

不同温度和 pH 值对瘤背石磺 (*Onchidium verruculatum* Cuvier) 消化酶活性的影响

倪小英, 应雪萍[†], 张永普, 贾守菊, 张 勇

(温州大学生命与环境科学学院, 浙江温州 325027)

摘 要: 研究了温度和 pH 值对瘤背石磺 (*Onchidium verruculatum* Cuvier) 肠淀粉酶、肝胰腺淀粉酶和胃淀粉酶以及相应的纤维素酶活性的影响。不同温度和 pH 值对瘤背石磺消化酶活性的影响显著 ($P < 0.05$)。当温度在 5–75℃ 时, 肠淀粉酶和纤维素酶分别在 35℃ 和 30℃ 时活性较高; 肝胰腺淀粉酶和纤维素酶分别在 35–45℃ 和 50℃ 时活性较高; 胃淀粉酶活性在 25–45℃ 维持较高水平, 随后随温度的升高而下降, 纤维素酶活性在 50℃ 时较高。在 pH 为 3.0–8.0 范围内, 肠淀粉酶和纤维素酶的最适 pH 值均为 6.0; 肝胰腺淀粉酶和纤维素酶的最适 pH 值分别为 6.9 和 5.4; 胃淀粉酶和纤维素酶的最适 pH 值分别为 6.5 和 6.0。在适宜温度和 pH 条件下, 肠淀粉酶、肝胰腺淀粉酶和胃淀粉酶活性均远大于肠纤维素酶、肝胰腺纤维素酶和胃纤维素酶。

关键词: 瘤背石磺; 淀粉酶; 纤维素酶; 温度; pH 值

中图分类号: Q55 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3563(2009)02-0001-05

DOI: 10.3875/j.issn.1674-3563.2009.02.01 本文的 PDF 文件可以从 xuebao.wzu.edu.cn 获得

石磺 (*Onchidium verruculatum* Cuvier), 俗名土海参、海蛤、海癞蛤蟆等, 隶属于软体动物门、肺螺亚纲、柄眼目、石磺科^[1], 广泛分布于印度——太平洋沿岸的河口海域, 国内则多分布于东海和南海, 具有很高的营养价值和药用价值^[2]。目前, 关于石磺的分布状况、生态习性等方面的研究报道较多^[3-8], 但有关其消化系统方面的研究相对滞后, 仅见代欣欣等对两种石磺齿舌的形态差异进行了分析^[9], 沈和定等就不同饲料对石磺暂养效果及其消化率进行了初步的研究^[10], 尚未见有关石磺消化生理方面的研究报道。本文以瘤背石磺为实验对象, 研究了不同 pH 值和温度对其主要消化器官消化酶活性的影响, 为石磺的消化生理研究及其在养殖过程中饵料的选择提供了一定的理论基础, 同时也丰富了软体动物消化酶研究的相关内容。

1 材料和方法

1.1 材料与样品制备

实验用瘤背石磺于 2006 年 5 月中旬采自温州龙港水产养殖试验场, 带回实验室暂养两天,

收稿日期: 2008-08-02

基金项目: 浙江省科技厅基金资助项目(2007C33066); 温州市科技局基金资助项目(S2004B016)

作者简介: 倪小英(1972-), 女, 浙江嘉兴人, 讲师, 学士, 研究方向: 动物生理生态学。† 通讯作者, xpying2008@wzu.edu.cn

以清除消化道内残留食物和粪便,之后选取健康个体 200 只,用电子天平称重,数显游标卡尺测量体长.所选个体体长范围为 (71.14 ± 6.33) mm,平均体长为 (74.18 ± 2.33) mm,平均体重为 (18.41 ± 1.45) g,置于冰盘活体剖开,取出肠、肝胰腺、胃,剔除附着物,预冷重蒸水清洗后用滤纸吸干称重,每五只石磺的肠、肝胰腺、胃分别各装一袋,置于超低温冰箱中保存、待用.

