

# 温度和 pH 对不同日龄蓝点马鲛鱼仔鱼消化酶活性的影响

陈 健<sup>1</sup>, 郑春静<sup>2\*</sup>, 桑卫国<sup>1</sup>

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315010)

**摘要:** 用生化方法研究温度和 pH 对蓝点马鲛鱼仔鱼蛋白酶和淀粉酶活力的影响。结果表明: 随着 pH 值的升高, 蓝点马鲛鱼仔鱼的蛋白酶先升高后下降, 淀粉酶先升高后下降。其中, 1 日龄仔鱼蛋白酶最适 pH 值为 8, 7 日龄和 15 日龄的蛋白酶最适 pH 值为 2; 1 日龄的淀粉酶最适 pH 值为 7, 7 日龄的淀粉酶最适 pH 值为 7~7.5, 15 日龄的淀粉酶最适 pH 值为 7.5。随着温度升高, 蓝点马鲛鱼仔鱼的蛋白酶先升高后下降, 淀粉酶随温度先升高后下降。其中, 1 日龄和 7 日龄仔鱼的蛋白酶最适温度为 37℃, 15 日龄的蛋白酶最适温度为 42℃; 1 日龄的淀粉酶最适温度为 42℃, 7 日龄的淀粉酶最适温度为 37~42℃, 15 日龄的淀粉酶最适温度为 42℃。

**关键词:** 蓝点马鲛鱼; 仔鱼; 消化酶; 温度; pH

**中图分类号:** S965.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-5132 (2015) 03-0009-04

蓝点马鲛鱼(*Scomberomorus niphonius*)隶属于鲈形目(*Perciformes*)、鲅科(*Cybiidae*)、马鲛属(*Scomberomorus*), 简称鲅鱼, 属暖水性中上层经济鱼类。近几年, 随着蓝点马鲛鱼价格不断提高, 捕捞强度有增无减, 导致黄渤海及东海区蓝点马鲛鱼资源严重衰退。随着人工养殖马鲛鱼的初步成功<sup>[1]</sup>, 对蓝点马鲛鱼鱼苗的需求必定会增加, 育苗种就成了一个相当重要的环节。由于鱼类早期生长的细微差别对其以后存活以及整个生活史的生长有着重要影响, 因此需要对蓝点马鲛鱼的早期生活史进行全面研究, 而研究仔稚鱼的消化酶变化机制更是了解仔稚鱼消化机能特性的基础。

酶是一类特殊的蛋白质。消化酶主要由消化腺和消化系统分泌, 包括蛋白酶、淀粉酶等, 具有促进营养消化作用。国内国外对鱼类消化酶活性的研究报道较多, 付新华等<sup>[2]</sup>研究了大菱鲆消化酶的活力, 马爱军等<sup>[3]</sup>研究了消化酶在仔稚幼鱼期的活性变化, 田宏杰等<sup>[4]</sup>研究了水温对施氏鲟幼鱼消化酶活力的影响, Comabella 等<sup>[5]</sup>研究了雀鳝仔鱼的酶活, 但尚未见对蓝点马鲛鱼的消化酶活性的研究报道。笔者以蓝点马鲛鱼仔鱼为实验材料, 研

究温度和 pH 对不同日龄的蓝点马鲛鱼仔鱼消化酶活力的影响, 进而了解蓝点马鲛鱼仔鱼不同的发育阶段各种消化酶的最适合反应条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

蓝点马鲛鱼仔鱼取自浙江象山港湾水产苗种有限公司育苗厂。蓝点马鲛鱼亲鱼捕获于浙江象山港海域, 通过人工授精获取 500 mL 受精卵, 经人工孵化获取仔鱼。取样前饥饿 24 h, 分别取 1 日龄、7 日龄和 15 日龄的马鲛鱼仔鱼。每个样品设置 3 个平行, 将所有样本放于液氮迅速冷冻, 再放入 -80℃ 超低温冰箱保存待测。育苗池水池面积为 23 m<sup>2</sup>, 水深 1.4 m, 水池溶解氧 7~8 mg·L<sup>-1</sup>, pH 7.35~7.5, 水池温度 20.5~22.5℃, 每天吸污, 换水 1 次。

