒对草鱼生长、营养组成和消化酶活性的影响. 上海水产大学学报, 2007, 16(2): 124–129]
- Tan F, Liang MQ, Zheng KK, *et al.* The requirement of dietary selenium at the middle growth stage of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(3): 93–100 [谈枫, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)养殖中期对饲料硒的需求量. 渔业科学进展, 2015, 36(3): 93–100]
- Trenzado C, Hidalgo MC, Garcia-Gallego AM. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*: A comparative study. Aquaculture, 2006, 254(1–4): 758–767
- Wang HW, Zhao JH, Cui S, *et al.* The effect of dietary selenium on the activity of superoxide dismutase (SOD) in muscle of *Caridina denticulata sinensis*. Chinese Journal of Zoology, 2005, 40(5): 91–94 [王宏伟, 赵建华, 崔爽, 等. 饲料中硒的添加量与中华米虾肌肉中 SOD 的活性. 动物学杂志, 2005, 40(5): 91–94]
- Wang JQ, Wang ZX, Yu HY, *et al.* Effects of dietary selenium sources on growth and immune indices in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Journal of Dalian Ocean University, 2011, 26(4): 306–311 [王吉桥, 王志香, 于红艳, 等. 饲料中不同类型的硒对仿刺参幼参生长和免疫指标的影响. 大连海洋大学学报, 2011, 26(4): 306–311]
- Wang YG, Rong XJ. The main problem with the disease and integrated techniques in sea cucumber farming. Shandong Fisheries, 2004, 21(10): 29–31 [王印庚, 荣小军. 我国刺参养殖存在的主要问题与疾病防治技术要点. 齐鲁渔业, 2004, 21(10): 29–31]
- Xie DZ, Liu Z, Xiao TY, *et al.* Research on selenium in aquatic animal nutrition. Hunan Feed, 2010(6): 34–36 [谢帝芝, 刘臻, 肖调义, 等. 硒元素在水产动物营养中的研究. 湖南饲料, 2010(6): 34–36]
- Xu HB, Feng ZM, Cheng Y. The free radical mechanism of the toxicity. Journal of Huazhong University of Science and Technology, 1991, 19(1): 13–19 [徐辉碧, 冯志明, 程驿. 硒化合物毒性的自由基机理. 华中理工大学学报, 1991, 19(1): 13–19]
- Zhan FF, Zhao XP. Effect of cadmium on ACP and AKP in *Carassias auratus*. Sichuan Journal of Zoology, 2007, 26(3): 641–643 [詹付凤, 赵欣平. 重金属镉对鲫鱼碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性的影响. 四川动物, 2007, 26(3): 641–643]
- Zhou X, Wang Y, Gu Q, *et al.* Effects of different dietary selenium sources (selenium nanoparticle and selenomethionine) on growth performance, muscle composition and glutathione peroxidase enzyme activity of crucian carp (*Carassius auratus* Gibelio). Aquaculture, 2009, 291(1–2): 78–81

Effects of Dietary Selenium-Enriched Yeast Levels on Important Physiological Enzymes and Enrichment of Selenium in Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*)

LI Xiumei^{1,2}, XU Tao³, SUN Guohua^{1①}, YANG Jianmin¹, LI Genrui¹, LI Haizhou⁴

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006; 2. Penglai Zongzhe Aquaculture Co. Ltd., Penglai 265617; 3. Shandong Province Fisheries Technology Promotion Station, Jinan 250002; 4. Shandong Fuhun Ocean Sci-Tech Co. Ltd., Haiyang 265114)

Abstract Selenium is an important trace element to maintain the normal physiological function of an organism. It plays important roles in regulating the balance of redox environment and improving the immunity. Appropriate amount of exogenous selenium can enhance the immune function of aquatic animals, improve ability to resist disease, and rich selenium content in aquatic product. In current study, juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*), with body weight of (60.75±0.32) g, were cultured in tanks of each 150 cm × 120 cm × 60 cm for 4 weeks with water temperature of 16–18°C. They were fed diets containing selenium-enriched yeast at the dose of 0, 0.20 mg/kg, 0.40 mg/kg, 0.80 mg/kg, 1.60 mg/kg, 3.20 mg/kg and 6.40 mg/kg. Survival rate was determined and different enzyme activities were assayed in order to evaluate the influence of different levels of selenium inclusion on biological indices related to growth, digestion and immunity. Selenium enrichment was detected by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS) in sea cucumber. The results showed that the survival of sea cucumber (up to 100%) and activities of digestive and immune enzymes were improved by appropriate concentration of selenium supplementation with the maximum activities of protease (35.13 U/mg prot) and amylase (0.51 U/mg prot), 2.45 and 2.07 times higher than the control group. The maximum activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), alkaline phosphatase (AKP) and acid phosphatase (ACP) were observed in the group fed the diet containing selenium concentration of 0.80–1.60 mg/kg diet, and they were significantly higher than those in the other groups. Furthermore, selenium contents in the sea cucumber tissues were increased at different levels. The organic selenium concentration was several times higher than inorganic selenium, indicating that enrichment of organic selenium is the main way into the body. In conclusion, the diet of selenium concentration from 0.80 mg/kg to 1.60 mg/kg fed in sea cucumber was the most appropriate amount. This study enriches the nutrition research of sea cucumber and provides a frame reference for sea cucumber's healthy, efficient and sustainable breeding.

Key words *Apostichopus japonicus*; Selenium-enriched yeast; Physiological enzymes; Selenium content

① Corresponding author: SUN Guohua. E-mail: sgh_smile@163.com