

盐度对凡纳滨对虾幼虾消化酶活性的影响

黄 凯, 杨鸿昆, 战 歌, 武林华

(广西大学动物科技学院, 广西 南宁 530005)

摘要 采用酶学分析方法, 在盐度为 1, 15 和 30 的条件下, 对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei* Boone) 幼虾消化酶活性进行测定。实验结果表明: (1) 幼虾肝胰腺中, 当盐度为 1 时, 胃蛋白酶活性最高 [29.58 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$], 胰蛋白酶活性 [92.46 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$] 与盐度为 15 时的值 [97.60 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$] 相当; 胃肠中, 胰蛋白酶和胃蛋白酶活性均以盐度为 1 时最高。 (2) 当盐度为 1 时, 肝胰腺和胃肠中脂肪酶活性最大, 但统计分析各组间差异不显著 ($P > 0.05$)。 (3) 肝胰腺中, 各盐度组的淀粉酶活性很接近, 组间无显著差异 ($P > 0.05$); 胃肠中, 盐度为 1 时的淀粉酶活性最高, 达 109.29 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, 显著高于盐度为 15, 30 时的活性 ($P < 0.05$)。

关键词: 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei* Boone); 盐度; 消化酶活性

中图分类号: Q482; Q485 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2007)03-0037-04

关于虾类消化酶方面的研究, 国内外许多学者进行了研究, 如虾类的食性、饵料、不同生长阶段、季节和饥饿程度对消化酶活性的影响均有报道。刘玉梅等^[1]、孙建明等^[2]和潘鲁青等^[3]分别研究报道了中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis* Osbeck) 不同生长阶段的消化酶活性变化, 魏华等^[4]研究了罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 幼体及成虾的消化酶活性, 许实荣等^[5]研究报道了 B_1 和 B_6 对中国明对虾消化酶的影响, 潘鲁青等^[6]与吴垠等^[7]分别研究了温度对中国对虾幼体消化酶活性的影响, 王淑红等^[8]对凡纳滨对虾幼体消化酶活力进行了初步研究, 上述研究主要集中在个体不同发育阶段的消化酶活性变化及饵料、温度对消化酶活性的影响。陈品健等^[9]分别研究报道了盐度对真鲷 (*Pagrosomus major*) 幼鱼消化酶活性的影响, 而关于对虾消化酶活性的盐度效应未见报道。目前, 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei* Boone) 已成为中国淡水、咸淡水和海水中的主要养殖虾类, 实验分析和考察了盐度为 1, 15 和 30 时凡纳滨对虾幼虾消化酶活性的变化, 以期对凡纳滨对虾在不同盐度水域中的养殖和营养调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验虾

实验用凡纳滨对虾取自广东省中山市对虾养殖场, 平均体长 $5.06 \text{ cm} \pm 0.87 \text{ cm}$, 平均体质量 $1.53 \text{ g} \pm$

0.30 g 。

1.2 实验分组

实验设置为 3 个盐度组, 其盐度分别为 1, 15 和 30, 每个组设 3 个重复。实验期间水温为 $19.0 \sim 24.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 。各盐度组实验虾驯养 2 周, 每日 8:30, 15:30 和 20:30 时投喂新鲜鱿鱼, 早上吸污和换水 1 次。所有实验虾均体质健壮, 摄食正常。

1.3 酶活性的测定方法

1.3.1 样品制备

喂食 12 h 后, 每组挑选 60 尾规格基本一致的实验虾, 取肝胰腺、胃肠置冰浴中, 加入 5 倍体积的预冷生理盐水后匀浆。 $0 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 匀浆液以 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液用作活性测定。

1.3.2 蛋白质质量测定

组织样本酶活性的大小以蛋白质质量做为基准单位。蛋白质质量采用考马斯亮蓝 G250 染色法方法测定^[10]。吸取酶液 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 放入试管中 (空白加等体积的蒸馏

收稿日期: 2005-01-06; 修回日期: 2006-12-18

基金项目: 广西大学博士基金资助项目

作者简介: 黄凯(1963-), 男, 广西桂林人, 教授, 博士, 研究方向: 水产动物营养学和集约化水产养殖, E-mail: hkai110@163.com

