

中国对虾幼体消化酶活力的实验研究

潘鲁青 王克行

(青岛海洋大学水产学院, 266003)

摘 要 以酶学分析方法测定了中国对虾各期幼体几种消化酶活力。实验结果表明,在中国对虾幼体发育过程中,五种消化酶活力表现出四种变化模式,其中胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力逐渐增大,淀粉酶活力呈下降趋势,纤维素酶和脂肪酶活力极微。在食性转换过程中,胃蛋白酶、类胰蛋白酶和淀粉酶出现较明显的变化。中国对虾幼体消化酶活力对饵料中的营养物质有着明显的适应性,而且饥饿实验表明消化酶活力受个体发育的影响。作者认为中国对虾幼体消化酶合成受遗传控制,取决于中肠腺的分化程度,同时在幼体不同发育阶段消化酶调节机制不同。

关键词 中国对虾, 幼体, 消化酶活力

中国对虾(*Penaeus chinensis*)是我国海水养殖的主要种类,近年来由于海域污染日益加重,对虾育苗的技术难度也相应加大。在中国对虾苗种生产过程中,对于人工饵料的配方和合理投饵等方面存在着许多盲目性,即饵料效果以幼体生长发育快慢为指标,而缺少研究幼体本身的消化生理和营养需求,往往导致对虾育苗工作失败。本文测定了中国对虾各期幼体消化酶活力,分析中国对虾幼体发育过程中消化酶活力变化规律以及投喂不同饵料幼体消化酶活力的变化情况,初步探讨影响各期幼体消化酶活力的可能原因。这不仅为中国对虾的人工繁殖技术提供了科学依据,而且为甲壳动物幼体的消化生理、营养生理和生化研究奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

中国对虾各期幼体:无节幼体 V~VI 期(N_{5~6})、蚤状幼体 I 期(Z₁)、蚤状幼体 II 期(Z₂)、蚤状幼体 III 期(Z₃)、糠虾幼体 I 期(M₁)、糠虾幼体 II 期(M₂)、糠虾幼体 III 期(M₃)和仔虾第 1 天(P₁)、仔虾第 2~3 天(P_{2~3}),于 1995 年 4 月至 5 月取自青岛市城阳区海丰对虾育苗场。蚤状幼体时投喂单细胞藻类和蛋黄,糠虾幼体和仔虾时投喂蛋糕。饵料实验分为三组幼体:Z₁、Z₂、Z₃。饵料设置为:饥饿(a)、新月菱形藻(b)、蛋黄(c)和虾粉(d),饵料投喂均为过量,每种饵料设 3 个平行组。实验容器为玻璃槽,实验水体 6L,控温仪水浴控温(24℃),连续充气。实验开始时,均放入刚变态的蚤状幼体,密度为 10 万尾/m³,培育 24 小时后,终止实验。样品于低温(-18℃)保存待用。

1.2 样品制备

各期幼体分别取 200~500mg 置于冰浴中,加入 10 倍体积(W/V)预冷重蒸水,在玻璃匀

浆器中匀浆, 取部分匀浆液直接测脂肪酶活力, 剩余部分以 TGL-16G 型冷冻离心机, 于 0~1℃、9 000~10 000r/min 离心 30 分钟, 上清液作酶活力测定。

1.3 活力测定

胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力的测定: 按刘玉梅等[1991]方法。测胃蛋白酶活力时, 加入 0.5% 干酪素 2mL, 0.04M EDTA-Na₂ 0.1mL, 0.2M 柠檬酸缓冲液(pH 为 3.0) 为 0.4mL, 酶液为 0.4mL, 加入重蒸水, 使总体积为 3.5mL, 混匀。置于 37℃ 水浴中, 反应 15 分钟后加入 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 μg 酪氨酸作为一个酶活力单位(μg/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 0.05M 硼砂-氢氧化钠缓冲液(pH 为 9.8)。

淀粉酶活力的测定: 加入用 0.067M 磷酸缓冲液(pH 为 6.9) 配制的 1% 淀粉溶液 0.5mL, 酶液 0.5mL, 摇匀; 置于 25℃ 水浴中, 保温 3 分钟; 再加入 3,5-二硝基水杨酸指示剂溶液 2mL, 置于沸水浴 5 分钟后, 取出进行流水冷却, 定容至 10mL, 490nm 处比色测麦芽糖含量。25℃ 条件下, 每分钟催化淀粉生成 1 μg 麦芽糖作为一个酶活力单位(μg/min)。

