

丁香酚麻醉大口黑鲈的保活温度优化

李宁^{1,2}, 白婵¹, 熊光权¹, 王炬光¹, 喻继桂¹, 周淼¹, 张金木¹, 廖涛¹

(1. 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北省农产品辐照工程技术研究中心, 湖北武汉 430064)

(2. 华中农业大学水产学院, 湖北武汉 430070)

摘要: 为探讨温度对有水保活大口黑鲈代谢与肌肉品质的影响, 研究了不同丁香酚浓度对大口黑鲈的麻醉效果。选取最佳浓度麻醉大口黑鲈, 分别在 5, 10, 15 和 20 °C 的条件下保活, 测定了不同温度下的存活率、氨氮含量、血液生化指标与肌肉品质的变化。结果显示: 大口黑鲈的较佳丁香酚浓度为 18 mg/L, 在 5 °C 保活 72 h 存活率为 0, 在 10, 15 和 20 °C 下保活 96 h 后的存活率分别 100%, 75% 和 0%; 随着保活时间延长, 与 15 °C, 20 °C 组相比, 10 °C 组的总氨氮降低 24.12%~51.24%, 血糖含量先增加后下降, 保活 72 h 后, 10 °C 处理组血清中皮质醇、谷草转氨酶、谷丙转氨酶、碱性磷酸酶和尿素氮分别比 20 °C 组低 260.44 pg/mL、52.54 mmol/L、8.76 mmol/L、3.26 mmol/L 和 8.22 mmol/L ($p<0.05$), 而溶菌酶、总抗氧化能力和谷胱甘肽过氧化物酶含量均显著高于其它组 ($p<0.05$); 10 °C 肝脏 HSP90 的表达量显著低于 15 °C 和 20 °C; 肌肉指标中, 15 °C 和 20 °C 组糖原、粗蛋白含量和 pH 显著低于 10 °C 组。表明 10 °C 保活条件下大口黑鲈抗氧化酶活性增强, 应激降低, 肌肉品质影响较小。因此, 10 °C 适合大口黑鲈的长途保活运输。

关键词: 大口黑鲈; 丁香酚; 保活温度; 生理生化; 肌肉品质

文章编号: 1673-9078(2020)10-173-181

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0355

Optimization of Keep-alive Temperature of Eugenol Anesthetized Largemouth Bass

LI Ning^{1,2}, BAI Chan¹, XIONG Guang-quan¹, WANG Ju-guang¹, YU Ji-gui¹, ZHOU Miao¹, ZHANG Jin-mu¹, LIAO Tao¹

(1. Institute of Agricultural Products Processing and Nuclear Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Hubei Agricultural Products Irradiation Engineering Technology Research Center, Wuhan 430064, China)

(2. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to investigate the effect of temperature on the metabolism and muscle quality of largemouth bass, the anesthesia effect of different concentrations of eugenol on largemouth bass was investigated. Largemouth bass were anesthetized at the optimal eugenol concentration and kept alive at 5, 10, 15 and 20 °C, respectively. The survival rate at different temperatures, water quality, blood biochemical indicators and chemical properties of muscle quality were measured. The results showed that the optimal concentration of eugenol was 18 mg/L, and the survival rate was 0 after preservation for 72 h at 5 °C, and the survival rates were 100%, 75%, 0 after 96 h at 10, 15 and 20 °C, respectively. With the prolongation of the survival time, the total ammonia nitrogen in the 10 °C group decreased by 24.12% to 51.24%, respectively, compared with those of 15 °C and 20 °C groups. The blood glucose content increased first and then decreased. After keeping alive for 72 h, compared to the 20 °C group, the serum cortisol, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase and urea nitrogen in the 10 °C group decreased by 260.44 pg/mL, 52.54 mmol/L, 8.76 mmol/L, 3.26 mmol/L, 8.22 mmol/L, respectively ($p<0.05$), while lysozyme, total antioxidant capacity and glutathione peroxidase content were significantly higher than those of the other groups ($p<0.05$). The

引文格式:

李宁, 白婵, 熊光权, 等. 丁香酚麻醉大口黑鲈的保活温度优化[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 173-181

LI Ning, BAI Chan, XIONG Guang-quan, et al. Optimization of keep-alive temperature of eugenol anesthetized largemouth bass [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 173-181

收稿日期: 2020-04-18

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助 (CARS-46); 湖北省科技特派员项目; 湖北省农业科技创新中心项目 (2020-620-000-001-25)

作者简介: 李宁 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品保活运输研究

通讯作者: 廖涛 (1979-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 水产品加工与安全研究

liver HSP90 expression at 10 °C was significantly lower than those of 15 °C and 20 °C. Among muscle indicators, the contents of glycogen, crude protein and pH at 15 °C and 20 °C were significantly lower than those at 10 °C. The results showed that the activity of metabolic enzymes of largemouth bass was increased, the stress was decreased and the muscle quality was affected a little at 10 °C. In conclusion, the most appropriate temperature for long-distance keep-alive transportation of largemouth bass is about 10 °C.

Key words: largemouth bass; eugenol; keep alive temperature; physiological and biochemical; muscle quality

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 俗称加州大口黑鲈、黑鲈, 隶属硬骨鱼纲, 是一种肉食性名贵鱼类, 深受广大养殖者和消费者们的喜爱。目前, 且在我国南方大范围养殖, 其中广东省年产量位居国内首位, 占全国的 75%^[1]。由于大口黑鲈产地在我国分布不均, 因而实现全国的人们都能品尝到鲜活的水产品需要探索保活运输技术。

目前麻醉运输法是一种新型的保活方法, 麻醉剂经常被用来减轻运输过程中鱼类的应激反应^[2,3], 延长运输时间, 降低成本。管维良等人^[4]研究使用二氧化碳水溶液作为麻醉剂, 并以化学麻醉剂 (MS-222) 作为阳性对照, 比较 2 种麻醉方式的优劣, 结果表明适宜质量浓度的二氧化碳和 MS-222 麻醉液均能延长罗非鱼在有水保活过程中的存活时间。一系列草药提取物 (精油和甲醇提取物) 已被测试其在鱼类中的镇静性能, 并添加到运输水中来降低代谢速率^[5]。方晓磊等^[6]采用丁香酚辅助运输鲜活草鱼, 结果表明, 10 mg/L 丁香酚处理组中可使草鱼长时间 (24 h) 处于深度镇静状态, 鱼体可保持平衡, 存活率 100%, 适合草鱼长时间运输操作。

