

对虾消化酶的研究*

刘玉梅 朱谨钊

(中国科学院海洋研究所)

我国对虾资源较丰富,但由于长期过度捕捞和其它环境因素的影响,导致资源衰退。为了满足国内外市场的需要,目前我国正在大力发展对虾的人工养殖事业。人工饵料是现代化养殖事业中重要的一环,解决好这个问题,就能大大促进人工养殖。对虾消化酶的研究可以为人工饵料的合理配方提供依据;因为对虾在不同生长发育阶段,对其食物有不同的需求,而消化酶的变化,在一定程度上可以反映它的这种生理状况。比较理想的人工饵料,应该是在不同的生长发育阶段有其不同成分的配比。

国内外对于对虾消化酶的研究报道不多;日本学者黑木暘曾做过日本对虾 *Penaeus Japonicus* 稚虾期的消化酶工作。Maugle、弟子修丸等^[7]曾对日本对虾消化酶的特性及饵料对它的影响做过研究。而中国对虾 *Penaeus orientalis* 消化酶方面的研究尚未见报道。

本文对人工养殖的中国对虾的几种消化酶在不同生长期的变化作了比较研究。

一、材料和方法

(一) 材料

对虾 *Penaeus orientalis* 取自青岛市黄岛区港头陈养殖场。饵料为鱼粉、豆饼、麸皮、杂鱼、面粉等,属于杂食性饵料。

根据对虾的生长期,分三个阶段取样。

第一阶段:稚虾期,放苗后20天左右,体长5.5厘米¹⁾,体重0.8—1.0克²⁾。取消化器官低温(-17°C)保存待用。

第二阶段:生长中期,放苗后50天左右。体长10.6厘米,体重7.4克。分别取肝脏、胃、肠低温保存待测活力。

第三阶段:收获期,放苗后110天左右。体长13.8厘米,体重12.7克。取样与保存方法同

中期。样品在低温下(-17°C)保存半月左右,酶活力无变化。

(二) 样品制备

1. 脂肪酶:分别取对虾肝脏、胃、肠置冰浴中剪碎,加入5倍体积(V/W)预冷的0.025M pH 7.5磷酸缓冲液,在玻璃匀浆器中匀浆,匀浆液在日制TOMY-RD 20Ⅲ型冷冻离心机,0—2°C,4,000rpm,离心20分钟,弃去沉淀,上清液作活力测定。

2. 蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶:提取液改用5—6倍预冷的重蒸水,4,000rpm离心10分钟,弃去沉淀,上清液于9,000rpm离心20分钟,弃沉淀,上清液用作活力测定。

(三) 活力测定

1. 胃蛋白酶与类胰蛋白酶^{[2][6]}:测定胃蛋白酶活力时,加入0.5%酪素2毫升,0.04M EDTA-Na₂0.1毫升,0.2M柠檬酸缓冲液(pH3.0)0.4毫升,酶液0.4毫升,加入重蒸水使总体积为3.5毫升,混匀,置于37°C水浴中反应15分钟,然后加入30%三氯醋酸1毫升,离心,取上清液,用福林-酚试剂测酪氨酸的生成。

在37°C下,每分钟水解酪素,产生1微克酪氨酸定为一个酶活力单位。

类胰蛋白酶活力的测定,基本上同胃蛋白酶,所用缓冲液改为0.05M硼砂-氢氧化钠缓冲液(pH9.8)。酶液改为0.1毫升。

2. 淀粉酶与纤维素酶^[2]:试管中加入0.2M醋酸缓冲液(pH 4.6)2毫升,2%淀粉液5毫升,酶液0.4毫升,加入重蒸水使总体积为10毫升,于40°C水浴中糖化30分钟,取出后立即放沸水中煮沸10分钟,所得糖化液按

* 中国科学院海洋研究所调查报告第1032号。本实验用的对虾由李春光同志帮助取样,特此致谢

1), 2) 体长、体重均为平均值,下同。

Somogyi-Nelson方法测糖^[5]。

以每分钟催化淀粉水解生成1微克葡萄糖的酶量定为一个活力单位。

纤维素酶活力测定基本上按测淀粉酶的方法，只是底物改用0.5%羧甲基纤维素钠。

3. 脂肪酶^[2]：三角烧瓶中加入0.025M磷酸缓冲液(pH7.5)5毫升，25%聚乙烯醇橄榄油乳化液4毫升，置于40℃水浴中预热5分钟，然后加入酶液，保温30分钟，立即加入95%乙醇15毫升，终止酶反应。用1%麝香草酚酞做指示剂，标准氢氧化钠滴定。

