

文章编号: 1674 - 5566(2010)06 - 0768 - 04

## 仿刺参4种消化酶活力的周年变化

唐黎<sup>1</sup>, 王吉桥<sup>2</sup>, 许重<sup>2</sup>, 程骏驰<sup>2</sup>, 王年斌<sup>3</sup>

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025;

2. 大连水产学院生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023;

3. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省应用海洋生物技术开放性实验室, 辽宁 大连 16023)

**摘要:** 2004年11月至2005年10月每月中旬, 在大连黑石礁海区采捕体长(21.8±2.3) cm(麻醉状态下), 体质量(165.3±3.1) g的仿刺参(*Apostichopus japonicus*), 测定消化道中蛋白酶、淀粉酶、褐藻酸酶和纤维素酶活力的周年变化。结果表明, 1-5月间, 消化管的最大长度可达体长的4.6~5.9倍, 2月达全年的最大值; 蛋白酶、淀粉酶和褐藻酸酶的活力随水温的升高而增加, 4-5月达最大值; 之后, 消化管长/体长比逐渐下降, 8-10月上旬, 消化管长仅为体长的0.8~1.1倍, 酶活力逐渐下降; 10月中下旬, 随着水温的下降, 消化管长/体长比又快速增大, 酶活力也逐渐回升。全年中, 纤维素酶的活力一直很低, 周年变化不明显。

**关键词:** 仿刺参; 消化酶; 周年变化

中图分类号: S 917 文献标识码: A

## Changes of four digestive enzymes in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

TANG Li<sup>1</sup>, WANG Ji-qiao<sup>2</sup>, XU Chong<sup>2</sup>, CHENG Jun-chi<sup>2</sup>, WANG Nian-bin<sup>3</sup>

(1. School of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. School of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China;

3. Liaoning Marine Fisheries Research Institute, Liaoning Open Laboratory of Applied Marine Biology, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Changes of protease, amylase, algalase and cellulase activities in alimentary canal were analyzed in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) weighing 165.3±3.1 g collected monthly along Dalian coast from November 2004 to October 2005. The results showed that the ratio of digestive tract length to body length (RDTLTBL) was 4.6 - 5.9 from January to May, with the peak in February in the sea cucumbers. Meanwhile, the activities of protease, amylase, and algalase increased with water temperature rising, the maximum value in April and May. Afterwards, there was decrease in the (RDTLTBL) as water temperature rose, 0.8 - 1.1 from August to early October. In the same period, the activities of protease, amylase, and algalase decreased gradually. While the water temperature decreased in middle and later October, the (RDTLTBL) and the activities of protease, amylase, and algalase increased rapidly. There was low and constant cellulase activity all of the year.

**Key words:** sea cucumber (*Apostichopus japonicus*); digestive enzymes; annual changes

收稿日期: 2010-03-30

基金项目: 辽宁省自然科学基金(20022109)

作者简介: 唐黎(1981-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事水产动物营养与饲料及水产动物生理生化方面的研究。E-mail: tang\_xiao\_xia@163.com

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)的医疗保健作用得到了越来越广泛的认同,需求量急剧增长,价格不断增加,引发了海参的过度捕捞和资源短缺,刺激了养殖业的蓬勃发展。了解仿刺参消化生理特性及规律是大规模养殖和科学饲养、管理的关键之一。每年当水温至 18~24℃时,仿刺参即“夏眠”<sup>[1]</sup>,摄食和消化发生很大变化。了解仿刺参消化酶的周年变化,是配制人工饲料、科学饲养管理的理论基础。国内外有关水产动物消化酶的研究很多<sup>[2-4]</sup>,温度、pH 值和  $Hg^{2+}$  等 9 种金属离子对仿刺参消化道中蛋白酶活性的影响也有研究<sup>[5]</sup>,但仿刺参消化酶活性的周年变化的研究尚未见报道。

