

文章编号:1000 - 0615(2005)05 - 0624 - 06

## 大菱鲂肠道蛋白酶的分离纯化及性质的初步研究

王海英<sup>1</sup>, 薛长湖<sup>2</sup>, 孙 谧<sup>1</sup>, 王跃军<sup>1</sup>, 王清印<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003)

**摘要:**以大菱鲂肠道为材料,对大菱鲂消化生理中起重要作用的肠蛋白酶的分离纯化条件和理化性质进行了研究。经 Tris-HCl 缓冲液抽提,硫酸铵分级分离,DEAE-Sephacrose Fast Flow 离子交换层析、Sephadex G-100 凝胶过滤层析分离纯化,获得大菱鲂肠蛋白酶 的电泳纯制品,并对该酶的性质进行了研究。结果显示:纯酶的分子量约为 58 kD。纯酶最适反应 pH 为 9.0,最适反应温度 50 ;pH 稳定范围 6.0~11.0,30 以下酶活性稳定;Mn<sup>2+</sup>可激活大菱鲂肠蛋白酶 ,Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>、Fe<sup>3+</sup> 则对酶活性有抑制作用;巯基蛋白酶抑制剂显著抑制大菱鲂肠蛋白酶的活性,金属蛋白酶抑制剂对大菱鲂肠蛋白酶 无影响。50 、pH 9.0 条件下以双倒数作图法得大菱鲂肠蛋白酶 催化酪蛋白水解的 Km 值为 2.92 g L<sup>-1</sup>。

**关键词:**大菱鲂;肠蛋白酶;纯化;性质

**中图分类号:**S917 **文献标识码:**A

## Preliminary study on purification and partial characterization of the intestine protease from *Scophthalmus maximus* L.

WANG Hai-ying<sup>1</sup>, XUE Chang-hu<sup>2</sup>, SUN Mi<sup>1</sup>, WANG Yue-jun<sup>1</sup>, WANG Qing-yin<sup>1</sup>

(1. Institute of Yellow Sea Fishery Research, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Department of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** A proteinase, which has important work on turbot digestive, was purified from turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and its major physical and chemical characteristics were studied and reported in this article. The intestine proteinase extraction was prepared through homogenate and centrifugation by Tris-HCl buffer at low temperature. The supernatant was purified through ammonium sulfate grading precipitation further and the active component was dialyzed and concentrated. Then the condensed proteinase was purified by means of DEAE-Sephacrose Fast Flow anion-exchange chromatography with an elution of a linear gradient of 5 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl buffer (pH 8.5) containing 1.0 mol L<sup>-1</sup> NaCl. At last, the pure enzyme was obtained through Sephadex G-100 chromatography with an elution of 5mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl buffer (pH 8.5). The purity of the purified intestine proteinase was confirmed by the presence of a single band on SDS-PAGE. The relative molecular mass of this enzyme was determined to be about 58 kD. By using casein as substrate to measure proteinase activity, the characterization of turbot intestine proteinase was made. The enzyme is stable at pH 6.0 - 11.0 and temperature below 30 . When the temperature rose, there was a rapid decline of its stability. The enzyme showed maximum activity at pH 9.0 and 50 . When the temperature declined, the optimum pH of enzyme showed a trend of moving to alkaline. And when the action time prolonged, the optimum temperature of enzyme showed a trend to decline. Furthermore, the enzyme is activated by Mn<sup>2+</sup> and inactivated by Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Fe<sup>3+</sup>. In further studies, it was inhibited by SH-enzyme inhibitors such as p-Hydroxymercuribenzoate (PCMB) and N-bromosuccinimide (NBS) remarkably, and partially inhibited by tosyl-lysine chloromethyl ketone (TLCK). Using casein as the substrate, the Km value of enzyme is 2.92 g L<sup>-1</sup> at pH 9.0, 50 . The result showed the enzyme seemed to be a SH-enzyme.