此外, 在保活运输过程中, 鱼类会受到多种胁迫因子的影响, 运输过程中可根据季节、运输距离的长短, 采用降低水温等方法达到保活目的并提高运输质量。因此, 研究温度对大口黑鲈麻醉保活工艺的影响, 对提高大口黑鲈的成活率和运输时间具有重要的意义。刘伟东等^[7]研究了低温条件下大菱鲆有水和无水保活过程中生理生化变化情况, 结果表明: 有水保活的大菱鲆血液中 BUN、CR、UA 和 GLU 显著低于无水保活。王丽娟等^[8]研究了不同水温下丁香酚对大口黑鲈的麻醉效果, 结果表明在 15 °C, 5 mg/L 的丁香酚水溶液里模拟运输 17 h, 存活率 100%。范秀萍等^[9]探索了温度对有水保活珍珠龙胆石斑鱼代谢与肌肉品质的影响, 结果表明, 15 °C 适合珍珠龙胆石斑鱼的长途保活运输。上述研究均表明在保活过程中其环境温度是至关重要的影响因素之一。低温可减慢呼吸速率和氨氮产生, 从而延长运输时间, 保持高存活率^[10]。同时, 低温作为一种胁迫反应, 可激发机体的抗氧化潜力^[11]。然而, 长期低温可能会损伤肝脏, 血液基本生化特征显示营养状况、组织损伤、脂代谢活性和应

激^[12,13]。因此, 本文为了延长大口黑鲈保活时间, 并将其与丁香酚麻醉相结合, 测定了不同温度和不同运输时间的存活率以及生理生化与肌肉理化指标的变化, 探讨其合适的保活运输温度, 为大口黑鲈的保活运输提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验原料

大口黑鲈全部购买于湖北省嘉鱼县三湖渔业有限责任公司, 体长 31.30~34.65 cm, 体质量 350.70~420.50 g。实验鱼暂养在 600 L 鱼缸中, 溶氧大约在 5.50~7.50 mg/L, pH: 7.23±0.12, 水温在 15~18 °C 之间, 每天投喂一次, 实验前停食 48 h。

丁香酚 (上海晶纯生化科技股份有限公司) 为橘黄色的油状液体, 有浓重的香味, 难溶于水, 丁香酚使用前按 1:9 的比例用乙醇溶解, 使用时现用现配。其他均为分析纯。超氧化物歧化酶 (SOD)、皮质醇 (COR)、血糖 (GLU)、谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、尿素氮 (BUN)、碱性磷酸酶 (AKP) 和总抗氧化能力 (T-AOC)、溶菌酶 (LYZ) 试剂盒: 南京建成生物科技有限公司, SYBR Premix Ex Taq M 试剂盒, RNA 裂解液。

1.2 主要仪器

3K15 离心机, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; TA-XTplus 型质构仪, 英国 SMS 公司; ISO 9001 电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; VORTEX 3 涡旋振荡器, 德国 IKA 公司; K1860 全自动凯氏定氮仪, 海能仪器; Nano Drop 2000c, 美国 Thermo Scientific 公司; Step One Plus TM 荧光定量仪, 美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验设计

丁香酚按终质量浓度为 10、15、18、20、25 和 30 mg/L 设置 5 个梯度组, 实验在 40 L 水箱中进行, 鱼水比为 1:2, 水温约为 15 °C, 将停食后健康的大口黑鲈转到麻醉液中。每组 10 尾鱼, 观察鱼的活动状态,

记录达到各麻醉阶段所需的时间以及麻醉 24 h 后的存活率，将大口黑鲈转入相同水温的清水中复苏。麻醉和复苏时间均为所有鱼进入到相应状态的时间。参照王利娟^[8]等的分类标准结合大口黑鲈的实际情况，麻醉和复苏阶段行为特征如表 1 所示。

根据麻醉、复苏时间及存活率，选择适宜的丁香酚浓度，再进行不同水温下（5、10、15 和 20 ℃）的保活实验，每组共 15 条鱼，通过加热棒和水空控制

水温，各梯度水温波动幅度为±1.0 ℃。记录不同温度保活 24、48、72 和 96 h 鱼体的存活率。测定水质 pH 和氨氮含量，并在运输 48 h 和 72 h 后取鱼样。取样时采用一次性无菌注射器尾动脉抽血，在 4 ℃静置 2 h，4 ℃、6000 r/min 离心 15 min 取血清，放入-80 ℃冰箱保存；在无菌操作台内用消毒剪刀和镊子取其肝脏组织后放入 RNA 保存液，防止 RNA 降解。同时设置基础组，基础组为相同条件下不加麻醉剂运输前的鱼。

表 1 麻醉和复苏程度分期及鱼类行为特征

Table 1 Anesthesia, recovery degree staging and fish behavior characteristics

分期		行为特征	备注
麻醉阶段	A1（轻度镇静期）	能够对外部的刺激做出反映，鳃盖的频率略有下降。	适用于运输 最佳的操作时期 应立即进行复苏 无法复苏，死亡
	A2（深度镇静期）	鳃盖张合频率略微减少，身体平衡性较好。	
	A3（平衡失调期）	不规则游泳，增加鳃盖的频率，并且仅响应强刺激。	
	A4（麻醉期）	完全丧失肌肉张力，失去平衡。	
	A5（深度麻醉期）	完全失去所有的反应能力，鳃盖的张合是缓慢的。	
	A6（延髓麻醉期）	鳃盖的张合停止。	
复苏阶段	R4	身体平衡，可以自如游动，且反应恢复灵敏	

