



仿刺参幼参对维生素 A 最适需求量

李宝山, 王丽丽, 王际英*, 孙永智, 王世信, 黄炳山
(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, 山东 烟台, 264006)

摘要: 为了探讨仿刺参幼参对配合饲料中维生素 A(V_A) 的适宜需求量, 实验在基础饲料中分别添加维生素 A 乙酸酯, 配制 V_A 含量分别为 3 250 (D1)、5 187 (D2)、7 054 (D3)、8 970 (D4)、12 975 (D5) 和 16 400 (D6) IU/kg 的 6 组等氮等能的实验饲料, 饲喂初始体重为 (15.48±0.01) g 仿刺参幼参 8 周。结果显示, ① V_A 对仿刺参存活率 (SR) 无显著影响, 显著提高了增重率 (WG) 和特定生长率 (SGR); ② V_A 显著提高了体壁粗脂肪和 V_A 含量, 降低了羟脯氨酸含量; ③ 肠道脂肪酶 (LPS) 活性呈上升趋势, D1 组显著低于其他组, 淀粉酶 (AMY) 活性呈先下降后上升的趋势; ④ 肠道谷草转氨酶 (AST)、总抗氧化能力 (T-SOD) 及过氧化氢酶 (CAT) 活性均呈先升后降趋势, AST 及 CAT 活性均在 D4 组出现最高值, D2~D5 组 T-SOD 活性显著高于 D1 组, 碱性磷酸酶 (AKP) 活性呈上升趋势, D1 组显著低于其他组, 丙二醛 (MDA) 含量逐渐降低。综上所述, 饲料中适宜含量的 V_A 能促进仿刺参生长, 提高机体脂肪代谢及抗氧化应激能力; 以增重率为评价指标, 经一元二次回归分析得出, 初始体重为 15.48 g 的仿刺参对饲料中 V_A 的最适需求量为 10 000 IU/kg。本实验结果可为仿刺参配合饲料中 V_A 的添加量提供参考, 也可为仿刺参“微营养素平衡”配合饲料的开发提供依据。

关键词: 仿刺参; 维生素 A(V_A); 生长; 需求

中图分类号: S963.73

文献标志码: A

维生素 A(V_A) 是一种极其重要、极易缺乏的维持机体正常代谢和机能所必需的脂溶性维生素。它是一元不饱和醇或具有醇类活性物质的总称, 通常被称之为视黄醇。V_A 能维持视觉^[1], 促进细胞分化及骨骼发育^[2], 也可以提高动物的生长速率、繁殖性能和疾病抵抗能力^[3], 同时也参与鱼类黏液分泌及脂肪代谢^[4-5]。研究发现, V_A 可以提高建鲤 (*Cyprinus carpio var. Jian*)^[6]、大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*)^[7] 等水生动物的生长性能、免疫能力及繁殖性能, 改善草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[8] 的肌肉品质。在牙鲆 (*Paralichthys oli-*

vaceus)^[9]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vanamei*)^[10] 等的研究证明 V_A 缺乏或不足时, 会出现生长缓慢、皮肤出血、死亡率增加等症状。长期过量摄入 V_A 也会导致鱼类骨骼畸形^[11], 甚至产生毒性^[12]。

仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 属于棘皮动物门 (Echinodermata) 海参纲 (Holothuroidea), 具有较高的营养及药用价值, 是我国黄渤海海域重要的海水养殖品种。已有研究报道了仿刺参对维生素 B₆^[13]、C^[14]、D^[15]、E^[16] 的需求, 表明仿刺参对上述维生素的需求与鱼类差异较大。实验通过在饲料中添加不同水平的 V_A, 探究其对仿刺参的生长、

收稿日期: 2021-07-15 修回日期: 2022-03-08

资助项目: 山东省现代农业产业技术体系-刺参产业技术体系 (SDAIT-22-06)

第一作者: 李宝山 (照片), 从事水生动物营养与饲料研究, E-mail: bsleeyt@126.com

通信作者: 王际英, 从事水产健康养殖研究, E-mail: ytwjy@126.com



体成分、消化及非特异性免疫能力的影响, 以期
为仿刺参配合饲料中 V_A 的适宜含量提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 实验设计与饲料制作

以鱼粉和发酵豆粕为主要蛋白源, 以鱼油和大豆卵磷脂为脂肪源, 设计粗蛋白含量为 22%^[17]、粗脂肪含量为 4%^[18] 的基础饲料配方。在基础饲料中分别添加 0、2 000、4 000、6 000、8 000、12 000

IU/kg 的维生素 A 乙酸酯 (浙江新维普添加剂有限公司, 100 000 IU/g), 制成 V_A 含量分别为 3 250、5 187、7 054、8 970、12 975、16 400 IU/kg 等 6 种等氮等能的实验饲料, 分别命名 D1、D2、D3、D4、D5、D6 组。饲料制作前将固体原料粉碎过 200 目标准筛, 按照配方比例进行称重, 混匀后加入适量的蒸馏水和新鲜鱼油, 然后用挤压机制成直径为 0.3 cm、厚度约为 0.05 cm 的片状饲料, 60 °C 烘干备用。具体饲料配方及营养组成见表 1。

