

三疣梭子蟹幼体消化酶活力及氨基酸组成的研究

潘鲁青 王奎琪

(青岛海洋大学水产学院, 266003)

摘 要 在三疣梭子蟹幼体发育过程中,五种消化酶活力表现出三种变化模式,其中胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力呈上升趋势,而且在蚤状幼体 I 期时就较高,淀粉酶活力逐渐减小,纤维素酶和脂肪酶活力极微。氨基酸含量随幼体发育逐渐增加。必需氨基酸中以亮氨酸含量最高,色氨酸含量最低;非必需氨基酸中含量最高者为谷氨酸,最低者为胱氨酸。同时单个必需氨基酸含量与必需氨基酸总量的比值(A/E)在幼体不同发育阶段略有差异,但基本趋于一致。

关键词 三疣梭子蟹,幼体,消化酶活力,氨基酸

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)广泛分布于我国沿海,是重要的经济甲壳动物。目前在三疣梭子蟹的苗种生产过程中,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,往往得不到较理想的育苗效果,其主要原因是缺少对三疣梭子蟹幼体消化生理和营养需求的研究。本研究旨在通过测定三疣梭子蟹幼体消化酶活力及氨基酸组成,探讨幼体发育过程中消化酶活力的变化规律,并对氨基酸组成和含量进行分析,为幼体消化酶活力的调节机制和营养需求提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

三疣梭子蟹各期幼体:蚤状幼体 I 期(Z_1)、蚤状幼体 II 期(Z_2)、蚤状幼体 III 期(Z_3)、蚤状幼体 IV 期(Z_4)、大眼幼体期(M)和幼蟹 I 期(C_1),于 1996 年 4 月至 5 月取自乳山市水产养殖公司对虾育苗场。样品低温(-18°C)保存待用。

1.2 酶活力测定

样品制备:各期幼体分别取 400mg 左右置于冰浴中,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 $0\sim 1^{\circ}\text{C}$ 、 $9\ 000\sim 10\ 000\text{r}/\text{min}$ 离心 30 分钟,上清液作酶活力测定。

胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力测定:按刘玉梅等[1991]方法。测胃蛋白酶时,加入 0.5% 干酪素溶液 2mL,0.04M EDTA- Na_2 0.1mL,0.2M 柠檬酸缓冲液(pH=3.0)0.4mL,酶液 0.4mL,加入重蒸水,使总体积为 3.5mL,混匀;置于 37°C 水浴中,反应 15 分钟;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°C 下,每分钟水解干酪素所产生 $1\mu\text{g}$ 酪氨酸作为一个酶活力单位($\mu\text{g}/\text{min}$)。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 = 9.8)。

淀粉酶活力测定:加入用 0.067M 磷酸缓冲液 (pH = 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; 然后加入 3,5-二硝基水杨酸指示剂溶液 2mL, 置于沸水浴 5 分钟后, 取出流水冷却, 定容至 10mL, 490nm 处比色测麦芽糖 ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$) 的含量, 在 25℃ 条件下, 每分钟催化淀粉生成 1 μ g 麦芽糖作为一个酶活力单位 (μ g/min)。

纤维素酶活力测定:加入 0.1M 醋酸缓冲液 (pH = 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 μ g 葡萄糖作为一个酶活力单位 (μ g/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 μ mol 脂肪酸作为一个酶活力单位 (μ mol/min)。

酶液蛋白浓度测定: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]。

1.3 氨基酸分析

总氨基酸分析:取于 105℃ 烘箱烘干的样品 20mg, 采用梁亚全等 [1995] 的盐酸水解法测定, 以 6M 盐酸水解, 样品在 (110 ± 1) ℃ 下水解 24 小时, 然后上机分析。

色氨酸分析:取于 105℃ 烘箱烘干的样品 15mg, 加入 6 滴含 5% 氯化亚锡的 5M NaOH 溶液, 倒入水解管中至 2mL, 然后通入氮气赶出空气后封管, 置于 (110 ± 1) ℃ 下水解 20 小时, 取出后以 6M 盐酸中和, 使 pH 值为 6~7; 离心, 取出上清液 0.5mL 上机分析, 此法分析时应注意加入 HCl 溶液并保持于 4℃ 左右。

