

# 温度和 pH 值对斜带髯鲷蛋白酶、淀粉酶活性的影响

李加儿<sup>1</sup> 张建强<sup>1,2</sup> 许晓娟<sup>1,2</sup> 区又君<sup>1</sup> 陶启友<sup>1</sup> 郭根喜<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

(<sup>2</sup> 上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

**摘要** 研究了温度和 pH 值对斜带髯鲷 *Hapalogenys nitens* 蛋白酶、淀粉酶活性的影响。结果表明,斜带髯鲷胃内 pH 值范围为 4.9~5.4;肝胰脏 pH 值为 5.8~6.2;肠道 pH 值为 6.5~6.9。蛋白酶活性随温度的上升而增加,在 40 °C 达最大,40 °C 以上酶活性随温度的上升而下降。在不同消化器官中,蛋白酶活性大小顺序为:胃>前肠>幽门盲囊>后肠>肝胰脏。在 15~50 °C 范围内,斜带髯鲷消化道不同部位淀粉酶活性的最适温度均为 35 °C,淀粉酶活性由高到低顺序为:肝胰脏>幽门盲囊>前肠>后肠>胃。在 pH 值为 2.2~7.6 范围内,胃蛋白酶活性的最适 pH 值为 2.8;在 pH 值为 4.8~8.0 范围内,其他消化器官蛋白酶的最适 pH 值均为 7.2;在最适 pH 值下,各消化器官中的蛋白酶活性由高到低顺序为:前肠>幽门盲囊>后肠>肝胰脏。在 pH 值为 4.8~8.0 范围内,胃淀粉酶活性的最适 pH 值为 6.0,肠、肝胰脏与幽门盲囊淀粉酶的最适 pH 值均为 6.8,活性由高到低顺序为:肝胰脏>幽门盲囊>前肠>后肠>胃。在最适温度和 pH 值下,蛋白酶活性由高到低顺序为:胃>前肠>幽门盲囊>后肠>肝胰脏;淀粉酶活性由高到低顺序为:肝胰脏>幽门盲囊>前肠>后肠>胃。

**关键词** 斜带髯鲷 温度 pH 值 蛋白酶 淀粉酶 活性

中图分类号 Q556;Q48 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2009)03-0007-06

## Effects of temperature and pH on the protease and amylase activities in skewband grunt *Hapalogenys nitens*

LI Jia-er<sup>1</sup> ZHANG Jian-qiang<sup>1,2</sup> XU Xiao-juan<sup>1,2</sup>

OU You-jun<sup>1</sup> TAO Qi-you<sup>1</sup> GUO Gen-xi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300)

(<sup>2</sup> College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, 201306)

**ABSTRACT** The effects of temperature and pH on protease and amylase activities in skewband grunt *Hapalogenys nitens* was studied. Results showed that the pH values of the stomach, hepatopancreas and intestine were 4.9~5.4, 5.8~6.2; and 6.5~6.9 respectively. Protease activity rose with the increase of water temperature with a peak at 40 °C, and then decreased. The order of protease activity was as follows: stomach>foregut>pyloric caecum>hindgut>hepatopancreas. The optimum temperature for amylase in *H. nitens* was 35 °C within the range of 15

国家 115 科技支撑计划项目(2006BAD09A14)、国家高新技术研究发展(863)计划项目(2006AA100301)和广东省科技计划项目(2004A20105002)共同资助

收稿日期:2008-03-14;接受日期:2008-05-24

作者简介:李加儿(1954-),男,研究员,主要从事水产养殖基础生物学和繁殖技术研究。E-mail:lje001@126.com

~50 °C; the order of amylase activity was as follows: hepatopancreas>pyloric caecum>foregut>hindgut>stomach. The optimum pH for protease activity in stomach was 2.8 °C within the range of 2.2~7.6, while the optimum pH for protease activity in other digestive organs was 7.2 °C with in the range of 4.8~8.0. Under the optimum pH conditions, the order of protease activity in different organs was as follows: foregut>pyloric caecum>hindgut>hepatopancreas. The optimum pH for protease activity in stomach was 6.0 in the range of 4.8~8.0. The optimum pH for amylase activity in stomach was 6.0 while it was 6.8 in intestine, hepatopancreas and pyloric caecum. The order of amylase activity was as follows: hepatopancreas>pyloric caecum>foregut>hindgut>stomach. Under the optimum temperature and pH conditions, the order of protease activity was as follows: stomach>foregut>pyloric caecum>hindgut>hepatopancreas, while that of amylase activity was: hepatopancreas>pyloric caecum>foregut>hindgut>stomach.