纤维素酶活力测定: 加入 0.1M 醋酸缓冲液(pH 为 4.5) 4mL, 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 1mL, 酶液 0.5mL 重蒸水 1.5mL, 置于 40℃ 水浴中糖化 30 分钟; 取出立即于沸水浴煮沸 15 分钟, 取 1mL 糖化液, 加入 3,5-二硝基水杨酸显色剂 3mL, 于沸水浴煮沸显色 15 分钟, 冷却, 加重蒸水 6mL, 550nm 处测葡萄糖含量。在 40℃ 下, 每分钟催化纤维素生成 1 μg 葡萄糖作为一个酶活力单位(μg/min)。

脂肪酶活力测定: 在 37℃ 水浴中, 将空白瓶和样品瓶分别加入 0.025M 磷酸缓冲液(pH=7.5) 5mL, 聚乙烯醇底物溶液 4mL, 20% 牛磺胆酸钠溶液 0.4mL, 酶液 0.1mL, 空白瓶先加入 95% 乙醇 15mL, 混匀, 反应 10 分钟; 然后取出, 样品瓶立即加入 95% 乙醇 15mL, 再加入 1% 酚酞溶液 0.1mL, 用氢氧化钠标准溶液滴定测脂肪酸含量。在 37℃ 条件下, 每分钟催化产生 1 μmol 脂肪酸作为一个酶活力单位(μmol/min)。

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[北京大学生物系生物化学教研室编 1980]。

2 结果

2.1 各期幼体五种消化酶活力的变化

在中国对虾的个体发育过程中, 各

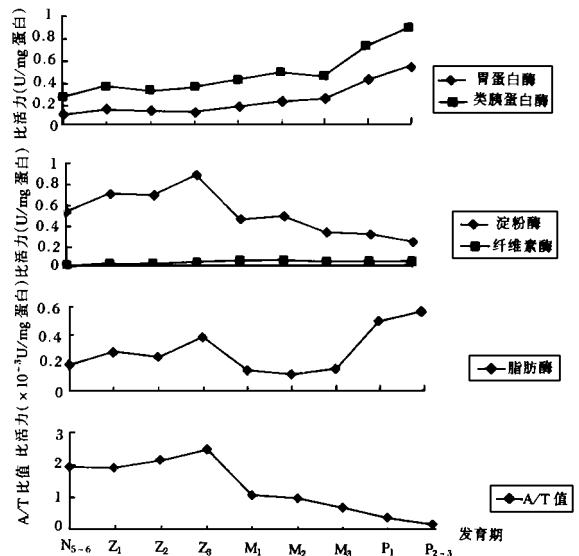


图1 中国对虾幼体不同发育期消化酶活力的变化
Fig. 1 The change of digestive enzyme activities in different larval stages of *Penaeus chinensis*

期幼体的五种消化酶活力有差异,表现出四种变化模式(图 1)。胃蛋白酶与类胰蛋白酶活力随着幼体生长发育逐渐增大,无节幼体期< 蚤状幼体期< 糠虾幼体期< 仔虾期。淀粉酶活力在幼体食性转换过程中逐渐减弱,蚤状幼体期> 糠虾幼体期> 仔虾期,但是在无节幼体期淀粉酶活力也较高。纤维素酶活力在幼体各发育期无多大变化。脂肪酶活力变化较大,糠虾幼体期< 无节幼体期< 蚤状幼体期< 仔虾期,这可能与投喂饵料种类有关。淀粉酶/类胰蛋白酶活力(A/T)比值的变化趋势与淀粉酶类似。

由表 1 可看出,类胰蛋白酶比胃蛋白酶活力大,约为 1.5~ 2 倍左右,淀粉酶活力较高,纤维素酶活力较低。在无节幼体期和蚤状幼体期,淀粉酶活力是纤维素酶活力的 20~ 30 倍左右;在糠虾幼体期和仔虾期,淀粉酶活力是纤维素酶的 10 倍左右。脂肪酶活力很弱。

表 1 中国对虾各期幼体消化酶活力比较

Table 1 The comparison of the digestive enzyme activities during larval development of *Penaeus chinensis*