表 1 实验饲料配方及营养成分 (风干物质)

Tab. 1 Formulation and proximate composition of experimental diets

原料 ingredients	组别 groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
鱼粉/% fish meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
发酵豆粕/% fermented soybean meal	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
虾粉/% shrimp meal	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
藻粉/% algae powder	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
小麦粉/% wheat flour	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00
α -淀粉/% α -starch	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
鱼油/% fish oil	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
大豆卵磷脂/% soybean lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
维生素预混料/% vitamin premix ^a	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
维生素A乙酸酯/(IU/kg) vitamin A acetate	0.00	2 000.00	4 000.00	6 000.00	8 000.00	12 000.00
矿物质预混料/% mineral premix ^a	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
海泥/% sea mud	36.00	36.00	36.00	36.00	36.00	36.00
总计/% total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
成分分析 proximate composition						
粗蛋白/% crude protein	24.00	24.00	23.72	24.28	23.75	23.71
粗脂肪/% crude lipid	4.56	4.65	4.61	4.54	4.72	4.70
粗灰分/% crude ash	42.89	43.16	42.77	42.84	42.73	42.84
能量/(kJ/g) energy	14.71	14.68	14.74	14.67	14.69	14.69
V_A /(IU/kg) vitamin A	3 250.00	5 187.00	7 054.00	8 970.00	12 975.00	16 400.00

注: a. 多维多矿配方参见文献[19]; 维生素预混料中不含 V_A 。

Notes: a. Formulas of vitamins and minerals are the same as reference[19]; there was no vitamin A in vitamin premix.

1.2 实验用仿刺参及实验管理

实验在山东省海洋资源与环境研究院东营实验基地循环水养殖系统中进行, 实验用仿刺参幼参购自蓬莱安源水产有限公司。正式实验之前, 将仿刺参幼参暂养于养殖系统中 15 d, 暂养期投喂 D1 组饲料。待其完全适应养殖条件后, 挑选大小均匀 (15.48±0.01) g、参刺坚挺的仿刺参 540 头, 随机放养于 18 个圆柱形玻璃钢养殖水槽

(70 cm×80 cm) 中, 控制水深 60 cm。每组饲料随机投喂 3 个水槽, 养殖 8 周。每个水槽放置仿海参养殖筐 2 个, 内嵌波纹板 20 张, 每隔 30 d 更换养殖筐 1 次。实验在微流水环境中进行, 水温控制在 17~19 °C, 水流速 2 L/min, 盐度 26~28, pH 7.6~8.2, 采用充气增氧, 保证溶解氧>5.0 mg/L, 氨氮和亚硝酸盐<0.05 mg/L。每天 8:00 进行换水, 换水量为养殖水体的 1/3, 每天 16:00 进行投喂, 初始投喂量占体重的 2%, 养殖期间依据仿刺参

的摄食情况调整投喂量, 记录水温及死亡情况。每隔 2 d 用虹吸法将残饵及粪便吸出, 实验在弱光环境下进行。

1.3 样品采集与处理

取样前将实验仿刺参控食 48 h, 统计每桶仿刺参数量并称体重。每桶随机取 8 头置于洁净的泡沫板上, 用滤纸轻轻吸干体表水分, 称体重。去除体腔液, 分离肠道和体壁; 去除肠道内容物, 用滤纸擦净后称重, 整个操作在冰盘上进行。样品在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 待测。

将肠道样品慢慢剪碎, 称其重量, 加入 9 倍体积预冷的生理盐水后匀浆, 匀浆液离心 10 min ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 8 000 r/min) 后分离上清液, 分装于 2 mL 的离心管中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

1.4 测定指标与方法

生长指标及计算公式:

$$\text{增重率} = (W_t - W_0) / W_0 \times 100\%;$$

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

$$\text{存活率(SR, \%)} = (\text{实验末仿刺参数} / \text{实验初仿刺参数}) \times 100\%;$$

$$\text{胴体比(weight, IWR\%)} = (W_i / W_t) \times 100\%。$$

式中, W_0 为实验初仿刺参体重, W_t 为实验末仿刺参体重, d 为实验天数 (d), W_i 为实验末仿刺参肠道质量。

测定方法 饲料及体壁水分测定采用 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干法 (GB/T6435—2014); 粗蛋白采用凯氏定氮法测定 (GB/T6432—2006); 粗脂肪采用索氏抽提法测定 (GB/T6433—2006); 粗灰分采用 $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灼烧法测定 (GB/T 6438—2007); 能量采用燃烧法测定 (IKA, C6000, 德国); 饲料 V_A 在通标标准技术服务 (青岛) 有限公司采用高效液相色谱法-皂化提取法测定 (GB/T17818—2010); 体壁羟脯氨酸 (HYP) 采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定; 体壁 V_A 含量采用上海酶联生物科技有限公司 ELISA 试剂盒测定。测定方法参照试剂盒说明书。

