

草鱼摄食两种蛋白质饲料后消化酶活性变动比较*

田丽霞 林 鼎

(中山大学生物系 广州 510275)

提 要

用鱼粉和黄豆饼粉为主要蛋白源的试验饲料饲养草鱼两周,测定摄食前、后肠组织和肝胰脏蛋白酶、淀粉酶活性的变化以及不同时间前、中、后肠组织蛋白酶活性。结果表明:随摄食后时间的推移,鱼粉组肠组织蛋白酶活性迅速增高,到10h达最大值,黄豆饼组则在15h以后。两组肠组织淀粉酶活性均在10h达到最大值。肝胰脏蛋白酶活性均在摄食后立即下降,到5h降到最低值,随后缓缓升高,淀粉酶活性变化较平缓。肝胰脏蛋白酶与肠组织蛋白酶活性之间存在一种消长关系。总的看来,鱼粉组的蛋白酶、淀粉酶活性均高于黄豆饼组。前肠组织蛋白酶活性最高,中肠次之,后肠最低。

关键词 草鱼,饲料,蛋白质,蛋白酶,淀粉酶

草鱼是我国主要的淡水养殖鱼类之一。近年来随着现代化水产饲料工业发展的要求,人们虽然对草鱼的营养需要量及饲料配方进行了不少研究,但在消化生理方面的研究还是十分薄弱的。消化酶是消化过程中具有独特功能的物质,它催化大分子的营养物质成小分子从而有利于吸收,因此,研究消化酶有助于了解鱼类怎样利用饲料中的营养物质,以及当饲料成分发生变化时,鱼类能做出何种程度的反应。这些理论问题的研究,无疑对于生产中改进人工配合饲料是十分重要的。为此,作者对草鱼摄食后消化过程中肠组织、肝胰脏的蛋白酶和淀粉酶活性的动态变化,以及草鱼对鱼粉和黄豆饼粉两种试验饲料的适应性进行了研究。

材 料 与 方 法

1. 试验鱼与饲养条件 试验鱼由本室试验鱼场提供,草鱼平均体重为 $339 \pm 56\text{g}$ 。在室内循环流水过滤水族箱中($98 \times 48 \times 42\text{cm}$)进行饲养,每箱放鱼10尾,水源为经曝气去氯后的自来水,试验饲养期为两周,水温为 $29-33^{\circ}\text{C}$ 。水中溶氧保持在 6mg/L , pH为6.8左右。

2. 试验饲料的组成与营养成分 (见表1)

* 本文承蒙廖翔华教授审阅,谨致谢意。

1990年4月25日收到;1992年8月5日修回。

表 1 试验饲料组成及营养成分

Tab. 1 Composition and nutrient levels of test diets

组 别 Group		鱼粉组 Fish meal group	黄豆饼组 Soybean meal group
饲料组成(%) Composition of test diets %	基础饲料* Reference diet	70	70
	鱼粉(智利) Fish meal	30	—
	黄豆饼粉 Soybean meal	—	30
营养成分(%) Nutrient composition (%)	水份 Moisture content	7.76	8.76
	蛋白质** Crude protein	40.25	34.80
	脂 肪 Crude fats	5.80	2.95
	还 原 糖 Glucose	36.42	39.90

* 酪蛋白 31%, 糊精 45%, 维生素 8% 鱼肝油+玉米油(1:1)3%、无机混合盐 (U. S. P. XII No. 2) 8%、混合维生素 (Halver 氏) 2%、羧甲基纤维素 (CMC) 3%。

** 鱼粉蛋白质占饲料总蛋白质的 49.14%, 黄豆饼蛋白质占饲料总蛋白质的 41.18%。

3. 分析样品的采取与处理 用鱼粉试验饲料和黄豆饼试验饲料饲养草鱼两周后, 分别于摄食前(0h)及摄食后(5, 10, 15h) 各取 2—3 尾鱼, 杀死, 立即取出肝胰脏和肠组织样品, 并将肠按前肠、中肠 I, 中肠 II, 后肠^[1]剪成四段, 剔除脂肪, 剪开肠, 用蒸馏水小心冲洗肠道内含物, 然后用滤纸轻轻吸去水份, 迅速称重, 然后将肝胰脏和肠组织样品置于液氮中速冻, 在 -20℃ 冰箱中保存。供作蛋白酶及淀粉酶活性测定。测定酶活性所用鱼的数量特征见表 2。