**KEY WORDS** Skewband grunt *Hapalogenys nitens* Temperature pH Protease Amylase Activity

鱼类消化酶不仅是鱼类消化生理的重要研究内容,而且了解这些酶的特性也能为人工配合饲料的研制提供科学的理论依据。随着鱼类营养学和饲料学研究的拓展和深入,鱼类消化酶的研究越来越受到人们重视(李希国等 2005、2006;吴婷婷等 1994;Agrawal *et al.* 1975;Bitterlich *et al.* 1985;Hofer *et al.* 1982)。鱼类的消化生理活动受到诸多内外因素的影响。其中,温度和 pH 值又是影响鱼类消化生理活动的两个重要因素,也是酶动力学的重要研究内容。有关温度和 pH 值对海水鱼类消化酶活性的影响方面的研究报告至今仍较为少见(李希国等 2005、2006;陈品健等 1997;周景祥等 2001;梅景良等 2004)。

斜带髭鲷 *Hapalogenys nitens* 隶属于鲈形目 Perciformes、石鲈科 Pomadasyidae、俗称包公鱼、黑包公,打铁婆和乌蛟薯等,主要分布在我国、朝鲜和日本沿海,为近海中下层鱼类,栖息于多岩礁的海区(福建鱼类志编写组 1985)。目前,斜带髭鲷已成为海水鱼类网箱养殖的重要种类之一。本文研究了温度和 pH 值对斜带髭鲷蛋白酶和淀粉酶活性的影响,旨在为斜带髭鲷营养饲料的研究和开发提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验动物为经人工繁殖和培育、置于海上网箱养殖的斜带髭鲷成鱼,于2007年5~11月期间采集所得,共18尾,体长范围为23.60~27.50 cm,鱼体健康。用鲜活运输车运到实验基地循环水养殖系统中蓄养,水温变幅20~23 °C,盐度30,蓄养期间不投喂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验设计

(1)本试验反应体系的作用温度由DK-S22数显电热恒温水浴锅控制。蛋白酶和淀粉酶活力测定的温度范围均设置在15~50 °C,以5 °C为1个梯度,共设8个梯度,分别在各温度梯度下测定蛋白酶和淀粉酶的酶活力。胃蛋白酶测定时缓冲液设置为3.0;其余均为7.5。

(2)采用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,胃蛋白酶测定在pH值2.2~7.6范围内,以pH值0.6为1个梯度,共设10个梯度;肠和肝胰脏消化酶测定在pH值4.8~8.0范围内,以pH值0.4为1个梯度,共设9个梯度。分别在各pH值下测酶活力。水浴温度均设置为40 °C。

#### 1.2.2 消化道内pH值测定及酶液的制备

将斜带髭鲷活鱼移入实验室,在进行生物学测定之后置于冰盘上解剖,迅速取出胃、肝胰脏和肠道,先用精

密 pH 试纸测定胃、肠道和肝胰脏内的 pH 值,然后用重蒸水冲洗,加入 10 倍体积(W/V)预冷的重蒸水(0~4 °C),在冰浴中用玻璃匀浆器充分研磨匀浆(10~20 min),匀浆后在 4 °C 冰箱中静置 1 h,再将组织匀浆液在 Sigma 1-15K 型高速冷冻离心机以 10 000 r/min 的转速离心 30 min,取上清液作为酶液,并在 0~4 °C 低温下保存,于 24 h 内分析完毕。

