

奥尼罗非鱼淀粉酶、脂肪酶的分布与特性

黎军胜¹, 李建林², 吴婷婷²

(1. 南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095; 2. 中国水产科学研究院 无锡淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘要:以奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)为实验材料,研究其淀粉酶、脂肪酶分布与特性。结果表明,Ⅰ(体重55.14 g)、Ⅱ(体重122.82 g)、Ⅲ(体重225.68 g)组实验鱼肠道淀粉酶、脂肪酶活性均表现出相似规律:活性从大到小依次为前肠、中肠、后肠。实验鱼体重从55 g增至122 g,肠道淀粉酶活性急剧上升,实验鱼体重从122 g增至225 g,酶活性增幅减缓。3组实验鱼肠道各肠段淀粉酶活性相对比值(前肠、中肠、后肠)分别为1:0.95:0.52、1:0.44:0.21和1:0.50:0.24;脂肪酶活性相对比值(前肠、中肠、后肠)分别为1:0.17:0.12、1:0.34:0.14和1:0.98:0.64。3组实验鱼淀粉酶活性相对比值(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组)在全肠、肝胰脏中分别为1:8.25:18.94和1:3.43:9.31;3组实验鱼脂肪酶活性相对比值(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组)在全肠中为1:3.82:13.09。奥尼罗非鱼肠道、肝胰脏淀粉酶最适pH值分别为6.5~7.0和7.5;最适反应温度均为30℃;最适反应底物浓度均为0.8%。肠道脂肪酶最适pH值为7.0~7.5,最适反应温度为35℃。

关键词:罗非鱼;淀粉酶;脂肪酶

中图分类号:S963.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)05-0473-05

饵料中碳水化合物与脂肪是鱼类生长的重要能量来源,研究鱼类淀粉酶和脂肪酶特性具有重要的应用意义。国内外研究者对不同的养殖鱼类消化道蛋白酶作了较多研究^[1-3],对淀粉酶、脂肪的研究报道相对较少。近年来,倪寿文^[4]、叶元士^[5]、黄峰等^[6]对不同鱼类淀粉酶特性作了研究。Izquierdo等^[7]、Borlongan等^[8]对几种鱼的脂肪酶作了研究。但对罗非鱼淀粉酶和脂肪酶的研究,目前仅见 Tengjaroenkul等^[9]、山田亚树子等^[10]对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的报道。随着奥尼罗非鱼养殖和出口规模的不断扩大,对其饵料配制的要求也不断提高,为此,本研究对奥尼杂交罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)淀粉酶和脂肪酶活性分布和特性进行了研究,旨在从消化生理角度为其饵料的科学配制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

奥尼杂交罗非鱼由中国水产科学研究院无锡淡水渔业研究中心自繁培育,日投喂商品饵料2次,投喂率3.5%。于上午投喂后2 h取不同生长阶段、体重均匀的雄性奥尼杂交罗非鱼各12尾(规格与分组见表1,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组用于分布研究,Ⅳ组用于特性研究)。立即断脊处死,于冰浴中分离出胃、肝胰脏、肠,肠道等分为前、中、后肠,分别在低温(0~4

℃)下以电动匀浆器匀浆(10 000 r/min, 2 min),匀浆液定容至100 mL, -20℃保存待用。

表1 实验鱼规格

Table 1 Size of experimental fish $\bar{X} \pm SE$				
组别 Group	样本数 Samples	年龄/a Age	体长/cm Body length	体重/g Body weight
Ⅰ	12	1	11.4 ± 0.4	55.14 ± 4.37
Ⅱ	12	1	13.7 ± 0.6	122.82 ± 16.82
Ⅲ	12	1	16.3 ± 0.3	225.68 ± 15.58
Ⅳ	12	1	12.4 ± 0.7	111.81 ± 6.74

1.2 酶活性测定方法^[11]

1.2.1 淀粉酶活性测定 采用DNS还原糖法:取匀浆粗酶液1 mL,加当天配制的2%淀粉溶液4 mL(以0.02 mol·L⁻¹, pH 7.5磷酸缓冲液配制),于37℃水浴中糖化30 min,取出后立即于沸水中煮沸15 min使淀粉酶失活,得到糖化液。取糖化液1 mL,加1 mL DNS显色剂在沸水中煮沸显色5 min,于520 nm比色。同时以1 mL已煮沸失活的酶液作空白对照。