1.3.2 水体指标和血液指标的测定

保活过程水体 pH 值采用 pH 计监测；采用纳氏试剂法（GB 3097-1997 中华人民共和国海水水质标准）测定海水中的总氨氮含量。采用南京建成生物试剂盒测定血清 ALT、AST、GLU、LYZ、BUN、COR、SOD、GSH 和 T-AOC。

1.3.3 肌肉品质的测定

水分的测定参照 GB 5009.3-2016^[14]，蛋白质的测定参照 GB 5009.5-2016^[15]。肌肉 pH 的测定：称取绞碎、混合均匀的 5.00 g 鱼肉，加水均质 2 min，定容至 50 mL，转入离心管中，5000 r/min 离心 10 min，取上清液测定 pH。

1.3.4 HSP90 表达量的测定

使用 Trizol 试剂（Sigma，USA）从肝脏体内提取总 RNA，并在 1.2%变性琼脂糖凝胶上电泳以测试完

整性。测定 RNA 浓度和质量。TaKaRa 反转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq T M（TaKaRa）试剂盒并进行荧光定量聚合酶链式反应，具体方法参考文献^[16]。

1.4 数据分析

用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件对试验结果进行统计分析，每组 3 个重复。用 graphpad prism5 作图，在单因素方差分析的基础上采用 Duncan 氏多重比较法进行分析，统计值为平均值（SEM）±标准差，显著性水平为 $p<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 较佳丁香酚浓度的确定

表 2 不同丁香酚浓度对入麻时间和复苏时间的影响

Table 2 Effects of anesthetic concentration on induction and recovery time

麻醉剂质量 浓度/(mg/L)	进入不同麻醉程度的时间/s						复苏至 R4 的时间/S	24 h 后 成活率/%
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆		
丁香酚	10	-	-	-	-	-	20±4	88±6
	15	220±14	366±22	-	-	-	89±45	100
	18	129±11	204±20	300±28	-	-	128±36	100
	20	100±9	120±13	240±11	280±14	-	268±21	100
	25	60±5	82±6	102±19	165±12	206±15	390±24	80±5
	30	40±5	62±8	88±22	118±23	130±21	550±22	40±10

注：水温 15 ℃；A₁~A₆ 对应表 1 的麻醉程度；R4 对应表 2 的复苏程度；“-”表示试验中没有观察到对应的麻醉状态；“/”表示鱼死亡无法复苏。

由表 2 可知,随着丁香酚浓度增加,大口黑鲈进入相同麻醉时期的时间缩短,完全复苏时间延长。丁香酚的浓度在 10、15 mg/L 时只能使大口黑鲈进入深度镇静状态。当浓度达到 18、20 mg/L 会使大口黑鲈进入到平衡失调期和麻醉期,24 h 后存活率 100%,在 25-30 mg/L 时会使大口黑鲈进入到延髓麻醉期,24 h 后在清水中不能全部复苏,存活率分别为 80%、70%。因此,本文选取丁香酚质量浓度为 20 mg/L。

2.2 温度对大口黑鲈保活时间和存活率的影响

大口黑鲈在不同温度下的保活时间与存活率见表 3。在 20 ℃ 时,保活 48 h 后的存活率为 100%,之后开始出现死亡,96 h 时的存活率为 0%;在 15 ℃ 时,保活 96 h 时的存活率为 75%;在 10 ℃ 时,保活 96 h 时存活率为 100%;在 5 ℃ 时,保活 24 h 以后出现死亡,在 48 h 存活率仅为 50%,96 h 全部死亡。温度过低,鱼体僵硬,不利于鱼的存活。因此,10 ℃ 是大口黑鲈麻醉保活运输的适宜温度。

水温过高或过低均不利于鱼体运输,其原因是水温较高时鱼体新陈代谢旺盛,水质容易恶化,但水温过低也会导致鱼体冷应激,长期低温会产生严重的损伤和死亡,从而导致其存活率下降^[16]。Yoshikawa 等^[17]研究温水性鱼类鲤鱼进行麻醉休眠的较佳保活温度,4 ℃ 下鱼体完全失去运动能力与平衡能力时 10 min 进入休眠状态,但仅能维持 5 h,而在 14 ℃ 条件下,鱼体的运动与平衡能力正常而呼吸较弱的镇静或半休眠状态下,能维持 24 h,与本研究结果相似。

表 3 大口黑鲈在不同温度与保活时间下的存活率 (%)

Table 3 Survival rate of largemouth bass at different temperatures and time (%)				
保活时间/h	24	48	72	96
水温/℃	存活率/%			
5	90	80	50	0
10	100	100	100	100
15	100	100	100	75
20	100	100	35	0

2.3 温度对大口黑鲈保活过程中水质指标的影响

如图 1 所示,在保活过程中,10 ℃ 时 pH 值在 6.8~7.0 左右,无显著变化。15~20 ℃ 水质 pH 值显著增加 ($p<0.05$)。水温越高, pH 越高,这可能是由于鱼体代谢释放的氨溶入水中所致,但 pH 依然在我国渔业水质标准规定的淡水鱼 pH (6.5~8.5) 要求范围之内^[18],所以 pH 的变化对大口黑鲈的影响并不大。试验结果表明,水体中总氨氮(total ammonia nitrogen,

TAN) 度随温度升高和时间延长呈明显增加趋势,在 10 ℃ 保活组氨氮含量在 0~24 h 内上升较缓慢,而在 48 h 后显著上升。与 20 ℃ 保活组相比,10 ℃、15 ℃ 保活组 TAN 浓度 48 h 时降低了 51.64% 和 26.16%,72 h 时分别降低了 47.12% 和 30.06%。