水), 加入 2.5 mL 考马斯亮蓝 G250 蛋白试剂, 充分混合后, 用 752 紫外光栅分光光度计于 595 nm 波长测吸光值, 并通过标准曲线查得 1 mL 溶液中蛋白质的质量。以 50 μ L 蒸馏水加 2.5 mL 考马斯亮蓝 G250 蛋白试剂作空白样。

1.3.3 胰蛋白酶活性测定

胰蛋白酶活性测定参照刘玉梅等^[1]方法做适当的修改。取 0.5% 干酪素 1 mL, 0.04 mol/L EDTA- Na_2 0.05 mL, 0.05 mol/L 硼砂-氢氧化钠缓冲液 (pH 9.8) 0.2 mL, 酶液 50 μ L, 加入蒸馏水混匀。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 加入 30% 三氯乙酸 0.5 mL (空白在加入三氯乙酸后再加入粗提酶液), 于 3 000 r/min 离心 4 min, 加 0.5 mol/L NaOH 2.5 mL, Folin 试剂 0.25 mL, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴显色 15 min。用 752 紫外光栅分光光度计于 680 nm 波长测吸光值。胰蛋白酶活性, 以含 1 mg 的蛋白酶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下, 每分钟水解干酪素所产生酪氨酸的质量数来表示酪蛋白活性 [$\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$]。

1.3.4 胃蛋白酶活性测定

胃蛋白酶活性测定参照刘玉梅等^[1]做适当修改。以 1.0% 牛血红蛋白-0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 3.0) 1 mL, 0.04 mol/L EDTA- Na_2 0.05 mL, 0.2 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 3.0) 0.2 mL, 酶液 100 μ L, 加入蒸馏水混匀。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 反应 15 min 后加入 30% 三氯乙酸 0.5 mL (空白在加入三氯乙酸后再加入酶液), 于 3 000 r/min 离心 4 min, 加 0.5 mol/L NaOH 2.5 mL, Folin 试剂 0.25 mL, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴显色 15 min。用 752 紫外光栅分光光度计于 680 nm 波长测吸光值。以含 1 mg 蛋白的酶液每分钟水解干酪素所产生酪氨酸的质量数来表示酪蛋白活性 [$\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$]。

1.3.5 脂肪酶活性测定

参照北京大学生物系生物化学教研室^[11]方法做适当修改。于锥形瓶加入 5 mL 0.025 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.5) 和 4 mL 聚乙烯醇橄榄油乳化液, 置 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 10 min, 然后加入酶液 0.5 mL, 40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min 后, 立即加入 95% 乙醇 15 mL 终止酶反应。加酚酞指示剂 3 滴, 用 0.05 mol/L 标准 NaOH 滴定至微红色, 并同时做空白对照。脂肪酶活性大小用含 1 mg 蛋白的酶液在 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 以每分钟催化产生脂肪酸的量来表示 [$\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$]。

1.3.6 淀粉酶活性测定

淀粉酶活性测定参照张龙翔等^[12]方法作适当修改。即取 1 mL 1.0% 可溶性淀粉-0.1 mol/L 磷酸盐缓

冲液 (pH 8.0), 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热 3 min, 加酶粗提液 100 μ L, 加入 DNS (3, 5-二硝基水杨酸) 显色剂 1.0 mL (空白在加入 DNS 后再加入酶粗提液), 终止反应后, 用 752 紫外光栅分光光度计于 540 nm 波长测吸光值。用 1.00 mL 标准葡萄糖溶液作同样操作 (标准空白以等体积蒸馏水替代标准葡萄糖溶液)。淀粉酶活性大小用含 1 mg 蛋白的酶液在 25 $^{\circ}\text{C}$, pH 8.0 条件下, 以每分钟使可溶性淀粉分解产生葡萄糖的质量数来表示淀粉酶活性 [$\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$]。