### 1.3 酶活力的测定

#### 1.3.1 蛋白酶活力测定

福林-酚试剂法(高等学校专用教材 2005):在室温下,取 1 ml 酶液用 pH 值为 7.6 的磷酸缓冲液稀释 5 倍,加稀释后待测酶液样品和 2% 的酪蛋白各 1 ml,在 37 °C 下反应 10 min 后用 TCA 终止反应,37 °C 保温 10 min,过滤后,取滤液 1 ml 加 5 ml 0.4 mol/L 的碳酸钠溶液,再加 0.5 ml 福林酚试剂显色。用 722 分光光度计,在波长 650 nm 测定光密度。用酪氨酸做标准曲线。

蛋白酶定义:在 pH 值 7.6 和 37 °C 条件下水浴 10 min,蛋白质水解每分钟产生 1 μg 分子酪氨酸的酶量,为 1 个蛋白酶的活力单位。

#### 1.3.2 淀粉酶活力测定

用碘-淀粉比色法,在 660 nm 波长测量,参照文献(周景祥等 2001)的方法进行测量和计算,所用仪器为北京普析生产的 T6 紫外可见分光光度计。

##### 1.3.2.1 测定程序

取酶液 0.2 ml 加入 0.4 g/L 淀粉底物缓冲液 1.0 ml 混匀,40 °C 水浴 7.5 min,再加入 10 g/L 碘液 1.0 ml、超纯水 6.0 ml 于 660 nm 波长处,以超纯水调零,测光吸收值,以不加酶液的为标准管。

##### 1.3.2.2 淀粉酶活力的计算

$$\text{淀粉酶活力} = (A_B - A_U) \div A_B \times 0.4 \times (30 \div 7.5) \div 0.2 \times \text{组织稀释倍数}$$

式中, $A_B$  为标准管吸光度; $A_U$  为测试管吸光度。

淀粉酶活性定义:以淀粉为底物,在一定 pH 值、一定反应温度条件下,30 min 水解 10 mg 淀粉为 1 个淀粉酶活性单位[mg/(g·min)]。

## 2 结果与分析

### 2.1 消化道内 pH 值

对所有实验鱼均测定了各器官内的 pH 值。各样品实验测的 pH 值在不同 pH 值段出现的百分率由图 1 所示。由图 1 可见斜带髯鲷胃内 pH 范围为 4.9~5.4,约 44.4% 的被检个体胃内 pH 为 5.4;肝胰脏 pH 值为 5.8~6.2,约 38.9% 的被检个体胃内 pH 为 6.2;肠道 pH 值为 6.5~6.9,约 50% 的被检个体胃内 pH 为 6.9。

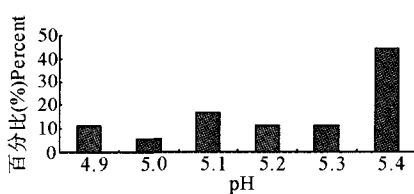


图 1-1 斜带髯鲷胃内 pH 值

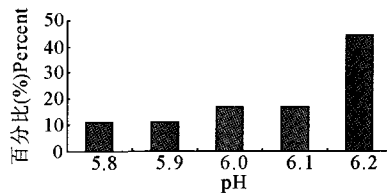


图 1-2 斜带髯鲷肝胰脏内 pH 值

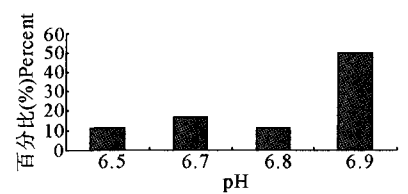


图 1-3 斜带髯鲷肠道内 pH 值

Fig. 1-1 pH in stomach of *H. nitens*

Fig. 1-2 pH in hepatopancreas of *H. nitens*

Fig. 1-3 pH in intestinal tract of *H. nitens*

### 2.2 温度对斜带髯鲷消化道中蛋白酶活性的影响

斜带髯鲷蛋白酶活性在 15~50 °C 范围内变化情况见图 2。结果表明,温度对蛋白酶活性具有明显的影

响。在 40 ℃ 以下,酶活性随温度的上升而增加,在 40 ℃ 达最大,40 ℃ 以上酶活性随温度的上升而下降。而且,在不同消化器官中,蛋白酶活性大小顺序为:胃>前肠>幽门盲囊>后肠>肝胰脏,表明斜带髯鲷对蛋白质的消化主要在胃内进行。