## 2 方法

### 2.1 酶液制备

因为马鲛鱼仔鱼太小, 所以将整条仔鱼进行匀浆提取酶液。加入 10 倍体积的 4℃ 重蒸水, 在冰浴中用玻璃匀浆器进行匀浆, 将匀浆液放入冷冻

收稿日期: 2015-01-26.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 宁波市农业科技攻关项目(2012C10035); 宁波市海洋与渔业专项资金项目(甬海(2014)46号)。

第一作者: 陈健(1988-), 男, 浙江宁波人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产养殖. E-mail: 327154439@qq.com

\*通信作者: 郑春静(1965-), 女, 浙江宁波人, 高级工程师, 主要研究方向: 水产养殖. E-mail: 179109530@qq.com

离心机中,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $2\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 离心 10 min 后, 取上清液测定各种消化酶的活力. 样品酶液置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用, 在 24 h 内分析完毕.

## 2.2 设定 pH 的梯度

反应 pH 下蛋白酶活性测定: 以磷酸-柠檬酸为缓冲液, 在 pH 为 1.5~7.5 时, 以 0.5 为梯度, 设 12 个 pH 梯度值; 在 pH 为 8.0~11.5 时, 以 0.5 为梯度, 设 8 个 pH 梯度, 以硼砂-氢氧化钠为缓冲液. 在各 pH 值下测酶活力, 反应温度为  $37^{\circ}\text{C}$ .

反应 pH 下淀粉酶活性测定: 以磷酸-柠檬酸为缓冲液, 在 pH 为 5.0~8.5 时, 以 0.5 为梯度, 共设 8 个 pH 梯度值, 在各 pH 值下测酶活力, 反应温度为  $37^{\circ}\text{C}$ .

各消化酶最适反应温度的测定, 用恒温及冰水浴控制反应温度. 设置梯度: 12, 17, 22, 27, 32, 37, 42, 47, 52 和  $57^{\circ}\text{C}$  共计 10 个梯度.

## 2.3 淀粉酶活力的测定

采用淀粉-碘比色法<sup>[6]</sup>. 在设定的 pH 和温度条件下, 在 30 min 内 100 mL 酶液中的淀粉酶能完全水解 1 mg 淀粉时, 称为 1 个酶活力单位(U), 比活力单位为  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ .

## 2.4 蛋白酶活力的测定

采用以 5% 干酪素为底物的福林-酚法测定蛋白酶活力<sup>[7]</sup>. 蛋白酶活力的定义: 在一定温度和 pH 下, 每 1 min 水解干酪素产生  $1\text{ }\mu\text{g}$  酪氨酸为 1 个酶活力单位( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

## 2.5 数据处理

采用 SPSS 22.0 软件对测定所得数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 用 Duncan 氏多重比较法分析各组间的差异显著性. 描述性统计结果用平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SE)表示,  $P<0.05$  表示具有显著性差异.

## 3 结果与分析

### 3.1 不同 pH 对不同日龄马鲛鱼仔鱼蛋白酶和淀粉酶活力的影响

如图 1 所示, 随 pH 值升高, 1 日龄的仔鱼蛋白酶活力在 pH 8.0 时达到最大值, 为  $(74.14\pm 1.58)\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 与 pH 7.5 和 pH 8.5 相比, 差异显著( $P<0.05$ ); 7 日龄时, 仔鱼在 pH 2 时蛋白酶活力最大, 为  $(85.03\pm 0.21)\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 与 pH 1.5 和 pH 2.5 相比,

差异显著( $P<0.05$ ); 15 日龄时, 仔鱼在 pH 2 时蛋白酶活力最大, 为  $(95.95\pm 0.54)\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 与 pH 1.5 和 pH 2.5 相比, 差异显著( $P<0.05$ ).

