

文章编号:1001-5132 (2009) 03-0337-06

黑鲷(*Girella leonina*)淀粉酶与蛋白酶的活力研究

孙 敏¹, 徐善良^{2*}, 肖云朴³, 吕惠明¹

(1.宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211; 2.宁波大学 海洋生物工程浙江省重点实验室 浙江 宁波 315211; 3.平阳县海洋与渔业局, 浙江 平阳 325400)

摘要: 通过测定 1⁺龄黑鲷的胃、盲囊、肝脏和肠道 4 个消化组织中蛋白酶和淀粉酶活性, 并研究其与温度及 pH 值的关系, 可以为黑鲷的合理投饵提供理论依据。实验设 9 个温度梯度(10~50) 和 14 个 pH 缓冲液梯度(pH 2.0~9.0), 用淀粉 - 碘显色法测淀粉酶活力, 用福林 - 酚试剂法测蛋白酶活力。结果表明: 黑鲷盲囊、肠道中淀粉酶和蛋白酶活力均较高, 最适温度为 35 , 淀粉酶最高活力为每克鲜组织 46.02 U 和 42.61 U, 蛋白酶最高活力为每克鲜组织 156.52 U 和 147.79 U; 胃中酶的最适温度为 40 , 肝脏中淀粉酶温度要求稍低, 最适温度为 30 , 酶活力值也最低; 胃淀粉酶和胃蛋白酶最适 pH 值分别为 6.5 和 3.5, 盲囊、肠道和肝脏组织中的最适 pH 值相近, 为 7.0~8.0。可以认为黑鲷胃中主要存在着酸性蛋白酶, 胃是食物蛋白质初步分解消化的场所; Q₁₀ 值充分反映了温度对消化酶活力的影响, 当温度从 10 上升至 20 时, 2 种消化酶活力增幅显著, 可作为开始投饵的温度指标。

关键词: 黑鲷; 淀粉酶; 蛋白酶; 酶活力

中图分类号: S965.225

文献标识码: A

黑鲷(*Girella leonina*)隶属鲈形目、鲈亚目、鲈科、鲈属, 在闽粤沿海俗称“黑鲤”。主要分布于西太平洋区的日本至中国东海南部以及台湾附近海域, 栖息于近岸岩礁区的 1~30 m 水层。黑鲷食性杂, 在冬季以藻类为主食, 其余季节以中小型无脊椎动物等为食, 在人工饲养条件下亦可食小杂鱼等。黑鲷性温和, 耐低氧能力强, 易驯养, 在网箱中可与大黄鱼等混养。黑鲷肉质细嫩, 清蒸、薰烤、制成生鱼片食用均可。过去其渔获量主要来自岛礁附近的渔钓^[1], 目前已在我国台湾、福建、广东

及浙江南部沿海开展人工养殖, 但是对黑鲷的基础生物学研究甚少, 国内仅见姚善成等^[2]的鲈鱼种群和地理变异研究, 以及陈舜等^[3]的网箱养殖试验研究。国外研究主要集中在鲈属的分类等方面^[4-5]。消化酶是鱼类消化生理的重要研究内容之一, 淀粉酶及蛋白酶是鱼体内最重要的 2 种消化酶。通过研究黑鲷消化道各部位及肝胰脏中蛋白酶和淀粉酶活性与温度及 pH 值的关系, 可以为黑鲷的合理投饵和科学管理提供理论指导, 并为今后配合饲料的研制提供理论依据。

收稿日期: 2008-11-16.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 浙江省科技厅重点科研项目(2007C22044)。

第一作者: 孙 敏(1984 -), 男, 浙江临海人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 鱼类生物学。E-mail: towtoo@126.com

*通讯作者: 徐善良(1962 -), 男, 浙江舟山人, 副研究员, 主要研究方向: 海水鱼类健康养殖。E-mail: xushanliang@nbu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验所用 1⁺龄黑鲢, 于 2008 年 3~4 月, 取自福鼎市八尺门海水养殖网箱, 用尼龙袋充氧后装于泡沫盒中运回实验室, 置于水族箱内暂养 72 h, 期间不投喂饵料. 共解剖取材 30 尾, 体重(351.43±51.79)g, 体长(21.18±1.14)cm.

