

文章编号: 1004-7271(2005)04-0397-04

温度、pH 和摄食作用对西施舌 胃蛋白酶活力的影响

董志国¹, 李家乐², 李晓英², 程汉良¹, 孟学平¹

(1. 淮海工学院海洋学院江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005;
2. 上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要:研究了不同温度、不同 pH 值和摄食后不同时间条件下西施舌胃蛋白酶的活性变化。结果表明:在 pH 为 3.0 时,西施舌胃蛋白酶最适温度为 50 ℃, 明显高于生理温度,酶活力达到最大(290.18 ± 20.11) U;在温度为 50 ℃下,最适 pH 值为 2.6,酶活力达到最高,为(426.59 ± 30.80) U,远低于生理 pH;西施舌在摄食后,胃蛋白酶的活力有明显的提高,摄食后 0.5 h 西施舌胃蛋白酶的活力达到最大值(96.04 ± 30.02) U,其后活力降低,但在摄食后 4 h 时,活力又有回升,之后又趋于最低值(43.06 ± 6.69) U。

关键词:西施舌;胃蛋白酶;温度;pH 值;摄食时间

中图分类号:S 917 文献标识码:A

The effects of temperature, pH and feeding time on pepsin activity of *Coelomacra antiquate*

DONG Zhi-guo¹, LI Jia-le², LI Xiao-ying², CHENG Han-liang¹, MENG Xue-ping¹

(1. Key Constructing Laboratory of Marine Biotechnology of Jiangsu Province,
Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated
by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: In the paper, the pepsin activity of *Coelomacra antiquate* was studied at different temperatures, pH and different time after feeding. The results indicate that: optimum temperature for *C. antiquate* pepsin is 50 ℃ in fixed pH 3.0, and pepsin activity is highest and amounts to (290.18 ± 20.11) U. At fixed temperature 50 ℃, the most suitable pH is 2.6, and pepsin activity value reaches (426.59 ± 30.80) U. After feeding, the pepsin activity increases and at 0.5 h reaches highest value (96.04 ± 30.02) U, then the activity declines. But after feeding 4 h, the activity rises again, then declines to lowest value (43.06 ± 6.69) U.

Key words: *Coelomacra antiquate*; pepsin; temperature; pH; feeding time

西施舌 (*Coelomacra antiquate*), 俗称海蚌, 属瓣鳃纲蛤蜊科, 以肉质细嫩味道甘美著称, 是海鲜极品之一。该种分布范围是太平洋西部的中国、日本、越南以及印度半岛沿海, 在中国四大海均见分布, 以福

收稿日期: 2005-07-14

基金项目: 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放课题项目(2005HS009)和淮海工学院引进人才科研基金项目(KK01050)

作者简介: 董志国(1977-), 男, 内蒙古丰镇人, 讲师, 主要从事水产种质资源与遗传育种研究。

通讯作者: 孟学平(1955-), 男, 教授, 主要从事水生生物生化及分子生物学研究。E-mail: mxp2002@hotmail.com

建沿海产量最多。

消化酶活性是动物摄食、营养条件、生理状况的良好指标,是联系动物营养状态和生长发育的中间指标,其活性的高低直接影响了动物对营养物质的吸收利用程度,进而影响动物的生长发育。目前,有关西施舌的生活史^[1]、核型分析^[2]、增养殖^[3-5]等进行了研究,而对其消化生理则还未有研究报导。通过研究西施舌的消化生理,了解其影响因素和自身特点,可为西施舌的营养学、饵料及水质等一系列养殖管理问题提供依据,也为西施舌这一名贵经济贝类的规模化生产提供技术依据,同时对于丰富软体动物的消化生理、营养生理和生化研究的基础理论也具有重要的科学意义。

1 材料和方法

1.1 研究材料

试验西施舌采集于海州湾的墟沟自然海域,壳长 8~10 cm,清洗后在 -70 °C 保存,用于温度(样本 33 个)和 pH 值(样本量为 36 个)试验。用于摄食试验的西施舌样本 25 个,饥饿暂养 3 d,用小月菱形藻作为饵料进行试验。

1.2 实验方法

1.2.1 酶液制备

参照黄耀桐和刘永坚^[6]方法制备粗酶提取液。解剖西施舌肝脏,取出后,剔除脏器上的结缔组织和性腺,用冰冻去离子水(4 °C, pH 7.0)冲洗干净,用吸水纸吸干水分后,准确称取组织重量(不要超过 0.2 g),按重量体积比 1:9 加匀浆介质匀浆,在冰浴条件下,于玻璃研磨器中研磨成浆状,等份分置于 1.5 mL 的离心管中,4 °C 时,2 500 r/min 离心 10 min,上清液即为所要的西施舌胃蛋白酶粗液,置于 4 °C 条件下保存,并于 24 h 内分析完毕。

