

文章编号: 1000 - 5463(2001)04 - 0001 - 04

臭氧对草鱼鱼种肠道蛋白酶和 淀粉酶活性的影响

马广智¹, 徐 军¹, 唐 玫², 方展强¹

(1. 华南师范大学生物学系, 广东广州 510631; 2. 华南师范大学生物技术研究所, 广东广州 510631)

摘要: 在实验室条件下, 分别向水中加入不同质量浓度的臭氧处理草鱼鱼种, 研究臭氧处理对鱼的肠组织蛋白酶和淀粉酶活性的影响。实验结果表明: 用 0.14、0.27、0.45 mg/L 臭氧处理草鱼时, 随着臭氧质量浓度的增加, 草鱼肠道蛋白酶和淀粉酶活性逐渐下降; 对于同一质量浓度, 随着处理时间的延长(6、12、24 和 72 h) 蛋白酶和淀粉酶活性亦呈下降趋势。

关键词: 臭氧; 草鱼; 蛋白酶; 淀粉酶

中图分类号: S942

文献标识码: A

许多研究证明臭氧应用于水产养殖有非常良好的效果^[1-5], 特别是促进水产动物的生长速度效果明显。如有报道臭氧处理水养虹鳟生长速度明显增快^[6], 利用臭氧处理水培育罗非鱼鱼苗 30 d, 生长速度比对照组快 1.3 倍; 臭氧处理水养鳊鱼 8 周, 从第二周开始, 实验组生长速度即明显快于对照组^[7]。臭氧促进鱼类生长速度增加的机理仍不清楚。也有报道表明臭氧对于鱼虾是高毒的^[8,9]。本文通过研究臭氧处理对草鱼肠组织蛋白酶和淀粉酶的影响, 探讨臭氧处理促进鱼类生长的机制及其它方面的影响。

1 材料与方方法

1.1 实验鱼的驯养

实验草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 外观健壮, 全长为 7.11 ± 1.10 cm, 体质量为 7.3 ± 1.5 g, 购自南海市鱼苗场。将草鱼鱼种移入实验室的水簇箱 (51 cm × 38 cm × 32 cm) 中, 驯养一周后进行实验, 两天换水一次, 每次换水三分之二。水源为充分曝气的自来水。水温为 12 ± 2 °C, pH = 6.8, 水硬度为 2.4 度(德国度)。

1.2 实验鱼的臭氧处理

实验分 5 个组, 分别为对照组、氧气组和 3 个臭氧质量浓度组, 实验重复一次。臭氧发生器为清华大学臭氧技术开发中心的产品, 臭氧发生器工作条件为电流 200 mA, 气流量 $0.1 \text{ m}^3/\text{h}$, 气压 0.041 MPa。氧气瓶作为氧源。待各水箱中氧气质量浓度和臭氧质量浓度稳定后, 测定对照组中的溶氧质量浓度为 7.0 mg/L, 氧气组和 3 个臭氧组中溶氧质量浓度为 22.4 mg/L, 各臭氧组的质量浓度分别为 0.14、0.27、0.45 mg/L 后, 向每个水箱放草鱼鱼种 25 条, 各水箱放鱼后的第 6、12、24 和 72 h, 分别从各水箱中取出 5 条草鱼鱼种, 用 MS - 222 (Triaine methansul -

收稿日期: 2001 - 09 - 03

基金项目: 广东省高教厅攻关课题(600264)

作者简介: 马广智(1959 -), 男(汉族), 安徽临泉人, 副教授, 博士。

phorate, Sandoz) 进行麻醉, 取肠, 用镊子将内含物除去, 称重, 冷藏于 - 40 °C 冰柜以备测量蛋白酶、淀粉酶活性。

水中臭氧质量浓度测定方法及计算采用碘量法^[10,11], 溶氧使用 MODEL5775 溶氧仪 (YSI 公司) 测定。

1.3 样品酶液的制备及活性的测定

每个肠样品按双蒸水 (mL) : 肠重 (g) = 10 : 1 加入预冷的双蒸水, 电动匀浆器进行匀浆。将匀浆液用冷冻离心机离心 15 min, 转速为 4 000 r/min, 取上清液用于测消化酶活性。