活力以国际单位表示，即在一定条件下，脂肪酶水解脂肪，每分钟产生1微克分子脂肪酸的酶量定为一个国际单位。

4. 酶液的蛋白浓度：用双缩脲法测定^[1]，以牛血清白蛋白作标准。

(四) 酯酶凝胶电泳

按张树政的方法^[3]。分离胶浓度为7%(W/V)，Tris-HCl缓冲液(pH8.7)，浓缩胶

3%(W/V)，Tris-HCl缓冲液(pH6.7)，电极缓冲液为Tris-甘氨酸缓冲液(pH8.3)。电泳后取出胶柱进行染色^[4]。

(五) 化学试剂

酪蛋白，E. Merck公司产品；淀粉为上海试剂厂产品，分析纯；聚乙烯醇PVA-124为中国医药公司上海化学试剂采购供应站供应，橄榄油是上海试剂二厂产品，化学纯；羧甲基纤维素钠购自上海化学试剂站，国产分装；其它试剂均为分析纯，试剂均用重蒸水配制。

二、结果和讨论

鉴于对虾在不同发育阶段，对饵料的需求不同，以及各消化器官消化吸收等情况也不同，因此我们把人工养殖的对虾按发育期分三个阶段取样，做了对虾消化器官不同部位几种消化酶的活性变化比较，其结果如下表。

因为各消化酶所水解的底物不一样，我们根据表内结果，将水解相似底物的酶活性分组

对虾消化器官不同部位消化酶的活性比较表

生长期	体长(厘米)	体重(克)	器官	胃蛋白酶	类胰蛋白酶	淀粉酶	纤维素酶	脂肪酶
稚虾期(放苗后20天)	5.5	0.88	消化器	0.89±0.14	14.73±2.19	504±64.5	24±3.2	0.08±0
			肌肉	0.06±0.007	2.48±0.7	59±13	4.8±0.8	0
中期(放苗后50天)	10.6	7.4	肝	2.59±0.52	56.05±12	1427±196	22±0	0.37±0.06
			胃	2.91±0.97	31.34±2.3	519±12	32.5±7.8	0.34±0.08
			肠	0.92±0.27	14.21±3.6	398±90	7.5±0.7	0.15±0.02
收获期(放苗后110天)	13.8	12.7	肝	5.59±0.14	62.05±4.45	1322±149	58	0.49±0.11
			胃	2.74±0.58	9.28±0.66	1042±108	66	0.15±0.01
			肠	1.00±0.27	9.53±0.83	289±30	12	0.11±0.02

注：酶的活力以比活力表示，即：活力单位/毫克蛋白。

表中数值以三次实验数据的标准差表示。

作比较。

1. 对虾不同生长期，消化器官不同部位胃蛋白酶与类胰蛋白酶的活性变化表示于图1及图2。

从图1看出，对虾消化器官的胃蛋白酶活性随着生长发育逐渐增大，到收获期，胃部略有减弱。消化器官的不同部位酶活性也有差异，肝脏>胃>肠。这个结果与黑木暘^[6]所

作的日本对虾的胃蛋白酶结果相似。

图2表明，对虾消化器官的类胰蛋白酶活性，从稚虾期开始随着生长发育增大，到了收获期，胃部类胰蛋白酶活性有所减弱。而消化器官不同部位类胰蛋白酶活性与胃蛋白酶相似，也是肝脏>胃>肠。