紫外比色法测定肠道蛋白酶 (TRP) 活性, 比色法测定脂肪酶 (LPS) 活性, 碘-淀粉比色法测定淀粉酶 (AMS) 活性, 微量酶标法测定碱性磷酸酶 (AKP) 活性、羟胺法测定总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 活性, TBA 法测定丙二醛 (MDA) 含量, 微

板法测定谷丙转氨酶 (ALT) 及谷草转氨酶 (AST) 活性。所用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, AKP 活性单位转化为国际单位, 其他酶活定义及具体测定步骤参照试剂盒说明书。

1.5 数据统计分析

实验所得数据采用 Microsoft Excel 2007 及 SPSS 统计软件 (Ver.11.0 for Windows, SPSS Inc., 美国) 进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 差异显著 ($P < 0.05$) 时用 Duncan's 检验进行多重比较分析, 结果以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。采用一元二次回归分析仿刺参对 V_A 的最适需求量。

2 结果

2.1 V_A 对仿刺参幼参生长的影响

V_A 对仿刺参幼参生长影响的结果显示, 仿刺参 SR 不受饲料中 V_A 含量的影响 ($P > 0.05$), 随着饲料中 V_A 含量的增加, WG 及 SGR 均呈先升后降趋势, D1 组显著低于其他组 ($P < 0.05$), D4 组与 D5 组显著高于其他组 ($P < 0.05$)。IWR 与 WG、SGR 呈相似趋势, D1 组与 D6 组无显著性差异 ($P > 0.05$), 显著低于其他 4 组 ($P < 0.05$) (表 2)。

本实验条件下, 以增重率为评价指标, 经一元二次回归分析得出, 初始体重为 15.48 g 的仿刺参对饲料中 V_A 的最适需求量为 10 000 IU/kg (图 1)。

2.2 V_A 对仿刺参幼参体壁基本成分的影响

V_A 对仿刺参体壁基本成分的影响结果显示, 水分及粗蛋白含量受 V_A 含量的影响不显著 ($P > 0.05$)。随着 V_A 含量的增加, 粗脂肪含量显著升高, D1 组显著低于其他组 ($P < 0.05$); 粗灰分含量先升高后平稳, D1 组显著低于其他组 ($P < 0.05$), D4 组达到最高值, 与 D5 组无显著性差异 ($P > 0.05$); 羟脯氨酸含量显著降低 ($P < 0.05$); V_A 的含量显著上升 ($P < 0.05$) (表 3)。

2.3 V_A 对仿刺参幼参肠道消化酶性的影响

仿刺参肠道 TRP 活性不受饲料中 V_A 含量的影响 ($P > 0.05$); LPS 活性随 V_A 含量的增加呈上升趋势, D2 ~ D6 组显著高于 D1 组 ($P < 0.05$); AMS 活性呈先升后降趋势, D4 组达到最高值 (表 4)。

2.4 V_A 对仿刺参幼参肠道免疫酶活性的影响

随着饲料中 V_A 含量的升高, AKP 活性呈上升趋势, D1 组显著低于其他组 ($P < 0.05$); AST 活

表 2 饲料 V_A 对仿刺参幼参生长的影响

Tab. 2 Effects of dietary vitamin A on growth performance of juvenile *A. japonicus*

生长 growth performances		组别 groups					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6
初体重/g	initial body weight	15.47±0.12	15.48±0.12	15.47±0.11	15.48±0.76	15.50±0.09	15.49±0.12
终体重/g	final body weight	19.22±0.31 ^a	20.39±0.46 ^b	19.59±0.98 ^b	21.28±1.60 ^c	22.07±0.64 ^c	19.31±1.09 ^b
增重率/%	WG	24.34±0.31 ^a	29.02±0.46 ^b	30.18±0.98 ^b	37.47±1.60 ^c	35.94±0.64 ^c	30.07±1.09 ^b
特定增长率/(%/d)	SGR	0.37±0.01 ^a	0.42±0.01 ^b	0.46±0.02 ^b	0.53±0.02 ^c	0.51±0.01 ^c	0.44±0.01 ^b
肠体比/%	IWR	2.53±0.01 ^a	3.36±0.16 ^b	3.22±0.10 ^b	3.16±0.84 ^b	3.28±0.14 ^b	3.04±0.12 ^{ab}
存活率/%	SR	86.67±1.33	88.00±2.31	91.33±1.76	85.56±1.11	84.89±2.47	90.00±1.15

注: 同行上标字母不同, 表示二者之间差异显著(P<0.05); 下同。

Notes: Different letters indicate significant difference(P<0.05) in the same colum; the same below.

