

温度对刺参繁殖期消化酶和代谢酶活力的影响

茹小尚¹, 高天翔¹, 刘石林², 宋盛亮³, 杨红生²

(1. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院 海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 3. 山东东方海洋科技股份有限公司, 山东 烟台 264003)

摘要: 为探究刺参(*Apostichopus japonicus*)繁殖期消化、代谢生理特点, 作者以刺参亲参(240 g±15 g)为实验材料, 设置了 5 个温度水平(6、10、14、18、21℃), 研究了温度对刺参繁殖期内肠道消化酶和体壁肌肉代谢酶活力的影响。结果发现: 温度对亲参繁殖期消化酶、代谢酶活力受培育水温影响显著($P<0.05$)。其中, 胰蛋白酶与淀粉酶活力随水温升高呈先升高后降低的趋势, 在 10℃ 时活力最高且达到峰值; 脂肪酶活力随着养殖水温升高呈下降趋势, 在 6℃ 时活力最高。己糖激酶、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶活力随水温升高出现先增高后降低的趋势, 在 10℃ 时达到峰值; 而琥珀酸脱氢酶活力随温度升高呈下降趋势。研究表明, 10~14℃ 温度下, 亲参消化酶与代谢酶活力均处于较高水平, 是理想的亲参室内促熟温度参数。

关键词: 刺参(*Apostichopus japonicus*); 亲参; 温度; 消化酶; 代谢酶

中图分类号: S968.9

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2015)03-0001-06

doi: 10.11759/hyxx20141020001

刺参(*Apostichopus japonicus*)属棘皮动物门(Echinodermate), 是中国传统名贵海产品, 主要分布于黄海、渤海浅海沿岸的辽宁、大连、山东及江苏北部地区^[1]。在南北地区不同纬度海域, 因自然水温差别较大, 其性成熟时间也不尽相同, 南部海域刺参排放精卵的时间一般早于北部海域, 而水温的高低是影响其性腺发育的主要因素^[2, 3]。水温对水产动物繁殖期的生理影响主要体现在摄食、消化、代谢强度、内分泌等方面, 过高或过低的水温会导致鱼类、贝类、棘皮动物等出现摄食量降低、消化率下降、代谢异常、生殖激素分泌异常等生理现象^[4, 5], 从而使性腺发育表现出性腺指数低、性腺发育质量低、亲本怀卵量少等不利于繁殖的后果^[6]。此外, 水生动物性腺生长发育存在温度阈值, 当温度低于该物种的生物学零度时性腺无法发育^[7]。

消化酶与能量代谢酶做为反映刺参生理状态的重要指标, 能准确反映出刺参对饵料消化吸收的能力及自身新陈代谢的状态^[8, 9]。水温通过影响消化酶、代谢酶的活性进而影响刺参对饵料的消化吸收及自身代谢功能, 最终影响其生长^[10]、幼体发育^[11]、夏眠^[12]、性腺发育^[13]等生理状态。目前, 水温对刺参生理生态学的影响主要集中在耳状幼体、稚参及大规模苗种阶段, 而刺参在不同生活史阶段对最适

水温的要求差别很大^[2], 因此, 探讨标准化培育水温对刺参亲参繁殖期生理状态的影响需进一步研究。

本实验研究了培育水温与刺参亲参肠道消化酶、体壁肌肉代谢酶活力的关系, 探讨了不同培育水温条件下, 刺参亲参消化、代谢生理状态的差异, 以期对刺参升温性腺促熟技术的完善提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用刺参样品于 2013 年 11 月采自山东东方海洋科技股份有限公司乳山分公司, 选取 150 头体表无明显损伤、活动力强的刺参(240±15)g 作为实验材料随机分配暂养在 5 个体积为 6 m³的水泥池内。暂养期间, 24 h 连续充气, 每日换水 1/2 并吸出粪便与残余饵料, 每日 8: 00 与 17: 00 投喂配合饵料, 饲料成分配比为鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*) 海带(*Laminaria japonica*) 马尾藻(*Sargassum polycystum*) 螺旋藻(*Spirulina platensis*) 维生素混合

收稿日期: 2014-10-20; 修回日期: 2014-12-30

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划(2012AA10A412); 山东省农业良种工程课题-速生抗病耐高温刺参良种选育

