

Université d'Aix-Marseille III
Faculté des Sciences et Techniques
de St Jérôme

Institut National d'Agronomie
Paris-Grignon

Utilisation digestive de l'amidon chez un tilapia, *Sarotherodon melanotheron* (Pisces, Cichlidae): Etude de l'activité amylasique.

Rapport de stage présenté par :
Yann MOREAU

Pour l'obtention du DEA de Nutrition
« Aspects Moléculaires et Cellulaires »
Option « Nutrition Animale »

Stage réalisé au GAMET

Groupe d'Aquaculture continentale Méditerranéenne et Tropicale, Montpellier
dans le cadre de l'ORSTOM

Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération

21 OCT. 1994

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° :

40663

Cote :

B

Ex 1

P 5 M

6.23

Introduction

Dans la recherche d'une source d'énergie alimentaire non protéique, l'amidon constitue le composé de choix, d'une part pour son faible coût et d'autre part pour sa facilité d'incorporation dans des aliments composés. S'il est largement reconnu que l'amidon alimentaire est globalement bien utilisé par les Vertébrés supérieurs élevés par l'homme, son utilisation par le poisson reste encore limitée (Steffens, 1989; Gropp & Tacon, 1994). Toutefois, les espèces tropicales semblent faire meilleur usage de source énergétique non protéique dans la mesure où ces poissons fixent moins cette forme d'apport alimentaire (Luquet & Moreau, 1989). L'utilisation effective des glucides pour la couverture des besoins énergétiques a été confirmée par la détermination des substrats utilisés en calorimétrie indirecte chez un poisson chat néotropical (Moreau et al., 1992) et chez le tilapia faisant l'objet de cette étude, *Sarotherodon melanotheron* (Moreau, 1992). Plus récemment, une réponse du métabolisme hépatique a été observée chez une autre espèce de tilapia, *Oreochromis niloticus*, soumis à un régime contenant de l'amidon (Shimeno *et al.*, 1993). Ces modifications conduisent à une épargne protéique de l'ordre de 44 %. L'utilisation de l'amidon reste étroitement liée à son taux d'incorporation dans l'aliment, et une teneur n'excédant pas 20 % de l'énergie digestible de l'aliment est généralement recommandée (Pfeffer *in* Gropp & Tacon, 1994).

Les capacités d'utilisation digestive d'un composant de l'aliment constituent une étape déterminante pour son exploitation par le métabolisme. Ainsi une précuisson, prégélatinisation, permet d'augmenter notablement la digestibilité de l'amidon par la truite arc en ciel, *Oncorhynchus mykiss* (Bergot & Brecque, 1983) ou par le poisson-chat élevé au Etats-Unis, *Ictalurus punctatus* (Wilson & Poe, 1985). D'une façon générale, la digestion chez les poissons et les mécanismes qui lui sont liés ont fait l'objet de nombreuses revues (Al Hussaini & Kholy, 1953; Creac'h, 1963; Fänge & Grove, 1979; Kapoor *et al.*, 1975; Pérès, 1981; Léger, 1981; Steffens, 1989) dont les poissons d'eau douces africains (Moreau, 1988). Une activité de type α -amylase a été décrite chez de nombreuses espèces de poissons (avec pour mémoire Dhage & Mohamed, 1977; Kuz'mina & Morozova, 1977; Hofer, 1979; Uys & Hecht, 1987; Ugwamba, 1993) et en particulier sur des espèces de tilapia (Al Hussaini & Kholy, 1953;

Keddis, 1956; Fish 1960; Nagase, 1964; Moitra & Das, 1967; Cockson & Bourne, 1972; Yamane, 1973). Les sites anatomiques où l'on retrouve cette activité font toujours l'objet d'une controverse (Steffens, 1989), sa présence pouvant même être décrite dans l'estomac (Fish, 1960; Cockson & Bourne, 1972). Son origine pancréatique semble toutefois reconnue (Yamane, 1973). L'anatomie particulière du pancréas exocrine, « pancréas diffus », chez la plupart des Téléostéens (Grasset, 1958) apparaît être à l'origine de nombreuses confusions quant au site d'observation de l'activité amylasique. Ainsi les cellules exocrines du pancréas se retrouvent le long des vaisseaux sanguins irrigants le tube digestif dans son ensemble (Fänge & Grove, 1979) et en particulier dans le foie et dans le conjonctif à la surface externe de l'intestin (Yamane, 1973). Chez les tilapias, le tube digestif comporte un estomac bien différencié et le tissu pancréatique est diffus.

Les caractéristiques biochimiques de l'amylase de certaines espèces de tilapia ont été étudiées, en particulier le pH optimal de l'activité (Moreau, 1988). Les enzymes digestives d'une espèce, *Oreochromis niloticus*, ont fait l'objet d'une attention particulière. Ainsi, des protéases de l'estomac et des protéases, des amylases et des α -glucosidases de l'intestin ont pu être purifiées et caractérisées à partir d'extrait d'estomac ou d'intestin (Yamada *et al.*, 1991a, 1991b, 1992, 1993).

L'influence du régime alimentaire sur les enzymes digestives a été étudiée chez quelques espèces. Les activités des enzymes protéolytiques et amylolytiques ont été comparées selon le régime alimentaire naturel des espèces (Fish, 1960; Cockson & Bourne, 1972; Hofer & Schiemer, 1981). En règle générale, les enzymes amylolytiques sont plus actifs chez les herbivores. Alors que la différence est moins marquée pour les activités protéolytiques. L'adaptation à des régimes différents pour une espèce en particulier a aussi fait l'objet d'étude. Une bonne revue en est proposée par Steffens (1989). L'augmentation de la teneur en protéine de l'aliment conduit à une augmentation de l'activité des protéases intestinales chez la carpe, *Cyprinus carpio*, la truite arc en ciel et le tilapia, *Oreochromis niloticus* (Kawai & Ikeda, 1972; Falge, 1973; Nagayama & Saito, 1968). Alors qu'une augmentation de la quantité d'amidon associée à une diminution des protéines entraîne une augmentation de l'activité amylasique chez la carpe (Kawai & Ikeda, 1972). Chez la truite arc en ciel, cette augmentation est plus nette si, à teneur en amidon constant, les protéines sont remplacées par de la cellulose (Kawai & Ikeda, 1973). Chez l'anguille, *Anguilla anguilla*, un accroissement de la teneur en amidon de l'aliment conduit à une augmentation simultanée des activités protéolytique et amylolytique (Bulnheim, 1974).

S'il ne présente qu'un intérêt limité pour l'élevage intensif, *Sarotherodon melanotheron* est une espèce de tilapia très largement réparti le long de la côte ouest de l'Afrique, du Sénégal au Congo, que ce soit dans les eaux douces des fleuves et des barrages ou dans les eaux hyperhalines des estuaires inversés du Sénégal. Cette espèce constitue donc un modèle de choix pour l'étude des modalités d'adaptation physiologique.

Après une description préliminaire des caractéristiques de l'activité amylasique dans l'intestin, le but de ce travail est d'étudier l'effet de l'ingestion d'un repas sur la sécrétion d'enzyme amylolytique, et l'effet de la nature du régime sur la proportion relative d'enzymes digestifs amylolytiques et protéolytiques.

Matériel et méthodes

Poissons et structures d'élevage

Les poissons sont tous issus des populations naturelles de *Sarotherodon melanotheron* de la lagune Ebrié (Côte d'Ivoire). Pour l'étude préliminaire de l'activité amylasique, les échantillons ont été prélevés sur des poissons nés et élevés en circuit fermé, avec renouvellement partielle en eau de ville, au Centre de Recherche Océanographique d'Abidjan (Côte d'Ivoire). La température d'élevage, non contrôlée, s'est maintenue entre 28 et 30 °C. Aucune condition adverse n'a été observée que ce soit pour les teneurs en oxygène, en ammoniacque ou en nitrite. Pour les autres aspects, les travaux ont été menés sur des poissons nés et élevés en circuit fermé au GAMET (Groupe Aquaculture continentale Méditerranéenne et Tropicale) à Montpellier. Les géniteurs de ces poissons, transférés à l'état juvénile en octobre 1992, proviennent des structures d'élevages déjà citées. Sur le site du GAMET, le circuit expérimental utilisé est constitué de 18 bacs rectangulaires en polyester d'un volume de 90 litres, alimentés en circuit fermé indépendant et autonome. La température d'élevage a été contrôlée et maintenue à 26-27 °C. Les concentrations en oxygène dissous, ammoniacque et nitrite n'ont pas variées et sont restées dans des limites respectives de 250, 21,4 et 2,14 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$.

