

# 牙鲆体内消化酶活性的研究\*

王宏田 张培军

(中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071)

**提要** 采用生化方法对一年龄牙鲆胃、肠中不同消化酶的活性进行了研究。实验组 I 的牙鲆平均体重为  $(350 \pm 20)$  g, 实验组 II 的牙鲆平均体重为  $(460 \pm 30)$  g。结果表明, 在牙鲆的胃、前肠、中肠、后肠中可以检测出蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶的活性。胃中的蛋白酶主要为酸性蛋白酶, 肠中的蛋白酶主要为碱性蛋白酶。肠中蛋白酶活性由前肠向后肠递减, 前肠与中肠的酶活性没有显著差异 ( $P > 0.05$ ); 牙鲆肠中脂肪酶活性较胃中的高, 在肠的不同部位脂肪酶的活性无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 牙鲆前肠中的淀粉酶活性最高, 胃次之, 中肠、后肠中淀粉酶活性较低。随着牙鲆的生长, 蛋白酶、脂肪酶活性增强, 淀粉酶活性减弱。对产生上述实验结果的原因进行了初步分析。

**关键词** 牙鲆, 蛋白酶, 脂肪酶, 淀粉酶, 活性

**中图分类号** Q45

鱼类消化道中消化酶活性的研究, 是了解鱼类消化生理的重要内容, 对于鱼类养殖过程中饵料的应用具有重要意义。另外, 了解消化酶在鱼体内的分布及其活性, 可以将其中活性较高的酶提取利用, 有利于水产加工过程中充分利用废弃物。有关的研究工作在淡水鱼中开展的较多(黄峰等, 1999; 吴婷婷等, 1994), 对于海水鱼的仔稚鱼也开展过相关的研究(王重刚等, 1998; Walford *et al.*, 1993)。牙鲆是我国重要的海水经济鱼类, 其生理学的研究曾有关于重组酵母菌对牙鲆生长、血清激素含量以及非特异性免疫能力的影响的报道(王宏田等, 2000a, b), 但有关牙鲆消化酶活性的系统研究尚未见报道。本文报道了一年龄牙鲆胃、肠等消化器官中消化酶的活性, 并初步探讨了不同生长阶段消化酶活性的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 牙鲆的饲养

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 由中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室提供。实验过程中将 10 尾牙鲆置于  $2.0\text{m} \times 1.5\text{m} \times 1.5\text{m}$  的饲养箱中饲养。实验组 I 中 5 尾牙鲆于 7 月份解剖测定, 鱼平均体重为  $(350 \pm 20)$  g; 其余牙鲆继续饲养至 8 月底解剖测定, 鱼平均体重为  $(460 \pm 30)$  g。饵料为从海水中捕捞的小型海水鱼虾。

\* 国家“973”课题“海水病原菌类致病因子的研究”资助, G1999003 号。王宏田, 男, 出生于 1970 年 3 月, 博士, 助理研究员, E-mail: hughw@sohu.com

收稿日期: 2001-03-06, 收修改稿日期: 2001-08-26

## 1.2 消化酶的提取

参考有关文献(王重刚等, 1998)并进行适当的修改, 以提取牙鲆胃、肠道等部分的消化酶, 肠道分为前肠、中肠、后肠三部分, 分别提取, 其中后肠为肠后端膨大部分, 前肠和中肠为把肠非膨大部分平均分割所得到的两部分。具体作法如下: 每克组织中加入 4ml 蒸馏水, 于冰浴中匀浆, 匀浆液于 4℃冰箱中静置 1h, 取上清液部分, 于 4℃, 以 10000r/min 的速率离心 30min, 收集上清液, 进行酶活力检测。

## 1.3 蛋白酶活性的测定

通过一定时间内蛋白酶水解酪蛋白的量测定蛋白酶的活性(周慧等, 1994)。具体测定方法如下:

**1.3.1 肠蛋白酶活性的检测** 将干酪素溶于浓度为 0.025mol/L, pH= 8.5 的磷酸缓冲液中, 配制成浓度为 1mg/ml 的溶液。把 0.9ml 干酪素溶液与 0.1ml 酶粗提液混合, 于 38℃摇动反应 30min。反应完毕, 于沸水浴中加热 10min, 使酶灭活。加入 2ml 考马斯亮蓝染色液, 在 20min 后, 60min 前, 于 595nm 处检测吸光值。对照反应中, 先将酶加热灭活, 然后再与底物混合, 其余步骤相同。测定吸光值时, 以磷酸缓冲液作空白对照。蛋白酶活性以每毫克酶蛋白每分钟使溶液吸光值降低的量表示, 单位为 unit/(min·mg)。

