

温度和 pH 对刺参(*Apostichopus japonicus*) 消化酶活力的影响*

姜令绪 杨宁 李建 王文琪 王仁杰 卢杰

(青岛农业大学水产学院 青岛 266109)

提要 消化酶活力能够反映刺参对不同营养成分的消化能力。当某一反应条件发生改变时,消化酶的活力大小就会发生变化,因此研究不同因子对消化酶活力的影响对于了解消化酶的性质具有重要的意义。温度和 pH 是影响消化酶活力的最重要的反应条件。本文中作者应用酶学分析研究了温度和 pH 对刺参前肠和中肠各种消化酶活力的影响。蛋白酶活力测定采用福林-酚法,脂肪酶活力测定采用水解法,淀粉酶活力和纤维素酶活力测定采用水杨酸显色法。实验结果表明,反应温度和反应 pH 对刺参前肠和中肠中的消化酶活力具有显著影响($P < 0.05$)。前肠和中肠中蛋白酶活力均在反应温度为 50℃ 时达到最大值,前肠和中肠中脂肪酶和纤维素酶均在反应温度为 40℃ 时达到最大值,而前肠和中肠中淀粉酶最适反应温度分别为 40℃ 和 30℃。刺参前肠蛋白酶活力在酸性环境下较中肠高,且在反应 pH 为 5.0—5.8 之间酶活力相对稳定,而中肠蛋白酶活力在碱性环境下较前肠高,且在反应 pH 为 7.0—8.6 之间酶活力相对稳定;刺参前肠脂肪酶活力随着 pH 的升高出现两个相对稳定的峰值,分别为 4.2—5.0 和 6.2—7.0 区间,中肠脂肪酶活力在 pH 为 3.8 时达到最大值,而在 pH 超过 9.0 明显失活;刺参前肠和中肠淀粉酶活力在 pH 变化时表现出相似的变化趋势,在反应 pH 为 6.6—7.4 之间酶活力较高且相对稳定;刺参前肠和中肠中纤维素酶活力在 pH 变化时反应不一致,前肠淀粉酶在反应 pH 为 6.2—7.4 之间酶活力较高且相对稳定,中肠纤维素酶活力在反应 pH 为 5.4—7.0 之间酶活力较高且相对稳定。此外,通过比较四种消化酶比活力值的大小,可以看出刺参蛋白酶活力最高,其次为纤维素酶和淀粉酶活力,而脂肪酶活力最低。

关键词 刺参, 温度, pH, 消化酶

中图分类号 S968

刺参具有较高的营养价值和药用价值,近几年已经成为我国北方地区最重要的养殖种类之一(廖玉麟, 2001; 袁秀堂等, 2006)。刺参的营养学和消化生理学研究是促进刺参健康养殖关键因素。刺参营养学是以刺参消化生理为基础的,因此了解刺参体内消化酶的种类及其在体内的分布,掌握各种消化酶的性质,对于加强刺参消化生理的研究具有重要意义。Shimizu 等(1994)研究指出,刺参在稚参时期肠道内就具有蛋白酶和脂肪酶活性。崔龙波(2000)报道,刺参的消化系统由口、食

道、胃、前肠、中肠、后肠、排泄腔和肛门组成,没有消化腺,组织化学分析发现前肠和中肠具有分泌消化酶的作用,而食道、胃和后肠几乎没有酶活性。姚雪梅等(2006)报道过 pH 对糙海参(*Holothuria scabra*)消化道中蛋白酶和淀粉酶活力有影响。目前,有关刺参(*Apostichopus japonicus*)消化生理的研究较少,而关于刺参消化酶的种类、消化酶活力测定方面的研究尚未见报道。本文中作者主要研究了反应温度和 pH 对刺参前肠和中肠几种主要消化酶活性的影响,探讨

* 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目, 2006BS08012 号; 青岛自然科学基金资助, 05-1-JC-87 号。姜令绪, 讲师, E-mail: jianglingxu888@163.com

