

草鱼肠道、肝胰脏对饲料蛋白质酶解速度的比较

叶元土¹, 薛敏², 林仕梅³, 王友慧³, 罗莉³, 田吉顺²

(1. 苏州大学农业科技学院, 江苏苏州 215006;

2. 北京友谊饲料公司, 北京 100075; 3. 西南农业大学, 重庆 400716)

摘 要: 草鱼样品体重($1\,543 \pm 213$) g。采用离体消化培养和茚三酮比色方法, 以草鱼前肠、中肠、后肠和肝胰脏的粗酶液作为酶源, 对鱼粉、豆粕、菜粕和棉粕进行酶解, 并测定酶解 14 h 内, 豆粕酶解液中氨基酸生成量随时间的变化, 以及 0 至 4 h 内 4 种饲料蛋白质酶解液中氨基酸的生成量。结果表明, (1) 在 0 至 4 h 内, 4 种饲料酶解液 OD₅₇₀ 随时间变化的线性关系较好。(2) 对于同种蛋白质饲料原料, 以中肠组织粗酶液的酶解速度最大, 其余依次为前肠、后肠及肝胰脏粗酶液。表明草鱼中肠对饲料蛋白质的酶解能力强于前肠和后肠, 同时, 肠道酶液的酶解速度均大于肝胰脏。(3) 对于 4 种不同的蛋白质饲料原料, 以鱼粉酶解氨基酸生成速度最大, 其他依次为豆粕、菜粕、棉粕。(4) 草鱼肝胰脏粗酶液对豆粕的酶解氨基酸生成速度最大, 表明草鱼对豆粕进行酶解消化的能力较强。实验证实, 饲料原料种类的差异和饲料蛋白质组成与性质的差异使其酶解氨基酸生成量和生成速度有差异。

关键词: 消化酶; 酶解速度; 草鱼

中图分类号: S963

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)02-0173-04

饲料蛋白质在鱼体消化道内经消化酶分解为小分子物质如氨基酸、小肽后才可能为鱼肠道粘膜细胞所吸收。目前, 有关饲料蛋白质的消化研究多集中于饲料氨基酸表观消化率等方面。施用辉等^[1]采用离体外消化方法进行了蛋白质品质与寡肽释放的研究, 表明寡肽释放量与蛋白质的品质呈正相关, 而有关饲料蛋白质在鱼体消化道内的降解机理以及不同蛋白质降解速度的差异等问题尚缺少相关报道。本研究采用离体实验方法, 利用草鱼肠道、肝胰脏的粗酶提取液测定其对鱼粉、豆粕、菜粕和棉粕蛋白质酶解后氨基酸的生成量随时间的变化, 目的在于建立一种快速、准确测定鱼体对不同饲料原料、配合饲料水解能力与水解速度的研究方法, 从而了解鱼体对饲料蛋白质的水解过程和消化利用能力。

1 材料和方法

1.1 实验草鱼

取池塘养殖草鱼 9 尾, 平均体重($1\,543 \pm 213$) g。

1.2 肠道粗酶液提取方法

收稿日期: 2002-03-18。

基金项目: 重庆市科委资助项目(97-4967)。

作者简介: 叶元土(1964-), 男, 理学硕士, 教授, 从事水产动物营养与饲料研究。

常规解剖取出草鱼的肠道和肝胰脏, 去除脂肪和肠道内容物后, 从肠道前部开始, 以肠道的第 1 个回折点以前为前肠、最后 1 个回折点以后为后肠、其间为中肠分别称取肠道的前、中、后 3 个部分, 分别按照肝胰脏、肠道重量的 10 倍量取磷酸缓冲液(pH 7.4、浓度 0.2 mol/L), 将样品与缓冲液用玻璃匀浆器进行匀浆。匀浆液在 3 500 r/min 离心 20 min, 取上清液作为粗酶提取液冰箱冷冻保存备用。

1.3 粗酶液酶解饲料蛋白质的方法和条件

分别取过 80 目标准筛的豆粕、菜粕、棉粕、鱼粉 0.300 0 g 于 100 mL 带塞三角瓶中, 加入 pH 7.4、磷酸 0.2 mol/L 的缓冲液 50 mL, 分别加入肝胰脏和前、中、后肠道粗酶液 5 mL。在 28 ℃ 的生化培养箱中培养、摇床以 50 次/min 振荡进行酶解。于不同时间取上清液 0.2 mL, 加入 10% 三氯醋酸 0.2 mL 沉淀蛋白质, 6 000 r/min 离心 25 min 后取上清液 0.2 mL 于 570 nm 处显色测定氨基酸含量。每个处理最少进行 3 次上述重复实验。