**1.3.2 胃蛋白酶活性的检测** 测定方法与碱性蛋白酶的测定步骤基本相同。反应过程中所用的缓冲液体系为浓度为 0.025mol/L, pH= 2.5 的磷酸缓冲液。

## 1.4 脂肪酶活性的测定

通过检测脂肪酶对新鲜牛乳中脂肪的降解作用, 测定脂肪酶的活性(北京大学生物系生物化学教研室, 1987)。具体操作如下: 取新鲜牛奶 6ml, 于 37℃预热 10min, 向牛奶中加入 1ml 酶粗提液, 于 37℃摇动反应 60min, 然后加入 3ml 95% 乙醇以终止反应。向反应液中加入 3—4 滴酚酞试剂, 用 0.01mol/L 的 NaOH 溶液滴定, 直到溶液呈现粉红色。对照反应中先向新鲜牛奶中加入乙醇, 使酶失活, 然后再加入酶粗提液。酶活性以每毫克酶蛋白每分钟消耗 NaOH 的微克分子数表示, 单位为 unit/(min·mg)。

## 1.5 淀粉酶活性的测定

采用 3, 5-二硝基水杨酸法, 通过检测反应体系中还原糖含量的变化, 测定淀粉酶的活性(蒋传葵等, 1982)。具体操作如下: 1g 可溶性淀粉溶于 100ml 浓度为 0.025mol/L, pH= 6.9 的磷酸缓冲液中, 配制 1% 淀粉溶液。将淀粉溶液于 37℃预热 10min, 每 2.5ml 溶液中加入 0.5ml 酶粗提液, 于 37℃摇动反应 20min, 然后向反应液中加入 2ml 3, 5-二硝基水杨酸显色液, 于沸水浴中煮沸 5min, 取出后用冰水冷却, 于 520nm 处测定吸光值。对照反应中, 先向淀粉溶液中加入 3, 5-二硝基水杨酸显色液, 然后再加入酶粗提液, 其余步骤相同。测定吸光值时, 以磷酸缓冲液作空白对照。酶活性以每毫克酶蛋白每分钟使反应液吸光值增加的量来表示, 单位为 unit/(min·mg)。

## 1.6 酶粗提液中蛋白质浓度的测定

以考马斯亮蓝染色法测定酶粗提液中蛋白质的含量(徐宜为, 1979)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蛋白酶

鱼体不同部位消化道中蛋白酶的性质不同, 肠中提取的蛋白酶为碱性蛋白酶, 在碱性

条件下酶的活性较高,胃中蛋白酶为一种酸性蛋白酶,在酸性条件下酶活性较高(Kawai *et al.*, 1972)。本实验中通过检测牙鲆肠中蛋白酶在 pH 值为 7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.5 时的活性,发现在 pH 值为 8.5 时肠蛋白酶的活性最高,实验中以溶液 pH 值为 8.5 作为检测肠蛋白酶活性的反应条件。本实验通过检测胃蛋白酶在 pH 值为 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.5 时的活性,发现在 pH 为 2.5 时胃蛋白酶活性最高,实验中以溶液 pH 值为 2.5 作为检测胃蛋白酶活性的反应条件。不同性质的蛋白酶在牙鲆不同消化器官中的分布,有利于增强消化、吸收各种蛋白质的能力。从表 1 中可以看出,蛋白酶在牙鲆肠中不同部位的活性不同,蛋白酶的活性在肠中依照从前向后的次序递减,但前肠与中肠的蛋白酶活性没有显著差异( $P > 0.05$ ),因此可以推测,与其他某些鱼类相似,牙鲆的前肠与中肠在蛋白质的消化与吸收过程中发挥着重要的作用(倪寿文等, 1993)。

从表 1 中可以看出,在牙鲆的不同生长时期,其胃、肠中蛋白酶的活性发生变化。实验组 II 中蛋白酶的活性较实验组 I 中高,这可能是由于环境中水温变化的影响。实验组 I 中牙鲆生活的环境温度为 20℃左右,实验组 II 中牙鲆生活的环境温度为 25℃左右,环境温度的升高,可能使消化道中蛋白酶的活性也随之增强。另外,蛋白酶活性的增强也可能来自牙鲆自身生理功能的需求。随着牙鲆的生长,其所需要的能量也逐渐增多,消化道中蛋白酶活性的增强,可以用来满足牙鲆生长的需要。其中水温和鱼体自身生长需求作为独立因子对于酶活性产生的影响需要进行进一步的研究。