蛋白酶活性测定采用 Folin - 酚试剂法^[12]。蛋白酶活性表示为每克新鲜肠组织每分钟水解酪蛋白产生的酪氨酸 (Tyr) 量 (μg) 表示, 比活单位为 μg/g · min。

淀粉酶活性的测定参照朱检和曹凯鸣^[13]的方法进行。淀粉酶活性表示为每克新鲜肠组织每分钟水解淀粉产生葡萄糖 (Glu) 量 (μg), 比活单位为 μg/g · min。

2 结果与分析

表 1 臭氧对草鱼鱼种肠组织蛋白酶活力的影响

Table 1 The effect of ozone on the protease activity of Grass Carp fingerling Intestine tissues

(O ₃) / (mg L ⁻¹)	酶活力 (Tyr) / (μg · min ⁻¹ · g ⁻¹)			
	6 h	12 h	24 h	72 h
空气对照组	3 294.8 ± 202.9	3 257.4 ± 351.9	3 316.8 ± 320.9	3 290.4 ± 322.6
氧气对照组	3 486.8 ± 194.9	3 450.7 ± 244.5	3 399.3 ± 315.6	3 446.9 ± 287.6
0.14	3 487.3 ± 163.3	3 305.3 ± 329.1	3 174.9 ± 326.2	3 074.3 ± 390.2
0.27	3 274.7 ± 437.2	3 033.0 ± 351.8	2 839.9 ± 361.1	—
0.45	3 250.8 ± 385.5	2 986.8 ± 319.2	2 852.4 ± 179.1	—

与氧气组相比较 $P < 0.05$; $P < 0.01$; $\bar{x} \pm SD, n = 10$

Values are expressed as mean $\pm SD$ of 10 replicates; Compared with Oxygen Group $P < 0.05$, $P < 0.01$

由表 1 可以看出, 臭氧处理草鱼随着臭氧质量浓度的增加 (0.14、0.27、0.45 mg/L), 鱼种肠组织蛋白酶活性逐渐下降; 同一质量浓度随着处理时间的延长 (6、12、24、72 h), 蛋白酶活性亦逐步下降。纯氧气对照组比空气对照组草鱼肠组织蛋白酶活性要高, 但无显著性差别 ($P > 0.05$)。

0.14 mg/L 臭氧处理草鱼, 在处理的 6、12 和 24 h 草鱼肠组织蛋白酶活性基本上与对照组 (空气和纯氧) 蛋白酶活性在同一水平, 但在处理 72 h 后蛋白酶活性低于纯氧对照组 ($P < 0.05$)。0.27 和 0.45 mg/L 臭氧处理 12 h 后均使蛋白酶活性显著低于纯氧对照 ($P < 0.05$)。

从表 2 可以看出, 臭氧处理草鱼引起草鱼肠淀粉酶活性下降的规律基本类似于肠蛋白酶, 即随着臭氧质量浓度的增加, 肠淀粉酶活性下降; 同一质量浓度随着处理时间的延长肠淀粉酶活性下降; 纯氧气对照组比空气对照组肠组织淀粉酶要高, 但无显著性差别 ($P > 0.05$)。

0.14 mg/L 臭氧处理草鱼, 在处理 6 h 和 12 h 与纯氧气对照组相比, 肠淀粉酶活性无明显下降 ($P > 0.05$), 但处理 24 h 和 72 h 酶活性显著降低 ($P < 0.05$); 0.27 和 0.45 mg/L 臭氧处理 12 h 后即引起酶活性显著降低 ($P < 0.05$)。

