

文章编号: 1000- 0615(2004)06- 0738- 03

#研究简报#

## 样品处理对罗非鱼和银鲫肠道消化酶活性测定的影响

黎军胜<sup>1</sup>, 李建林<sup>2</sup>, 吴婷婷<sup>2</sup>

(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)

关键词: 匀浆; 冻融; 离心; 保存

中图分类号: Q55; S917

文献标识码: A

## Effects of sample disposal on determination of intestinal digestive enzyme of tilapia and silver crucian carp

LI Junsheng<sup>1</sup>, LI Jianlin<sup>2</sup>, WU Tingting<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: This paper reported the effects of disposal methods of sample on determination of digestive enzyme of tilapia and silver crucian carp. The results showed that activities of digestive enzyme in intestine tissue homogenized for 1 min and 2 min ( $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) respectively were not remarkably different, and so did that frozen and melted once. By centrifugation, the activities of digestive enzyme in superstratum of intestine tissue homogenized were 2.8% - 7.4% lower than those of initial intestine tissue homogenized. At 4 e, the activities of digestive enzyme in intestine tissue homogenized were the most stable in the phase of 3- 9 h and 9- 18 h for protease and amylase of silver crucian carp respectively after homogenization, and so did that in the phase of 6- 9 h for both protease and amylase of tilapia, in the other phase, the activities of digestive enzyme in intestine tissue homogenized decreased at most by 9.0% - 18.2% and 11.5% - 44.4% for protease and amylase respectively.

Key words: homogenization; refrigerating and melting; centrifugation; preservation

近年来,有关鱼类消化酶的研究报告不断增多,为鱼类消化生理的研究提供了大量有价值的实验资料。在鱼类消化酶的研究中,众多研究者采用了基本相近的研究方法<sup>[1- 5]</sup>,但有时却得出相矛盾的结果,这种现象似乎不能简单的归结为鱼类消化酶特性的多样性,而由实验方法和手段的差异导致酶活性的变化应是一个不可忽略的原因。

消化酶的活性与许多外界条件相关<sup>[6]</sup>,了解这些因素对消化酶活性测定的影响是得出科学的实验结论的前提。样品的处理方法及保存条件在上述因素中最容易为人们所忽视,但对实验结果有可能产生重要的影响。

收稿日期: 20030815

资助项目: 中国水产科学研究院重点科研计划项目(No. 2001- 5- 3); 南京农业大学青年创新基金(Y200206)

作者简介: 黎军胜(1969- ), 男, 湖北武汉人, 讲师, 博士研究生, 专业方向为鱼类营养与生化。Tel: 025- 84395618, E-mail: ljs. xj@sohu. com

通讯作者: 吴婷婷(1944- ), 女, 上海市人, 教授, 博士生导师, 主要从事鱼类营养与生物技术研究。Tel: 0510- 5554552

## 1 材料与方法

### 1.1 试验鱼及取样

取体重均匀的奥尼罗非鱼(266.2? 20.3 g)和银鲫(42.2? 6.2 g)各9尾,分别饲养于水族箱中1周,日投喂商品饵料2次,投饵率3.5%。实验前饥饿24 h,断脊处死,每种鱼均分为3组,每组3尾。于冰浴中仔细分离出肠道,分别在低温(0~4 e)下以电动匀浆器匀浆( $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 1 min,取部分罗非鱼肠道匀浆液以相同条件继续匀浆1 min。匀浆液均定容至100 mL制备为粗酶液,取部分罗非鱼肠道匀浆液-20 e保存1周后融解测定酶活性,其余样品置于4 e保存,分别于0、3、6、9、12、18、24 h测定匀浆液和上清液( $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 15 min)酶活性。

### 1.2 酶活性测定

蛋白酶活性测定采用Folin-酚法<sup>[7]</sup>:取粗酶液1 mL,加底物1%酪蛋白溶液2 mL,于37 e水浴中反应30 min。然后加入10%三氯乙酸3 mL,过滤,取滤液1 mL,加入 $0.55 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠5 mL,再加入福林试剂1 mL,于37 e水浴中显色20 min,在680 nm波长处比色。同时以1 mL已煮沸失活的酶液作空白对照。蛋白酶在上述反应条件下,1 min水解酪蛋白产生1 Lg酪氨酸的酶量为1个酶活力单位(U)。

淀粉酶活性测定采用DNS还原糖法<sup>[7]</sup>:取粗酶液1 mL,加当天配制的2%淀粉溶液4 mL(以 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.5磷酸缓冲液配制),于37 e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。淀粉酶在上述反应条件下,1 min催化淀粉水解生成1 Lg葡萄糖的酶量定为1个活力单位(U)。

### 1.3 数据统计处理

采用SPSS统计软件包处理数据,结果以 $\bar{x} \pm S$ 表示。

## 2 结果

### 2.1 匀浆程度和冻融对消化酶活性的影响

由图1可知,在本实验条件下,匀浆时间为1 min和2 min对酶活性没有产生显著影响,说明以电动匀浆机在 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度匀浆1 min已能使肠道组织和细胞充分裂解和均质化。由图2可知,粗酶液冻融前后酶活性无显著变化,说明一次冻融对酶活性测定无影响。

