

# 不同年龄泥蚶几种消化酶活性的季节变化\*

张永普<sup>①</sup> 孙建礼<sup>①</sup> 周化斌<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>温州师范学院生物与环境科学系 温州 325027; <sup>②</sup>温州师范学院第一初等教育学院 温州 325027)

**摘要:** 对不同年龄乐清养殖的泥蚶蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性的季节变化进行了研究,经双因子方差(two-way ANOVA)分析,结果表明,季节显著影响蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活力;年龄显著影响蛋白酶、淀粉酶活力,对纤维素酶无显著影响;季节和年龄相互作用显著影响蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活力。

**关键词:** 泥蚶;蛋白酶;淀粉酶;纤维素酶

**中图分类号:** S968.314 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)04-28-04

## Seasonal Changes in Activity of Some Digestive Enzymes in Different Ages of *Tegillarca granosa*

ZHANG Yong-Pu<sup>①</sup> SUN Jian-Li<sup>①</sup> ZHOU Hua-Bin<sup>②</sup>

(<sup>①</sup>Department of Biological and Environmental Science, Wenzhou Normal College, Wenzhou 325027;

<sup>②</sup>The First Primary Educational School, Wenzhou Normal College, Wenzhou 325027, China)

**Abstract:** Seasonal changes of proteinase, amylase and cellulase activities in *Tegillarca granosa* of different ages were recorded and analyzed by two-way ANOVA. The results show that season significantly affected proteinase, amylase and cellulase activities, and age significantly affected proteinase and amylase activities, but not cellulase activity. The interaction between season and age had a significant effect on proteinase, amylase and cellulase activities.

**Key words:** *Tegillarca granosa*; Proteinase; Amylase; Cellulase

消化酶主要由消化系统分泌,对软体动物消化酶的研究早在 20 世纪初就有报道。近年来随着贝类养殖的大力发展,其消化酶的研究倍受重视,但主要集中在以下几个方面:(1)定性分析组织器官中消化酶的种类,如通过对花缘牡蛎(*Ostrea* sp.)和食用牡蛎(*Ostrea edulis*)的消化盲囊分析,得知其中的酶类大致分为三类,即碳水化合物分解酶、脂肪分解酶和蛋白分解酶<sup>[1]</sup>; (2)研究消化酶的生理作用,如朱仁华<sup>[2]</sup>研究了海螺酶的解壁作用,陈菊崎<sup>[3,4]</sup>研究了大瓶螺和粒花冠小月螺消化酶对海藻的解壁作用; (3)环境因子对消化酶活性的影响,这方

面的研究近期较为活跃,张硕等<sup>[5]</sup>研究了温度和 pH 对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)蛋白酶和淀粉酶活性的影响,李太武等<sup>[6]</sup>研究了皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)不同年龄及正常鲍和病鲍的蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶的活性,杨惠萍等<sup>[7]</sup>研究了温度和 pH 对皱纹盘鲍蛋白酶活性的影响,岑利权等<sup>[8]</sup>研究了温度和 pH 对 10 种

\*温州市科技发展计划项目(No. S2000A11-1),温州市“551 人才工程”基金项目(No. 210);

第一作者介绍 张永普,36 岁,男,副教授;研究方向:动物生态学和海洋生物学; E-mail: zhangyongpu@hotmail.com.

收稿日期:2003-04-18

食用贝类淀粉酶活性的影响,刘万顺等<sup>[9]</sup>研究了紫贻贝、滨螺的消化酶活性大小。泥蚶(*Tegillarca granosa*)隶属于软体动物门双壳纲(Bivalvia)蚶科(Arcidae),是山东以南沿海常见的具有较高经济价值的软体动物,是我国沿海主要经济养殖贝类之一。目前,泥蚶人工育苗和养殖技术方面的研究较为活跃,有关其生理生化方面的研究相对较少,孙建礼等<sup>[10]</sup>研究了温度和 pH 对养殖泥蚶蛋白酶活性的影响。本文研究的目的在于探讨不同年龄养殖泥蚶蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性的季节变化,旨在为泥蚶养殖和育苗方面提供理论依据,从而丰富软体动物消化生理、营养生理和生化的理论基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料与样品制备** 用于测定不同年龄泥蚶蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性的季节变化材料采于浙江乐清东山泥蚶养殖场。年龄分别为 2、3、4 龄(年龄划分依据当年生的为 1 龄、前一年生的为 2 龄,依次类推),采集时间为 2001 年 4、7、10 月和 2002 年 1 月的每月 15 日,分别代表春季、夏季、秋季和冬季。每次所采实验材料于当天运回实验室,经砂滤海水中暂养 2~3 d,排除消化道中的食物后在冰浴中剥离泥蚶内脏团,每组样本(不同年龄和季节共 12 组样本)随机取样 6~8 份,预冷蒸馏水清洗后称重,于 -37℃ 下冰箱中暂存以备使用。样品在冰浴中研磨,于 GL-20B 高速冷冻离心机以 14 000 r/min 离心 30 min,制上清液即为粗酶提液,取上清液用预冷蒸馏水按比例稀释后于 -37℃ 下保存备用。

