

中国对虾消化酶的研究

I. 消化酶的活力测定及性质的研究*

于 书 坤

(中国科学院海洋研究所)

在对虾配合饵料研究中,首先要了解对虾对各种饵料成分的消化利用能力,才能配成成本低、生长效果好的饵料。评价消化利用能力的标准之一就是对虾消化酶的种类及其比活力的大小。

近年来,随着甲壳动物养殖事业的发展,已有不少学者在甲壳动物中做过消化酶的研究。但从目前的研究来看,由于每一种甲壳动物各占有不同的小生境,消化酶的种类和比活力的大小存在着差别^[6,8,11],因而很难利用这些研究结果来评价中国对虾 *Penaeus orientalis* 对各种饵料成分的消化利用能力。为此本文对中国对虾消化酶进行探讨。

一、实验方法

1. 酶液的制备 取 2—5 g 对虾的肝胰脏加 5 倍的冷重蒸水, 5000 rpm 匀浆 1 分钟;然后于 $24000 \times g, 0^{\circ}\text{C}$ 下离心 30 分钟。清液作为酶原液,在 5°C 条件下保存。测定活力时进行适当稀释。

2. 酶活力的测定 胰蛋白酶、糜蛋白酶、羧肽酶 A 及羧肽酶 B 的活力测定按 Devillez 的方法^[7]。分别用 TAME, BTEE, CGP, HAA¹⁾ 作为底物。胰蛋白酶、糜蛋白酶的活力单位定义为: 25°C 时每分钟对 247 nm 光的吸收增加 0.001 为 1 个 TAME 或 BTEE 单位。羧肽酶 A 的活力单位定义为: 25°C 时每分钟产生 1 mmol/L 的苯丙氨酸为 1 个 CGP 单位。羧肽酶 B 的活力单位定义为: 25°C 时每分钟对 254 nm 光的吸收增加 0.001 为 1 个 HAA 单位。酪蛋白酶的活力测定按浅原允雄的方法^[2],每小时产生 1 μg 酪氨酸定义为 1 个活力单位。

淀粉酶的活力测定基本按 Bernfeld 法^[4],反应混合物的组成有改动(详见图 3 b 说明)。麦芽糖酶、蔗糖酶、乳糖酶、纤维二糖酶及海藻糖酶的活力测定按改进的 Tauber-Kleiner 法^[9]。 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶的活力测定分别以邻硝基苯

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1158 号。本文由姜康后研究员指导完成。

收稿日期: 1985 年 2 月 26 日。

1) TAME, BTEE, CGP, HAA 分别代表 N_α -对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯、苯甲酰-L-酪氨酸乙酯、苄氧羰基甘氨酸苯丙氨酸、苯甲酰甘氨酸精氨酸。

- α -D-半乳糖苷 (ON- α -Gal)、邻硝基苯- β -D-半乳糖苷 (ON- β -Gal) 及对硝基苯- β -D-葡萄糖苷 (PNPG) 为底物。反应混合物包括 0.5 mL 2 mmol/L 的底物液, 0.5 mL 0.1 mol/L pH 6.2 的醋酸缓冲液及 0.5 mL 酶液。37°C 保温 1 小时立即加入 1 mL 1 mol/L 的 Na_2CO_3 终止反应, 以对照作空白测 420 nm 的光吸收。各种糖酶的活力单位定义为: 37°C 时每小时产生 1 μg 还原糖为 1 个活力单位。

脂酶的活力测定^[1]是以橄榄油为底物, 用 NaOH 滴定底物水解产生的脂肪酸。活力单位定义为: 37°C 时每分钟产生 1 mmol/L 的脂肪酸为 1 个活力单位。脂酶的活力测定直接用匀浆液作为粗酶液。

3. 蛋白浓度的测定 酶液蛋白浓度的测定按 Lowry 法^[10], 用牛血清蛋白作标准。

二、结果与讨论

1. 蛋白水解酶的比活力 从表 1 可以看出, 对虾的肝胰脏存在着胰蛋白酶、糜蛋白酶、羧肽酶 A、羧肽酶 B 及酪蛋白酶, 且活力较高, 由此可见对虾有着较强的消化蛋白质的能力。

表 1 对虾蛋白水解酶的比活力

酶	底物	pH	比活力
胰蛋白酶	TAME	8.0	3579
糜蛋白酶	BTEE	7.1	22
羧肽酶 A	CGP	6.0	9.6×10^{-4}
羧肽酶 B	HAA	7.1	204
酪蛋白酶	酪蛋白	8.0	2553