1.2 酶液的制备

将样品取出解冻后,按重量:体积=1:10 (mg/ml) 加入预冷重蒸水,用玻璃匀浆器冰浴匀浆后于 4°C 、9 000 r/min 离心机离心 20 min.取上清液即为粗酶提取液,并在 $0 - 4^{\circ}\text{C}$ 下保存,24 小时内完成对淀粉酶和纤维素酶活性的测定.

1.3 消化酶活性的测定

淀粉酶、纤维素酶活性测定参照文献[11-12],略作修改.淀粉酶酶活性定义:在一定温度条件下,每分钟每毫克湿组织催化淀粉生成 1 毫克麦芽糖为一个酶活性单位.纤维素酶酶活性定义为:在一定温度条件下,每分钟每毫克湿组织催化滤纸生成 1 微克葡萄糖作为 1 个酶活性单位.

1.4 实验条件的设定

实验温度范围为 $5 - 75^{\circ}\text{C}$,温度间隔 10°C 为一个梯度,用恒温水浴控制.在 pH 实验中,以缓冲液调节测定淀粉酶和纤维素酶活性的反应介质的 pH 值,pH 范围为 $3.0 - 8.0$,共 10 个梯度.每个条件下设 3 个重复样.

1.5 数据处理

采用 SPSS 11.0 统计软件包中的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Tukey's HSD 多重比较法处理相应数据.描述性统计值用“平均值 \pm 标准差”表示,显著性水平设置为 $\alpha=0.05$.

2 结果和分析

2.1 不同温度和 pH 值对瘤背石磺淀粉酶活性的影响

温度和 pH 值对瘤背石磺淀粉酶活性的影响见图 1 和图 2.

由图 1 可见,随着温度的上升,瘤背石磺胃淀粉酶和肝胰腺淀粉酶活性明显升高,在 25°C 到

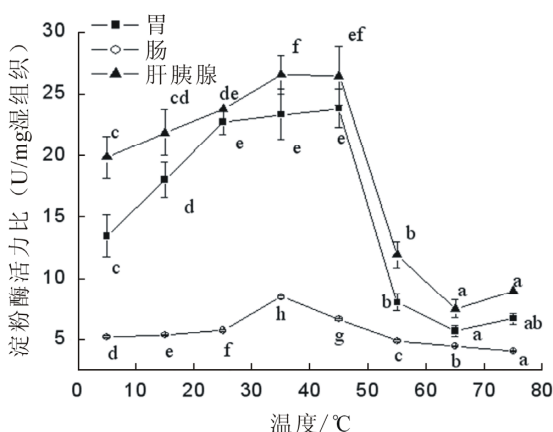


图 1 不同温度对瘤背石磺淀粉酶活性的影响

Fig 1 Effect of Different Temperatures on the Activity of Amylase in *Onchidium verruculatum* Cuvier

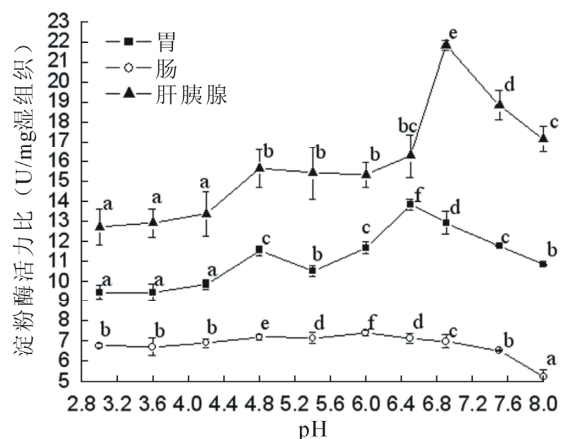


图 2 不同 pH 值对瘤背石磺淀粉酶活性的影响

Fig 2 Effect of Different pHs on the Activity of Amylase in *Onchidium verruculatum* Cuvier

注:图中数据上的上标字母相同表示差异不显著($P > 0.05$);字母不相同表示差异显著($P < 0.05$).以下同.

45℃之间胃淀粉酶活性维持在较高水平且差异不显著, 肝胰腺淀粉酶在 35℃和 45℃时活性均较高且两者之间差异不显著, 而后随温度的继续升高两者活性均快速下降; 温度改变, 肠淀粉酶活性波动范围相对较小, 在 35℃时其活性相对较高. 单因素方差分析得知, 温度对淀粉酶活性有显著影响 ($P<0.05$).

