

凡纳滨对虾幼体胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力的研究

杨奇慧, 周歧存, 马丽莎, 迟淑艳

(湛江海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要:以酶学分析方法测定了凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei* Boone)蚤状幼体(Z_2)、糠虾幼体(M_2)和仔虾(P_1)胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力的变化。结果表明,在凡纳滨对虾幼体发育过程中,胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力逐渐增大,表现为 $Z_2 < M_2 < P_1$,各期类胰蛋白酶的活力均比同期的胃蛋白酶活力高5倍左右,在食性转换过程中,即 P_1 酶活力比 Z_2 酶活力和 M_2 酶活力显著升高($P < 0.05$),其中各期类胰蛋白酶活力的递增幅度均大于胃蛋白酶。说明了不同发育阶段,凡纳滨对虾胃蛋白酶和类胰蛋白酶的活力变化差异显著。

关键词:凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei* Boone);幼体;胃蛋白酶;类胰蛋白酶;活力

中图分类号:S917 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3096(2005)05-0006-04

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei* Boone),在分类上属于节肢动物门,甲壳纲,十足目,游泳亚目,对虾科,对虾属^[1]。凡纳滨对虾具有生长快,肉质鲜美,出肉率高,广盐性,耐高温等优点,是当今世界公认的最有养殖前途的3大优良虾种之一。目前,虽然凡纳滨对虾的育苗工作已具有一定的技术水平,但由于缺少对幼体的消化生理和营养需求的研究,导致在人工饵料特别是开口饵料的配制和合理投喂等方面仍存在着许多盲目性,最终影响凡纳滨对虾苗种的产量和质量。因此,开展虾类幼体不同发育阶段消化生理特别是消化酶活力变化的研究具有重要的意义。目前,关于虾类消化酶的活力变化,国内已有一些报道,如对于中国对虾(*Penaeus chinensis*)^[2,3]、日本对虾(*Penaeus japonicus*)^[4]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[5]的蚤状幼体、糠虾幼体和仔虾阶段胃蛋白酶和类胰蛋白酶的活力变化均有研究。但对于凡纳滨对虾幼体胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力的比较研究则较少^[6]。因此,对凡纳滨对虾幼体食性转换明显的3个阶段: Z_2 、 M_2 和 P_1 ,胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力的测定,可为凡纳滨对虾人工饲料研发提供数据依据,同时也有助于从消化生理的角度探讨凡纳滨对虾育苗的养成与营养需求的关系,为提高苗种产量提供科学参考。

1 材料和方法

1.1 材料

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei* Boone)取自湛江市荣达种苗场。根据对虾的生长阶段,分3个阶段取样:第一阶段 Z_2 ,第二阶段 M_2 ,第三阶段 P_1 。

取样后,立即放入冰瓶中,然后用预冷的双蒸水冲洗样品,并用滤纸吸干水分,置于冰箱(-20°C)中保存储备用。

1.2 方法

1.2.1 样品制备

准确称取样品0.3~0.5 g,放入已烘干的玻璃匀浆器中,并加入25倍体积预冷的双蒸水,置于冰浴中匀浆。匀浆液在 $0\sim 2^{\circ}\text{C}$,9000 r/min,冷冻离心30 min,弃沉淀,取上清液用作胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力的测定。

1.2.2 胃蛋白酶和类胰蛋白酶的活力测定

胃蛋白酶和类胰蛋白酶的活力测定参考刘玉梅法^[2],酶液的蛋白浓度:用福林-酚试剂法测定^[7],以牛血清白蛋白作标准曲线。

1.2.2.1 样品活力测定

取酶液0.4 mL后,加入0.5%干酪素溶液2 mL,0.04 mol/L的EDTA- Na_2 0.1 mL,0.2 mol/L柠檬酸缓冲液($\text{pH}=3.0$)0.4 mL,再加入重蒸水0.6 mL,混匀置于 37°C 水浴中15 min,取出。然后加入30%三氯乙酸1 mL,在 $0\sim 2^{\circ}\text{C}$,3600 r/min,冷冻离心15 min。取上清液1 mL,先加入5 mL 0.55 mol/L Na_2CO_3 溶液,再加入1 mL福林试剂乙溶液,混匀置于 37°C 水浴15 min,用(UV-755B)紫外分光光度计在波长680 nm下比色。

收稿日期:2004-08-26;修改日期:2004-12-12

作者简介:杨奇慧(1978-),女,广东湛江人,助教,从事水产动物营养与饲料的研究与教学工作,电话:0759-2362270, E-mail:qihuiyang03@163.com