注: 实验材料为平均体重 49g 的未产卵亲虾, 用新鲜的双壳类软体动物作饵料。

从表 1 还可以看到, 胰蛋白酶的比活力远比糜蛋白酶的高, 这种现象在螯虾 *Cambarus affinis* 和河虾 *Astacus astacus* 中也观察到^[8]。羧肽酶 A 和羧肽酶 B 的比活力比 *Dreissena polymorpha* 消化液提取物中测到的比活力高两倍多^[7]。

2. 糖酶和脂酶的比活力 从表 2 可以看出, 在各种糖酶中淀粉酶和麦芽糖酶的比活力最高, 把淀粉水解成可吸收的单糖形式主要靠这两种酶的共同作用。因此, 推测对虾对淀粉有一定的利用能力。

从表 2 还可以看出, 纤维二糖酶、 β -葡萄糖苷酶的比活力远比麦芽糖酶的低, 说明对虾利用纤维素和纤维二糖的能力不大。在实验条件下未测到蔗糖酶、乳糖酶、海藻糖酶和 α -半乳糖苷酶的活力, β -半乳糖苷酶的比活力也很低, 这可能说明对虾对蔗糖、乳糖、海藻糖及棉子糖的利用能力有限。其中棉子糖的水解需要蔗糖酶和蜜二糖酶 (α -半乳糖苷酶) 的作用。金沢昭夫等^[3]曾报道, 日本对虾 *Penaeus japonicus* 以麦芽糖作为饵料中糖的来源时, 其生长率和蛋白质利用效率都较用蔗糖或乳糖时为高, 这似乎说明日本对虾消化利用蔗糖和乳糖的能力不及麦芽糖。

比较表 2 和表 1, 脂酶的比活力比羧肽酶 A 的比活力低, 与 Brun 等^[2]对黄道蟹 *Cancer irroratus* 的测定结果相近。从目前的研究来看, 脂酶广泛存在于十足类甲壳动物中, 从其

表 2 稚虾与产完卵亲虾消化酶的比活力

酶	底物	pH	稚虾比活力 ¹⁾	产完卵亲虾比活力 ²⁾
α -淀粉酶	可溶性淀粉	6.6	52308	11166
麦芽糖酶	麦芽糖	6.2	4420	700
蔗糖酶	蔗糖	6.2	—	—
纤维二糖酶	纤维二糖	6.2	140	—
乳糖酶	乳糖	6.2	—	—
海藻糖酶	海藻糖	6.2	—	—
α -半乳糖苷酶	ON- α -Gal	6.2	—	—
β -半乳糖苷酶	ON- β -Gal	6.2	222	17
β -葡萄糖苷酶	PNPG	6.2	756	106
脂酶	橄榄油	7.5	1.6×10^{-4}	—
酪蛋白酶	酪蛋白	8.0	2158	—

1) 实验材料为平均体重 0.51 g 的稚虾,用新鲜的双壳类软体动物作饵料。

2) 实验材料为平均体重 75 g 产完卵的亲虾,饵料同稚虾。

不少种类的消化液中还找到了帮助脂肪消化的乳化剂。从这些事实推测,对虾对脂肪有一定的消化利用能力。

3. 产完卵亲虾与稚虾糖酶比活力的比较 表 2 表明产完卵亲虾的糖酶,包括淀粉酶、纤维二糖酶、 β -半乳糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶的比活力都比稚虾的低得多;其麦芽糖酶的比活力只有稚虾的 $\frac{1}{6}$ 。由此可见,糖酶的比活力与对虾所处的生理状态密切相关。

4. 抑制剂对蛋白水解酶活力的影响 图 1 a, b 说明对虾的胰蛋白酶活力受大豆胰蛋白酶抑制因子 (SI) 及丝氨酸蛋白酶的专一性抑制剂对甲苯磺酰-L-赖氨酰氯甲酮 (TLCK) 的抑制。表明它和哺乳动物的胰蛋白酶一样,属于以丝氨酸为活性中心的蛋白酶。

