

温度对蜕壳后期三疣梭子蟹能量代谢酶活力的影响

戴 超, 王 芳*, 房子恒, 董双林

(中国海洋大学水产学院, 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为研究温度对三疣梭子蟹雌蟹钙化过程中丙酮酸激酶(PK)、己糖激酶(HK)和琥珀酸脱氢酶(SDH)活力的影响,在实验室条件下设 18、22、26 °C 3 个温度水平,分别在梭子蟹蜕壳后 1、2、8、16 h 及完全硬化 5 个时间点取样,测定其肝胰脏、肌肉和鳃中 HK、PK、SDH 的活力。结果显示:①与 22 °C 条件下相比,高温(26 °C)和低温(18 °C)下三疣梭子蟹肌肉中 PK 的活力在蜕壳后 1~8 h 明显升高,说明高温和低温条件下梭子蟹肌肉中的糖酵解速率加大;而肝胰脏和鳃中的 PK 活力的峰值出现在梭子蟹蜕壳后 1~2 h,表明蜕壳后 1~2 h 这 2 种组织中有较大的糖酵解速率;②3 个温度水平下,梭子蟹肝胰脏中 HK 的活力随钙化过程的进行而降低,蜕壳后 1~16 h 的活力显著高于完全钙化时的活力,说明蜕壳后的梭子蟹肝胰脏对葡萄糖的利用能力逐渐减弱,而其鳃中 HK 活力的变化趋势与肝胰脏中相反,说明梭子蟹的鳃对葡萄糖的利用能力随钙化过程的进行而提高,这种差异可能与不同组织在梭子蟹钙化过程中对葡萄糖的利用能力不同有关;③梭子蟹肝胰脏中 SDH 的活力在 3 个实验温度下蜕壳后 16 h 内呈逐渐升高的趋势,说明肝胰脏在钙化过程中三羧酸循环作用逐渐加强。此外,其肌肉和鳃组织中 SDH 的活力在 3 个实验温度下的峰值均出现在前 8 小时,并且低温(18 °C)的峰值明显低于高温(26 °C),说明在这段钙化时间中,相对于低温而言,梭子蟹的肌肉和鳃中有氧代谢的加强在高温条件下更显著。在钙化过程中,低温条件下三疣梭子蟹的糖酵解作用没有明显的变化,而三羧酸循环有较明显的减弱趋势,其中三疣梭子蟹肌肉和鳃中 SDH 的活力明显低于高温条件,表明低温确实可以延长其蜕壳后的软壳时间。

关键词: 三疣梭子蟹; 钙化; 己糖激酶; 丙酮酸激酶; 琥珀酸脱氢酶

中图分类号: Q 178.1; S 966.1

文献标志码: A

能量代谢主要涉及糖酵解、三羧酸循环和氧化磷酸化等途径,以糖类物质为基础,与物质代谢过程伴随发生,为动物进行生命活动提供能量。其中糖酵解途径除了为动物体提供少量 ATP 之外还提供丙酮酸,丙酮酸进入三羧酸循环后继续进行脱羧和脱氢反应,生成 ATP、NADH 和 FADH₂。NADH 和 FADH₂经电子传递链传递,被还原产生大量 ATP。三羧酸循环和氧化磷酸化产生的 ATP,理论上是糖酵解途径产能的数倍。能量代谢酶对调节动物的能量代谢起关键作用。机体在缺氧条件下或者动物体自身代谢旺盛但氧

气供应不足时,糖酵解是机体能量的主要提供者,己糖激酶(hexokinase, HK)和丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)是糖酵解过程中重要的变构调节酶。HK 活力的变化取决于外源或内源葡萄糖利用,机体利用葡萄糖能力的提高会引起 HK 活力的增大^[1],对糖酵解有重要调节作用;PK 作为糖酵解途径重要的限速酶之一,对于控制糖酵解过程的速率起关键作用,其活力在一定程度上可以反映细胞进行糖分解的潜力^[2]。氧气充足且机体代谢旺盛时,三羧酸循环将葡萄糖氧化为机体提供能量,琥珀酸脱氢酶(scinate

收稿日期:2013-04-15 修回日期:2013-05-02

资助项目:国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD13B03)

通信作者:王 芳, E-mail: wangfang249@ouc.edu.cn

dhydrogenase, SDH) 参与三羧酸循环。与三羧酸循环中的其他酶不同, SDH 是唯一嵌入到线粒体内膜中的酶, 而其他酶大多存在于线粒体基质中, 因而 SDH 作为线粒体的一个重要组成部分, 其活力可在一定程度上反映有氧代谢的水平^[3]。