1.2.2 酶活性测定

Follin-酚法进行^[7],用 722S 分光光度计测定。酶活力定义:在 37 °C 保温 20 min,蛋白酶水解 50 μg/mL 蛋白标准液每分钟产生 1 μg 酪氨酸的酶量为一个蛋白酶活力单位。

1.2.3 蛋白质浓度测定

蛋白质浓度用考马斯亮蓝 G-250 法测定。

1.2.4 试验条件的设定

试验温度水平设定为 15~65 °C 共 11 个(每 5 °C 设一个梯度),用水浴控制。pH 水平为本实验设置了 2.2~6.6 共 12 个 pH 梯度(每 0.4 个 pH 设一个梯度),以磷酸氢二钾-柠檬酸缓冲液调节 pH 值。在摄食水平上,本实验设置未进食、进食完毕、进食后 0.5、1、2、3、4 和 15 h 共 8 个水平。以上试验每个水平均设置 3 个重复。

2 结果

2.1 西施舌胃蛋白酶活力和温度的关系

由预试验结果显示 pH 值在 3.0 左右,酶处于较高活力,因此,在 pH 为 3.0 时,测定温度对西施舌胃蛋白酶活力的影响。结果表明,在不同温度条件下,

西施舌胃蛋白酶的活力变化较大。由图 1 可见,在 15~50 °C 范围内,西施舌胃蛋白酶的活力在不断增加,50 °C 时西施舌胃蛋白酶的活力达到最大值(290.18 ± 20.11) U。50 °C 以后,西施舌胃蛋白酶活力开

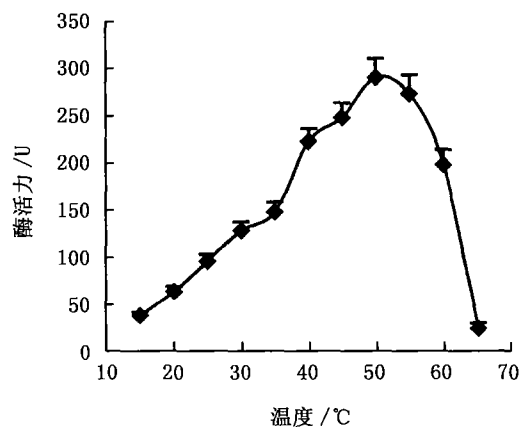


图 1 不同温度条件下西施舌胃蛋白酶活力变化
Fig.1 Pepsin activity at different temperatures of *C. antiquate*

始下降;55℃后,急剧下降。因此,西施舌胃蛋白酶的最适温度为50℃。

2.2 西施舌胃蛋白酶活力和pH值的关系

在50℃条件下,pH值在2.2~6.6时西施舌胃蛋白酶的活力变化情况见图2。从图2看出:西施舌胃蛋白酶的活力在酸性条件下较高,当pH为2.6时出现了一个大波峰(426.59 ± 30.80)U,在pH为3.8时则为(386.91 ± 18.11)U,pH 3.8之后,西施舌胃蛋白酶的活力开始下降,虽然在pH 5.4出现回升(248.02 ± 30.14)U,但较pH 2.6和3.8时为小。之后,酶活力继续下降。总的来说,在酸性条件下,西施舌胃蛋白酶的活力较高,而随着pH的升高,酶活力总的变化趋势是减小。pH 2.6是西施舌胃蛋白酶的最适pH,胃蛋白酶在此时的活力最大,说明西施舌的胃蛋白酶是低酸性蛋白酶。