本研究测定了成体仿刺参消化道中蛋白酶、淀粉酶、褐藻酸酶和纤维素酶活性的周年变化,旨在为合理搭配成体仿刺参饲料,科学饲养和管理提供理论依据,丰富仿刺参消化生理的研究内容。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验用成参于 2004 年 11 月至 2005 年 10 月采自大连黑石礁海区自然生长个体,体长( $21.8 \pm 2.3$ ) cm(麻醉状态下),体质量( $165.3 \pm 3.1$ ) g。每月中旬取 10~15 头,测定消化酶活力,共取了 12 批,暂养在大连水产学院农业部海水养殖和生物技术重点开放实验室,暂养用水为沙滤海水,每天换水 4/5,盐度为 30~32。

### 1.2 样品制备

将暂养的健康成参停食 72 h,使其排空消化道内的食物残渣,分别称重测体长(麻醉状态下),于冰盘中注射 0.35 mol/L KCl 溶液,诱导排脏,获得消化道,剔除与消化道末端相连的呼吸树,用冰冻重蒸水配置的 pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液( $Na_2HPO_4-NaH_2PO_4$ )冲洗后,称肠重,测肠长,置于冰箱中暂存备用。

样品在冰浴中用玻璃研磨器匀浆,每克样品研磨 10~15 min,按 1 g 样品 10 mL 缓冲溶液的比例分次加入 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液。然后将匀浆液在高速冷冻离心机中以 4℃冷冻离心 30 min(5 000 r/min),其上清液即为粗酶提液,4℃保存。此粗酶提液在 24 h 内分析完毕。

## 1.3 活力测定

### 1.3.1 蛋白酶

依福林-酚试剂法<sup>[6]</sup>,略加修改。具体操作方法是:向试管中加入 0.5% 的酪蛋白溶液 2.0 mL 和 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液 4.0 mL,在 40℃下保温 5 min,然后加入粗酶提液 1.0 mL,保温 20 min,立即加入 10% 三氯醋酸 2.0 mL 终止反应。取出常温离心(3 000 r/min) 10 min 后的上清滤液 1 mL,加入 0.4 mol/L 的碳酸钠溶液 5.0 mL,再加入 1.0 mol/L 的福林试剂 1.0 mL,于 40℃恒温水浴中显色 20 min,然后在 680 nm 波长下比色测定,以蒸馏水校零作为参照,对照管在加入粗酶提液前先加入 2.0 mL 10% 的三氯醋酸使酶失活,其他同测定管。

蛋白酶活力单位定义:在 pH 7.2 和 40℃<sup>[5]</sup>下保温 20 min,1 g 仿刺参消化道 1 min 水解 0.5% 的酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸即为 1 个蛋白酶活力单位。

### 1.3.2 淀粉酶

淀粉酶活力测定方法参照淀粉-碘显色法<sup>[6]</sup>,略加修改。具体操作方法是:向试管中加入 0.04% 可溶性淀粉 5 mL,于 40℃水浴中预热 5 min,加入粗酶提液 1.0 mL,充分混匀后,40℃水浴反应 8 min,再加入 0.01 mol/L 碘应用液 5.0 mL 终止酶反应,然后用重蒸水稀释到 50 mL,立即充分混匀,660 nm 处比色,以重蒸水校正光密度 0 点,读取光密度值。空白管中不加酶液,其他同试验管。

淀粉酶活力单位定义:在 40℃,30 min 内,100 mL 酶液中的淀粉酶完全水解淀粉 10 mg 称为 1 个淀粉酶活力单位。

### 1.3.3 纤维素酶和褐藻酸酶

纤维素酶的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法<sup>[7]</sup>。纤维素酶活力定义:在 40℃和 pH 7.2 下,水浴保温 30 min,每分钟催化纤维素水解生成 1 μg 葡萄糖的酶量定义为一个活力单位。褐藻酸酶活力按照纤维素酶活力的方法测定,底物换成褐藻酸钠。

## 1.4 蛋白质浓度测定

样品的蛋白质浓度用考马斯亮蓝 G-250 法测定。蛋白酶活力均以比活力表示,即每毫克蛋白质所显示的活力(活力单位/mg 蛋白)。

## 1.5 数据的统计分析

实验数据用 SPSS 10.0 进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 消化酶活力的季节变化