目前, 软壳蟹由于其食用方便, 已成为高档水产品之一, 软壳蟹是指在蟹的蜕壳过程中, 硬的旧壳已蜕掉, 而新壳尚没有硬化的蟹。商品软壳蟹, 就是以软壳状态销售给顾客的蟹。随着生活水平的提高, 人们对其需求量逐渐增大。软壳蟹的生产关键在于延长蟹蜕壳后的软化时间。研究发现, 不同种类的甲壳动物蜕壳后的软化时间存在明显的差异^[4-5], 且与环境因子如温度、水中钙浓度和钙吸收率有关^[6-8]。目前降低水温是延长蟹蜕壳后的软化时间所采取的有效方法^[6]。温度通过影响甲壳动物能量代谢酶的活力调控其能量代谢水平, 是影响其能量代谢最重要的因素之一^[9]。目前还未见关于温度对三疣梭子蟹钙化过程能量代谢影响方面的研究报道。

本研究以我国主要的池塘养殖蟹类—三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 为实验对象, 研究了 3 个温度水平下三疣梭子蟹钙化过程中能量代谢酶如丙酮酸激酶 (PK)、己糖激酶 (HK)、琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活力的变化, 以期进一步丰富海洋甲壳动物的生理生态学, 同时为三疣梭子蟹软壳蟹的生产提供参考资料。

1 材料与方 法

1.1 实验蟹的来源与暂养

实验用雌三疣梭子蟹约 200 只购自山东省胶南活海鲜养殖基地。选择无病无伤, 活力强的个体作为实验用蟹, 实验蟹规格为 (114.88 ± 4.33) g, 头胸甲长为 (59.9 ± 3.59) mm, 头胸甲宽为 (120.20 ± 7.37) mm。实验前在底部铺有 3 cm 海沙 (海沙取自当地海滨, 粒径为 0.85 ~ 1.00 mm, 实验前过筛、曝晒) 的玻璃钢水槽 (200 cm × 100 cm × 40 cm) 内暂养, 放置扇贝壳、瓦片等遮蔽物, 海水盐度为 30, 水深为 20 cm。暂养期间温度控制在 (22 ± 0.5) °C, 光照周期为 14 L: 10 D, 连续充气, 溶解氧 DO > 5 mg/L。每天于早 7:30、晚 19:30 过量投喂 2 次鲜活蛤蜊肉 (去除内脏), 及时吸底。每 2 天彻底换水 1 次。暂养 10 d 后转移至水族箱 (55 cm × 30 cm × 35 cm) 中进行温

度驯化。驯化至实验温度, 梭子蟹正常蜕壳 1 次后开始正式实验。水族箱中放置瓦片作为遮蔽物。

1.2 实验设计与温度驯化

实验设 18、22、26 °C 3 个温度水平, 从 22 °C 开始, 以 1 °C/d 的速度向高温、低温同时进行温度调节, 直至实验设定的温度。温度控制系统采用中科海公司设计的控温循环水族箱系统, 低温海水采用制冷水泵处理; 高温海水采用加热棒加热至实验设定的温度, 温度感应探头自动调控加热棒开启和关闭。实验蟹驯化至实验温度后正常蜕壳 1 次, 开始正式实验。驯化及养殖期间的管理同暂养。

实验在水族箱内进行, 每个温度下设 30 个水族箱, 每个水族箱放 1 只实验蟹, 分别于蟹蜕壳后 1、2、8、16 h 及完全硬化时取样, 各实验温度下每个取样点取 4 只蟹。

1.3 样品的采集与测定

用吸水纸吸干梭子蟹的体表水分, 在冰盘上迅速解剖, 去壳后取蟹的肝胰脏、肌肉和鳃, 放入 1.5 mL 的离心管中, 迅速放入液氮中, 而后转入 -80 °C 冰箱保存待测。

取 0.2 g 组织加 1.8 mL 0.86% 的生理盐水于冰水浴中充分研磨, 研磨后 3 500 r/min 离心 15 min, 制成 10% 组织匀浆后分装备用。鳃组织研磨后需 1 500 r/min 离心 15 min。

己糖激酶 (HK)、丙酮酸激酶 (PK) 和琥珀酸脱氢酶 (SDH) 的活力及样本的蛋白含量均采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定, 具体测定参照试剂盒附带的操作说明书进行。