1.2.2 脂肪酶活性测定 加5 mL 0.025 mol/L pH 7.5磷

收稿日期:2003-01-02; 修订日期:2003-06-20。

基金项目:中国水产科学研究院重点科研计划项目(2001-53);南京农业大学青年创新基金(Y200206)。

作者简介:黎军胜(1969-)男,讲师,博士研究生,专业方向为鱼类营养与生化。Tel: 025-84395618。

通讯作者:吴婷婷。Tel: 0510-5554552。

酸缓冲液和4 mL 聚乙烯醇橄榄油乳化液于100 mL 锥形瓶中,置反应温度(37 ℃)水浴中预热5~10 min,然后加入酶液1 mL,准确反应30 min后,立即加入95%乙醇15 mL,终止酶反应。加1%酚酞指示剂3滴,用0.05 mol/L 标准氢氧化钠滴定至微红色,同时以1 mL 已煮沸失活的酶液做空白对照。

1.3 酶活性定义^[11]

脂肪酶:在一定反应条件下,1 min 催化脂肪水解产生1 μmol 脂肪酸的酶量定为1个活力单位(U)。

淀粉酶:在一定反应条件下,1 min 催化淀粉水解生成1 μg 葡萄糖的酶量定为1个活力单位(U)。

1.4 酶特性测定方法

按照酶活性测定方法,改变下列条件以测定酶特性:

最适反应 pH:配制0.02 mol/L, pH 1.6~12(梯度0.4~0.5)缓冲溶液,以此缓冲溶液配制相应 pH 梯度的反应底物取代标准底物进行消化酶活测定。

最适反应温度:反应温度设定为15~60 ℃,间隔梯度5 ℃,其他条件不变。

最适反应底物浓度:以0.02 mol/L, pH 7.5 磷酸缓冲液配制不同浓度底物进行消化酶活测定。

1.5 数据统计处理

采用 SPSS 统计软件包处理数据,结果以($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示。

2 结果

2.1 淀粉酶、脂肪酶活性分布

由表2.3可见,3组实验鱼肠道淀粉酶、脂肪酶活性分布均表现出相似规律:即其活性大小依次为前肠、中肠、后肠,酶活性主要分布于前、中肠。I、II、III组实验鱼各肠段淀粉酶活性比值(前肠、中肠、后肠)分别为1:0.95:0.52、1:0.44:0.21和1:0.50:0.24;脂肪酶活性比值(前肠、中肠、后肠)分别为1:0.17:0.12、1:0.34:0.14和1:0.98:0.64。

肝胰腺及各肠段淀粉酶、脂肪酶活性均随实验鱼体重增加而上升,但与体重增加不成比例,实验鱼体重从55 g增至122 g,肠淀粉酶活性急剧上升,实验鱼体重从122 g增至225 g,酶活性增幅减缓。3组实验鱼淀粉酶活性比值(I、II、III组)在前、中、后各肠段中分别为1:12.34:27.04、1:5.71:14.05和1:5.05:12.35;在全肠中为1:8.25:18.94;在肝胰腺中为1:3.43:9.31。3组实验鱼脂肪酶活性比值(I、II、III组)在前、中、后各肠段中分别为1:3.33:6.45、1:6.58:36.37和1:3.87:34.82;在全肠中为1:3.82:13.09。

表2 各消化器官淀粉酶活性

Table 2 Activities of Amylase in different digestive organs

$\bar{X} \pm \text{SE}$

组别 Group	体重/g Body weight	淀粉酶活性/U Amylase activity				
		肝胰腺 Hepato-pancreas	前肠 Fore intestine	中肠 Middle intestine	后肠 Hind intestine	全肠 Total intestine
I	55.14 $\pm$ 4.37	5883.4 $\pm$ 1191.30	4381.8 $\pm$ 851.6	4178.7 $\pm$ 654.5	2289.4 $\pm$ 318.4	10849.8
II	122.82 $\pm$ 16.82	20167.2 $\pm$ 4801.50	54076.7 $\pm$ 9098.3	23847.4 $\pm$ 5754.0	11557.5 $\pm$ 2021.7	89481.6
III	225.68 $\pm$ 15.58	54747.5 $\pm$ 5138.57	118467.7 $\pm$ 26232.2	58710.8 $\pm$ 18224.6	28278.4 $\pm$ 4593.3	205456.9

