

中国对虾幼体和仔虾消化酶活力 及氨基酸组成的研究*

刘玉梅 朱谨钊 吴厚余 施奠族

(中国科学院海洋研究所, 青岛, 266071)

提要 于1987年5月初在山东日照市涛雒对虾育苗场采集中国对虾虾苗;成虾于1986年春、秋两季取自青岛胶州湾水域的网捕成虾。以酶学分析方法作试验。结果表明,1. 虾苗酶活力结果为: 类胰蛋白酶及胃蛋白酶的活性有差异, 蚤状幼体期 < 糠虾幼体期 < 仔虾期; 酶活性随着生长发育而增高, 类胰蛋白酶活性比胃蛋白酶高4倍左右。淀粉酶的活性是蚤状幼体期 > 糠虾幼体期 > 仔虾期; 纤维素酶活力极微; 淀粉酶活性是纤维素酶的6—13倍左右。育苗期几种消化酶的活性均远远低于成虾。2. 育苗期幼虾的氨基酸含量, 随着生长发育而增高, 在各期, 氨基酸总和的差别是: 蚤状幼体期 < 糠虾幼体期 < 仔虾期。

本文系中国对虾 [*Penaeus chinensis* (O'sbeck, 1965)] 食性转换期——蚤状幼体、糠虾幼体和仔虾期几种主要消化酶的活力及氨基酸组成的研究报告。

一、材料和方法

1. 材料

(1) 虾苗 对虾幼苗于1987年5月初取自山东省日照市涛雒对虾育苗场。根据虾苗生长发育期分三个阶段取样: 蚤状幼体, 体长1—3mm; 糠虾幼体, 体长3.5—5mm; 仔虾期, 体长5—7mm。低温(−17℃)保存, 待用。

(2) 成虾 于1986年春、秋两季取自青岛胶州湾水域网捕成虾, 体长17—20.5cm, 体重65—80g。

2. 样品制备

分别取蚤状幼体、糠虾幼体、仔虾及成虾的肝胰、胃、肠, 置冰浴中, 加入5倍体积(W/V)预冷的重蒸水, 在玻璃匀浆器中匀浆。匀浆液以日制 TOMY-RD20 III 型冷冻离心机, 于0—1℃、9 000r/min 离心 30min。弃沉淀, 上清液用作活力测定。

3. 活力测定

(1) 胃蛋白酶与类胰蛋白酶^[1]的测定 测胃蛋白酶活力时, 加入0.5%干酪素2ml, 0.04mol/L EDTA-Na₂0.1ml, 0.2mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH = 3.0) 0.4ml, 酶液 0.4ml;

* 中国科学院海洋研究所调查报告第1634号。

中国科学院胶州湾水产生产农牧化基金, 课题号 D20870317。

氨基酸分析由李烈英同志协助测定, 特此致谢。

收稿日期: 1989年10月4日。

加入重蒸水,使总体积为 3.5ml,混匀;置于 37℃ 水浴中,反应 15min;然后加入 30% 三氯醋酸 1ml,离心,取上清液,用福林-酚试剂测酪氨酸生成。在 37℃ 下,每分钟水解干酪素所产生的 1 μ g 酪氨酸作为一个酶活力单位 (μ g/min)。

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 0.05mol/L 硼砂-氢氧化钠缓冲液 (pH = 9.8)。

(2) 淀粉酶与纤维素酶的测定^[1] 加入 0.2mol/L 醋酸缓冲液 (pH = 4.6) 2ml, 2% 淀粉液 5ml,酶液 0.4ml;加入重蒸水,使总体积为 10ml,于 40℃ 水浴中糖化 30min;取出后立即放沸水中煮沸 10min,所得糖化液按文献[5]方法测糖。以每分钟催化淀粉水解生成 1 μ g 葡萄糖的酶量作为一个活力单位 (μ g/min)。

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

(3) 酶液蛋白浓度的测定 以牛血清白蛋白作标准,用双缩脲法测定^[3]。

4. 酶凝胶电泳

按文献[3]方法电泳。分离胶浓度为 7%(W/V),浓缩胶浓度为 3%(W/V),Tris-HCl 缓冲液 (pH = 8.7 与 pH = 6.7);电极缓冲液为 Tris-甘氨酸 (pH = 8.3)。电泳后将胶柱取出进行染色^[7]。

5. 氨基酸的分析

(1) 氨基酸样品的前处理¹⁾ 分别取于 105℃ 烘箱烘干的样品各 3mg,放入安瓿瓶中,加入 5.6mol/L HCl 0.5ml,抽气封瓶口,置于 110℃ 烘箱中水解 24h;水解后,把样品转入蒸发皿中,水浴蒸干,加入 1ml 蒸馏水,再蒸干;最后加入 0.02mol/L HCl 0.5ml,待测。

(2) 分析与试剂 样品用日立 835-50 型高速氨基酸自动分析仪测氨基酸组分。化学试剂为酪蛋白 (E. Merck 公司产)、淀粉(上海试剂厂产,分析纯)、羧甲基纤维素钠(上海化学试剂站,国产分装),其它试剂均为分析纯。