实验结果显示, 臭氧处理草鱼可引起肠蛋白酶和淀粉酶活性下降, 纯氧 (氧过饱和) 不会引起肠蛋白酶和淀粉酶活性下降。

表 2 臭氧对草鱼鱼种肠组织淀粉酶活力的影响

Table 2 The effect of ozone on the amylase activity of Grass Carp fingerling Intestine tissues

(O ₃)/mg L ⁻¹	酶活力(Gu)/(μg·min ⁻¹ ·g ⁻¹)			
	6 h	12 h	24 h	72 h
空气对照组	2 558.6 ±302.4	2 567.6 ±446.9	2 545.0 ±201.4	2 447.4 ±307.2
氧气对照组	2 702.7 ±200.0	2 697.7 ±310.0	2 702.7 ±300.7	2 537.0 ±267.4
0.14	2 647.6 ±257.6	2 483.1 ±288.5	2 328.8 ±284.9	2 201.6 ±326.1
0.27	2 496.8 ±401.6	2 364.9 ±344.5	2 157.2 ±329.8**	—
0.45	2 402.4 ±411.0	2 332.3 ±356.0	1 936.9 ±392.8**	—

*与对照组相比较 $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; 与氧气组相比较 $P < 0.05$; $P < 0.01$; $\bar{x} \pm SD, n = 10$

Values are expressed as mean \pm SD of 10 replicates; Compared with Oxygen Group $P < 0.05$, $P < 0.01$; * Compared with Control Group $P < 0.05$, ** Compared with Control Group $P < 0.01$

3 讨论

一般认为臭氧的毒性与其强氧化性有关。臭氧在水中分解成单原子氧和氧气,发挥强氧化性的主要是单原子氧的作用,而氧气是比较稳定的,通常情况下是无毒的^[6]。实验结果显示,纯氧气组不会引起草鱼肠蛋白酶和淀粉酶活性下降,而臭氧处理引起蛋白酶和淀粉酶活性下降,推测引起酶活性下降主要是臭氧的分解产物单原子氧引起的。臭氧的毒害机理可能如下:臭氧作为外源性毒物进入鱼体内,一方面自身分解成单原子氧和氧气,其中单原子氧和水反应生成自由基,当自由基超出机体自身的清除系统的清除能力,便又与多不饱和脂肪酸反应启动新过氧化物形成链锁反应。这种自动催化过程,导致多不饱和脂肪的迅速降解,生成丙二醛及其它醛类和酮类,而这些自由基或降解产物会直接攻击酶蛋白的必需基团或改变其构象,最终影响酶活性,而在鱼类消化酶的活性中心就含有易于受活性氧攻击的基团^[14]。需要说明的是,臭氧对草鱼蛋白酶和淀粉酶活性的影响还与臭氧浓度有关,只有超过一定浓度才会呈现降低酶活性作用,在较低浓度下不会降低酶活性作用。

因此,推测臭氧促进鱼类生长的前提条件是臭氧浓度比较低,主要是通过间接途径发挥作用的。臭氧在水中分解出氧气和单原子氧,氧气可提高水中的溶氧,较高的溶氧可提高水生动物消化酶的活性^[15],进而提高生长速度;单原子氧可降解水中的硫化物、氰化物、亚硝酸起到净化水质,又可杀灭水中病原体的作用^[16-24],从而使得鱼类将更多的能量用于生长,提高生长速度。臭氧提高鱼类生长速度的作用机理还有待于进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] 孙广明,李宝华,杨建军,等. 臭氧在水产养殖中的应用研究[J]. 中国水产,1996,(16):32-33.
- [2] 孙晓红,韩华. 臭氧处理海珍品育苗用水效果的初步研究[J]. 大连水产学报,1997,12(2):73-78.
- [3] 孙广明. 臭氧水处理原理及在水产养殖中的应用[J]. 内陆水产,1998,(4):5-7.
- [4] 臧维玲,戴习林,江敏,等. 臭氧对罗氏沼虾育苗池水净化作用的研究[J]. 水产科技情报. 2000,27(5):195-198.
- [5] Dixon M G, Hecht T, Brandt C R. Identification and treatment of a *Clostridium* and *Vibrio* infection in South Africa abalone (*Haliotis midae* L.) [J]. Journal of Fish Diseases, 1991,14(6):693-695.