1.2 酶液的制备

在冰盘上活体解剖, 取出肝脏、胃、盲囊、肠, 仔细去除各组织上的脂肪, 用冰冷去离子水反复冲洗内容物和血渍等, 并将肠道均分为 3 等份, 分别称为肠 I、肠 II 和肠 III, 然后用滤纸吸干表面水分, 放入预冷的离心管内, 置于超低温冰箱内分别保存. 测定酶活力前, 将多尾黑鲢的同种组织均匀混合, 用分析天平称重, 然后加入 10 倍重量的冷冻去离子水, 匀浆机内匀浆并在 9 000 rpm 下离心 20 min 后, 取其上清液置于 4 ℃ 冰箱内保存, 24 h 内测定完毕.

1.3 测定方法

1.3.1 温度梯度设定

用恒温水浴锅控制温度, 共设 9 个梯度, 温度范围为 10~50 ℃, 梯幅为 5 ℃. 分别测定 2 种酶在不同温度下的活力, 胃蛋白酶测定时设定 pH 为 3.0, 其他组织蛋白酶测定时 pH 设定为 7.0; 淀粉酶测定时的 pH 均为 7.0.

1.3.2 pH 值梯度设定

pH 值缓冲液分 14 个梯度, 范围为 2.0~9.0, 梯幅为 0.5, 用酸度计校正(pH=±0.1); 缓冲体系见文

献[6-7]. 测定 35 ℃ 温度时不同 pH 下的酶活力.

1.3.3 淀粉酶与蛋白酶的测定方法

采用淀粉-碘显色法测定淀粉酶活力^[8], 722 型分光光度计用波长 660 nm 处进行比色测定. 一个单位淀粉酶活力(U)定义为: 在一定温度与 pH 值条件下, 30 min 内淀粉酶能完全水解淀粉 10 mg; 采用福林-酚试剂法^[9]测蛋白酶活力, 722 型分光光度计在波长 680 nm 处进行比色测定. 一个单位蛋白酶活性(U)定义为: 在一定 pH 值和温度条件下, 底物酪蛋白浓度为 20 mg·mL⁻¹, 每分钟每克组织蛋白酶水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸. 组织中酶活性以 1 g 新鲜组织中所含酶活力单位数量(U·g⁻¹)表示.

1.4 数据处理

采用 SPSS 统计软件进行分析, 检验各实验组间数据的差异显著性.

2 实验结果

2.1 温度对淀粉酶和蛋白酶活力的影响

2.1.1 不同温度下各部位淀粉酶活力

在 10~50 ℃ 条件下, 胃、盲囊、肝脏和肠道 4 个消化组织中淀粉酶活力测定结果见图 1 和图 2. 由图 1 可见, 盲囊和肠道中的淀粉酶活力显著高于胃和肝脏; 盲囊和肠道在 35 ℃ 时, 淀粉酶活力达到最高值, 约为 46.02 U·g⁻¹ 和 42.61 U·g⁻¹, 此后迅速下降; 而胃和肝脏分别在 30 ℃ 和 40 ℃ 时达到峰值, 且酶活力仅为前两者的 1/2 水平; 15~40 ℃ 之间, 各组织淀粉酶活性变幅较小, 温度低于 15 ℃ 和高于 40 ℃ 时, 4 种组织的淀粉酶活性均表现为较低水