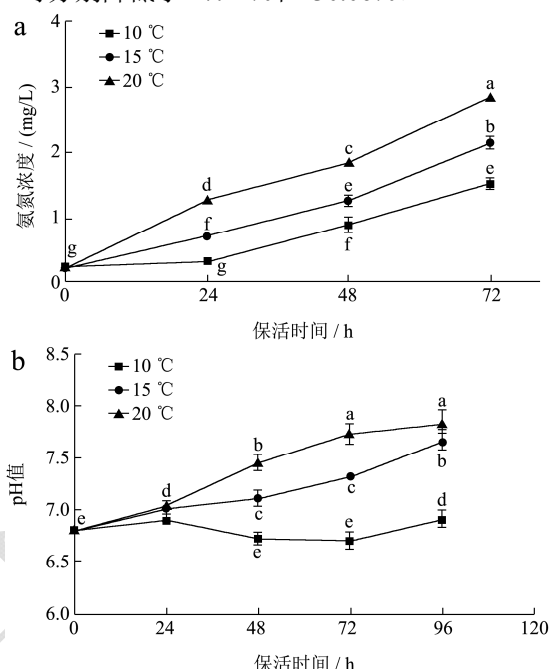


图 1 保活时间对保活水质氨氮含量和 pH 的影响

Fig.1 Effect of different keep-alive temperature on ammonia nitrogen content and pH

注: 图中不同小写字母表示组间差异显著 ($p<0.05$), 下同。

氨氮是水生生物的“头号隐形杀手”, 在水中以游离氨 (NH_3) 和铵盐 (NH_4^+) 形式存在, 其中起危害作用的主要是游离氨, 它的毒性比铵盐要高几十倍。氨氮毒性受水温和水的 pH 的影响, 大多数情况下, 水温及 pH 愈高, 其毒性就愈强^[19], 进而影响保活时间与存活率。研究发现保活水温适当降低 10 ℃, 部分水产品的氨类物质产量降低 50%^[20]。范秀萍等研究表明珍珠龙胆石斑鱼在水温 25 ℃ 时排泄率达到最大值^[10]。在本研究中, 10 ℃ 组与 20 ℃ 组相比, 大口黑鲈在 24~72 h 内的总氨氮浓度降低量在 47.12%~74.62%, 与上述研究结果一致。表明低温麻醉能通过降低大口黑鲈的代谢率而减缓氨氮类代谢产物的排出, 减少水质恶化达到延长保活时间目的。

2.4 保活温度对大口黑鲈应激指标的影响

皮质醇、葡萄糖浓度常被作为应激反应的敏感指标, 可以反映鱼类应激反应的强弱^[21]。由图 2 可知, 与新鲜鱼 (对照组) 相比, 保活 48 h 时 10 和 15 ℃ 血清皮质醇含量显著下降 ($p<0.05$), 保活 72 h 后鱼体

皮质醇含量上升,但 20℃组显著高于 10℃组 ($p<0.05$)。随着保活时间的延长,血糖水平显著下降 ($p<0.05$),10℃组保活 48 h 血糖水平高于对照组,10、15、20℃保活 72 h 后分别比保活前血糖水平下降 22.75%、50.21%、54.22%。

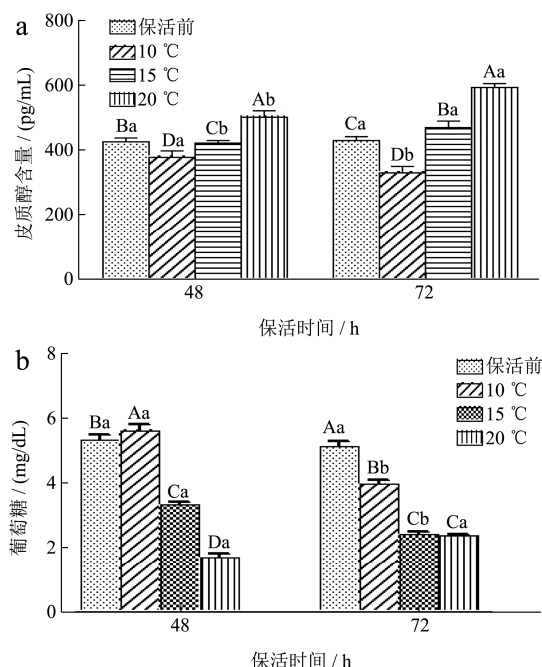


图2 不同保活温度对大口黑鲈皮质醇和葡萄糖含量的影响

Fig.2 Effect of keep-alive temperature on the content of cortisol and glucose

注:不同大写字母表示不同温度差异显著,不同小写字母表示组间差异显著, $p<0.05$,下同。

当鱼类受到应激后,下丘脑-垂体-肾上腺组织轴会迅速作用促进肾上腺皮质激素的释放,从而导致头肾细胞皮质醇激素的合成与释放。Mirghaed 等^[22]研究鲤鱼暴露于丁香酚中,皮质醇和血糖水平先显著升高后下降。本文大口黑鲈麻醉休眠后在 10℃保活 72 h 后的血清皮质醇含量显著降低,表明低温麻醉能减缓保活运输后的应激反应,而高温运输组皮质醇含量显著高于保活前,表明高温运输鱼体的应激反应不能立即恢复到正常水平。这与运输后水体总氨氮含量增加导致应激反应增强有关^[23]。范秀萍等^[9]研究在 15、20 和 25℃对石斑鱼应激指标的影响,结果表明在 15℃运输 72 h,皮质醇含量最低,葡萄糖含量最高,这与本文的研究结果相似。本试验中 10℃保活组血清葡萄糖的含量要显著高于 15℃和 20℃组,可能是由于大口黑鲈为了应对低温应激,维持基本的生命活动,使糖异生作用增强,从而提高血清葡萄糖的浓度,这与许友卿的研究结果相似^[24]。这主要与低温下能量消耗降低,而糖异生作用生成葡萄糖,所以血糖仍维持

高水平。这可能也是低温能延长保活时间的原因之一。

2.5 保活温度对大口黑鲈血清生化指标的影响

由图 3 可知,随着保活时间延长,血清 ALT、AST 活性显著升高 ($p<0.05$)。在 20℃保活 72 h 后,ALT、AST 酶活性分别升高 42.05%、77.78%;在 15℃,ALT、AST 酶活性分别升高 30.05%、50.78%;而在 10℃,AST 活性无显著变化,ALT 活性升高 20.22%。与保活前相比 AKP 酶活性在 10℃、15℃时显著下降 ($p<0.05$),在 20℃显著升高 ($p<0.05$)。10℃、15℃组保活 48、72 h,尿素氮浓度显著性下降,20℃保活 72 h 尿素氮浓度显著性升高,在 48、72 h 分别增加 1.40、4.13 mmol/L。表明高温保活 72 h 鱼体内代谢与物质转化发生显著变化,导致肝脏组织受损,引起血清代谢酶活性的显著上升,这也是高温条件下长时间保活后鱼体出现死亡的原因之一。