**Key words:** *Scophthalmus maximus* L.; intestine proteinase; purification; characterization

收稿日期:2004-09-30

资助项目:青岛市科技发展计划项目“大菱鲂消化酶的研究”(02-1-KJ-Y-50)

作者简介:王海英(1975-),女,山东青岛人,助理研究员,博士,从事海洋活性物质的研究。Tel:0532-85833961, E-mail: jacquelinewhy@163.com

通讯作者:孙 谧, Tel:0532-85819525, E-mail:sunmi@ysfri.ac.cn

消化道蛋白酶是最早受到广泛研究的一类蛋白酶, Laskowski<sup>[1]</sup> 等建立了制备分离胰蛋白酶 (Trypsin, E. C. 3. 4. 4. 4) 和胰糜蛋白酶 (Chmotrypsin, E. C. 3. 4. 4. 5) 的经典方法。几十年来, 人们发现几乎所有的脊椎动物消化道都含有相类似的蛋白酶<sup>[2,3]</sup>, 在牛、羊、猪<sup>[4]</sup>、马<sup>[5]</sup>、鲸<sup>[6]</sup>、鲨等来源的消化道蛋白酶已有研究报道。但大菱鲂消化道来源的蛋白酶至今未见报道, 大菱鲂对食物蛋白质含量的要求较高, 其消化道内富含蛋白酶。本研究前期工作表明, 大菱鲂胃和肠是消化蛋白的主要消化部位, 胃内蛋白酶在酸性条件下发挥作用, 而肠内蛋白酶在碱性条件下酶活最高。本工作即以大菱鲂肠为原料, 对肠蛋白酶进行提取纯化, 并研究其理化性质, 为大菱鲂消化生理和该酶的应用提供一些有益的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以大菱鲂 (*Scophthalmus maximus* L.) 肠为提取酶的原料; DEAE-Sephadex Fast Flow、Sephadex G-100 为瑞典 Pharmacia Biotech 公司产品; 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、对甲苯磺酰基苯丙氨酰氯甲基酮 (TPCK)、对甲苯磺酰基赖氨酸氯甲基酮 (TLCK)、抑胃酶肽 Pepstatin、对氯高汞苯甲酸 (PCMB)、N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS) 等为 Sigma 产品; 酪蛋白、聚乙二醇 20000 为进口分装; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

大菱鲂肠道蛋白酶的分离纯化 (1) 4 下以大菱鲂肠道样品重 5 倍体积的冷冻 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol L<sup>-1</sup>、pH 8.5) 对样品冰浴匀浆、冷冻离心 (10 000 r·min<sup>-1</sup>, 30 min), 得上清液为大菱鲂肠蛋白酶粗酶提取液 A; (2) 4 下向粗酶提取液中缓慢加入研细的硫酸铵分别至饱和度 20%、40%、60%、80%、100%, 充分静置后冷冻离心 (4、10 000 r·min<sup>-1</sup>, 30 min), 取上清液进行下一步分级沉淀; 离心所得的沉淀用 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液溶解, 缓冲液体积 (V, mL) 与样品重量 (W, g) 比约为 3/1 (V/W), 此清液以 5 mmol L<sup>-1</sup>、pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液 4 下透析 16 h, 离心 (10 000 r·min<sup>-1</sup>, 30 min) 获得大菱鲂肠蛋白酶硫酸铵分级沉淀组份 B1 - B5; (3) 将大菱鲂肠蛋白酶硫酸铵分级沉淀活性组份合并,

经 DEAE-Sephadex Fast Flow 阴离子交换层析 (3 × 15 cm), 洗脱液为 5 mmol L<sup>-1</sup>、pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液, 采用 NaCl 浓度由 0 至 1.0 mol L<sup>-1</sup> 直线梯度洗脱, 收集活性峰溶液 C; (4) 将 C 液浓缩后, 经 Sephadex G-100 凝胶过滤层析 (1.8 × 100 cm), 去离子水洗脱, 收集活性峰 D 冻干。