表3 各消化器官脂肪酶活性

Table 3 Activities of lipase in different digestive organs

$\bar{X} \pm \text{SE}$

组别 Group	体重/g Body weight	脂肪酶活性/U Lipase activity			
		前肠 Fore intestine	中肠 Middle intestine	后肠 Hind intestine	全肠 Total intestine
I	55.14 $\pm$ 4.37	5.85 $\pm$ 1.03	1.02 $\pm$ 0.37	0.70 $\pm$ 0.72	7.58
II	122.82 $\pm$ 16.82	19.50 $\pm$ 4.53	6.72 $\pm$ 1.84	2.71 $\pm$ 0.45	28.93
III	225.68 $\pm$ 15.58	37.75 $\pm$ 4.74	37.10 $\pm$ 2.01	24.38 $\pm$ 0.80	99.23

2.2 pH 对淀粉酶、脂肪酶活性的影响

由图1可见,肠道、肝胰腺淀粉酶活性随 pH 变化的规律相似,反应最适 pH 值分别为6.5~7.0、7.5,偏离最适 pH 值则活性急剧下降。pH 值高于9,下降趋势变缓。pH 值为8时活性降到最低点。

由图2可见,肠道脂肪酶最适反应 pH 值为7.0~7.5,偏离这一范围则活性降低,pH 值低于6.5,活性稍微回升。

2.3 温度对淀粉酶、脂肪酶活性的影响

由图3可见,在反应温度为15~55 ℃时,肝胰腺、肠道淀粉酶受反应温度影响活性变化规律相似,最适反应温度均为30 ℃。偏离该最适温度点,活性开始下降,但低于20 ℃活性有所回升。

由图4可见,肠道脂肪酶最适反应温度为35 ℃,高于此温度,酶活性单调下降。低于35 ℃则活性在最大值的62%~97%摆动变化。

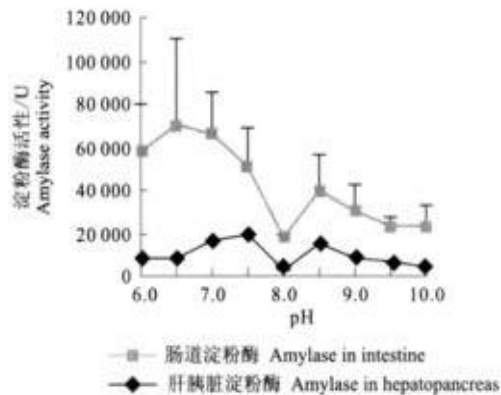


图1 pH对奥尼罗非鱼肝胰脏、肠道淀粉酶活性的影响
Fig.1 Effects of pH value on amylase in hepatopancreas and intestine of tilapia

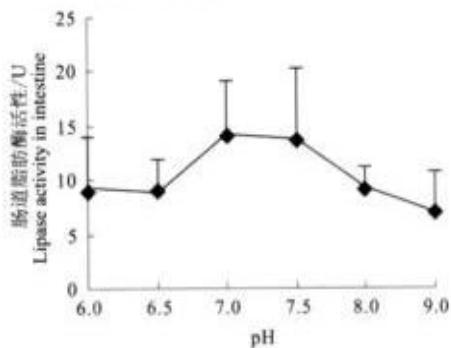


图2 pH对奥尼罗非鱼肠道脂肪酶活性的影响
Fig.2 Effects of pH value on lipase in intestine of tilapia

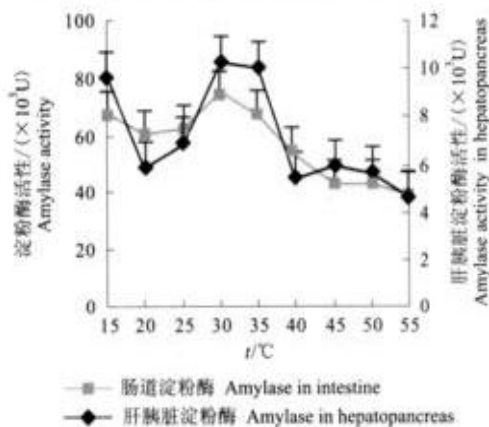


图3 温度对奥尼罗非鱼肝胰脏、肠道淀粉酶活性的影响
Fig.3 Effects of temperature on amylase in hepatopancreas and intestine of tilapia

