

草鱼肠道肝胰脏蛋白酶活性初步研究*

黄耀桐 刘永坚

(中山大学鱼类学研究室, 广州)

提 要

对不同种类不同蛋白质水平的饲料与草鱼肠道、肝胰脏蛋白酶活性之间的关系, 对草鱼前、中和后肠蛋白酶活性的差异, 以及这些酶的最适酪蛋白浓度和最适 pH 值进行了测定研究。草鱼肠道和肝胰脏蛋白酶活性在饲料含蛋白质 32—40% 的范围内随着蛋白质含量的增加而升高。肝胰脏蛋白酶活性要比肠道稍高些。饲草草鱼肝胰脏蛋白酶比活为每毫克酶蛋白每分钟产生 332.5 微克酪氨酸, 肠道蛋白酶比活为 260.0 微克酪氨酸。草鱼肠道蛋白酶活性以后肠较高, 前、中肠次之。在 pH4—9 范围内, 以酪蛋白作为底物, 草鱼肠道、肝胰脏蛋白酶最大活性分别在 pH6.5 和 pH7.0。在酪蛋白实际浓度为 83.33—333.33 微克/毫升范围内, 肠道和肝胰脏蛋白酶最适酪蛋白浓度分别为 166.67 微克/毫升和 208.33 微克/毫升。

关键词 草鱼, 饲料, 蛋白质, pH, 蛋白酶活性

有胃鱼类消化酶已有不少研究, 而对无胃鱼类研究不多。有关消化酶与饲料的关系报道也少。pH 是酶的重要影响因素, 酶的最适 pH 值是该种酶的重要理化性质。此特性使得草鱼饲料 pH 值与草鱼蛋白酶最适 pH 值密切相关。一般有胃鱼胃蛋白酶最适 pH 为 2.0—2.2^[12], 或 2.0—4.0^[3], 无胃鱼肠道蛋白酶最适 pH 值报道不多。草鱼肠道比较长, 其各段的蛋白酶活性有无差异, 人工配合饲料的制作应如何适应其特点。作者进行了测定研究。

材 料 与 方 法

以浙江淡水鱼粉作蛋白源^[7], 黄玉米粉和麦麸作糖源。用 50%、60% 和 70% 的鱼粉分别与 30%、20% 和 10% 的玉米粉等配制成蛋白质含量分别为 32%、36% 和 40% 的 1, 2, 3 号试验饲料(表 1)。随机取用体重约 150—250 克的草鱼, 分养在 4 口面积约 0.5 亩的鱼塘。其中 1 口塘主要喂青饲料, 3 口塘分别以 1, 2, 3 号试验饲料投喂。饲养 3 个月, 每口塘各取大、中、小草鱼 4 尾, 移至 4 个水族箱暂养。饥饿 72 小时后^[13], 取鱼称重(体重变动在 330 克—800 克)解剖, 取出全部肝胰脏和肠道, 剔除脂肪, 分别称重, 然后随即用冰冻脱离子水冲洗。肠道用解剖剪剪开, 用冰冻脱离子水冲洗, 以脱脂棉轻轻揩干净。按

* 承蒙廖翔华教授热情指导, 深表谢忱。

1986 年 11 月 3 日收到。

表 1 不同蛋白质水平的试验饲料成分

Tab. 1 Composition of experiment diets with different levels of protein

成分 ¹⁾ 饲料号 ²⁾	鱼 粉 ³⁾	玉米粉 ⁴⁾	麦麸 ⁵⁾ %	蔗 糠 ⁶⁾	复合维生素 ⁷⁾
1	50	30	15	5	0.2
2	60	20	10	10	0.2
3	70	10	5	15	0.2

1) Composition; 2) Diet No; 3) Fish meal; 4) Corn powder; 5) Wheat bran; 6) Sugarcane bran; 7) Vitamin mix