2 结果与分析

2.1 盐度对凡纳滨对虾幼虾胰蛋白酶活性的影响

图 1 显示, 肝胰腺中, 各组胰蛋白酶活性有显著差异 ($P < 0.05$), 盐度为 15 时的胰蛋白酶活性最高, 达 97.60 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, 与盐度为 1 时的胰蛋白酶活性 [92.46 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$] 无显著差异 ($P > 0.05$), 而盐度为 30 时活性为最低 [63.36 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$], 显著低于盐度为 15 和 1 的胰蛋白酶活性。胃肠中, 胰蛋白酶活性变化差异显著 ($P < 0.05$), 盐度为 1 时活性最高 [68.79 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$], 显著高于其它两个盐度组 ($P < 0.05$)。

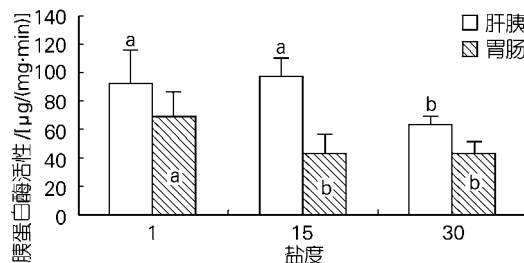


图 1 盐度对凡纳滨对虾胰蛋白酶活性的影响

Fig.1 Effect of salinity on activities of tyrosine-like of *Litopenaeus vannamei* Boone

2.2 盐度对凡纳滨对虾幼虾胃蛋白酶活性的影响

结果表明 (图 2), 肝胰腺中, 各组胃蛋白酶活性有显著差异 ($P < 0.05$), 盐度为 1 时, 胃蛋白酶活性最高, 达 29.58 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$; 在盐度为 15 时活性最低 [18.49 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$], 显著低于其它两个盐度组 ($P < 0.05$); 胃肠中, 盐度为 1 时的胃蛋白酶活性最高 [8.88 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$], 显著高于其它两个盐度组 ($P < 0.05$)。

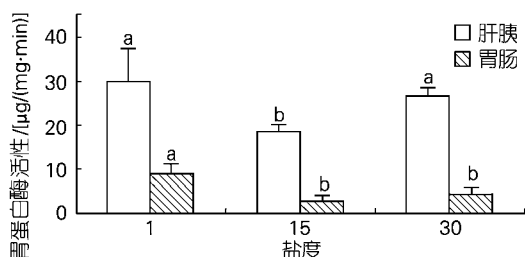


图2 盐度对凡纳滨对虾胃蛋白酶活性的影响
Fig.2 Effect of salinity on activities of pepsin enzyme of *Litopenaeus vannamei* Boone

2.3 盐度对凡纳滨对虾幼虾脂肪酶活性的影响

实验结果表明(图3),肝胰腺和胃肠中脂肪酶活性均以盐度为1时最高,分别为0.28 μmol/(mg·min)和0.14 μmol/(mg·min),但统计分析表明各盐度组间差异不显著(P>0.05)。

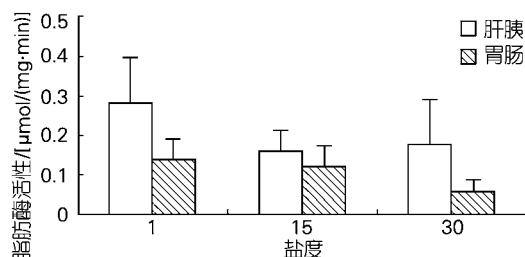


图3 盐度对凡纳滨对虾脂肪酶活性的影响
Fig.3 Effect of salinities on activities of lipase of *Litopenaeus vannamei* Boone

2.4 盐度对凡纳滨对虾幼虾淀粉酶活性的影响

从图4可以看出,肝胰腺中各盐度组淀粉酶活

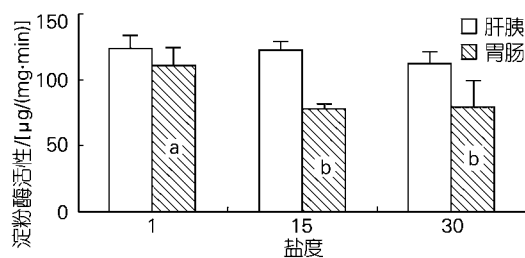


图4 盐度对凡纳滨对虾淀粉酶活性的影响
Fig.4 Effect of salinity on activities of enzyme of *Litopenaeus vannamei* Boone