作者简介: 茹小尚(1991-), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事刺参繁殖育种研究, E-mail: ruxiaoshang@163.com; 杨红生, 通信作者, 研究员, E-mail: hshyang@126.com

剂 酵母粉 海泥=1.5 1 1 0.1 0.01 0.04 10, 其中, 暂养海水盐度为 30.6, 溶解氧>7.74 mg/L, pH 为 8.36, 温度为 3℃, 光照强度为 20 lx, 暂养时间为 5 d。

1.2 实验设计

实验设置 6、10、14、18、21℃ 5 个梯度, 暂养结束后, 将暂养池内水温每天升高 0.5℃, 直至调整到实验设定水温, 并完成温度驯化。驯化期间, 将吐肠的刺参及时挑出。驯化结束后, 随机在每个驯化池内挑出 24 头刺参分别置于 20 个 360 L 的塑料水槽内, 每个水槽放置 6 头刺参, 每个实验处理设置 4 个平行, 实验进行 80 d。驯化期间及实验期间的管理模式与暂养期间相同。实验期间室内温度为 6、10、14、18、21℃, 水温由自动控温仪与加热棒控制, 温度波动在 0.5℃之内。

1.3 样品采集

为使刺参肠道内粪便排出且不会对实验动物造成饥饿胁迫, 根据预实验结果, 本实验采用禁食 48 h 后采集体壁及肠道样品。养殖实验结束后, 禁食 48 h, 随机在各水槽内取刺参 4 头, 用脱脂棉纱布轻轻吸干刺参体表的海水后, 将刺参置于冰盘, 并迅速从腹面剖开, 取出肠道、体壁肌肉并剪碎后, 每头刺参各取 0.2 g 待测样本放入 2 mL 冻存管内, 在液氮内暂放。采集全部样品完成后, 将样品放入-80℃超低温冰箱保存。

取 0.2 g 组织样品置于研磨器中, 加入 9 倍质量体积比的磷酸缓冲溶液(pH=7.0), 在冰浴条件下充分研磨 3 min 后, 将匀浆组织液在高速冷冻离心机中以 4℃冷冻离心 10 min(5000 r/min), 将 10%的上清粗酶提取液, 4℃暂存, 24 h 内完成检测。

1.4 样品蛋白质含量及酶活力测定

胰蛋白酶(Trypsin)、脂肪酶(LPS)、淀粉酶(AMS)、己糖激酶(HK)、丙酮酸激酶(PK)、乳酸脱氢酶(LDH)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)的活力测定及肌肉样品蛋白含量测定所用试剂均采自南京建成生物工程研究所, 并按照其说明书检测步骤进行测定。其中, 淀粉酶、胰蛋白酶、琥珀酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶活力单位为 U/mg 蛋白, 脂肪酶、己糖激酶、丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶活力单位为 U/g 蛋白。

1.5 数据统计

实验数据用 SPSS13.0 软件进行 ANOVA 方差分

析, $P<0.05$ 表示有显著性差异。同时利用 Duncan 来比较数据之间的差异性。所有数据均表示为平均值±标准误(Mean ± S.E.)。

2 结果

2.1 肠道消化酶

在实验过程中, 除 21℃温度组外, 其他各温度组未观察到刺参吐肠现象。由图 1~图 3 可知, 在 6~21℃水温范围内, 温度对刺参亲参主要消化酶中的胰蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活力具有显著影响($P<0.05$)。其中, 胰蛋白酶与淀粉酶活力呈现出先升高后减小的趋势, 并在 10℃达到最大值, 分别为 1431.04、3.48 U/mg 蛋白, 在 21℃出现最小值分别为 568.35、1.86 U/mg 蛋白; 而脂肪酶活力与养殖水温升高呈现负相关趋势, 最大值与最小值分别为 11.35、1.97 U/g 蛋白。此外, 胰蛋白酶与淀粉酶活力在水温为 6℃与 10℃, 18℃与 21℃间差异均不显著($P>0.05$)。在相同温度下, 刺参亲参肠道 3 种消化酶活力大小为胰蛋白酶>脂肪酶>淀粉酶。

