

大鳍鲩蛋白酶活力的研究

林仕梅¹, 王友慧¹, 罗莉¹, 叶元土¹, 李涛²

(1. 西南农业大学水产系, 重庆 400716; 2. 重庆市沙坪坝区农业局, 重庆 400700)

摘要:以嘉陵江野生大鳍鲩(*Mystus macropterus*)为材料,对其蛋白酶的酶活力影响因素、酶解动力学、体外消化率进行综合研究。结果表明,(1)大鳍鲩胃、肠、肝胰脏的蛋白酶最适温度分别为36、40、40℃,最适pH分别为2.2、7.0、7.0,温度对胃、肠蛋白酶的影响大于肝胰脏,pH对胃蛋白酶的影响大于肠和肝胰脏;(2)肠蛋白酶的酶解能力最强,对鱼粉和豆粕酶解产生氨基酸,速度分别为52.288 mg/h和33.352 mg/h,胃、肝胰脏蛋白酶的酶解能力差异不显著,对鱼粉和豆粕酶解产生氨基酸,速度分别为24.328 mg/h、25.275 mg/h和19.843 mg/h、17.535 mg/h;(3)大鳍鲩蛋白酶对鱼粉或豆粕的干物质或粗蛋白消化率均以胃最大,肠次之,肝胰脏最小;鱼粉的体外消化率均大于豆粕的体外消化率。从总体消化能力来看,大鳍鲩蛋白酶对鱼粉和豆粕都有较强的消化能力。

关键词:大鳍鲩;消化道;蛋白酶;酶活性

中图分类号:S917;Q493.2

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2003)02-0169-04

大鳍鲩(*Mystus macropterus*)为鲇形目鲇科鲇属中一种生长较快的肉食性经济鱼类。由于江河污染、过度捕捞等原因,天然资源急剧减少,大鳍鲩的人工养殖已日益受到人们的重视,对大鳍鲩生物学及其繁殖生理学方面已进行了大量研究^[1-2],但对大鳍鲩消化生理方面的研究未见报道,而了解消化生理特点对开发和研究大鳍鲩人工配合饲料具有重要的意义。本研究对大鳍鲩消化道中蛋白酶的消化生理特点作初步的探讨,旨在为大鳍鲩人工配合饲料的合理开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验鱼 大鳍鲩来自嘉陵江北碛段的野生鱼类,共26尾,体重45~382 g,平均体重(181.8±100.5) g。

1.1.2 鱼粉及豆粕 重庆市场购得,过80目筛,测得常规营养成分如表1。

1.2 试验鱼处理与粗酶液的制备

捣毁脊髓处死,迅速解剖,分别测定胃、肠、肝胰脏重及消化道内pH等;粗酶液的制备参照叶元土等^[3-4]的方法进行。

1.3 测定方法

收稿日期:2002-03-14。

作者简介:林仕梅(1970-),男,讲师,从事水产动物营养方面的研究。E-mail:linshimei@net mail. com

1.3.1 酶活力 采用Folin酚法测定蛋白酶活力。pH及温度设置参照叶元土等^[3-5]的方法。蛋白酶活力单位规定为:以酪蛋白为底物,在28℃、pH 7.0条件下,每分钟催化生成1 μg酪氨酸的酶量为1个酶活力单位。

表1 试验饲料的常规营养成分

Table 1 Nutrient composition of test feeds %	成分		原料 Ingredients	
	Composition	鱼粉 Fishmeal	豆粕 Soybean meal	%
粗蛋白 Crude protein	62.45	44.87		
粗脂肪 Crude lipid	9.98	1.03		
粗灰分 Crude ash	11.83	6.19		
水分 Moisture	10.18	12.89		

1.3.2 酶解速度 准确称量过80目鱼粉和豆粕各0.400 g,加pH 7.0(胃加pH 2.2)磷酸缓冲液50 mL,各粗酶液5 mL。为防止肠道及其他微生物的干扰,加入青霉素和硫酸链霉素各150 IU/mL,酶解反应置于(28±0.1)℃生化培养箱中,摇床以50次/min振摇进行酶解。每隔30 min取样0.2 mL,3个平行样,同时补加等体积缓冲液,样品液加入10%三氯醋酸0.2 mL,3 500 r/min,离心25 min,取上清液0.2 mL,用茚三酮法显色测定总氨基酸量。每个处理最少做3个重复,取其平均值计算。