每口塘 4 尾鱼分成两平行组(大、中鱼,中、小鱼),分别做成每两尾鱼一组的混合样品。按样品重的 20 倍分次加进约 pH 7.0 的冰冻脱离子水,先在 10000 转/分的高速组织捣碎机制匀浆,然后迅速转到玻璃匀浆器加工成组织匀浆。接着用离心力为 $2700 \times g$ 的 KDC-1-4000 型电子可控沉淀器离心 20 分钟,获得组织匀浆抽提上清液,置 -10°C 冰箱备用。

蛋白酶活性和组织匀浆抽提液酶蛋白的测定,参照 Lowry 等(1951)的福林-酚试剂法^[1,2,9,14],用上海第三分析仪器厂 721 型分光光度计测定。pH 4.0—9.0 梯度缓冲溶液参照 Colowick 等(1955)^[2,4]。另一批试验样品测定使用与上述相同的方法,但制组织匀浆改用 Tekmar SDT 1810 Tissumizer 组织匀浆装置。

蛋白酶活性定义为:在 pH 7.5,底物酪蛋白浓度为 2.0 毫克/毫升(包括缓冲溶液)的条件下,在 37°C 保温 15 分钟,以每分钟水解酪蛋白产生 1 微克酪氨酸定为一个活性单位。

蛋白酶比活定义为:每毫克酶蛋白每分钟的蛋白酶活性单位数。

结 果 与 讨 论

饲料蛋白质含量对蛋白酶活性的影响

经 3 个月饲养,草鱼生长良好,表明它们对鱼粉作为试验饲料的蛋白源是适应的。不同饲料所养草鱼肠道与肝胰脏蛋白酶比活测定结果也证明了这一点。表 2 表明,在饲料蛋白质含量为 32—40% 的范围内,无论肝胰脏或肠道蛋白酶活性都是随着饲料蛋白质含

表 2 草鱼肠道和肝胰脏蛋白酶活性与饲料蛋白质含量的关系

Tab. 2 Relation between protein contents in diets and protease activity of intestine and hepatopancreas in grass carp

饲料蛋白质 ¹⁾ 含量%	肠道 ²⁾ 肝胰脏 ³⁾ 蛋白酶比活 ⁴⁾ (酪氨酸·微克/毫克·酶蛋白/分) ⁵⁾	
32	222.9	249.9
36	285.4	291.1
40	288.9	368.4
青饲料 ⁶⁾	260.0	332.5

1) Crude protein; 2) Intestine; 3) Hepatopancreas; 4) Protease specific activity; 5) μg of tyrosine liberated/mg of protease protein/min; 6) Green grass.

量的增加而升高。用 40% 蛋白质饲料饲养的草鱼,其肠道和肝胰脏蛋白酶比活分别是饲以含 32% 蛋白质饲料的草鱼的 129.6% 和 147.4%,比后者显著为高。但与饲以 36% 蛋白质饲料的草鱼相比,肠道蛋白酶比活增高很小,而肝胰脏蛋白酶比活却增高显著。说明草鱼肠道蛋白酶与肝胰脏的是有区别的。据此趋势推断,再增加饲料蛋白质含量,草鱼肠道蛋白酶比活可能不会显著增高,但肝胰脏蛋白酶比活则可能再增高。草鱼蛋白酶的这一特性提示我们,草鱼饲料蛋白质含量如超过 40%,就很可能由于肠道蛋白酶活性不相应增高而造成蛋白质消化率下降,以致浪费蛋白质。

主要饲以青草料的草鱼,肠道和肝胰脏蛋白酶比活都要比喂给含 32% 蛋白质的饲料的草鱼略高些。一般青草料含蛋白质仅为 2% 上下(以鲜重计算),虽然草鱼摄食量大,但它从青草料摄进的蛋白质毕竟不多,那么为什么蛋白酶活性会比较高,而且草鱼生长良好。看来,草鱼蛋白酶在长期进化过程中形成了对低蛋白青饲料的适应性,而青饲料也可能含有能激活草鱼蛋白酶的激活物。草鱼蛋白酶虽然也能适应鱼粉玉米粉,但其适应程度不如对青草料。