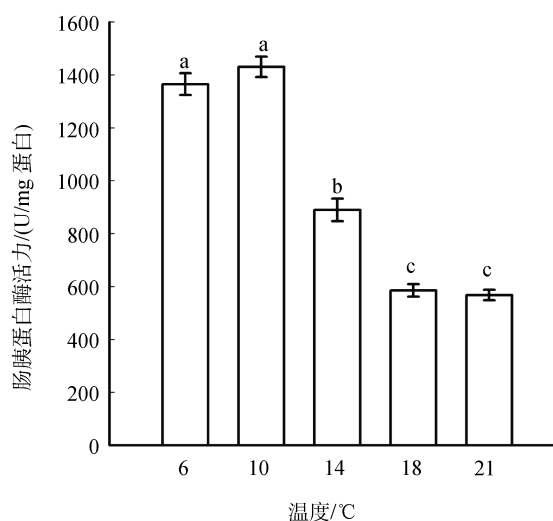


图 1 不同温度下刺参亲参肠道胰蛋白酶活力

Fig.1 The trypsin activity in intestines of sea Cucumber broodstock at different temperatures

图中标有不同字母表示不同温度下差异显著($P<0.05$)。下同
The different letters indicate significant differences among groups at different temperatures($P<0.05$). The same below

2.2 代谢酶

2.2.1 己糖激酶和丙酮酸激酶

不同养殖温度下刺参亲参 HK、PK 酶活见图 4、图 5。亲参 HK、PK 活力随水温升高出现先增大后

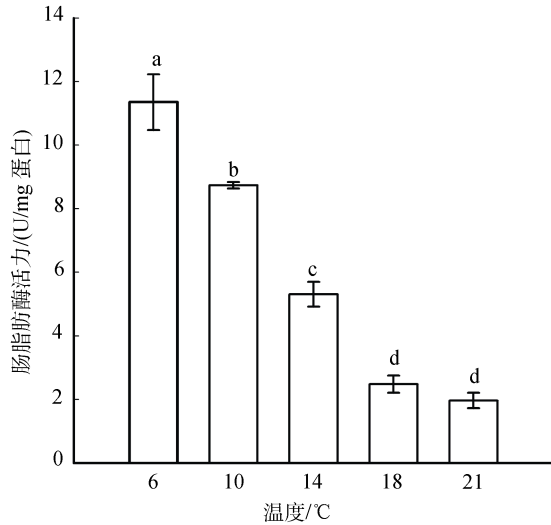


图 2 不同温度下刺参参肠道脂肪酶活力

Fig.2 The LPS activity in intestines of sea cucumber broodstock at different temperatures

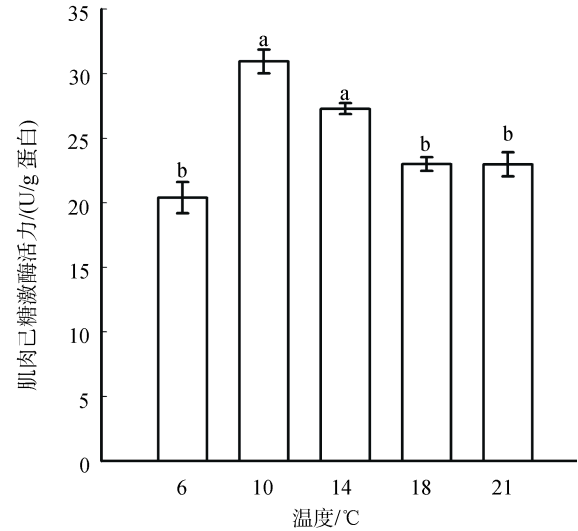


图 4 不同温度下刺参参体壁肌肉己糖激酶活力

Fig.4 The HK activity in muscle of sea cucumber broodstock at different temperatures