1.3.3 离体消化率 准确称取鱼粉和豆粕各0.500 g,各加pH 7.0(胃加pH 2.2)磷酸缓冲液40 mL,粗酶液10 mL,并

参照王子淑^[6]方法加青霉素和硫酸链霉素 150 IU/mL,每隔 4 h 加 1 次。置于 $(28 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 的恒温生化培养箱中,摇床以 50 次/min 振荡消化 8 h。每个样品做 3 个平行,以各煮沸酶液为对照。结果计算方法参照罗莉等^[6]进行。

2 结果

2.1 蛋白酶的酶活力

2.1.1 蛋白酶的最适温度 在温度 16~64 °C 内,测得各温度梯度下胃(pH 2.2)、肠和肝胰脏(pH 7.0)蛋白酶活力,结果见图 1。从图 1 可知,大鳍鲢胃、肠、肝胰脏的蛋白酶最适温度分别为 36、40、40 °C。其中以胃的最适温度最低,肠和肝胰脏相同,另外在最适温度附近(36~44 °C),肝胰脏没有出现明显的峰值,受温度的影响较小;相反,胃和肠在最适温度处有明显的峰值,受温度的影响较大。

2.1.2 蛋白酶的最适 pH 在 pH 1.4~8.2 内,测得各 pH 时胃、肠、肝胰脏蛋白酶活力,结果见图 2。从图看出,胃在 pH 2.2 附近有最大酶活力,肠、肝胰脏在 pH 7.0 处有最大酶活力,其中以胃蛋白酶活力受 pH 影响较大,在 pH 4.0 以上时,其酶活性基本丧失,肠和肝胰脏蛋白酶活力受 pH 影响

相对较小。

2.2 消化道氨基酸酶解速度及比较

以酶解鱼粉和豆粕所生成的氨基酸量随时间的变化作为粗酶液对蛋白质酶解动力学的变化关系。0~4 h 之间酶解产生的氨基酸量(mg)随时间(h)的变化曲线如图 3、4。由不同时间的氨基酸生成量对相应的酶解时间作直线回归分析得到回归方程及相关系数见表 2。

从图 3、4 和表 2 可知,大鳍鲢消化道粗酶液对鱼粉和豆粕的蛋白质酶解速度以肠最大,分别为鱼粉 52.288 mg/h,豆粕 33.352 mg/h,胃和肝胰脏粗酶液对鱼粉和豆粕的蛋白质酶解速度无明显差异,即 $t_1 = 0.947 \leq t_{0.05} = 2.45$, $t_2 = 2.308 \leq t_{0.05} = 2.45$, 2 条曲线几乎重叠,酶解产生氨基酸速度也相近,分别为 24.328 mg/h、25.275 mg/h 和 19.843 mg/h、17.535 mg/h。