从图 2 可以看出, 瘤背石磺淀粉酶在中性稍偏酸性环境中活性相对较高. 当 pH 为 6.5 时, 其胃淀粉酶的活性相对较高; 肝胰腺淀粉酶在 pH 为 6.9 时活性相对较高; 相对于其它两种酶来说, 肠淀粉酶活性因 pH 值改变波动范围不是很大, 在 pH 为 6.0 时相对较高. 单因素方差分析得知, pH 值对淀粉酶活性有显著影响 ($P<0.05$).

2.2 不同温度和 pH 值对瘤背石磺纤维素酶活性的影响

温度和 pH 值对瘤背石磺纤维素酶活性的影响见图 3 和图 4.

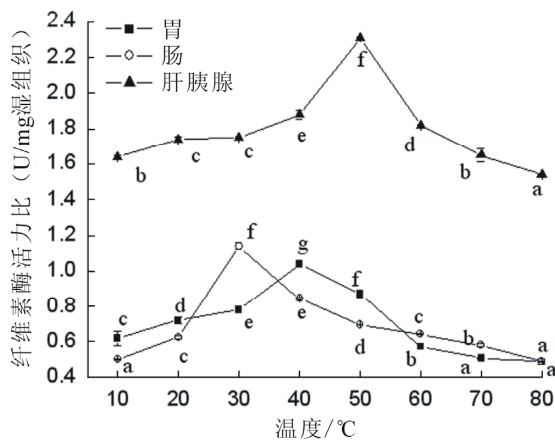


图 3 不同温度对瘤背石磺纤维素酶活性的影响

Fig 3 Effect of Different Temperatures on the Activity of Cellulase in *Onchidium verruculatum* Cuvier

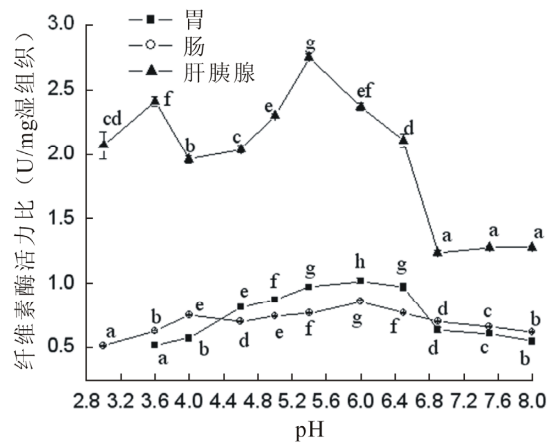


图 4 不同 pH 值对瘤背石磺纤维素酶活性的影响

Fig 4 Effect of Different pHs on the Activity of Cellulase in *Onchidium verruculatum* Cuvier

由图 3 可见, 温度对瘤背石磺纤维素酶活性有显著影响 ($P<0.05$). 随着温度的升高, 三种消化器官中各纤维素酶活性均随之增加, 其中胃纤维素酶活性在 30℃时相对较高, 而后随温度升高而下降; 肠纤维素酶和肝胰腺纤维素酶活性分别在 40℃和 50℃时相对较高, 而后随温度升高而下降.

由图 4 可知, pH 值对瘤背石磺纤维素酶活性有显著影响 ($P<0.05$). 与 pH 值对淀粉酶活性的影响相似, 在中性或微偏酸性环境中瘤背石磺纤维素酶活性相对较高. 在 pH 值为 3.0–8.0 范围内, 胃纤维素酶和肠纤维素酶在 pH 为 6.0 时活性相对较高; 肝胰腺纤维素酶活性在实验 pH 值范围内出现两个峰值, 分别在 pH 为 3.6 和 pH 为 5.4 时, 且 pH 为 5.4 时的纤维素酶活性相对要高.