丙酮酸激酶 (PK) 的活力定义: 在 37 °C, pH 7.6 的条件下, 每克组织蛋白每分钟将 1 μmol 的磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 转变为丙酮酸为 1 个活力单位。

己糖激酶 (HK) 的活力定义: 在 37 °C, pH 7.6 的条件下, 每克组织蛋白在本反应体系中每分钟生成 1 mmol 的 NADPH 定义为 1 个酶活力单位。

琥珀酸脱氢酶 (SDH) 的活力定义: 在 37 °C, 每毫克蛋白每分钟使反应体系的吸光度降低 0.01 为 1 个比活力单位。

PK 和 SDH 的活力单位用 U/mg prot 表示, HK 用 U/g prot 表示。

1.4 数据分析

数据结果以平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示。数据统计分析采用 SPSS 13.0 软件进行,以温度(18、22、26 $^{\circ}\text{C}$)和钙化时间点(1、2、8、16 h 和完全硬化状态)为主要因子的 Two-Way ANOVA 分析,采用 Duncan 氏进行多重比较,以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平, $P < 0.01$ 作为差异极显著水平。

2 结果

2.1 温度对钙化过程中三疣梭子蟹肝胰脏中 PK、HK 和 SDH 活力的影响

实验过程中各处理组未观察到梭子蟹死亡或者蟹体活动异常现象。温度对钙化过程中三疣梭子蟹肝胰脏中 PK、HK 和 SDH 活力的影响见图 1 ~ 图 3。由图 1 和图 2 可以看出,三疣梭子蟹肝胰脏中 PK 和 HK 的活力在 3 个温度下,在蜕壳后 1 ~ 2 h 有最大值,随钙化时间的延长,总体呈下降趋势。软壳期梭子蟹肝胰脏中 PK 和 HK 的活力显著高于完全硬化时的活力 ($P < 0.05$)。三疣梭子蟹肝胰脏中 SDH 的活力在 3 个温度下,随钙化时间延长,在软壳期呈上升趋势,在蜕壳后 16 h 有最大值(图 3),显著高于完全硬化状态下 SDH 的活力 ($P < 0.05$)。

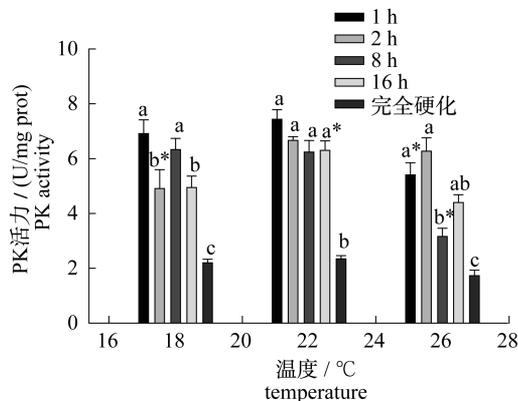


图 1 不同温度下三疣梭子蟹钙化过程中肝胰脏中 PK 的活力

$n = 4$, 图中不同的字母表示相同温度下差异显著 ($P < 0.05$); 不同的符号表示相同时间点下差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Fig. 1 The activities of PK in the liver of *P. trituberculatus* during the calcification process at different temperatures

$n = 4$, different letters indicate significant differences among groups within the same temperature, and different symbols indicate significant differences among groups within the same time point. The same below.

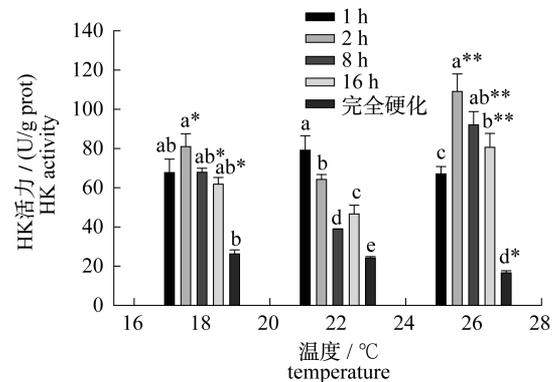


图 2 不同温度下三疣梭子蟹钙化过程中肝胰脏中 HK 的活力

Fig. 2 The activities of HK in the liver of *P. trituberculatus* during the calcification process at different temperatures