表 2 测定酶活性所用鱼的数量特征

Tab. 2 Meristic characters of the grass carp used for enzyme assay ($\bar{X} \pm SE$)

组别 Group	取样时间(h) Time after feeding	体长 Body length (cm)	体重 Body weight (g)	前肠重 Fore intestine weight (g)	中肠 I 重 中肠 II 重 Middle intestine I and II weight (g)		后肠重 Hind intestine weight (g)
					I	II	
鱼粉组 Fish meal group	0*	24.2±1.20	305±25	1.61±0.04	1.61±0.04	0.94±0.15	0.41±0.02
	5	25.9±0.81	403±38	2.18±0.13	1.75±0.32	1.46±0.09	0.83±0.15
	10	25.1±0.05	343±75	1.64±0.06	1.37±0.10	1.22±0.21	0.84±0.01
	15	22.7±2.50	285±75	1.56±0.42	1.14±0.11	1.21±0.19	0.54±0.17
黄豆饼组 Soybean meal group	0*	22.4±0.15	263±25	1.39±0.21	1.41±0.01	0.81±0.29	0.36±0.12
	5	26.2±0.43	392±24	1.86±0.12	2.10±0.33	1.64±0.25	0.65±0.09
	10	27.2±1.02	420±26	1.84±0.08	1.54±0.20	1.28±0.11	0.62±0.09
	15	30.2±0.10	298±13	1.66±0.10	1.60±0.10	1.10±0.10	0.70±0.13

* Before feeding.

将肝胰脏及肠组织缓缓解冻后, 按其重量加蒸馏水 50 倍, 先用玻璃匀浆器粗匀浆, 然后再用 SDT 1810 型电动匀浆器匀浆 20min, 匀浆液用离心力为 $2700 \times g$ 的 KDC-1-400 型电子可控沉淀器离心 20min。取出上清液即进行酶活性的测定。采用 Folin-

Phenol 试剂法^[2]测定酶解后游离出来的酪氨酸,用 2% 酪蛋白作反应底物,反应在 pH 7.5^[3], 37℃ 下进行 30min, 活性单位用酪氨酸 $\mu\text{g}/\text{min} \cdot \text{g}$ 组织表示。通过测定酶解后游离出来的还原糖的量来反映淀粉酶的活性^[4]。用 1% 淀粉溶液作为反应底物,在 pH 7.0, 37℃ 下反应 30min。活性单位用葡萄糖 $\mu\text{g}/\text{min} \cdot \text{g}$ 组织表示。

结 果

(一) 摄食后不同时间蛋白酶活性的变动

1. 肠组织蛋白酶活性

鱼粉饲料组草鱼肠组织蛋白酶活性随食物进入肠道后逐渐上升,在摄食后 10h 达到高峰,此时酶活性约比进食前高 2 倍,这意味着食物中的蛋白质大量地被消化。而后随着时间的延长,酶活性逐渐降低,慢慢地又恢复到进食前空肠时的酶活性水平。而黄豆饼饲料组草鱼摄食后,伴随食物进入肠道,酶活性变化缓慢,在摄食后 10h 之前,酶活性稍稍有所下降,随后肠组织蛋白酶活性迅速升高,至 15h 升到比进食前活性高 1.5 倍。肠组织蛋白酶活性测定结果见图 1。

图 1 比较了草鱼对鱼粉和黄豆饼两组不同质蛋白源饲料的消化过程,反映在蛋白酶的变动模式是不一样的。鱼粉组蛋白酶活性在 10h 达到高峰,而黄豆饼组迟至 15h 才上升到比较高的水平。此外,还由于鱼粉组饲料蛋白质含量(40.25%)高于黄豆饼组(34.80%),相应前者蛋白酶活性也比后者为高,表现出肠组织蛋白酶活性与饲料蛋白质水平有相关的适应性。