2.4 底物浓度对淀粉酶活性的影响

由图5可见,肝胰脏、肠道淀粉酶最适反应底物质量分

数均为0.8%,低于该值,活性下降,高于0.8%,活性开始略有下降然后缓慢回升。

3 讨论

相对于蛋白酶而言,近年来对鱼类淀粉酶和脂肪酶特性的研究资料相对较少。陈品健研究发现,真鲷(*Pagrosomus major*)幼鱼脂肪酶活性在30℃达到高峰^[12],黄峰^[16]报道鲢、鳙淀粉酶的最适pH 7.5,叶元士^[5]测定了南方大口鲶胰脏和肠淀粉酶最适pH值分别为6.4和7.0,最适温度分别39℃和41℃。山田亚树子^[10]从尼罗罗非鱼肠管分离和提纯得到2种精制的淀粉酶,发现两者最适合温度均为40℃,最适pH为6.0。本研究结果与之相近。

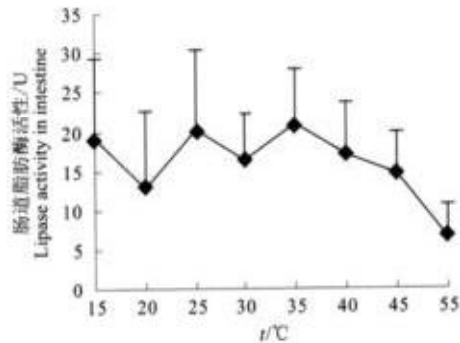


图4 温度对奥尼罗非鱼肠道脂肪酶活性的影响
Fig.4 Effects of temperature on lipase in intestine

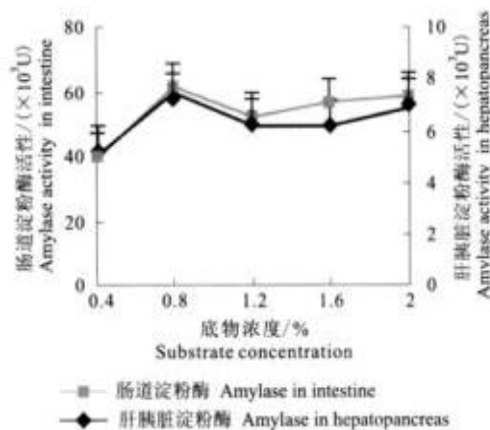


图5 底物浓度对奥尼罗非鱼肝胰脏、肠道淀粉酶活性的影响
Fig.5 Effects of substrate concentration on amylase in hepatopancreas and intestine of tilapia

结合其他研究者^[3]的结果,本研究中发现不同鱼类淀粉酶的最适pH值和最适温度变异范围要比蛋白酶小,说明相对于蛋白酶而言,各种鱼类的淀粉酶具有更为相似的酶学特性,其原因值得探讨。依据本研究结果中,奥尼罗非鱼肝胰

脏、肠道淀粉酶的温度及 pH 反应曲线相似的这一现象,可以初步推断二者的主要成分具有同源性,肠道淀粉酶的主要成分来源于肝胰脏。当反应温度在 25~35℃ 时,奥尼罗非鱼肝胰脏、肠道淀粉酶均保持较高的活性,这一酶学特性与其最佳生长温度在 24~32℃^[14] 的生长特性相一致。此外,奥尼罗非鱼肝胰脏、肠道中淀粉酶活性的比值远大于蛋白酶的比值,说明淀粉酶在肝胰脏合成时已具有较强的活性,而蛋白酶在肝胰脏合成后主要是以无活性的酶原的形式存在的,需要在肠道中激活才能发挥生理功能。

根据酶学理论,在变性温度以下,温度升高能提高酶的活性,反之亦然。可是从本研究的结果可以发现,随着反应温度的降低,奥尼罗非鱼肝胰脏、肠道淀粉酶均表现出酶活性补偿性回升的特点,脂肪酶也存在类似特性,这种现象用经典的酶促反应理论难以解释,可能是因为低温改变了酶的空间构象进而导致酶活性改变,当淀粉酶处于某一临界温度以下,导致构象改变,引起活性基团暴露使活性升高,上述推断有待于更深入的研究证实。但以提高消化能量物质的酶的活性来抵偿由于温度降低引起的能量物质摄入减少,倒是具有营养代谢上的合理性。北御门学等^[15]曾报道在 5℃ 及 20℃ 时,虹鳟淀粉酶分解可溶性淀粉的相对活力比值为 0.63:0.78,淀粉酶活性在低温时减低不多,但是,蛋白酶对酪蛋白的分解活力在上述 2 个温度时的比值为 0.32:0.44,蛋白酶分解底物的能力在低温条件下显著降低。尾崎久雄等^[17]也观察到鲑鱼的脂肪酶在低温时活性更大。但要确认鱼类淀粉酶与脂肪酶活性的低温适应性,还需要更多的试验证据。