性较接近[111.00~122.51 μg/(mg·min)],差异不显著

(P>0.05);在胃肠中,各组盐度淀粉酶活性有显著差异(P<0.05),其中以盐度为1时活性最高[109.27 μg/(mg·min)],显著高于其它两个盐度组(P<0.05)。

3 讨论

王维娜等^[13]研究了水环境中铜、锌、铁和钴离子对日本沼虾消化酶的影响,水体中适量的金属离子可激活消化道中胃蛋白酶和类胰蛋白酶的活性,高浓度时则有抑制作用。本研究也证实了这种论点,实验结果显示,盐度为1时,幼虾肝胰腺中,胃蛋白酶活性为最高[29.58 μg/(mg·min)],胰蛋白酶活性[92.46 μg/(mg·min)]与盐度为15时的最高值[97.60 μg/(mg·min)]相当,胃肠中,胰蛋白酶活性、胃蛋白酶活性也均为最高,分别为68.79 μg/(mg·min)和8.88 μg/(mg·min)。因此,作者推测,由于对虾主要通过离子调节方式来调节自身的渗透压,以适应外界环境盐度变化^[14,15],与此同时,对虾机体消化酶的激活或抑制可以借助体内金属离子含量变化得以调控。至于为何凡纳滨对虾幼虾在盐度为1时,肝胰腺、胃肠中的蛋白酶有较高的活性,可能与天然幼虾阶段长期生活于低盐度环境中有关^[16]。

本实验结果表明,凡纳滨对虾幼虾脂肪酶活性很低,这与一些学者在其他甲壳动物中得到的结果一致^[17]。从表观数据上看,盐度为1时条件下肝胰腺和胃肠中脂肪酶活性最大[0.28 μmol/(mg·min), 0.14 μmol/(mg·min)],但统计分析各盐度组间差异不显著(P>0.05),盐度与脂肪酶之间的关系尚待进一步研究。

在甲壳类的淀粉酶研究中,刘玉梅^[18]认为中国明对虾的淀粉酶活性比预想的要高。本实验凡纳滨对虾肝胰腺和胃肠中淀粉酶活性均较高,与刘玉梅^[18]的研究结果相似,同时也说明凡纳滨对虾对淀粉有很强的消化能力。Dalla^[19]研究发现,当环境盐度降低时,对虾需要消耗大量的能量来调节体内的渗透压和离子平衡。对虾在不同盐度下的能量消耗也与其在该盐度条件下的适应情况密切相关,日本对虾(*Penaeus japonicus* Bate)从盐度为37的条件下移入盐度为10时的环境中时,耗氧率迅速提高到原值的300%,经数小时后稳定在200%的水平上。Chen等报道^[19,20],盐度在15~30范围,中国明对虾和日本对虾的耗氧率随盐度降低而增加。本实验结果表明,凡纳滨对虾幼虾肝胰腺中淀粉酶活性很接近,各盐度组间无显著差

异 ($P>0.05$),但是在胃肠中,盐度为 1 时虾的淀粉酶活性最高,达 $109.29 \mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$,显著高于盐度为 15, 30 的组 ($P<0.05$),这说明凡纳滨对虾在盐度为 1 时,胃肠中对淀粉的分解、消化和吸收能力增强,同时也意味着能获取更多的能量。

总体上看,凡纳滨对虾幼虾在盐度为 1 时,蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性呈整体性的升高,很可能是因为体内存在较大的渗透压梯度差,为维持自身渗透压平衡,需要消耗更多的能量,这就在一定程度上要求在非等渗环境下需要较高的消化酶活性来消化食物。Babink 等^[21]研究发现几种消化酶的浓度经常保持着平行的关系,当其中一种酶活性提高时,其它消化酶的活性也同时提高,当其中一种酶活性减弱时,其它消化酶的活性也随之减弱。这种酶的整体性效应与本试验结果非常相似。

参考文献:

- [1] 刘玉梅,朱谨钊,吴厚余,等.中国对虾幼体和仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究[J].海洋与湖沼,1991,22(6):571-575.
- [2] 孙建明,刘亚杰,周遵春.不同生长时期中国对虾蛋白酶、脂肪酶活性变化的研究[J].水产科学,1995,14(2):11-13.
- [3] 潘鲁青,王克行.中国对虾幼体消化酶活力的实验研究[J].水产学报,1997,21(1):26-31.
- [4] 魏华,赵维信.罗氏沼虾幼体及成虾消化酶活性[J].水产学报,1996,20(1):61-64.
- [5] 许实荣,孙凤,娄康后.中国对虾营养研究-B 族维生素(B1,B6)对对虾蛋白酶和淀粉酶活力的影响[J].海洋科学,1987,11(4):34-37.
- [6] 潘鲁青,马胜,王克行.温度对中国对虾幼体生长发育与消化酶活力的影响[J].中国水产科学,1997,4(3):17-22.
- [7] 吴垠,孔建明,周遵春.温度对中国对虾、日本对虾主要消化酶活性的影响[J].大连水产学院学报,1997,12(2):15-21.
- [8] 王淑红,陈昌生,刘志勇等.凡纳滨对虾幼体南美白对虾消化酶活力的初步研究[J].厦门大学学报(自然科学版),2004,43(3):389-392.
- [9] 陈品健,王重刚,郑森林.盐度影响真鲷幼鱼消化酶活力的研究[J].厦门大学学报(自然科学版),1998,37(5):754-756.
- [10] Bradfor M A. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254.
- [11] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京:人民教育出版社, 1980.71-72.
- [12] 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社, 1981.175-179.
- [13] 王维娜,王安利,孙儒泳. 水环境中的铜锌铁钴离子对日本沼虾消化酶和碱性磷酸酶的影响[J]. 动物学报, 2001,47:72-77.
- [14] Wheatley G, Henry P. Branchial and antennal gland $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ and carbon anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*[J]. *J Exp Biol*,1987,133:73-86.
- [15] Furriela R P M, McNamarab J C, Leone F A. Characterization of $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*[J]. *Comp Biochem Physiol*, 2000,26:303-315.
- [16] 陈楠生(译).对虾生物学[M].青岛:青岛海洋大学出版社,1992.
- [17] Biesiot P M, Capuzzo G M. Change in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* [J]. *Mar Bilo Ecol*, 1990,36(2): 107-122.
- [18] 刘玉梅,朱谨钊.对虾消化酶的研究[J].海洋科学,1984,5:46-50.
- [19] Dalla Via. Salinity response of the juvenile penaeid shrimp *Penaeus japonicus* I. Oxygen consumption and estimation of productivity[J]. *Aquaculture*, 1986, 55:297-306.
- [20] Hen J C, Sen H L. Response of oxygen consumption, ammonia-N excretion and urea N- excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient at different salinity and pH levels[J]. *Aquaculture*, 1995,136:243-255.
- [21] Bakbin B P. Secretory Mechanism of the Digestive Glands(Seconds) [M]. New Yory: Hoeber.1963.

(下转第 45 页)

Effect of salinities on digestive enzyme activities of juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone

HUANG Kai , YANG Hong-kun , ZHAN Ge , WU Lin-hua

(College of Animal Science and Technology, Guangxi University , Nanning 530005, China)

Received: Jan., 6, 2005

Key words: *Litopenaeus vannamei* Boone; salinity; digestive enzyme activities

Abstract: In this paper, the effect of salinity on digestive enzyme activities of the juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone was studied by means of enzyme analysis. The experiment was made under three levels of salinities equal to 1, 15 and 30 respectively. The results were as follows: (1) In the hepatopancreas of juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone under the salinity equal to 1, the pepsin has the highest activity [29.58 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$], and the activity of tyrosic-like [92.46 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$] corresponds to the highest [97.60 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$] under the salinity equal to 15, and in stomach, both tyrosic-like and pepsin have the highest activity. (2) The lipase has the highest activity in hepatopancreas and stomach under the salinity equal to 1, but the differences among various groups are not prominent ($P > 0.05$) through the statistical analysis. (3) The activities of amylase are quite contiguous in hepatopancreas, and there is no prominent difference among various groups of salinities ($P > 0.05$), and in stomach the juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone's amylase has the highest activity under the salinity equal to 1, and reaches 109.29 $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$, prominently higher than that under the groups of salinities equal to 15 and 30 ($P < 0.05$).

(本文编辑 : 刘珊珊)