分子量测定 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 法, 按文献 [7] 采用不连续系统, 积层胶 5%, 分离胶 12%, 采用中低分子量标准蛋白 (14.4 ~ 97.4 kD) 作对照。

肠蛋白酶活性的测定 采用 Folin-酚法, 按文献 [8] 进行测定, 每组实验设三个平行样, 结果取平均值。

蛋白质含量测定 按文献 [9] 的方法测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 大菱鲂肠道蛋白酶的分离纯化

硫酸铵分级沉淀结果 大菱鲂肠蛋白酶大多集中在 40% ~ 80% 硫酸铵饱和度的溶液中, 以 60% 硫酸铵饱和度组分的溶液蛋白酶活性最高, 20% 硫酸铵饱和度溶液中也有一定的蛋白酶活 (表 1), 但显著低于 40% ~ 80% 硫酸铵饱和度组份, 集中含有目的蛋白的活性组分冻干。

表 1 大菱鲂肠蛋白酶硫酸铵分级沉淀各组份酶活

硫酸铵饱和度 saturation of (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 %	40 %	60 %	80 %	100 %
蛋白酶活性 (U·mg <sup>-1</sup> ) activity of proteinase	18.80	44.54	47.12	45.63	0.48

DEAE-Sephadex Fast Flow 离子交换层析洗脱结果 大菱鲂肠蛋白酶硫酸铵沉淀样品经 DEAE-Sephadex F. F. 阴离子交换层析纯化 (图 1), 洗脱曲线出现了大小三个蛋白峰; 进一步蛋白酶活分析的结果显示, 第二个蛋白峰具有蛋白酶活。

合并具有酶活的蛋白峰洗出液, 经 1 万分子量超滤膜超滤浓缩, 以及聚乙二醇 20000 的进一步吸水浓缩, 除去大部分小分子量的盐及水份, 使活性样品得到有效浓缩。经酶活检测, 1 万分子量超滤膜滤外液不具有蛋白酶活性。经浓缩的样品进入下一步分子筛层析。

Sephadex G-100 凝胶过滤层析洗脱结果 大菱鲂肠道蛋白酶经分子筛 Sephadex G-100 分离

纯化,洗脱曲线得到大小五个蛋白峰(图2),其中3个峰具有蛋白酶活,以峰4蛋白酶比活最高,且SDS-PAGE表明该峰为单一蛋白组分,将其命名为大菱鲂肠蛋白酶;峰1蛋白酶比活也较高,但

SDS-PAGE电泳显示有杂蛋白没有完全分开;峰3和峰2没有完全分开,且蛋白酶比活也较低。合并峰4洗脱液,4下超滤浓缩得大菱鲂肠蛋白酶电泳纯样品。

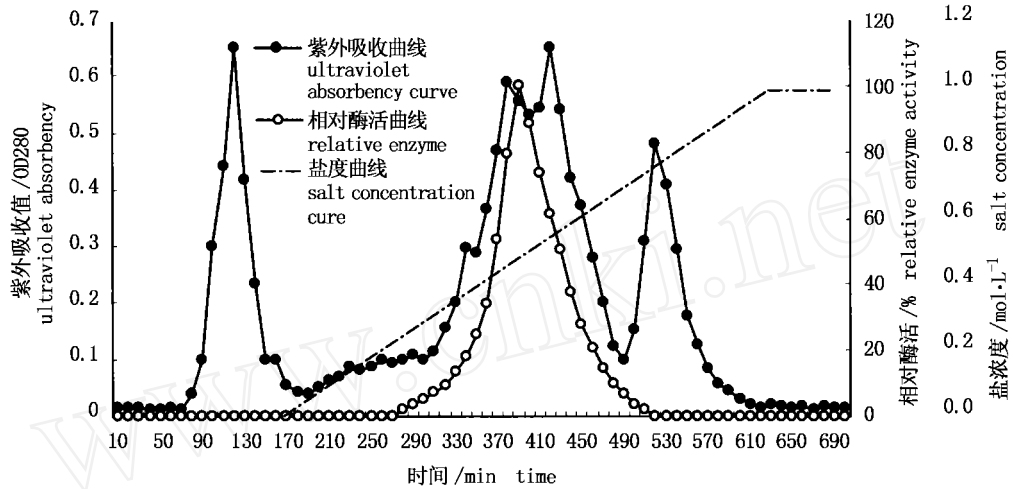


图1 大菱鲂肠蛋白酶 DEAE-Sepharose F. F. 洗脱结果

Fig. 1 Ion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose F. F. gel of intestine protease