发育期	胃蛋白酶	类胰蛋白酶	淀粉酶	纤维素酶	脂肪酶	A/T 比值
N ₅₋₆	0.12±0.03	0.28±0.02	0.54±0.05	0.15±0.04	0.19±0.02	1.93
Z ₁	0.16±0.04	0.37±0.03	0.71±0.12	0.31±0.07	0.28±0.11	1.92
Z ₂	0.14±0.01	0.32±0.08	0.69±0.07	0.27±0.02	0.24±0.06	2.16
Z ₃	0.13±0.06	0.35±0.10	0.88±0.07	0.39±0.01	0.38±0.11	2.51
M ₁	0.17±0	0.41±0.02	0.45±0.06	0.46±0.03	0.14±0.08	1.10
M ₂	0.21±0.01	0.47±0.05	0.48±0.02	0.52±0.03	0.11±0.02	1.02
M ₃	0.23±0.09	0.43±0.07	0.32±0.02	0.35±0.05	0.15±0.01	0.74
P ₁	0.39±0.33	0.69±0.12	0.30±0.04	0.33±0.04	0.48±0.04	0.44
P ₂₋₃	0.51±0.05	0.85±0.04	0.22±0.08	0.26±0.06	0.55±0.05	0.26

注:酶的活力以比活力表示,即活力单位/mg 蛋白(U/mg 蛋白),其中纤维素酶为 10⁻¹活力单位/mg 蛋白;脂肪酶为 10⁻³活力单位/mg 蛋白。A/T 比值为淀粉酶/类胰蛋白酶活力。表中数值以三次实验数据的标准差表示。下表同

2.2 饵料对中国对虾幼体消化酶活力的影响

表 2 饵料对中国对虾蚤状幼体消化酶活力的影响

Table 2 Effect of diets on the larval digestive enzyme activities of *Penaeus chinensis*

组别	胃蛋白酶	类胰蛋白酶	淀粉酶	A/T 比值	
Z ₁	o	0.11±0.03	0.27±0.05	0.55±0.08	1.90
	a	0.09±0.02	0.26±0.11	0.61±0.02	2.35
	b	0.08±0.01	0.21±0.03	0.68±0.04	3.24
	c	0.12±0.04	0.29±0.04	0.48±0.11	2.09
	d	0.21±0.08	0.37±0.05	0.38±0.01	1.03
Z ₂	o	0.18±0.07	0.24±0.02	0.62±0.03	2.58
	a	0.13±0.05	0.22±0.05	0.73±0.02	3.32
	b	0.12±0.04	0.20±0.01	0.79±0.03	3.95
	c	0.21±0.07	0.26±0.08	0.43±0.08	1.65
	d	0.24±0.04	0.37±0.02	0.45±0.06	1.22
Z ₃	o	0.16±0.04	0.28±0.13	0.52±0.01	1.86
	a	0.12±0.03	0.26±0.02	0.65±0.05	2.50
	b	0.10±0.06	0.24±0.04	0.76±0.02	3.17
	c	0.17±0.01	0.31±0.07	0.46±0.06	1.48
	d	0.19±0.02	0.39±0.02	0.39±0.01	1.00

注:表中 o 表示刚变态的蚤状幼体;a、b、c、d 分别表示投喂饵料种类为饥饿、新月菱形藻、蛋黄和虾粉

由表 2 可知,由于投喂不同饵料,中国对虾蚤状幼体(Z₁、Z₂、Z₃) 三种消化酶活力出现相应变化。对胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力的影响为:喂虾粉组> 喂蛋黄组> 刚变态组> 饥饿组>

喂单胞藻组; 淀粉酶活力的变化趋势为: 喂单胞藻 > 饥饿组 > 刚变态组 > 喂蛋黄组和喂虾粉组; A/T 比值的变化为: 喂单胞藻组 > 饥饿组 > 刚变态组和喂蛋黄组 > 喂虾粉组。

3 讨论

中国对虾幼体发育过程中五种消化酶活力表现出四种变化模式, 其中胃蛋白酶、类胰蛋白酶和纤维素酶活力的变化模式与刘玉梅等[1991]的测定结果相近, 而淀粉酶和脂肪酶活力的变化趋势与其他学者对白对虾(*Penaeus setiferus*) [Lovett 和 Filder 1990]、美洲龙螯虾(*Homarus americanus*) [Biesiot 和 Capuzzo 1990a]、和锯缘青蟹[汤 鸿等 1995]得到的结果类似, 说明不同消化酶有各自的调节机制, 同时也表明不同甲壳动物幼体消化酶有各自的调节系统。这与于书坤和张树荣[1986]关于甲壳动物不同种类由于占有不同的生态位置, 生活环境和食性各异, 因此不同种类之间消化酶活性和变化趋势差别很大的观点一致。

中国对虾在无节幼体期不摄食, 无完整口器和消化器官, 靠卵黄供给营养进行生长发育, 但是, 在如何利用营养物质方面, 尚未见报道。笔者测定结果表明 N_{5-6} 除纤维素酶外, 其它四种酶活力均较高, 说明在 N_{5-6} 时中肠腺已有了初步分化, 一方面分泌消化酶更好地利用卵黄物质, 促进幼体生长发育, 另一方面在生理生化上为变态后摄食作充分准备。王海林(1996)的研究结果也表明: N_5 已形成两对中肠腺盲囊, 出现了中肠腺雏形。