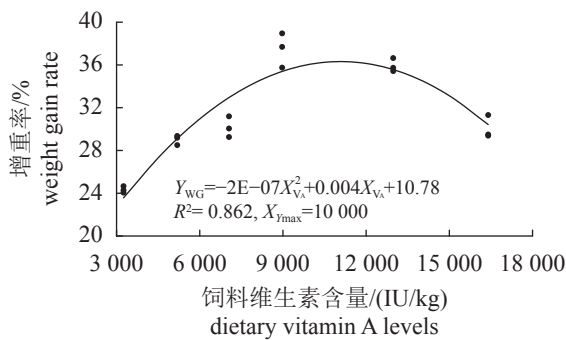


图 1 V_A 含量与仿刺参增重率的相关性分析

Fig. 1 Relationship between dietary vitamin A levels and WG of *A. japonicus*

性先下降后升高, D4 组达到最低值; T-SOD 活性先升高后降低, D3 与 D4 组显著高于其他 4 组 (P<0.05), 但 2 组之间无显著性差异 (P>0.05); MDA 含量呈下降趋势, D5、D6 组显著低于其他 4 组 (P<0.05)。V_A 对肠道 ALT 活性无显著性影响 (P<0.05)(表 5)。

3 讨论

3.1 饲料中添加 V_A 对仿刺参幼参生长及体成分的影响

V_A 能够提高动物的生长速率且增强机体的免

表 3 饲料 V_A 对仿刺参幼参体壁基本成分的影响

Tab. 3 Effects of dietary vitamin A on body wall composition of juvenile *A. japonicus*

体成分 body composition		组别 groups					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6
水分/%	moisture	91.60±0.22	91.39±0.09	91.44±0.32	91.97±0.07	91.84±0.12	91.73±0.07
粗蛋白/%	crude protein [*]	45.01±0.08	45.16±0.07	45.21±0.15	45.21±0.08	45.47±0.19	45.44±0.27
粗脂肪/%	crude lipid [*]	4.11±0.05 ^a	4.50±0.03 ^b	4.92±0.11 ^c	5.31±0.14 ^d	5.44±0.09 ^{de}	5.68±0.06 ^c
粗灰分/%	crude ash [*]	35.63±0.11 ^a	36.06±0.08 ^b	37.49±0.12 ^c	38.64±0.11 ^d	38.60±0.10 ^d	38.31±0.01 ^d
羟脯氨酸/(mg/kg)	HYP	723.85±3.47 ^c	616.45±6.93 ^d	449.12±0.60 ^c	414.11±7.49 ^b	402.96±6.86 ^b	340.92±3.65 ^a
V _A /(mg/kg)		269.37±4.53 ^a	266.90±7.85 ^a	276.47±4.31 ^{ab}	280.46±6.53 ^{ab}	290.13±3.22 ^{bc}	300.05±0.92 ^c

注: *. 粗蛋白、粗脂肪、粗灰分为干基含量。

Notes:*. Contents of crude protein, crude lipid, and crude ash are based on dry basis.

表 4 饲料 V_A 对仿刺参幼参肠道消化酶活性的影响

Tab. 4 Effects of dietary vitamin A on digestive enzyme activities of intestine of *A. japonicus* juveniles

消化酶 digestive enzyme		组别 groups					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6
蛋白酶	TRP	91.40±0.75	93.99±2.45	92.82±1.14	91.93±0.90	91.18±0.65	90.56±0.90
脂肪酶	LPS	24.87±0.76 ^a	31.36±0.10 ^b	32.63±0.75 ^c	37.00±0.48 ^d	35.55±0.53 ^d	36.33±0.66 ^d
淀粉酶	AMS	0.32±0.01 ^a	0.48±0.02 ^b	0.80±0.01 ^{de}	0.83±0.03 ^c	0.77±0.01 ^d	0.70±0.01 ^c

表 5 V_A 对仿刺参肠道免疫酶活性的影响Tab. 5 Effects of dietary vitamin A on immune enzymes activities of intestine of *A. japonicus* juveniles

项目 items		组别 groups					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6
碱性磷酸酶/(U/g prot)	AKP	0.68±0.03 ^a	1.00±0.04 ^b	1.68±0.03 ^c	1.59±0.02 ^c	2.10±0.06 ^d	2.48±0.03 ^c
谷草转氨酶/(U/g prot)	AST	5.38±0.38 ^d	3.53±0.11 ^c	3.53±0.02 ^c	2.53±0.02 ^a	2.79±0.05 ^b	2.95±0.06 ^b
谷丙转氨酶/(U/g prot)	ALT	2.26±0.02	2.51±0.09	2.51±0.05	2.39±0.13	2.36±0.10	2.43±0.07
总超氧化物歧化酶/(U/mg prot)	T-SOD	91.03±1.57 ^a	121.42±3.24 ^c	175.89±7.85 ^d	170.38±4.92 ^d	110.10±5.21 ^{bc}	102.41±3.42 ^{ab}
丙二醛/(nmol/mg prot)	MDA	1.43±0.02 ^b	1.41±0.04 ^b	1.43±0.03 ^b	1.37±0.06 ^b	1.15±0.05 ^a	1.02±0.03 ^a