鱼类消化酶对其食物的适应性和酶本身的进化,已有一些报道。Olatunde 等(1977)^[13]对三种热带鲇鱼消化酶的研究指出,胃、胰蛋白酶等消化酶活性与这些鱼的食性有关。Mukhopadhyay(1977)^[10]报告两栖胡子鲇 *Clarias batrachus*(Linn)肠道蛋白酶活性在吃天然饲料时稍高于吃含蛋白质 10.26% 的人工饲料,但低于摄食含蛋白质 21.85% 的饲料。他进一步研究指出(1978)^[14]两栖胡子鲇肠道蛋白水解酶活性随着饲料蛋白质含量由 25% 增至 50% 而显著增高,但蛋白质含量再增加至 75%,蛋白酶活性并不随之增高。Kawai 等(1972)^[2]对鱼类消化酶的研究中指出,鲤蛋白酶活性也是随着饲料鱼粉含量由 20% 增至 80% 而增高,饲养 28 天,蛋白酶活性以 80% 鱼粉饲料组最高,60% 组次之,但两者相差很小。上述报道,特别是无胃鱼鲤的数据与本试验草鱼的结果是一致的。

表 2 还表明,草鱼肝胰脏蛋白酶比活是比较高的,它稍高于肠道蛋白酶。

草鱼蛋白酶最适蛋白质浓度

为进一步研究草鱼肠道、肝胰脏蛋白酶基本性质,查明它们的活性与蛋白质浓度的确切关系,进行了蛋白酶活性最高的酪蛋白浓度试验。以 83.3 微克/毫升的酪蛋白实际浓度为起点,以 41.7 微克/毫升的浓度差作 7 个梯度,测定结果见图 1。在酪蛋白浓度为 83.3—333.3 微克/毫升的范围内,肠道、肝胰脏蛋白酶比活最高点分别在 166.7 微克/毫升和 208.3 微克/毫升。肠道的蛋白酶比活与底物酪蛋白浓度关系曲线斜率比较大,肝胰脏的比较小。肠道蛋白酶比活在最适酪蛋白浓度时明显大于其它浓度。以其最大比活为 100%,则仅次于它的比活只相当于它的 81.3% (酪蛋白浓度为 125.0 微克/毫升),而比活最低者只相当于它的 38.5%,说明蛋白质浓度的改变对肠道蛋白酶比活有重大影响。图 1 还表明,草鱼蛋白酶比活并非随着蛋白质浓度增大而直线地增高,而是到达其最适浓度后,蛋白质浓度再增大,酶活性却反而下降。肝胰脏蛋白酶比活与酪蛋白关系曲线同样表明蛋白酶比活受到酪蛋白浓度的强烈影响,不过程度上比肠道的轻些。肝胰脏蛋白酶最适酪蛋白浓度高于肠道蛋白酶,表明它们之间是有区别的。这些测定结果与上述饲料蛋白质含量与蛋白酶比活关系试验结果是一致的,与 Mukhopadhyay 等(1978)^[14]的试验

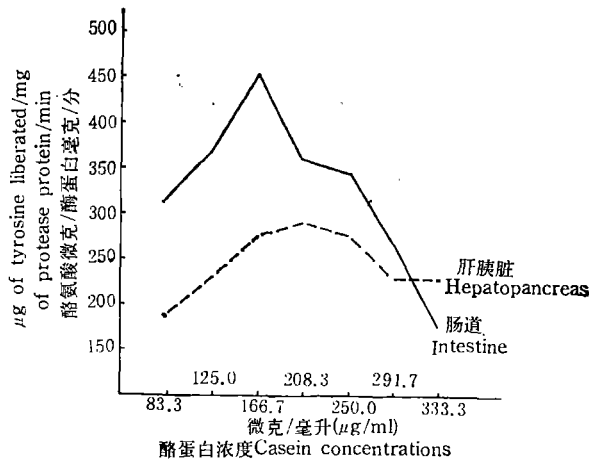


图1 肠道和肝胰脏蛋白酶最适酪蛋白浓度
Fig. 1 Optimal casein concentration for intestine and hepatopancreas protease in grass carp