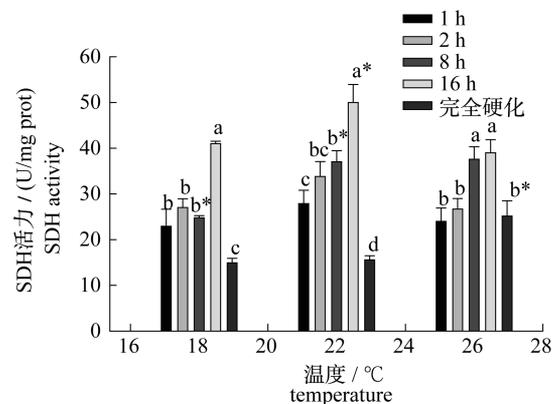


图 3 不同温度下三疣梭子蟹钙化过程中肝胰脏中 SDH 的活力

Fig. 3 The activities of SDH in the liver of *P. trituberculatus* during the calcification process at different temperatures

统计结果显示,温度和时间点的双因子交互作用对三疣梭子蟹肝胰脏的 PK、HK 的活力影响差异不显著 ($P > 0.05$),但对 SDH 活力的影响差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.2 温度对钙化过程中三疣梭子蟹肌肉中 PK、HK 和 SDH 活力的影响

温度对钙化过程中三疣梭子蟹肌肉中 PK、HK 和 SDH 活力的影响分别见图 4 ~ 图 6。由图 4 可以看出,三疣梭子蟹肌肉中 PK 的活力在 18 和 26 $^{\circ}\text{C}$ 下随钙化时间的延长,呈先上升再下降的趋势,而在 22 $^{\circ}\text{C}$ 下则呈上升 - 下降 - 上升的趋势。其中梭子蟹在 26 $^{\circ}\text{C}$ 蜕壳后肌肉中 PK 的活力在前 8 h 均维持较高水平,18 $^{\circ}\text{C}$ 下其活力则在

蜕壳后 2~16 h 较高,都显著高于 26 和 18 °C 下完全硬化时 PK 的活力 ($P < 0.05$)。在 3 个温度下,随蜕壳时间延长,梭子蟹肌肉中 HK 的活力总体呈下降趋势(图 5),但在 18 °C 和 26 °C 下蜕壳后 16 h 活力突然升高。3 个温度下,肌肉中 HK 在软壳期各时间点的活力显著高于完全硬化时 HK 的活力 ($P < 0.05$)。三疣梭子蟹肌肉中 SDH 的活力在 3 个温度下,随钙化过程的进行,均呈先上升再下降的趋势,在蜕壳后 2 h 其活力达最大值(图 6)。26 °C 完全硬化状态下肌肉中 SDH 的活力水平与该温度蜕壳后 1 h 的活力水平相当 ($P > 0.05$),但 18 和 22 °C 在硬化状态下 SDH 的活力显著低于同温度下软壳期各时间点 SDH 的活力 ($P < 0.05$)。

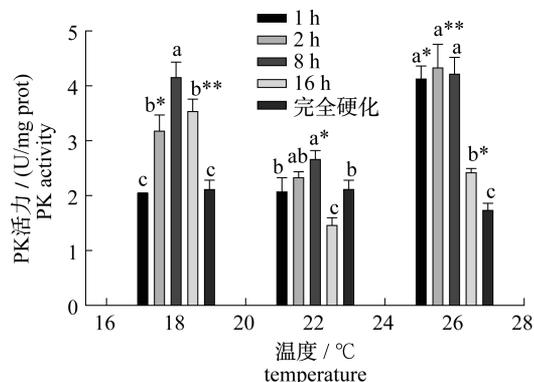


图 4 不同温度下三疣梭子蟹钙化过程中肌肉中 PK 的活力

Fig. 4 The activities of PK in the muscle of *P. trituberculatus* during the calcification process at different temperatures

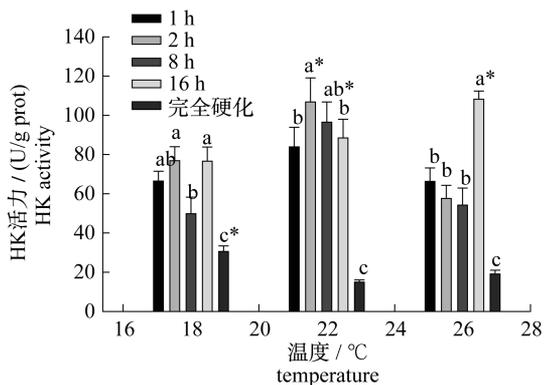


图 5 不同温度下三疣梭子蟹钙化过程中肌肉中 HK 的活力

Fig. 5 The activities of HK in the muscle of *P. trituberculatus* during the calcification process at different temperatures