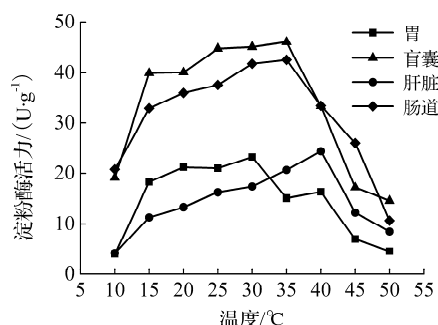


图 1 不同温度下 4 种消化组织中淀粉酶活力变化

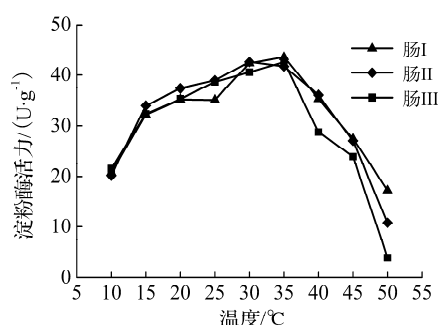


图 2 不同温度下肠道不同部位淀粉酶活力变化

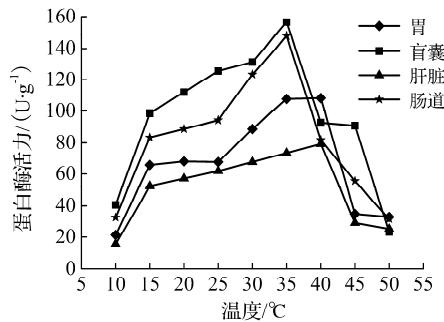


图3 不同温度下四种消化组织中蛋白酶活力变化

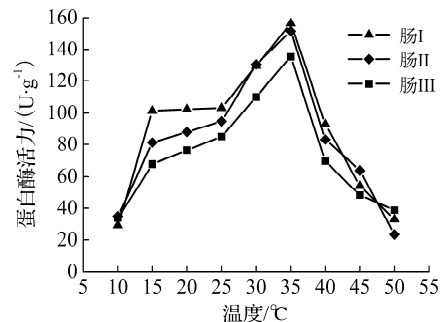


图4 不同温度下肠道不同部位蛋白酶活力变化

平. 比较图2中的肠I、肠II和肠III的淀粉酶活力可知, 三者的活力无显著差异($P>0.05$).

2.1.2 不同温度下各部位蛋白酶活力

不同温度下的蛋白酶测定结果见图3和图4, 图3表明, 与淀粉酶相似, 盲囊和肠道的蛋白酶活力高于肝脏和胃, 前两者的活力最大值出现在35℃, 分别为 $156.52 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $147.79 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, 后两者出现在40℃, 分别为 $108.21 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $79.23 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$; 峰值前随温度升高, 蛋白酶活力逐渐上升, 高峰过后, 活力迅速下降, 尤以肠道和盲囊变化明显. 由图4可见, 肠3个部位的蛋白酶变化趋势基本一致, 其中以肠I最高, 肠III的酶活力略低于肠I和肠II, 经检验, 前两者差异不显著, 但与肠III相比差异显著($P<0.05$).

2.1.3 蛋白酶和淀粉酶的Q10值

表1 2种消化酶的温度系数(Q10)

酶	温度/	胃	盲囊	肝脏	肠道
淀粉酶	10~20	5.31	2.10	3.22	1.73
	20~30	1.10	1.12	1.30	1.16
	30~40	0.70	0.74	1.41	0.80
	40~50	0.28	0.44	0.35	0.32
蛋白酶	10~20	3.20	2.76	3.69	2.71
	20~30	1.31	1.17	1.19	1.38
	30~40	1.22	0.71	1.17	0.66
	40~50	0.30	0.25	0.32	0.39

由不同温度下4种组织的淀粉酶和蛋白酶的活力值计算得到 $Q_{10}^{[10]}$, 见表1. 由表1可知, 10~20℃时, 2种酶的 Q_{10} 值最大, 普遍为2.0以上; 20~30℃时, Q_{10} 为1.1~1.38; 30~40℃时, Q_{10} 值为

0.66~1.41; 40~50℃时, Q_{10} 值小于0.44.