溶菌酶 (LYZ) 一种是与机体免疫系统有关的活性物质,当机体受到胁迫时,会释放更多的溶菌酶,提高机体防御能力。如图可以看出,随着保活时间延长,10℃溶菌酶活性无显著变化;15℃和 20℃显著下降 ($p<0.05$),在保活 72 h 时分别下降 7.7%、50%。这可能也与高温保活过程中代谢增强,氨氮含量增加,水质恶化严重,影响机体的免疫能力。

血清转氨酶活性是反映机体代谢和物质转化的状况的重要指标。是肝脏损伤的重要指示酶当肝脏、心脏和肌肉组织受损时,血液中 ALT、AST 的活性会显著升高。AKP 的来源包括肠上皮、肾脏和肝脏的合成,并经常因胆道梗阻而增加。向建国^[25]等通过研究发现,热应激下虹鳟血清中谷丙转氨酶和谷草转氨酶等指标升高,由此判定热应激导致虹鳟肝脏组织损伤。Josef Vellse 等^[26]研究发现大口黑鲈经丁香酚麻醉运输后在 24 h 时 ALT、AST 和 AKP 显著上升,之后逐渐恢复至运输前水平;本试验中保活后与保活前相比,ALT、AST 和 ALP 酶活性都趋于上升,20℃保活组显著高于其他两组 ($p<0.05$)。表明高温保活条件下,应激反应造成肝脏受损。尿素氮 (BUN) 是蛋白质与氨基酸代谢的终产物,血液中尿素氮含量可以反映了肾脏功能的好坏。当肾功能受到损害时,血液中尿素氮含量会升高^[24]。Shi 等^[7]研究温度胁迫对石斑鱼血清生化指标的影响,结果表明,温度胁迫会导致 ALT、AS 和 BUN 含量显著上升。本试验与此结果一致,表明高温或低温保活大口黑鲈会损伤肝脏、肾脏功能,从而影响毒素的代谢,尿素氮含量增加。

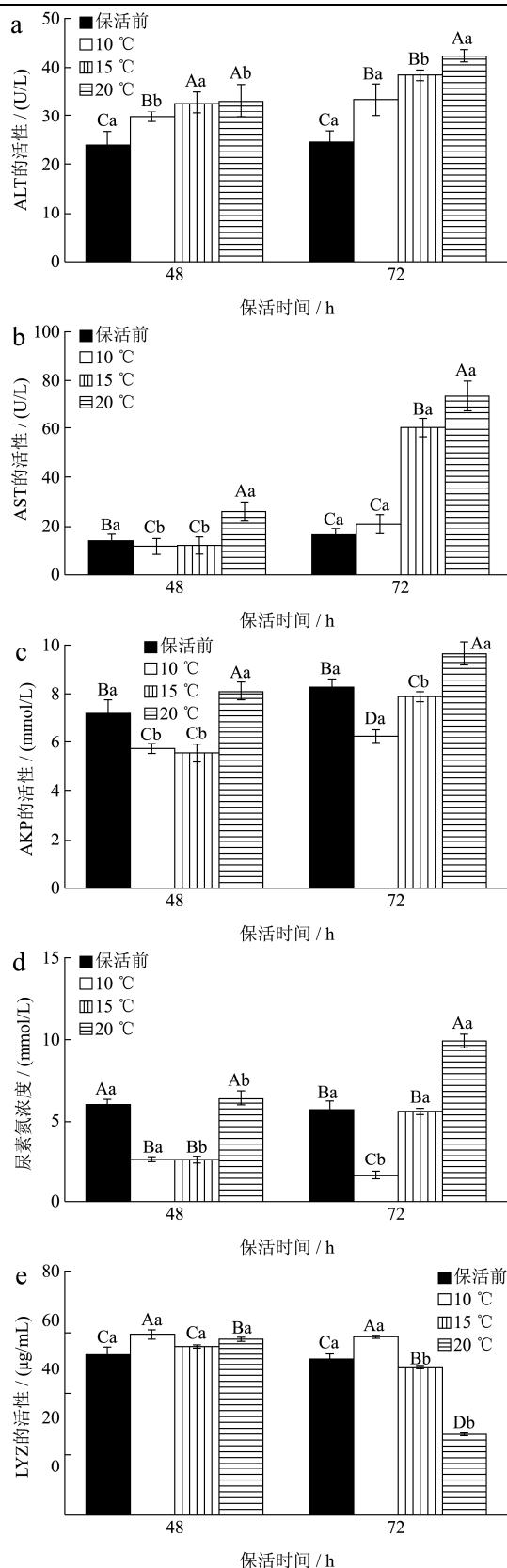


图3 不同保活温度对ALT、AST、AKP、BUN和LYZ活性的影响

Fig.3 Effect of different keep alive temperatures on ALT, AST, AKP, BUN and LYZ enzyme activities

溶菌酶是一种能够水解致病菌的碱性蛋白, 通过

破坏细菌细胞壁上的糖苷键, 使细胞内容物流出从而杀死细菌, 也可结合病毒上的蛋白, 使病毒失活。王丽娟等^[8]研究温度对大口黑鲈幼鱼存活率的影响, 发现15℃溶菌酶活性比25℃和5℃时高。强俊等^[27]研究温度对罗非鱼的影响时, 发现随着时间的延长, 高温组25℃溶菌酶活力显著降低, 而15℃溶菌酶活力没有显著变化。综合上述研究结果, 表明水生动物在受到温度胁迫时, 会造成溶菌酶活力下降, 当异物侵入时没有足够的溶菌酶消化清除异物, 使机体免疫力下降, 影响鱼类正常的免疫应答从而感染疾病, 增大死亡率。