**1.2 蛋白酶活力测定** 参照福林酚试剂法<sup>[11]</sup>,略加修改。具体方法为加入 2% 酪蛋白底物溶液 1 ml,磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 4 ml,酶液 1 ml,使体积为 6 ml,混匀。在 40℃ 恒温水浴中反应 20 min 后加三氯乙酸 2 ml 终止反应、离心,取上清液,用福林酚试剂显色 20 min 后用 751-GW 分光光度计在 680 nm 下测取光吸收值。酶活力定义:在 pH = 6.6 和 40℃ 下保温 20 min,蛋白酶水解 2% 酪蛋白每分钟产生 1 μg

酪氨酸的酶量为一个蛋白酶活力单位。

**1.3 α-淀粉酶活力测定** 加入用 20 mmol/L (pH 6.9) 磷酸钠缓冲液配制的 1% 马铃薯支链淀粉溶液 0.5 ml,酶液 0.5 ml 置于 25℃ 恒温水浴中保温 3 min,再加入 3,5-二硝基小杨酸显色剂 1 ml,于沸水浴中加热 5 min 后,冷却加蒸馏水 10 ml,在 540 nm 处测取光吸收值。酶活力定义:在 25℃ 下,每分钟催化淀粉酶生成 1 μg 麦芽糖作为一个酶活力单位。

**1.4 纤维素酶活力测定** 加入 1 ml 酶液,0.04 mol/L (pH 4.5) 的乙酸缓冲液 1 ml,以 6 片(1 cm<sup>2</sup>) 滤纸片,置于 40℃ 水浴中保温 60 min,取出立即置于沸水浴中煮沸 10 min,冷却后加 3 ml 3,5-二硝基水杨酸显色剂,于沸水中煮沸显色 15 min 后冷却加蒸馏水 10 ml,于 550 nm 处测取光吸收值。酶活力定义:在 40℃ 下,每分钟催化纤维素生成 1 μg 葡萄糖作为一个酶活力单位。

**1.5 酶液蛋白浓度的测定** 采用福林酚试剂法<sup>[11]</sup>:1 ml 酶液加入 5 ml 试剂 3,0.5 ml 福林酚试剂,室温放置 30 min 后,于 550 nm 处测定光吸收值,从蛋白浓度与吸光值标准曲线上求得样品的蛋白质浓度。

**1.6 数据处理** 所有数据在统计检验前分别检验其正态性和方差同质性,用双因子方差(two-way ANOVA)分析处理相应数据,所用软件为 Statistica 统计软件包。文中描述性数据用平均值 ± 标准误表示。显著性水平设计在 α = 0.05。

## 2 结 果

不同季节、不同年龄乐清湾养殖泥蚶几种消化酶活力测定结果见表 1。经双因子方差分析(two-way ANOVA),Tukey's 检验显示:季节显著影响蛋白酶活力,春、秋季 > 夏季 > 冬季;年龄显著影响蛋白酶活力,2 龄和 3 龄大于 4 龄;季节和年龄相互作用显著影响蛋白酶活力。季节显著影响淀粉酶活力,冬季 > 秋季 > 春、夏季;年龄显著影响淀粉酶活力,4 龄大于 3 龄;季节和年龄相互作用显著影响淀粉酶活力。季

节显著影响纤维素酶活力,秋、冬季 > 春、夏季; 年龄对纤维素酶活力无显著影响; 季节和年龄相互作用显著影响纤维素酶活力。从表 1 可

知,不同年龄和不同季节的淀粉酶活力(2 龄春季除外) > 胃蛋白酶 > 纤维素酶。

表 1 年龄和季节对泥蚶几种消化酶活性的影响(活力单位/克湿组织)