2.2 pH值对淀粉酶和蛋白酶活力的影响

2.2.1 不同pH值下各部位淀粉酶活力

在温度35℃, pH 2.0~9.5条件下, 胃、盲囊、肝脏和肠道4个消化组织中的淀粉酶活力测定结果见图5和图6. 图5表明, 在pH 3.5~5.0时, 4种组织的淀粉酶活力无显著差异; pH 2.0~3.5时只有胃淀粉酶仍有活力; pH>5.0时, 盲囊和肠道的淀粉酶活力迅速上升; 在pH为7.0时活力达到最大值, 分别为 $50.10 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $46.84 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$; pH 7.5~8.5时, 活力处于平台期, 约为峰值的50%; pH大于8.5时, 盲囊的淀粉酶活力急剧下降而肠道的淀粉酶活力仍保持较高水平. 胃及肝脏的淀粉酶活力较低, 峰值仅为 $21.03 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $25.51 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. 胃淀粉酶在弱酸性(pH 6.5)时活性最大, 肝脏的活力高峰出现在弱碱性(pH 7.5)时. 图6表明, 不同pH下肠道的淀粉酶活力表现出肠III>肠II>肠I, 但pH<4.5时只有肠I仍有微弱活力.

2.2.2 不同pH值下各部位蛋白酶活力

由图7可知, 不同pH下4种组织的蛋白酶活力也以盲囊和肠道为高, 胃次之, 肝脏最低; 胃蛋白酶活力的变化与其他3种组织截然不同, 其高峰出现在pH 3.5时. 当pH为2.0时其活力仍高达峰值的50%, 而盲囊、肝脏及肠道的蛋白酶高峰分别出现在pH 7.5和8.0时, 在pH 4.0以下时已无活力; 胃蛋白酶的最大活力为 $107.25 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, 盲囊为 $161.53 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, 肝脏为 $76.80 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, 肠为 $161.67 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. 由图8可见, 肠I和肠II在pH 8.0时的峰值, 分别为

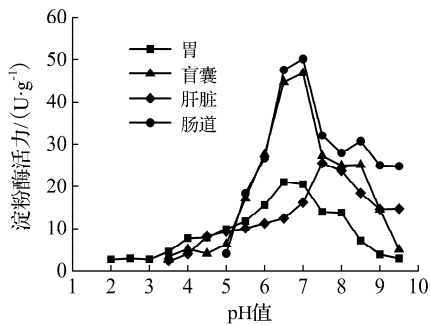


图5 不同pH时4种消化组织淀粉酶活力变化(35)

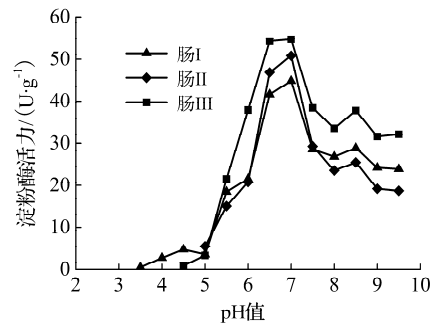


图6 不同pH时肠道各部位淀粉酶活力变化(35)

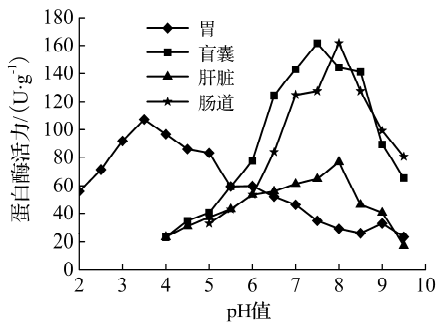


图7 不同pH时4种消化组织的蛋白酶活力变化(35)