2.3 体外消化率的测定

从表 3 可以看出,大鳍鲢粗酶液对鱼粉的体外消化率优于对豆粕的体外消化率,只是在粗蛋白消化方面豆粕与鱼粉相差较小。

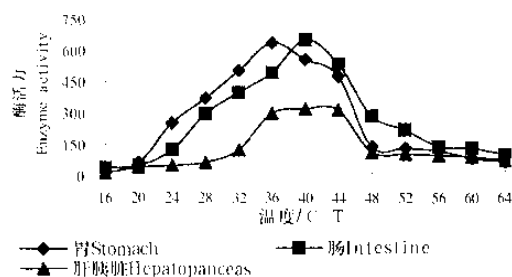


图1 温度对大鳍鲢蛋白酶活力的影响

Fig. 1 Effects of temperature on protease activity of *M. macropterus*

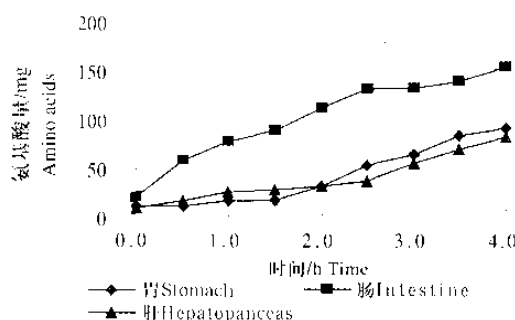


图3 酶解鱼粉氨基酸生成量随时间变化曲线

Fig. 3 Amino acids production of fishmeal enzymolysis liquid at different time

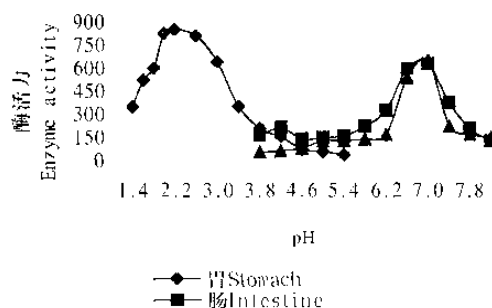


图2 pH 对大鳍鲢蛋白酶活力的影响

Fig. 2 Effects of pH on protease activity of *M. macropterus*

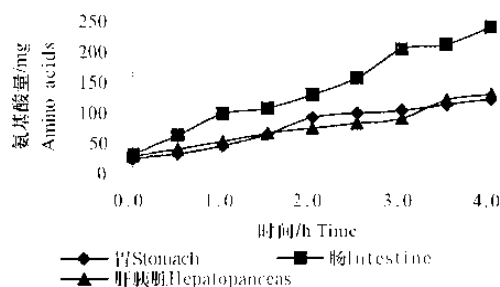


图4 酶解豆粕生成氨基酸量随时间变化曲线

Fig. 4 Amino acids production of soybean meal enzymolysis liquid at different time

表2 酶解氨基酸生成量对反应时间的回归方程及氨基酸的生成速度
Table 2 Regression equations of amino acids production to enzymolysis reaction time and producing rates of amino acids from fishmeal and soybeal

饲料原料 Feed sample	粗酶液 Crude enzyme liquid	回归方程 Regression equations	R^2	氨基酸生成速度/(mg·h ⁻¹) Produced rate of amino acids
鱼粉 Fish meal	胃 Stomach	$Y = 26.013x + 23.263$	0.960 1	24.328
	肠 Intestine	$Y = 51.456x + 33.447$	0.987 5	52.288
	肝胰脏 Hepatopanceas	$Y = 24.559x + 24.895$	0.971 9	25.275
豆粕 Soybean meal	胃 Stomach	$Y = 29.841x - 11.474$	0.911 6	19.843
	肠 Intestine	$Y = 30.668x + 38.920$	0.935 8	33.352
	肝胰脏 Hepatopanceas	$Y = 16.724x + 4.7703$	0.930 3	17.535

表3 大鳍鲷粗酶液对鱼粉和豆粕的体外消化率
Table 3 Digestibility of *M. macropterus* crude enzyme in fishmeal and soybean meal in vitro %

原料 Rawmaterial	鱼粉* Fishmeal			豆粕* Soybean meal		
	I	II	III	I	II	III
干物质 Dry matter	51.00	32.75	23.50	41.25	21.00	18.50
粗蛋白 Crude protein	64.46	9.51	47.25	58.43	47.70	42.10

*: I—胃 Stomach; II—肠 Intestine; III—肝胰脏 Hepatopanceas.

3 讨论

3.1 酶活力的影响因素

3.1.1 温度的影响 本实验测得大鳍鲷蛋白酶的最适温度为胃36℃、肠40℃、肝胰脏40℃,这与叶元士等^[3]测得的肉食性鱼类南方大口鲶33℃、45℃、39℃,长吻鲶36℃、39℃、41℃差异不大,而与桂远明等^[6]报道的草鱼、鲢、鲤、鳙消化道蛋白酶最适温度45~55℃差异较大。这种差异可能与鱼类本身的食性有关,而且草食性鱼类蛋白酶的最适温度通常比肉食性鱼类蛋白酶的最适温度要高得多,这种现象是否具有普遍意义仍需要进一步的研究证实。

3.1.2 pH的影响 本实验测得胃内最适pH为2.2,比叶元士等^[3]测得南方大口鲶2.6、长吻鲶3.0更低,这是否预示着大鳍鲷胃对食物的酸化作用更强,或者说胃对蛋白质具有更强的消化能力,还有待于进一步研究。同时,肠、肝胰脏蛋白酶的最适pH均为7.0左右,与南方大口鲶6.2~7.0、长吻鲶6.6~7.0相近^[3],表明它们的消化能力相近。

3.2 酶活力与酶解动力学

本研究结果显示,肠道蛋白酶对鱼粉和豆粕的消化能力最强,酶解产生氨基酸的速度最大,其次为胃蛋白酶,再次为肝胰脏蛋白酶。这表明鱼体对蛋白质的吸收利用主要在肠道中进行;胃在蛋白质消化中只起初步酶解的作用,其酶解产物可能主要为肽、寡肽和少量氨基酸;肝胰脏蛋白酶对饲