Prélèvement du suc intestinal et des tissus du tube digestif

Après anesthésie (Phénoxyéthanol, $0,25 \text{ mL.L}^{-1}$), les poissons sont sacrifiés puis éviscérés. Le tube digestif est isolé dans sa totalité et dégagé de l'ensemble du tissu adipeux. L'estomac avec l'oesophage est séparé de l'intestin par section en aval du pylore.

Le contenu intestinal est ensuite chassé délicatement par un léger écrasement de l'intestin sur l'ensemble de sa longueur. Le suc est recueilli en microtube (Type Eppendorf), centrifugé (10 min; $10000g$; 4°C). Le surnageant est récupéré dans le même type de tube et stocké au congélateur (-20°C) avant analyse.

Pour les tissus, l'intestin est scindé en deux portions, proximale et distale. La zone proximale, juste en aval de l'estomac, correspond à la partie de l'intestin ayant une paroi charnue et opaque. La zone distale, allant jusqu'à l'anus, se caractérise par une paroi plus fine et translucide. Chaque élément du tube digestif, estomac, intestin proximal et distal, est ensuite ouvert sur toute sa longueur, lavé et rincé dans une solution de chlorure de sodium (9 g.L^{-1}), essoré sur papier absorbant et pesé au dixième de milligramme. Les différents tissus sont ensuite stockés en microtubes et conservés au congélateur avant extraction.

Pour chaque échantillon de tissu un extrait est obtenu par homogénéisation, en milieu réfrigéré (glace), dans $1,5 \text{ mL}$ de tampon phosphate (20 mM ; $\text{pH } 6,9$; $\text{NaCl } 6 \text{ mM}$) à l'aide d'un tube de Potter (Teflon/Verre). L'homogénéisat est transféré quantitativement en tube et centrifugé à 4°C (30 min ; $4147g$). Le surnageant est recueilli en fiole de 10 mL et le volume ajusté avec le tampon. L'extrait obtenu est réparti en aliquot de 1 mL et stocké au congélateur avant analyse.

Préalablement aux diverses analyses, les extraits sont dilués au besoin avec le tampon utilisé pour l'analyse considérée.

Dosages

Détermination des activités enzymatiques

Activité amylasique

L'activité amylasique a été estimée par détermination discontinue indirecte (Eisenthal & Danson, 1993). L'amidon soluble (Amidon soluble selon Zulkowski; Merck) a été retenu comme substrat. Les groupements réducteurs, dont l'apparition est consécutive à l'action de l'enzyme sur les chaînes de glucose constituant l'amidon, ont été dosés par la méthode dite de

Dygert (Cf. *infra*). L'augmentation du pouvoir réducteur est mesurée à différents temps d'incubation à 30°C (0, 20, 40 et 60 secondes).

L'activité est mesurée par ajout de 50 µL d'extrait enzymatique dans 450 µL de solution contenant 1g.L⁻¹ d'amidon soluble dans un tampon phosphate (20 mM; pH 6.9; NaCl, 6 mM). La réaction est stoppée par ajout de 500 µl d'une solution alcaline de sulfate de cuivre (CuSO₄, 1,8 mM; Na₂CO₃, 0,38 M; Glycine, 0,21 M) et par refroidissement dans un bac de glace. La formation du complexe coloré est obtenu par addition de 500 µL d'une solution de chlorhydrate de néocuproïne (5 mM; Sigma) suivi d'une incubation de 10 minutes à 100°C. Après refroidissement (15 min, eau courante), le volume de la solution est ajustée avec de l'eau distillée à 5 mL. La densité optique est ensuite lue à 450 nm contre l'eau distillée. Les D.O. obtenues sont comparées à une gamme étalon de maltose 0 à 100 nM.

Une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire à la production d'une micromole d'équivalent réducteur par minute.

Activité trypsine-analogue, « Trypsine-like »

L'activité trypsine-analogue a été mesurée par détermination continue directe (Eisenthal & Danson, 1993) de l'activité amidasique. Elle a été déterminée par le dosage de la 4-Nitroaniline, NA, libérée par l'hydrolyse du Benzoyl-L-Arginine-4-Nitroaniline, BAPNA (Geiger & Fritz, 1988). L'augmentation de NA est suivie par spectrophotométrie à 405 nm, en cuve thermostatée à 30°C.

L'activité est dosée par action de 10 µL d'extrait enzymatique sur 990 µL d'une solution de BAPNA (0,4 mM) dans un tampon triéthanolamine (0,2 M; pH 7,8; CaCl₂, 20 mM).

Une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour obtenir une augmentation d'une unité de densité optique par minute.

Par commodité, le terme « activité trypsique » sera utilisé en lieu et place du terme « activité trypsine-analogue » correspondant à la description d'une activité enzymatique analogue à celle observée pour la trypsine des Mammifères.

Détermination des protéines

Les protéines totales contenues dans les différents extraits ont été dosés à l'aide du réactif Biorad (réf. 500-0006) selon le protocole de la micro méthode décrit par le fournisseur. Cette

technique utilise la méthode au bleu de Coomassie (Bradford, 1976). L'étalon protéique utilisé est la sérum albumine bovine (Protein standard BSA, réf. P 7656; Sigma Chemicals Co.).

Caractérisation préliminaire de l'activité amylasique

Régime reçu avant prélèvement

Les prélèvements ont été réalisés sur trois poissons d'un poids moyen de 23 g. Les animaux ont reçu quatre heures auparavant un aliment complet à partir de farine de poisson locale (farine de déchets de thon) comme source de protéine, et de refus de farine de manioc, comme source d'amidon. Les rations distribuées correspondent à un apport journalier par masse de poisson de $20 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour les protéines brutes, et de $20 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour l'amidon. Les échantillons obtenus ont été regroupés avant traitement pour analyse. Les mesures d'activité ont été réalisées sur l'échantillon dilué au millième.

Détermination du pH et de la température optimal

Influence du pH

L'influence du pH sur l'activité amylasique a été testée à une température de 30°C avec un tampon citrate/phosphate (20 mM; NaCl 6 mM) pour une gamme de pH allant de 4,8 à 7,2 unités, et un tampon phosphate (20 mM; NaCl 6 mM) pour une gamme de pH allant de 6,6 à 7,6. Deux types de substrats ont été testés: l'amidon soluble (amidon soluble selon Zulkowsky; Merck; 1 g.L^{-1}) pour les tampons phosphates, et l'amylose (amylose Type III de pomme de terre; Sigma Chemicals, Co.; $0,5 \text{ g.L}^{-1}$) pour les deux types de tampons.

Influence de la température

L'influence de la température a été étudiée dans une gamme de température allant de 10 à 80°C . Exceptée la température, les conditions générales de détermination sont celles décrites au préalable.

Détermination des paramètres cinétiques

Pour la détermination des paramètres cinétiques, les activités amylasiques ont été mesurées avec deux substrats de nature différente : l'amidon soluble (amidon soluble selon Zulkowsky; Merck) et l'amylose (amylose Type III de pomme de terre; Sigma Chemicals, Co.). La gamme de concentration en substrats est de $0,05$ à 1 g.L^{-1} pour chacun d'eux. Exceptée la concentration en substrat, les conditions générales de détermination sont celles décrites (Cf. *supra*).

Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel k•cat™ (BioMetallics, Inc.). Le calcul des paramètres de l'équation de Michaelis-Menten est obtenu par ajustement non-linéaire itératif à partir des valeurs estimées initiales calculées par la méthode de Lineweaver-Burk.

Electrophorèses

Les électrophorèses ont été réalisées sur gel de polyacrylamide suivant le protocole de Laemmli (Laemmli, 1970 *in* Giraud, 1993). Un gel de concentration ou « stacking gel » est coulé au dessus du gel de séparation ou « running gel » dans le but d'assurer une concentration des protéines avant leur séparation.