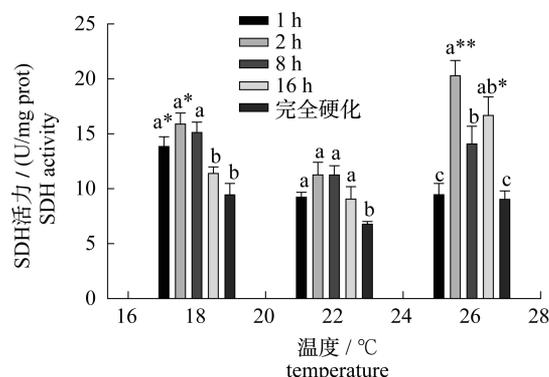


图 6 不同温度下三疣梭子蟹钙化过程中肌肉中 SDH 的活力

Fig. 6 The activities of SDH in the muscle of *P. trituberculatus* during the calcification process at different temperatures

统计结果显示,温度和时间点的双因子交互作用对三疣梭子蟹肌肉组织的 PK、HK 和 SDH 活力影响差异均极显著 ($P < 0.01$)。

2.3 温度对钙化过程中三疣梭子蟹鳃中 PK、HK 和 SDH 活力的影响

温度对钙化过程中三疣梭子蟹鳃中 PK、HK 和 SDH 活力的影响分别见图 7~图 9。由图 7 可以看出,3 个温度下,三疣梭子蟹鳃组织中 PK 的活力随钙化时间的延长总体呈下降趋势,均在蜕壳后 1 h 有最大值,在完全硬化时有最小值,且显著低于其他时间点 PK 的活力 ($P < 0.05$)。三疣梭子蟹鳃中 HK 的活力在 18 和 26 °C 下,随钙化时间的延长,在软壳期先呈上升趋势,在蜕壳后 16 h 达最大值,到完全硬化时活力下降并显著低于蜕壳后 16 h 的活力 ($P < 0.05$) (图 8)。而 22 °C 鳃中 HK 的活力在蜕壳后 1 h 达最大值,其他时间点 HK 活力的变化不明显。在 3 个温度下,梭子蟹鳃中 SDH 的活力随钙化时间的延长,基本呈下降趋势,只在 18 °C 时蜕壳后 16 h 其活力突然升高(图 9)。完全硬化时梭子蟹鳃中 SDH 的活力显著低于软壳期各时间点 SDH 的活力 ($P < 0.05$)。

统计结果显示,温度和时间点的双因子交互作用对三疣梭子蟹鳃组织的 PK 和 HK 的活力影响差异不显著 ($P > 0.05$);对 SDH 的活力影响差异极显著 ($P < 0.01$)。

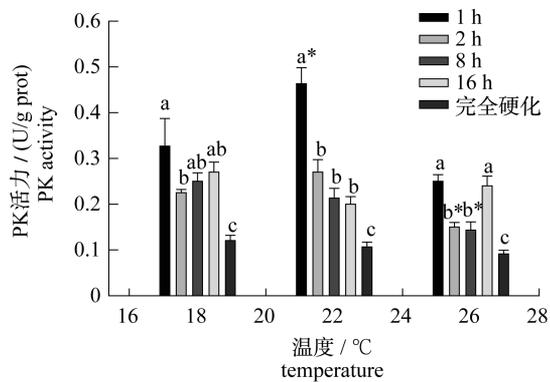


图7 不同温度下三疣梭子蟹钙化过程中鳃中PK的活力

Fig. 7 The activities of PK in the gill of *P. trituberculatus* during the calcification process at different temperatures

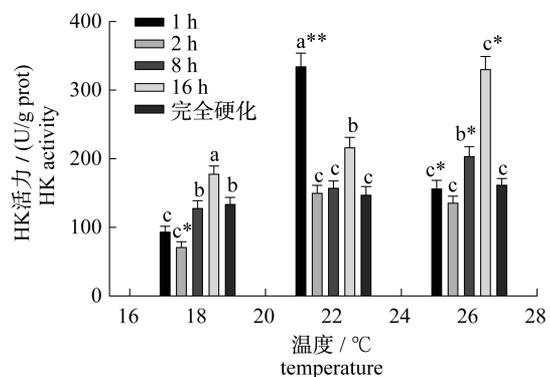


图8 不同温度下三疣梭子蟹钙化过程中鳃中HK的活力

Fig. 8 The activities of HK in the gill of *P. trituberculatus* during the calcification process at different temperatures