### 2.3 温度对斜带髯鲷消化道中淀粉酶活力的影响

温度对斜带髯鲷淀粉酶活力的影响由图 3 所示。在 15~50 ℃ 范围内,斜带髯鲷消化道不同部位淀粉酶活力的最适温度均为 35 ℃,淀粉酶活性由高到低顺序为:肝胰脏>幽门盲囊>前肠>后肠>胃。由此表明,在温度为 15~50 ℃ 范围内,淀粉酶活性随温度的升高先上升,在 35 ℃ 达到最强,然后随温度升高酶活性明显下降。可以看出肝胰脏是淀粉酶分泌的最重要消化腺,淀粉的消化吸收主要在肠道进行。

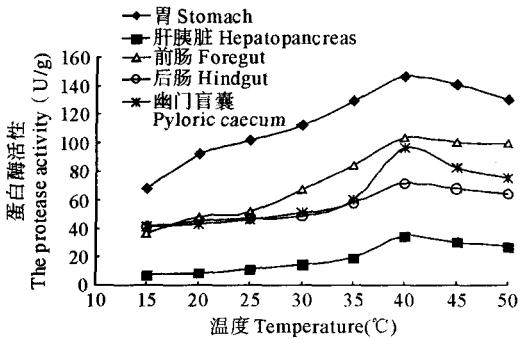


图 2 温度对斜带髯鲷蛋白酶活力的影响

Fig. 2 Effects of temperature on protease activities in *H. nitens*

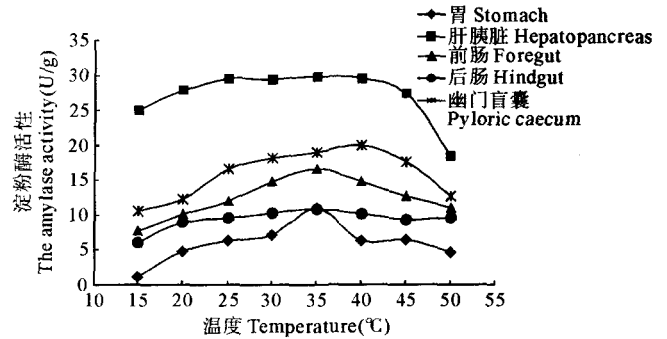


图 3 温度对斜带髯鲷淀粉酶活力的影响

Fig. 3 Effect of temperature on amylase activities in *H. nitens*

### 2.4 pH 值对斜带髯鲷消化道中蛋白酶活力的影响

pH 值对斜带髯鲷蛋白酶活力的影响见图 4。在 pH 值为 2.2~7.6 范围内,胃蛋白酶活力的最适 pH 值为 2.8;在 pH 值为 4.8~8.0 范围内,肠、肝胰脏与幽门盲囊蛋白酶的最适 pH 值均为 7.2;在最适 pH 值下,各消化器官中的蛋白酶活性由高到低顺序为:前肠>幽门盲囊>后肠>肝胰脏。结果表明,胃蛋白酶的最适 pH 值在强的酸性范围,而肠、肝胰脏与幽门盲囊的蛋白酶活力的最适 pH 值接近中性。

### 2.5 pH 值对斜带髯鲷消化道中淀粉酶活力的影响

pH 值对淀粉酶活力的影响见图 5。在 pH 值为 4.8~8.0 范围内,胃淀粉酶活力的最适 pH 值为 6.0,肠、肝胰脏与幽门盲囊淀粉酶的最适 pH 值均为 6.8,其中以肝胰脏的淀粉酶活性最强,其次依次为幽门盲囊>前肠>后肠,胃的淀粉酶活性最弱。结果表明,胃淀粉酶的最适 pH 值在较弱的酸性范围,而肠、肝胰脏与幽门盲囊淀粉酶活力的最适 pH 值在中性范围。