1.2.2.2 样品测定时的空白对照

取 0.4 mL 双蒸水, 加入 0.5% 干酪素 2 mL, 0.04 mol/L 的 EDTA - Na₂ 0.1 mL, 0.2 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH=3.0) 0.4 mL, 再加入双蒸水 0.6 mL, 混匀置于 37℃ 水浴中 15 min, 取出。然后加入 30% 三氯乙酸 1 mL, 在 0~2℃, 3 600 r/min, 冷冻离心 15 min。取上清液 1 mL, 先加入 5 mL 0.55 mol/L Na₂CO₃ 溶液, 再加入 1 mL 福林试剂乙溶液, 混匀, 置于 37℃ 水浴 15 min, 用 (UV-755B) 紫外分光光度计在波长 680 nm 下比色。

酪氨酸活力单位的定义: 在 37℃ 下, 每分钟水解干酪素所产生 1 μg 酪氨酸定为一个活力单位 (U)。

比活力的定义: 单位蛋白 (mg) 中酪氨酸的活力单位。

表 1 凡纳滨对虾各期幼体胃蛋白酶活力的比较

Tab.1 Contrast to the activities of pepsin during early ontogeny of *Litopenaeus vannamei* Boone

生长期	蛋白质含量 (mg/mL)	酪氨酸含量 (μg/mL)	活力单位 (U)	比活力
Z ₂ (n=6)	3.217 ± 0.059	0.114 ± 0.090 ^b	0.086 ± 0.068 ^b	0.026 ± 0.021 ^b
M ₂ (n=6)	3.076 ± 0.483	0.687 ± 0.247 ^a	0.517 ± 0.185 ^a	0.164 ± 0.041 ^a
P ₁ (n=6)	3.208 ± 0.536	0.906 ± 0.209 ^a	0.680 ± 0.157 ^a	0.208 ± 0.051 ^a

注: 活力单位 (A/15) × F; A 为由标准曲线查得酪氨酸 μg 数; 15 为酶解时间; F 为粗酶液稀释倍数; 比活力 = 活力单位 / 蛋白质含量; 表中数据为平均数 ± 标准差, 同一列中具不同字母标记的值, 表示差异显著 (P < 0.05)。

凡纳滨对虾各期幼体类胰蛋白酶活力结果见表 2。从表 2 可知, M₂ 和 P₁ 类胰蛋白酶的比活力均显著高

类胰蛋白酶活力的测定, 其方法与胃蛋白酶活力的测定方法基本相似, 所用缓冲液改为 0.05 mol/L 硼砂 - 氢氧化钠缓冲液 (pH=9.8), 酶液改为 0.1 mL。

1.2.3 数据分析

实验数据用平均数 ± 标准差表示, 数据统计 SPSS (11.5) 分析软件对数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 并结合 Duncan's 进行多重比较, 检验不同发育阶段酶活的差异显著性 (P < 0.05)。

2 结果

凡纳滨对虾各期幼体胃蛋白酶活力见表 1。从表 1 可知, M₂ 和 P₁ 期胃蛋白酶的比活力均显著高于 Z₂ 期 (P < 0.05), M₂ 和 P₁ 之间差异不显著 (P > 0.05), 说明随着幼体的发育, 胃蛋白酶的活力不断升高。

于 Z₂ (P < 0.05), M₂ 和 P₁ 之间差异不显著 (P > 0.05), 说明随着幼体的发育, 类胰蛋白酶的活力也不断升高。

表 2 凡纳滨对虾各期幼体类胰蛋白酶活力的比较

Tab.2 Contrast to the activities of trypsin-like enzyme during early ontogeny of *Litopenaeus vannamei* Boone

生长期	蛋白质含量 (mg/mL)	酪氨酸含量 (μg/mL)	活力单位 (U)	比活力
Z ₂ (n=6)	3.217 ± 0.058	0.427 ± 0.239 ^b	1.281 ± 0.716 ^b	0.394 ± 0.205 ^b
M ₂ (n=6)	3.266 ± 0.495	1.156 ± 0.247 ^a	3.468 ± 0.742 ^a	0.868 ± 0.312 ^a
P ₁ (n=6)	3.106 ± 0.529	1.122 ± 0.548 ^a	3.656 ± 1.644 ^a	1.195 ± 0.627 ^a

表 3 凡纳滨对虾各期幼体胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力比较

Tab.3 Mensuration on the activities of pepsin and trypsin-like enzyme in different stages of *Litopenaeus vannamei* Boone