① 通讯作者: 王文琪, 教授, E-mail: wenqiwang@qau.edu.cn

了各种消化酶的最适反应条件, 以期对刺参消化酶测定方法的确定和刺参消化生理的研究提供科学的数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用刺参于 2006 年 3 月购买于青岛市城阳水产品批发市场, 选取规格一致、离水后收缩能力强、健康无病的刺参作为实验材料。刺参体长(15.5 ± 0.5)cm, 体重为(42.5 ± 3.5)g, 置于自动水循环系统中暂养 3d, 海水盐度为 30, pH 为 8.0 ± 0.1 , 水温为(15.5 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 实验方法

1.2.1 实验梯度的设置 温度实验中, pH 稳定在 7.0, 反应温度设置范围为 10—80 $^{\circ}\text{C}$, 梯度差为 10 $^{\circ}\text{C}$, 共设置 8 个梯度, 通过恒温水浴锅(HH·SY21-Ni)控温; pH 实验中, 温度稳定在 40 $^{\circ}\text{C}$, 反应 pH 设置范围为 3.0—9.8, 梯度差为 0.4, 共设置 18 个梯度, pH 梯度的设置用不同的缓冲液进行调节, pH 在 3.0—6.2 范围内采用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液调节 pH, pH 在 6.6—7.8 范围内采用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液调节 pH, pH 在 8.2—9.8 范围内采用硼砂缓冲液调节 pH。

1.2.2 样品制备 用剪刀沿刺参腹部剪开, 取出消化道, 剔除呼吸树和肠系膜上的脂肪组织, 用去离子水冲洗干净, 然后将前肠和中肠分开, 置于冷冻柜中在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。实验时, 取 3 条肠组织置于玻璃匀浆器中, 加入 15ml 预冷的去离子水, 在冰浴条件下匀浆 20min, 然后将匀浆液置于高速冷冻离心机中(0—4 $^{\circ}\text{C}$, 10000r/min)离心 30min, 所得上清液即为粗酶液。

1.2.3 测定方法 蛋白酶活力测定采用以酪蛋白为底物的福林-酚法(施特尔马赫, 1992; 沈文英等, 2004)进行。蛋白酶活力定义为: 在一定 pH 和温度下, 每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸为 1 个酶活力单位($\text{U}=\mu\text{g}/\text{min}$)。

脂肪酶活力测定采用聚乙烯醇橄榄油乳化液水解法(朱俭, 1981; 沈文英等, 2004)进行。脂肪酶活力定义为: 在一定 pH 和温度下, 每分钟催化产生 1 μmol 脂肪酸为 1 个酶活力单位($\text{U}=\mu\text{mol}/\text{min}$)。

淀粉酶活力测定采用以可溶性淀粉为底物的 3,5-二硝基水杨酸显色法(朱俭, 1981; 沈文英等, 2004)进行。淀粉酶活力定义为: 在一定 pH 和

温度下, 每分钟催化淀粉生成 1mg 麦芽糖为 1 个酶活力单位($\text{U}=\text{mg}/\text{min}$)。

纤维素酶活力测定采用以羧甲基纤维素钠为底物的 3,5-二硝基水杨酸显色法(潘鲁青等, 1997; 沈文英等, 2004)。纤维素酶活力定义为: 在一定 pH 和温度下, 每分钟催化纤维素生成 1mg 葡萄糖为 1 个酶活力单位($\text{U}=\text{mg}/\text{min}$)。

各种酶活力以比活力表示, 即每毫克可溶性蛋白质所含酶活力单位数($\text{U}/\text{mg pr}$)。

1.2.4 统计分析 实验数据以 3 个平行组数据的平均值表示, 并且计算标准差; 所有数据分析均采用单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果

2.1 前肠和中肠 pH 的测定

取鲜活刺参 6 只, 解剖取出消化道, 将前肠和中肠分开, 用精密 pH 试纸对刺参肠内的 pH 进行测定, 前肠内的 pH 为 6.45 ± 0.10 , 中肠内的 pH 为 7.20 ± 0.15 。结果表明, 前肠 pH 呈弱酸性, 中肠呈弱碱性。