1.4 氨基酸的测定

采用茚三酮方法进行测定^[2]。具体方法: 取样品水溶液 0.1~0.2 mL, 加入 pH 5.5、0.2 mol/L 的醋酸缓冲液至 2 mL, 茚三酮试剂 1 mL[2 g 茚三酮溶解于 50 mL 乙二醇甲醚后, 再加入 25 mL 醋酸缓冲液(pH 5.5、0.2 mol/L)、25 mL 去离子水、0.08 g SnCl₂·2H₂O], 于沸水中煮沸 30 min, 冷却

至室温后加入50%的乙醇7 mL,以不加样品的显色液为空白对照,用721型分光光度计在570 nm测定OD值。氨基酸测定采用亮氨酸标准溶液做“亮氨酸-OD”标准曲线进行定量。

2 实验结果

2.1 酶解后氨基酸生成量的测定条件

本实验以豆粕为原料重点探讨酶解液中氨基酸生成量随时间的变化作为肝胰脏、肠道消化酶对饲料蛋白质的酶解动力学研究的实验条件。

2.1.1 14 h内豆粕酶解氨基酸生成量随时间的变化 取5 mL中肠的粗酶液在沸水中煮沸5 min后作为空白对照组,相同条件进行酶解。从0 h开始,每2 h取样一次,按照氨基酸含量测定方法测得OD₅₇₀随时间的变化,结果见图1。

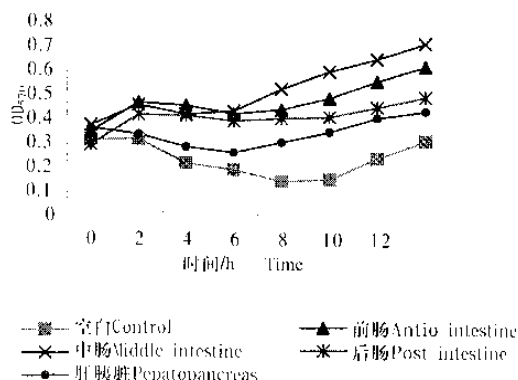


图1 豆粕水解液OD值随时间的变化

Fig 1 The OD value of the soybean enzymolysis liquid at difference time

由图1可知,①在刚加入粗酶液(0 h)的OD₅₇₀为0.3~0.4,而加入粗酶液前的OD₅₇₀为0,表明0 h的OD₅₇₀主要来源于粗酶液中的氨基酸(组织中的游离氨基酸),而不是饲料中的游离氨基酸。②从OD₅₇₀随时间的变化曲线来看,在2 h形成1个OD₅₇₀峰值,之后下降,在8 h左右开始回升。空白组与对照组的结果一致。出现这种现象的原因可能是来自粗酶液、饲料及器具的微生物作用的结果。因为酶解培养条件基本满足了微生物生长繁殖的条件。微生物利用酶解液中的游离氨基酸等营养物质进行生长繁殖,从而导致2 h后OD₅₇₀的降低。随着酶和微生物的进一步作用,生成的氨基酸量随后又逐渐增加。对照组的OD₅₇₀的变化可证明这个推测。因此必须排除微生物的干扰。

2.1.2 加入双抗后豆粕酶解液OD₅₇₀随时间的变化 参照王子淑等^[3]细胞培养时加入双抗(即青霉素、硫酸链霉素)的方法,在酶解液中分别加入150 U/mL的青霉素、硫酸链霉素以消除微生物的干扰。按照1.4方法测定OD₅₇₀随时间

的变化,结果见图2。

由图2可知,在0~4 h OD₅₇₀随时间变化的线性关系较好,在第2小时没有出现2.1.1中第1个OD₅₇₀峰值,证明微生物干扰基本排除。在5 h以后,各实验组和空白对照组的OD₅₇₀均显著增加,12 h以后基本稳定。出现这种现象的原因可能是双抗失活后微生物再次生长繁殖。因此,如果酶解的时间较长时,应该每间隔4 h左右加入1次双抗以排除微生物的影响。一般情况下,饲料蛋白质酶解氨基酸生成量动力学测定可以在4 h以前进行。

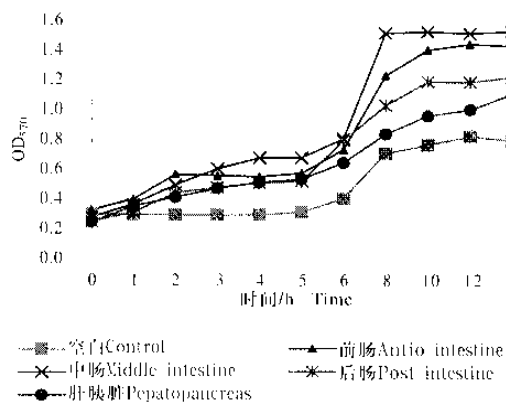


图2 加入抗生素后豆粕水解液OD值随时间的变化

Fig 2 The OD value of the soybean enzymolysis liquid with the antibiotic at difference time