生长期	胃蛋白酶比活力	类胰蛋白酶比活力
Z ₂ (n=6)	0.026 ± 0.021	0.394 ± 0.205
M ₂ (n=6)	0.164 ± 0.041	0.868 ± 0.312
P ₁ (n=6)	0.208 ± 0.051	1.195 ± 0.627

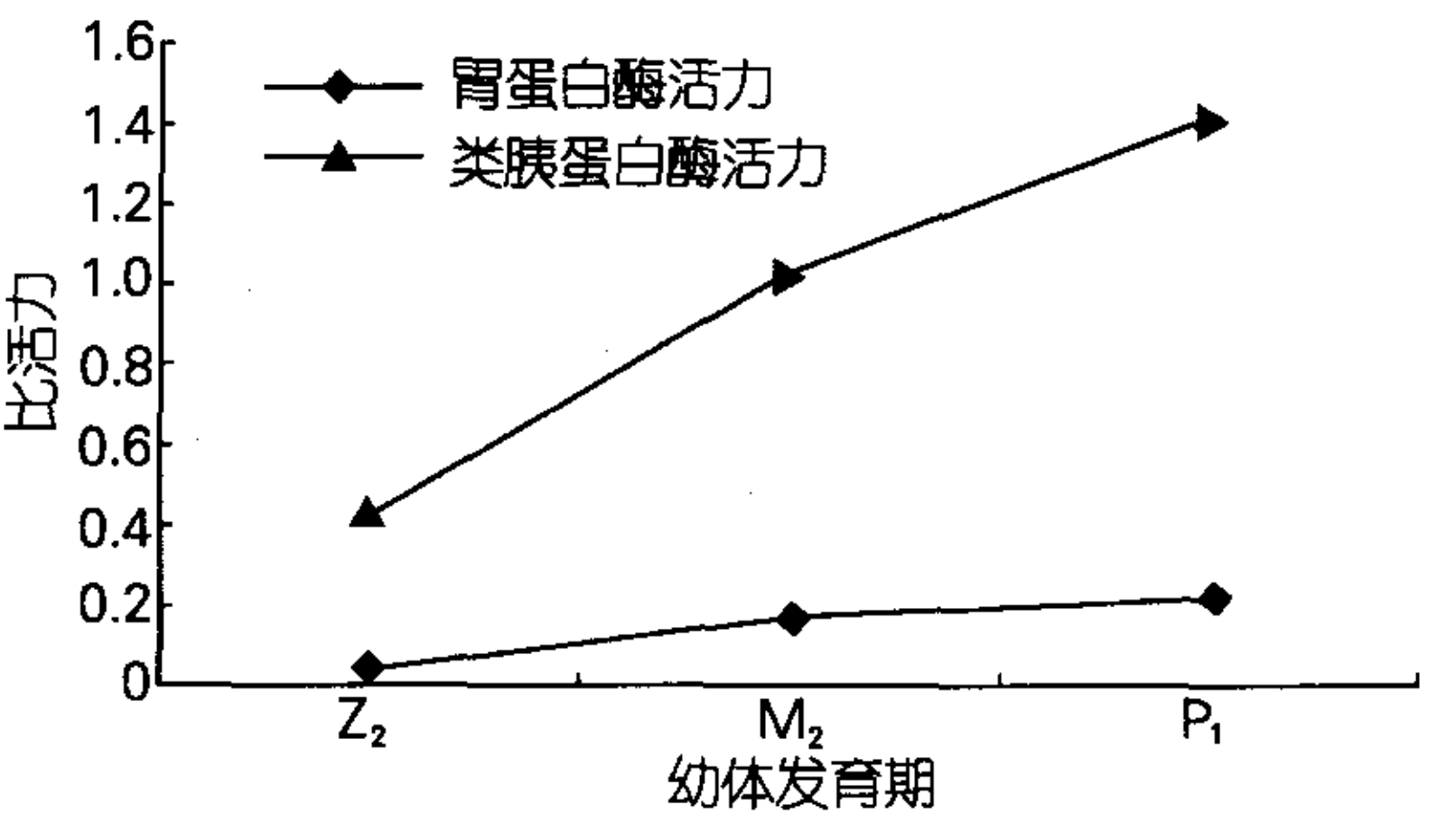


图 1 凡纳滨对虾幼体发育期胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力的比较

Fig. 1 Contrast to the activities of pepsin and trypsin-like enzyme during early ontogeny of *Litopenaeus vannamei* Boone

