

## 虾类及甲壳动物消化酶研究的现状

于书坤 张树荣

(中国科学院海洋研究所)

近年来,在虾类捕获量不断降低,而人们需求不断增加的情况下,许多有经济价值的甲壳动物成了重要的养殖对象。如中国对虾、日本对虾、印度对虾、墨吉对虾、美国龙虾、三疣梭子蟹等。目前这些养殖种类的育苗及养成技术已经基本解决。饵料问题的矛盾却显得很突出,如果饵料的研究得以突破,将会给养虾业开创一个完全崭新的局面。要解决虾类的饵料,首先要了解虾类饵料中究竟应包括哪些营养物质,虾类能消化那些物质,消化能力的大小,即要知道虾类有那些消化酶,消化酶的活力及消化酶对饵料组成的适应能力。有了这些数据,才有可能配制一种成本低,促使生长效果好的饵料。

目前国际上对脊椎动物,特别是哺乳动物的消化酶已经研究得比较清楚。相比之下,无脊椎动物消化酶的研究却比较少。Vonk (1960)认为,甲壳动物消化液中存在蛋白水解酶、脂肪酶、淀粉酶、麦芽糖酶和蔗糖酶。关于这些酶的特征描述主要根据粗提物的最适pH和最适温度。但由于实验条件不同,不同作者的结果很难比较。又因对实验控制不够严格,上述酶的存在也受到怀疑,因为这些酶的活性完全有可能来自肠道中共生的微生物,摄食的饵料生物或不纯的药品。近二十年来,由于比较生物化学的发展,特别是近十年来随着甲壳动物养殖研究的兴起,甲壳动物消化酶日益受到人们的重视。目前,已有不少消化酶被分离提纯并做过详细研究。

### 一、蛋白水解酶

早期有关甲壳动物蛋白酶的研究着重于粗提物及其非专一性的分析。但是用小的合成肽和脂来证明甲壳动物与哺乳动物有相似的消化酶是不妥当的,因为这两类动物的消化系统明显不同。有人认为,在甲壳动物中不存在胰凝乳蛋白酶。且不论这种断言是否正确,我们必须记住:甲壳动物维持消化酶活性和稳定性所需的条件可能完全不同于脊椎动物中相应的酶。另外,甲壳动物这一类群的每一个种各占有不同的生态位置,它们的生活环境和食性各异,因此不同种类之

间,消化酶的种类和活性可能差别很大。

#### 1. 内肽酶

胰蛋白酶存在于若干种甲壳动物中,这种胰蛋白酶与哺乳动物胰蛋白酶有什么差别还不太清楚。胰蛋白酶的重要特征是能水解由碱性氨基酸(赖氨酸和精氨酸)羧基形成的肽键,它的活性中心为丝氨酸和组氨酸,分子量为20 000到25 000。从*Astacus*, *Cambarus* (河虾属)和*Panaeus* (对虾属)中分离出来的胰蛋白酶的最适pH值为7—9。其分子量及对抑制剂的敏感性与来源于哺乳动物的胰蛋白酶非常相似。但甲壳动物胰蛋白酶的等电点偏酸性,因此它在酸性溶液(pH<6.0)中不稳定。不需要Ca<sup>2+</sup>来维持稳定性,本身具抗自溶能力。Zwilling等(1969)证明,从*Astacus*分离得到的胰蛋白酶不仅能和哺乳动物来源的胰蛋白酶一样,水解同一合成底物,而且能在同一位置水解氧化了的胰岛素B链。这一特征说明了用结构已知的多肽来研究酶专一性的重要性。

另一点不同的是,甲壳动物的胰蛋白酶能水解天然蛋白。Eisen等(1973)从*Uca*分离得到的酶能水解未变性的胶原蛋白,而且显示出相似于胰蛋白酶和胰乳蛋白酶的活性。可惜他们没有用胰岛素测其专一性。

上述情况表明,甲壳动物的消化腺将分泌一种蛋白水解酶,其性质与来源于哺乳动物的胰蛋白酶相似。甲壳动物和脊椎动物丝氨酸蛋白酶的氨基酸组成的比较见下表。

甲壳动物体内的蛋白酶不止胰蛋白酶一种。据报道,在*Homarus*中有7种蛋白酶,分子量从12 500到50 000,最适pH有的在4.0左右,有的在8.0左右。Zwilling等(1969)发现,在*Astacus*中有一种小分子量(11 000)的蛋白酶,其专一性较差,但不作用于胰蛋白酶的专一性底物。在*Orconectes virilis*中也找到了一种专一性差,分子量为12 000的蛋白酶。这两种小分子量的蛋白酶可能属于同一种酶,它们之间的微小差异可能是由不同的提取过程产生的。