2.2 反应温度对刺参前肠和中肠消化酶活力的影响

由图 1 可以看出, 反应温度对刺参前肠和中肠中各种消化酶活力具有显著的影响($P < 0.05$)。刺参前肠和中肠中的蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和纤维素酶活力都随着温度的变化而呈现出峰值变化。蛋白酶、脂肪酶和纤维素酶在刺参前肠的最适反应温度分别为 50 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 和 40 $^{\circ}\text{C}$, 在中肠中的最适反应温度也分别为 50 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 和 40 $^{\circ}\text{C}$, 而淀粉酶在刺参前肠和中肠中的最适反应温度则有差异, 前肠淀粉酶和中肠淀粉酶最适反应温度分别为 40 $^{\circ}\text{C}$ 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 。经比较分析, 中肠中蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活力要高于前肠相应酶的活力, 而中肠的脂肪酶活力要低于前肠的脂肪酶活力。此外, 根据比活力值的大小可以看出, 刺参蛋白酶活力最高, 其次为纤维素酶和淀粉酶活力, 而脂肪酶活力最低。

2.3 反应 pH 对刺参前肠和中肠消化酶性质的影响

图 2 显示了反应 pH 对刺参前肠和中肠中各种消化酶活力的影响。实验结果表明: 反应 pH 对刺参前肠和中肠中各种消化酶影响显著($P < 0.05$)。刺参前肠蛋白酶活力在酸性环境下较中肠高, 且在反应 pH 为 5.0—5.8 之间酶活力相对稳