流速:  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 检测波长:  $280 \text{ nm}$ ; 平衡缓冲液:  $\text{pH} 8.5, 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$  缓冲液; 洗脱液:  $\text{pH} 8.5, 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$  缓冲液 +  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$

flow rate:  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Wavelength:  $280 \text{ nm}$ ; Equilibration buffer:  $\text{pH} 8.5, 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$  buffer; Elution buffer:  $\text{pH} 8.5, 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$  buffer +  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$

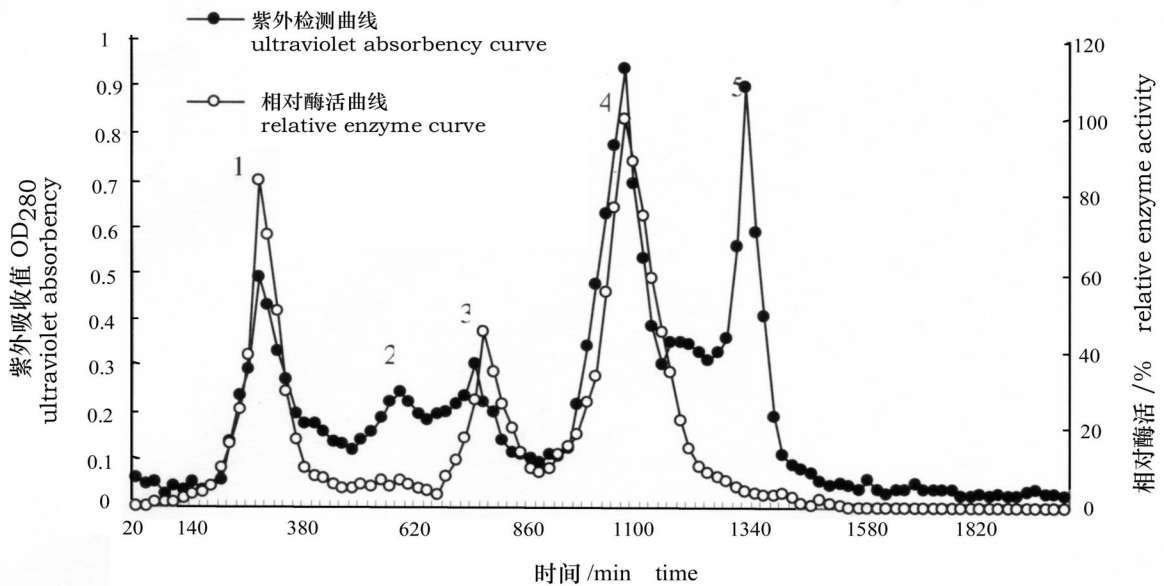


图2 大菱鲂肠蛋白酶 Sephadex G-100 洗脱结果

Fig. 2 Gel column chromatography on Sephadex G-100 of intestine protease

流速:  $0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 检测波长:  $280 \text{ nm}$ ; 洗脱缓冲液: 去离子水

flow rate:  $0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; wavelength:  $280 \text{ nm}$ ; elution buffer: deionized water

大菱鲆肠道蛋白酶 各纯化步骤及结果 如表 2 所示,经过硫酸铵沉淀、阴离子交换层析、分子筛层析,纯化得到电泳纯级的大菱鲆肠道蛋白酶

,比活从  $28.4 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  提高到  $186.2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,纯化倍数达到 6.56,收率为 12.0%。