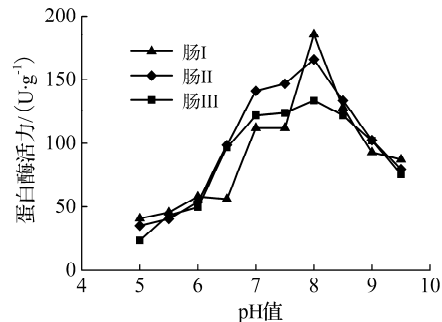


图8 不同pH下肠道各部位蛋白酶活力变化(35)

185.51 $U \cdot g^{-1}$ 和 166.18 $U \cdot g^{-1}$, 肠 III 峰值最低为 133.33 $U \cdot g^{-1}$. 当 $pH > 7.0$ 时的平均蛋白酶活力为 $(120.24 \pm 27.81) U \cdot g^{-1}$, 显著大于酸性条件下的蛋白酶活力 $((67.65 \pm 37.27) U \cdot g^{-1})$. 当 pH 小于 5.0 时蛋白酶活力较低, 实验中未测得.

3 讨论

3.1 消化酶活力与温度的关系

温度是酶促反应的基本条件之一, 因此温度是影响鱼类消化酶活力的重要因素. 从上述实验结果可知, 黑鲷淀粉酶最适温度在肠道和盲囊中为 35, 胃和肝脏中分别为 30 和 40; 蛋白酶的最适温度在肠道与盲囊中为 35, 胃和肝脏均为 40. 有研究表明^[11], 鱼类消化酶的体外实验所得最适温度一般为 30~50. 邱晓寒等^[12]研究得到花鲢(*Hemibarbus maculatus*)肠道及肝胰脏的蛋白酶最适温度为 40. 叶元土等^[13]则认为南方大口鲶(*Silurus meridionalis*)和长吻鲇(*Leiocassis longirostris*)蛋白酶、淀粉酶的最适温度分别为

36~41 和 36~45. 由此可见, 一般鱼类的消化酶最适温度高于鱼体耐受上限温度, 我们实验结果与上述结论相一致, 最适温度均高于 30.

另外, 从 2 种消化酶的 Q_{10} 值变化也充分反映了温度对消化酶活力的影响, 10~20 时, 各组织的淀粉酶和蛋白酶的 Q_{10} 值均大于 2, 显著高于各自在 20~30 时的 Q_{10} 值, 说明温度由 10 上升至 20 时, 2 种消化酶活力增幅显著, 可以作为开始投饵的指示温度; 超过 20 以上时, 消化酶活力增幅减小, 高于 30 后, 甚至某些组织的酶活力出现小幅下降, 所以温度 20~40 阶段 Q_{10} 值波动于 1.0 上下; 40~50 时 Q_{10} 值仅为 0.25~0.44, 表明温度高于 40 以后酶活力出现显著下降. 故温度对黑鲷消化酶活力产生了显著影响. 黑鲷的生存温度为 7.3~30.8, 最适生长水温是 19~28, 12 以下基本不摄食^[3], 以上实验结果与事实相符.

研究还表明, 随环境水温增高消化酶能获得更大的活力. 田宏杰等^[14]以饲养在 14~28 水温条件下的施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)幼鱼为材料, 检测得到幼鱼消化器官十二指肠和胃的蛋白酶活

力在 28 ℃ 时最高, 在 14 ℃ 时最低, 认为在适宜温度范围内, 鱼类消化酶活力与环境温度呈正相关。因此, 在黑鲷养殖过程中, 春天随海水温度回升至 15 ℃ 左右时, 黑鲷的蛋白酶与淀粉酶活力逐渐恢复, 可以开始少量投喂; 随着水温的不断升高, 消化能力增强, 可适量增加投喂率; 而当冬季水温下降至 20 ℃ 以下时, 应逐渐减少投喂量, 以免造成饵料的浪费。