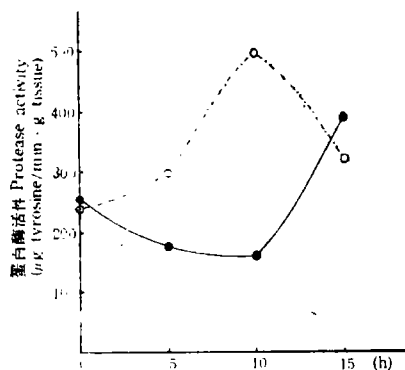


图 1 摄食后肠组织蛋白酶活性变化

Fig. 1 Changes in protease activity of intestine after feeding

○ 鱼粉组 Fish meal group

● 黄豆饼组 Soybean meal group

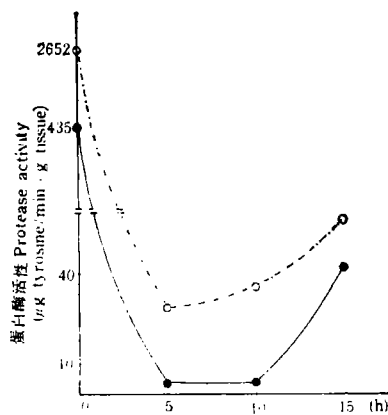


图 2 摄食后肝胰脏蛋白酶活性变化

Fig. 2 Changes in protease activity of hepatopancreas after feeding

○ 鱼粉组 Fish meal group

● 黄豆饼组 Soybean meal group

2. 肝胰脏蛋白酶活性

鲤科鱼类肝胰脏是消化酶产生和储存的场所^[5],在未进食前,肝胰脏的蛋白酶活性保

持相当高的水平, 摄食鱼粉饲料组的草鱼, 其活性为 2652 单位, 黄豆饼饲料组的则为 1435 单位。进食后两组蛋白酶活性的变动模式相近似, 鱼粉组草鱼肝胰脏蛋白酶活性进食后急剧下降, 进食后 5h 降到 28.41 单位, 达最低点。蛋白酶活性比原先几乎减少了 98%, 5h 后缓慢回升, 15h 仅达 58.55 单位, 此活性只及原先的 2.2%。黄豆饼组, 进食后 5—10h 降到最低点, 维持在约 3.90 单位, 蛋白酶几乎消耗了 99%, 10h 后略有回升。两组相比, 同样也表现出蛋白酶活性与饲料蛋白质含量之间的伴随关系, 饲料蛋白质高的, 其肝胰脏蛋白酶活性亦相应较高。肝胰脏蛋白酶活性测定结果见图 2。

(二) 摄食后不同时间淀粉酶活性变动

1. 肠组织淀粉酶活性

摄食鱼粉与黄豆饼两组不同饲料的草鱼, 在消化过程中, 其肠组织淀粉酶活性表现出相似的变动趋势。鱼粉组进食前淀粉酶活性为 1896 单位。进食后, 随食物的摄入和消化, 淀粉酶活性逐渐上升, 至 10h 达到高峰, 而后下降, 15h 降至摄食前空肠水平。黄豆饼组有相类似的变动曲线, 但整个酶活性水平比鱼粉组低, 平均水平约低 22%。尽管黄豆饼组饲料比鱼粉组饲料在表观上糖含量略高一些, 但并没有表现出淀粉酶活性对饲料糖含量的伴随适应性, 淀粉酶活性最终还是受蛋白酶活性高低的协同影响。肠组织淀粉酶活性测定结果见图 3。

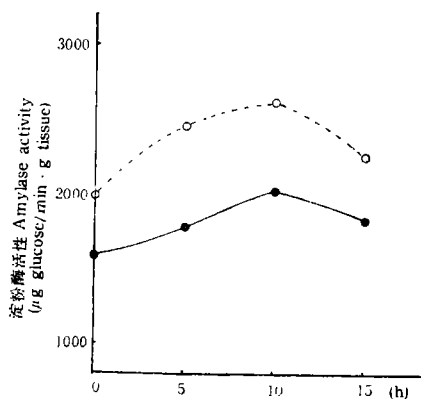


图 3 摄食后肠组织淀粉酶活性变化

Fig. 3 Changes in amylase activity of intestine after feeding

○ 鱼粉组 Fish meal group
● 黄豆饼组 Soybean meal group

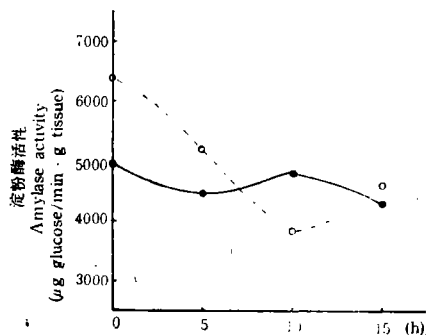


图 4 摄食后肝胰脏淀粉酶活性变化

Fig. 4 Changes in amylase activity of hepatopancreas after feeding

○ 鱼粉组 Fish meal group
● 黄豆饼组 Soybean meal group

2. 肝胰脏淀粉酶活性

摄食鱼粉和黄豆饼两组不同饲料的草鱼, 在消化过程中, 其肝胰脏淀粉酶活性的变动略有不同的趋势。鱼粉组进食前淀粉酶活性为 6373 单位, 比黄豆饼组约高 29%, 进食后淀粉酶活性急剧下降, 10h 降到最低值, 然后, 到 15h 略有回升。而黄豆饼组进食后淀粉