表 2 大菱鲆肠道蛋白酶 纯化步骤及结果  
Tab.2 Purification of turbot intestine protease

提纯步骤 purification step	总酶活(U) total enzyme activity	总蛋白量(mg) total protein	比活 ( $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) specific activity	收率 (%) yield	纯化倍数 purification fold
抽提液 extract liquid	14380	506	28.4	100	1
硫酸铵沉淀 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation	6188	86.9	71.2	43.0	2.5
阴离子交换层析 DEAE-Sephadex F. F.	3726	35.6	104.7	25.9	3.7
凝胶过滤层析 Sephadex G-100	1732	9.3	186.2	12.0	6.56

## 2.2 大菱鲆肠道蛋白酶 主要理化性质分析

大菱鲆肠道蛋白酶 分子量 大菱鲆肠道蛋白酶 经过 3 步纯化后,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示为单一条带(图 3)。以标准蛋白的相对迁移距离(R 值)和分子量的对数绘标准曲线,求得其分子量为 58 kD。

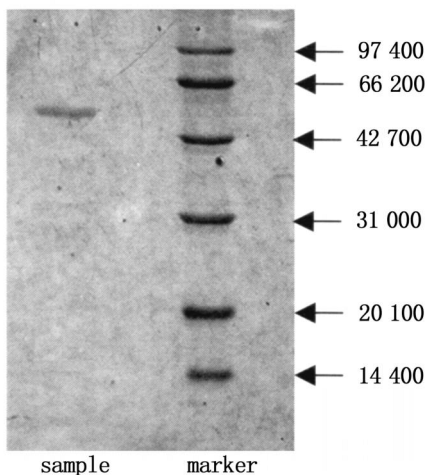


图 3 大菱鲆肠道蛋白酶 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳  
Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis of turbot intestine protease

温度、pH 对大菱鲆肠道蛋白酶 活力的影响以酪蛋白为底物,在 pH 6.0~11.0, 10~70 下对大菱鲆肠道蛋白酶 的活力进行测定。测定结果通过分析软件对实验数据进行分析处理作三维图(图 4),由图可知,该蛋白酶最适反应条件为:pH 9.0、温度 50。当 pH 和温度继续升高时,等酶活曲线趋向密集,酶活力下降迅速;低温下酶活力下降趋势则很缓慢,并且低温下大菱鲆肠道蛋白酶

的最适反应 pH 相比高温下的最适反应 pH 有向碱性偏移的现象。如图 4 所示,在 pH 9.0 的条件下,常规方法(反应时间为 10 min)下测得大菱鲆肠道蛋白酶 的最适作用温度为 50,而 40 下酶活保留率也在 83%左右,和最高值很接近;而当模拟大菱鲆体内生理条件,延长酶作用时间至 1.5 h 时(图 5),同样 pH 条件下大菱鲆肠道蛋白酶 的最适作用温度向低温移动,在 40 时酶活达到最高,在此条件下 50 时的酶活和最高值几乎相平,60 下酶活则迅速下降,到 70 酶活保留率已降到 10%以下。

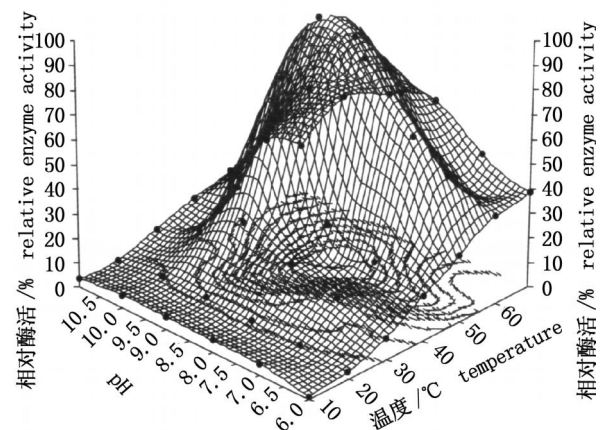


图 4 温度和 pH 对大菱鲆肠道蛋白酶活力的影响  
Fig.4 Effect of temperature and pH on turbot intestine protease

pH 与温度对大菱鲆肠道蛋白酶 稳定性的影响 将酶液在 4、不同的 pH 下静置 30min,然后于 pH 9.0,50 下按 Folin-酚试剂法测定剩余酶活,结果表明大菱鲆肠道蛋白酶 在 pH 6.0~