Le matériel utilisé est un dispositif Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Biorad) qui permet de réaliser des gels de 8 x 7,3 cm. L'épaisseur choisie pour le gel est de 1,5 cm. Les solutions nécessaires à la préparation des gels et à la migration ont été préparées suivant les instructions du fournisseur Biorad. Les migrations ont été réalisées à température ambiante sous l'action d'un courant de tension constante, 150 V. La durée des migrations n'a pas excédée une heure.

Les électrophorèses ont été réalisées en présence de SDS (3,5 mM ou 1 g.L⁻¹) en conditions non réduites et réduites.

Avant d'être déposés, les échantillons ont été dilués au dixième avec le tampon phosphate utilisé pour le dosage de l'activité amylasique. Dans les conditions non réduites, l'échantillon dilué a été incubé pendant 1 heure à 37 °C après mélange (1:1) avec une solution d'iodoacétamide dénaturante (Iodoacétamide, 21,6 mM; Urée, 8 M; Tris/HCl pH 8, 0,2 M; SDS 7 mM). Dans les conditions réduites, l'échantillon dilué mélangé (1:1) à une solution de β -mercaptoéthanol dénaturante (β -mercaptoéthanol, 0,286 M; Urée, 8 M; Tris/HCl pH 8, 0,2 M; SDS 7 mM) est incubé à 37 °C pendant 1 heure, puis à nouveau pendant 20 minutes après ajout d'iodoacétamide (q.s.p. 0,216 M). Chaque échantillon traité a été coloré au bromophénol pour suivre le front de migration.

Un premier essai a été réalisé avec des gels contenant 12 % de polyacrylamide et un deuxième avec des gels à 7,5 %.

Les protéines ont été révélées par coloration au nitrate d'argent (Oakley *et al.*, 1980). Pour la mise en évidence de l'activité amylasique, les gels ont été rincés, sur table d'agitation, pendant 160 minutes avec le tampon phosphate de détermination de l'activité amylasique. Ce tampon a été changé toutes les 20 minutes. Le gel rincé est ensuite mis à incuber 1 heure sur table d'agitation à température ambiante dans une solution d'amidon soluble (Prolabo) à 10 g.L⁻¹

dans le même tampon phosphate. Après trois rinçage du gel à l'eau, les sites de dégradation de l'amidon par les enzymes sont révélés au Lugol.

Suivi postprandial et influence du régime

Aliment

Cinq formules d'aliment ont été calculées pour fournir des apports journaliers par unité de biomasse de $15 \text{ g.kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour les protéines brutes, et allant de 0 à $40 \text{ g.kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour l'amidon.

Le tableau I décrit les différentes formules correspondantes.

	<i>Régime</i>				
	AM0	AM10	AM20	AM30	AM40
Apport journalier ($\text{g.kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$)					
Protéines brutes	15	15	15	15	15
Amidon	0	10	20	30	40
Constituants (g.kg^{-1} aliment sec)					
Concentré protéique ¹	871,5	581,4	436,3	349,1	290,9
Amidon pré-gélatinisé	0	329,5	494,4	593,4	659,5
Huile de maïs	44,5	29,7	22,2	17,9	14,8
Complexe vitaminé ²	14,8	9,9	7,4	5,9	5
Complexe minéral ³	59,2	39,5	29,7	23,7	19,8
Liant ⁴	10	10	10	10	10
Composition estimée (g.kg^{-1} aliment sec)					
Protéines brutes	741	494	371	297	247
Amidon	0	330	495	594	660
Ration d'usage (g.kg^{-1} poisson)	20,2	30,4	40,4	50,5	60,7

Tableau I. Composition des aliments

Les aliments ont été préparés par voie humide. Les granulés obtenus ont été stockés sous sac de polyéthylène alimentaire. Les sacs soudés ont été maintenus au congélateur ($-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) avant

¹ SOLATLANTE 90 (Sanofi) Hydrolysate de poisson obtenu à partir de poissons entiers et de sous produits de poissons (82-88 % protéines brutes, 0,61 % tryptophane).

² Vitamine A, 200 UI.g⁻¹; Vitamine D3, 1000 UI.g⁻¹; Vitamine E, 40,2 UI.g⁻¹; Vitamine K3, 4 mg.g⁻¹; Vitamine C, 100 mg.g⁻¹; Vitamine B1, 5 mg.g⁻¹; Vitamine B2, 5mg.g⁻¹; Vitamine B6, 5 mg.g⁻¹; Vitamine B12, 10 µg.g⁻¹; Calcium D-Pantothenate, 11 mg.g⁻¹; Vitamine PP, 20 mg.g⁻¹; Biotine, 600 µg.g⁻¹; Acide folique, 1,5 mg.g⁻¹; Choline, 230 mg.g⁻¹.

³ P, 168 mg.g⁻¹; Ca, 210 mg.g⁻¹; Mg, 13 mg.g⁻¹; Na, 30 mg.g⁻¹; S, 12 mg.g⁻¹; Zn, 1,25 mg.g⁻¹; Cu 0,2 mg.g⁻¹; Mn, 0,3 mg.g⁻¹; Fe, 6,7 mg.g⁻¹; I, 0,15 mg.g⁻¹; Co, 0,1 mg.g⁻¹; Se, 8 µg.g⁻¹.

⁴ Sodium alginate.

utilisation. Une détermination de matière sèche a systématiquement été pratiquée à l'ouverture d'un nouveau sac.

Suivi postprandial

L'expérience s'est déroulée sur un ensemble de 105 poissons (poids moyen 57,4 g) présents dans les structures d'élevage depuis plus d'un mois et répartis en lots équivalents dans 6 bacs. Pour permettre l'adaptation du poisson à l'aliment, ceux-ci ont reçu le régime AM10, 48 heures avant le début de l'expérience (Moreau, 1991). Les rations journalières ont été distribués en 2 repas équivalents à 9H00 et 17H00. Le jour de l'expérience, deux poissons ont été prélevés dans un bac au hasard à 9H00 juste avant le repas, puis chaque heure dans un bac différent, tiré au hasard sur les bacs restant, jusqu'à 14h00 soit 5 heures après le début du repas. Les poissons ont été pesés et les tissus (estomac, intestin proximal et distal) prélevés dans les 10 minutes suivant la capture. Trois déterminations de l'activité amylasique ont été réalisés sur chaque échantillon.

Influence du régime

80 poissons (poids moyen 9,4 g) ont été placés dans un bac. Ces poissons ont reçu les différents régimes, AM0 à AM40, par ordre croissant d'apport en amidon pour faciliter l'adaptation au régime les plus riches en glucides. Après avoir reçu le régime le plus riche en amidon, AM40, les animaux ont reçu à nouveau le régime AM10. Les rations journalières ont été distribués en 3 repas équivalents à 9H00, 12H00 et 17H00. Après un période d'adaptation de 48 heures au nouveau régime, trois poissons ont été prélevés à 14H30 soit 5H30 après le premier repas et 1H30 après le deuxième. Ce choix de l'heure de prélèvement a permis de garantir un bon taux de remplissage du tube digestif. Le soir même les poissons acceptaient sans difficulté le régime suivant et le prélèvement suivant a pu être pratiqué deux jours après. Les poissons ont été pesés et traités dans les 10 minutes suivant leur capture.

Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Statgraphics® Version 5 (STSC Inc.) en appliquant les modèles d'analyse de variance correspondant à chaque situation expérimentale (Cochran & Cox, 1957; Dowdy & Wearden, 1983).