3 讨 论

3.1 温度对瘤背石磺消化酶活性的影响

本实验结果表明温度会对瘤背石磺不同部位淀粉酶和纤维素酶的活性产生一定的影响. 其中肠淀粉酶活性相对较高时的温度为 35℃; 肝胰腺淀粉酶和胃淀粉酶活性相对较高时的温度范围分别为 35–45℃和 25–45℃, 这与文献报道的皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino) 淀粉酶的最适温度 30℃^[13]、栉孔扇贝 (*Chlamys ferrerii*) 淀粉酶的最适温度 25℃^[14]较为接近, 但与缢蛭 (*Sinonovacula*

constricta) 淀粉酶的最适温度 65°C ^[15]差异较大. 瘤背石磺肝胰腺淀粉酶和胃淀粉酶活性相对较高时的适宜温度范围非常广, 这与成体淡水珍珠贝消化酶的最适温度范围^[16]相似. 瘤背石磺肠纤维素酶、肝胰腺纤维素酶、胃纤维素酶的最适温度分别为 30°C 、 50°C 、 50°C , 与缢蛏纤维素酶的最适温度 45°C ^[15]较为接近.

瘤背石磺的生长适宜温度在 $20\text{--}30^{\circ}\text{C}$ 之间, 低于大约 20°C 时即入洞越冬; 瘤背石磺在干燥高温的情况下会散发出一种难闻的臭气(脲), 其自身体能消耗很大, 在 44°C 以上挣扎1小时左右后即会死亡^[2]. 实验结果表明, 瘤背石磺淀粉酶和纤维素酶活性最大时的温度远高于其生长适宜温度. 最适温度受实验条件特别是反应时间的影响很大, 在正常生活条件下, 酶消化食物进行的时间是相当长的, 而实验条件下测定的是短时间内酶活性达到相对较高值的温度, 这也就不难理解最适温度高于生理温度的现象了. 最适温度虽然只是在一定条件下才有意义, 但在一定程度上反映了消化酶的耐热性和温度对酶活力的影响规律. 温度能提高或抑制酶的活性, 适宜的温度使其能充分地表现活性. 因此在实际的养殖过程中要注意水温的变化. 同时, 在夏季高温时间, 在养殖场上方应采取遮阴降温的措施, 以利于瘤背石磺更好地生长.

3.2 pH值对瘤背石磺消化酶的影响

瘤背石磺肠淀粉酶、肝胰腺淀粉酶和胃淀粉酶的最适 pH 值分别为 6.0、6.9、6.5, 这与多数学者对皱纹盘鲍、牡蛎、滨螺、贻贝等动物淀粉酶最适 pH 研究结果(偏酸性)^[13]是相一致的. 目前对软体动物纤维素酶活性的研究报道很少. 瘤背石磺肠纤维素酶、肝胰腺纤维素酶和胃纤维素酶的最适 pH 值分别为 6.0、5.4、6.0, 这与缢蛏纤维素酶的最适 pH 值 5.2 ^[15]比较接近. 实验数据显示瘤背石磺三个消化器官的不同纤维素酶活性都比较低, 与一些学者在甲壳类动物中得到的结果^[17-19]一致. 这也从一个侧面证实了瘤背石磺主要以含淀粉为主的藻类为食.

瘤背石磺消化酶在弱酸性条件下有较高活性. 酸碱度对瘤背石磺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 值范围, 适宜的 pH 环境能使消化酶的活性充分增加. 因此, 为了提高瘤背石磺对食物的消化吸收率, 促进其生长发育, 可以在瘤背石磺饵料中添加一定量的外源酶制剂, 以提高饵料的利用率.