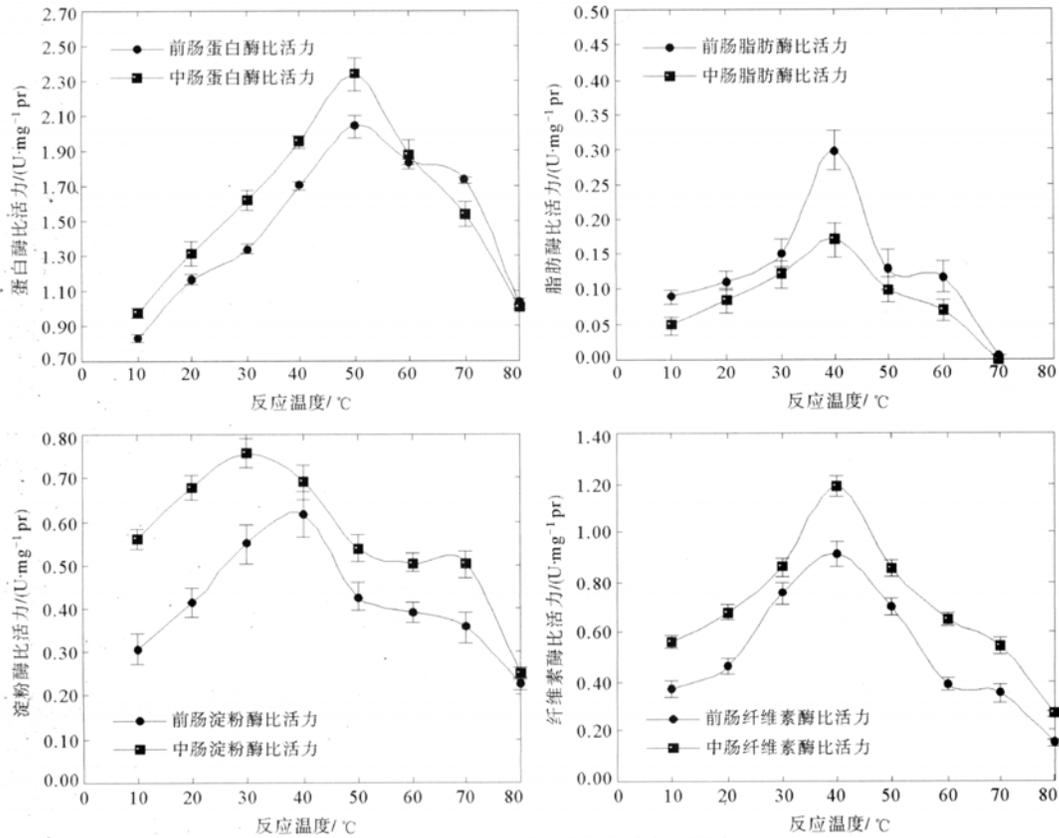


图1 反应温度对刺参消化酶活力的影响

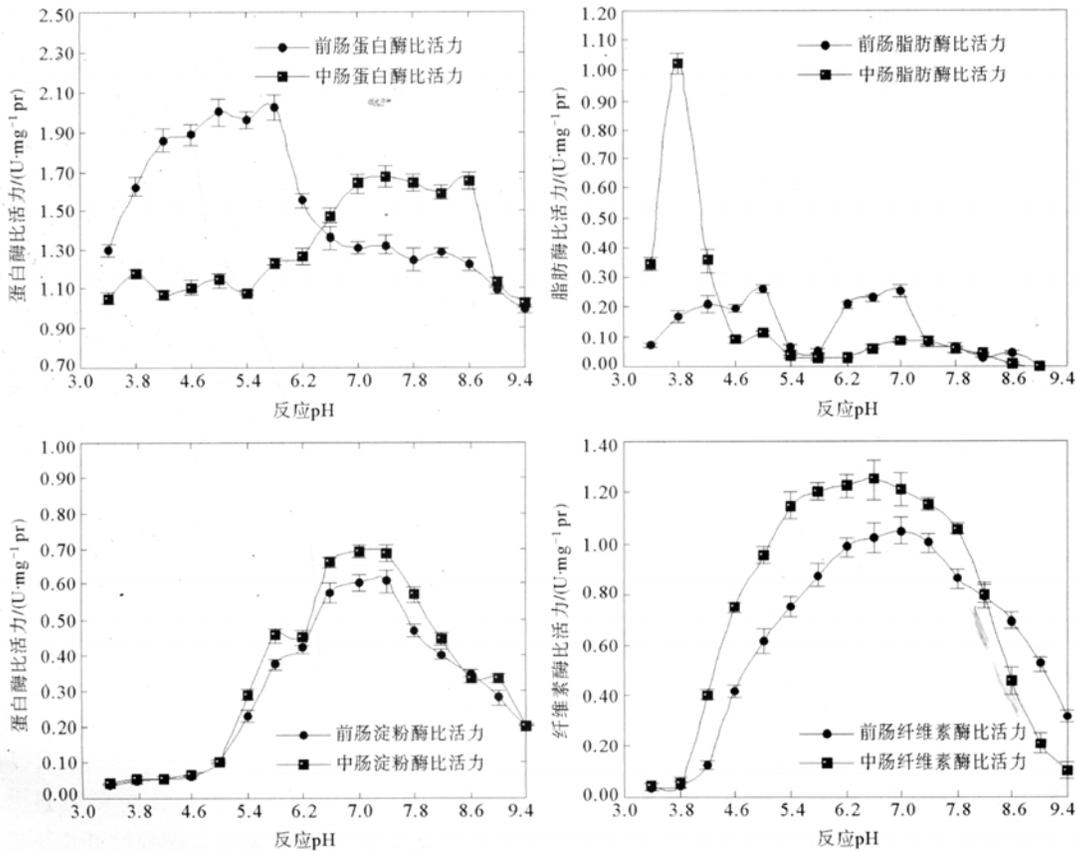
Fig.1 Effect of temperature on the activities of digestive enzymes in *Apostichopus japonicus*

图2 反应 pH 对刺参消化酶活力的影响

Fig. 2 Effect of pH on the activities of digestive enzymes in *Apostichopus japonicus*

定, 而中肠蛋白酶活力在碱性环境下较前肠高, 且在反应 pH 为 7.0—8.6 之间酶活力相对稳定; 刺参前肠脂肪酶活力随着 pH 的升高出现两个相对稳定的峰值, 分别为 4.2—5.0 和 6.2—7.0, 中肠脂肪酶活力在 pH 为 3.8 时达到最大值, 而在 pH 超过 9.0 时明显失活; 刺参前肠和中肠淀粉酶活力表现出相似的变化趋势, 在反应 pH 为 6.6—7.4 之间酶活力较高且相对稳定; 刺参前肠纤维素酶活力在反应 pH 为 6.2—7.4 之间酶活力较高且相对稳定, 中肠纤维素酶活力在反应 pH 为 5.4—7.0 之间酶活力较高且相对稳定。