11.0 之间稳定性良好(图 6),超出此范围,酶稳定性下降迅速,在 pH 5.0 和 pH 12.0 的条件下约保持 40% 以上的酶活。

将酶液在不同温度下保温不同时间后,测定酶活力。结果表明,大菱鲂肠蛋白酶在 30℃ 以下稳定性良好(图 7),保温 60 min 酶活基本保持不变;40℃ 下保温酶活开始缓慢下降,60 min 时保温 30 min 后酶活即完全丧失。

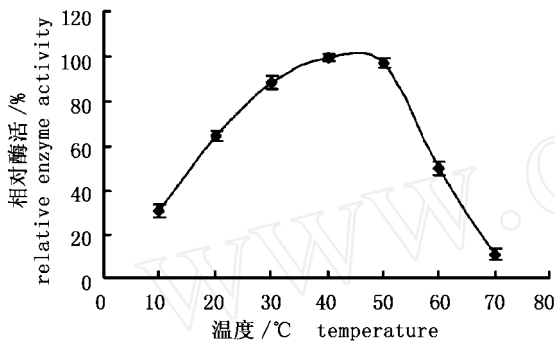


图 5 大菱鲂肠蛋白酶的最适温度曲线

Fig. 5 The optimal temperature of intestine protease

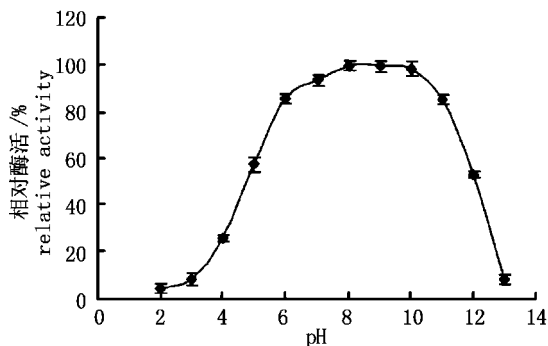


图 6 大菱鲂肠蛋白酶 pH 稳定性

Fig. 6 Effect of pH on enzyme stability

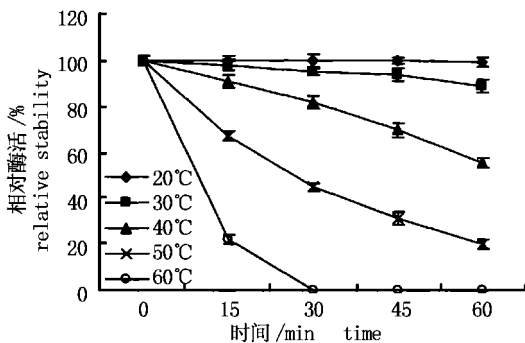


图 7 大菱鲂肠蛋白酶温度稳定性

Fig. 7 Effect of temperature on enzyme stability

抑制剂对酶活力的影响 配制含各种抑制剂如丝氨酸蛋白酶抑制剂(PMSF)、胰蛋白酶抑制剂(TLCK)、糜蛋白酶抑制剂(TPCK)、胃蛋白酶抑制剂(Pepstatin)、巯基酶抑制剂(PCMB、NBS)、金属蛋白酶抑制剂(EDTA)等的酶溶液,抑制剂终浓度为  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ,4℃ 下静置 30 min,50℃、pH 9.0 条件下测定酶活性,对照无抑制剂,结果见表 3。

