

# 水温对刺参消化酶和免疫酶活力的影响

杨 宁, 王文琪, 姜令绪, 张 晋, 刘建康

(青岛农业大学 海洋科学与工程学院, 山东 青岛 266109)

**摘要:** 为研究水温对刺参(*Apostichopus japonicus*)消化酶及免疫酶活力的影响, 本实验将体质量为 8.0 g 左右的刺参分别于 10、14、18、22℃下养殖 4 周后, 对其消化道中蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和脂肪酶活力, 以及体腔液中溶菌酶和超氧化物歧化酶活力进行测定。研究结果显示, 刺参消化道中蛋白酶含量最高, 其酶活在 10℃下最高, 但随着温度的升高活力逐渐下降, 在水温升至 18℃以后酶活显著下降; 淀粉酶活力在水温升至的 18℃时无明显变化, 但至 22℃时活力显著下降; 纤维素酶和脂肪酶活力较小, 不同温度下其活力无显著差异。水温对刺参体腔液溶菌酶活性影响显著, 在水温为 18℃时达到最高值, 升至 22℃时其活力显著降低; 超氧化物歧化酶活性在水温为 18℃达到最低, 但水温升至 22℃其酶活与 18℃相比又显著升高。

**关键词:** 水温; 刺参(*Apostichopus japonicus*); 消化酶; 免疫酶

中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)11-0056-04

doi: 10.11759/hyxx20140310003

刺参(*Apostichopus japonicus*)属于棘皮动物门(Echinodermata), 海参纲(Holothroidea), 有较高的营养和药用价值, 已成为我国北方地区重要的海水养殖品种<sup>[1-2]</sup>。为保障刺参养殖业的健康可持续发展, 国内外学者对刺参的育苗及养殖条件、营养学、免疫学特征等进行了大量的研究<sup>[3-7]</sup>。

水温是刺参生长重要的环境因子, 现有研究表明, 刺参对温度的适应具有特殊性和复杂性, 为适应温度胁迫, 刺参在进化过程中形成了夏眠机制, 温度过高或过低抑制刺参的生长, 并导致其发病率增加<sup>[4,8-10]</sup>。作者研究了不同养殖温度对刺参消化酶活力及免疫酶活力的影响, 以期对刺参养殖业的发展提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及其蓄养

试验用刺参于 2013 年 4 月购自田横岛养殖厂, 刺参体质量约(8.0±0.23)g, 放入容积为 100 L 的水箱中进行蓄养, 同时充气控温。实验设置 10、14、18、22℃ 4 个温度梯度, 每个温度 3 个平行, 每个平行饲养刺参 10 只。水箱水温每天提升 2℃, 达到试验温度后, 使刺参适应 5 d 后投饵饲养, 实验周期为 30 d。每天 8:00、18:00 吸底后过量投喂饵料, 投喂量约为刺参体质量的 1%, 海水的 pH 为 8.0±0.1, 盐

度约为 30, 光照为自然光。

### 1.2 样品处理

#### 1.2.1 消化道粗酶液制备

剖开刺参腹部, 取出消化道, 剔除呼吸树和肠系膜上的脂肪组织, 用预冷的磷酸盐缓冲液(pH7.5)冲洗干净, -20℃下保存备用。实验时, 取 10 条肠, 按肠质量的 10 倍加入预冷的磷酸盐缓冲液, 0℃下匀浆, 将匀浆液于 4℃, 10 000 r/min 下离心 30 min, 所得上清液即为粗酶液。酶液于 4℃保存备用, 24 h 内测定完毕<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.2 刺参体腔液的制备

刺参取出后, 于腹部切口, 用 1 mL 无菌注射器收集体腔液, 3 000 r/min 离心 5 min(4℃), 取上清液于 4℃保存备用, 24 h 内测定完毕。

### 1.3 样品测定

#### 1.3.1 消化酶的测定

蛋白酶活力测定采用酪蛋白为底物的福林-酚法<sup>[12-13]</sup>, 在 40℃下, 每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸定义为一个酶活力单位<sup>[13]</sup>。

收稿日期: 2014-02-11; 修回日期: 2014-05-08

基金项目: 山东省“两区”建设专项; 山东省现代农业产业技术体系虾蟹类创新团队项目(SDAIT-15-011-06)

作者简介: 杨宁(1977-), 女, 山东青岛人, 讲师, 主要从事水产动物病理免疫研究; 王文琪, 通信作者, 教授, E-mail: wenqi31@163.com