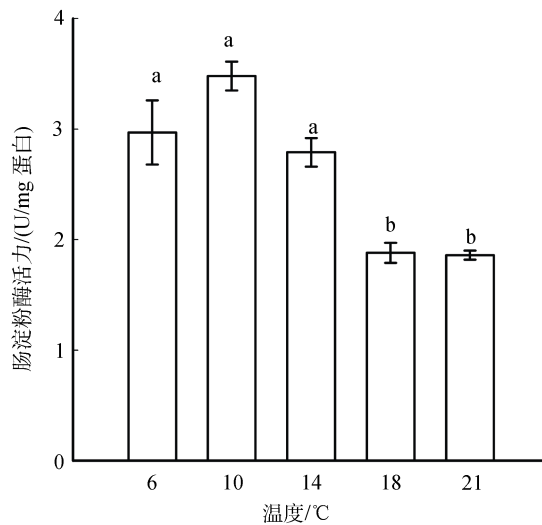


图 3 不同温度下刺参参肠道淀粉酶活力

Fig.3 The AMS activity in intestines of sea cucumber broodstock at different temperatures

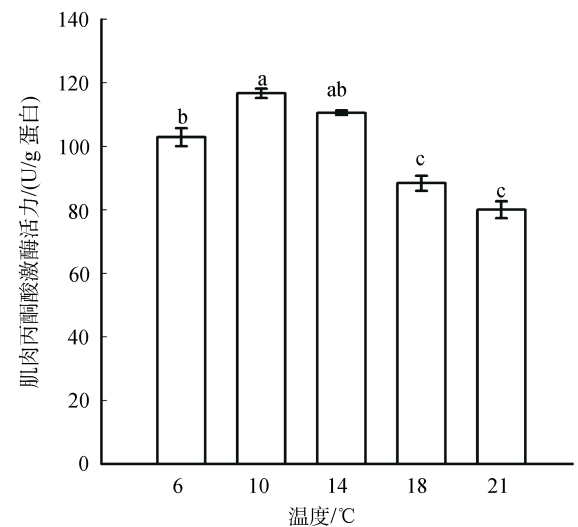


图 5 不同温度下刺参参体壁肌肉丙酮酸激酶活力

Fig.5 The PK activity in muscle of sea cucumber broodstock at different temperatures

降低的趋势，并在 10°C 出现最大值分别为 30.95、116.69 U/g 蛋白。HK 活性在 6°C 时最低为 20.4 U/g 蛋白，而 PK 活性在 21°C 时达到最低值为 80.05 U/g 蛋白。在养殖水温为 10~14°C 与 18~21°C，HK、PK 活力都差异不显著 ($P>0.05$)。

2.2.2 乳酸脱氢酶

根据图 6 可知，刺参体壁肌肉 LDH 活性在 6~21°C 水温间呈现先增大后降低的趋势，在 10°C 达到峰值，活力范围为 (141.32~250.74) U/g 蛋白。在 6~14°C，各温度处理组差异不显著 ($P>0.05$)，但都显著高于 18 与 21°C 组 ($P<0.05$)。

2.2.3 苹果酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶

由图 7 可见，亲参体壁肌肉 MDH 活性随培育水温升高出现先增大后降低的趋势，在 10°C 达到峰值为 29.94 U/mg 蛋白，在 21°C 时达到最低值为 13.28 U/g 蛋白，且在 6~14°C 范围内活力差异不显著 ($P>0.05$)。

由图 8 可见，在培育水温为 6~21°C，温度对亲参体壁肌肉 SDH 活力影响显著 ($P<0.05$)，SDH 活力随温度升高出现下降趋势，活力范围为 (4.04~6.99) U/mg 蛋白，在 18~21°C 范围内 SDH 活力差异不显著 ($P>0.05$)。

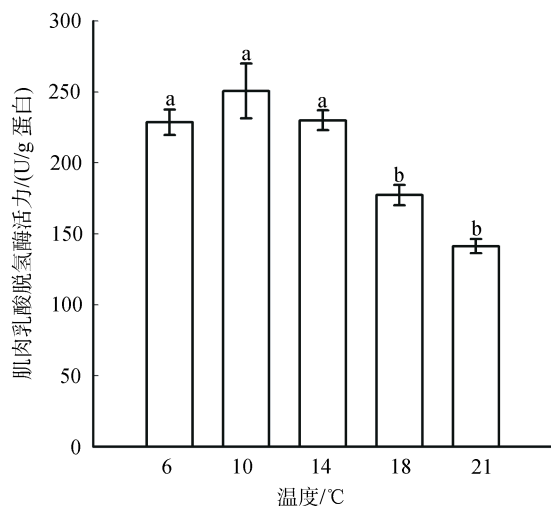


图6 不同温度下刺参亲参体壁肌肉乳酸脱氢酶活力

Fig.6 The LDH activity in muscle of sea cucumber broodstock at different temperatures