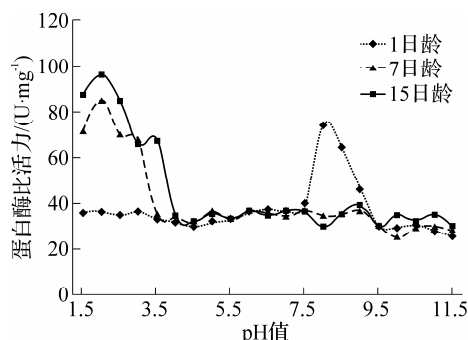


图 1 pH 对蓝点马鲛鱼仔鱼蛋白酶的影响

如图 2 所示, 1 日龄的仔鱼淀粉酶活力在 pH 7 时达到最大值, 为  $(4.77\pm 0.21)\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 与 pH 6.5 和 pH 7.5 相比, 差异显著( $P<0.05$ ); 7 日龄时, 仔鱼在 pH 7.5 时淀粉酶活力最大, 为  $(3.69\pm 0.25)\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 与 pH 7 相比, 差异不显著( $P>0.05$ ); 15 日龄时, 仔鱼在 pH 7.5 时淀粉酶活力最大, 为  $(4.00\pm 0.29)\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 与 pH 7 和 pH 8 相比, 差异显著( $P<0.05$ ).

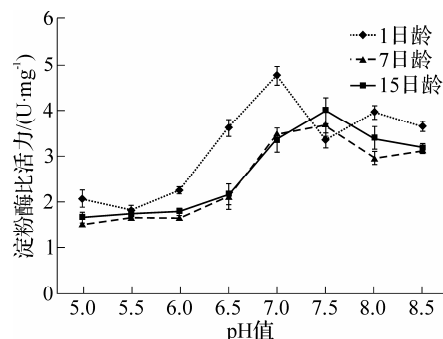


图 2 pH 对蓝点马鲛鱼仔鱼淀粉酶的影响

### 3.2 不同温度对不同日龄马鲛鱼仔鱼蛋白酶和淀粉酶活力的影响

如图 3 所示, 随温度升高, 1 日龄、7 日龄和 15 日龄仔鱼蛋白酶活力变化趋势相似, 均呈先上升后下降的变化. 1 日龄的仔鱼蛋白酶活力在温度  $37^{\circ}\text{C}$  时达到最大值, 为  $(36.14\pm 0.32)\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 但温度在  $32\sim 42^{\circ}\text{C}$  时, 差异不显著( $P>0.05$ ); 7 日龄时, 仔鱼在温度  $37^{\circ}\text{C}$  时蛋白酶活力最大, 为  $(83.16\pm 0.96)\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 与其他温度组相比, 差异显著( $P<0.05$ ); 15 日龄时, 仔鱼  $42^{\circ}\text{C}$  时蛋白酶活力最大, 为  $(95.20\pm 0.44)\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 与其他温度组相比, 差异显著( $P<0.05$ ).

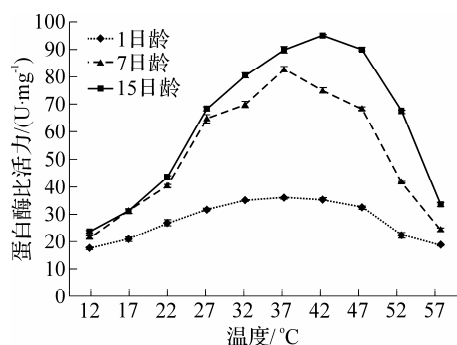


图3 温度对蓝点马鲛鱼仔鱼蛋白酶的影响

如图4所示, 1日龄仔鱼淀粉酶活力在温度42℃时达到最大值, 为 $(4.86 \pm 0.08) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 与其他温度组相比, 差异显著( $P < 0.05$ ); 7日龄仔鱼在温度37℃时淀粉酶活力最大, 为 $(4.91 \pm 0.03) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 但在温度37~42℃时, 差异不显著( $P > 0.05$ ); 15日龄仔鱼在温度42℃时淀粉酶活力最大, 为 $(4.00 \pm 0.29) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 与其他温度组相比, 差异显著( $P < 0.05$ ).