3 讨论

3.1 反应温度对刺参消化酶活力的影响

本实验结果表明, 随着温度的升高, 刺参前肠和中肠中各种消化酶活力都逐渐升高, 但是表现出的热稳定性不同, 蛋白酶在 50℃ 时活力最高, 脂肪酶和纤维素酶在 40℃ 时活力最高, 而前肠和中肠中淀粉酶活力则分别在 40℃ 和 30℃ 时达到最大值。由此可以看出, 不同消化酶对温度的热稳定性是有差异的, 即使同一种酶因在消化道内的分布不同也存在差异。作者认为, 体外实验中温度对消化酶活力的影响主要表现在两个方面, 一方面随着温度的升高, 酶催化反应速度加快, 致使单位时间内酶活力升高; 另一方面当温度超过某一临界值时, 会引起消化酶变性和失活, 从而导致酶活力降低。本实验结果反映了温度对刺参多种消化酶活力影响的变化规律, 体现了多种消化酶的热稳定性。刺参蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶的热稳定性较好, 在反应温度达到 80℃ 时依然具有一定的酶活力; 而脂肪酶的热稳定性则较差, 当反应温度达到 70℃ 时就完全失活。纵向比较可以看出, 在最适反应温度下刺参中肠内的蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活力都较高, 高于前肠内对应的酶活力; 而中肠内的脂肪酶活力则较低, 且低于前肠的脂肪酶活力。这表明刺参对饲料中的蛋白质、淀粉和纤维素等具有较好的消化能力, 而对脂肪的消化能力较弱。

3.2 反应 pH 对刺参消化酶活力的影响

pH 值是酸碱度大小的反映, 其对水产动物消化酶的影响主要有两个方面: 1) pH 可以改变酶的活性中心或与之有关基团的解离状态, 从而影响底物与消化酶的结合, 改变酶的活性; 2) 当 pH

超过一定的范围时会使酶的构象发生改变, 导致消化酶变性失活。因此消化酶必须在一定的 pH 范围内才能表现出活力。姚雪梅等(2006)对 pH 对糙海参(*Holothuria scabra*)消化道中蛋白酶和淀粉酶活力影响的研究中指出, 在酸性条件下, 糙海参前肠蛋白酶活力和淀粉酶活力较中肠和后肠的酶活力高, 这与本实验结果具有一致性, 但是其所测定的糙海参蛋白酶和淀粉酶活力的最适 pH 与本实验结果有较大的差异, 这可能是因为种间差异的原因。本实验结果显示, 刺参前肠蛋白酶活力在酸性环境下较中肠的高, 且在反应 pH 为 5.0—5.8 之间酶活力相对稳定, 而中肠蛋白酶活力在碱性环境下较前肠的高, 且在反应 pH 为 7.0—8.6 之间酶活力相对稳定。作者认为, 蛋白酶因在消化道内分布的位置不同, 其结构或者酶活性中心可能存在差异, 因此酶活力表达的适宜 pH 范围就不同; 而刺参前肠和中肠的这种蛋白酶结构或者酶活性中心的多样性更有利于刺参对蛋白质的消化作用。刺参前肠和中肠脂肪酶活力都较低, 中肠脂肪酶在 pH 为 3.8 时表现出较高的活力, 但是其适宜 pH 与中肠实测的 pH 值(7.20 ± 0.15)相差较大, 这表明脂肪酶由于受 pH 值的影响, 其活力在肠道内难以表达; 同时可以看出 pH 在 6.2—7.0 范围内, 前肠脂肪酶活力要高于中肠的, 说明刺参的脂肪消化可能主要在前肠进行。刺参前肠和中肠 pH 在 6.2—7.4 之间都具有较高的淀粉酶和纤维素酶活力, 但是中肠酶活力要高于前肠的酶活力。综合比较看来, 在实验实测的刺参前肠(6.45 ± 0.10)和中肠(7.20 ± 0.15)的 pH 范围内, 中肠内蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活力都要高于前肠的酶活力, 只有脂肪酶活力低于前肠的酶活力。崔龙波等(2000)对刺参消化道的组织化学研究指出, 刺参前肠和中肠具有重要的分泌消化酶的作用, 特别是中肠具有吸收功能的结构特征, 但是没有区分开前肠和中肠在消化中的作用。结合本实验结果可以认为, 刺参中肠在刺参的消化过程中能够分泌更多的消化酶, 较前肠具有更重要的消化和吸收作用。