- [6] Kim J G, Yousef A E, Dave S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of food : A review[J]. Journal of Food Protection , 1999 , 62(9) : 1071 - 1087.
- [7] Ajuzie C C. Effect of ozone on growth of *Anguilla anguilla*[J]. Fish Farmer , 1993 , 7(3) :33 - 34.
- [8] Paller M H, Heidinger R C. The toxicity of ozone to the bluegill *Lepomis machrochirus rafinesque*[J]. Environ. Pollution (Series A) . 1979 ,22 :229 - 239.
- [9] Wedemeyer G A, Nelson N C, Yasutake W T. Physiological and biochemical aspects of ozone toxicity of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. J Fish Res Board Can , 1979 ,36:605 - 614.
- [10] Hana Shechter. Spectrophotometric Method for Determination of Ozone in Aqueous Solutions [M]. USA : Water Research Pergamon Press , 1973 ,(7) :729 - 739.
- [11] Kopczyński S L. B J, Some observations on stoichiometry of iodometric analyses of ozone at pH 7.0[J]. Anal Chem , 1971 , (43) :1126 - 1127.
- [12] 中山大学生物系. 生化技术导论[M]. 北京: 科学出版社. 1979. 42 - 54.
- [13] 朱 俭,曹凯鸣. 生物化学实验[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1995.
- [14] 陈清西,陈祥仁. 鲨鱼肠蛋白酶活性必需基团的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1995, 34(2) : 267 - 270.
- [15] 胡贤德,林北^亮. 水体溶氧量对对虾消化道蛋白酶活力的影响[J]. 沈阳农业大学学报. 1999, 30(4) : 457 - 459.
- [16] 欧阳川,王福玉,史美琴,等. 臭氧杀灭水中枯草杆菌黑色变种芽胞的实验效果观察[J]. 消毒与灭菌, 1985, 2(2) :87.
- [17] 白希尧,张 宏,马安成,等. 臭氧溶液杀菌的研究[J]. 中国消毒学杂志, 1993, 106(1) : 7.
- [18] 殷之奕,俞永正,康新蛙. 臭氧在水产养殖中的应用[J]. 水产科技情报, 2000, 27(3) : 133 - 135.
- [19] Bursleson G, Murray T M, Pollard M. Inactivation of viruses and bacteria by ozone ,with and without sonication[J]. Appl Environ Microbiol , 1975 ,29(3) :340.
- [20] Finch G R, Fairbairn N. Comparative inactivation of poliovirus type 3 and MS2 coliphage in demand - free phosphate buffer by using ozone[J]. Appl Environ Microbiol , 1991 ,57(11) :3121.
- [21] Finch G R, Black E K, Laratiuk C W, et al. Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muriscyst* inactivation by ozone[J]. Appl Environ Microbiol , 1993 , 59(14) :3674.

EFFECTS OF OZONE ON ACTIVITY OF PROTEINASE AND AMYLASE IN INTESTINE TISSUES IN GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS C. & V.*) FINGERLING

MA Guang - zhi¹, XU Jun¹, TANG Mei², FANG Zhan - qiang¹

(1. Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. Biotech Research Institute, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract : Effects of ozone on activity of protease and amylase in intestine tissues in grass carp fingerling were studied. The activity of proteinase and amylase in the fingerling decreased with the enhancement of ozone treatment from a range of 0.14 ~ 0.45 mg/L. In the period of 72 h post ozone treatment, the activity of both enzymes decreased gradually.

Key words : ozone; grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* C. & V.); proteinase; amylase

【责任编辑 黄玉萍】