### 2.2 离心上清液与粗酶原液蛋白酶活性的差异

由图3可知,离心上清液与粗酶原液酶活性存在明显差异,离心上清液比粗酶原液酶活性平均降低5.4%,幅度为2.8%~7.4%,说明蛋白酶并未完全溶解扩散于水中,部分蛋白酶可能被吸附于固相中。

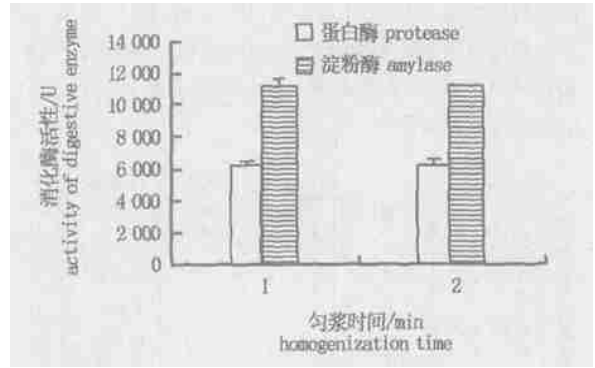


图1 匀浆时间对消化酶活性的影响

Fig. 1 Effects of homogenization time on activities of digestive enzyme

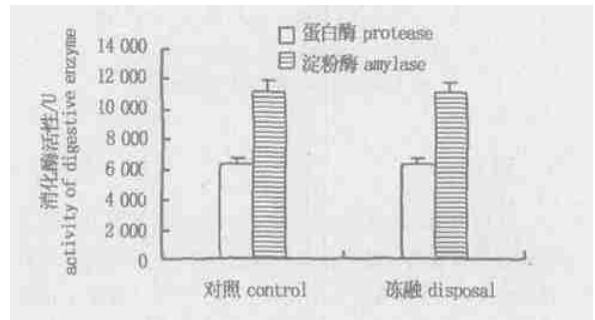


图2 冻融对消化酶活性的影响

Fig. 1 Effects of refrigerating and melting on activities of digestive enzyme

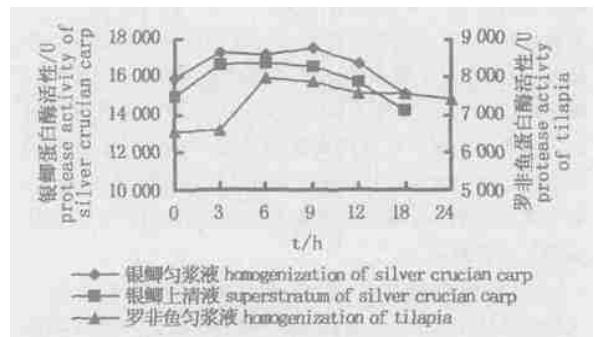


图3 保存时间对肠道蛋白酶活性的影响

Fig. 3 Effects of preservation time on activity of protease in intestine

### 2.3 保存时间对离心上清液与粗酶原液消化酶活性影响

由图3、图4可知,离心上清液与粗酶原液保存于4 e条件下24 h,除了银鲫淀粉酶外,消化酶活性均发生规律性的变化,即开始阶段活性逐渐升高,稳定一段时间后活性开始下降,蛋白酶活性最大波动幅度为9.0%~18.2%,

淀粉酶活性最大波动幅度为 11.5%~44.4%。银鲫和罗非鱼粗酶液中蛋白酶的活性稳定期分别处在抽提 3~9 h 和 6~9 h 区间,淀粉酶的活性稳定期分别处在抽提 9~18 h 和 6~9 h 区间。

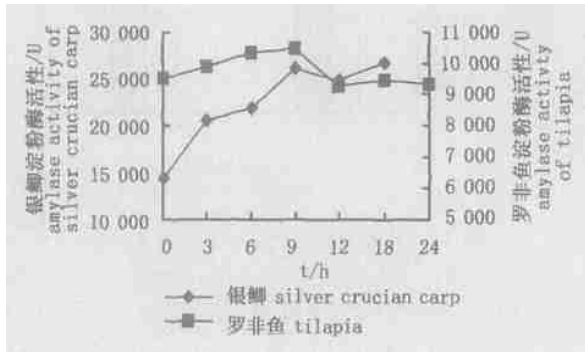


图4 贮存时间对肠道淀粉酶活性的影响

Fig. 4 Effects of preservation time on activity of amylase in intestine

### 3 讨论

在鱼类消化酶活性测定过程中,将消化组织匀浆的主要目的是通过机械剪切作用将细胞破碎,从而使得胞内酶释放出来,并将粗酶液均质化以有利于测定。通常采用的工具有玻璃匀浆器和电动匀浆器。玻璃匀浆器的缺点在于耗时长,样品匀浆可能不够充分,用于匀浆结缔组织含量少的消化器官如肝胰脏等比较适合,对于胃肠道组织的匀浆比较费时费力,通常充分匀浆 1 个样品需要 15 min 甚至更长时间,特别是样品数量多时尤显不便,但由于条件简便,研究者们采用较多。相比较而言,电动匀浆器则克服了前述缺点,匀浆充分,快速省力,缺点是有可能由于过分匀浆导致机械剪切作用损害酶活力。本研究表明,在 4 e 下以电动匀浆机在  $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  的速度匀浆 1 min 已能使肠道组织和细胞充分裂解和均质化,并且不会导致机械剪切损害酶活力。