疫能力, 饲料中 V_A 过低和过高都会抑制动物的生长, 甚至产生毒性。本研究表明, 饲料中缺乏或过量的 V_A 对仿刺参的存活率影响不显著, 然而, WG 及 SGR 均随饲料中 V_A 含量的增加呈先升后降趋势。这与在建鲤^[6]及凡纳滨对虾^[10]等的研究结果一致。 V_A 是维持成骨细胞及破骨细胞正常代谢的必须物质, 当摄入 V_A 过低或过高时, 成骨细胞的溶解速率、旧骨细胞的活性都会减弱, 进而降低动物的生长速率。本实验中, 仿刺参的肠体比明显受饲料中 V_A 含量的影响, 且与生长趋势相同。这与 V_A 可以保持消化道上皮细胞的完整性的功能有关, 当缺乏或过量时, 肠道上皮细胞就会受损, 不利于肠道的正常发育^[20]。

本实验条件下, 仿刺参幼参对饲料中 V_A 的最适需求量为 10 000 IU/kg, 与中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 的需求较为接近^[21], 高于大多数已报道的鱼类^[3], 这既反应了动物种属的差异, 又反应动物组织分化的差异。仿刺参体内组织分化程度较低, 不具备完整的消化系统; V_A 及其代谢产物能维持机体上皮的分化及黏液分泌, 而上皮的完整性和黏液的分泌对维持仿刺参机体正常功能至关重要; 因此其对 V_A 的需求量可能会更高。此外, 仿刺参的摄食较慢, 且饲料呈细小颗粒状, 在水中的散失也是影响实验数据的一个重要因素。

V_A 对不同水生动物体成分的影响存在较大差异。本实验中, V_A 对仿刺参体壁水分及粗蛋白含量无明显影响, 与 Hu 等^[22]对奥尼罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂) 的研究结果不一致, 可能是仿刺参与其他鱼类相比, 饲料中蛋白含量较低, V_A 对仿刺参体内蛋白质的代谢影响不大^[23]。仿刺参体壁中粗脂肪含量呈上升趋势, 粗灰分含量呈先升后降趋势, 与张璐等^[24]对日本花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 的研究结果一致。维生素 A(乙酸酯) 主要是以脂肪的形式存在, 进入消化道

后形成更多的乳糜微粒, 延长了脂肪在肠道的停留时间, 促进了机体对饲料中脂肪的吸收, 进而引起体内脂肪积累量增加, 导致体壁中粗脂肪含量升高。骨骼代谢是指骨骼形成及吸收的一个动态平衡的过程, 然而水生动物的骨骼中 Ca、P 是主要元素, 适宜水平的 V_A 能够促进骨片中 Ca、P 等矿物质的积累, 导致仿刺参体壁中粗灰分含量上升, 然而, 高水平的 V_A 会抑制矿物质的沉积, 使体壁中粗灰分含量降低。仿刺参体壁羟脯氨酸含量随添加量的增加呈下降趋势, 这与张丽^[8]对草鱼的研究结果不一致, 原因可能是 V_A 能在鱼体内转换成维甲酸后抑制分解胶原的酵素, 促进新的胶原的产生, 而仿刺参的代谢机制与鱼类存在较大差异。

3.2 饲料中添加 V_A 对仿刺参肠道消化酶活性的影响

消化系统是动物对自身摄取的营养物质进行消化和吸收的主要场所, 是为维持机体生命不断提供能量、蛋白、脂肪等的重要器官。仿刺参为低等变温动物, 消化器官发育不完善, 但仍具有消化道, 因此对营养物质的消化主要是在肠道中进行, 而消化的实质主要是酶的消化, 消化酶活性能够更直观的反映出营养物质被消化吸收的程度。本实验中 V_A 对仿刺参肠道胰蛋白酶活性无显著影响, 与冯仁勇^[25]对幼建鲤的研究结果不一致, 说明胰蛋白酶活性与蛋白质在机体内的沉积呈正相关。脂肪酶主要通过催化酰基甘油水解而发挥作用, 在仿刺参的肠道中脂肪酶与蛋白酶一样, 属于同源性消化酶, 稚参肠道中就可分泌这种酶。本实验只有肠道脂肪酶活性受 V_A 的影响, 说明 V_A 通过提高肠道脂肪酶活性增强消化能力, 促进仿刺参的生长, 与大鼠 (*Rattus norvegicus*) 上的研究结果一致^[26]。淀粉酶是消化酶中出现最早的一种酶, 主要是水解淀粉和糖元。本实验各组

仿刺参肠道淀粉酶活性无显著差异, 原因是淀粉酶主要存在动物唾液及胰脏等部位, 肠道中淀粉酶含量相对较少, 因此, V_A 对仿刺参肠道淀粉酶活性无显著影响。本实验中所测得蛋白酶与脂肪酶活性的变化与体壁中粗蛋白及粗脂肪的沉积呈正相关, 表明 V_A 通过影响蛋白质与脂肪在仿刺参肠道的消化吸收影响其在体壁中的沉积。

3.3 饲料中添加 V_A 对仿刺参幼参肠道免疫酶活性的影响

免疫系统最重要组成部分是免疫器官^[27], 同时免疫器官也是维持机体正常免疫功能的组织学基础, 动物免疫器官的发育程度受营养物质的影响显著^[28], 免疫器官的发育程度对机体免疫功能起着重要的影响^[29], 将机体的抵抗力作为衡量营养物质对机体免疫作用的综合指标^[3]。仿刺参为无脊椎动物, 免疫机制主要是非特异性免疫, 因此通过检测仿刺参肠道中非特异性免疫酶活性可直接判断机体的抗病能力。