蛋白酶、淀粉酶和褐藻酸酶活力的季节变化表现出较明显的规律性(图 1), 这 3 种酶的活力在 2-3 月的低水温期达到最大值, 随着水温的上升酶活力逐渐下降, 到刺参进入 7-10 月的夏眠生理周期时, 酶活力下降到全年的最小值, 10 月中下旬夏眠结束后, 随着水温的降低, 酶活力又开始缓慢的回升。2 月份和 3 月份的蛋白酶、淀粉酶和褐藻酸酶活力大小均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。全年中纤维素酶活力一直很低, 而且季节变化不明显。

在全年中, 蛋白酶的活力显著高于其他 3 种酶, 变化的幅度最大; 淀粉酶活力和变化幅度次之, 褐藻酸酶和纤维素酶的活力最低, 变化幅度最小。这表明, 蛋白酶和淀粉酶是刺参肠道的主要消化酶。

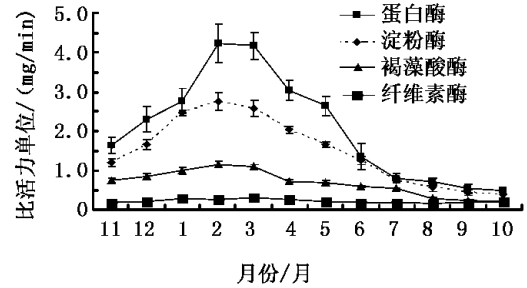


图 1 成参 4 种主要消化酶活力的周年变化  
Fig.1 Annual changes in protease, amylase, alginate lyase and cellulase in alimentary canal of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

### 2.2 成参消化管长与体长之比的季节变化

1-3 月低温期, 仿刺参消化管的最大长度可达到体长的 4.6~5.9 倍(表 1), 2 月达到全年的最大值, 随着水温的升高, 消化管长/体长比逐渐下降, 在 8-10 月的高水温期, 消化管长仅为体长的 0.8~1.1 倍, 10 月下降到全年的最小值, 随着水温的下降, 消化管长/体长比又快速增大, 到 12 月恢复到较大值。

表 1 成参在不同月份的消化管长与体长之比

Tab.1 Ratios of digestive tract length to body length in adult sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) at various months

| 月份(月)   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 消化管长/体长 | 4.6 | 5.9 | 5.3 | 3.2 | 2.7 | 1.8 | 1.3 | 1.1 | 0.9 | 0.8 | 1.6 | 2.8 |

## 3 讨论

### 3.1 不同季节消化管长度的变化

本实验发现, 在适应水温范围内, 刺参消化管长度和重量与水温呈负相关, 即水温高时(18℃以上), 刺参开始夏眠, 消化管短, 消化道质量轻; 水温低时, 反之。依刺参消化管长度、重量和摄食强度, 刺参的年生活周期可分为 4 个阶段: 消化管长而重的活动期; 消化管逐渐变短、重量逐渐变轻的夏眼前期; 消化管最短, 消化道质量最轻的夏眠期和消化管逐渐变长、重量逐渐增加的恢复期<sup>[8]</sup>。水温 2℃<sup>[9]</sup> 或 5~18℃时<sup>[10]</sup>, 海参活动随水温升高频繁增加, 夏季高温期活动明显减退。这表明, 在水温 2~18℃期间加强饲养管

理和科学投喂等, 对加速刺参生长, 提高产量具有重要意义。自然海区刺参夏眠时的海水温度为 18~24℃<sup>[11]</sup>。本实验证明, 在大连海域, 刺参从 8 月上旬水温达到 18℃开始进入夏眠, 到 10 月末结束。此间, 刺参基础代谢下降, 停止摄食, 消化道变薄, 变细, 变短。秋季水温下降, 消化管开始恢复, 11 月初开始摄食, 肠内有少量的食物但并不充满, 肠管开始变长, 但仍然较轻。2 月上旬的最低水温期是消化管最肥厚的时期, 消化管长/体长比最大。这与我们观察到的刺参在越冬期仍生长的现象相一致。随着水温的上升, 消化道又逐渐变短, 变瘦。到 6 月上、中旬, 刺参进入繁殖期, 消化管的重量迅速下降, 可能是受生殖腺发育的影响。