Résultats

Caractérisation préliminaire de l'activité amylasique

Avec l'amidon soluble comme substrat, l'activité amylasique moyenne observée dans le contenu intestinal obtenu à partir des échantillons prélevés en Côte d'Ivoire est de $756 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$, pour une activité spécifique de $62 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protéine. En utilisant une solution de maltose comme substrat ($55 \mu\text{M}$), aucune action d'hydrolyse par le contenu intestinal n'a été observée dans les conditions de détermination des activités amylolytiques.

pH Optimal

La figure 1 représente l'influence du pH sur l'activité amylasique du contenu intestinal dans les deux tampons étudiés. Pour chaque tampon, l'activité observée à pH 6,9 avec le tampon phosphate et l'amidon est utilisée comme référence. L'activité maximale est observée pour un pH de l'ordre de 6,9. Ce maximum semble indépendant du tampon utilisé et du substrat (amidon $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou amylose $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

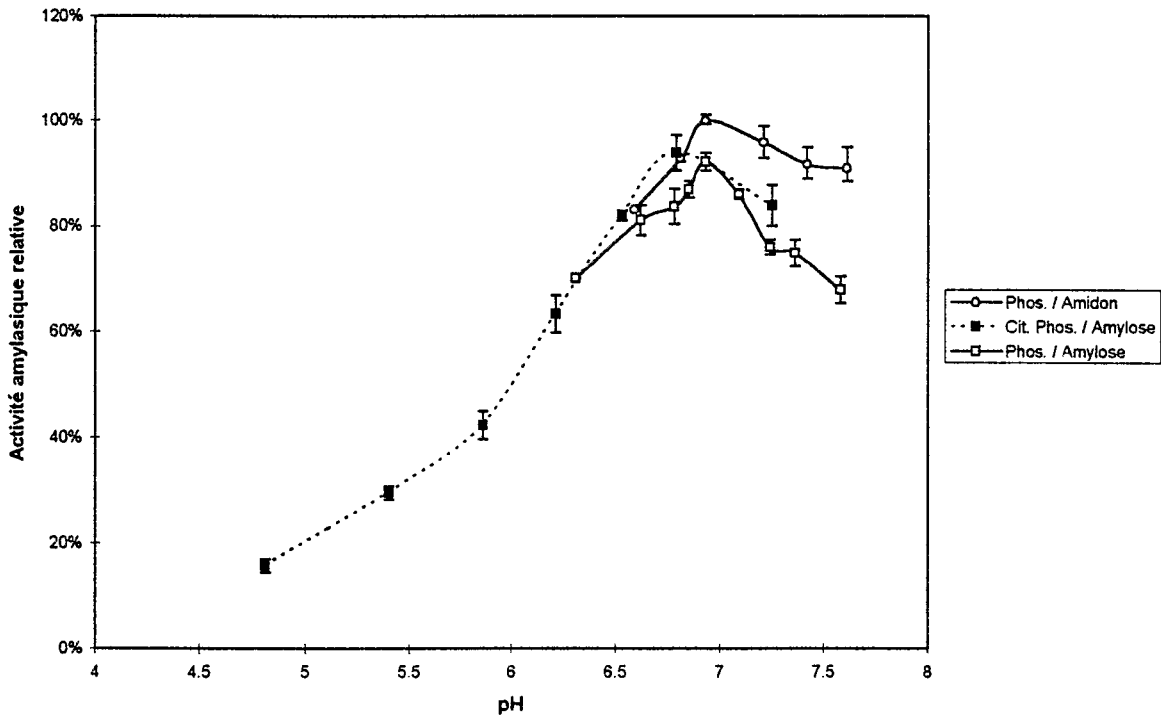


Figure 1. Influence du pH sur l'activité amylasique du contenu intestinal de *Sarotherodon melanotheron*. Tests réalisés avec un tampon (20mM, NaCl 6mM) phosphate, ligne pleine, ou citrate/phosphate, ligne brisée. Substrat utilisé : amidon soluble $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (○) ou amylose $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (□). Les valeurs sont rapportées à la moyenne observée à pH 6,9 avec l'amidon. Les barres d'erreurs indiquent l'amplitude des observations.

Température optimale

Pour évaluer l'influence de la température sur l'activité amylasique les activités sont calculées en pourcentage des moyennes observées à 30 °C (Figure 2). Le maximum est obtenu entre 35 et 50 °C. L'activité est très réduite vers 10-15 °C (température normale d'élevage des truites) et disparaît quasi totalement à 80 °C.

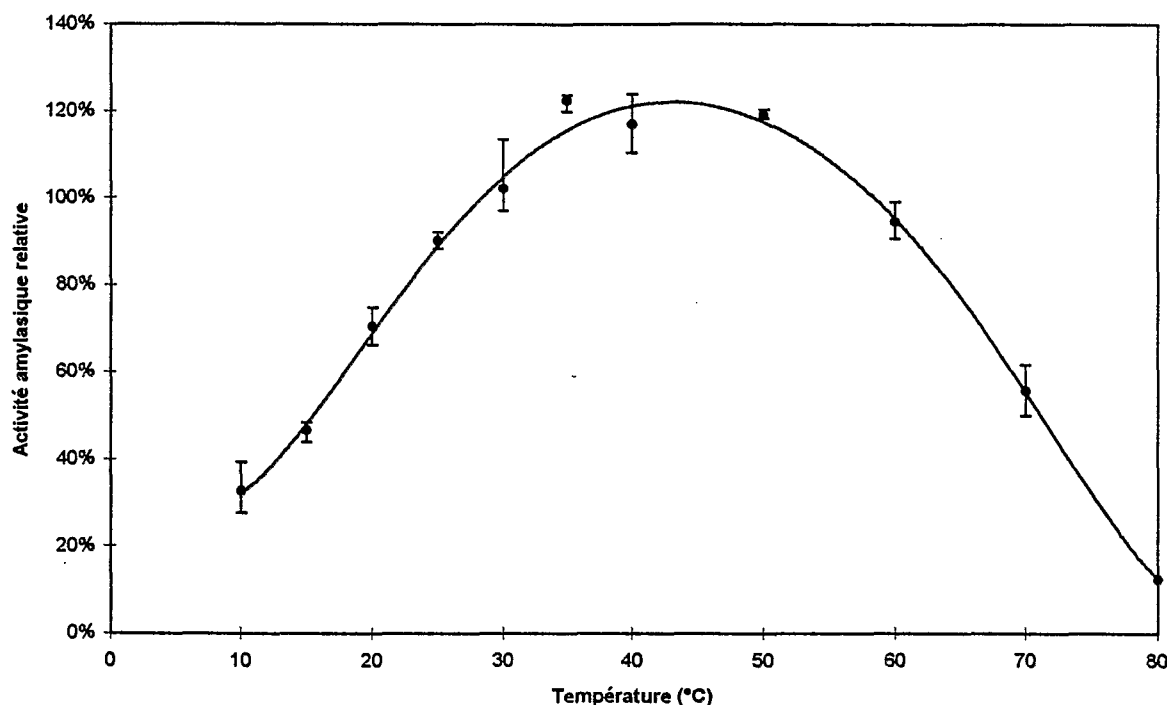


Figure 2. Influence de la température sur l'activité amylasique du contenu intestinal de *Sarotherodon melanotheron*. Les valeurs sont rapportées à la moyenne observées à 30 °C. Les barres d'erreurs indiquent l'amplitude des observations.

Paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques de l'activité amylasique du contenu intestinal sont étroitement dépendant de la nature du substrat (Tableau II). Pour l'amylose, le K_m est deux fois plus faible (47%) que pour l'amidon. Alors que les différences de vitesse maximale obtenue avec l'échantillon étudié sont moins marquée. Cependant, des activités équivalentes sont obtenues avec de l'amylose à 0,5 g.L⁻¹ et de l'amidon à 1 g.L⁻¹ (Figure 3).

Substrat	K_m apparent	V_{max} apparent
Amidon	0.445 (0.036)	999 (37)
Amylose	0.210 (0.016)	1103 (26)

Tableau II. Paramètres cinétiques de l'activité amylasique du contenu intestinal brut de *Sarotherodon melanotheron*, en fonction du substrat. Les valeurs de V_{max} sont données à titre de comparaison entre les substrats. Les erreurs standards des paramètres (s/\sqrt{n}) sont données entre parenthèses.