结果相同。

草鱼蛋白酶最适 pH 值

在 pH 4.0—9.0 范围内,以 0.5 个 pH 单位差作 11 个梯度,对草鱼蛋白酶比活的测定结果见图 2。肠道蛋白酶比活,与 pH 值关系曲线表明, pH 4.0—5.5,比活变化平缓,6.0 曲线斜率突然增大,6.5 比活达到最高点,7.0—9.0 曲线缓缓下降。曲线明显地在 6.0—7.0 形成一个峰,总的呈单峰型。比活最小出现在 pH 5.5。以最小比活为 100%,则最大比活是最小的 118.9%。表明肠道蛋白酶比活随 pH 值改变的变化不大,显示了它具有比较大的酸碱度适应范围。

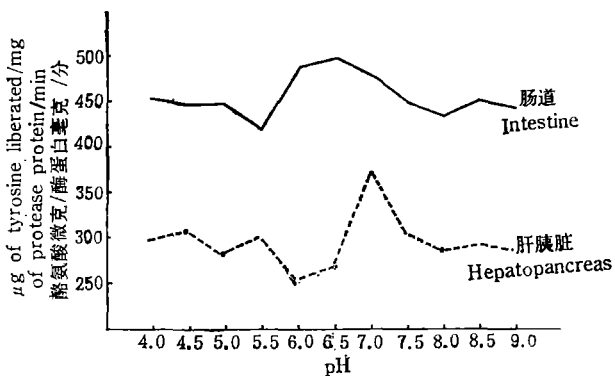


图2 肠道和肝胰脏蛋白酶比活最适 pH 值
Fig. 2 Optimal pH value for intestine and hepatopancreas protease in grass carp

肝胰脏蛋白酶比活与 pH 值关系曲线与肠道的不同。 pH 4.0—5.5 变化平缓,6.0 比活出现最低值,6.5 回升,7.0 达到最高点,7.5—9.0 先陡然降低,然后徐徐下降。基本上

也是呈单峰型。以最小比活为 100%，则最大比活是最小的 142.7%，表明变化比肠道显著。如果肝胰脏蛋白酶是真正的胰蛋白酶，那么，肠道蛋白酶可能是类胰蛋白酶。

据草鱼蛋白酶的上述性质，对于配制人工饲料是比较有利的，建议草鱼饲料以 pH 6.5—7.0 为宜。

Shcherbina 等 (1971)^[12]报告鲤肠道蛋白酶和淀粉酶最大活性是在微酸性至微碱性。吉村等(1964)^[3]报道鲑类胰蛋白酶的最适 pH 为 9.0。Croston (1960)^[9]报道大鳞大马哈鱼肠道幽门盲囊抽提液蛋白酶(胰蛋白酶)最适 pH 值为 9.0。Mukhopadhyay 等(1978)^[11]测定两栖胡子鲇肠道蛋白酶最高活性出现在 pH 8.0 (6.2—9.6)。这些资料表明，有胃鱼与无胃鱼的肠道蛋白酶最适 pH 值是不相同的。食性不同的鱼类，也会有差异。同是无胃的草鱼和鲤，它们肠道蛋白酶最适 pH 值基本一致。

至于肝胰脏蛋白酶，资料很少。如从一般动物和一些鱼类胰蛋白酶最适 pH 值是碱性至微碱性来看，则草鱼与它们不一样。但据 Hoar 等(1979)^[6]引用 Lehninger (1971) 资料，胰蛋白酶最大活性是在 pH 7.0，则与草鱼肝胰脏蛋白酶最适 pH 值相同。今后深入研究，要把草鱼蛋白酶提纯结晶，进一步查明其性质。

草鱼肠道不同部位蛋白酶活性的差异

植物食性和杂食性鱼类的肠道都比较长。肠道不同部位的消化酶活性不同^[3]。为查明草鱼肠道不同部位蛋白酶活性的差异，对主要饲草的草鱼前肠(肠道第一个转折以前部分)、中肠(肠道第一个转折至末一个转折)和后肠蛋白酶活性进行了测定(表 3)。草鱼肠道蛋白酶活性以后肠最高，前、中肠次之。但是，活力差别不是很大，特别是后肠与前肠差别不大。以后肠蛋白酶活性为 100%，则前肠的相当于后肠的 94.73%，中肠的相当于后肠的 79.76%。总的来看，草鱼整个肠道蛋白酶活性都是比较高的。这是草鱼在长期进化过程中对蛋白质含量低的草料所形成的适应。测定结果与 Kawai 等 1972^[7]分别以麦芽糖和淀粉作底物测定鲤肠糖酶活性以后肠酶活性最高的结果相类似。草鱼的这种特性，对于制造怎样性状的人工饲料才能获得更好的饲养效果，是值得考虑的。