淀粉酶活力测定采用以可溶性淀粉为底物的 3,5-二硝基水杨酸显色法<sup>[12,14]</sup>, 在 40℃ 下, 每分钟催化淀粉产生 1 mg 麦芽糖定义为一个酶活力单位<sup>[14]</sup>。

纤维素酶活力测定采用以羧甲基纤维素钠为底物的 3,5-二硝基水杨酸显色法<sup>[12-14]</sup>, 在 40℃ 下, 每分钟催化纤维素产生 1 mg 葡萄糖定义为一个酶活力单位<sup>[14]</sup>。

脂肪酶活力测定采用聚乙烯醇橄榄油乳化液水解法<sup>[12,14]</sup>, 在 40℃ 下, 每分钟催化产生 1 μmol 分子脂肪酸定义为一个酶活力单位<sup>[14]</sup>。

各种酶活力以比活力表示, 即每毫克可溶性蛋白质所含酶活力单位数(U/mg)。蛋白质浓度测定用考马斯亮蓝 G-250 法测定。

### 1.3.2 免疫酶的测定

溶菌酶以溶壁微球菌冻干粉为底物, 参照 Hultmark 等<sup>[15]</sup>的方法改良测定。溶菌酶活力=(起始吸光度值-反应后吸光度值)/反应后吸光度值。

超氧化物歧化酶测定采用邻苯三酚自氧化法, 超氧化物歧化酶活性(U)定义为每毫升反应液自氧化速率抑制 50%的酶量<sup>[16]</sup>。

## 1.4 数据分析

所有数据使用 SPSS18.0 软件进行单因素方差分析, 并进行 duncan 多重比较,  $P < 0.05$ , 差异显著。

## 2 实验结果

### 2.1 水温对消化酶的影响

研究结果显示, 刺参消化道中蛋白酶含量较高, 淀粉酶次之, 纤维素酶和脂肪酶较低。不同的养殖温度下, 4 种酶活力不同。蛋白酶活力 10℃ 下最高, 随着温度的升高蛋白酶活力下降, 到 18℃ 时与 10、14℃ 差异显著(图 1)。

淀粉酶活力受水温的影响较小, 随着温度的升高, 淀粉酶活力上升, 至 18℃ 下淀粉酶活力最大, 但差异不显著; 22℃ 活力下降, 并与其他温度组差异显著(图 1)。

纤维素酶和脂肪酶活力较小, 水温对其影响较小, 差异不显著(图 1)。

### 2.2 水温对溶菌酶和超氧化物歧化酶活性的影响

研究结果显示, 水温对刺参体腔液溶菌酶活性影响显著。随着温度的上升, 溶菌酶活力上升, 到 18℃ 达到最大, 并且与 10℃ 和 14℃ 两个组差异显著

( $P < 0.05$ ); 22℃ 溶菌酶活性较 18℃ 显著降低( $P < 0.05$ , 图 2)。

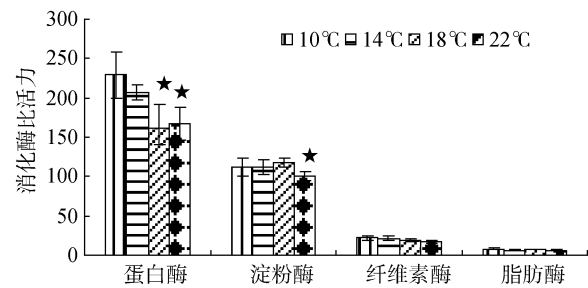


图 1 水温对刺参消化酶活力的影响

Fig.1 Effects of water temperature on activities of digestive enzymes in *Apostichopus japonicus*

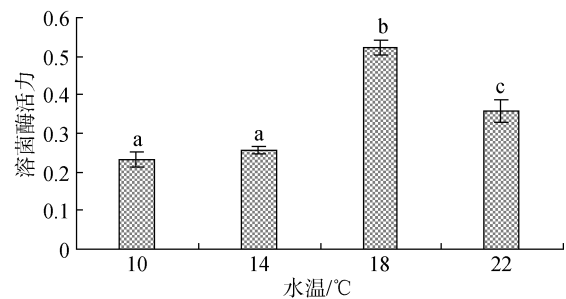


图 2 水温对刺参体腔液溶菌酶活力的影响

Fig.2 Effects of water temperature on activities of lysozyme in *Apostichopus japonicas*

刺参体腔液超氧化物歧化酶活性随水温的变化与溶菌酶不同。随着温度的升高, 活性逐渐降低, 到 18℃ 达到最低, 后随着水温的升高又升高, 至 22℃ 时与 18℃ 差异显著( $P < 0.05$ , 图 3)。