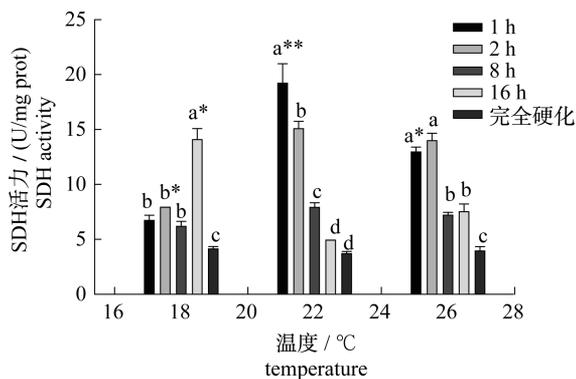


图9 不同温度下三疣梭子蟹钙化过程中鳃中SDH的活力

Fig. 9 The activities of SDH in the gill of *P. trituberculatus* during the calcification process at different temperatures

3 讨论

3.1 温度对三疣梭子蟹钙化过程中无氧代谢的影响

能量代谢酶作为调控甲壳类动物机体能量代谢过程的重要蛋白类物质,受温度影响明显,在调控生物体各种化学反应时具有最适温度范围,超过此范围酶活力大大降低。动物体进行糖代谢时,首先将葡萄糖糖酵解成丙酮酸,同时为机体提供少量能量。PK和HK是糖酵解过程中重要的变构调节酶。PK作为糖酵解途径重要的限速酶之一,对于控制糖酵解过程的速率起关键作用;HK催化的由葡萄糖转变为葡萄糖-6-磷酸的反应为放热反应,对糖酵解有重要调节作用。PK和HK的活力能够反映糖酵解水平的高低^[10]。

研究表明,低温条件下,变温动物可以通过维持较高的糖酵解速率,提高其对低温的耐受性^[11]。Lemos等^[12]研究了圣保罗对虾(*Farfantepenaeus paulensis*)在高温(26 °C)和低温(20 °C)条件下PK的活力,也发现低温条件下PK活力的升高可以抵消低温对对虾的不良影响。本研究中,低温条件下梭子蟹肌肉中的PK活力较高,有利于梭子蟹维持较高的糖酵解速率,进而促进ATP生成和NAD⁺再生,支持了上述结论。与常温(22 °C)相比,高温(26 °C)下三疣梭子蟹肌肉中的PK活力在蜕壳后1~8 h明显升高,说明在高温下梭子蟹肌肉中的糖酵解速率加大,其原因可能是因为高温接近糖酵解酶系的最适温度,酶活力较高,这与Vetter^[13]对甲壳动物进行温度适应时机体内酶系调控的研究结果相一致。此外,本研究中高温和低温条件下肝胰脏和鳃中PK活力的峰值均出现在梭子蟹蜕壳后1~2 h,表明梭子蟹蜕壳后1~2 h有较大的糖酵解速率,这可能与钙化初期梭子蟹呼吸代谢较弱,机体缺氧导致能量主要由糖酵解作用供给有关,而此时梭子蟹肝胰脏和鳃中的SDH的活力较低,8 h后才逐渐升高,支持了以上推论。

研究表明,HK活力的变化取决于动物机体对葡萄糖的利用情况^[1]。本研究中,梭子蟹肝胰脏中HK活力在3个实验温度下随钙化过程的进行呈递减趋势,且显著高于完全硬化时的活力,说明蜕壳后的梭子蟹对葡萄糖的利用能力随钙化程度加强而逐渐减弱。而梭子蟹鳃中HK活力的变