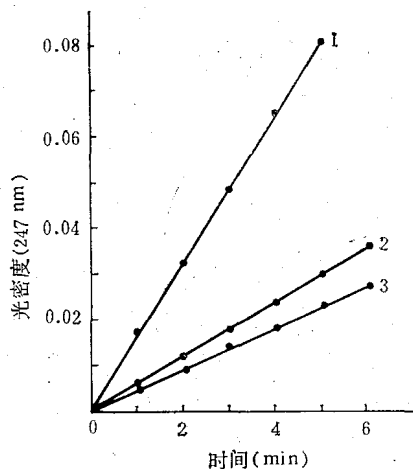


图 1a SI 对胰蛋白酶的抑制

在分析酶活力前,酶和 SI 在 25℃ 下预保温 10 分钟。
1 为对照;2, 3 的 SI 含量分别为 0.154 μ g 和 0.200 μ g

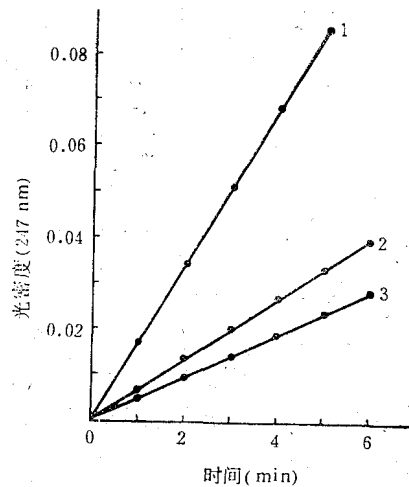


图 1b TLCK 对胰蛋白酶的抑制

在分析酶活力前,酶和 TLCK 在 25℃ 下预保温 30 分钟。1 为对照;2, 3 的 TLCK 含量分别为 1.01 μ g 和 1.32 μ g

图 2a 表明,SI 对酪蛋白酶的抑制特点是随抑制剂含量的增加,抑制程度逐渐增大,直到 SI 的含量达到每 mL 反应混合物含 $27\ \mu\text{g}$ 为止,这时酪蛋白酶活力的 75% 已被 SI 抑制。由此可见,用大豆制品作为饵料成分时,必须经过处理,使所含的 SI 变性,否则会影响对虾对蛋白质的消化。

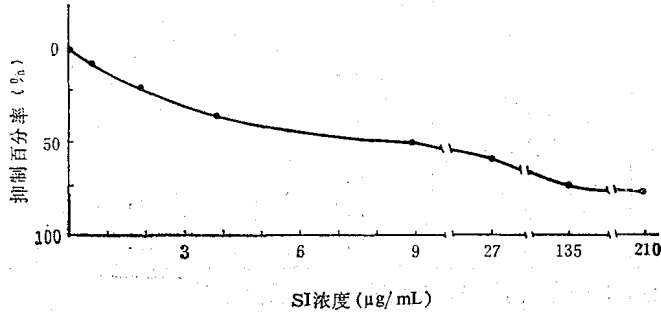


图 2a SI 对酪蛋白酶的抑制曲线
在分析酶活力前,酶和 SI 在 25°C 下预保温 10 分钟

图 2b 表明, TLCK 对酪蛋白酶的抑制情况完全不同于 SI。当抑制剂含量增加时,抑制程度迅速达到最大,这时只有 35% 的酪蛋白酶活力被抑制。这说明以丝氨酸为活性中心的蛋白水解酶在蛋白质的消化过程中所起的作用只占全部蛋白水解酶的 $\frac{1}{3}$; 除胰蛋白酶外,对虾的其它蛋白水解酶可能也受 SI 的抑制。

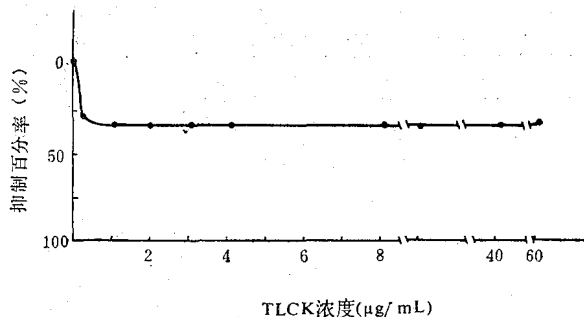


图 2b TLCK 对酪蛋白酶的抑制曲线
在分析酶活力前,酶和 TLCK 在 25°C 下预保温 30 分钟

5. 温度、pH、保存时间、激活剂对酪蛋白酶和淀粉酶活力的影响 图 3a, b 说明酪蛋白酶的最适温度在 47°C 左右, 淀粉酶则在 37°C 左右。图 4a, b 说明酪蛋白酶的最适 pH 范围为 8—9, 淀粉酶则为 $\text{pH} = 5—6$ 。酪蛋白酶和淀粉酶的这些性质分别与浅原允雄^[2]对鹰爪虾 *Trachypenaeus curvirostris*, Van Wormhoudt 等^[12]对长臂虾 *Palaemon serratus* 测定的结果相符合。