3.2 消化酶活力与 pH 的关系

pH 值是影响鱼类消化酶活力的另一个重要因素, 蛋白酶和淀粉酶活力随 pH 值的不同而发生显著变化, 在各消化组织中 pH 的影响又不尽相同。黑鲷胃淀粉酶和胃蛋白酶适应了胃酸环境, 比盲囊、肝脏和肠道中的消化酶更耐酸性, 最适 pH 值分别为 6.5 和 3.5, 尤其是胃蛋白酶在 pH 为 2.0 的强酸条件下活力仍然可达 $56.10 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$; 而 2 种消化酶在盲囊、肠道和肝脏组织中的最适 pH 值相近, 为 7.0~8.0。这一现象表明, 黑鲷胃中主要存在着酸性蛋白酶, 盲囊、肠道和肝脏组织中则存在更多的碱性蛋白酶, 胃液的酸性环境更有利于胃蛋白酶作用的发挥, 而不利于淀粉酶活力的发挥^[15]。这与其他具有胃的肉食性鱼类相似, 胃是食物蛋白质初步分解消化的场所。

3.3 黑鲷体内消化酶分布特点

黑鲷消化组织中淀粉酶和蛋白酶活力以盲囊和肠道中酶活力最高, 肝脏中酶活力值最低, 这与黑鲷的盲囊和肠道的粘膜层具非常丰富的褶皱, 直接参与消化吸收的事实相一致; 另外, 通过肠道消化酶的分段检测, 还发现蛋白酶离胃越近活力越高, 依次为: 肠 I>肠 II>肠 III; 淀粉酶则相反为: 肠 III>肠 II>肠 I。由此表明, 由于胃的酸性环境抑制了淀粉酶活力, 盲囊和肠道才是淀粉等多糖消化分解的主要场所; 胃是蛋白质分解消化的粗加工场所, 受其影响与其相连的肠道前段的蛋白酶活力也高于中段和后段。黑鲷具有发达的幽门盲囊, 分支数量多达 150 条, 从 2 种消化酶活性来看,

盲囊是除胃与肠道外重要的消化场所。黑鲷肝脏的淀粉酶和蛋白酶活力明显低于其他部位, 这可能与肝脏分泌的大部分为蛋白酶原需要在肠致活酶的作用下激活有关^[16]。

4 结论

黑鲷淀粉酶与蛋白酶的研究结果表明: 黑鲷消化组织中淀粉酶和蛋白酶活力以盲囊和肠道酶活力最高, 肝脏中酶活力值最低; 淀粉酶和蛋白酶的最适温度为 30~40 ℃, 在此温度下消化酶活力最高; 10~20 ℃ 时, Q_{10} 值最大, 温度对消化酶活力影响最显著。在冬季水温 12 ℃ 以下时应停止投喂, 春季水温 15 ℃ 左右要恢复投喂; 在各消化组织中消化酶对 pH 的适应不尽相同, 黑鲷的胃中主要存在着酸性蛋白酶, 盲囊、肠道和肝脏组织中存在更多的则是碱性蛋白酶。胃液的酸性环境更有利于胃蛋白酶作用的发挥, 而不利于淀粉酶活力的发挥; 盲囊和肠道是淀粉等多糖消化分解的主要场所, 胃是蛋白质分解消化的粗加工场所。

参考文献:

- [1] 沈世杰. 台湾鱼类志[M]. 台北: 国立台湾大学动物学系印行, 1993.
- [2] 姚善成, 李凤歧. 日本产鲷鱼 *Girella punctata* 种群和地理变异的研究[J]. 海洋通报, 1988, 7(2):87-94.
- [3] 陈舜, 肖云朴. 南麂列岛海域黑鲷网箱养殖试验初报[J]. 水产科技情报, 2008, 35(1):1-8.
- [4] Naoki Y, Tetsuji N. Revision of the genus *Girella* (Girellidae) from East Asia[J]. Ichthyol Res, 1999, 47(2): 119-135.
- [5] Naoki Y, Tetsuji N. Evolutionary trend in feeding habits of *Girella*[J]. Ichthyol Res, 2003, 50:358-366.
- [6] 吴仁协, 戈薇, 洪万树, 等. 大弹涂鱼成鱼消化酶活性的研究[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1):99-105.
- [7] 吴仁协, 洪万树, 张其永, 等. 中华乌塘鳢成鱼消化酶活性的研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2007, 46(1):118-122.
- [8] 周景祥, 张东鸣, 黄权, 等. 大眼鲷淀粉酶活性的研