总之, 刺参虽然没有消化腺, 但是其前肠和中肠内具有多种重要的消化酶。各类消化酶因其结构或者酶活性中心的不同, 最适反应温度和最适反应 pH 存在较大的差异。四种消化酶最适反应温度范围为 30—50℃, 淀粉酶和纤维素酶的最

适反应 pH 范围为 6.2—7.4, 而蛋白酶和脂肪酶的最适反应 pH 变化较大。因此在确定刺参消化酶的最适反应条件时应该对酶的结构特征进行相应的研究。此外, 研究发现刺参消化道内蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活力较高, 而脂肪酶活力较低, 这为刺参营养生理的研究及饲料配方改进的研究等提供了必要的基础数据。

参 考 文 献

廖玉麟, 2001. 我国的海参. 生物学通报, 35(9): 1—3
袁秀堂, 杨红生, 周毅等, 2006. 盐度对刺参 (*Apostichopus japonicus*) 呼吸和排泄的影响. 海洋与湖沼, 37(4): 348—354
朱俭, 曹凯鸣, 周润琦, 1981. 生物化学试验. 上海: 上海科学技术出版社, 136—138

沈文英, 胡洪国, 潘雅娟, 2004. 温度和 pH 对南美白对虾消化酶活性的影响. 海洋与湖沼, 35(6): 543—548
姚雪梅, 王珺, 贝荣丙等, 2006. 不同 pH 对糙海参消化酶活性的影响. 海南大学学报自然科学版, 24(4): 389—394
施特马赫, 1992. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 242—255
崔龙波, 董志宁, 陆瑶华, 2000. 仿刺参消化系统的组织学和组织化学研究. 动物学杂志, 35(6): 2—4
潘鲁青, 王克行, 1997. 中国对虾幼体消化酶活力的实验研究. 水产学报, 21(1): 26—31
Shimizu M, Mikami I, Takahashi K, 1994. On accelerating maturity of sea cucumber with controlled temperature and its artificial seed-rearing, histochemical detection on the ontogenic development of digestive enzymes in the intestine of a juvenile sea cucumber *Stichopus japonicus*. Bull Fac Fish Hokkaido Univ, 45(1): 1—8

EFFECTS OF TEMPERATURE AND pH ON THE ACTIVITIES OF DIGESTIVE ENZYMES IN *APOSTICHOPUS JAPONICUS*

JIANG Ling-Xu, YANG Ning, LI Jian, WANG Wen-Qi^①, WANG Ren-Jie, Lu Jie
(Qingdao Agricultural University, Aquaculture College, Qingdao, 266109)

Abstract Activities of digestive enzyme reflect the digestive level of *Apostichopus japonicus* to different nutritional ingredients. Any changes in ambient factors would affect the activity of a digestive enzyme. Studying different ambient factors on the digestive enzymes in the *A. japonicus* is important for understanding the behavior of the enzymes. Among ambient factors, temperature and pH are the most two important affecting factors. Enzyme activities were analyzed including protease, lipase, amylase, and cellulase by Folin-phenol method, turbidimetric method, and colorimetric assay of salicylic acid. The results showed that temperature and pH had notable effects on the activities of digestive enzymes in foregut and midgut of *Apostichopus japonicus* ($P < 0.05$). The optimum temperature of protease, lipase, and cellulase was 50°C, 40°C and 40°C respectively in both foregut and midgut, while the optimum temperature of amylase was 40°C in foregut and 30°C in midgut. The protease activity in foregut was higher than that of midgut in an acidic condition at pH 5.0—5.8, while in an alkalescence condition at pH 7.0—8.6, the protease activity was higher in midgut than that in foregut. The lipase activity of foregut was high and stable in two pH ranges: 4.2—5.0 and 6.2—7.0, and that of midgut was high at pH 3.8, while the lipase lost enzyme activity at pH over 9.0. The amylase activity was high and stable at pH 6.6—7.4 in both foregut and midgut. The cellulase activity of foregut and midgut was high and stable at pH 6.2—7.4 and 5.4—7.0 respectively. Therefore, the protease activity was the highest among all digestive enzymes, followed by cellulase and amylase activities, and the lipase activity was the lowest.

Key words *Apostichopus japonicus*, Temperature, pH, Digestive enzyme