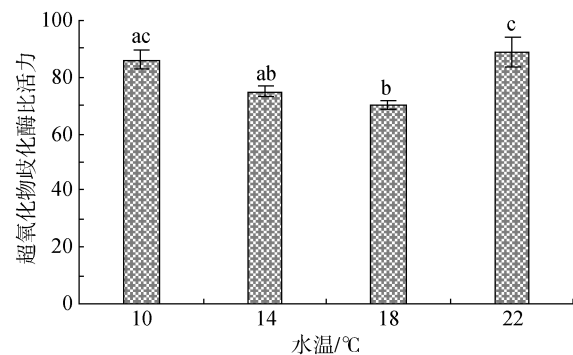


图 3 水温对刺参体腔液超氧化物歧化酶活力的影响

Fig.3 Effects of water temperature on activities of superoxide dismutase (SOD) in *Apostichopus japonicas*

## 3 讨论

水温是刺参生长的重要限制性因子, 温度过高或过低都会影响刺参的生长, 导致刺参休眠甚至死

亡。本研究显示,水温对刺参消化酶活力也有明显的影响。当水温达到 18℃时,蛋白酶活力显著下降;水温达到 22℃时,淀粉酶活力显著下降;而纤维素酶与脂肪酶活力较低,受水温变化影响不明显。这与王吉桥等<sup>[17]</sup>对大连黑石礁海区刺参消化酶的周年变化研究结果基本一致。另外,消化酶活力的大小,直接影响着刺参的消化吸收功能,从而影响刺参生长。现有研究表明,刺参适宜的生长温度为 10~20℃,5~15 cm 刺参生长最适温度为 10~15℃<sup>[5,18]</sup>,这一结果与本研究得出的消化酶活力较高的温度结果基本一致。

刺参属于无脊椎动物,缺少脊椎动物所具有的获得性免疫,因此,非特异性免疫在海参的免疫防御中具有较为重要的作用。溶菌酶和超氧化物歧化酶是非特异性免疫的重要组成部分。

目前未见养殖温度对溶菌酶活力影响的报道,但是,现有研究资料表明,刺参适应生长温度为 10~20℃,温度过高或过低均会抑制刺参生长,并导致发病率增加<sup>[3,10]</sup>。本研究结果显示,溶菌酶随着温度的升高而升高,到 18℃达到最大,22℃时溶菌酶活性显著降低,这可能与刺参的生长状态具有相关性。在 10℃时,水温较低,刺参生长较好,环境中致病因子也相对活力较低,随着温度的升高,环境中致病因子相对活力增高,溶菌酶活力高,保证了刺参生长良好;当温度达到 22℃时,溶菌酶活力下降,相应的刺参生长活力受抑制。这也解释了温度过高,刺参发病率增加的原因。

超氧化物歧化酶活性和机体的抗氧化能力密切相关<sup>[19]</sup>,它能催化过氧阴离子发生歧化生成过氧化氢和氧,是清除体内自由基的首要物质,是衡量机体健康状况的重要指标。超氧化物歧化酶活力的大小与氧消耗率相关。一般认为,随着温度的增高,组织耗氧率增加,活性氧类物质生成增加,抗氧化酶活力增加<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,超氧化物歧化酶活力随着温度的升高至 18℃稍有下降后上升,至 22℃增加至 10℃水平,这与大多数关于水温对水产动物抗氧化防御系统影响的研究结果不一致<sup>[20]</sup>,但与王海贞等<sup>[21]</sup>的研究结果类似。王海贞等研究温度对吉富罗非鱼消化道抗氧化酶活力的影响显示罗非鱼幼鱼肠道 SOD 活力随着温度的升高呈先下降后上升的趋势,且在最接近罗非鱼最适生存温度时 SOD 活力最小,认为水温越接近最适生长温度,氧化应激越不明显,机体内 SOD 活力就越低。因此,本实验的研究结果也可能与 14~18℃基本位于刺参最适生长