有人认为,甲壳动物和其它无脊椎动物一样,不

甲壳动物来源和其它动物来源的丝氨酸蛋白酶氨基酸组成比较表

氨基酸	淡水小龙虾	对虾	蟹	鲨鱼	牛
Lys	5	5	2	5	14
His	5	5	5	8	3
Try	3	3	2	5	4
Arg	2	3	5	7	2
Asp	30	30	29	24	22
Thr	15	10	24	7	10
Ser	17	24	17	17	33
Glu	21	24	13	16	14
Pro	10	11	12	10	9
Gly	28	28	28	28	25
Ala	16	16	21	16	14
Cys	6	8	8	12	12
Val	18	18	20	17	1
Met	2	2	3	8	2
Ile	15	14	17	14	15
Leu	16	10	13	15	14
Tyr	11	10	8	12	10
Phe	7	6	8	1	3
合计	227	227	235	222	223

存在胃蛋白酶，专一性低的小分子蛋白酶可能起着胃蛋白酶的作用。

胰凝乳蛋白酶是否在甲壳动物中存在，不同作者得到不同的结果。Devillez未能在*Orconectes virilis*消化液中测到此酶的活性。我们用同样的方法在中国对胰肝脏提取物中测到了比胰蛋白酶活性低得多的胰凝乳蛋白酶活性，而Brun等从*Cancer irroratus*中分离出了 $\alpha$ -胰乳蛋白酶。

## 2. 外肽酶

合成底物和粗提物的研究已经证实甲壳动物体内存在着各种肽酶。Kleine用凝胶过滤法从*Astacus astacus*和*Orconectes limosus*前肠液中和消化液中分离出了羧肽酶A、芳胺酶和一个二肽酶。他还发现从消化腺分离得到的羧肽酶比从前肠液中分离得到的羧肽酶分子量要大。Gate等从*Penaeus setiferus*中分离出了羧肽酶A和羧肽酶B，并对它们的性质做了讨论。而Devillez在*Orconectes virilis*中只测到了专一性低的羧肽酶活性，即它既作用于羧肽酶A专一的合成底物又作用于羧肽酶B专一的合成底物。关于

羧肽酶在甲壳动物中的分布及其性质还有待于进一步研究。

## 8. 酶原

迄今为止，还未在甲壳动物体内发现蛋白酶原。据此有人认为甲壳动物体内无酶原存在。如果真是如此，分泌细胞又如何保护自己而免遭蛋白酶的破坏呢？从Uca分离出来的胺酶的N端常常是缬氨酸或异亮氨酸。因此，即使甲壳动物体内存在着酶原，其激活机制也可能不同于脊椎动物。直到1970年，普遍还认为无脊椎动物体内不存在酶原。但后来，Camacho等首先从海星体内发现酶原。有人由此推断甲壳动物中也存在着酶原，但容易在制备过程中被迅速激活。关于甲壳动物蛋白酶的合成、贮存以及分泌机制还有待于进一步研究。

## 二、脂肪酶

在甲壳动物中，脂肪水解酶的研究远不如蛋白水解酶受人注意。据报道有若干种甲壳动物含有脂酶和酯酶。从美国龙虾*Homarus americanus*前肠液中分离纯化的脂酶分子量为43 000，和猪胰脂酶相近，最适pH在7左右，对三油酸甘油酯的作用也类似于脊椎动物来源的胰脂酶。它专一地水解甘油三酯的 $\alpha$ -键，产生 $\alpha$ 、 $\beta$ -甘油二酯和 $\beta$ -甘油一酯，同时还产生少量的 $\alpha$ 、 $\alpha'$ -甘油二酯和 $\alpha$ -甘油一酯。不过，目前还很难确定它们是酶反应的产物还是自发的异构作用。蟹(*Cancer pagurus*)能合成脂肪酰肌氨酰牛磺酸并分泌到前肠液中协助脂肪的消化和吸收。在*Astacus leptodactylus*中也发现了脂肪酰牛磺酸和由羧脯氨酸与牛磺酸或其它氨基酸所形成的脂肪酰二肽。它们都属于乳化剂。由于它们的存在，胆固醇和卵磷脂微粒容易形成，从而促进脂的消化和吸收。

## 三、糖类水解酶

在甲壳动物消化液和消化腺体中，已经找到19种左右糖酶。但是对它们进行详细研究的报道却很少。关于糖酶的专一性，一般认为，一些糖苷酶专一性低，主要取决于糖苷基的性质和键的类型( $\alpha$ 或者 $\beta$ )，另一些糖苷酶的专一性高，它与糖苷配基结合的基因有关。因此，用各种不同的底物和粗指物一起温育测得的糖苷酶活性，不一定说明这些酶在甲壳动物中的确都存在，因为水解二糖和寡糖的糖苷酶的专一性比糖内切酶的专一性差得多。