化趋势与肝胰脏中相反,说明鳃对葡萄糖的利用能力随钙化过程的进行而提高,这种差异可能与不同组织在梭子蟹蜕壳后钙化过程中对葡萄糖的利用能力不同有关。

3.2 温度对三疣梭子蟹钙化过程中有氧代谢的影响

有研究发现变温动物体内可能存在一套补偿适应机制,当外界环境温度变化时,动物通过调整自身有氧代谢和内脏膜活动的相关酶活力来适应环境温度^[14]。SDH 参与三羧酸循环途径,与三羧酸循环中的其它酶不同,SDH 是唯一嵌入到线粒体内膜中的酶,因而 SDH 作为线粒体的一个重要组成部分,其活力可在一定程度上反映有氧代谢的水平^[3]。本研究表明,3 个温度下梭子蟹肝胰脏中 SDH 的活力在蜕壳后 16 h 内呈逐渐升高的趋势,说明肝胰脏在钙化过程中,三羧酸循环作用逐渐加强,可以补充糖酵解作用减弱而产生的供能不足,而硬壳状态下 SDH 的活力显著低于软壳状态 ($P < 0.05$),这可能是由于伴随梭子蟹外壳的钙化,钙、镁等离子的吸收和转运等主动运输导致的能量消耗高。相比之下,硬壳状态的梭子蟹代谢相对稳定,SDH 的活力即下降到一般水平。在 3 个温度下,SDH 的活力均随钙化过程的进行呈先上升后下降的趋势,表明三疣梭子蟹肝胰脏中这种供能机制的转变与环境温度无关,与其对能量的需求有关。三疣梭子蟹肌肉组织中 SDH 的活力在 3 个温度下的峰值出现在 2 ~ 8 h,但低温 (18 °C) 的峰值 (15.88 U/mg prot) 明显低于高温 (26 °C) 的峰值 (20.28 U/mg prot),另外其鳃中低温下前 8 h 的 SDH 活力 (6.18 ~ 7.92 U/mg prot) 明显低于高温下前 8 h 的活力 (7.20 ~ 13.98 U/mg prot),说明相对于低温而言,高温条件下梭子蟹的肌肉和鳃中有氧代谢的加强更显著,而有氧代谢能力的提高保证了蟹体的持续游动。很多研究表明,随环境温度升高,蟹类的活动量加大、摄食量增多、耗氧率和排氨率增加^[15-18],支持了本研究的结论。而低温条件下虾蟹类有氧代谢水平的降低与其活动量的减少及耗氧率、排氨率的降低的趋势相一致^[19-20]。

本研究还发现温度和钙化时间点的双因子交互作用对三疣梭子蟹肌肉中糖酵解酶系和 SDH 的活力影响极显著;对肝胰脏和鳃中的 SDH 的活力影响也极显著,表明温度和钙化时间点对三疣

梭子蟹无氧代谢和有氧代谢有明显的交互效应。

综上所述,在钙化过程中,低温条件下三疣梭子蟹的糖酵解作用无明显的变化,而三羧酸循环有较明显的减弱趋势,其中三疣梭子蟹肌肉和鳃中的 SDH 活力明显低于高温条件,表明低温确实可以延长其蜕壳后的软壳时间。

参考文献:

- [1] Susana S A, Francisco J A, María P M R, et al. Time course of osmoregulatory and metabolic changes during osmotic acclimation in *Sparus auratus* [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2005, 208: 4291 - 4304.
- [2] Laiz-Carrión R, Martín D R M P, Miguez J M, et al. Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata* [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2003, 298 (2): 105 - 118.
- [3] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学 [M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2002:104 - 105.
- [4] Travis D F. The molting cycle of the spiny lobster *Panulirus argus* Latreille. IV. Post-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues [J]. *Biological Bulletin of the Marine Biological Laboratory*, 1957, 113 (3): 451 - 479.
- [5] 王顺昌,魏亦军,申德林. 中华绒螯蟹蜕皮过程中肌肉、肝胰脏和甲壳中钙和磷含量的变动 [J]. *水产学报*, 2003, 27 (3): 219 - 224.
- [6] 常文东. 瞄准顾客需求 专育软壳螃蟹 [J]. *科学种养*, 2008 (11): 8 - 9.
- [7] Perry H, Trigg C, Larsen K, et al. Calcium concentration in seawater and exoskeletal calcification in the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. *Aquaculture*, 2001, 198 (3 - 4): 197 - 208.
- [8] Cameron J N. Post-moult calcification in the blue crab (*Callinectes sapidus*): relationships between apparent net H⁺ excretion, calcium and bicarbonate [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1985, 119: 275 - 285.
- [9] Luis V C, Francisco J A, Sergio P, et al. Interactive effects of environmental salinity and temperature on metabolic responses of gilthead sea bream *Sparus aurata* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2009, 154 (3): 417 - 424.
- [10] Greenberg D M. *Metabolic pathways* [M]. New