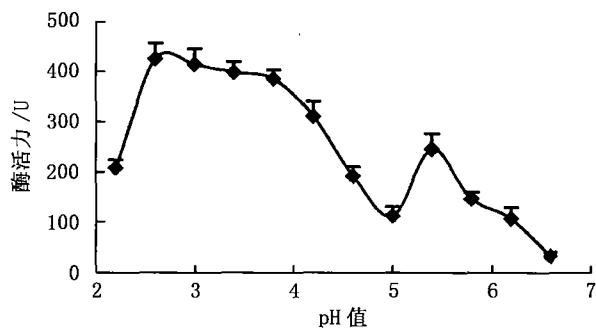


图2 不同pH值条件下西施舌胃蛋白酶活力变化
Fig.2 Pepsin activity at different pH of *C. antiquate*

2.3 摄食时间对西施舌胃蛋白酶活力的影响

在研究西施舌的摄食情况时,作摄食前、摄食完毕、摄食后0.5~15h的处理,在相同的温度(20℃)和pH(不作处理以正常酶提取液)条件下研究食物对于西施舌胃蛋白酶活性的影响,结果见图3。由图3可知:经饥饿3d后的西施舌胃蛋白酶活性很低为(49.60 ± 15.61)U,而西施舌在进食后,胃蛋白酶的活力有明显的提高,进食后0.5h西施舌胃蛋白酶的活力达到最大值(96.04 ± 30.02)U。随着时间的推移,消化作用的进行,西施舌胃蛋白酶的活力开始下降。但到进食后4h,西施舌的胃蛋白酶的活性又有了一定幅度的回升,之后直到15h蛋白酶的活性保持在最低水平(43.06 ± 6.69)U。

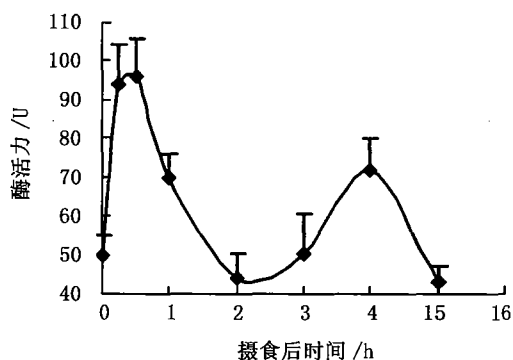


图3 不同摄食时间西施舌胃蛋白酶活力变化
Fig.3 Pepsin activity at different feeding time of *C. antiquate*

3 讨论

3.1 西施舌胃蛋白酶的耐热性能

酶是一种大分子物质,蛋白质肽链具有特定的空间结构,当酶吸收了过多的能量,则维持蛋白质空间结构的次级键解体,导致热变性,随着变性的明显化,反应速度自然降低^[8]。每一种酶都有其作用温度范围和最适温度。一种酶的最适温度愈高,这种酶的热稳定性就愈强。

本实验结果表明:pH值为3.0时,西施舌胃蛋白酶的最适温度为50℃,而西施舌栖息时的适应水温为8~30℃,最适水温为7~28℃,50℃远高于生理极限温度。在正常生活条件下,酶消化食物进行的时间是相当长的,这也就不难理解最适温度高于生理温度的现象了。对皱纹盘鲍蛋白酶的活性研究得出,皱纹盘鲍蛋白酶的最适温度为50℃^[9],这说明西施舌与其具有相似的规律。西施舌胃蛋白酶与褐藻酸酶、淀粉酶相比,其抗热性即热稳定性要好。运用到实际的饵料配制中,当养殖温度较高时,饵料蛋白的配比需适当加大,具体的加大程度还需进一步探讨。另一方面,本研究结果也暗示了西施舌胃蛋白酶有着良好的热稳定性,便于开发利用。

3.2 蛋白酶及pH对其作用程度

关于低等无脊椎动物是否存在胃蛋白酶,目前存在两种不同的观点。Norris和Mathies^[10]、Vonk^[11]、

Gibson 和 Barker^[12]认为无脊椎动物中不存在胃蛋白酶。但对中国对虾的研究表明^[13],其体内存在胃蛋白酶,其活力随个体发育逐渐增大;对主要的鱼、虾、贝的消化酶种类研究表明,无脊椎动物存在胃蛋白酶^[14];对皱纹盘鲍蛋白酶研究发现,其最适 pH 值为 2.6 和 5.0,存在胃蛋白酶^[9]。本实验的结果表明,当用酪蛋白作为底物进行酶反应时,蛋白酶在 pH 2.6 和 pH 5.4 时出现高峰,且 pH 2.6 处活力远高于 pH 5.4 处。一般来说,酶蛋白是所有蛋白酶进行反应的通用底物,通过最适 pH 值的选择可以确定蛋白酶的酶的来源,这样从本实验的结果就得出西施舌确实含有胃蛋白酶的结论。

因为生物体内蛋白酶具有多样性,不同酶对 pH 值的敏感性不同,在相同 pH 值下,不同酶表现出不同的活性。对西施舌的研究结果说明,其体内至少存在两种蛋白酶,即最适 pH 值为 2.6 的胃蛋白酶和最适 pH 值为 5.4 的蛋白酶,而且前者含量远大于后者,由于本研究结果显示在 pH 值 6.6 时,酶活力很低,因此,就没对于高 pH 值下酶活力情况进一步的探讨。