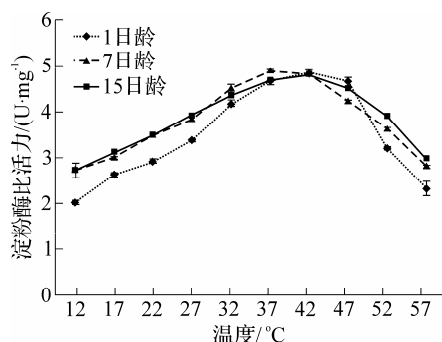


图4 温度对蓝点马鲛鱼仔鱼淀粉酶的影响

## 4 讨论

### 4.1 不同 pH 下消化酶活力的影响

不同阶段的马鲛鱼仔鱼蛋白酶的最适 pH 值不同. 1日龄时, 蛋白酶的最适 pH 值为 8.0, 到 7日龄和 15日龄时, 最适 pH 值则为 2, 这可能与马鲛鱼仔鱼的消化系统发育有关. 1日龄时, 仔鱼未开口摄食, 主要的营养物质来源于卵黄囊, 此时的胃腺还未形成, 而胰腺是蛋白水解酶的主要器官<sup>[13]</sup>, 因此, 在该阶段中, 最适 pH 值偏碱性时, 蛋白酶的活性较高, 此结果与陈品健等<sup>[8]</sup>研究真鲷仔稚鱼蛋白酶活力最适 pH 值在 10 的结论类似. 随着消化系统的发育和完善, 蛋白酶主导功能的酶逐渐发生变化, Comabella 等<sup>[5]</sup>研究表明, 当胃的消化系统发育形成后, 胃则是蛋白酶的主要器官, 碱性蛋白酶逐渐

降低, 酸性蛋白酶逐渐上升. 这与本文研究结果一致.

鱼类的淀粉酶可分 2 种——胃淀粉酶和肠淀粉酶. 在胃内, 胃淀粉酶的活性很低, 所以鱼类的消化吸收主要在肠道, 肠道的淀粉酶最适 pH 值在 5.0~8.0, 呈弱酸性或者弱碱性, 与本文研究结果一致, 淀粉酶最适 pH 值在 7~7.5. 倪寿文等<sup>[9]</sup>研究草鱼、鲤、鲢和尼罗罗非鱼淀粉酶最适 pH 值为 6.0~8.0 一致. 本文中, 1日龄时, 淀粉酶活性比 7日龄和 15日龄大, 1日龄未开口摄食, 能量来自内源性营养, 马鲛鱼仔鱼在孵化后第 7 日, 卵黄囊即将消失, 导致营养转换不适应, 这可能与仔鱼体内淀粉酶的 mRNA 转录水平下降有关. Douglas 等<sup>[10]</sup>研究美洲拟鲈仔鱼, 发现淀粉酶到 15 日又有所升高, 但又低于 1 日龄, 此情况与马鲛鱼的肉食性摄食习性有关联性. Douglas 等研究美洲拟鲈仔鱼在不同日龄淀粉酶的基因表达与摄食有关, Ma 等<sup>[11]</sup>研究鲈鱼仔鱼的淀粉酶表达与孵化天数有关.

### 4.2 不同温度下消化酶活力的影响

温度对消化酶的影响较大, 随着温度的升高, 酶活力表现出先上升后下降的趋势, 这是温度升高会加快催化反应, 但继续升高, 高温会使酶变性而失去活性. 由图 3 得知, 1日龄, 7日龄和 15日龄的仔鱼蛋白酶最适温度在 32~37℃, 淀粉酶在 37~42℃. 郭善军等<sup>[14]</sup>研究黄颡鱼蛋白酶和淀粉酶的最适温度分别在 42℃和 37℃. 叶元土等<sup>[15]</sup>研究南方大口鲶(*Silurus meriaionalis*)和长吻鲇(*Leiocassis longirostris*)蛋白酶、淀粉酶最适温度分别在 33~45℃和 39~45℃. 倪寿文等<sup>[9]</sup>研究鲢、鳙、草鱼、鲤的淀粉酶最适温度在 30~35℃, 蛋白酶最适温度在 40~45℃, 王立波等<sup>[12]</sup>研究怀头鲇幼鱼的淀粉酶最适温度在 40~45℃, 蛋白酶最适温度在 35~40℃, 这与本文研究结果类似.