2.6 温度对不同保活时间大口黑鲈相关抗氧化酶活性的影响

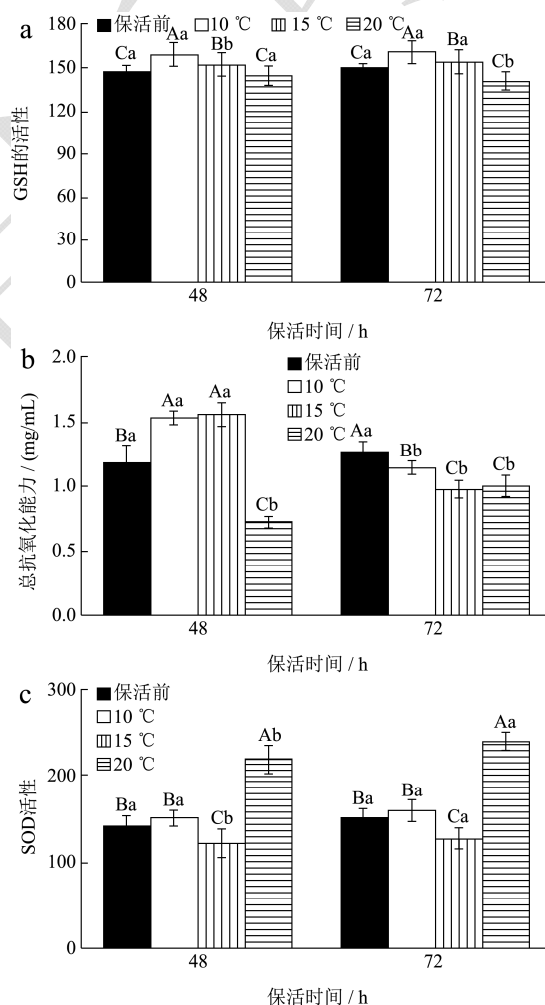


图4 不同保活温度对TAC、GSH和SOD酶活性的影响

Fig.4 Effect of different keep-alive temperatures on T-AOC, GSH and SOD activities

由图4可知, 在不同保活温度下GSH、T-AOC和SOD酶活性均随着保活时间延长逐渐下降, 而SOD酶活性在20℃保活组显著高于10、15℃, 在保活48、

72 h 时分别比保活前增加 79.12、88.03 U。10 ℃ 保活组 GSH、T-AOC 活性显著高于 15 ℃ 和 20 ℃。结果表明, 低温保活能有效减少鱼体抗氧化活性的损失, 提高机体防御能力。

温度胁迫会引起鱼体的应激反应, 应激反应多与活性自由基的过量生成有关, 过量的自由基会对机体组织产生一定的损伤^[28]。研究表明, 在温度胁迫下生物体可通过调节抗氧化酶活性来增强其清除活性氧自由基的能力, 降低脂质过氧化和提高细胞存活率, 然而当抗氧化酶活性过高时, 也表明机体自由基含量骤增, 肝脏组织受损。本实验中, 10 ℃ 保活组 TAC、GSH 和 SOD 均出现先升高后降低的趋势, 这与强俊等^[27]研究急性温度应激对吉富品系尼罗罗非鱼幼鱼生化指标的影响中的结果相似。这表明急性低温胁迫使得自由基迅速增加, 使得细胞和组织出现损伤, SOD 大量产生来应对过量的自由基, 所以 SOD 先升高, 随着与过量的自由基反应, 导致 SOD 含量下降。20 ℃ 保活组, 在保活 72 h 时 SOD 活性仍显著高于其他两组, 预示着机体自由基含量骤增, 肝脏受到损伤, 清除自由基能力下降。

2.7 不同温度对肝脏中 HSP90 基因表达的影响

运用实时荧光定量 PCR 技术, RT-PCR 结果显示, 肝脏中 HSP90 表达量均随着温度升高而上升, 低温 10 ℃ 保活组 HSP90 下调, 而 15 ℃ 和 20 ℃ 显著上调 ($p<0.05$)。表明, 高温会提高 HSP90 基因的表达, 从而诱导合成 HSP90 蛋白, 进而导致应激程度增强, 肝脏受损严重。

HSP90 是 HSP 家族代表性成员, 参与蛋白质折叠和运输, 调节蛋白质的降解, 在应激反应中有着重要的调节作用。HSP90 在正常细胞中含量较低, 细胞受

到应激后, 产生异常的蛋白质, HSP90 表达升高^[29]。Jia 等^[30]通过研究发现虹鳟在热应激环境下, 肝脏中 HSP90 表达量显著高于其他组织。本研究中, 大口黑鲈肝脏中 HSP90 在 20 ℃ 时表达量急剧升高, 表明 HSP90 在 20 ℃ 水温中呈现明显的诱导表达现象。刘波等^[31]研究不同温度对团头鲂应激基因表达的影响, 结果证明团头鲂在高温下应激蛋白的表达量显著高于低温。这与本试验的结论一致。

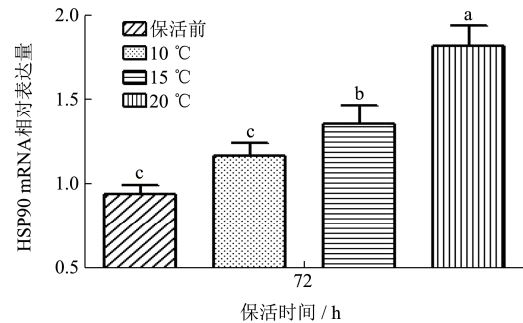


图5 保活温度对肝脏 HSP90 相对表达量的影响

Fig.5 Effect of keep-alive temperature on relative expression of liver HSP90mRNA

2.8 温度对大口黑鲈背肌营养成分的影响

不同温度对保活前后大口黑鲈肌肉理化指标的影响见表 4。由结果可以看出, 随着保活时间延长, 各保活组肌肉指标均呈下降趋势。10 ℃ 保活组肌肉的水分、粗蛋白含量均无显著变化; 15 ℃ 与 25 ℃ 保活组后肌肉的水分、粗蛋白与粗脂肪含量均显著下降 ($p<0.05$); 肌肉中 pH 和糖原含量在保活 72 h 后均显著下降 ($p<0.05$), 与保活前相比, 10、15、20 ℃ 保活 72 h 后 pH 值分别下降 0.45、0.85 和 0.74; 肌糖原分别下降 16.01%、9.84% 和 19.55%。