从图 4a 还可以看出,以酪蛋白为底物时,在酸性范围内测到的酶活力很低,一般不能认为这是胃蛋白酶的作用。许多研究者,包括 Vonk^[13], Gibson^[8] 都认为甲壳动物和其他无脊椎动物一样,不具有胃蛋白酶。

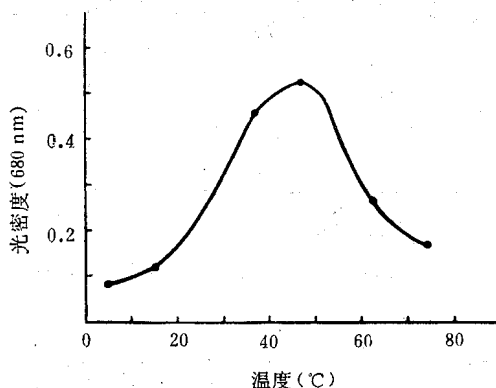


图 3a 温度对酪蛋白酶活力的影响

反应混合物包括 1mL 酶液, 1 mL 1% 的酪蛋白液, 3mL pH = 8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液。保温时间为 1 小时

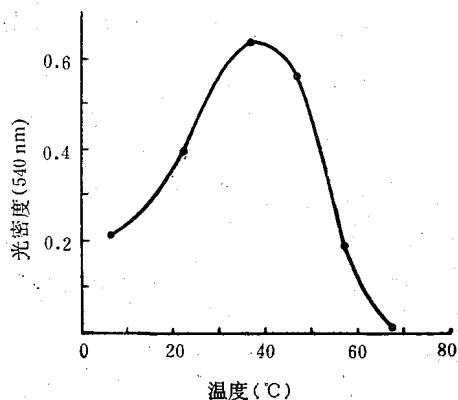


图 3b 温度对淀粉酶活力的影响

反应混合物包括 1mL 酶液, 1 mL 1% 的淀粉液, 3mL 含 83 mmol/L NaCl, pH = 6.6 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液。保温时间为 1 小时

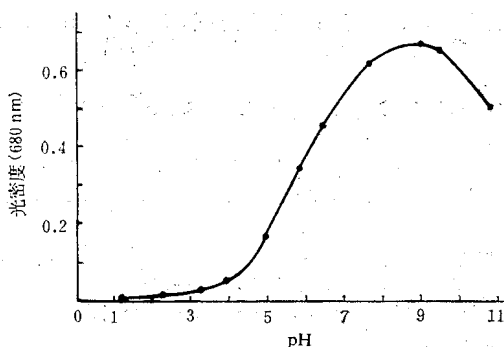


图 4a pH 对酪蛋白酶活力的影响

pH = 1.0—2.3 采用 KCl-HCl 缓冲液, pH = 3.0—11.0 采用广范围的缓冲液。反应温度为 37°C, 其它条件同图 3a

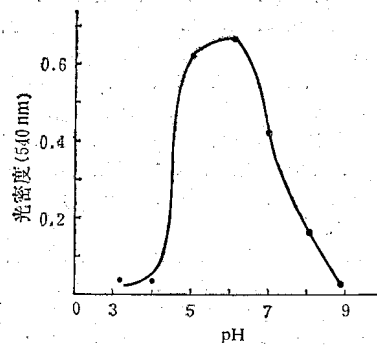


图 4b pH 对淀粉酶活力的影响

采用广范围的缓冲液, 反应温度为 37°C, 其它条件同图 3b

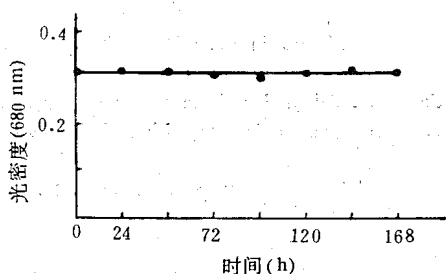


图 5a 酪蛋白酶活力随时间的变化

测定活力时的反应温度为 37°C, 其它条件同图 3a

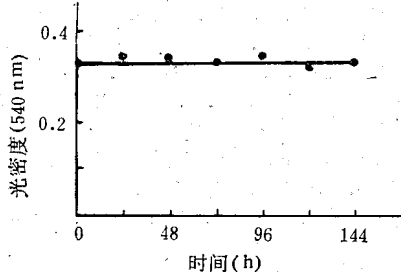


图 5b 淀粉酶活力随时间的变化

测定活力时的反应温度为 37°C, 其它条件同图 3b

图 5a, b 表明, 粗酶液(蛋白浓度在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上)保存于 5°C 条件下, 一周之内, 酪蛋白酶和淀粉酶的活力几乎无变化。