2.2 4种饲料蛋白质酶解氨基酸生成动力学

以酶解氨基酸生成量随时间的变化作为肠道、肝胰脏消化酶对饲料蛋白质酶解动力学的变化关系(见表1)。各时间样品的OD₅₇₀均减去0 h的OD₅₇₀后再计算为样品的氨基酸量。曲线的斜率即为单位时间内酶解氨基酸的生成量,即饲料蛋白质被酶解的反应速度(mg/h)。酶解速度的大小反应了饲料蛋白质被水解生成氨基酸的能力大小。表1显示,①0~4 h内饲料蛋白质被酶解氨基酸生成量随时间的变化具有很好的直线线性关系,可以作为动力学测定的时间范围;②对于同种蛋白质饲料原料,以中肠组织粗酶液的酶解速度最大(鱼粉为31.967 mg/h、豆粕为22.801 mg/h、菜粕为17.551 mg/h、棉粕为8.723 mg/h),其次为前肠组织粗酶液(鱼粉为22.158 mg/h、豆粕为16.522 mg/h、菜粕为9.377 mg/h、棉粕为6.354 mg/h),再次为后肠组织粗酶液(鱼粉为18.764 mg/h、豆粕为17.101 mg/h、菜粕为11.584 mg/h、棉粕为4.575 mg/h),最后为肝胰脏的酶解液(鱼粉为8.957 mg/h、豆粕为13.447 mg/h、菜粕为6.961 mg/h、棉粕为1.841 mg/h)。表明草鱼中肠对饲料蛋白质的酶解能力强于前肠和后肠,同时,肠道的酶解速度均大于肝胰脏。③对于4种不同的蛋白质饲料原料,以鱼粉被酶解氨基酸生成速度较大,其次为豆粕,再次为菜粕,对棉粕的酶解速度最小。④

对于豆粕,草鱼肝胰脏的酶解氨基酸生成速度为最大,大于鱼粉相应值,表明草鱼对豆粕进行酶解消化具有较强的能力。肠道不同部位的结果与鱼粉的结果无显著性差异,表明

草鱼对豆粕的利用效率较高。⑤草鱼肠道、肝胰脏对棉粕的酶解消化能力较弱,其酶解氨基酸生成速度较低,速度最大的中肠酶解速度也仅为 8.723 mg/h。

表1 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 1 Regression equations of amino acids to enzymolysis reaction time and amino-acids-producing rate

饲料原料 Raw feed	粗酶液来源 Digestive enzyme source	回归方程 Regression equations	R	统计标准差 Standard difference	氨基酸生成速度 /(mg·h ⁻¹) Amino-acids- producing rate
鱼粉 Fish meal	前肠 Antio intestine	$Y = 22.158x - 3.112$	0.995	2.280	22.158
	中肠 Middle intestine	$Y = 31.967x - 4.925$	0.995	3.210	31.967
	后肠 Post intestine	$Y = 10.764x - 1.051$	0.987	1.810	18.764
	肝胰脏 Hepatopanceas	$Y = 8.957x - 4.697$	0.938	3.360	8.957
豆粕 Soybean meal	前肠 Antio intestine	$Y = 16.522x - 2.522$	0.986	2.805	16.522
	中肠 Middle intestine	$Y = 22.801x - 6.498$	0.985	4.080	22.801
	后肠 Post intestine	$Y = 17.101x - 0.126$	0.986	2.945	17.101
	肝胰脏 Hepatopanceas	$Y = 13.447x - 5.349$	0.970	3.426	13.447
菜粕 Rapeseed meal	前肠 Antio intestine	$Y = 9.377x + 1.538$	0.984	1.741	9.377
	中肠 Middle intestine	$Y = 17.551x - 3.680$	0.988	2.720	17.551
	后肠 Post intestine	$Y = 11.584x + 1.097$	0.995	1.080	11.584
	肝胰脏 Hepatopanceas	$Y = 6.961x - 1.737$	0.964	1.959	6.961
棉粕 Cottonseed meal	前肠 Antio intestine	$Y = 6.354x - 0.443$	0.996	0.189	6.354
	中肠 Middle intestine	$Y = 8.723x + 0.344$	0.991	0.918	8.723
	后肠 Post intestine	$Y = 4.575x + 2.329$	0.948	1.551	4.575
	肝胰脏 Hepatopanceas	$Y = 1.841x + 2.354$	0.984	1.170	1.841

3 讨论

3.1 饲料蛋白质在消化道内的水解过程及其影响因素

(1) 饲料原料的种类和饲料蛋白质的氨基酸组成决定了饲料蛋白质被酶解的速度和程度。施用辉等^[1]利用猪的胃蛋白酶-胰酶体外消化系统研究蛋白质饲料被酶解时寡肽的释放量,结果表明寡肽的释放量与饲料蛋白质中有效碱性氨基酸的含量呈显著线性正相关。Savose 等^[4]对 19 种动、植物性(豆科、谷物)蛋白质进行体外消化试验,在胃蛋白酶-胰蛋白酶作用下,动物性蛋白质释出的肽与游离氨基