黄耀桐^[16]曾对草鱼蛋白酶最适底物蛋白浓度作过探讨,发现草鱼蛋白酶活力并非随着蛋白浓度增大而直线增高,而是到达最适浓度后,底物浓度再增大,酶活性却反而下降。根据酶学理论,酶量一定,而底物浓度变化时,一般是反应速度和底物浓度成正比例的增大,当底物浓度增至某一浓度以上时,反应速度的增长趋势即渐减直至趋向恒定,超过以上浓度,反应速度反而会降低^[18]。奥尼罗非鱼肝胰脏、肠道淀粉酶活性与底物浓度的关系基本符合上述酶学规律,不符合之处可能与反应体系中存在多种消化酶,从而导致反应体系复杂有关。在奥尼罗非鱼饵料的设计中,应充分考虑上述酶学特性,在保持肠道内淀粉酶的高活性的基础上,设定合理的饵料淀粉含量水平,充分发挥奥尼罗非鱼对碳水化合物的潜在消化能力。

本研究还发现,不同体重奥尼罗非鱼肠道淀粉酶、脂肪酶活性分布均表现出相似规律;即其活性从大到小依次为前肠、中肠、后肠。在食糜从前肠经中肠向后肠推进的过程中,淀粉酶活性在各肠段间大约以 50% 的速率衰减。这些结果表明,前、中肠段是奥尼罗非鱼营养物质消化的主要场所。当实验鱼体重高于 122 g,肠淀粉酶活性随体重成比例上升,并且远高于平均体重 55 g 实验鱼,说明奥尼罗非鱼对碳水化合物的消化能力会随体重增加而提高,结合肝胰脏中淀粉酶活性随体重变化的规律分析,其原因部分为肝胰脏淀粉酶

的分泌量增加。平均体重 225 g 的实验鱼,前、中、后肠脂肪酶衰减速率显著低于低体重组,并且全肠脂肪酶活性远高于低体重组,表明随着体重增加,奥尼罗非鱼对脂肪的消化能力提高,其原因可归结为脂肪酶分泌量增加和有效作用时间延长两个方面。

综合奥尼罗非鱼消化酶的上述酶学特性,在罗非鱼饲料配方的设计中,除了应注重饲料的营养平衡,还应该考虑不同原料的选用与加工,以及饲料添加剂的配伍对饲料酸碱度、缓冲能力及离子组成的影响,以尽量减轻胃肠道的酸碱负荷及其对消化酶活性的损害。实际生产中营养成分相同的饲料养殖效果各异,也许可部分归于上述饲料组成特性的差异。事实上,目前许多优质饲料的设计已开始考虑电解质和酸碱平衡问题。

参考文献:

- [1] Fish G R. The comparative activity of some digestive enzymes in the alimentary canal of tilapia and perch [J]. *Hydrobiologia*, 1960, 15(1-2): 161-177.
- [2] Jonas E. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis*), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix* var.) and omnivorous (*Cyprinus carpio*) fishes [J]. *Aquaculture*, 1983, 19: 145-154.
- [3] Infante J L I, Cahu C L. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different Artemia rations; growth, pancreas enzymatic response and development of digestive function [J]. *Aquaculture*, 1996, 139(1/2): 129-138.
- [4] 倪寿文. 草鱼、鲤、鳊、鲮和淀粉酶比较研究[J]. 大连水产学院学报, 1992, 7(1): 24-31.
- [5] 叶元土. 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.
- [6] 黄峰, 严安生, 牟松, 等. 鲢、鳊蛋白酶、淀粉酶的研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 14-17.
- [7] Izquierdo M S, Henderson R T. The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of tubot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence-based assays [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1998, 19(2): 153-162.
- [8] Borlongan I G. Studies on the digestive lipases of milkfish (*Chanos chanos*) [J]. *Aquaculture*, 1990, 89(3/4): 315-325.
- [9] Tengjaroenkul B, Smith B J. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Aquaculture*, 2000, 182(3/4): 317-327.
- [10] 山田亚树子, 高野克己, 鸭居郁三. 罗非鱼肠管淀粉酶的精制和性状[J]. 日水, 1991, 57(10): 1903-1909.
- [11] 中山大学生物系生化微生物教研室. 生化技术导论[M]. 北京: 人民教育出版社, 1978. 52-88.
- [12] 陈品健. 真鲷幼鱼消化酶活性与温度的关系[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1998, 37(6): 931-935.
- [13] 尾崎久雄. 鱼类消化生理[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [14] 李思发. 中国淡水主要养殖鱼类种质研究[M]. 上海: 上海科技出版社, 1998. 169-174.