AKP 是骨骼、肠道等组织中广泛分布的一种酶, 主要是由成骨细胞产生, 很多因素都会影响 AKP 的活性。已有研究表明, 饲料中过低和过高水平的 V_A 都能对 AKP 活性产生一定的影响。本实验中肠道 AKP 活性总体呈先升后降趋势, 与索兰弟等^[30]对肉仔鸡血清中 AKP 活性的研究结果一致。说明饲料中适宜含量的 V_A 能够通过提高成骨细胞的活性, 促进骨骼的正常发育, 提高肠道碱性磷酸酶的活性^[22]。

转氨酶是催化氨基酸与酮酸之间氨基转移的一类酶, 普遍存在于动物组织中。在脊椎动物中, 血清中转氨酶活性的高低通常被用来评价肝脏功能正常与否。仿刺参不具备肝脏这个重要的代谢器官, 因此转氨酶活性的大小更可能反应了组织氨基酸代谢能力的高低。本实验中, 肠道 AST 活性先降后升, ALT 活性无变化。已有研究表明, ALT 主要位于细胞质内, 而 AST 主要位于线粒体内。因此推测, 本实验中饲料添加 V_A 对蛋白质的代谢影响不大, 而影响了能量代谢, 这也与本实验中仿刺参体壁基本成分、肠道消化酶等指标的变化相对应。

总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 是一种二聚体酶, 可以解毒、清除超氧阴离子自由基^[31], 通过其活性可以判断机体清除氧自由基的能力^[32]。机体内丙二醛的含量可以反映出躯体的脂质过氧化程度, 也能间接的反应机体细胞受氧自由基攻击的程

度^[33], 其含量过高时, 对细胞的毒害作用就会产生, 免疫力因此下降。本实验中, 肠道 T-SOD 酶活性随 V_A 水平的增加呈先升后降趋势, 肠道 MDA 含量呈下降趋势, 表明适量的 V_A 能够提高仿刺参的抗氧化应激能力, 与对草鱼的研究结果一致^[34-35]。

4 结论

以增重率为评价指标, 经一元二次线性回归分析可知, 初始体重为 15.48 g 的仿刺参对饲料中 V_A 的最适需求量为 11 000 IU/kg。饲料中添加适量的 V_A 能够促进仿刺参生长, 提高机体脂肪代谢及抗氧化应激能力。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Moren M, Opstad I, Berntssen M H G, et al. An optimum level of vitamin A supplements for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles[J]. *Aquaculture*, 2004, 235(1-4): 587-599.
- [2] Hemre G I, Deng D F, Wilson R P, et al. Vitamin A metabolism and early biological responses in juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) fed graded levels of vitamin A[J]. *Aquaculture*, 2004, 235(1-4): 645-658.
- [3] Hernandez L H, Hardy R W. Vitamin A functions and requirements in fish[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(8): 3061-3071.
- [4] 蒋明. 草鱼幼鱼对维生素 A、D 和 K 需要量的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
Jiang M. Studies on requirements of dietary vitamin A, D and K for grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007 (in Chinese).
- [5] Takeuchi T, Dedi J, Haga Y, et al. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Aquaculture*, 1998, 169(3-4): 155-165.
- [6] 杨奇慧, 周小秋. 维生素A缺乏对建鲤生长性能及免疫功能的影响[J]. 中国水产科学, 2005, 12(1): 62-67.
Yang Q H, Zhou X Q. Effects of dietary vitamin A deficiency on growth performance and immune responses of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)[J]. *Journal of China Society of Fisheries*, 2005, 12(1): 62-67.