酸的比例高,豆科蛋白次之,而谷物蛋白质的释放量最低。本实验结果也证实了不同饲料蛋白质被酶解为氨基酸的速度具有差异。

(2) 消化酶种类的不同决定了酶对饲料蛋白质酶解位点的数量和对蛋白质肽链的水解程度,而酶活力的大小决定了对饲料蛋白质水解能力的大小。肠道不同部位消化酶种类和酶活力的大小对饲料蛋白质的水解能力产生重大的影响。鱼类消化酶包括胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶、寡肽酶、肽酶等消化酶,而草鱼是无胃鱼类,缺少胃蛋白酶,对饲料蛋白质的水解只能依赖于肠道内的消化酶的作用。

当然,饲料蛋白质在消化道内被水解为氨基酸、小肽的过程是复杂的,需经过多步水解反应以及多种消化酶的催化作用才能实现。在这些反应链中氨基酸、小肽的产生效率还受很多因素的影响,如各种消化酶之间的组合效应、各级水解产物对消化酶分泌的诱导效应等,这均需要系统、深入的研究。

3.2 草鱼肠道和肝胰脏粗酶液对饲料蛋白质的酶解速度分析

本实验结果显示出草鱼对鱼粉具有很好的消化效果;在3种植物蛋白质饲料中,以对豆粕的消化效果最好,其次为菜粕,对棉粕的消化效果最差。这说明饲料原料种类差异和饲料蛋白质组成、性质的差异导致氨基酸酶解生成量和生成速度的差异,即草鱼消化道内的客观条件决定了对饲料蛋白质具有一定的选择性,这是营养与饲料研究中应该重视的问题。

3.3 消化道不同部位粗酶液对饲料蛋白质酶解速度分析

本实验结果反映出中肠对饲料蛋白质具有较强的消化能力;前肠和后肠占全肠的比例较少,食物可以很快通过。肝胰脏的消化酶一般以无活力的酶原的形式存在,且所分泌的蛋白质酶主要为胰蛋白酶、糜蛋白酶等消化酶,其水解产

物以短肽链为主,所以以氨基酸为终产物反映出的水解速度很低。这些结果表明草鱼肠道的不同部位的消化酶具有不同种类、或酶活力大小的差异。

消化道内饲料成分对消化酶的产生(分泌)也有一定的诱导作用。饲料蛋白质在消化道内按照一定的速度移动,同时被消化酶逐渐水解,其水解产物的种类、数量也在不断地发生变化,从而对消化酶的分泌产生一定的影响,其结果也将导致肠道不同部位分泌的消化酶种类和活力具有一定的差异。

参考文献:

- [1] 施用辉,乐国伟,刘选珍,等.离体外消化过程中蛋白质品质与寡肽释放的研究[J].中国畜牧杂志,2001,37(6):12-14.
- [2] 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份[J].饲料工业,1993,14(9):18-20.
- [3] 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.
- [4] Savose G L. Protein digestion in wealting pig:effect of dietary protein source[J].J Nutr,1989,119:1 093-1 099.

Enzymolysis kinetics of digestive enzyme from intestine and hepatopancreas in grass carp to four kinds of raw feed materials

YE Yuan-tu¹, XUE min², LIN Shi-mei³, WANG You-hui³, LUO Li³, TIAN Ji-shun²

(1. Agriculture Technique College, Suzhou University, Suzhou 215006, China; 2. Beijing Friendship Feed Company, Beijing 100075, China; 3. Southwest Agricultural University, Congqing 400716, China)

Abstract: The digestive enzymes for the enzymolysis cultivation were extracted from the anti intestine, middle intestine, post intestine and the hepatopancreas of grass carp, respectively. The fishmeal, soybean meal, rapeseed meal and cottonseed meal were used to be digested by those digestive enzymes at 28 °C, and the amount of amino acids produced in the enzymolysis fluid were tested within 0 h to 4 h. The results show that: (1) There is a linear relationship between the amino acids production amount and the digestive time. (2) For the same raw material protein, the fastest digestive rate occurs in the enzymolysis fluid from middle intestine and followed the enzymolysis fluid from anti intestine, post intestine and hepatopancreas. Meanwhile, the enzymolysis fluid from intestine has higher digestive rate than that from hepatopancreas. (3) For the four raw feed, the amino-acids-producing rate is in the order of fish meal > soybean meal > rapeseed meal > cottonseed meal. (4) The digestibility in the intestine is higher than that in the hepatopancreas.

Key words: digest enzyme; enzymolysis kinetics; grass carp