年龄/季节	胃蛋白酶	淀粉酶	纤维素酶
2 龄/春季	0.522 ± 0.013 (0.468 ~ 0.585)	0.232 ± 0.011 (0.196 ~ 0.284)	0.0152 ± 0.0035 (0.0042 ~ 0.0264)
2 龄/夏季	0.281 ± 0.013 (0.241 ~ 0.366)	2.084 ± 0.181 (1.442 ~ 2.936)	0.0167 ± 0.0033 (0.0081 ~ 0.0379)
2 龄/秋季	0.664 ± 0.037 (0.487 ~ 0.774)	12.764 ± 2.021 (7.499 ~ 24.412)	0.0498 ± 0.012 (0.0150 ~ 0.1089)
2 龄/冬季	0.342 ± 0.041 (0.151 ~ 0.493)	25.458 ± 1.314 (20.144 ~ 31.032)	0.0223 ± 0.0035 (0.0106 ~ 0.0390)
3 龄/春季	0.566 ± 0.027 (0.468 ~ 0.646)	1.067 ± 0.049 (0.900 ~ 1.240)	0.0085 ± 0.0022 (0.0040 ~ 0.0140)
3 龄/夏季	0.306 ± 0.014 (0.258 ~ 0.372)	2.714 ± 0.250 (1.737 ~ 3.639)	0.0096 ± 0.0024 (0.0027 ~ 0.0179)
3 龄/秋季	0.650 ± 0.049 (0.492 ~ 0.879)	13.932 ± 2.127 (6.130 ~ 19.704)	0.0366 ± 0.0081 (0.0107 ~ 0.0747)
3 龄/冬季	0.266 ± 0.033 (0.136 ~ 0.412)	18.621 ± 1.234 (15.022 ~ 26.259)	0.0261 ± 0.0027 (0.0115 ~ 0.0362)
4 龄/春季	0.483 ± 0.002 (0.405 ~ 0.540)	0.617 ± 0.047 (0.460 ~ 0.720)	0.0068 ± 0.0013 (0.0046 ~ 0.0117)
4 龄/夏季	0.165 ± 0.013 (0.125 ~ 0.240)	2.288 ± 0.131 (1.787 ~ 2.744)	0.0080 ± 0.0028 (0.0025 ~ 0.0217)
4 龄/秋季	0.441 ± 0.068 (0.304 ~ 0.826)	19.403 ± 1.460 (14.947 ~ 26.114)	0.0159 ± 0.0018 (0.0102 ~ 0.0231)
4 龄/冬季	0.366 ± 0.018 (0.299 ~ 0.435)	24.809 ± 1.351 (21.805 ~ 32.634)	0.0338 ± 0.0057 (0.0121 ~ 0.0504)
季节	$F_{(3,78)} = 69.43^{***}$ 春季 <sup>a</sup> , 夏季 <sup>c</sup> , 秋季 <sup>a</sup> , 冬季 <sup>b</sup>	$F_{(3,78)} = 227.45^{***}$ 春季 <sup>c</sup> , 夏季 <sup>c</sup> , 秋季 <sup>b</sup> , 冬季 <sup>a</sup>	$F_{(3,68)} = 12.25^{***}$ 春季 <sup>b</sup> , 夏季 <sup>b</sup> , 秋季 <sup>a</sup> , 冬季 <sup>a</sup>
年龄	$F_{(2,78)} = 8.75^{***}$ 2 龄 <sup>a</sup> , 3 龄 <sup>a</sup> , 4 龄 <sup>b</sup>	$F_{(2,78)} = 4.91^{**}$ 2 龄 <sup>ab</sup> , 3 龄 <sup>b</sup> , 4 龄 <sup>a</sup>	$F_{(2,68)} = 3.06^{ns}$
相互作用	$F_{(6,78)} = 4.94^{***}$	$F_{(6,78)} = 4.62^{***}$	$F_{(6,68)} = 3.01^*$

双向 ANOVA 的 F 值上标不同的平均值差异显著(Tukey's test,  $\alpha = 0.05$ ), a > b > c; ns:  $P > 0.05$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

### 3 讨论

3.1 季节变化对泥蚶消化酶活力的影响 环境条件的变化对生物的生理生化都有很大的影响,由于温度和食饵随季节而变化,动物消化酶的活力和组成会随着季节的变化而产生一定的变化,这在鱼类<sup>[12-14]</sup>、甲壳类<sup>[15,16]</sup>的研究较多,但在软体动物很少报道。作者的研究结果表明,泥蚶蛋白酶的活力在三个年龄段均表现出

春季、秋季 > 冬季 > 夏季。酶本身属于蛋白质,温度对消化酶最为直接,在一定范围内随着温度的升高,酶活力也升高,而超过一定温度后反而会下降。在夏季由于温度过高,泥蚶活动能力下降,摄食量减少,从而引起酶活力下降。消化酶活力大小的变化程度与食物组成、含量的变化有一定的关系<sup>[17]</sup>。