### 1. $\alpha$ -淀粉酶

实验表明， $\alpha$ -淀粉酶广泛存在于甲壳动物中。从

美国龙虾前肠液分离得到的 $\alpha$ -淀粉酶占前肠液总蛋白量的2%，最适pH为5.2，分子量为41 000， $\text{Cl}^-$ 有激活作用，这些性质都类似于其它生物来源的 $\alpha$ -淀粉酶。从*Orconectes virilis*及等足类*Asellus aguaticus*也分离得到了 $\alpha$ -淀粉酶。但是，甲壳动物的 $\alpha$ -淀粉酶的作用机理还不清楚。

淀粉和糖元的完全消化还需要另外两种类型的酶，即脱支酶（寡- $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷酶）和麦芽糖酶（ $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷酶），但这两种酶至今还没有被分离提纯和详细研究。 $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷酶在甲壳动物中的存在已有许多报道。如果脱支酶不存在，这将是令人意外的。

## 2. 纤维素酶

纤维素酶是一类水解纤维素的酶的混合物，其主要成分是 $\beta$ -1,4-葡萄糖内切酶（Cx）、 $\beta$ -1,4-葡聚糖外切酶（C<sub>1</sub>）及纤维二糖酶。Eriksson等认为纤维素的水解需要这三个酶协同作用。关于纤维素分解酶性质和作用还没有报道过。纤维二糖酶已经在许多动物中找到，不过，这可能是由具广泛专一性的 $\beta$ -葡萄糖苷酶所致。在甲壳动物中消化纤维素的能力已有报道，但实验用的底物通常是羧基纤维素，因此不能说明，外切酶和内切酶都存在。消化非水溶性的纤维素（结晶的或天然的）业已在等足类*Limnoria sp*和端足类*Gammarus pulex*中得到证明。

实验证明，甲壳动物能合成纤维素酶，不过一部分纤维素酶活性可能来自肠道的微生物或摄食的饵料生物。Yoko等（1964）指出，在低等无脊椎动物中，纤维素酶是普遍的消化酶，它的存在与食物的性质无关。纤维素酶在以纤维素为食的动物，如等足类的*Limnoria*中功能很明显。在滤食性和杂食性的动物中，纤维素的降解完全可以由肠道的微生物来完成。而在肉食性的甲壳动物中，纤维素酶是退化的残迹，毫无功能。一般来说，纤维素的消化是很慢的。关于纤维素酶的来源问题目前还有争议。在*Limnoria tripunctata*中纤维素酶不是由微生物产生的，因为其消化道是无菌的。Martin等（1978）证明，白蚁*Macrotermes natalensis*能够合成Cx和纤维二糖酶，而通过真菌获得C<sub>1</sub>。陆生等足类*philoscia muscorum*在甲壳动物中是很特别的，消化道有帮助微生物消化的适应特征。尽管Hassall等认为，这种等足类的纤维素是由微生物合成的，但是他们的实验并没有推翻部分酶是由动物本身分泌的假设。另外在消化腺和肠盲囊中找到了纤维素酶，并由此得出结论：纤维素酶是由动物本身分泌的。但这个结论也不一定

正确，因为消化液不断流出和流入消化腺的小管中，所以仍不能排除微生物的干扰。

纤维素酶有两种功能：（1）把纤维素转化成可作为能量的葡萄糖，（2）使其它消化酶能穿透植物细胞壁。

$\beta$ -1, 3-葡聚糖（海带多糖）广泛存在于真菌、原生动物和藻类中，对摄食这些生物的甲壳类是一种潜在的能源。Piavaux（1977）认为，海带多糖酶与纤维素酶、壳多糖酶和淀粉酶共同组成低等动物的消化酶。通常作为研究海带多糖酶的底物海带多糖是含有 $\beta$ -1, 6-键的 $\beta$ -1, 3-葡聚糖。海带多糖酶是否也和纤维素酶一样是几种酶的混合物，是否也含有内切酶、外切酶及 $\beta$ -1, 6-葡聚糖苷酶等尚待进一步研究。实验室常用海带多糖酶从霉菌和酵母中制备原生质体，可见甲壳动物可以分解和消化这些微生物。

## 4. 壳多糖酶

壳多糖是甲壳动物外骨骼的主要结构多糖。许多甲壳动物吞食自己脱的皮，如果它们不分泌消化壳多糖的酶是不可思议的。现在已经知道甲壳动物的确能分泌壳多糖酶和壳二糖酶。在黄道蟹属（*Cancer*）的两个种中分离出了壳二糖酶，分子量为110 000到125 000。甲壳动物对几丁质的消化机理还没有详细报道过。由于壳多糖常和别的葡聚糖及蛋白原结合在一起，它们的消化无疑需要多种酶的协同作用。在甲壳动物中，角质层都含有一定量的 $\text{CaCO}_3$ ，不过 $\text{CaCO}_3$ 对消化液的影响还不清楚。大部分甲壳动物的消化液偏酸性，它能帮助液解一部分 $\text{CaCO}_3$ 。