胃蛋白酶与类胰蛋白酶之间的活性，总的看来，类胰蛋白酶活力很强，比胃蛋白酶活力

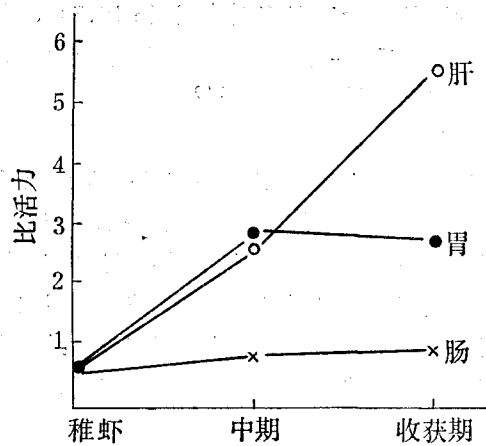


图1 对虾不同生长期, 消化器官的不同部位胃蛋白酶活性变化
○—○肝; ●—●胃; ×—×肠。

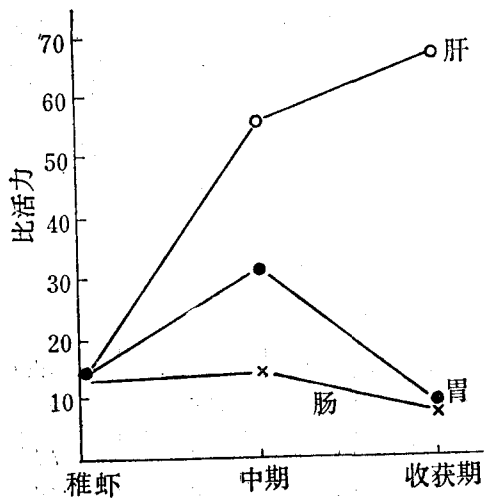


图2 对虾不同生长期, 消化器官的不同部位类胰蛋白酶活性变化
○—○肝; ●—●胃; ×—×肠。

大得多。仅以肝脏为例(图3), 稚虾期¹⁾, 胃蛋白酶活力是0.89单位/毫克蛋白, 类胰蛋白酶活力是14.73单位/毫克蛋白; 类胰蛋白酶活力是胃蛋白酶的14倍左右。中期: 类胰蛋白酶活力是胃蛋白酶的50倍左右。收获期: 类胰蛋白酶活力是胃蛋白酶的60倍左右。这一现象说明, 类胰蛋白酶对于蛋白质的消化分解要比胃蛋白酶强。川合真一郎^[6]对虹鳟鱼的消化酶研究, 也提出了类胰蛋白酶活性比胃蛋白酶活性大。我们的结果与川合真一郎有相似之处。