酶活性开始缓慢下降, 15h 才降到最低, 比鱼粉组约迟 5h。两组相比, 黄豆饼组淀粉酶活性变化较缓慢, 恢复较迟, 酶活性平均值水平约比鱼粉组低 7% 左右。肝胰脏淀粉酶活性测定结果见图 4。

(三) 肠组织与肝胰脏两者消化酶活性的消长关系

如果把肠组织与肝胰脏两者消化酶活性的动态变化曲线联系起来分析, 从蛋白酶活性变化来看, 进食前肝胰脏酶活性相当高, 约比肠组织酶活性高 5—10 倍。随着进食后的消化过程, 肝胰脏酶活性急剧下降, 而此时肠组织酶活性则逐渐增高。肝胰脏酶活性约在 5h 降到最低点, 而肠组织酶活性在 5—10h 上升至最高点, 反映出一种内在相联系的明显消长关系。这说明肝胰脏中分泌的胰蛋白酶释放到肠道, 与肠组织分泌的类胰蛋白酶共同参与蛋白质的消化过程。淀粉酶活性也反映出这种消长关系。

(四) 肠组织蛋白酶的分布

从消化过程中不同时间肠组织分段取样测定蛋白酶活性分布来看, 进食后 5、10、15 h, 三者的蛋白酶活性均以前肠最高, 中肠次之, 后肠最低, 逐渐递减(图 5)。鱼粉组前肠酶活性为后肠的 5.4 倍, 黄豆饼组前肠酶活性为后肠的 3.1 倍(图 6)。可见, 草鱼对蛋白质的消化作用主要在前肠进行。

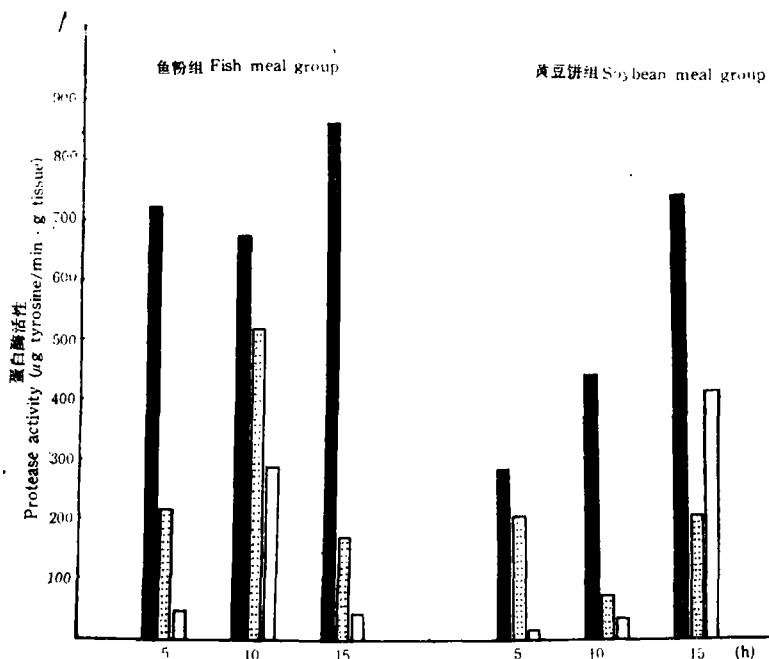


图 5 摄食后不同时间肠道不同部位蛋白酶活性变化

Fig. 5 Changes in protease activities in different parts of intestine after feeding

■ 前肠 Fore intestine; ▨ 中肠 Middle intestine
□ 后肠 Hind intestine

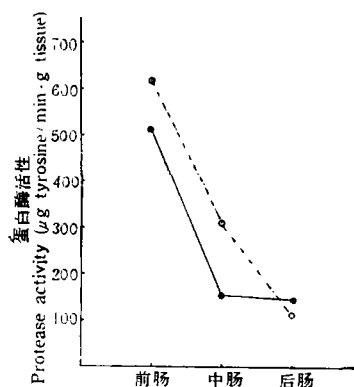


图 6 摄食后 5, 10, 15h 肠道不同部位蛋白酶活性平均值

Fig. 6 The average value of protease activity in different parts of the intestine at 5, 10, 15h after feeding