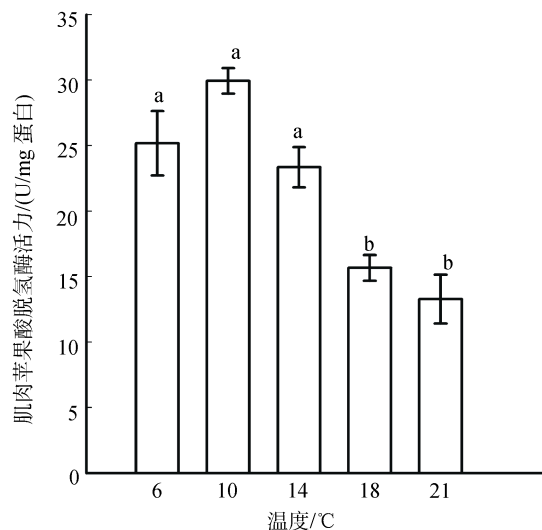


图7 不同温度下刺参亲参体壁肌肉苹果酸脱氢酶活力

Fig.7 The MDH activity in muscle of sea cucumber broodstock at different temperatures

3 讨论与结论

3.1 温度对刺参亲参消化酶活的影响

刺参肠道消化酶主要包括胰蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、纤维素酶、褐藻酸酶等^[8]。随着季节变化,刺参消化酶会出现显著的周年变化,而季节变化对消化酶的影响主要由水温波动造成的^[14]。赵永军等^[15]发现湿质量为 58 g 的刺参在 15.1 °C 时对有机沉积物的摄食与吸收能力最高,当水温超过 22.3 °C 后其摄食量与吸收能力极低,周玮等^[16]报道了湿质量为 40 g 的刺参消化酶活力在 16 °C 达到峰值,并在 16 ~ 22 °C

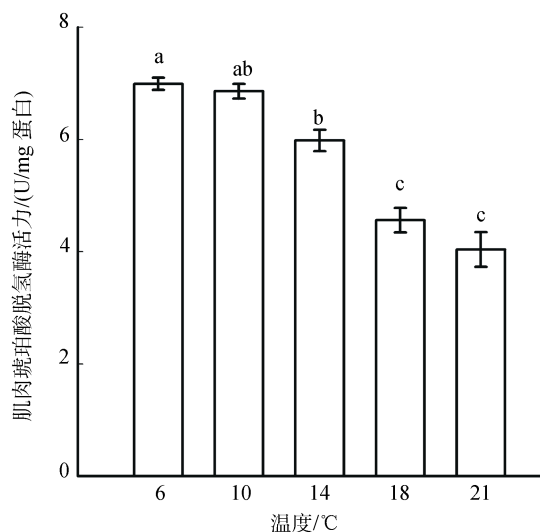


图8 不同温度下刺参亲参体壁肌肉琥珀酸脱氢酶活力

Fig.8 The SDH activity in muscle of sea cucumber broodstock at different temperatures

范围内逐渐下降。本实验研究结果表明,在 6 ~ 21 °C 范围内,水温对繁殖期刺参消化酶活力具有显著影响($P < 0.05$),总体上看,胰蛋白酶与淀粉酶活力呈现先上升后降低的趋势,并于 10 °C 达到峰值。原因可能是低温下刺参胰蛋白酶与淀粉酶催化反应速率低,在一定范围内随着温度上升酶催化反应速率加快,消化能力也逐渐增强^[17]。因大规模刺参具有在夏季高温期夏眠的生理特点,且温度是诱导刺参夏眠、肠道退化最重要的生态因子^[18]。当亲参培育水温高于 21 °C 时,刺参被高温诱导濒临进入夏眠状态,肠道消化机能出现退化,导致消化酶活力显著降低,进一步说明水温是诱导刺参夏眠的重要因子,即使在繁殖期,当温度过高时,刺参也会被诱导进入夏眠。