由表 3 中数据可知,巯基蛋白酶抑制剂(PCMB 和 NBS)对大菱鲂肠蛋白酶有显著抑制作用,胰蛋白酶抑制剂(TLCK)部分抑制大菱鲂肠蛋白酶的活性,其他如丝氨酸蛋白酶抑制剂(PMSF)、糜蛋白酶抑制剂(TPCK)、胃蛋白酶抑制剂(Pepstatin)及金属蛋白酶抑制剂(EDTA)均对大菱鲂肠蛋白酶没有显著的抑制作用,说明大菱鲂肠蛋白酶活性中心必需集中巯基的存在。

表 3 抑制剂对大菱鲂胃蛋白酶活性的影响

Tab. 3 Effect of several inhibitors on the turbot stomach protease

抑制剂 inhibitor	浓度( $\text{mmol L}^{-1}$ ) concentration	相对酶活保留率(%) retention of relative activity
不含抑制剂 no inhibitor	0	100
PMSF	5	88.5
TLCK	5	69.2
TPCK	5	75.0
Pepstatin	5	97.5
PCMB	5	37.3
NBS	5	46.7
EDTA	5	81.0

金属离子对大菱鲂肠蛋白酶活性的影响

配制含  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  不同金属离子的大菱鲂肠蛋白酶,4℃ 下静置 1 h,50℃、pH 9.0 条件下按常规方法测定酶活力,以不加金属离子的酶液为对照。结果见图 8。

实验结果显示, $5 \text{ mmol L}^{-1}$  的离子浓度下, $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$  显著抑制大菱鲂肠蛋白酶的活性,其中以  $\text{Cu}^{2+}$  抑制作用最强;同大菱鲂胃蛋白酶一致, $\text{Mn}^{2+}$  也对大菱鲂的肠蛋白酶有明显的激活作用, $5 \text{ mmol L}^{-1}$  的浓度可使其活性增强至 130% 左右;其他离子对大菱鲂肠蛋白酶的激活或抑制作用不显著。

大菱鲂肠蛋白酶的酶促动力学研究 以酪蛋白为底物于 50℃、pH 9.0 条件下测定大菱鲂肠蛋白酶动力学常数<sup>[9]</sup>。以双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法)得到图 9,经线性拟和的方程

$y = 243.01x + 83.169$  计算可得大菱鲂肠蛋白酶的动力学参数:  $K_m = 2.92 \text{ g L}^{-1}$ ,  $V_{\max} = 1.20 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 。

### 3 讨论

通过对大菱鲂肠道蛋白酶的研究,发现在大菱鲂肠道中,营蛋白消化的是由 3 个或 3 个以上的蛋白酶组成的蛋白酶系。经分离纯化我们获得了其中一种主要蛋白酶的纯品并研究了其理化性质。研究表明该蛋白酶的最适作用 pH 随温度的升高有向中性偏移的现象,另外当延长反应时间时,其最适作用温度又有下降的趋势,这和以往许多鱼种的研究结果是一致的<sup>[10]</sup>。