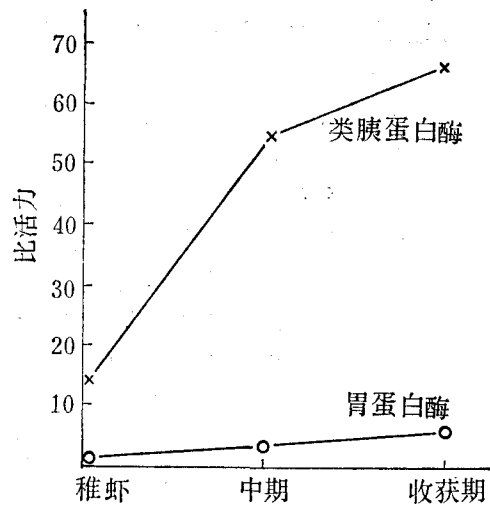


图3 对虾不同生长期, 肝脏胃蛋白酶活性与类胰蛋白酶活性比较
×—×类胰蛋白酶; ○—○胃蛋白酶。

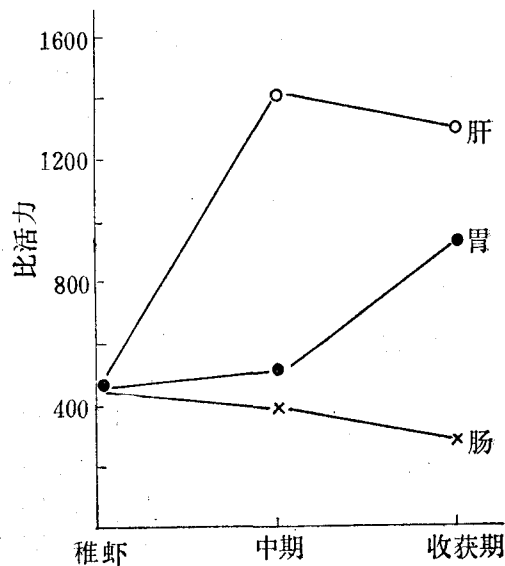


图4 对虾不同生长期, 消化器官不同部位淀粉酶的活性变化
○—○肝; ●—●胃; ×—×肠。

2. 对虾不同生长期, 消化器官的不同部位淀粉酶与纤维素酶的活性变化如图4, 5所示。

从图4可以看出, 对虾消化器官的不同部位的淀粉酶活性是有差异的, 其活力是肝脏>

1) 稚虾期为整个消化器官, 下同。

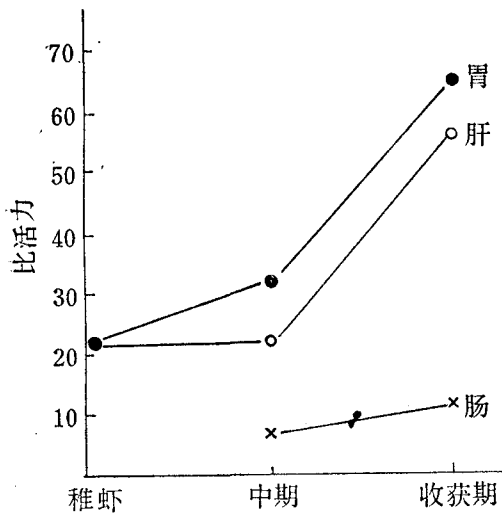


图5 对虾不同生长期，消化器官不同部位纤维素酶活性变化
○—○肝；●—●胃；×—×肠。

胃>肠。

淀粉酶的活性，肝脏、肠从稚虾期到中期是逐渐增大，到收获期有所减低；而胃部淀粉酶活性随着生长发育一直增强。北御门^[8]做的虹鳟鱼消化道淀粉酶活性，也有类似结果。

黑木场^[6]在测定日本对虾稚虾的消化酶

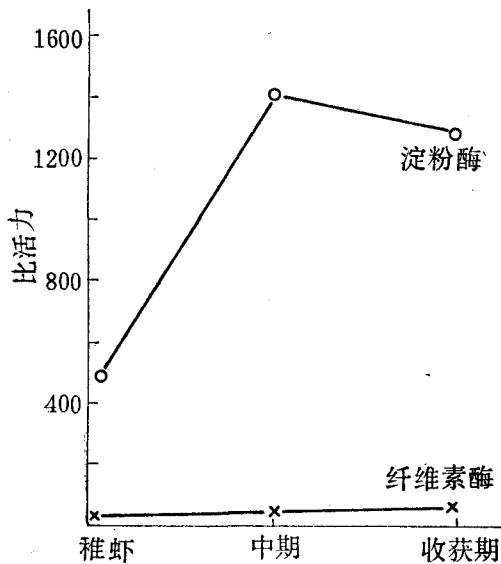


图6 对虾不同生长期，肝脏淀粉酶活性与纤维素酶活性比较
○—○淀粉酶；×—×纤维素酶。

时，用糖化法检不出淀粉酶的活性，而我们用糖化法测定稚虾期的中国对虾，淀粉酶的活性是很高的。

从图5可以看出，对虾纤维素酶在肝脏、胃、肠内活性很低。纤维素酶与其它几种酶活性的不同点是胃>肝脏>肠。

淀粉酶的活性比纤维素酶大得多。现以肝脏为例(图6)，稚虾期淀粉酶活力是纤维素酶的500倍左右，到了中期和收获期，分别为1400倍和1300倍左右。这些结果表明，在对虾的成长过程中，对于植物性饵料的消化分解，主要是依靠淀粉酶的作用。由于对虾的淀粉酶活性很高，并且随着生长发育而增强，因此在稚虾期以后，是否可在饵料的配比上适当增加富有淀粉的植物性饵料，值得作进一步探索。