表 1 实验组 I、实验组 II 牙鲆不同消化器官中蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶的活性( $n = 5$ )

Tab. 1 The activities of protease, lipase, amylase in different parts of digestive organs of

*Paralichthys olivaceus* in group I and group II ( $n = 5$ )

项目	实验组	胃	前肠	中肠	后肠
蛋白酶活性	I	9.71 ± 1.33	6.75 ± 1.63	5.91 ± 1.92	3.71 ± 1.58
[ × 10 <sup>-2</sup> unit/(min·mg) ]	II	12.36 ± 3.17	10.95 ± 2.76	10.48 ± 1.65	5.57 ± 2.34
脂肪酶活性	I	1.78 ± 0.53	2.21 ± 0.76	2.10 ± 0.63	2.08 ± 0.43
[ × 10 <sup>-1</sup> unit/(min·mg) ]	II	2.61 ± 0.94	3.47 ± 1.25	3.78 ± 1.64	2.95 ± 1.37
淀粉酶活性	I	1.73 ± 0.36	2.21 ± 0.57	0.79 ± 0.29	0.95 ± 0.37
[ × 10 <sup>-2</sup> unit/(min·mg) ]	II	0.91 ± 0.29	1.23 ± 0.61	0.66 ± 0.25	0.89 ± 0.23

## 2.2 脂肪酶

由表 1 的实验结果可以看出,肠道中脂肪酶的活性较胃中脂肪酶高,而脂肪酶在肠道不同部位的活性没有显著的差异( $P > 0.05$ )。由此可以推测牙鲆肠道是消化、吸收脂类物质的主要器官。

比较不同生长时期牙鲆消化道中脂肪酶的活力,可以发现,随着牙鲆的生长,牙鲆胃、肠中脂肪酶的活性也逐渐增强,造成这种变化的原因可能与蛋白酶活性变化的原因相似。王重刚等(1998)报道,在饲喂真鲷幼鱼的过程中,发现脂肪酶活力与食物中脂肪含量呈负相关趋势,而在饲喂罗非鱼时,未发现食物的组成与脂肪酶活性之间有明显的规律性影响,因此,饵料中所含脂肪对于鱼体内脂肪酶活性的影响在不同的鱼类表现不同。在本实

验中发现,随着牙鲆的生长,胃、肠中的脂肪酶活性增强,因此,脂肪酶活性的改变与鱼体不同的生长阶段有关。在饲喂牙鲆的过程中,饲料中含有丰富的脂类物质,这是否会抑制牙鲆消化器官中脂肪酶的活性,还需要在另外的实验中进行验证。

### 2.3 淀粉酶

从表 1 中可以看出,淀粉酶活性在牙鲆前肠部位较高,在胃、中肠及后肠中较低,但这种差异并不显著( $P > 0.05$ )。吴婷婷等(1994)在研究中发现,几种无胃鱼类肠道各部位脂肪酶活性和淀粉酶活性有互补现象,即淀粉酶活性高的部位脂肪酶活性低;相反,脂肪酶活性高的部位淀粉酶活性低。这一规律在牙鲆中并不适用。考察不同生长时期淀粉酶的活性可以看出,随着牙鲆的生长,其消化系统中淀粉酶活性减弱,这可能与饲料中缺少淀粉有关(王重刚等,1998)。

牙鲆消化系统中淀粉酶活性的存在,说明牙鲆依然具有消化吸收淀粉的能力。在对某些肉食性海水鱼的研究中发现,如果鱼类的消化器官中不存在强烈分解淀粉的淀粉酶,则饲料中的淀粉呈糊状残留在肠中,会降低鱼类对蛋白质的消化吸收率,但这一规律并非对所有的鱼类都适合(日崎久雄,1985)。添加淀粉对牙鲆生长的影响值得进一步实验研究。

由实验中可以看出,牙鲆的胃、肠中含有蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等消化酶。不同的消化酶在不同的消化部位,其活性不完全相同。而且各种消化酶的活性在牙鲆的不同生长阶段也发生变化。这种变化可能和环境因素(主要为水温)的差异,不同生长时期鱼体的生理需求不同等因素有关。牙鲆胃、肠中几种消化酶广泛分布,在将来水产品加工过程中可以对这些酶进行提取和利用。