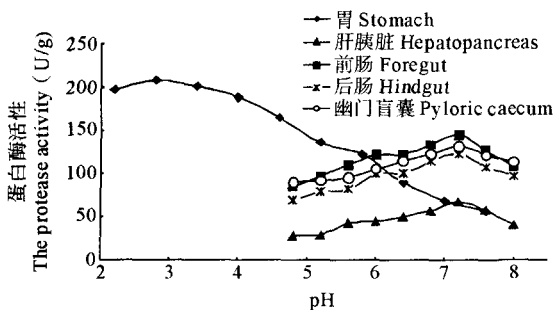


图 4 pH 值对斜带髯鲷蛋白酶活力的影响

Fig. 4 Effect of pH on protease activities in *H. nitens*

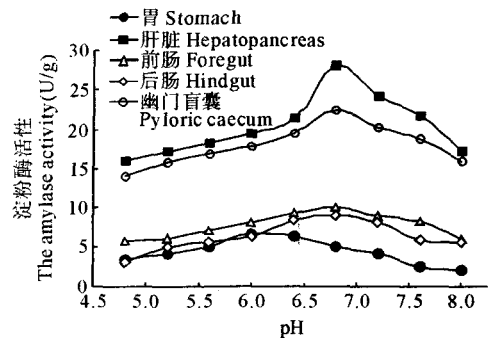


图 5 pH 值对斜带髯鲷淀粉酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH on amylase activities of *H. nitens*

## 2.6 在最适温度和 pH 值条件下的蛋白酶和淀粉酶活性

斜带髯鲷消化道不同部位在最适温度和 pH 值下的蛋白酶活性由高到低顺序为:胃>前肠>幽门盲囊>后肠>肝胰脏,如图 6 所示。淀粉酶活性由高到低顺序为:肝胰脏>幽门盲囊>前肠>后肠>胃,如图 7 所示。这说明胃和前肠是蛋白消化的主要部位;肝胰脏是淀粉酶分泌的主要部位;淀粉酶主要在前肠进行消化。

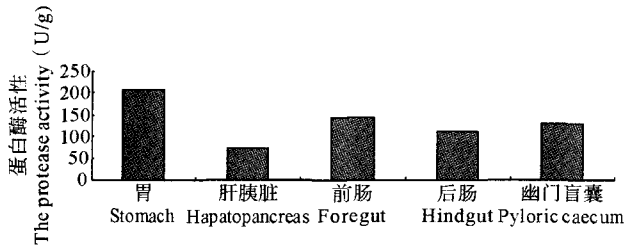


图 6 最适温度和 pH 值下斜带髯鲷消化道不同部位的蛋白酶活性

Fig. 6 Protease activity in different parts of alimentary organs of *H. nitens* at optimum temperature and pH

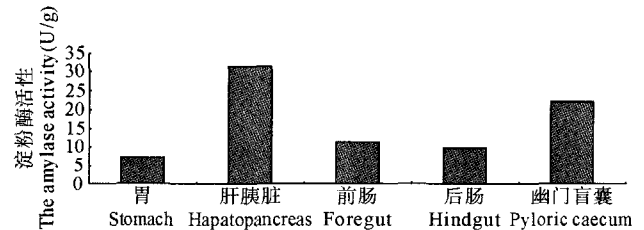


图 7 最适温度和 pH 值下斜带髯鲷消化道不同部位的淀粉酶活性

Fig. 7 Amylase activity in different parts of alimentary organs of *H. nitens* at optimum temperature and pH