- [15] 北御门学, 立野新光. ニジマス消化酵素の研究[J]. 日本水産学雑誌, 1960, 26(7): 679-695.
- [16] 黄耀桐. 草鱼肠道、肝胰脏蛋白酶活性初步研究[J]. 水生生物学报, 1988, 12(4): 328-333.

Distribution and properties of amylase and lipase in alimentary tract of tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*

LI Jun-sheng¹, LI Jian-lin², WU Ting-ting²

(1. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Three groups of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*), average body weight in groups I, II and III as 55.14, 122.82 and 225.68 g respectively, were employed to study the development and distribution of digestive enzyme in alimentary tract. The results showed that the activities of amylase in total intestine rose sharply with the body weight increasing from 55 g to 122 g, and that went up slowly with increase of body weight from 122 g to 225 g. The activities of amylase and lipase in all groups showed the same regularity as those in fore intestine, which were higher than those in middle intestine. The activities of amylase and lipase hind intestine were the lowest. The relative ratio of amylase activity among fore, middle and hind intestines in the three groups (Groups I, II and III) were 1:0.95:0.52, 1:0.44:0.21 and 1:0.50:0.24, respectively; and the relative ratio of lipase activities among fore, middle and hind intestines in the three group (Groups I, II and III) were 1:0.17:0.12, 1:0.34:0.14 and 1:0.98:0.64. The relative ratio of amylase activities in the three group (I, II, III) in hepatopancreas and total intestine were 1:3.43:9.31 and 1:8.25:18.94 respectively; and the relative ratio of lipase activities in the three groups (I, II, III) in total intestine were 1:3.82:13.09. A group of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) (average body weight as 111.81 g) were employed to study properties of digestive enzyme in alimentary tract. The results showed that the optimum pH for amylase in intestine and hepatopancreas were 6.5~7 and 7.5, respectively, and the optimum temperature for amylase in intestine and hepatopancreas was 30°C, and the optimum substrate concentration for amylase in intestine and hepatopancreas was 0.8%. The optimum pH and temperature for lipase were 7.0~7.5 and 35°C, respectively.

Key words: tilapia; amylase; lipase

Corresponding author: WU Ting-ting.

欢迎订阅 2005 年《上海水产大学学报》

《上海水产大学学报》是上海水产大学主办的以水产科学为主的综合性学术刊物, 主要反映自然科学各学科的科研成果, 以促进学术与教学研究的交流与繁荣。主要刊载渔业资源、水产养殖和增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器、渔业经济与技术管理以及基础研究等方面的论文、调查报告、研究简报、综述与评述、简讯等, 并酌登学术动态和重要书刊的评价等。目前,《上海水产大学学报》已同时被北京大学图书馆定为中文核心期刊、中国科学院文献情报中心定为中国科技论文统计源期刊、中国科学技术信息研究所定为中国科技核心期刊。

本刊为季刊, 大 16 开, 国内外公开发行。每期单价 6 元。全年定价 30 元(含邮费)。国际标准刊号: ISSN1004-7271, 国内统一刊号: CN31-1613/S。国内邮发代号: 4-604, 国际发行代号: 4822Q。读者可在当地邮局订阅, 也可直接汇款至编辑部订阅。编辑部还有《上海水产大学学报》(1992-2001 年)全文检索光盘, 定价 50 元(含邮费), 欢迎订阅。

编辑部地址: 上海市军工路 334 号, 上海水产大学 38 信箱, 邮编: 200090

联系电话: 021-65710892, 传真: 021-65680965, E-mail: xuebao@shfu.edu.cn