二、结果和讨论

1. 几种消化酶的活性变化

育苗期虾苗随着生长发育,有着食性转换的过程,按蚤状幼体、糠虾幼体、仔虾三个阶段取样,测了几种消化酶的活性变化;同时也分析了外海(青岛胶州湾水域网捕成虾)不同季节的成虾消化器官主要消化酶的变化,见表 1。

因各消化酶水解的底物不同,为此按表 1 结果将水解相似底物的酶活性分别作比较。

(1) 虾苗不同生长期胃蛋白酶与类胰蛋白酶的活性变化(图 1) 测定表明,虾苗食性转换期,胃蛋白酶与类胰蛋白酶活性随着生长发育逐渐增大,蚤状幼体期 < 糠虾幼体期 < 仔虾期;类胰蛋白酶活力比胃蛋白酶活力大。在蚤状幼体期,胃蛋白酶活力是 0.1 μ g/(min · mg);类胰蛋白酶活力是 0.35 μ g/(min · mg);类胰蛋白酶活力是胃蛋白酶的 3.5 倍左右。在糠虾幼体及仔虾期,类胰蛋白酶活力是胃蛋白酶的 3—4 倍左右。这一结果说

1) 北京理化分析测试技术学会,1984。氨基酸分析技术,第 3 篇。北京大学,2—10 页。

表 1 虾苗不同发育期和春、秋外海成虾消化酶的活性的比较①

Tab. 1 Comparison of the activities of digestive enzyme in different stages of larval prawn and spring-autumn adult prawn

生长期与季节	体长 (mm)	器 官	胃蛋白酶	类胰蛋白酶	淀 粉 酶	纤维素酶
溞状幼体期	1—3	整 体	0.1±0.03	0.35±0.04	0.27±0	0.02±0
糠虾幼体期	3.5—5	整 体	0.13±0.04	0.51±0.04	0.24±0.01	0.04±0.01
仔 虾 期	5—7	整 体	0.19±0	0.75±0.05	0.18±0.02	0.02±0
春季成虾	205 (80)	肝 胰	2.64±0.25	20.82±2.5	8.09±0.3	0.04±0.01
		胃	0.76±0.1	1.72±0.4	3.93±0.5	0.15±0.01
		肠	0.95±0.05	5.15±1.0	6.52±0.3	0.08±0
秋季成虾	170 (65)	肝 胰	3.17±0.15	24.82±0.5	2.46±0.5	0.09±0
		胃	0.91±0.01	1.06±0.04	0.94±0.1	0.5±0
		肠	0.55±0.12	2.78±0.9	0.37±0	0.02±0

① 酶的活力以比活力表示, 即活力单位/mg 蛋白 [$\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mg})$]。表中数值以三次实验数据的标准差表示。体长、体重均为平均值。括号内数据为体重。

明, 虾苗期类胰蛋白酶对于蛋白质的水解能力要比胃蛋白酶高。这与文献[1]的结果是一致的, 说明了对虾从育苗期到养成期均是类胰蛋白酶活性大于胃蛋白酶。故对蛋白质的分解消化, 以前者为强。测定也表明, 虾苗期的两种蛋白酶活力远远低于春季与秋季成虾的活力(表 1)。

(2) 虾苗不同生长期淀粉酶与纤维素酶的活性变化(图 1) 测定表明, 淀粉酶的

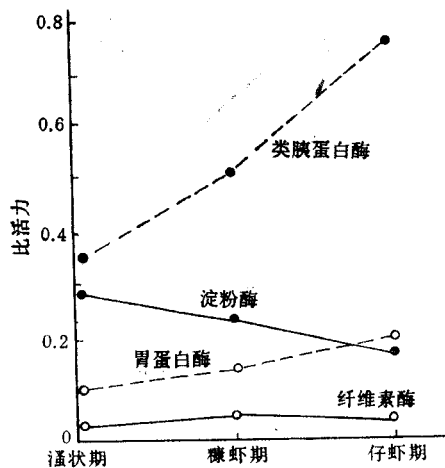


图 1 虾苗不同生长期胃蛋白酶与类胰蛋白酶、淀粉酶与纤维素酶的活性比较

Fig. 1 Comparison of the activities of pepsin and trypsin-like enzyme and that of amylase and cellulase in different stages of larval prawn



图 2 虾苗不同生长期酯酶聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱(模拟型)

Fig. 2 Diagram of esterase in different stages of larval prawn by Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Model)

活性约是纤维素酶的 6—13 倍;淀粉酶的活性是随着虾苗的生长发育而减弱的,这一结果说明,虾苗期淀粉酶的活性大小与食性转换相关;对虾在蚤状幼体、糠虾幼体时期,以食植物性饵料为主,所以淀粉酶相对偏高。黑木場^[4]在测定日本对虾 (*Penaeus japonicus* Bate) 稚虾期的消化酶时,用糖化法检不出淀粉酶的活性;本文用糖化法可以测定出中国对虾育苗期的淀粉酶活力。可以看出,淀粉酶活性随着发育期的不同而有变化。测定也表明,育苗期的淀粉酶活性远远低于春季及秋季成虾的酶活力(表 1)。