料蛋白质酶解能力较差,这可能与肝胰脏所含酶原的激活程度有关。另外,酶解产生氨基酸速度的大小与酶活力之间并没有表现出一致性,原因可能与不同酶液失活时间和实验酶解时间的长短有关。

对不同饲料而言,虽然酶活力和环境条件相同,但鱼粉酶解产生氨基酸的速度明显大于豆粕,这一现象在长吻鲶、大眼鲈、斑点叉尾鲷等肉食性鱼类中具有普遍性,叶元士等^[3]认为,这与饲料本身的蛋白质品质和酶对蛋白质的酶切位点有关。

3.3 酶活力与体外消化率

Frukawa等^[9]认为,饲料在鱼体内的消化程度取决于消化酶作用的时间,消化速度受消化酶的浓度、底物、温度和作用时间的影响。故酶活力的实际大小可以通过体外消化率来反映,从大鳍鲷对鱼粉和豆粕体外消化率的测定结果来看,干物质和粗蛋白消化率均为胃>肠>肝胰脏,这说明胃蛋白酶在消化过程中起重要作用,尤其是在干物质消化中起决定作用,也说明把酶活力与体外消化率相结合来评价鱼的消化能力更切合实际,也有助于饲料源的选择。因此,在目前鱼粉等动物性原料价格上涨较大的情况下,开发大鳍鲷人工配合饲料,使用大量豆粕来代替鱼粉作为蛋白源是有可能的,在生产上有较大的应用价值。

参考文献:

- [1] 王德寿,杨松林. 大鳍鲷的可量性状、体重关系和肥满度[J]. 西南师范大学学报,1993,17(4):510-515.
- [2] 王德寿,林浩然,Goos H J Th. 大鳍鲷脑垂体和血清促性腺激素(GTH)水平的季节变化[A]. 鱼类学论文集(第六集)[M]. 北京:科学出版社,1997.22-27.
- [3] 叶元士,林仕梅,罗莉. 温度、pH值对南方大口鲶、长吻鲶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.
- [4] 王德寿,林浩然,张为民. 大鳍鲷脑垂体和血清生长激素水平的季节变化[J]. 水产学报,1999,23(1):1-5.
- [5] 叶元士,肖理仁,陈凯,等. 鲤鱼肝胰脏和肠道蛋白酶活性

- 研究[J]. 西南农业大学学报, 1990, 12(4): 425 - 427.
- [6] 叶元土, 林仕梅, 罗莉. 茚三酮法测定蛋白质饲料中水溶蛋白质成分[J]. 饲料工业, 1993, 14(9): 18 - 20.
- [7] 王子淑. 人体及动物细胞遗传学实验技术[M]. 成都: 四川大学出版社, 1987. 1 - 40.
- [8] 罗莉, 林仕梅, 叶元土, 等. 长吻鮠、南方大口鲶和鲤鱼对九种蛋白质饲料的离体消化率的测定[J]. 饲料研究, 1997, (1): 2 - 5.
- [9] 桂远明, 吴士良, 刘焕尧. 温度对草鱼、鲢、鲤、鳙主要消化酶活性的影响[J]. 大连水产学院学报, 1992, 7(4): 1 - 8.
- [10] Fukawa A, Tsukabata H. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility in fish food[J]. Bull Jap Sci Fish, 1966, 35: 502 - 506.

Protease activity of digestive tract in *Mystus macopterus*

LIN Shi-mei¹, WANG You-hui¹, LUO Li¹, YE Yuan-tu¹, LI Tao²

(1. Fisheries Department, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China;

2. Agriculture Bureau of Shapingba District, Chongqing 400700, China)

Abstract: An experiment was conducted on protease activities, kinetics of enzymolysis and digestibility in vitro of *Mystus macopterus*. The results of protease activities show that the optimum temperatures in stomach, intestine and hepatopancreas for protease are 36, 40 and 40, and the optimum pHs are 2.2, 7.0 and 7.0, respectively. Using fishmeal and soybean meal as the feeds to study the kinetics of enzymolysis and the results indicate that the enzymolysis on intestine is better than those in stomach and hepatopancreas that the amino-acids-producing rate for fishmeal is 52.288 mg/h and for soybean meal is 33.352 mg/h in intestine, but for enzymolysis in stomach and hepatopancreas there is no significant difference between them.

Key words: *Mystus macopterus*; digestive tract; protease; enzyme activity