我们的实验表明, 对虾的淀粉酶和其他来源的 α -淀粉酶一样, 受 Cl^- 激活。当在测

定对虾淀粉酶的反应体系中加入 50 mmol/L 的 Cl^- 时,测到的活力比对照高 3 倍多。

三、小 结

从消化酶的种类和比活力的大小来看,对虾有着较强的消化蛋白质、淀粉及脂肪的能力,而消化纤维素及纤维二糖的能力有限。在实验条件下未能测到蔗糖酶、乳糖酶、海藻糖酶及 α -半乳糖苷酶的活力,对虾是否能利用蔗糖、乳糖、海藻糖及棉子糖还有待于进一步研究。

大豆所含的胰蛋白酶抑制因子能抑制对虾蛋白水解酶活力的 75%,因此,用作对虾饵料的大豆制品必须经过处理,使抑制因子失活,否则将影响对虾对蛋白质的消化。

参 考 文 献

- [1] 中山大学生物系生化微生物学教研室,1978. 生化技术导论. 人民教育出版社,第 58 页。
- [2] Asahara, M. (浅原允雄), 1973. Studies on proteolytic enzyme in the liver of the shrimp *Trachypenaeus curvirostris*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 39: 987—991.
- [3] Abdel-Rahman, S. H., A. Kanazawa (金沢昭夫) and S. Teshima (手岛新一), 1979. Effects of dietary carbohydrates on the growth and the levels of the hepatopancreatic glycogen and serum glucose of prawn. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 45: 1491—1494.
- [4] Bernfeld, P., 1955. Amylases, α and β . In *Methods in Enzymology* (Ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan) Academic Press, N. Y., Vol. 1, p. 149.
- [5] Brun, G. L. and M. B. Wojtowicz, 1976. A comparative study of the digestive enzymes in the hepatopancreas of Jonah crab (*Cancer borealis*) and Rock Crab (*Cancer irroratus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 53(B): 387—391.
- [6] Dall, W. and David G. W. Moriarty, 1982. Functional aspects of nutrition and digestion In *The Biology of Crustacea*. (Ed. by L. H. Mantel) Academic Press, N. Y., Vol. 5, pp. 231—241.
- [7] Devillez E. J., 1965. Isolation of the proteolytic digestive enzymes from the gastric juice of the crayfish *Orconectes virilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 14: 577—586.
- [8] Gibson, R. and P. L. Barker, 1979. The *Decapod hepatopancreas*. In *Oceanography and Marine Biology Annual Review* (Ed. by M. Barnes). Aberdeen University Press, Vol. 17, pp. 305—326.
- [9] Kawai, S (川合真一郎) and M. Yamada (池田静德), 1971. Studies on digestive enzymes of fishes—I. Carbohydrases in digestive organs of several fishes. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 37: 333—337.
- [10] Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randal, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 267—275.
- [11] Sather B. T., 1969. A comparative study of amylases and proteinases in some Decapod Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 28: 371—379.
- [12] Van Wormhoudt A., H. J. Ceccaldi and B. J. Martin, 1980. Adaptation de la teneur en enzymes digestives de l'hépatopancréas de *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapod), a la composition d'aliments expérimentaux. *Aquaculture* 21: 63—78.
- [13] Vonk H. J., 1960. Digestion and metabolism. In *The Physiology of Crustacea* (Ed. by T. H. Waterman). Academic Press, N. Y., Vol. 1, pp. 295—297.

STUDIES ON THE DIGESTIVE ENZYMES OF THE PRAWN *PENAEUS ORIENTALIS* I. MEASUREMENT OF SPECIFIC ACTIVITIES AND STUDIES OF PROPERTIES*

Yu Shukun

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica*)

ABSTRACT

1. The specific activities of caseinase, trypsin, carboxypeptidase A and B, α -amylase, maltase and lipase in the hepatopancreases of the prawn are far greater than those of chymotrypsin, β -glucosidase and β -galactosidase.
2. The specific activities of the carbohydrases in the juvenile prawn, including those of α -amylase, maltase, β -glucosidase, β -galactosidase are much greater than those in the spawned female prawn.
3. The activities of caseinase and trypsin can be inhibited by soybean inhibitor or tosyl-lysyl-chloromethylketone (TLCK).

* Contribution No. 1158 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.