## 3 讨论

### 3.1 消化道内 pH 值

消化道内酸碱度的作用有两方面,一方面对食物起酸性或碱性消化的作用,另一方面为消化酶提供合适的 pH 值条件。与哺乳类一样,有胃鱼类胃内 pH 值受胃酸即 HCL 浓度的影响,但鱼类胃液和胃酸的分泌是由食饵直接刺激胃而引起,条件反射现象不明显。因此,胃内食饵的有、无,充塞程度及摄饵时间对胃内 pH 值有较大的影响;空胃时 pH 值较低,胃中有食饵或进食一定时间后,胃液 pH 值较低(尾崎久雄 1983)。长吻鮠和南方大口鲶胃内 pH 在有食物时为 5.0~5.5,无食物时为 6.5(叶元土等 1998)。本实验中斜带髯鲷经室内水池蓄养数天,于取样解剖时基本是空腹,测得胃内 pH 为 4.9~5.4。肠道内 pH 值是胃、肠道分泌物的混合酸碱浓度的反映。斜带髯鲷肠道 pH 值为 6.5~6.9,肝脏 pH 值为 5.8~6.2。说明斜带髯鲷消化器官内 pH 呈弱酸性。实验结果与其他鱼类消化道内 pH 值的大小及变化规律大体相似。

### 3.2 食性与消化酶

鱼类的食性一般分为肉食性、草食性和杂食性,它与消化器官组织结构和消化机能是相适应的,消化器官组织结构不同,所承担的消化机能不同,因而消化酶的活性也呈现出明显的差异。一般肉食性鱼类的消化道短,蛋白酶活性强;草食性鱼类的消化道长,糖酶活性强(Uys *et al.* 1987)。斜带髯鲷为近海中下层鱼类,栖息于多岩礁的海区,摄食小鱼和小虾,是肉食性鱼类。研究表明,斜带髯鲷消化道蛋白酶活性较高,符合肉食性鱼类消化酶的特点。

### 3.3 温度与蛋白酶、淀粉酶活性

鱼类蛋白酶、淀粉酶作为消化道内高效专一的生物催化剂,受温度影响较大。在一定温度范围内,随温度上升,催化反应的速度增加;超过一定温度,催化活性反而降低(周顺伍 2001)。实验表明,斜带髯鲷各组织淀粉酶和蛋白酶的最适温度分别为 35 和 40 ℃。不同温度下,斜带髯鲷的蛋白酶、淀粉酶活力明显不同,只在一定温度范围内有较高酶活力;这与李希国等(2006)、叶元土等(1998)的研究结果是一致的。鱼类是变温动物,环境温度变化直接影响着鱼类机体内的生理生化过程,也与其体内消化酶活力密切相关。消化酶活力高低决定着鱼体对营养物质消化吸收的能力,从而决定鱼体生长发育的速度。这也与每一种鱼类只能在一定温度范

围内生活相一致,因为温度过高或过低,鱼体内的蛋白酶、淀粉酶活性过低,会导致鱼类对食物消化利用率降低,生长慢,甚至于停止生长。因此在斜带髯鲷的养殖中,应根据养殖水温来决定饲料成分的配比及投饵量。斜带髯鲷适温、适盐范围较广。在海水网箱常年水温 9.7~30.5℃的养殖条件下,生长正常,自然越冬;其生存的适温范围为 8.0~35.0℃。与其消化道内蛋白酶、淀粉酶的最适温度相比,斜带髯鲷的栖息水温较低,这说明斜带髯鲷栖息的水环境温度难以达到斜带髯鲷消化酶活性的最适温度,这与目前了解的其他鱼类消化酶活性最适温度均高于所处环境温度的普遍现象是一致的,为何会出现如此结果,其原因还有待进一步研究和探讨。