3.2 温度对刺参亲参代谢酶活的影响

动物体内能量代谢主要涉及糖酵解、三羧酸循环、氧化磷酸化等途径^[19]。机体保持葡萄糖水平动态平衡是通过糖酵解与糖异生这两个对立过程进行的,糖酵解途径为机体提供少量 ATP 及大量丙酮酸,丙酮酸进入三羧酸循环继续反应,产生 ATP、NADH、FADH₂, NADH 与 FADH₂ 经过氧化磷酸化过程产生大量 ATP 以供机体维持生理活动。其中,己糖激酶、丙酮酸激酶是糖酵解过程中的两种关键限速酶^[20, 21]。HK、PK 活性越高说明糖酵解过程进行旺盛,糖异生过程被抑制。乳酸脱氢酶是一种结合蛋白,可将丙酮酸催化成乳酸并释放 ATP,从而完成葡萄糖的酵解过程^[19, 22]。位于线粒体基质中苹果酸脱

氢酶与位于线粒体膜内的琥珀酸脱氢酶是线粒体的重要组成部分, MDH、SDH 作为三羧酸循环过程中重要的辅酶, 可用来反映能量代谢的强弱^[19, 23]。

李宝泉等^[24]发现湿质量为 149.9 g 的刺参在 10~20℃ 内的呼吸与排泄率随温度升高呈增大趋势, 但水温高于 20℃ 后呈下降趋势。本实验研究结果表明, 在 6~10℃ 低温条件下, 刺参亲参体壁肌肉中 HK、PK、SDH、LDH、MDH 活力处于较高水平, 利于 ATP 的生成, 说明糖酵解、三羧酸循环、氧化磷酸化等能量代谢途径速率在该温度范围内呈上升趋势。在 10~14℃ 范围内, 5 种代谢酶活力与 10℃ 时峰值相比较均出现下降, 但在 14℃ 组 5 种代谢酶活力与峰值差异不明显, 说明该温度范围内刺参体内有氧呼吸与无氧呼吸也可以维持在高水平, 刺参处于正常的生理状态。在 18~21℃ 高温条件下, 5 种代谢酶均处于低水平, 原因是刺参被高温诱导即将进入夏眠, 机体代谢能力下降, 代谢酶活力也出现降低的趋势。

隋锡林等^[25]、陈伟等^[26]报道了刺参亲参室内升温促熟的温度范围一般为 8~17℃, 但水温低于 10℃ 时性腺发育速度较慢。赵永军等^[15]等发现温度高于 15.1℃ 时, 体质量超过 58 g 的刺参摄食率与饵料吸收利用率明显降低。此外, 当水温为 21℃ 时, 刺参肠道消化酶、代谢酶活力极低, 刺参机体因水温过高被诱导临近夏眠状态, 不利于性腺发育。综合性腺发育及消化代谢生理角度, 在 10~14℃ 内, 刺参亲参消化酶、代谢酶活力都处于较高水平且性腺发育速度较快, 是亲参性腺促熟的适宜温度。

参考文献:

- [1] 廖玉麟. 中国动物志—海参纲[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 148-150.
- [2] 董云伟, 董双林. 刺参对温度适应的生理生态学研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(5): 908-912.
- [3] Gaudron S M, Kohler S A, Conand C. Reproduction of the sea cucumber *Holothuria leucospilota* in the Western Indian Ocean: biological and ecological aspects[J]. Invertebrate Reproduction & Development, 2008, 51(1): 19-31.
- [4] Christiansen J S, Siikavuopio S I. The relationship between feed intake and gonad growth of single and stocked green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) in a raceway culture[J]. Aquaculture, 2007, 262(1): 163-167.
- [5] King H R, Pankhurst N W. Effect of maintenance at elevated temperatures on ovulation and luteinizing hormone releasing hormone analogue responsiveness of female Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Tasmania[J]. Aquaculture, 2004, 233(1): 583-597.
- [6] Brown N P, Shields R J, Bromage N R. The influence of water temperature on spawning patterns and egg quality in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)(J). Aquaculture, 2006, 261(3): 993-1002.
- [7] 梁峻, 闫喜武, 李霞, 等. 菲律宾蛤仔性腺发育生物学零度的研究[J]. 海洋科学, 2007, 31(9): 67-72.
- [8] 王羽, 孙永欣, 汪婷婷, 等. 海参消化酶的研究进展[J]. 中国饲料, 2008, 13: 38-41.
- [9] Wang F, Yang H, Gao F, et al. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2008, 151(4): 491-498.
- [10] An Z, Dong Y, Dong S. Temperature effects on growth-ration relationships of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka)[J]. Aquaculture, 2007, 272(1): 644-648.
- [11] Kashenko S D. Effects of temperature and salinity on the early development of the Japanese sea cucumber (Trepang) *Stichopus japonicus*[J]. Russian Journal of Marine Biology, 1998, 24(2): 100-105.
- [12] Yang H, Yuan X, Zhou Y, et al. Effects of body size and water temperature on food consumption and growth in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) with special reference to aestivation[J]. Aquaculture Research, 2005, 36(11): 1085-1092.
- [13] 隋锡林, 陈远, 胡庆明, 等. 亲参人工升温促熟培育研究初报[J]. 水产科学, 2005, 3: 28-31.
- [14] 王吉桥, 唐黎, 许重, 等. 仿刺参消化道的组织学及其 4 种消化酶活力的周年变化[J]. 水产科学, 2007, 26(9): 481-484.
- [15] 赵永军, 张慧. 不同温度下刺参对有机沉积物的摄食与吸收[J]. 水产科学, 2004, 23(7): 1-4.
- [16] 周玮, 田甲申, 黄俊鹏, 等. 不同生长阶段仿刺参肠道内含物及消化酶活性的变化[J]. 大连水产学院学