- York: Academic Press, 1960.
- [11] Raúl L C, Susana S A, José M G. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 27(3-4): 179-188.
- [12] Lemos D, Salomon M, Gomes V, *et al.* Citrate synthase and pyruvate kinase activities during early life stages of the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae): effects of development and temperature [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 135(4): 707-719.
- [13] Vetter R A H. Ecophysiological studies on citrate-synthase: (I) enzyme regulation of selected crustaceans with regard to temperature adaptation [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 1995, 165(1): 46-55.
- [14] 周小愿, 韩亚慧, 张林林, 等. 变温动物特殊动力作用的研究进展 [J]. *经济动物学报*, 2009, 13(2): 115-120.
- [15] Zou E M, Du N S, Lai W. The effects of mass temperature and thermal acclimation on the respiration rate of Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapod) [J]. *Zoological Research*, 1995, 16(1): 49-58.
- [16] 廖永岩, 肖展鹏, 袁耀阳. 三疣梭子蟹幼体和幼蟹的温度适应性 [J]. *水生生物学报*, 2008, 32(4): 534-543.
- [17] Dehnel P A. Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of two intertidal crabs [J]. *Biological Bull*, 1960, 118(2): 215-249.
- [18] Dimock J R V, Groves K H. Interaction of temperature and salinity on oxygen consumption of the estuarine crab *Panopeus herbstii* [J]. *Marine Biology*, 1975, 33(4): 301-308.
- [19] Emmerson W D. Oxygen consumption in *Palaemon pacificus* (stimpson) (Decapoda: Palaemonidae) in relation to temperature, size and season [J]. *Comparative Biochemistry Physiology Part A: Physiology*, 1985, 81(1): 71-78.
- [20] 董双林, 堵南山, 赖伟. 日本沼虾生理生态学研究: I. 温度和体重对其代谢的影响 [J]. *海洋与湖沼*, 1994, 25(3): 233-237.

Effects of temperature on energy metabolic enzymes of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) in the post-molt stage

DAI Chao, WANG Fang*, FANG Ziheng, DONG Shuanglin

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The present work was carried out to study the effect of temperature on some metabolic enzyme activities in the female swimming crab (*Portunus trituberculatus*) during its calcification process in laboratory. Activities of PK, HK and SDH were measured in hepatic, muscular and branchial tissue of the swimming crab at 1, 2, 8, 16 h after molting and the completely hardening stage at different temperatures (18 °C, 22 °C, 26 °C), respectively. The primary results are recorded as follows: ① Compared to moderate temperature (22 °C), PK activity in muscle of *P. trituberculatus* was found to be significantly increased during 1 – 8 h after molting at higher temperature (26 °C) and lower temperature (18 °C), indicating that the glycolysis rate increased in muscular tissue of the swimming crab at higher and lower temperatures; PK dynamics was found to be peaked in hepatic and branchial tissues of *P. trituberculatus* at 1 – 2 h after molting which showed a greater rate of glycolysis in these two tissues. ② HK activity in the hepatic tissue of *P. trituberculatus* decreased during the calcification process in all treatments. HK activity in the liver at 1 – 16 h was significantly higher than the activity of calcified status, indicating a gradually decreased utilizing capacity of glucose in liver of *P. trituberculatus* during the calcification process. However, the branchial HK activities showed an opposite dynamic trend compared with that in hepatic tissue, which projected an increased utilizing capacity of glucose levels in gills of *P. trituberculatus* during the calcification process. The difference may be related to different capabilities to use glucose in different tissues of the swimming crab during calcification process. ③ SDH activity in hepatic tissue of *P. trituberculatus* in the all treatments was found to be gradually increased within 16h after molting, indicating that a gradual strengthening of the citric acid cycle in the liver during calcification process. In addition, SDH dynamics was found to be peaked in muscular and branchial tissues of crab occurring within 8h after molting in the all treatments. The activity of SDH at low temperature (18 °C) was significantly lower than that at high temperature (26 °C). The statistics described above showed an aerobic strengthening in muscular and branchial tissues of *P. trituberculatus* at high temperature compared to the low temperature. In summary, glycolysis process under low temperature conditions did not change significantly, while the citric acid cycle had been significantly weakened during the calcification process. The activity of SDH in muscle and branchial tissues of *P. trituberculatus* at lower temperature was significantly lower than that at higher temperature, indicating that lower temperature can indeed extend the time of its soft-shell stage after molting.

Key words: *Portunus trituberculatus*; calcification process; hexokinase (HK); pyruvate kinase (PK); succinate dehydrogenase (SDH)

Corresponding author: WANG Fang. E-mail: wangfang249@ouc.edu.cn