参考文献

- [1] 蔡英亚, 张英, 魏若飞. 贝类学概论[M]. 上海: 上海科学出版社, 1997: 254-257.
- [2] 沈和定, 李家乐, 张缓溶. 石磺的生物学特性及其增养殖前景分析[J]. 中国水产, 2004, (1): 60-63.
- [3] 邱立言. 苏沪沿海瘤背石磺的形态和习性[J]. 动物学杂志, 1991, 26(3): 33-36.
- [4] 王金庆, 成永旭, 吴旭干, 等. 瘤背石磺的形态、习性和生殖行为[J]. 动物学杂志, 2005, 40(1): 32-40.
- [5] 王金庆, 成永旭, 吴旭干, 等. 瘤背石磺的生殖系统和性腺发育[J]. 动物学杂志, 2006, 41(1): 19-26.
- [6] 沈和定, 陈贤龙, 陈汉春, 等. 水温对石磺胚胎发育的影响[J]. 水产学报, 2005, 29(6): 776-782.
- [7] Stringer B L. The species of New Zealand *Onchidiidae* (Mollusca, Gastropoda) and their distribution [J]. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 1969, 3: 29-45
- [8] Deshpande U D, Nagabhushanam R. Seasonal Changes in the biochemical Composition of the *Chiton iatricus* (polyplacophora: Mollusca) and the marine Pulmonate *Onchidium* (Gastropoda: Mollusca) in relation to their reproductive cycle [J]. Marine Biology, 1983, 72: 227-234.
- [9] 代欣欣, 沈和定, 冉福, 等. 两种石磺齿舌形态差异分析[J]. 动物学杂志, 2007, 42(5): 149-156.

- [10] 沈和定, 陈汉春, 陈贤龙, 等. 几种饲料对石磺的暂养效果及其消化率的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(4): 293-297.
- [11] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1979: 145-154.
- [12] 蒋传葵, 金承德, 吴仁龙, 等. 工具酶的活力测定[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 74-82.
- [13] 杨蕙萍, 童圣英, 王子臣. 皱纹盘鲍淀粉酶和褐藻酸酶的研究[J]. 水产学报, 1998, 22(4): 345-351.
- [14] 张硕, 赵艳. 栉孔扇贝蛋白酶和淀粉酶活力的初步研究[J]. 大连水产学院学报, 1997, 12(1): 15-20.
- [15] 范德朋, 潘鲁青, 肖国强, 等. 温度、pH 对缢蛏消化酶活力的影响[J]. 海洋湖沼通报, 2003, (4): 69-73.
- [16] Mayuva A, Arunee E, Uthaiwan K, et al. Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult freshwater pearl mussel, *Hyriopsis bialatus* Simpson 1900 [J]. Aquaculture, 2004, 234: 575-587.
- [17] Moss S M, Divakaran S, Kim B G. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) [J]. Aquaculture Research, 2001, 32(2): 125-131.
- [18] 薛俊增, 赵艳, 张燕平, 等. 四种蟹成蟹消化酶的研究[J]. 东海海洋, 1998, 16(4): 8-13.
- [19] Maugle P D, Deshimaru O, Catayama T, et al. Effects of short-necked clam diets on shrimp growth and digestive enzyme activities[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1982, 48(12): 1759-1764.

Effect of Different Temperatures and pHs on Digestive Enzyme Activities of *Onchidium Verruculatum* Cuvier

NI Xiaoying, YING Xueping, ZHANG Yongpu, JIA Shouju, ZHANG Yong
(College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou, China 325027)

Abstract: The effects of different temperatures and pHs on activities of intestines amylase, hepatopancreas amylase and stomach amylase as well as intestines cellulose, hepatopancreas cellulose and stomach cellulose of *Onchidium verruculatum* Cuvier were studied in this paper. The results showed: different temperatures and pHs have affected the activities of amylase and cellulose of *Onchidium verruculatum* Cuvier significantly ($P < 0.05$). Between the temperature 5°C and 75°C, intestines amylase and cellulose are highly active at the temperature of 35°C and 30°C, while the hepatopancreas amylase keeps a high activity at the range of 35 – 45 °C and the cellulose at 50 °C. And the stomach amylase has temperature optima range at 25 – 45 °C and the cellulose has temperature optima at 50 °C. Between the pHs 3.0 and 8.0, the optima pHs value of the intestines amylase and cellulose are 6.0; while the optima pHs value of the hepatopancreas amylase and cellulose are 6.9 and 5.4; and the stomach amylase and cellulose are 6.5 and 6.0. The result also showed that at the most favorable reacting temperature and pH of the two digestive enzymes, the activities of the amylase are much higher than those of the cellulose.

Key words: *Onchidium verruculatum* Cuvier; Amylase; Cellulose; Temperature; pH