关于甲壳动物几丁质消化的另一个问题是：如果所有甲壳动物都能分泌壳多糖酶，那么身体上的几丁质是如何抵抗壳多糖酶的作用尚不清楚。

## 四、其它消化酶

已有报道，在*Gammarus pulex*体内有多种糖苷酶活性；*Cancer irroratus*和*Carcinus maenas*中有芳基硫酸酯酶及葡萄糖苷酶活性。此外，脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶亦可能作为消化酶广泛存在于甲壳动物中。

## 五. 消化酶的最适pH

据报道，大多数甲壳动物的前肠液略偏酸性，pH一般为5—7。许多消化酶的最适pH通常都在此范围内，唯有胰蛋白酶最适pH在碱性范围内。在摄食期间用指示剂测定前肠液的pH准确性较差；当动

物处于饥饿状态时，测定消化液的pH也是不恰当的，因为它不能正确反映消化酶起作用的真实pH。消化酶的最适pH不仅取决于酶活性中心的性质，而且与底物的性质和介质的离子组成有关。因此，体外一定条件下，测得的某种酶的最适pH未必能与此酶在体内的pH相一致。一般认为，在摄食期间消化液的pH可能在中性范围内波动，所有的消化酶在这个pH范围内都有充分的活性，能进行有效的消化。

### 六. 消化酶的合成与分泌

一般认为，消化酶的分泌主要是由消化腺中的β细胞完成的。即使处于饥饿状态时，动物体内仍存在着一定量的基础分泌。其具体表现是，有一定量的消化液的存在。许多研究人员还观察到进食后消化液的分泌迅速增加。因此普遍认为，在进食和分泌之间可能存在着生物的反馈机制。

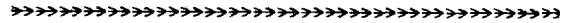
### 七. 消化酶对饵料组成的适应

实验证明，脊椎动物消化酶对饵料组成有着适应作用。Van Wormhoudt (1980) (1980) 用人工饵料研究卡臂虾蛋白酶和淀粉酶时发现，蛋白质含量为45%时，蛋白酶活性最高，高于或低于这个水平，蛋白酶活性下降；当糖含量为2.8%时，淀粉酶活性最高，高于或低于这个水平，情形和蛋白酶一样。我们用中国对虾做的初步实验也说明了蛋白酶与淀粉酶比活性之比随着饵料中蛋白质含量的增加而变大，随着淀粉含量的增加而降低。当给对虾转换饵料时，一周之内，摄食不同饵料的虾的消化酶即表现出差异。由此可见，消化酶的适应速度是非常快的。

关于影响消化酶的其他因素，Van Wormhoudt(1974)指出， *Palaemon serratus* 的消化酶水平受蜕皮及季节变化的影响。据报道， *P. serratus* 消化酶水平的变化有昼夜节律现象，消化酶的这种变化模式即使处于饥饿状态也能够维持。

### 八. 结束语

尽管二十年来，甲壳动物消化酶的研究已取得不少成绩，但仍有许多未解决的问题，如消化酶的种类、活性、合成、贮存与分泌机制；消化酶对饵料的适应情况和内肽酶是否存在酶原等。近年来，许多甲壳动物已成为重要的养殖对象，大大推动了消化酶的研究。希望这方面的工作今后能引起国内从事养殖研究人员的密切注意。



### 一种优良的饵料——等鞭藻3011通过鉴定

中国科学院海洋研究所从事单胞藻饵料研究的科研人员，1982年从山东沿岸分离筛选出一种新的等鞭藻3011饵料种，经过纯化、分类、鉴定，营养成分和生长条件等一系列的生物学研究；根据其生长规律，掌握了等鞭藻3011工厂化培养的方法。通过对海湾扇贝、中国对虾、刺参、鲍鱼、西施舌、牡蛎和贻贝幼苗的喂养试验，证明这种饵料效果很好。该种营养成分丰富，个体小，细胞壁薄，很容易被动物幼体摄食和消化，用它饲养贻贝苗比用褐指藻饲养生长快32—42%，用它喂养海湾扇贝、对虾、刺参及牡蛎等幼苗均获得很好的效果。此藻种适温范围广，对高光强和盐度，pH等方面有较广的适应范围，繁殖速度快，培养技术简易可行。中国科学院海洋研究所于1985年10月，邀请水产科研、高等院校及生产单位的专家进行评审，与会代表认为：等鞭藻3011的人工培育成功为我国水产动物苗种培育，特别是海珍品育苗增添了一种新的优良饵料种，一致通过鉴定。

目前，中国科学院海洋研究所正推广这一新品种，向生产单位提高藻种和技术。

胡葵英