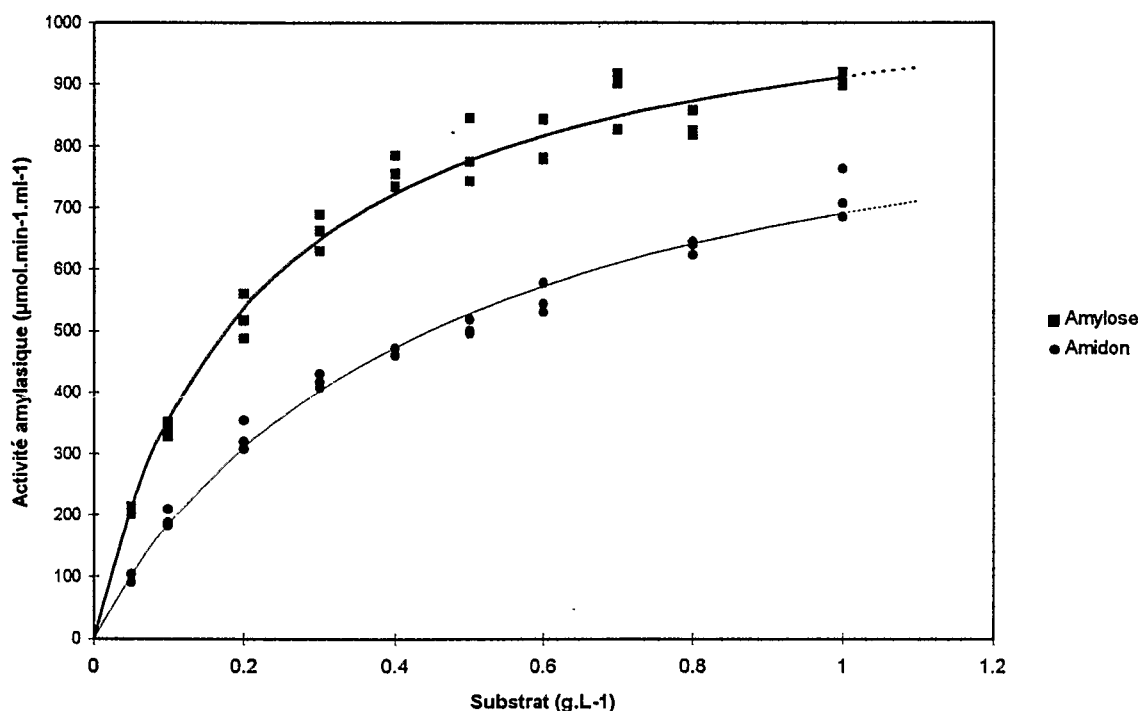


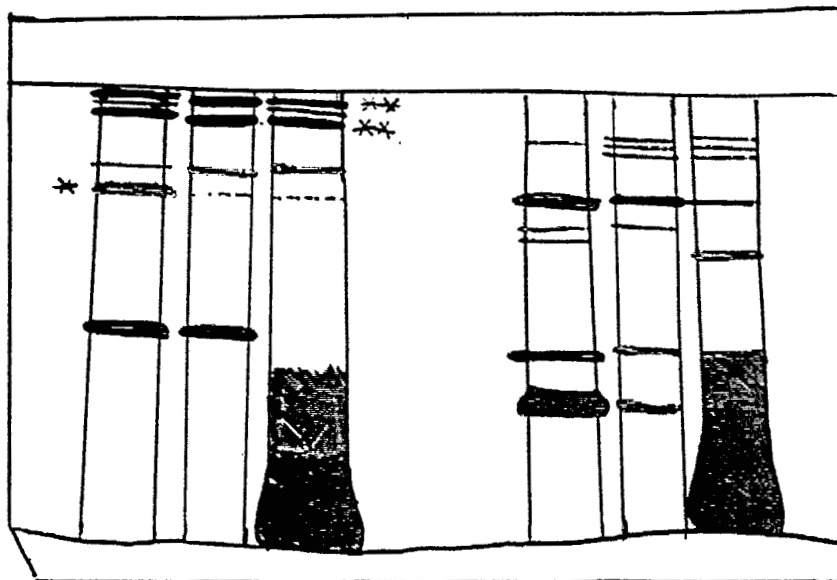
Figure 3. Influence de la concentration et de la nature du substrat sur l'activité amylasique du contenu intestinal de *Sarotherodon melanotheron*.

Electrophorèses

Des électrophorèses ont été réalisées sur le contenu intestinal prélevés sur les poisson provenant de Côte d'Ivoire et sur les poissons nés à Montpellier, ainsi que sur un extrait de tissu intestinal de ces derniers. La répartition des bandes correspondant aux protéines sont équivalentes pour les trois échantillons (Figure 4). Pour les échantillons non réduits, on note principalement deux bandes de haut poids moléculaire (> 97,4 kD) et une bande de plus faible poids moléculaire. La réduction des échantillons conduit à la quasi disparation des bandes de hauts poids moléculaires pour ne retrouver qu'une bande bien marquée d'un poids moléculaires compris entre 66 et 45 kD.

L'activité amylasique a été recherchée sur les échantillons non réduits. Des activités n'ont pu être révélées que pour le gel à 12% de polyacrylamide. L'intense lavage du gel, pour éliminer le SDS avant incubation, peut avoir été à l'origine de l'absence de révélation pour le gel à 7,5%. Dans ce gel le réseau de polymère est beaucoup plus lâche et les protéines, plus labiles, peuvent avoir été lessivées. Sur le gel à 12%, deux taches d'activité bien marquées sont obtenues pour les bandes de hauts poids moléculaires avec une activité beaucoup plus diffuses pour la bande de plus faible poids moléculaires.

4a



Répartition des puits

Et.	NR				R		
	Abj	Mpl			Abj	Mpl	
	C	C	I		C	C	I

4b

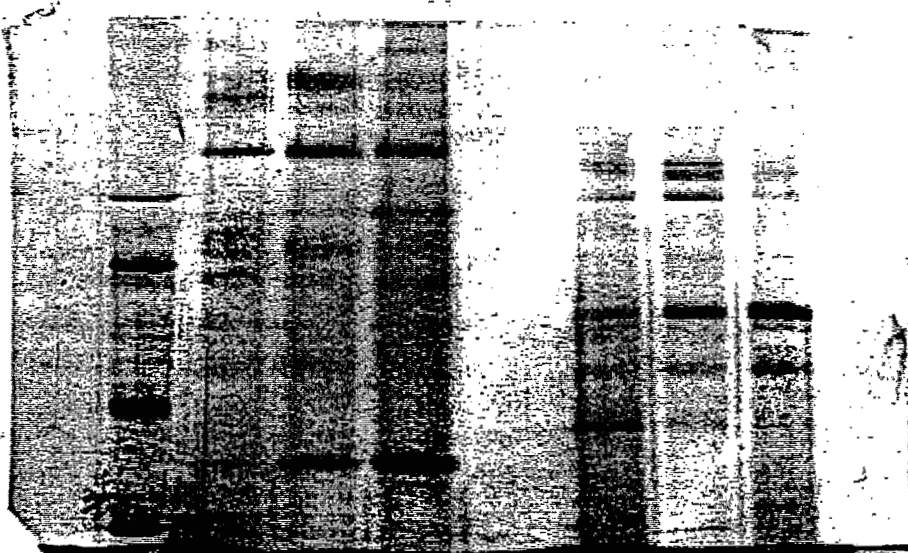


Figure 4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12% (4a) et 7,5% (4b) d'échantillons non réduits (NR) ou réduits (R) de contenu intestinal (C) et d'extrait de tissu intestinal (I) de *Sarotherodon melanotheron* provenant de Côte d'Ivoire (Abj) ou nés à Montpellier (Mpl). Un étalon de poids moléculaires (97,7; 66; 45; 31; 21,5 et 14,5 kD) a été placé pour le gel 7,5 %. Les astérisques indiquent les bandes pour lesquelles une activité amylasique a été révélée.

Suivi postprandial

Le poids moyen des poissons prélevés est de 63,3 g ($s = 11,6$). Les activités amylasiques ont été exprimées en fonction du poids frais de l'ensemble du tissu prélevé pour tenir compte de la disparité des poids des poissons. Une analyse par regression multiple des activités en fonction de la teneur en protéine de l'extrait, du poids frais du tissu et du poids corporel a montrée que la plus forte corrélation est celle avec le poids du tissu.

Source de variation	Somme des carrés	d.l.	Carrés moyens	F_{obs}	Prob($F > F_{obs}$)
Heure	25314	5	5062,9	0,32 ^B	0,8817
Réplicat	2835	1	2834,8	0,179 ^B	0,694
Tissu	316865	2	158432,6	227,02 ^R	0
<i>Intéactions</i>					
Heure x Réplicat	79124	5	15824,79		
Heure x Tissu	30346	10	3034,6	4,348 ^R	0,0001
Résiduelle	58622	84	697,88		
Total	513106	107			

Source d'erreur considérée pour le calcul de F :

^R Résiduelle

^B Intéaction Heure x Réplicat

Tableau III. Suivi postprandial de l'activité amylasique dans différents tissus du tube digestif. Tableau d'analyse de variance. Les rapports F sont calculés en suivant un plan « split plot ».