## 5 结论

蓝点马鲛鱼仔鱼的发育中, 消化酶的活力随着仔鱼的生长而增大. 胰蛋白酶在未开口阶段对蛋白质的消化具有主导作用, 但随着消化系统的发育, 酸性蛋白酶的活力不断增加. 淀粉酶的活力在早期阶段较高, 随着仔鱼开口摄食, 淀粉酶活力逐渐降低. 笔者对早期的马鲛鱼仔鱼消化酶活性

研究,有助于了解蓝点马鲛鱼不同发育阶段的营养需求,也为蓝点马鲛鱼营养生理学及下一阶段饵料的研制提供理论参考依据。

#### 参考文献:

- [1] 郑春静, 朱民军, 徐凡土, 等. 野生蓝点马鲛鱼人工育苗初步研究[J]. 河北渔业, 2008, 12:15-16.
- [2] 付新华, 孙谧, 孙世春. 大菱鲆消化酶的活力[J]. 中国水产科学, 2005, 12(1):26-32.
- [3] 马爱军, 柳学周, 吴莹莹, 等. 消化酶在半滑舌鲷成鱼体内的分布及仔稚幼鱼期的活性变化[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(2):43-48.
- [4] 田宏杰, 庄平, 章龙珍, 等. 水温对施氏鲟幼鱼消化酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1):126-131.
- [5] Comabella Y, Mendoza R, Aguilera C, et al. Digestive enzyme activity during early larvae development of the Cuban gar *Atractosteus tristoechus*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2006, 32(2):147-157.
- [6] 王富荣. 生物工程分析与检验[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005:204-207.
- [7] 胡思玉, 白建梅, 葛传龙, 等. 昆明裂腹鱼淀粉酶活性研究[J]. 水产科学, 2007, 26 (4):234-236.
- [8] 陈品健, 王重刚, 黄崇能, 等. pH 影响真鲷仔、稚鱼蛋白酶活性的研究[J]. 海洋学报, 1997, 19(3):97-101.
- [9] 倪寿文, 桂远明, 刘焕亮. 草鱼、鲤、鲢、鳙和尼罗罗非鱼肝胰脏和肠道蛋白酶活性的初步探讨[J]. 动物学报, 1993(2):160-168.
- [10] Douglas S E, Mandla S, Gallant J W. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during the development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*[J]. Aquaculture, 2000, 190(3/4):247-260.
- [11] Ma P, Sivaloganathan B, Reddy P K, et al. Ontogeny of  $\alpha$ -amylase gene expression in Sea Bass Larvae (*Lates calcarifer*)[J]. Marine Biotechnology, 2001, 3(5):463-469.
- [12] 王立波, 刘伟, 潘伟志, 等. 温度、pH 对怀头鲷幼鱼胃和肠道蛋白酶、淀粉酶活力的影响[J]. 大连水产学院学报, 2007(4):311-314.
- [13] Zambonino I J L, Cahu C L. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation[J]. Aquaculture, 2007, 268(1/4):98-105.
- [14] 郭善军, 陈章宝. 团头鲂、淡水白鲳、黄颡鱼的淀粉和蛋白酶活性研究[J]. 重庆工学院学报, 2004, 18(5):34-37.
- [15] 叶元土, 林仕梅, 罗莉, 等. 温度、pH 值对南方大口鲶、长吻鲈蛋白酶和淀粉酶活力的影响[J]. 大连水产学院学报, 1998, 13(2):17-23.

## Effects of Temperature and pH on Digestive Enzyme Day-varying Activity Larvae of *Scomberomorus niphoides*

CHEN Jian<sup>1</sup>, ZHEN Chun-jing<sup>2\*</sup>, SANG Wei-guo<sup>1</sup>

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Ningbo Ocean and Fishery Research Institute, Ningbo 315010, China)

**Abstract:** Effects of pH and temperature on activities of protease and amylase are studied in *Scomberomorus niphoides* larvae using enzyme analysis approach. It is found that the activities of protease and amylase first increase in the *Scomberomorus niphoides* larvae followed by decreasing along with rising pH. The results indicate that the optimal pH of protease for 1st-day, 7th-day and 15th-day larvae is 8, 2, 2, respectively; The optimal pH of amylase for 1st-day, 7th-day, 15th-day larvae is 7, 7-7.5, and 7.5, respectively. The activities of protease and amylase in *Scomberomorus niphoides* larvae are found to first increase and then decrease while temperature is rising. The results also indicate that the optimal temperature of protease for 1st-day, 7th-day, and 15th-day larvae is 37 °C, 42 °C, 42 °C, respectively. The optimal temperature of amylase for 1st-day, 7th-day, and 15th-day larvae is 42 °C, 37-42 °C, 42 °C, respectively.

**Key words:** *Scomberomorus niphoides*; larvae; digestive enzyme; temperature; pH

(责任编辑 章践立)