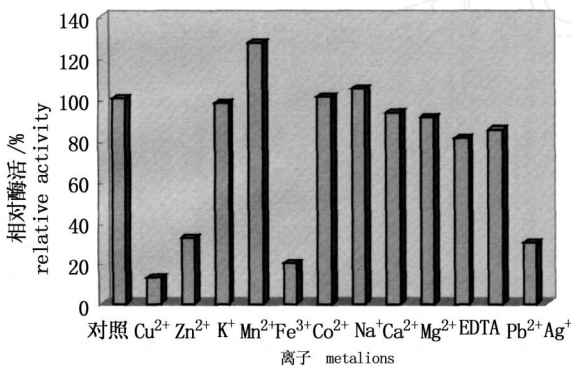


图 8 金属离子对大菱鲂肠蛋白酶活性的影响

Fig. 8 Effect of metal ions on intestine protease

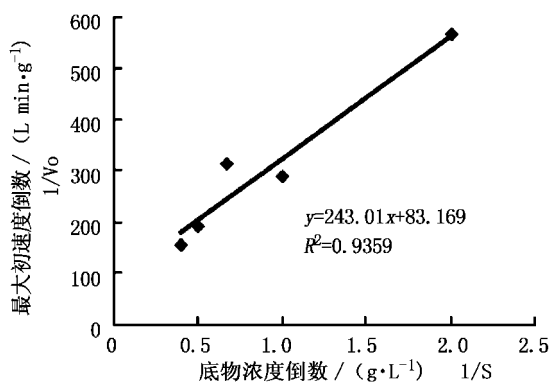


图 9 Lineweaver-Burk 作图法求肠蛋白酶米氏常数

Fig. 9 Determination of  $K_m$  with Lineweaver-Burk equation

迄今所报告的各种鱼类消化酶的最适温度范围很广,从最低 30 到最高 60 。一般来说,理化性质研究获得的消化酶最适反应温度一般比鱼类栖息水域的温度要高。尾崎久雄<sup>[11]</sup>认为,从温

度方面来说生活环境对酶不起最大作用。但佐佐木<sup>[12]</sup>等对鳗鱼蛋白酶进行研究,发现用麻仁球蛋白作为底物,消化 30 min 时,最适温度为 50 , 消化 1.5 h 则为 42 。大岛和佐佐木<sup>[13]</sup>在银鲟、鲟鱼的蛋白酶上也得到相似的结果,即消化酶与底物的反应时间越长,所测得最适温度越低。这和本文的研究结果相似,可能是由于反应时间的延长,酶蛋白产生的热变性导致活性逐渐降低。这提示,在饲养温度下,食物的消化通常历经数小时,因此消化酶的最适温度不一定比鱼类栖息的水温要高,而在生产实践中,水温对鱼类的生长发育的影响是非常显著的。可以认为,饲养温度不仅直接影响消化酶的活性高低,而且使鱼体的代谢、体内离子浓度以及内外环境 pH 等发生改变,从而间接影响消化酶的活性。因此,我们用常规方法获得的消化酶作用最适温度一般只是表征该酶性质的一个常数。

对大菱鲂肠蛋白酶理化性质的探讨,有助于增进对大菱鲂消化生理的了解,为大菱鲂养殖、饲料研制提供理论依据,并对推动大菱鲂健康养殖有一定的意义;同时也为该酶的应用提供一定的理论基础。

### 参考文献:

- [1] Laskowski M. Chymotrypsinogen and chymotrypsin, trypsinogen and trypsin[J]. *Methods in Enzymology*, 1995, 2: 8 - 22, 26 - 33.
- [2] Walsk K A. Trypsinogens and trypsin of various species [J]. *Methods in Enzymology*, 1970, 19: 41 - 63.
- [3] Bergmeyer H U. *Methods of enzymatic analysis* [M]. New York and London: Academic Press, 1963. 800 - 802, 807 - 814.
- [4] 吴克佐, 戚正武. 牛羊猪结晶胰蛋白酶的一些性质的比较研究[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1966, 6: 32 - 41.
- [5] Harris C I. Studies on equine trypsinogen and trypsin [J]. *J Biochem*, 1969, 114 (4) : 82 - 86.
- [6] Matsuoka Y, Koide A. On fin whale chymotrypsins [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1966, 114: 422 - 424.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning* [M]. USA: Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 688 - 692.
- [8] 张树政. 酶制剂工业 [M]. 北京: 科学出版社, 1984. 446 - 447.
- [9] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化试验方法和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 100 - 106, 164 - 168.
- [10] 陈品健, 王重刚. 真鲷幼鱼消化酶活性与温度的关系 [J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1998, 37 (6) : 931 - 935.
- [11] 尾崎久雄. 鱼类消化生理 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [12] 佐佐木, タテ胃 ペプシン に 関 する 研 究 [J]. *日本水产学会志*, 1932, 1: 59.
- [13] 大島幸吉, 佐佐木. ペプシン に関する研究 [J]. *日本水产学会志*, 1926, 29: 17.