表 4 保活温度对不同保活时间肌肉指标的影响

Table 4 Effect of keep-alive temperature on physical and chemical properties of muscles different keep-alive times

指标	保活前	保活时间/h					
		48			72		
		10 °C	15 °C	20 °C	10 °C	15 °C	20 °C
pH	6.88±0.02 ^a	6.58±0.05 ^b	6.44±0.04 ^c	6.35±0.10 ^d	6.43±0.07 ^c	6.03±0.04 ^e	6.14±0.03 ^e
水分/%	76.83±0.58 ^a	76.65±0.65 ^a	74.05±0.60 ^c	73.07±0.56 ^d	76.05±0.68 ^b	74.43±0.88 ^c	74.57±0.76 ^c
蛋白质/%	23.55±0.12 ^a	23.01±0.14 ^a	22.34±0.20 ^b	22.06±0.18 ^c	22.70±0.13 ^b	21.78±0.20 ^d	22.01±0.16 ^c
肌糖原/(mg/g)	6.24±0.02 ^a	6.00±0.02 ^b	5.95±0.03 ^c	5.88±0.03 ^c	5.26±0.02 ^e	5.66±0.05 ^d	5.02±0.05 ^e

注: 同行数据上标不同表示组间存在显著差异 ($p<0.05$)。

休眠后低温下保活对肌肉水分和蛋白质含量影响较小, 对 pH 值、糖原含量影响显著。在 15 ℃ 下, 大口黑鲈处于静止状态, 呼吸频率降低, 活动少, 对能量的需求降低, 但在低温与饥饿的应激作用下, 通过

分解糖原满足能量需求。同时糖原分解成葡萄糖进入血液引起血糖的升高。保活温度越高, 机体代谢水平越强, 糖原作为主要的能量物质消耗越大, 导致高温保活后鱼体的糖原消耗更多。大多数鱼类在饥饿时,

对蛋白质的利用较少以后;只有少部分的鱼在饥饿期间主要消耗蛋白质^[32],大部分鱼通过消耗体内储存的脂肪和糖原获得能量,以维持机体在饥饿胁迫下的正常生理代谢。在本研究中,保活 48、72 h 后的鱼体肌肉中蛋白质、糖原均有不同程度的下降,但 10 °C 组蛋白质下降不显著,表明大口黑鲈在饥饿时主要消耗肌肉中的糖原供能。这与低温运输鲫鱼研究结果一致^[20]。

3 结论

3.1 本试验下大口黑鲈的较佳丁香酚浓度为 18 mg/L。(1)将麻醉后的鱼转移到 5、10、15 和 20 °C 保活 72 h 后的存活率分别为 50%、100%、100%和 35%,保活 96 h 的存活率分别为 0%、100%、75%和 0%。且水中 TAN 含量随温度升高和保活时间延长而增加,10 °C 与 20 °C 相比,保活 72 h 时大口黑鲈总氨氮含量降低了 47.12%,血清皮质醇含量显著低于 20 °C 组。10 °C 显著提高了运输时间及存活率,保持了较低的代谢。

3.2 与保活前相比,各温度组随着保活时间的延长,血清 ALT、AST、BUN 酶活性均呈上升趋势,皮质醇和血糖呈先上升后下降、GSH、TAC 和 SOD 酶活性显著下降。与 15 °C 和 20 °C 相比,10 °C 保活组抑制了 ALT、AST、AKP 和 BUN 酶含量的增加,同时,保持了较高的溶菌酶、超氧化物歧化酶、总抗氧化能力和谷胱甘肽还原酶活性。20 °C 肌肉中粗蛋白、糖原含量均显著下降,10 °C 变化不显著。

3.3 20 °C 保活条件下提高机体代谢速率和酶活性,增加能量物质代谢,而导致肌肉品质下降;而经过休眠后的鱼体在 10 °C 能维持较低的代谢水平,存活率提高,肌肉品质无显著变化。因此 10 °C 适合大口黑鲈的长途保活运输。

参考文献

- [1] 李静红,雷光英,李丽雪,等.广东加州鲈产业现状及发展建议[J].水产养殖,2012,33(9):21-24
LI Jing-hong, LEI Guang-ying, LI Li-xue, et al. The current status and development proposals of the striped bass industry [J]. Aquaculture, 2012, 33(9): 21-24
- [2] Azambuja C R, Mattiazzi J, Riffel A P K, et al. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish subjected to transport [J]. Aquaculture, 2011, 319, 156-161
- [3] CAI Zuo-nan, FENG Shuo-heng, XIANG Xiao-jun, et al. Effects of dietary phospholipid on lipase activity, antioxidant capacity and lipid metabolism-related gene expression in large yellow croaker larvae (*Larimichthys crocea*) [J]. Molecular Biology, 2016, 201: 46-52
- [4] 管维良,陈德慰.二氧化碳麻醉对罗非鱼有水运输的影响[J].肉类研究,2018,32(2):52-56
GUAN Wei-liang, CHEN De-wei. The effect of carbon dioxide anesthesia on tilapia water transport [J]. Meat Research, 2018, 32(2): 52-56
- [5] Salbego J, Becker A G, Parodi T V, et al. Methanolic extract of *Condalia buxifolia* added to transport water alters biochemical parameters of the silver catfish *Rhamdia quelen* [J]. Aquaculture, 2015, 437(437): 46-50
- [6] 方晓磊,柯常亮,李刘冬,等.丁香酚辅助鲜活草鱼处理和运输的剂量研究[J].食品工业科技,2017,38(17):275-278
FANG Xiao-lei, KE Chang-liang, LI Liu-dong, et al. Dose study on the treatment and transportation of eugenol assisted fresh grass carp [J]. Food Industry Technology, 2017, 38(17): 275-278
- [7] SHI Zhao-hong, ZHANG Yan-liang, GAO Quan-xin, et al. Effects of low temperature stress on serum biochemical parameters and metabolic enzyme activity in juvenile [J]. Aquaculture, 2015, 34(8): 2222-2228
- [8] 王利娟,程守坤,张饮江,等.水温对加州大口黑鲈保活运输的影响[J].渔业现代化,2014,41(2):23-27
WANG Li-juan, CHENG Shou-kun, ZHANG Yin-jiang, et al. The effect of water temperature on the conservation and transportation of California carp [J]. Fisheries Modernization, 2014, 41(2): 23-27
- [9] 范秀萍,秦小明,章超桦,等.温度对有水保活石斑鱼代谢与鱼肉品质的影响[J].中国农业工程学报,2018,34(14):241-248
FAN Xiu-ping, QIN Xiao-ming, ZHANG Chao-hua, et al. The effect of temperature on the metabolism and fish quality of water-spotted grouper [J]. Chinese Journal of Agricultural Engineering, 2018, 34(14): 241-248
- [10] YIN Fei, SUN Peng, PENG Shi-ming, et al. Effects of low salinity stress on antioxidant enzymes, sputum and kidney ATPase activity in juvenile silver carp [J]. Journal of Applied Ecology, 2011, 22(4): 1059-1066
- [11] Bowden T J. Modulation of the immune system of fish by their environment [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(4): 373-383
- [12] Barrento S, Powell A. The effect of transportation and re-watering strategies on the survival, physiology and batch weight of the blue mussel, *Mytilus edulis* [J]. Aquaculture,