3.3 摄食促进西施舌胃蛋白酶活力的提高

饥饿是影响水生动物生长、发育和生存的重要因素之一。食物不足或缺乏时,机体许多器官会受影响,消化系统是首先受到影响的。国内外已有许多学者在这方面做过研究^[15-17]。影响酶液分泌量的因素很多,其中影响最大因素是食物。胃酸、胃液的分泌不受心理的影响,无明显的条件反射现象;胃液的分泌是由食物直接刺激胃而引起的,一般情况下酶液的量随食物的摄入而立即升高,如饥饿和再投喂对牙鲆生化组成和组织结构的影响高,而且可以在瞬间达到最大值^[15]。

动物在摄食后,进入体内的营养物质增多,即需要酶来消化的底物增多。由实验结果可知:在摄食后数小时内,西施舌胃蛋白酶的活力持续增加。但随着时间的推移,西施舌体内的营养物质在不断的减少,底物减少,所需要的酶的量减少,直接导致酶活力的下降。当很长一段时间没有食物来源,虽然底物量较少,但为了满足自身生存的需要,生物通过加强自身消化酶的活力,来消化所剩余的营养物质,以求消化同样的底物来获得更多的营养来维持生命。这就可以说明进食 4 h 后,西施舌胃蛋白酶的活性会有大的反弹。而进食后 15 h,所测消化酶活性降幅很大,分析原因可能是由于饥饿时间太长,致使其消化腺组织结构受损最终导致酶活力的下降。

实际生产中可以利用该应急反应,将养殖贝类进行短期饥饿后再投喂,在短时间内胃蛋白酶的活性急增,达到充分消化,降低饲料系数,从而达到促进贝类的生长,降低成本和减少环境污染的作用。

参考文献:

- [1] 齐秋珍,高如承,邱文仁,等.西施舌的生活史[J].福建师范大学学报(自然科学版),1995,11(4):82-88.
- [2] 饶小珍,许友勤,陈寅山,等.西施舌的核型分析[J].动物学杂志,2003,38(2):2-5.
- [3] 刘德经,谢开恩.西施舌的繁殖生物学[J].动物学杂志,2003,38(4):10-15.
- [4] 饶小珍,陈寅山,陈文列,等.西施舌精子发生过程的超微结构观察[J].水产学报,2002,26(2):97-103.
- [5] 吴进锋,张汉华,梁超愉.西施舌苗种的中间培育[J].上海水产大学学报,2004,13(2):130-133.
- [6] 黄耀桐,刘永坚.草鱼肠道、肝胰脏蛋白酶活性初步研究[J].水生生物学报,1988,12(4):328-333.
- [7] 蒋传葵,金承德,吴仁龙,等.工具酶活力的测定[M].上海:上海科技出版社,1982.
- [8] 吴梧桐.生物化学(第四版)[M].北京:人民卫生出版社,2001.111-145.
- [9] 杨蕙萍,童圣英,王子臣.皱纹盘鲍蛋白酶的研究[J].水产学报,1997,21(2):128-133.
- [10] Norris E R, Mathies J C. Preparation and properties of crystallization of tuna pepsin[J]. J Biol Chem, 1953,204(2): 673-680.
- [11] Vonk H J. Digestion and metabolism in the physiology of crustacean[M]. New York: Academic Press, 1953. 1:295-297.
- [12] Gibson R, Barker P L. The decapod hepatopancreas[A]. In oceanography and marine biology annual review[C]. Aberdeen Univ Press, 1953, 17: 305-326.
- [13] 刘玉梅,朱谨利,吴厚余,等.中国对虾幼体和仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究[J].海洋与湖泊,1991,22(6):572-575.
- [14] 刘世英,庸文岳(译).水产饵料生物学[M].北京:农业出版社,1989.319-321.
- [15] 王静波.饥饿和再投喂对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)生化组成和组织结构的影响[D].大连水产学院硕士论文,2004.
- [16] Labarta U, Fernandez R M J, Navarro J M. Enzymatic digestive activity in epifaunal(*Mytilus chilensis*) and infaunal(*Mulinia edulis*) bivalves in response to changes in the food regimes in a natural environment[J]. Marine biology, 2002, 140:669-676.
- [17] 王文,杜开和.三角帆蚌消化系统的组织学研究及其胃肠在饥饿状态下的变化[J].南京师大学报(自然科学版),1995,18(4):134-138.