不同规格刺参对夏眠的反应不同,通常,规格越小,反应越不强烈<sup>[12]</sup>。本实验中,刺参的规格为 3 龄,具有明显的夏眠生理周期,表明本实验结果对研究海参消化生理的周年变化具有重要意义。

### 3.2 刺参 4 种主要消化酶的周年变化

刺参消化道中蛋白酶、淀粉酶和褐藻酸酶活力的季节变化与消化管长度和重量的季节变化相一致,即摄食和生长旺盛时期,消化管较长、较重,这 3 种酶的活性高;反之,摄食和生长缓慢时期,消化管较短、较轻,这 3 种酶的活性低<sup>[13]</sup>。但越冬期刺参摄食不旺盛期,而消化管却最长、最厚、最重。这可能与延长食物在体内的停留时间,延长食物与消化酶的接触时间,提高消化率和生长速度有关,是刺参在冬季摄食和生长的一种适应。

食性与消化酶的种类和活力密切相关。蛋白酶的活力在全年中均处于最高水平,表明刺参消化蛋白质的能力较强,对食物蛋白的需求量较高,而褐藻酸酶活力一直处于较低水平,表明刺参对海带和裙带菜等富含褐藻酸的大型藻消化能力较弱,这与我们在海胆与海参混养实验中观察到的海参不能完全利用摄食海带的海胆粪便的结果相一致<sup>[14]</sup>。

本实验中,刺参消化道中的纤维素酶活力一直很低,且变化不明显,而刺参的食物中,植物性食物占了很大的比例。结果显示刺参消化道中的纤维素酶可能不是自身分泌的,而是通过食物进入消化管中的微生物产生的。Dybas 和 Fankboner<sup>[15]</sup>认为,肠道中细菌环境为海参存活所必需。所以,生产中常在海参饲料中添加海泥。由此推想,在海参饲料中考虑添加有益微生物,或将植物性饲料源发酵后再使用,可提高饲料的消化率和海参成活率。

### 参考文献:

- [1] 刘永安,李馥馨,宋本祥,等. 刺参夏眠习性研究—夏眠生态特点的研究[J]. 中国水产科学,1996,3(2): 41-48.
- [2] 陈品健,王重刚,陈浩,等. 真鲷幼鱼消化酶活性与温度的关系[J]. 厦门大学学报,1998,37(6): 931-934.
- [3] 刘玉梅,朱谨钊,吴厚余. 中国对虾幼体和仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究[J]. 海洋与湖沼,1990,22(6): 571-575.
- [4] 杨慧萍,童圣英,王子臣. 皱纹盘鲍淀粉酶和褐藻酸酶的研究[J]. 水产学报,1998,22(4): 345-351.
- [5] 王吉桥,唐黎,许重,等. 温度、pH 和金属离子对刺参蛋白酶活力影响的研究[J]. 海洋科学,2007,31(11): 14-18.
- [6] 上海市医学化学研究所. 临床生化检验(上册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1982: 31-35.
- [7] 中山大学生物化学教研室. 生化技术导论[M]. 北京:人民教育出版社,1978: 53-55.
- [8] 廖玉麟. 中国动物志 棘皮动物门 海参纲[M]. 北京:科学出版社,1997: 17-21.
- [9] 王吉桥,李振武,陈国泰,等. 两种方法培育的仿刺参幼参越冬期的成活率与生长[J]. 现代渔业信息,2006,21(7): 3-6.
- [10] 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.
- [11] 谢忠明. 海海参胆增殖养殖技术[M]. 北京:金盾出版社,2004: 16-17.
- [12] Yang H S, Yuan X T, Zho 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): 1085-1090.
- [13] 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.
- [14] 王吉桥,程鑫,杨义,等. 不同密度的虾夷马粪海胆与仿刺参混养的试验[J]. 大连水产学院学报,2007,22(2): 102-108.
- [15] Dybas L, Fankboner P V. Holothurian survival strategies: Mechanisms for the maintenance of a bacteriostatic environment in the coelomic cavity of the sea cucumber[J]. Aquaculture Research, 2002, 33(8): 112-116.