Les résultats pondérés ont été analysés selon un plan « Split plot » (Tableau III). Comparés aux activités rencontrées dans le contenu intestinal, les valeurs obtenues pour les extraits restent faibles. On n'observe aucune influence de l'heure de prélèvement par rapport au repas sur les activités. Seule une différence entre les tissus existe, l'activité observée au niveau de l'estomac étant proche de zéro (Tableau IV et Figure 5).

Comparaisons multiples ($\alpha = 0,05$)			
Tissu	N	Moyenne	Homogénéité
Estomac	36	4,38	a
Intestin proximal	36	104,7	b
Intestin distal	36	129,7	c

Tableau IV. Comparaisons multiples de moyennes pour les tissus (test de Duncan). Les activités sont exprimées en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de tissu frais.

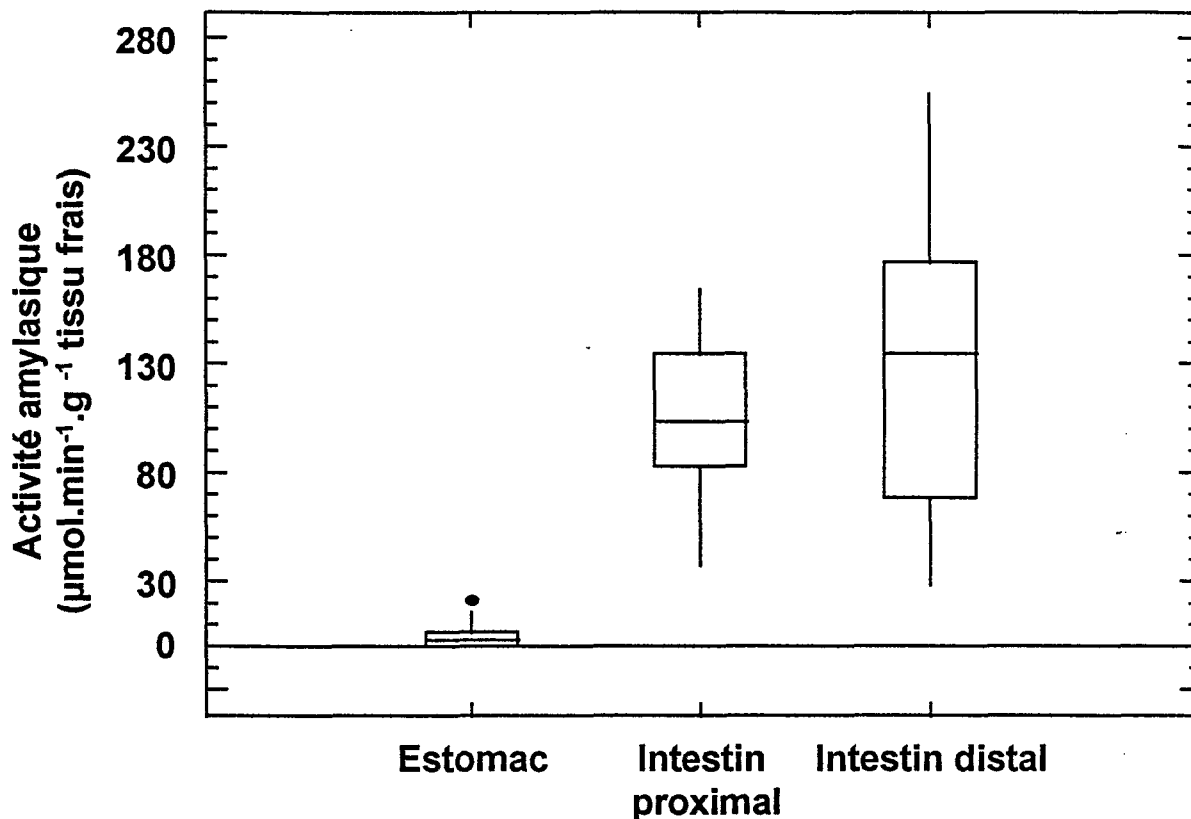


Figure 5. Activités amylasiques totales du tissu observées dans l'estomac, dans l'intestin proximal et dans l'intestin distal de *Sarotherodon melanotheron*. Diagramme de Box & Whisker : le cadre représente la dispersion de 50 % de l'échantillon, le trait horizontal la valeur de la médiane, les traits verticaux la dispersion des individus situés dans un intervalle égal à 1,5 fois l'interquartile, les autres individus sont représentés par des points.

Influence du régime

En raison des faibles activités rencontrées dans le tissu intestinal, les comparaisons ont portées sur les activités enzymatiques dans le contenu intestinal. Les activités spécifiques (unités enzymatiques. mg^{-1} protéines) et le rapport de l'activité amylasique et trypsique ont été comparés par analyse de variance selon un plan hiérarchisé pour les activités spécifiques (Tableau V et Tableau VI) et simple pour le rapport « amylase/trypsine » (Tableau VII). L'influence du régime n'est significatif ($\alpha=0,05$) que sur l'activité spécifique de la trypsine. Le régime n'a pas d'effet significatif sur le rapport « amylase/trypsine ». L'activité amylasique

spécifique diminue faiblement avec l'ingestion d'amidon (Figure 6). Les activités trypsiques les plus faibles sont rencontrées avec le régime AM30 et AM40 qui sont significativement différentes de celle obtenue pour le régime AM0 (test de Duncan).

Source de variation	Somme des carrés	d.l.	Carrés moyens	F_{obs}	Prob($F > F_{obs}$)
Régime	4736,00	5	947,2	2,719 ^B	0,072
Réplikat	4179,95	12	348,3	73,89 ^R	0,000
Résiduelle	169,72	36	4,71		
Total	9085,67	53			

Source d'erreur considérée pour le calcul de F :

^R Résiduelle

^B Réplikat

Tableau V. Influence du régime sur l'activité amylasique spécifique du contenu intestinal. Tableau d'analyse de variance selon un plan hiérarchisé.

Source de variation	Somme des carrés	d.l.	Carrés moyens	F_{obs}	Prob($F > F_{obs}$)
Régime	485,58	5	97,11	3,438 ^B	0,037
Réplikat	338,93	12	28,24	110,67 ^R	0,000
Résiduelle	9,19	36	0,2552		
Total	833,70	53			

Source d'erreur considérée pour le calcul de F :

^R Résiduelle

^B Réplikat

Tableau VI. Influence du régime sur l'activité trypsique spécifique du contenu intestinal. Tableau d'analyse de variance selon un plan hiérarchisé.

Source de variation	Somme des carrés	d.l.	Carrés moyens	F_{obs}	Prob($F > F_{obs}$)
Régime	1,544	5	0,309	0,863	0,533
Résiduelle	4,295	12	0,358		
Total	5,839	17			

Tableau VII. Influence du régime sur le rapport des activités amylasique et trypsique du contenu intestinal. Tableau d'analyse de variance à un facteur.