温度有关。具体温度对超氧化物歧化酶活力的影响还需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 廖玉麟.我国的海参[J].生物学通报,2001,35(9):1-3.
- [2] 袁秀堂,杨红生,周毅,等.盐度对刺参(*Apostichopus japonicus*)呼吸和排泄的影响[J].海洋与湖沼,2006,37(4):348-354.
- [3] 于东祥,宋本祥.池塘养殖刺参幼参的成活率变化和生长特点[J].中国水产科学,1999,6(3):109-110.
- [4] 李宝泉,杨红生,张涛,等.温度和体质量对刺参呼吸和排泄的影响[J].海洋与湖沼,2002,33(2):182-187.
- [5] Yang H S, Yuan X T, 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, 36:1085-1092.
- [6] 张春云,王印庚,荣小军.养殖刺参腐皮综合症病原菌的分离与鉴定[J].水产学报,2006,30(1):118-123.
- [7] 李华,陈静,陆佳,等.仿刺参体腔细胞和血细胞类型及体腔细胞数量研究[J].水生生物学报,2009,33(2):207-213.
- [8] 董云伟,董双林,田相利,等.不同水温对刺参幼参生长、呼吸及体组成的影响[J].中国水产科学,2005,12(1):33-37.
- [9] Dong Y W, Dong S L, Tian X L, et al. Effects of diel temperature fluctuation on growth, oxygen consumption and proximate body composition in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. Aquaculture, 2006, 255:514-521.
- [10] 于明志,常亚青.低温对不同群体仿刺参幼参某些生理现象的影响[J].大连水产学院院报,2008,23(1):31-36.
- [11] 姜令绪,杨宁,李建,等.温度和 pH 对刺参(*Stichopus japonicus*)消化酶活力的影响[J].海洋与湖沼,2007,38(5):476-480.
- [12] 潘鲁青,王克行.中国对虾幼体消化酶活力的实验研究[J].水产学报,1997,21(1):26-31.
- [13] 史峰.生物化学实验[M].杭州:浙江大学出版社,2002:11-113.
- [14] 赵亚华.生物化学实验技术教程[M].广州:华南理

- 工大学出版社, 2000: 144-159.
- [15] Hultmark D, Steiner H, Rasmusn T, et al. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *HyaloPhera cecropia*[J]. Eur J Biochem, 1980, 106: 7-16.
- [16] 王晓杰, 张秀梅, 李文涛. 盐度胁迫对许氏平鲉血液免疫酶活力的影响[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 17-21
- [17] 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.
- [18] 常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参海胆生物学研究与养殖[M]. 北京: 海洋出版社, 2004 .
- [19] Parihar M S, Tarangini J, Taruna H, et al. Response of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* to short-term elevated temperature[J]. Thern Biol, 1997, 22(2): 151-156.
- [20] 李大鹏, 刘松岩, 谢从新, 等. 水温对中华鲟血清活性氧含量及抗氧化防御系统的影响[J]. 水生生物学报, 2008, 32(3): 327-332.
- [21] 王海贞, 王辉, 李瑞伟, 等. 温度和盐度对吉富罗非鱼幼鱼肠道两种抗氧化酶活力的联合效应[J]. 广东海洋大学学报, 2012, 32(1): 47-53.

## Effects of water temperature on activities of digestive enzymes and immune enzymes in *Apostichopus japonicus*

YANG Ning, WANG Wen-qi, JIANG Ling-xu, ZHANG Jin, LIU Jiang-kang  
(Qingdao Agricultural University, College of Marine Science and Engineering, Qingdao 266109, China)

**Received:** Feb., 11, 2014

**Key words:** water temperature; *Apostichopus japonicus*; digestive enzyme; immune enzyme

**Abstract:** To investigate the effects of temperatures on the digestive enzymes and immune enzymes activities, several groups of sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) (approximately 8.0 g) were reared under different constant temperatures ranged from 10~22°C for four weeks. Then, the activities of protease, amylase, cellulase and lipase in the digestive tract and the lysozyme and superoxide dismutase (SOD) in coelomic fluid were determined. The results showed that the protease was the most abundant enzyme in the digestive tract. The protease activity was highest when the sea cucumbers were reared in 10°C, but it was significantly inhibited when the temperature was raised to 18°C ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in amylase activity between sea cucumbers groups reared in temperature below 18 . However, the amylase activity was significant reduced in the sea cucumber group when temperature was increased to 22°C ( $P<0.05$ ). The levels of cellulose and lipase activities were extremely low in all experimental groups. Moreover, it was found that the lysozyme activity was the highest when the sea cucumbers were reared in 18°C ( $P<0.05$ ), but it was significantly decreased at 22°C ( $P<0.05$ ). However, activity of SOD exhibited a different trend in sea cucumber groups. The SOD activity was gradually reduced as the temperature rose, but it was significantly increased when temperature rose up to 22°C ( $P<0.05$ ).

(本文编辑: 梁德海)