表 3 草鱼肠道不同部分蛋白酶活性

Tab. 3 Protease activities in different parts of grass carp intestine

部 分	Parts	蛋白酶活性 Protease activities 酪氨酸微克/分 μg of tyrosine liberated/min
前 肠	Fore	267.41
中 肠	Middle	222.16
后 肠	Hind	282.28

参 考 文 献

- [1] 中山大学生物系生化微生物教研室编, 1979. 生化技术导论. 科学出版社。
- [2] 北京大学生物系生物化学教研室编, 1980. 生物化学实验指导. 人民教育出版社。
- [3] 蔡完其译(桥本芳郎编), 1980. 养鱼饲料学. 27—43 页, 农业出版社。
- [4] Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., 1955. *Methods in enzymology* Vol. 1. The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland.
- [5] Croston, C. B., 1960. Tryptic enzymes of chinook salmon. *Archives of Biochem. and Biophysics*, **89**: 202—206.
- [6] Hoar, W. S., Randall, D. J. and Brett, J. R., 1979. *Fish physiology*. Vol. 8: 179—190. Academic press.
- [7] Kawai, S. and Ikeda, S., 1972. Studies on digestive enzymes of fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **37**: 333—337.
- [8] ———— 1972. Studies on digestive enzymes of fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **38**: 265—270.
- [9] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. Farr, A. L. and Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275.
- [10] Mukhopadhyay, P. K., 1977. Studies on the enzymatic activities to varied pattern of diets in the air-breathing catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). *Hydrobiologia*, **52**(2—3): 235—237.
- [11] ———— 1978. Studies on intestinal protease: Isolation purification and effect of dietary proteins on alkaline protease activity of the air-breathing fish, *Clarias batrachus* (Linn.). *Hydrobiologia*, **57**(1): 11—15.
- [12] National Research Council, 1983. Nutrient requirements of warmwater fish and shellfishes, p. 39—40. Washington, D. C.
- [13] Olatunde, A. A. and Ogunbiyi, O. A., 1977. Digestive enzymes in the alimentary tracts of three tropical catfish. *Hydrobiologia*, **56**(1): 21—24.
- [14] Sugiura, M., Ishikawa, M., Sasaki, M., Hirano, K., Ito, Y. and Awazu, S. 1979. A new method for protease activity measurement. *Anal. Biochem.*, **97**(1): 11—15.

**STUDY ON PROTEASE ACTIVITY IN THE INTESTINE
AND HEPATOPANCREAS OF GRASS CARP,
CTENOPHARYNGODON IDELLUS
(*C. ET V.*)**

Huang Yaotong and Liu Yongjian

(*Ichthyology Laboratory, Zhongshan University, Guangzhou*)

Abstract

The protease activities of both the intestine and the hepatopancreas raised with increasing protein levels when grass carp was fed on the diets containing proteins 32% to 40%. Protease activity in the hepatopancreas was higher than in the intestine. The protease specific activity in hepatopancreas of grass carp fed on grasses was measured to be per mg protease protien per minute producing 332.5 μg tyrosines and in intestine being 260.0 μg tyrosines. The protease optimal activity of intestine and hepatopancreas have been found at pH 6.5 and pH 7.0 using casein as substrate and pH 4.0—9.0 of buffers. The intestine and hepatopancreas proteases acted optimally at 166.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 208.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of casein concentrations under the casein concentration range of 83.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 333.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

The protease activity in hind intestine was found to be highest and those in fore and in middle intestine were less.

Key words Grass carp, diet, protein, pH, protease activity