- of Fishery Sciences of China, 2005, 12(1): 62-67 (in Chinese).
- [7] 黄利娜, 梁萌青, 张海涛, 等. 饲料中添加不同水平维生素A对大菱鲆亲鱼繁殖性能的影响[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(4): 62-70.
Huang L N, Liang M Q, Zhang H T, *et al.* The effect of dietary vitamin A level on reproductive performance of broodstock *Scophthalmus maximus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(4): 62-70 (in Chinese).
- [8] 张丽. 维生素 A 对生长中期草鱼生产性能、肠道、机体和鳃健康以及肌肉品质的作用及作用机制 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
Zhang L. Effects of dietary vitamin A on growth performance, intestinal health, body health, gill health and muscle quality as well as the potential mechanisms in young grass carp [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [9] 王际英, 李宝山, 马晶晶, 等. 褐牙鲆亲鱼野生群体与养殖群体维生素A、C、E含量的比较[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1250-1256.
Wang J Y, Li B S, Ma J J, *et al.* A comparison study of vitamin A, C and E in wild and farmed Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1250-1256 (in Chinese).
- [10] 杨奇慧, 周歧存, 迟淑艳, 等. 饲料中维生素A水平对凡纳滨对虾生长、饲料利用、体组成成分及非特异性免疫反应的影响[J]. 动物营养学报, 2007, 19(6): 698-705.
Yang Q H, Zhou Q C, Chi S Y, *et al.* Effects of dietary vitamin A levels on growth, feed utilization, body composition and non-specific immunological responses of juvenile shrimp[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2007, 19(6): 698-705 (in Chinese).
- [11] Fernández I, Hontoria F, Ortiz-Delgado J B, *et al.* Larval performance and skeletal deformities in farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*)[J]. *Aquaculture*, 2008, 283(1-4): 102-115.
- [12] Cuesta A, Ortuño J, Rodriguez A, *et al.* Changes in some innate defence parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) induced by retinol acetate[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 13(4): 279-291.
- [13] 李宝山, 王际英, 王成强, 等. 仿刺参幼参对饲料中维生素B₆需求量的研究[J]. 水产学报, 2019, 43(12): 2545-2553.
Li B S, Wang J Y, Wang C Q, *et al.* Dietary vitamin B₆ requirement of juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(12): 2545-2553 (in Chinese).
- [14] Luo Z Y, Wang B J, Liu M, *et al.* Effect of dietary supplementation of vitamin C on growth, reactive oxygen species, and antioxidant enzyme activity of *Apostichopus japonicus* (Selenka) juveniles exposed to nitrite[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2014, 32(4): 749-763.
- [15] 王丽丽, 李宝山, 王际英, 等. 维生素D₃对仿刺参幼参生长、体组成及抗氧化能力的影响[J]. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 110-118.
Wang L L, Li B S, Wang J Y, *et al.* Effects of dietary vitamin D₃ on growth performance, body composition, and antioxidant capacity of the juvenile sea cucumber[J]. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(1): 110-118 (in Chinese).
- [16] Wang J, Xu Y P, Li X Y, *et al.* Vitamin E requirement of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and its' effects on nonspecific immune responses[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(7): 1628-2637.
- [17] Liao M, Ren T, He L, *et al.* Optimum dietary protein level for growth and coelomic fluid non-specific immune enzymes of sea cucumber *Apostichopus japonicus* juvenile[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2014, 20(4): 443-450.
- [18] Seo J Y, Lee S M. Optimum dietary protein and lipid levels for growth of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2011, 17(2): e56-e61.
- [19] 王际英, 李宝山, 张德瑞, 等. 饲料中添加精氨酸对仿刺参幼参生长、免疫能力及消化酶活力的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(3): 410-419.
Wang J Y, Li B S, Zhang D R, *et al.* Effects of dietary arginine on growth performance, immune responses and digestive enzyme of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(3): 410-419 (in Chinese).
- [20] Warden R A, Strazzari M J, Dunkley P R, *et al.* Vitamin A-deficient rats have only mild changes in jejunal structure and function[J]. The Journal of Nutrition, 1996, 126(7): 1817-1826.
- [21] Chen L P, Huang C H. Estimation of dietary vitamin A requirement of juvenile soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2015, 21(4): 457-463.
- [22] Hu C J, Chen S M, Pan C H, *et al.* Effects of dietary vitamin A or β -carotene concentrations on growth of juven-

- ile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*[J]. *Aquaculture*, 2006, 253(1-4): 602-607.
- [23] 孙淑洁, 王宝维, 葛文华, 等. 维生素A对鹅生长性能及血清生化指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2012, 24(1): 78-84.
- Sun S J, Wang B W, Ge W H, *et al.* Vitamin A affects growth performance and serum biochemical parameters of geese[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(1): 78-84 (in Chinese).
- [24] 张璐, 李静, 谭芳芳, 等. 饲料中不同维生素A含量对花鲈生长和血清生化指标的影响[J]. *水产学报*, 2015, 39(1): 88-96.
- Zhang L, Li J, Tan F F, *et al.* Effects of different dietary vitamin A levels on growth and serum biochemical parameters for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(1): 88-96 (in Chinese).
- [25] 冯仁勇. 维生素 A 对幼建鲤消化能力和免疫功能的影响 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2006.
- Feng R Y. Effects of dietary vitamin A on digestive and immune function of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2006 (in Chinese).
- [26] 肖露, 崔婷, 李莹莹, 等. 孕期开始的持续维生素A缺乏加重LPS诱导的仔鼠肠上皮屏障功能障碍[J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(10): 837-843,849.
- Xiao L, Cui T, Li Y Y, *et al.* Sustainable vitamin A deficiency from the beginning of gestation aggravates intestinal barrier dysfunction in the offspring with LPS treatment[J]. *Immunological Journal*, 2017, 33(10): 837-843,849 (in Chinese).
- [27] 杨先乐. 鱼类免疫学研究的进展[J]. *水产学报*, 1989, 13(3): 271-284.
- Yang X L. Advance on fish immunology research[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1989, 13(3): 271-284 (in Chinese).
- [28] Erickson K L, McNeill C J, Gershwin M E, *et al.* Influence of dietary fat concentration and saturation on immune ontogeny in mice[J]. *Journal of Nutrition*, 1980, 110(8): 1555-1572.
- [29] 张永安, 聂品. 鱼类体液免疫因子研究进展[J]. *水产学报*, 2000, 24(4): 376-381.
- Zhang Y A, Nie P. Humoral immune factors of fish: a review[J]. *Journal of fisheries of China*, 2000, 24(4): 376-381 (in Chinese).
- [30] 索兰弟, 魏建民, 闫素梅. 日粮锌和维生素A水平及其交互作用对肉仔鸡血清碱性磷酸酶活性的影响[J]. *内蒙古畜牧科学*, 2002, 23(6): 1-3.
- Suo L D, Wei J M, Yan S M. Effects of dietary zinc and vitamin A levels and their interaction on the activity of serum alkaline phosphatase in broilers[J]. *Inner Mongolian Journal of Animal Sciences and Production*, 2002, 23(6): 1-3 (in Chinese).
- [31] Bannister J V, Bannister W H, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase[J]. *Critical Reviews in Biochemistry*, 1987, 22(2): 111-180.
- [32] Anggraeni M S, Owens L. The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 40(2): 85-92.
- [33] Rudnicki M, Silveira M M, Pereira T V, *et al.* Protective effects of *Passiflora alata* extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45(4): 656-661.
- [34] 刘梦梅, 陈娇娇, 朱文欢, 等. 维生素A对养成期草鱼生长性能以及骨骼中钙磷含量变化的影响[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(1): 101-107.
- Liu M M, Chen J J, Zhu W H, *et al.* Effects of dietary vitamin A on growth performance and calcium and phosphorus contents in bone of subadult grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(1): 101-107 (in Chinese).
- [35] Chen C, Zhu W, Wu F, *et al.* Quantifying the dietary potassium requirement of subadult grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2016, 22(3): 541-549.