(3) 春季与秋季成虾的酶活性 类胰蛋白酶活性比胃蛋白酶高。消化器官的部位不同,其酶活性也有差异,肝胰>肠>胃。淀粉酶活性,春季成虾高于秋季成虾(表 1)。

(4) 取虾苗不同生长期酶液电泳图谱(图 2) 在虾苗的不同发育阶段,酯酶有变化,蚤状期酯酶呈现 3 条带,到了糠虾期与仔虾期呈现一条宽带。酯酶的变化是否与食性有关,尚需进一步探讨。

综上所述可以看出,胃蛋白酶与类胰蛋白酶的活性,均随着虾苗的不同生长发育期而增大。这说明,虾苗的生长发育与摄食后的消化吸收的增加有关,而淀粉酶的活性却是随着虾苗的生长发育而减小;这在一定程度上反映了食性转换期与淀粉酶的变化相关。

2. 育苗期不同生长发育阶段氨基酸的组成

测定表明,除色氨酸在水解过程中被破坏外,共含有 18 种氨基酸,其中含量最高的是谷氨酸,最低的是胱氨酸(表 2)。其它氨基酸的含量,也随着虾苗的生长发育而增高。从

表 2 虾苗不同生长期氨基酸的组成^①

Tab. 2 Composition of amino acids in different stages of larval prawn

氨基酸	蚤状幼体期	糠虾幼体期	仔 虾 期
天门冬氨酸	2.833	2.323	6.463
苏氨酸	1.405	1.542	3.121
丝氨酸	2.145	1.527	2.541
谷氨酸	3.689	2.538	8.725
甘氨酸	1.925	2.356	4.946
丙氨酸	1.926	3.664	4.720
胱氨酸	0.155	0.750	0.664
缬氨酸	1.663	2.243	4.139
蛋氨酸	0.277	0.751	1.750
异亮氨酸	1.153	1.787	2.884
亮氨酸	1.624	2.905	4.957
酪氨酸	0.824	1.539	1.875
苯丙氨酸	0.910	1.241	2.281
赖氨酸	1.270	2.716	4.698
氨	0.988	1.402	0.980
组氨酸	0.569	0.627	1.223
精氨酸	1.431	3.001	4.138
色氨酸	—	—	—
脯氨酸	1.411	2.979	6.546
总 和	24.272	35.891	66.650

① 各期样品均为干样,其量为每 100mg 样品的氨基酸含量(mg)。

总的氨基酸含量看, 溞状幼体期为 24.272%, 糠虾幼体期为 35.891%, 仔虾期为 66.650%。对虾生长短缺的必需氨基酸中的蛋氨酸与赖氨酸也随着生长发育而增高。蛋氨酸, 溞状幼体期为 0.277%, 糠虾幼体期为 0.751%, 仔虾期为 1.750%; 赖氨酸, 则分别为 1.270%, 2.716%, 4.698%。

参 考 文 献

- [1] 刘玉梅、朱谨钊, 1984。对虾消化酶的研究。海洋科学 5: 46—50。
- [2] 张树政, 1973。聚丙烯酰胺凝胶电泳。化学通报 1: 33—36。
- [3] 潘家秀, 1962。蛋白质化学研究技术。科学出版社, 第 12 页。
- [4] 黑木暘, 1975。水产学シリーズ8。稚魚の攝餌と発育。恒星社厚生閣, 41—44 页。
- [5] Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375.
- [6] Flowerdew, M. W. and D. J. Crisp, 1975. Esterase Heterogeneity and an Investigation into Racial Differences in the Cirripede *Balanus balanoides* Using Acrylamide Gel Electrophoresis. *Mar. Biol.* 33(1): 33—39.

STUDIES ON DIGESTIVE ENZYMES AND AMINO ACID OF LARVAL AND POST LARVAL STAGES OF PRAWN *PENAEUS CHINENSIS* (O'SBECK 1965)*

Liu Yumei, Zhu Jinzhao, Wu Houyu and Shi Dianzu

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao, 266071)

ABSTRACT

The larvae of prawn *Penaeus chinensis* were collected from Shrimp Farm, Taolu, Rizhao, in May, 1987. The adult prawns were collected from Jiaozhou Bay, Qingdao during spring and autumn, 1986. This experiment was conducted with the enzyme analytical method. The results indicate that:

1. The activities of trypsin-like enzyme and pepsin were different in different stage of the larvae of prawn: *Penaeus chinensis* Zoea stage < Mysis stage < Post larval stage.

The activities of trypsin-like enzyme and pepsin increased with growth. Activity of trypsin-like enzyme was about 4 times higher than that of pepsin.

2. The activity of amylase in different stage was Zoea stage > Mysis stage > Post larval stage. The activity of cellulase was fairly low. Activity of amylase was 6 to 13 times higher than that of cellulase. The activity of digestive enzyme in the larvae of prawn was lower than that in the adult prawn.

3. The contents of amino acid in the larvae of prawn increased with growth. The contents of amino acid in different stage are zoea stage < Mysis stage < Post larval stage.

* Contribution No. 1634 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.