- 报, 2010, 25(5): 460-464.
- [17] 姜令绪, 杨宁, 李建, 等. 温度和 pH 对刺参 (*Apostichopus japonicus*) 消化酶活力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(5): 476-480.
- [18] Gao F, Yang H, Xu Q, et al. Effect of water temperature on digestive enzyme activity and gut mass in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), with special reference to aestivation[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2009, 27: 714-722.
- [19] 郑集, 陈钧辉. 普通生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 349-353.
- [20] Hemer G I, Mommsen T P, Krogdahl Å. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes[J]. Aquaculture Nutrition, 2002, 8(3): 175-194.
- [21] Metón I, Fernández F, Baanante I V. Short-and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis–gluconeogenesis in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. Aquaculture, 2003, 225(1): 99-107.
- [22] 李太武, 苏秀榕. 中国对虾和日本对 6 种同工酶的比较研究[J]. 海洋学报, 1997, 19(2): 85-88.
- [23] 刘桂琴. 兔子和小鼠不同组织苹果酸脱氢酶活性的研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2006, 38(5): 44-47.
- [24] 李宝泉, 张春晓. 温度和体重对刺参呼吸和排泄的影响[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(2): 182-187.
- [25] 隋锡林, 刘永襄, 刘永峰, 等. 刺参生殖周期的研究[J]. 水产学报, 2005, 9(4): 303-310.
- [26] 陈伟, 王文豪, 于文松. 刺参室内越冬促熟技术[J]. 科学养鱼, 2012, 11: 43-44.

Effects of temperature on digestive and metabolic enzymes activities of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) broodstock

RU Xiao-shang¹, GAO Tian-xiang¹, LIU Shi-lin², SONG Sheng-liang³, YANG Hong-sheng²

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences Qingdao 266071, China; 3. Shandong Oriental Ocean Sci-Tech Co., Ltd, Yantai 264003, China)

Received: Oct., 20, 2014

Key words: sea cucumber; broodstock; temperature; digestive enzymes; metabolic enzymes

Abstract: To investigate the digestive and metabolic performance of adult sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) during breeding season, the activities of digestive and metabolic enzymes including trypsin, lipase, amylase, hexokinase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase and malate dehydrogenase of sea cucumber broodstock cultured at different water temperatures (6, 10, 14, 18 and 21°C) were detected. The results indicated that digestive and metabolic enzymes activities were affected by water temperature significantly ($P < 0.05$). The activities of trypsin, amylase, hexokinase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase increased when the water temperature increased from 6 to 10°C, then decreased when the water temperature increased from 14 to 20°C, and the highest activities were observed at 10°C. While the activities of lipase and succinate dehydrogenase decreased as water temperature rose. Based on results of this study, the optimal temperature range for gonad development of sea cucumber is from 10 to 14°C.

(本文编辑: 谭雪静)