为了保持酶的活性,含酶样品一般冷冻保存于 -20 e 条件下,由于水在低温结晶和融化过程中,冰晶的形成和破坏产生的机械力会对蛋白质造成损伤,因此,酶反复冻融有可能导致活性下降<sup>[6]</sup>。在消化酶活性的测定过程中,尽可能将样品匀浆抽提一定时间后及时测定,在必须冷冻保存的情况下,应尽量避免反复冻融。本研究表明,样品 1 次冻融不会影响消化酶活力。

许多研究者在测定消化酶活力时,通常将样品充分匀浆后离心取上清液测定<sup>[2-5]</sup>。本研究发现,离心上清液与匀浆原液的酶活性存在明显差异,离心上清液比粗酶原液酶活性平均低 5.4%,究其原因,可能是由于匀浆液中存在固液两相,离心沉淀的固相部分吸附了部分消化酶,这部分吸附损失的消化酶导致了上清液中的消化酶活性低于匀浆原液。因而,在定量研究中,通过上清液测定得

到的结果可能会低估消化组织的实际酶活力。为了消除上述因素的影响,在匀浆过程中,采用增加稀释倍数以避免匀浆液过于粘稠,然后直接以匀浆液测定酶活性的方法可能更为准确和方便。

为了能够充分抽提消化酶,许多研究者通常将匀浆粗酶液置于 4 e 条件下抽提一定时间后进行测定<sup>[2-5]</sup>。本研究发现,匀浆粗酶液置于 4 e 24 h,活性会发生规律性的变化:匀浆液放置一段时间,由于细胞裂解和酶的激活作用,活性将逐渐升高,在峰值稳定一段时间后,由于消化酶的自我降解作用加剧,活性将逐渐下降,蛋白酶活性最大波动幅度为 9.0%~18.2%,淀粉酶活性最大波动幅度为 11.5%~44.4%。由此可见,不同的抽提时间对消化酶活性的测定结果具有极其显著的影响,进而可能导致实验结论的差异。为了消除上述影响,在鱼类消化酶活性测定过程中,应尽可能在消化酶活性稳定期取样测定。根据本研究的结果,匀浆液在 4 e 条件下抽提 6~9 h,消化酶活性基本处于峰值稳定期。抽提时间过长或过短,都会导致实验结果偏低。需要注意的是,不同种类鱼的消化酶的稳定性还存在种间差异,值得进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] Wu T T, Zhu X M. Studies on the activity of digestive enzymes in mandarin fish, black carp, grass carp, common carp, crucian carp and silver carp[J]. J Fish Sci China, 1994, 1(2): 10-16. [吴婷婷,朱晓鸣. 鳊、青鱼、草鱼、鲤、鲫、鲢消化酶活性的研究[J]. 中国水产科学, 1994, 1(2): 10-16.]
- [2] Zhou J X, Yu T, Huang Q, et al. Comparison studies of the activities of digestive enzymes in grass carp, huangsang catfish and walleye[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2001, 23(1): 94-96. [周景祥,余涛,黄权,等. 鲤鱼、黄颡鱼和大眼鲈消化酶活性的比较研究[J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(1): 94-96.]
- [3] Chen P J, Wang Z G, Lu H, et al. Relationship between activity of digestive enzymes of larval pagrosomus major and temperature[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 1998, 37(6): 931-935. [陈品健,王重刚,陆浩,等. 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.]
- [4] Huang F, Yan A S, Wang X D. Studies on trypsin in silver carp and big head carp[J]. J Fish China, 1996, 20(1): 63-71. [黄峰,严安生,汪小东. 鲢、鳙胰蛋白酶的研究[J]. 水产学报, 1996, 20(1): 63-71.]
- [5] Ni S W. Investigation on the comparison of protease activities in grass carp, common carp, silver carp big head carp and Tiliapia nilotica[J]. Acta Zool Sin, 1993, 39(2): 160-168. [倪寿文. 草鱼、鲤、鲢、鳙和尼罗非鲫肝胰脏和肠道蛋白酶活性的初步探讨[J]. 动物学报, 1993, 39(2): 160-168.]
- [6] Robert A. Enzyme: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis (second edition) [M]. New York: WILEY-VCH, Inc. 2000.
- [7] Edited by Biological Department of Zhongshan University. Directions of biochemistry technology [M]. Beijing: People's Education Press, 1979. [中山大学生物系编. 生化技术导论[M]. 北京: 人民教育出版社, 1979.]