Optimum dietary vitamin A requirement of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*

LI Baoshan, WANG Lili, WANG Jiying*, SUN Yongzhi, WANG Shixin, HUANG Bingshan

(Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China)

Abstract: Sea cucumber *Apostichopus japonicus* is one of most valuable marine cultured species in northeast China, and the cultured production reached 170 000 tons in 2020. With the rapid development of *A. japonicus* breeding industry, high efficiency and environmental protection formula diet has become one of bottleneck problem which inhibited the development of industry. Vitamin A (V_A), also called retinol, is the general name of monounsaturated alcohol or alcohol active substances, which is an extremely important and easily deficient fat soluble vitamin. V_A can maintain vision, promote cell differentiation and bone development, and participate in fish mucus secretion and fat metabolism. Meanwhile, it also can improve animal growth rate, reproductive performance and disease resistance of *Cyprinus carpio* var. Jian and *Scophthalmus maximus*, but long term excessive intake of V_A may result in bone deformities of *Sparus aurata*. So it is very important to determine the optimum dietary V_A in formulate diet. In order to investigate the effects of dietary V_A on growth performance, body composition, digestive metabolism and non-specific immunity for *A. japonicus* juveniles, an 8-week feeding experiment was conducted with *A. japonicus* juveniles. Six isonitrogen and isoenergetic diets with graded levels V_A [3 250(D1), 5 187(D2), 7 054(D3), 8 970(D4), 12 975(D5), 16 400(D6) IU/kg] were formulated by adding V_A acetate into basal diet. Each diet was assigned to triplicate tanks with 30 *A. japonicus* juveniles with initial body weight (15.48 ± 0.01) g. Results showed that there was no significant effect on survival rate, but both the weight gain rate and specific growth rate were significantly increased. With the increasing of dietary V_A levels, the contents of crude lipid and V_A of body wall were increased, and crude ash contents increased firstly and thereafter declined. The contents of hydroxyproline were decreased and D1 group was significantly higher than other groups. The activity of lipase was increased with the increasing of dietary V_A levels, and D1 group was significantly lower than other groups. The activity of amylase was increased first and then decreased afterwards. There were no differences in protease activities among all groups. With the increasing of dietary V_A levels, all of the activities of aspartate aminotransferase (AST), total superoxide dismutase (T-SOD) and catalase (CAT) were first elevated and then fell down, and the activities of AST and CAT reached the highest in D4 group. The activity of T-SOD of D3 and D4 groups were significantly higher than other groups. The activity of alkaline phosphatase showed an upward trend and D1 group was significantly lower than other groups. The contents of malondialdehyde were decreased. Taking the weight gain rate as the evaluation index, analysis by a linear regression equation indicated that the optimum dietary V_A requirement for *A. japonicus* (initial body weight 15.41g) was 10 000 IU/kg. The results of this experiment can provide a reference for the addition of V_A in the formula feed, and also provide a basis for the development of "micronutrient balance" formula feed of *A. japonicus*.

Key words: *Apostichopus japonicus*; vitamin A; growth; requirement

Corresponding author: WANG Jiying. E-mail: ytwjy@126.com

Funding projects: Shandong Modern Agriculture Industry Technology System- Sea Cucumber Industry Technology System (SDAIT-22-06)