- 究[J]. 吉林农业大学学报, 1999, 21(增刊):65-67.
- [9] 周景祥, 张东鸣, 黄权, 等. 大眼鲮蛋白酶活性的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2000, 22(3):107-110.
- [10] 寿建昕, 沈文英, 祝尧荣, 等. 翘嘴红鲌胃、肠道及肝脏主要消化酶活力的研究[J]. 水产科学, 2007, 26(2): 99-102.
- [11] John EH. Fish nutrition[M]. California: Academic Press Inc, 1987.
- [12] 邱晓寒, 叶元土, 蔡卫俊. 花鲮肠道和肝胰脏蛋白酶、淀粉酶活力的研究[J]. 水产养殖, 2007, 28(14):24-26.
- [13] 叶元土, 林仕梅, 罗莉, 等. 温度、pH 值对南方大口鲶、长吻鱼蛋白酶和淀粉酶活力的影响[J]. 大连水产学院学报, 1998, 13(2):17-23.
- [14] 田宏杰, 庄平, 章龙珍, 等. 水温对施氏鲟幼鱼消化酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1):126-131.
- [15] Hoar W S, Randall D J, Brett J R, et al. Fish physiology [M]. New York: Academic Press, 1979.
- [16] 高春生, 齐子鑫, 范光丽, 等. 淇河鲫鱼消化酶活性研究[J]. 水利渔业, 2006, 26(1):7-8.
- [17] 倪寿文, 桂远明, 刘焕亮. 草鱼、鲤、鲢、鳙和尼罗罗非鱼肝胰脏和肠道蛋白酶活性的初步探讨[J]. 1992, 39(2):161-168.
- [18] 王海英. 大菱鲆主要消化酶——蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.

Study on Activities of Amylase and Protease of *Girella leonina*

SUN Min¹, XU Shan-linag^{2*}, XIAO Yun-pu³, Lü Hui-ming¹

(1.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

3.Pingyang Ocean and Fishery Bureau, Pingyang 325400, China)

Abstract: This paper measures amylase and protease in the four digestive organ of *Girella leonina* to find how digestive enzyme activity changes given different temperature and pH value. Nine temperature gradient (10~50) and 14 pH gradient buffer (pH 2.0~9.0) are set up in the experiment conducted in this research using starch-iodine chromogenic method for amylase activity and Folin-phenol reagent method for protease. The results show that the optimal temperature for both amylase of diverticulum and intestine is 35 , their maximal dynamic value of amylase accounts for 46.02 U·g⁻¹ fresh organizations and 42.61 U·g⁻¹ fresh Organization, respectively. For protease, the value are 156.52 U·g⁻¹ fresh organizations and 147.79 U·g⁻¹ fresh Organization, respectively. Stomach enzyme optimum temperature is found to be 40 , and liver amylase optimum temperature requirements is noted for being slightly lower than 30 , which reaches the lowest value of enzyme activity. The optimum pH values for stomach are 6.5 and 3.5, whereas the optimum pH value for diverticulum, intestine and liver tissue turns out to be close to 7.0~8.0. As a result, acid protease is the major protease in stomach, stomach is also the initial decomposition place for digestion. The value of Q_{10} reflects the influence of temperature on the digestive enzyme activity, so the temperature indicators should be counted as the beginning of feeding.

Key words: *girella leonine*; amylase; protease; enzyme activity

CLC number: S965.225

Document code: A

(责任编辑 史小丽)