Kamarudin 等[1994]认为, 虾类幼体不同发育期消化酶活性变化与虾的食性相一致。据 Van Wormhoudt[1973]报道, 当锯额长臂虾(*Palaemon serratus*) 食性由浮游植物向浮游动物转化时, 其蛋白酶活力明显上升。中国对虾在整个幼体发育过程中, 胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力呈上升趋势, 表明消化酶活力受中肠腺发育程度的影响。这与王海林(1996)的观点相吻合。在中国对虾蚤状幼体期, 中肠腺盲囊由突起逐渐分枝形成初级中肠腺小管, 在糠虾幼体期分枝增多, 内壁出现皱褶, 仔虾期进一步分化为密集的指状中肠腺盲管, 最终形成中肠腺。在蚤状幼体期, 两种酶活力在 Z_1 就较高, 而且酶活力 $Z_1 > Z_2$ 和 Z_3 , 表明在 Z_1 时卵黄物质已消耗殆尽, 摄食本能较强, 以后由于受个体发育的影响酶活力下降, 表现为植物食性。在糠虾幼体期, 两种酶活力较高, 说明幼体由植物食性向肉食性转变, 尤其在仔虾期, 两种酶活力明显上升, 幼体转为肉食性。因此在中国对虾苗种生产中, 人工饵料的配方和投饵种类应根据消化酶活力和营养需求来确定。同时中国对虾各期幼体的类胰蛋白酶比胃蛋白酶活力高, 表明类胰蛋白酶对于蛋白质水解能力比胃蛋白酶高, 这也从一个侧面反映出中国对虾幼体蛋白酶对内外环境的适应性。

笔者测定出两种糖类水解酶: 淀粉酶和纤维素酶。淀粉酶活力随着中国对虾幼体发育逐渐减弱, 在 Z_3 时出现一个峰值, 而且从 Z_3 至 M_1 , 由植物食性为主向肉食性为主转变时, 出现一个明显的跃升, 故从 M_1 开始应投喂含蛋白质高的饵料, 以适应幼体的营养需求, 提高成活率。甲壳动物能否产生纤维素酶, 目前还有争议。据于书坤和张树荣[1986]报道, 纤维素酶在滤食性和杂食性动物中, 完全由肠道内的微生物产生, 而肉食性甲壳动物中, 纤维素酶是退化的痕迹, 毫无功能。

实验结果表明, 中国对虾幼体脂肪酶活力很低, 这与一些学者在其它甲壳动物中得到的结果一致[Biesiot 和 Capuzzo 1990b]。这可能因为反应条件不是最适(如底物)或方法不够灵

(1) 王海林, 1996. 中国对虾消化系统发生的研究. 青岛海洋大学硕士论文.

敏;也可能是生物本身脂肪酶活力很低甚至无,而以酯酶消化脂类。Bernier 和 Hammond [1970]发现在测试的许多无脊椎动物中,只有一半的种类具有脂肪酶活力,但全部具有酯酶活力。Lovett 和 Filder[1990]也认为白对虾只有酯酶而无脂肪酶。事实上,脂肪酶和酯酶的真正界限难以划分[Nachlas 和 Seligman 1949]。一般认为,脂肪酶的适宜底物为长链脂肪酸甘油酯,而且底物呈乳化状态而非水溶液。

许多学者利用动物个体发育中酶活力的变化作为营养状态指标来指导投饵 [Biesiot 和 Capuzzo 1990b],一般采用淀粉酶/蛋白酶活力(A/P)比值或淀粉酶/类胰蛋白酶(A/T)比值作为指标,比值高则为植物食性或偏植物食性,比值低则为肉食性或偏肉食性。在中国对虾幼体发育过程中,A/T 比值呈现由高到低的变化,在蚤状幼体期,A/T 比值较高,在 Z₃ 时 A/T 比值最高,至糠虾幼体期和仔虾期 A/T 比值明显下降,表明随着中国对虾幼体的发育,由植物食性向肉食性转变。这与从中国对虾幼体蛋白酶活力分析食性的结果一致。而汤 鸿等[1995]发现在锯缘青蟹幼体发育中,A/P 比值有较大的波动,与其食性不符。因此作者认为,采用 A/P 或 A/T 比值可以作为海洋甲壳动物幼体的食性指标,但尚需进一步验证。