3. 对虾不同生长期，消化器官的不同部

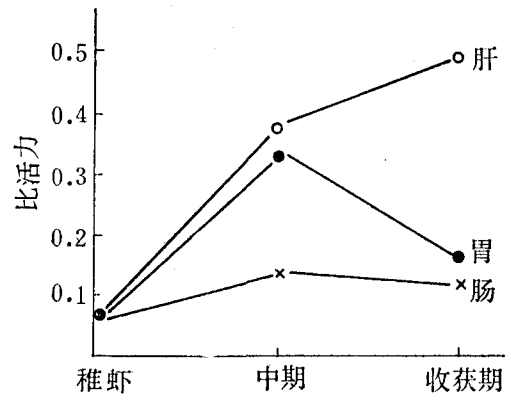


图7 对虾不同生长期，消化器官不同部位脂肪酶的活性变化
○—○肝；●—●胃；×—×肠。

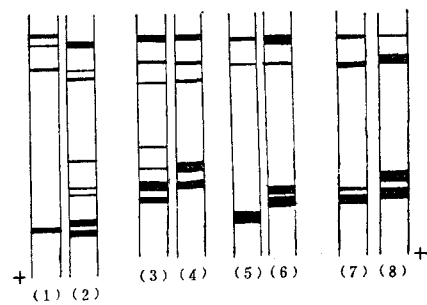


图8 对虾不同生长期，消化器官不同部位酯酶聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱(模拟型)

位脂肪酶的活性变化见图7。在对虾消化器官各部位,总的说来,脂肪酶的活性是很低的,各生长阶段变化也不大。黑木暘^[6]在测定日本对虾稚虾的脂肪酶时,也发现脂肪酶的活力低。

4. 我们分别对对虾不同生长期,消化器官不同部位的酶制剂做了酯酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳,得到图8所示结果。

由图8看出,对虾不同生长期酯酶的同功酶有变化,不同部位也有差异。稚虾期的肌肉出现4条带,消化器官为8条;在生长中期,肝脏部份有7条带,收获期呈现5条;胃的酯酶,生长中期3条带,收获期4条;肠在生长中期4条带,收获期也是4条。但是,收获期第2条带比生长中期第2条带宽。上述同功酶的变化是否与不同时期摄饵情况有关,尚待进一步证实。

综合上述结果可以看出,在前两组酶中,除了纤维素酶之外,各种消化酶的活性均是肝脏>胃>肠;并随着个体生长发育而增大;这也说明了,对虾的生长发育与摄食后的消化吸收的增加有关,因此消化酶的变化,可以在一定程度上反映出生物体对饵料的消化能力。

另外,我们发现在对虾的消化器官内,淀粉酶的活力相当高,其活力远比我们所预想的高的多,看来也许可以把含有富淀粉性的饵料用作对虾的饵料成分之一来考虑。

生物体是一个错综复杂的机体,与环境各种因子有着密切的关系,今后还须进一步深入地从事多因子方面来探讨研究。

参 考 文 献

- (1) 潘家秀等, 1962. 蛋白质化学研究技术。科学出版社, 第12页。
- (2) 中山大学生物系生化微生物学教研室编, 1979. 生化技术导论。人民教育出版社, 第53, 58页。
- (3) 张树政等, 1973. 化学通报1: 34—36。
- (4) Flowerdew, M. W. and D. J. Crisp., 1975. Marine Biology 33 (1): 33—39.
- (5) Nelson N., 1944. J. Biol. Chem. 153, 375.
- (6) 川合真一郎, 1975. 水产学シリーズ8 稚鱼の摄饵と发育。日本水产学会编, 恒星社厚生阁, 东京。pp. 30—44。
- (7) Maugle, P. D, 弟子丸修, 片山辉久, K. L. Simpson, 1982. 日本水产学会志。48 (12): 1753—1764。
- (8) 尾崎久雄, 1978. 鱼类生理学 讲座 4。绿书房, 东京。pp. 415—416。

STUDIES ON DIGESTIVE ENZYMES OF PRAWN COMPARATIVE STUDIES ON THE ACTIVITIES OF DIGESTIVE ENZYMES OF CULTURED PRAWN (*Penaeus orientalis* Kishinouye) FOUND IN HUANGDAO ISLAND

Liu Yumei and Zhu Jinzhao

(Institute of Oceanology, Academia Sinica)

Abstract

The activities of trypsin-like enzyme, pepsin and amylase were different in different digestive organs; liver>gastric>intestines. Activity of trypsin-like enzyme was about 14~60-fold higher than that of pepsin in the same tissue of juvenile and adult liver. The activity of amylase was about 500~1400-fold higher than that of cellulase. The activity of lipase was fairly low.

The activities of trypsin-like enzyme, pepsin and amylase increased along with growth, but the activity of lipase did not change very much.