- 2016, 450: 194-198
- [13] 许国蓉.温度对红螯光壳螯虾生长及免疫影响的初步研究[D].上海:华东师范大学,2017
- XU Guo-rong. Preliminary study on the effect of temperature on the growth and immunity of *Cinnamomum camphora* [D]. Shanghai: East China Normal University, 2017
- [14] GB 5009.5-2016,食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S]
- GB 5009.5-2016. National Food Safety Standard Determination of Protein in Food [S]
- [15] GB 5009.3-2016,食品安全国家标准食品中水分的测定[S]
- GB 5009.3-2016, National Food Safety Standard Determination of Moisture in Food [S]
- [16] 刘骁.团头鲂保活工艺优化及机制的研究[D].上海:上海海洋大学,2016
- LIU Xiao. Study on the optimization and mechanism of the preservation process of the group head [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016
- [17] Zeppenfeld C C, Toni C, Becker A G, et al. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* Britton [J]. Aquaculture, 2014, 418-419: 101-107
- [18] GB 11607-1989,渔业水质标准[S]
- GB 11607-1989, Fishery water quality standard [S]
- [19] 高亚峰,孙洪杰.氨氮对鱼类的危害[J].河北渔业,2014,8:63-67
- GAO Ya-feng, SUN Hong-jie. The harm of ammonia nitrogen to fish [J]. Hebei Fisheries, 2014, 8: 63-67
- [20] Ibarz A, Padrós F, Gallardo M Á, et al. Low-temperature challenges to gilthead sea bream culture: review of cold-induced alterations and 'Winter Syndrome' [J]. Reviews in Fish Biology & Fisheries, 2010, 20(4): 539-556
- [21] Shabani F, Erikson U, Beli E, et al. Live transport of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and subsequent live storage in market: water quality, stress and welfare considerations [J]. Aquaculture, 2016, 453: 110-115
- [22] Mirghaed A T, Ghelichpour M, Hoseini S M. Myrcene and linalool as new anesthetic and sedative agents in common carp, *Cyprinus carpio* - comparison with eugenol [J]. Aquaculture, 2016, 464: 165-170
- [23] ZHAO Jian-hua, ZHU Yong-jiu, HE Yong-feng, et al. Effects of temperature reduction and MS-222 on water quality and blood biochemistry in simulated transport experiment of largemouth bronze gudgeon, *Coreius guichenoti* [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2016, 45(5): 493-507
- [24] 许友卿,郑一民,丁兆坤,等.冷应激对水生动物代谢的影响及调控研究进展[J].中国水产科学, 2017,24(5):1149-1159
- XU You-qing, ZHENG Yi-min, DING Zhao-kun, et al. Research progress on the effects, mechanisms, and control of coldstress in aquatic animals [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 1149-1159
- [25] Tovar-Ramírez D, Mazurais D, Gatesoupe J F, et al. Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass larvae [J]. Aquaculture, 2010, 300(1): 142-147
- [26] Josef Velišek, Stejskal V, Jan Kouřil, et al. Comparison of the effects of four anesthetics on biochemical blood profiles of perch [J]. Aquaculture Research, 2008, 40(3): 354-361
- [27] 强俊,任洪涛,徐璐,等.温度与盐度对吉富品系尼罗罗非鱼幼鱼生长和肝脏抗氧化酶活力的协同影响[J].应用生态学报,2012,23(1):255-263
- QIANG Jun, REN Hong-Tao, XU Lu, et al. Synergistic effects of temperature and salinity on growth and liver antioxidant enzyme activities of *Tilapia juveniles* [J]. Journal of Applied Ecology, 2012, 23(1): 255-263
- [28] 谢明媚,彭士明,张成杰,等.急性温度胁迫对银鲈幼鱼抗氧化和免疫指标的影响[J].海洋渔业,2015,6:541-549
- XIE Ming-mei, PENG Shi-ming, ZHANG Cheng-jie, et al. Effects of acute temperature stress on antioxidant and immune indexes of juvenile silver carp [J]. Marine Fisheries, 2015, 6: 541-549
- [29] 王艳妮.热应激对虹鳟免疫指标及热休克蛋白基因HSP47mRNA表达的影响[D].兰州:甘肃农业大学,2016
- WANG Yan-ni. The effect of heat stress on the immune index of rainbow trout and the expression of heat shock protein gene HSP47 mRNA [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2016
- [30] JIA Yu-dong, Cavileer T D, Nagler J J. Acute hyperthermic responses of heat shock protein and estrogen receptor mRNAs in rainbow trout hepatocytes [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 2016, 201: 156-161

(下转第 246 页)