由此可见,中国对虾幼体发育过程中消化酶的合成可能受遗传控制,取决于消化系统(中肠腺)的分化程度,同时在幼体不同发育阶段消化酶的调节机制不同,从而使各期幼体出现食性变化。

饵料实验结果表明,刚变态的蚤状幼体(Z₁、Z₂ 和 Z₃)投喂单细胞藻类(高碳水化合物)24 小时后,淀粉酶活力升高,胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力下降,A/T 比值增大,而投喂虾粉的与之相反,胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力上升,淀粉酶活力下降,A/T 比值也降低,说明消化酶活力受饵料中生化成分的诱导。这与 Das 等[1991]报道草鱼鱼种和成鱼消化酶活性取决于所摄食饵料的观点一致。饥饿后蚤状幼体淀粉酶活力升高,胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力下降,A/T 比值升高,进一步证明中国对虾幼体消化酶活力受个体发育的影响。

据许实荣等[1987]报道中国对虾的消化酶对饵料中的营养物质有着明显的适应性,这种特性可以作为对虾饵料中各种营养物质消化吸收和利用的重要指标。作者在饵料实验中发现,投喂虾粉组和饥饿组幼体死亡率较高,而投喂单细胞藻类和蛋黄组死亡率低,说明虽然饵料对幼体消化酶有一定的诱导作用,但是通过饵料对幼体存活、消化酶活力和食性影响的研究,可以选择适宜幼体营养需求的饵料,同时可根据饵料实验中幼体消化酶活力变化来检测人工饵料配方的合理性,为对虾幼体人工饵料的开发研制创立一种新的技术方法。

本研究系国家攀登 B(编号 PDB6-2-2)资助项目。

参 考 文 献

- 于书坤,张树荣. 1986. 虾类及甲壳动物消化酶研究的现状. 海洋科学, 10(2): 60~ 63.
 北京大学生物系生物化学教研室编. 1980. 生物化学实验指导. 北京: 人民教育出版社. 71~ 72.
 汤 鸿等. 1995. 锯缘青蟹幼体消化酶活力的实验研究. 厦门大学学报, 34(1): 88~ 93.
 刘玉梅等. 1991. 中国对虾幼体及仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究. 海洋与湖沼, 22(6): 571~ 575.
 许实荣等. 1987. 中国对虾营养研究. 海洋科学, 11(4): 34~ 37.
 Bernier D L, Hammond E G. 1970. Phylogeny of lipase specificity. Lipids, 5: 558~ 562.
 Biesiot P M, Capuzzo G M. 1990a. Change in digestive enzyme activities during early development of the American lobster

Homarus americanus. Mar Biol Ecol, 36(2): 107~ 122.

Biesiot P M, Capuzzo G M. 1990b. Digestive protease, lipase and amylase activities in stage I Larvae of the American lobster, *Homarus americanus*. Comp Biochem Physiol, 95A(1): 47~ 54.

Das K M, et al. 1991. Studies on digestive enzyme activities of fish *Ctenopharyngodon idella*. Aquac, 92(1): 21~ 30.

Kamarudin M S, et al. 1994. Ontogenetic change in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii*. Aquac, 123: 323~ 333.

Lovett D L, Filder D L. 1990. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of Larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus*. Biol Bull, 178: 144~ 159.

Nachlas M M, Seligman A M. 1949. Evidence for the specificity of esterase and lipase by use of three chromogenic substrates. J Biol Chem, 181: 343~ 355.

Van Wormhoudt A. 1973. Activite des Protease, des amylases et des proteines solubles au cours du developement larvaire chez *Palaemon serratus*. Mar Biol, 19: 245~ 248.

THE EXPERIMENTAL STUDIES ON ACTIVITIES OF DIGESTIVE ENZYME IN THE LARVAE *PENAEUS CHINENSIS*

PAN Lu-Qing and WANG Ke-Xing

(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, 266003)

ABSTRACT Activities of several digestive enzymes from larval *Penaeus chinensis* were analyzed with the enzyme analytical method during its ontogenetic development. The results showed that there were 4 different patterns in the activities of 5 digestive enzymes from larval prawn. The activities of pepsin enzyme and trypsin increased along with the growth of larval prawn, while the activities of amylase decreased. The activities of cellulase enzyme and lipase were fairly low. The activities of pepsin enzyme, trypsin and amylase changed obviously in feeding habits transformation. The activities of digestive enzyme from larval prawn were affected obviously by the different diets and ontogenetic development. The authors suggested that the activities of digestive enzyme in the larval prawn were associated with its genetic control and liver differentiation and adjusting mechanism.

KEYWORDS *Penaeus chinensis*, Larvae, Activities, Digestive enzyme