○鱼粉组 Fish meal group; ●黄豆饼组 Soybean meal group

讨 论

从图 1 可以看出: 鱼粉组肠组织蛋白酶活性随着食物的摄入逐渐增高, 到摄食后 10 h 达到高峰, 然后才下降。而黄豆饼组肠组织蛋白酶活性却在摄食后先有一个下降过程, 这很可能是由于黄豆饼中含有抗胰蛋白酶抑制了肠内胰蛋白酶的活性^[6,7]。这一现象在配制人工饲料时是值得加以考虑的。由于抗胰蛋白酶是热敏性的, 故通过加热、处理可以使其失活, 但是加热过度也不行。业已证明: 膨化过程中蛋白质营养价值的损失较小, 虽然连接蛋白质分子的副键受到影响, 但连接氨基酸的主键不受影响, 因此, 膨化可以使抗胰蛋白酶失活而不影响必需氨基酸^[8]。在美国, 黄豆粉之所以能够占到全部蛋白饲料的三分之二与其在加工工艺中注意对抗营养素的破坏以提高黄豆粉的质量是有关的。

草鱼是无胃鱼类, 其食道与肠道直接相通, 前端膨大, 从组织学上观察未发现胃腺, 生化分析缺乏胃蛋白酶——盐酸系统^[9], 肠代替了胃的消化作用。肠道中蛋白酶和淀粉酶有两种来源, 一是来自肠组织粘膜本身的分泌, 二是来自肝胰脏中胰腺所分泌的胰蛋白酶、胰淀粉酶。两种来源的酶其结构和性质还有待进一步研究。从本研究结果来看, 整个肠组织均有蛋白酶和淀粉酶分布, 蛋白酶活性以前肠最高, 这与 Jonas 等(1983)^[10]报道的草食性和杂食性鱼类肠道蛋白酶活性最高段相类似, 但与黄耀桐等(1988)^[11]观察的结果正相反。

与食性相适应, 草食性鱼类肠管与杂食性和肉食性鱼类相比为最长, 且盘曲多, 使食物在肠管中移动滞留的时间相对延长, 增加与消化酶接触的时间, 这使草鱼能够较充分地消化吸收植物性食物。在天然水域中草鱼是草食性的, 食物在消化管中消化时间较长, 本研究表明摄食后消化酶活性的变动也反映了这一特点。鳊鲈是肉食性的有胃鱼类, 摄食后胃体受食物的刺激蛋白酶活性上升, 胃内含物蛋白酶活性也急剧上升, 摄食后 1h 胃体及胃内含物酶活性达到高峰, 随后迅速下降, 3h 已降到最低点。其肠组织蛋白酶活性摄

食后 5h 达到最低水平,而此时正是肠道内含物蛋白酶活性的高峰 (Takii 等, 1985)^[12]。鲤鱼是杂食性鱼类,在一次摄食之后,肠组织蛋白酶、淀粉酶活性约 5—8h 达到最大值,随后逐渐下降 (Onish 等, 1976)^[13]。草鱼肠组织蛋白酶活性,鱼粉组在摄食后 10h,黄豆饼组 15h 后分别达到高峰值。相比来看,也可以说草鱼蛋白酶活性高峰出现最迟。当然,蛋白酶活性的高低还受摄食量、摄入蛋白质水平以及投饲次数等因素的影响。本实验是在一次性摄食之后测定的,至于草鱼在上述条件影响下,酶活性变化尚待研究。Dawas (1930)^[14]曾经观察到给鲮鱼投喂第一次饲料后,紧接着再进行第二次投喂,则第一次的饲料很快反射性地由胃进入肠,消化很不充分。Onish 等(1976)给鲤鱼一天投喂两次则第二次摄食后 5h 酶的活性比一次性投喂相应时间的酶活性要低,说明酶的合成和释放对于摄食的反应是长久的。因此通过研究摄食后消化酶活性的变化,搞清楚充分利用饲料所必需的最小消化时间,这对养鱼投饲技术上确立合适的投饲次数,提高饲料的利用率将是非常有益的。