3 讨论

3.1 胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力的变化趋势

胃蛋白酶是胃液的重要消化酶,它能使食物中的蛋白质水解为蛋白胨以及少量的多肽和氨基酸,而类胰蛋白酶是由胰腺分泌的,它能分解蛋白质为蛋白胨,这两种蛋白酶对于蛋白的消化过程中起着重要的作用。

从表 1、2 和图 1 可知,凡纳滨对虾的幼体胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力均表现为: $Z_2 < M_2 < P_1$, M_2 和 P_1 期胃蛋白酶和类胰蛋白酶的比活力均显著高于 Z_2 期 ($P < 0.05$), M_2 和 P_1 之间差异不显著 ($P > 0.05$),其中, M_2 活性胃蛋白酶是 Z_2 活性的 6.3 倍左右,而 P_1 活性是 M_2 活性的 1.3 倍左右; M_2 类胰蛋白酶活性是 Z_2 活性的 2.2 倍左右, P_1 是 M_2 的 1.4 倍左右,说明胃蛋白酶和类胰蛋白酶的活力随着幼体的不断发育,其活力逐渐升高。本实验所测得胃蛋白酶和类胰蛋白酶的活力变化趋势与中国对虾^[2,3]、罗氏沼虾^[5]、凡纳滨对虾^[6]、日本对虾^[4]的变化趋势相似,但本实验测得的胃蛋白酶比活力略低于上述研究结果,类胰蛋白酶比活力的数值略高于其它研究结果。

许多研究表明:胃蛋白酶和类胰蛋白酶活性受众多因素影响,其中 Ca^{2+} 浓度、盐度和 pH、饲料营养水平等因素对其活力影响较大。王维娜等^[9]指出, Ca^{2+} 对日本对虾的胃蛋白酶有促进作用, Ca^{2+} 质量浓度为 150 mg/mL 时胃蛋白酶活力最高,而对类胰蛋白酶有抑制作用;胃蛋白酶、类胰蛋白酶的活力在盐度为 14 时,均高于盐度为 7 和 20 时的活力;随着 pH 值升高,酶活力也随着增高, pH=9.8 时达到最高值^[9]。而钱国英^[10]研究表明胃蛋白酶和类胰蛋白酶的活力随投饲和摄食活动的变化而变化,投饲后,鳃鱼体内胃蛋白酶和类胰蛋白酶活性缓慢上升;摄食后,食物进入消化道胃蛋白酶和类胰蛋白酶活性则迅速升高,并且在摄食条件下,消化道类胰蛋白酶的活性高于胃蛋白酶的活性^[10]。饲料中不同蛋白水平对罗氏沼虾的生长和消化酶活性也有影响,随着饲料中蛋白水平的上升,胃蛋白酶和类胰蛋白酶比活性呈逐渐上升的趋势^[11]。此外,温度也是重要的影响因素之一。在 18~38℃ 反应温度范围内,蛋白酶活性随温度的升高而升高,在 30℃ 以上增加较快,在 23~30℃ 饲养水温下,蛋白酶活性随水温升高而增大,其活性增幅在反应温度下大于饲养温度下,饲养温度除直接影响酶活性外,还通

过调节机体的代谢,改变体内的离子质量浓度、pH 等,从而间接影响了酶活性^[12]。于书坤和张树荣研究认为,甲壳动物不同种类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力和变化趋势有所差别^[13]。可见,胃蛋白酶和类胰蛋白酶活性在不同的实验条件下变化较大。

3.2 胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力的比较

从实验中可以得出:胃蛋白酶和类胰蛋白酶比活力均表现为 $Z_2 < M_2 < P_1$, 各期类胰蛋白酶活性均高于胃蛋白酶活性 5 倍左右,且类胰蛋白酶活性在糠虾幼体期的递增幅度明显小于胃蛋白酶活性的递增幅度(见图 1),说明了虾类早期幼体发育阶段蛋白酶的消化主要以类胰蛋白酶为主。此次试验所测得的胃蛋白酶和类胰蛋白酶的活力变化趋势与中国对虾^[2,3]、日本对虾^[4]、罗氏沼虾^[5]和南美白对虾^[6]的变化趋势相似。但本实验所得数值(类胰蛋白酶与胃蛋白酶的比值)比上述研究者的略高。如中国对虾,各期类胰蛋白酶活性均高于胃蛋白酶活性 3 倍左右^[3],凡纳滨对虾各期类胰蛋白酶活性均高于胃蛋白酶活性 2 倍左右^[6]。