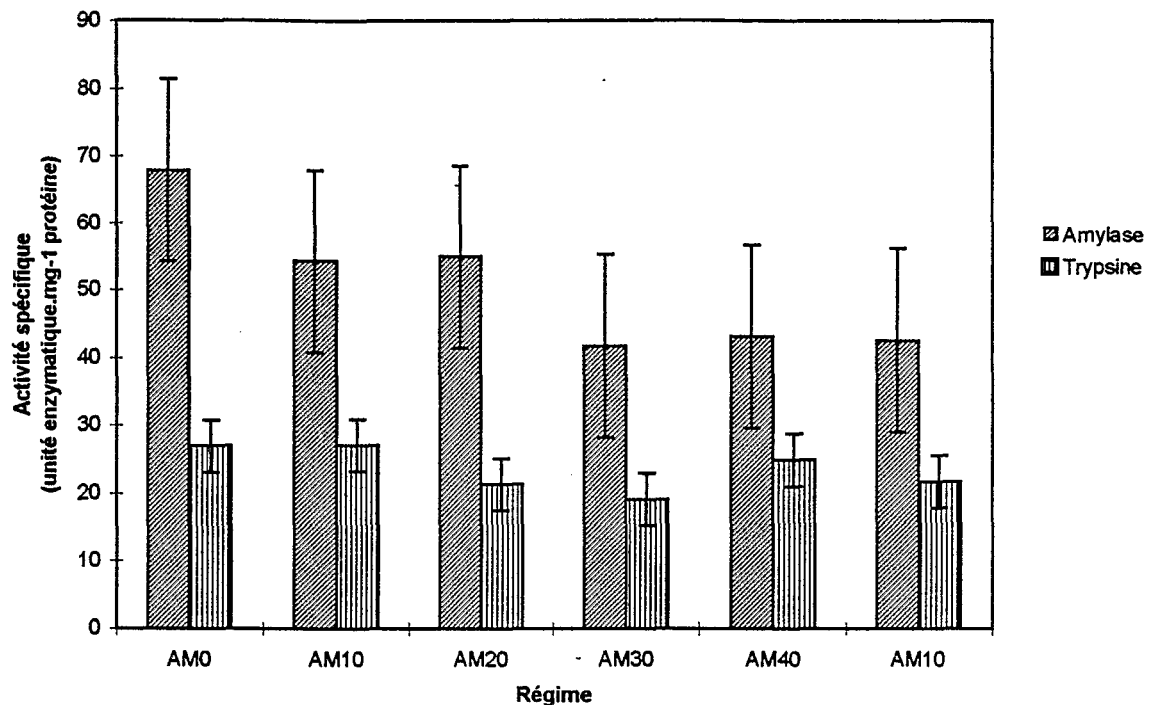


Figure 6. Influence du régime sur l'activité spécifique amylasique et trypsique du contenu intestinal. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance des moyennes ($\alpha=0,05$).

Discussion

Caractéristiques de l'activité amylasique

Le pH optimal de l'activité amylasique apparaît légèrement plus élevé, 6,9 au lieu de 6, que celui observé pour les amylases purifiées de l'intestin d'*Oreochromis niloticus* (Yamada *et al.*, 1991). Hormis un possible effet lié à la nature des tampons utilisés, McIlvaine et TrisHCl pour l'équipe de Yamada, ou à la température d'incubation (40°C), aucun élément ne permet de conclure à une différence interspécifique pour l'influence du pH. Les valeurs de température optimale sont par contre tout à fait comparable, 40 °C pour *Oreochromis niloticus*. Une influence similaire de la température a été retrouvée chez d'autres espèces de poissons y compris d'eau froide (Kuz'mina & Morozova, 1977). La forte diminution de l'activité à des températures de l'ordre de 10-15 °C pourrait expliquer une différence d'utilisation de l'amidon entre ces poissons et des poissons d'eau froide. Cependant les valeurs de coefficient d'utilisation digestive apparent (CUDA) obtenu chez la truite avec des amidons cuits sont du même ordre que pour un tilapia (Bergot & Brecque, 1983; NRC, 1993).

Le Km de l'échantillon brut pour l'activité de (ou des) amylase(s) de *Sarotherodon melanotheron* sur l'amidon est du même ordre de grandeur que celui obtenu par l'équipe de Yamada pour *Oreochromis niloticus* (0,48 et 0,67 g.L⁻¹). Par contre, ces auteurs indiquent une spécificité plus faible des amylases d'*Oreochromis niloticus* pour l'amylose que pour l'amidon soluble. Ceci est en opposition avec les présents résultats de Km et de Vmax obtenus pour *Sarotherodon melanotheron*, qui indiquent une plus grande affinité et une plus grande activité pour l'amylose.

Les résultats d'électrophorèse indiquent la présence, dans les conditions physiologiques, de plusieurs complexes amylasiques dans le contenu de l'intestin. Ces protéines de hauts poids moléculaires peuvent être partiellement dégradées en sous unité d'un poids équivalent à celui des amylases purifiées (Yamada, 1991). Il peut donc s'agir soit de copolymères d'amylases, soit de polymères d'amylases et d'autres molécules. Une étude plus précise de la structure de « l'amylase » dans les conditions physiologiques est souhaitable, l'appariement de plusieurs sous unités, qui constituent le potentiel global d'activité en macro-unités, pouvant intervenir sur le rendement général d'hydrolyse de grosse molécule comme celles de l'amidon.

Suivi postprandial

Il n'existe pas d'activité amylasique au niveau de l'estomac. Aucune activité importante n'a été retrouvée dans les tissus constituant l'intestin. Les cellules du tissu pancréatique diffus ne semblent donc pas être intimement liées à la paroi de l'intestin. Elles doivent avoir été écartées au moment de la dissection. La majeure partie de ce tissu doit donc être localiser dans le foie ou dans le tissu adipeux. L'analyse du tissu adipeux et du foie a pu être faite sur une espèce voisine, le tilapia rouge (hybride pour majeure partie issu d'*Oreochromis hornorum* X *O. mossambicus*). Des activités spécifiques amylasiques substantielles ont été trouvées, 25,08 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ dans le tissu adipeux et 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ dans le foie. Ces résultats rejoignent les observations faites par Keddis (1956) et Moriarty (1973). Si l'isolement du tissu pancréatique au sein du foie peut être hasardeux, l'utilisation de l'extrait obtenu à partir du tissu adipeux serait plus adéquat, excepté pour une étude des lipases.

Sécrétion et régime

Contrairement aux résultats obtenus chez les Vertébrés supérieurs (Puigserver *et al.*, 1986), aucune influence bien nette du régime sur les activités dans le tube digestif n'a été observée. D'une part, le faible temps d'adaptation au régime retenu pourrait en être la cause. Chez le rat,

une période d'adaptation de quelques jours est nécessaire pour l'établissement d'un nouveau niveau de sécrétion. Cependant, l'étude des coefficients d'utilisation digestive apparents montre une adaptation rapide du poisson à un nouveau régime, dans les 24 heures (Moreau, 1991). Les deux observations peuvent toutefois ne pas être nécessairement liées. D'autre part, les analyses ont été réalisées sur des échantillons prélevés dans la lumière intestinal alors que chez le rat, les prélèvements sont fait au niveau du canal deWirsung. Chez le poisson, le « suc » étudié est donc un mélange des sécrétions pancréatiques et intestinales, et du bol alimentaire en cours de digestion. Les résultats peuvent donc être altérés à la fois par le volume du repas et par la teneur en protéine du repas. Le choix d'un niveau d'ingestion protéique constant permet, sous réserve de l'ingestion total des rations, d'avoir une quantité totale de protéines indépendante du volume du bol. Les activités spécifiques devraient donc être comparables. De plus, le volume du repas et donc celui du bol ne devrait pas avoir d'effet sur le rapport entre les activités « amylase » et « trypsine ». L'absence observée d'effet du régime sur les enzymes digestives peut donc avoir plusieurs origines : soit le temps d'adaptation est plus long que 48 heures et indépendant de l'adaptation en terme d'utilisation digestive; soit le niveau de sécrétion est lié à la quantité globale de protéine présente dans le tube, en ce qui concerne la « trypsine »; soit le niveau de sécrétion des enzymes est le reflet des besoins spécifiques du poisson en réponse à la quantité de nutriments présents. Dans ce dernier cas, les coefficients d'utilisation digestive devraient dépendre à la fois de la quantité et de la valeur alimentaire de la ration ingérée. Si une diminution sensible de la digestibilité est observée avec des aliments très riches en glucides utilisables par le poisson, ce dernier point reste encore controversé (Steffens, 1989).

Conclusion

Une activité amylasique a pu être mise en évidence dans l'intestin de *Sarotherodon melanotheron*. Les enzymes responsables de cette activité sont plus actifs sur les chaînes linéaires d'amylose que sur l'amidon. La structure globale des éléments responsables, dans les conditions physiologiques, de cette activité reste à préciser. Elle peut être liée aux différences d'activité observées sur l'amylose ou l'amidon.

Le site de sécrétion de cette « amylase » est extérieur à l'enveloppe que constitue le tube digestif dans son ensemble. Le tissu pancréatique diffus doit pour l'essentiel être reparti dans le tissu adipeux qui entoure l'intestin.

A apport protéique équivalent, la nature du régime ne semble pas avoir d'influence sur les niveaux relatifs des activités amylasiques et « tryptique » dans la lumière intestinal. Cette observation rentre en contradiction avec les phénomènes d'adaptation généralement observés chez les Vertébrés supérieurs.