鱼粉组无论在肠组织或是肝胰脏其蛋白酶活性和淀粉酶活性均比黄豆饼组高。可见,经过两周的饲养,由于饲料蛋白质性质和水平的差异,造成酶的适应性生成现象十分明显。蛋白酶活性因饲料蛋白质性质不同和相应蛋白质水平的差异而变化。由于蛋白酶活性的提高,淀粉酶活性也随之相应地提高,这说明当营养条件改变时,鱼能通过体内激素分泌等自身调节机制调节酶的合成与分泌来控制代谢过程,产生新的代谢水平。Kawai 等(1972)^[15]用鱼粉和马铃薯淀粉含量不同的饲料饲养幼鲤 75d,发现在一个星期内,肠道麦芽糖酶、淀粉酶和蛋白酶活性对饲料呈现出适应性。当饲料淀粉含量不变时,肠道蛋白酶活性和生长率随饲料蛋白质含量增加而增加。Babkin 等(1963)^[16]发现几种消化酶的浓度经常保持着平行的关系,当其中一种酶活性提高时,其它几种酶活性也同时提高,一种酶活性减弱时,其它酶活性也随之降低。本试验结果也表明了这一点。

参 考 文 献

- [1] 倪达书、洪雪峰. 草鱼消化道组织学的研究. 水生生物学集刊, 1963, (3): 1—25.
- [2] Lowry O H, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193: 265—275.
- [3] National Research Council. Nutrient requirements of warm water fish and shellfishes. Washington, D. C., 1983: 39—40.
- [4] 北京大学生物系生化教研室编, 生物化学实验指导. 北京: 人民教育出版社, 1980.
- [5] 桥本芳郎著, 蔡完其译. 养鱼饲料学. 北京: 农业出版社, 1980.
- [6] Birk Y et al. A pure trypsin inhibitor from soya beans. *Biochem. J.*, 1963, 87: 281.
- [7] Kunits M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybeans. *Science*, 1945, 101: 668.
- [8] Osborne T B Meadel L B. The use of soybeans as food. *J. Biol. Chem.*, 1917, 32: 369.
- [9] 获野珍吉编, 陈国铭、黄小秋译. 鱼类的营养和饲料. 北京: 海洋出版社, 1987.
- [10] Jonas E, et al. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio* L.) fishes. *Aquaculture*, 1983, 30: 145—154.
- [11] 黄耀桐、刘永坚. 草鱼肠道肝胰脏蛋白酶活性初步研究. 水生生物学报, 1988, 12(4): 328—334.
- [12] Takii K, Shimene S, Takeda M. Changes in digestive enzyme activities in eel after feeding. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 1985, 51(12): 2027—2031.
- [13] Onish T, Murayama S, Takeuchi M. Changes in digestive enzyme levels in carp after feeding. III. Response of protease and amylase to twice-a-day feeding. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 1976, 42(8): 931—929.
- [14] 尾崎久雄著, 吴尚忠译. 鱼类消化生理(上册). 上海: 上海科技出版社, 1983.
- [15] Kawai S, Ikeda S. Studies on digestive enzymes of fish II. Effect of dietary change on the activities of di-

gestive enzymes in carp intestine. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 1972, 38(3): 265—270.

- [16] Babkin B. P. Secretory Mechanism of the Digestive Glands. Second edition, New York: Paul. B. Hoeber. Inc., 1963: 54.

CHANGES IN DIGESTIVE ENZYME ACTIVITIES IN GRASS CARP *CTENOPHARYNGODON IDELLUS* AFTER FEEDING OF TWO TEST DIETS

Tian Lixia and Lin Ding

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract

Digestive enzyme activities of grass carp fed with two test diets were studied at 0, 5, 10 and 15 hours over a period of two weeks. The experiments showed that intestinal protease activity in the fish meal group reaches a maximal level 10 hours after feeding, but in the case of the soybean meal group, the peak appears at the 15th hour. Amylase activity reaches a maximum at 10 hours for both fish meal and soybean meal groups. Hepatopancreatic protease activity decreases immediately after feeding, drops to its minimum after 5 hours, and then increases gradually. In the case of amylase, similar changes are noticed, though they take place more slowly.

In conclusion, the activities of protease and amylase in the fish meal group are higher than those in the soybean meal group. The protease activity is highest in the fore intestine and lowest in the hind intestine.

Key words Grass carp, Diet, Protein, Protease, Amylase