3.3 胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力变化与食性的关系

虾类幼体不同发育期消化酶活力变化与虾的食性转换相一致^[14]。在凡纳滨对虾育苗过程中,无节幼体期不投喂饵料,状幼体期以投喂单胞藻为主,然后逐渐过渡到投喂轮虫、丰年虫无节幼体等动物性活饵。对投喂饵料的种类变化而言,凡纳滨对虾在整个幼体发育中,胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力的变化与饵料的种类具有一定的相关性。糠虾幼体期开始投喂动物性饵料,则其蛋白酶的活性就比状幼体期以投喂单胞藻类蛋白酶的活性大得多。在凡纳滨对虾整个幼体发育中,胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力呈上升趋势,表明消化酶活力与中肠腺的发育程度有一定的关系。在凡纳滨对虾状幼体期,中肠腺盲囊由突起逐渐分枝形成初级中肠腺小管,而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。随虾体消化器官逐渐成熟,其消化能力也逐渐增强。因此,对蛋白质等高分子物质的分解能力也相应的逐渐增强,表现为其消化酶活性的升高,在仔虾后就投喂以动物性饵料为主的饵料。因此,本实验所得凡纳滨对虾的蛋白酶的活力随着幼体的发育而逐渐增大与虾的食性变化是一致的。

参考文献:

- [1] 林治术, 高庆良, 高东英. 南美白对虾渤海湾全人工繁殖技术研究[J]. 海洋科学, 1997, 6: 10 - 12.
- [2] 刘玉梅, 朱谨钊. 对虾消化酶的研究[J]. 海洋科学, 1984, 5: 215 - 219.
- [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] 潘鲁青, 王伟. 日本对虾幼体几种消化酶活力的研究[J]. 海洋湖沼通报, 1997, 2: 15 - 18.
- [5] 朱春华, 李广丽, 邓筑虹, 等. 罗氏沼虾幼体及成虾消化酶活力的研究[J]. 水利渔业, 2003, 23(3): 12 - 13.
- [6] 朱春华, 李广丽, 文海翔, 等. 南美白对虾早期幼体消化酶活力的研究[J]. 海洋科学, 2003, 27(5): 54 - 56.
- [7] 赵亚华. 生物化学实验技术教程[M]. 华南理工大学出版社, 2000: 38 - 40.
- [8] 中山大学生物系生化微生物学教研室. 生化技术导论[M]. 北京: 人民教育出版社, 1978, 52 - 54.
- [9] 王维娜, 孙儒泳, 王安利, 等. 环境因子对日本沼虾消化酶和碱性磷酸酶的影响[J]. 应用生态学报, 2002, 13(9): 1153 - 1156.
- [10] 钱国英. 不同驯食方式对鳊鱼胃肠道消化酶活性的影响[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(2): 207 - 210.
- [11] 董云伟, 牛翠娟, 杜丽. 饲料蛋白水平对罗氏沼虾生长和消化酶活性的影响[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2001, 37(1): 96 - 98.
- [12] 陈品健, 王重刚, 陆浩, 等. 真鲷幼鱼消化酶活性与温度的关系[J]. 厦门大学学报, 1998, 37(6): 931 - 935.
- [13] 于书坤, 张树荣. 虾类及甲壳动物消化酶研究的现状[J]. 海洋科学, 1986, 10(2): 60 - 63.
- [14] Kamarudin M S, Jones D A, Vay L L, et al. Ontogenetic change in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Aquaculture*, 1994, 123(3/4): 323.

Pepsin and trypsin - like enzyme activities in larvae of *Litopenaeus vannamei* Boone

YANG Qi - hui, CHOU Qi - cun, MA Li - sha, CHI Shu - yan
(Fisheries College of Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Received: Aug. , 26, 2004

Key words: *Litopenaeus vannamei* Boone; larval; pepsin; trypsin - like enzyme; activities

Abstract: An experiment was conducted to determine the activities of pepsin and trypsin - like enzyme in the larvae of *Litopenaeus vannamei* Boone using enzyme analytical method. The results indicated that the activities of pepsin and trypsin-like enzyme increased with the growth of larval prawn: zoea stage < mysis stage < post larval stage. The activities of trypsin - like enzyme were about 5 times higher than that of pepsin during early ontogeny of *Litopenaeus vannamei* Boone. During feeding habits changing, the activities of pepsin and trypsin - like enzyme in the post larval stage increased the most, and the activities of trypsin - like enzyme increased higher than that of pepsin.

(本文编辑: 谭雪静)