淀粉酶活力不同季节表现为:冬季 > 秋季 > 夏季 > 春季,这与蛋白酶有很大的差

异,不同年龄的淀粉酶活力几乎在不同季节都大于蛋白酶活力,这与泥蚶的食性有关。泥蚶摄入的食物 95% 为硅藻,而硅藻中富含复杂的多糖。

纤维素酶的不同季节变化表现为秋、冬季大于春、夏季,在三种酶中活力最低,反映了泥蚶对纤维素的消化利用能力较低。

**3.2 年龄对泥蚶消化酶活力的影响** 泥蚶的生长为终生生长型,研究不同年龄阶段消化酶活力变化,有助于了解不同生长阶段的饵料利用情况。结果表明:年龄对蛋白酶和淀粉酶有显著影响,2 龄和 3 龄蚶的蛋白酶大于 4 龄,低龄泥蚶生长较快,4 龄后减慢,这与泥蚶的生长速率有关,与虾蟹类<sup>[18,19]</sup>和皱纹盘鲍<sup>[6]</sup>的研究有相似之处。机体在高速生长期对蛋白质摄入量,要求与其相应量的消化酶来实现蛋白质的消化、吸收和积累,故蛋白质的活性较高。淀粉酶活力的年龄变化为 4 龄大于 3 龄,这与虾蟹类幼体发育过程中淀粉酶的变化不同<sup>[19]</sup>,与皱纹盘鲍<sup>[6]</sup>淀粉酶从 1 cm 以下鲍苗到成鲍呈明显下降趋势不同,可能与泥蚶的摄食习性有关,也可能与不同生长阶段的能量需求不同有关,糖类为动物能量的主要来源,于是表现出了淀粉酶活力的这种年龄差异。泥蚶的纤维素酶年龄间差异不显著,这与皱纹盘鲍<sup>[6]</sup>不同。

总之,不同年龄和不同季节各种酶的活力不同,这与环境温度、饵料和年龄等有关。

## 参 考 文 献

- [1] 蔡英亚,张英,魏若飞. 贝类学概论. 上海:上海科学技术出版社,1979.
- [2] 朱仁华. 海螺酶解壁作用的研究. 山东海洋学院学报, 1983, 13(4): 46 ~ 47.
- [3] 陈菊崎. 粒花冠小月螺消化酶对海藻解壁作用的研究. 厦门水产学院学报, 1990, 12(2): 21 ~ 27.
- [4] 陈菊崎. 大瓶螺消化酶对海藻解壁作用的初步研究. 厦门水产学院学报, 1991, 13(1): 1 ~ 6.
- [5] 张硕,赵艳. 栉孔扇贝蛋白酶和淀粉酶活力的初步研究. 大连水产学院学报, 1997, 12(1): 15 ~ 20.
- [6] 李太武,聂丽萍,刘金屏等. 皱纹盘鲍消化酶的研究. 水产科学, 1995, 14(5): 3 ~ 7.
- [7] 杨惠萍,童圣英,王子臣. 皱纹盘鲍蛋白酶的研究. 水产学报, 1997, 21(2): 128 ~ 133.
- [8] 岑利权,顾小英,尤仲杰等. 几种食用贝类淀粉酶活性的初步研究. 海洋科学集刊, 1997, 39: 71 ~ 80.
- [9] 刘顺万,李颜. 海洋无脊椎动物消化酶的研究 I: 紫贻贝、日本蛭、滨螺消化酶的初步分析和利用. 山东海洋学院学报, 1988, 18(1): 53 ~ 57.
- [10] 孙建礼,张永普,高辉. 温度和 pH 值对乐清养殖泥蚶蛋白酶的影响. 水产科学, 2002, 21(6): 7 ~ 9.
- [11] 蒋传葵,金承德,吴仁龙等. 工具酶活力的测定. 上海:上海科技出版社, 1982.
- [12] Hofer R. The adaptation of digestive enzymes to temperature, seasons and diet in roach, *Rutilus rutilus* and *Rueld scardinius erythrophthalmus* I: amylase. *J Fish Biol*, 1978, 14: 565 ~ 572.
- [13] Hofer R. The adaptation of digestive enzymes to temperature, seasons and diet in roach, *Rutilus rutilus* and *Rueld scardinius erythrophthalmus* II: protease. *J Fish Biol*, 1979, 15: 373 ~ 379.
- [14] 陈品健,王重刚,郑森林. 夏、冬两季真鲷仔、稚、幼鱼消化酶活性的比较研究. 海洋学报, 1998, 20(5): 90 ~ 92.
- [15] 汤鸿,李少菁. 桉类消化酶活力的影响因子. 生态学杂志, 1994, 13(1): 45 ~ 50.
- [16] Hassett R P. Seasonal changes in feeding rate, digestive enzyme activities and assimilation efficiency of *Calanus pacificus*. *Mar Eco Pro Ser*, 1990, 62 (3): 203 ~ 210.
- [17] 杨惠萍,童圣英,王子臣. 国内外关于水产动物消化酶研究的概况. 大连水产学院学报, 1998, 13(3): 64 ~ 71.
- [18] 孙建明,刘亚杰,周遵春. 不同生长时期中国对虾蛋白酶、脂肪酶活性变化的研究. 水产科学, 1995, 14(2): 11 ~ 13.
- [19] 潘鲁青. 四种虾蟹类幼体消化酶活力比较研究. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(3): 313 ~ 318.