Des études complémentaires sont indispensables pour la confirmation et pour une analyse plus précises de ces résultats.

Bibliographie

- A. H. AL HUSSAINI and A. A. KHOLY. 1953. On the functional morphology of the alimentary tract of some omnivorous teleost fish. *Proc. Egypt. Acad. Sci.*, **9** : 17-39.
- F. BERGOT and J. BRECQUE. 1983. Digestibility of starch by rainbow trout : effects of the physical state of starch and of the intake level. *Aquaculture*, **34** : 203-212.
- M. M. BRADFORD. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72** : 248-254.
- U. BULNHEIM. 1974. Untersuchungen zur Amylase- und Proteaseaktivität im Darminhalt sowie des Blutzucker- und Leberglykogengehaltes beim Aal (*Anguilla anguilla* L.) in Abhängigkeit von der Futterqualität. Ph.D. Dissertation, Univ. Rostock, 97 p.
- W. G. COCHRAN and G. M. COX. 1957. Experimental designs. 2nd edition. John Wiley & Sons, New York.
- A. COCKSON and D. BOURNE. 1972. Enzymes in the digestive tract of two species of euryhaline fish. *Comp. Bioch. Physiol.*, **41A** : 715- 718.

- P. V. CREACH. 1963. Les enzymes protéolytiques des poissons. *Ann. Nutr. et Alim.*, 17 : A375-A471.
- K. p. DHAGE and O. M. M. MOHAMED. 1977. Study of amylase activity in mudskipper *Periophthalmus koelreuteri* (Pallas). *Indian J. Fish.*, 24 1-2 : 129-134.
- S. DOWDY and S. WEARDEN. 1983. Statistics for research. John Wiley & Sons, New York.
- R. EISENTHAL and M. J. DANSON. 1993. Enzyme Assays. A Practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- R. FALGE. 1973. Untersuchungen von Enzymaktivitäten im Darminhalt der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) nach Fütterung mit natürlicher und halbsynthetischer Nahrung. Ph.D. Dissertation, Univ. Rostock,
- R. FÄNGE and D. GROVE. 1979. Digestion in Fish physiology. VIII. Academic Press, New York, 786 p. : 161-260.
- G. R. FISH. 1960. The comparative activity of some digestive enzymes in the alimentary canal of tilapia and perch. *Hydrobiologia*, 15 1-2 : 161-178.
- P. p. GRASSET. 1958. Traité de zoologie. XIII. Agnathes et Poissons. Masson, Paris.
- J. M. GROPP and A. G. J. TACON (Eds.) . 1994. Report of the EIFAC Workshop on methodology for the determination of nutrient requirements in fish, Eichenau, Germany, 29 June-1 July 1993. EIFAC/OP29.. F.A.O., Rome.
- R. HOFER and F. SCHIEMER. 1981. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. *Oecologia*, 48 : 342-345.
- B. G. KAPOOR, H. SMIT and I. A. VERIGHINA. 1975. The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. mar. Biol.*, 13 : 109-239.
- S. KAWAI and S. IKEDA. 1972. Studies on digestive enzymes of fishes. II. Effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in carp intestine. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 38 : 265-270.
- S. KAWAI and S. IKEDA. 1973. Studies on digestive enzymes of fishes. III. Development of the enzymes of rainbow trout after hatching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in juvenile stage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 39 : 819-823.

- M. N. KEDDIS. 1956. On the intestinal enzymes of *Tilapia nilotica* Boulenger. *Proc. Egypt. Acad. Sci.*, **12** : 21-37.
- V. V. KUZ'MINA and Y. N. MOROZOVA. 1977. The influence of temperature on the α -amylase activity in freshwater teleosts. *J. Ichthyol.*, **17** : 778-785.
- U. K. LAEMMLI. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** : 680-685.
- C. LEGER. 1981. Enzymologie digestive. I. La lipase pancréatique *in* Nutrition des Poissons. Actes du Colloque CNERNA. M. FONTAINE (Ed.). Editions du CNRS, Paris, 376 p. : 69-77.
- P. LUQUET and Y. MOREAU. 1989. Energy - protein management by some warmwater finfishes *in* Advances in tropical aquaculture. *Actes de Colloque*, **9**. AQUACOP, IFREMER., : 751-755.
- S. K. MOITRA and K. M. DAS. 1967. Influence of environment on the digestive enzymes of a fish, *Tilapia mossambica* (Peters). *Current Science*, **36** : 381-382.
- Y. MOREAU. 1988. Physiologie de la nutrition *in* Biologie et écologie des poissons d'eau douce africains. C. LEVEQUE, M. N. BRUTON and G. W. SSENTONGO (Eds.) Editions de l'ORSTOM, Paris, 508 p. : 137-152.
- Y. MOREAU. 1991. Méthode d'étude de la digestibilité chez *Oreochromis niloticus* : adaptation à un nouvel aliment et influence de l'heure de collectes des fèces. Application à la détermination des coefficients de digestibilité apparents de sous-produits agro-industriels disponibles en Côte d'Ivoire. *Presented at IIIth International Symposium on Tilapia Aquaculture* .
- Y. MOREAU. 1992. Utilization of carbohydrates as energy- substrates by the tilapia, *Sarotherodon melanotheron* . *Presented at Third Asian Fisheries Forum*.
- G. NAGASE. 1964. Contribution to the physiology of digestion in *Tilapia mossambica* Peters : digestive enzymes and the effects of diets on their activity. *Zeitsch. Vergl. Physiol.*, **49** : 270-284.
- F. NAGAYAMA and Y. SAITO. 1968. Distribution of several hydrolytic enzymes in fish. FAO/FL/EIFAC 68/SC II-8. FAO, Roma.
- N.R.C. 1993. Nutrients requirements of fish. National Academy Press, New York.

- B. R. OAKLEY and D. R. ., M. N. KIRSH. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **105** : 361-363.
- G. PERES. 1981. Enzymologie digestive. I. Les protéases - l'amylase - les enzymes chitinolytiques - les laminarinases *in* Nutrition des Poissons. Actes du Colloque CNERNA. M. FONTAINE (Ed.). Editions du CNRS, Paris, 376 p. : 55-67.
- A. PUIGSERVER, C. WICKLER and C. GAUCHER. 1986. Adaptation of pancreatic and intestinal hydrolases to dietary changes *in* Molecular and cellular basis of digestion. p. DESNUELLE, H. SJÖSTRÖM and O. NORÉN (Eds.). Elsevier, Amsterdam, 539 p. : 113-124.
- S. SHIMENO, D. C. MING and M. TAKEDA. 1993. Regulation of carbohydrate metabolism .16. Metabolic response to dietary carbohydrate to lipid ratios in *Oreochromis niloticus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59** 5 : 827-833.
- W. STEFFENS. 1989. Principles of fish nutrition. Ellis Horwood Ltd, Chichester
- A. A. A. UGWUMBA. 1993. Carbohydrases in the digestive tract of the african bony-tongue *Heterotis niloticus* (Pisces, Osteoglossidae). *Hydrobiologia*, **257** 2 : 95-100.
- W. UYS and T. HECHT. 1987. Assays on the digestive enzymes of sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces : Clariidae). *AQUACULTURE*, vol. **63** 1-4 : 301-313.
- R. p. WILSON and W. E. POE. 1985. Apparent digestibility of protein and energy in feed ingredients for channel catfish. *Progressive Fish Culturist*, **47** : 154-158.
- A. YAMADA, K. TAKANO and I. KAMOI. 1991. Purification and properties of protease from tilapia intestine. *Nippon Suisan Gakkaishi - Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **57** 8 : 1551-1557.
- A. YAMADA, K. TAKANO and I. KAMOI. 1992. Purification and properties of alpha-glucosidases from tilapia intestine. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58** 11 : 2189-2195.
- A. YAMADA, K. TAKANO and I. KAMOI. 1993. Purification and properties of protease from tilapia stomach. *Nippon Suisan Gakkaishi - Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **59** 11 : 1903-1908.

S. YAMANE. 1973. Localization of amylase activity in the digestive organs of the Mozambique mouthbrooder, *Tilapia mossambica*, and bluegill, *Lepomis macrochirus*, determined by a starch substrate film method . *Nippon Suisan Gakkaishi*, **39** 6 : 595- 603..