### 参 考 文 献

- 王宏田,徐永立,张培军等,2000a. 重组酵母菌对牙鲆生长及血清激素含量的影响. 海洋与湖沼, 31(2): 135—138
- 王宏田,张培军,2000b. 重组酵母菌对牙鲆非特异性免疫能力的影响. 海洋与湖沼, 31(6): 631—635
- 王重刚,陈品健,顾 勇等,1998. 不同饵料对真鲷稚鱼消化酶活性的影响. 海洋学报, 20(1): 103—106
- 北京大学生物系生物化学教研室,1987. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 150
- 吴婷婷,朱晓鸣,1994. 鳊鱼、青鱼、草鱼、鲤鱼、鲫鱼、鲢鱼消化酶活性的研究. 中国水产科学, 1(2): 10—17
- 倪寿文,桂远明,刘焕亮,1993. 草鱼、鲤鱼、鲢鱼、鳊鱼和尼罗罗非鱼肝脏和肠道蛋白酶活性的初步探讨. 动物学报, 39(2): 160—168
- 徐宜为,1979. 实验免疫学技术. 北京: 科学出版社, 199
- 周 慧,鲁治斌,齐 杰等,1994. 蛋白水解酶活力测定新方法. 生物化学杂志, 10(5): 630—633
- 黄 峰,严安生,牟 松等,1999. 鲢、鳊蛋白酶、淀粉酶的研究. 中国水产科学, 16(2): 14—17
- 蒋传葵,金承德,吴仁龙,1982. 工具酶活力的测定. 上海: 上海科学技术出版社, 20—80
- 日崎久雄,1985. 鱼类消化生理(下). 李爱杰,沈宗武译,吴尚忠校. 上海: 上海科学技术出版社, 498—567
- Kawai S, Ikeda S, 1972. Studies on digestive enzymes of fish. II. Effects of dietary change on the activity of digestive enzymes in carp. Bull Jap Soc Sci Fish, 38: 265—270
- Walford J, Lam T J, 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates niloticus*) larvae and juveniles. Aquaculture, 109: 187—205

## ACTIVITIES OF DIGESTIVE ENZYME IN DIFFERENT TISSUES OF *PARALICHTHYS OLIVACEUS*

WANG Hong-Tian, ZHANG Pei-Jun

(Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology,  
The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

**Abstract** The activities of digestive enzyme in stomach and gut of one-year-old *Paralichthys olivaceus* were studied. The average weights of the fish in Group I was  $(350 \pm 20)$  g. The activity of acidic protease in stomach was  $(9.71 \pm 1.33) \times 10^{-2}$  unit/(min•mg). The alkaline protease activities in foregut, midgut and hindgut were  $(6.75 \pm 1.63)$ ,  $(5.91 \pm 1.92)$ ,  $(3.71 \pm 1.58) \times 10^{-2}$  unit/(min•mg). In stomach, foregut, midgut, hindgut, the lipase activities were  $(1.78 \pm 0.53)$ ,  $(2.21 \pm 0.76)$ ,  $(2.10 \pm 0.63)$ ,  $(2.08 \pm 0.43) \times 10^{-2}$  unit/(min•mg). The Amylase activities were  $(1.73 \pm 0.36)$ ,  $(2.21 \pm 0.57)$ ,  $(0.79 \pm 0.29)$ ,  $(0.95 \pm 0.37) \times 10^{-2}$  unit/(min•mg). The mean weights of the fish in Group II was  $(460 \pm 30)$  g. The acidic protease in stomach was  $(12.36 \pm 3.17) \times 10^{-2}$  unit/(min•mg). The alkaline protease activities in foregut, midgut, hindgut were  $(10.95 \pm 2.76)$ ,  $(10.48 \pm 1.65)$ ,  $(5.57 \pm 2.34) \times 10^{-2}$  unit/(min•mg). In stomach, foregut, midgut, hindgut, the lipase activities were  $(2.61 \pm 0.94)$ ,  $(3.47 \pm 1.25)$ ,  $(3.78 \pm 1.64)$ ,  $(2.95 \pm 1.37) \times 10^{-2}$  unit/(min•mg), the amylase activities were  $(0.91 \pm 0.29)$ ,  $(1.23 \pm 0.61)$ ,  $(0.66 \pm 0.25)$ ,  $(0.89 \pm 0.23) \times 10^{-2}$  unit/(min•mg). The results indicate that the alkaline protease activities in foregut and midgut are higher than in hindgut. The lipase activities in gut were higher than in stomach; no significant difference was found within the gut ( $P > 0.05$ ). The amylase activity in foregut is higher than in stomach, which is higher than those in midgut and hindgut. With the growth of fish, the activities of protease and lipase become higher, but the amylase activity becomes lower.

**Key words** *Paralichthys olivaceus*, Protease, Lipase, Amylase, Activity