### 3.4 pH 值与蛋白酶和淀粉酶活性

关于 pH 值与鱼类蛋白酶和淀粉酶关系的研究较多(叶元土 1998;李希国等 2005;陈品健等 1997;梅景良等 2004),有文献(李希国等 2005)报道,有胃硬骨鱼类胃蛋白酶的最适 pH 值在 2.0~3.0 之间,肝胰脏和肠道蛋白酶的最适 pH 值分别在 7.0~8.7 和 6.5~9.5 之间;而肝胰脏、肠和胃淀粉酶的最适 pH 值分别是 6.8~7.0,5.0~8.0 和 5.0~7.0。研究结果表明,斜带髯鲷胃蛋白酶、淀粉酶的最适宜 pH 分别为 2.8 和 6.0;肝胰脏、肠和幽门盲囊蛋白酶、淀粉酶的最适 pH 分别是 7.2 和 6.8,与前者的研究结果相吻合。从 pH 值对蛋白酶和淀粉酶活性的影响来看,斜带髯鲷胃内是以强酸性或弱酸性条件下酶活性最高,肠、幽门盲囊和肝胰脏则均在中性或偏碱性条件下酶活性最强。这一结果与鱼类的消化系统生理机能是一致的,因鱼的胃内多为强酸性,肠内多呈碱性,这与有关文献(尾崎久雄 1983)的报道结果相吻合。酶的活性受环境 pH 值的影响极为显著,pH 值是酸碱度大小的反映,其对鱼类生理活动的影响是多方面的。酸碱度的作用一方面是对食物进行酸碱性消化,另一方面是为消化酶提供适宜的 pH 值。通常各种酶只有在一定的 pH 值范围内才表现它的活性。因此,为了充分保证食物的消化吸收,促进鱼体的生长发育,可以在其饲料中添加一定的酸化剂和外源性酶制剂,以提高饲料的利用率,同时可减少有机物的排泄量,从而减轻水体污染。

## 参 考 文 献

- 叶元土,林仕梅,罗 莉,杨思华,陈 文. 1998. 温度、pH 值对南方大口鲶、长吻鮠蛋白酶和淀粉酶活力的影响. 大连水产学院学报,13(2):17~23
- 李希国,李加儿,区又君. 2005. 黄鳍鲷主要消化酶活性在消化道不同部位的比较研究. 海洋水产研究,26(5):34~38
- 李希国,李加儿,区又君. 2006. 盐度对黄鳍鲷幼鱼消化酶活性的影响及消化酶活性的昼夜变化. 海洋水产研究,27(1):40~45
- 李希国,李加儿,区又君. 2005. pH 对黄鳍鲷主要消化酶活性的影响. 南方水产,1(6):18~22
- 李希国,李加儿,区又君. 2006. 温度对黄鳍鲷主要消化酶活性的影响. 南方水产,2(1):43~48
- 吴婷婷,朱小明. 1994. 鳊鱼、青鱼、草鱼、鲢、鳙消化酶活性的研究. 中国水产科学,1(2):10~17
- 陈品健,王重刚,黄崇能,顾 勇. 1997. pH 影响真鲷幼鱼蛋白酶活性的变化. 海洋学报,19(3):97~101
- 尾崎久雄著,吴尚忠译. 1983. 鱼类消化生理学. 上海:上海科技出版社,104~105
- 周景祥,陈 勇,黄 权,孙云龙. 2001. 鱼类消化酶的活性及环境条件的影响. 北华大学学报(自然科学版),2(1):70~73
- 周景祥. 2001. 蛋白酶和淀粉酶活性检测方法探讨. 中国饲料,11:23~24
- 周顺伍. 2001. 动物生物化学(第3版). 北京:中国农业出版社
- 高等学校专业教材. 2005. 生物工程分析与检验. 北京:中国轻工业出版社,204~207
- 梅景良,马燕梅,王 宏,张秀奇. 2004. pH 值对黑鲷胃肠道及肝胰脏主要消化酶活力的影响. 云南农业大学学报,19(5):592~595
- 福建鱼类志编写组. 1985. 福建鱼类志(下卷). 福州:福建科学技术出版社,196~197
- Agrawal, V. P., Ssstry, K. V., and Kaushab, S. K. S. 1975. Digestive enzymes of three teleost fishes. Acta-physiol. Hung,46: 93~98
- Bitterlich, G. 1985. Digestive enzyme patterns of two stomachless filter feeders silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val., and bighead carp, *Aristichthys nobilis* (Rich.) J. Fish Biol. 27(2):103~112
- Hofer, R. 1982. Protein digestion and proteolytic activity in the digestive tract of an omnivorous cyprinid, Comp. Biochem. Physiol. 72a:55~63
- Uys, W., and Hecht, T. 1987. Assays on the digestive enzymes of sharp-toothed catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae). Aquac. 63(1-4):301~313