测试仪器:日立 835-50 型氨基酸自动分析仪。

2 结果

2.1 三疣梭子蟹各期幼体五种消化酶活力变化

在三疣梭子蟹幼体发育过程中, 各期幼体消化酶活力表现出三种变化模式。胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力的变化趋势为 $Z_1 \rightarrow Z_2$ 逐渐增大, 且 Z_2 出现一个峰值变化, $Z_3 \rightarrow M$ 维持较低酶活力, 至 C_1 又上升; 淀粉酶和纤维素酶活力在 Z_2 达最大值, $Z_3 \rightarrow C_1$ 呈下降趋势; 脂肪酶活力在 Z_3 达最大值, Z_4 、M 酶活力较低, 到 C_1 又增大。淀粉酶/类胰蛋白酶活力 (A/T) 比值随着幼体生长发育逐渐减小, $Z_1 \rightarrow Z_2$ 呈明显下降趋势, $Z_3 \rightarrow M$ 变化较小, 到 C_1 又显著减小 (图 1)。

由表 1 看出, 胃蛋白酶、类胰蛋白酶和淀粉酶活力较高, 而纤维素酶和脂肪酶活力很低。类胰蛋白酶比胃蛋白酶活力大, 约为 1.5~2.8 倍左右; 淀粉酶活力约为纤维素酶活力的 70~120 倍左右; 脂肪酶活力与纤维素酶相近。

2.2 三疣梭子蟹各期幼体氨基酸组成与含量变化

必需氨基酸:必需氨基酸总量随着三疣梭子蟹幼体发育逐渐增加,但在同一幼体期不同发育阶段增幅较小,而不同幼体期增幅较大(表 2)。必需氨基酸中含量最高的为亮氨酸,含量最低的为色氨酸。它们含量的排列顺序为亮氨酸、赖氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、蛋氨酸和色氨酸。在幼体发育过程中,赖氨酸含量增幅最大,由 1.79% 增加至 2.53%,色氨酸增幅最小,由 0.21% 增加至 0.29%。必需氨基酸的 A/E 比值变化较小(表 3)。

半必需氨基酸:在两种半必需氨基酸中,精氨酸含量比较高,约为组氨酸含量的 3.2~4 倍。

非必需氨基酸:非必需氨基酸总量的变化趋势与必需氨基酸的基本相同。其中谷氨酸含量最高,胱氨酸含量最低。在幼体发育过程中,非必需氨基酸的增幅以甘氨酸最高,由 1.7% 增至 3.6%,以胱氨酸最低,由 0.22% 增至 0.39%。

表 1 三疣梭子蟹各期幼体消化酶活力的比较

Table 1 The comparison of the digestive enzyme activities during larval development of *Portunus trituberculatus*

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
Z ₁	0.27 ± 0.03	0.38 ± 0.05	0.51 ± 0.07	0.67 ± 0.04	0.50 ± 0.06	1.34
Z ₂	0.45 ± 0.17	0.73 ± 0.21	0.69 ± 0.13	0.71 ± 0.08	0.69 ± 0.19	0.95
Z ₃	0.23 ± 0.09	0.64 ± 0.17	0.57 ± 0.20	0.52 ± 0.12	0.72 ± 0.14	0.89
Z ₄	0.34 ± 0.08	0.58 ± 0.10	0.41 ± 0.09	0.55 ± 0.16	0.58 ± 0.06	0.71
M	0.31 ± 0.04	0.55 ± 0.16	0.43 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.52 ± 0.11	0.78
C ₁	0.52 ± 0.11	0.81 ± 0.29	0.35 ± 0.06	0.30 ± 0.03	0.79 ± 0.26	0.43

注:酶的活力以比活力表示,即活力单位/mg 蛋白(U/mg 蛋白),其中纤维素酶为表中数值 × 10⁻²活力单位/mg 蛋白,脂肪酶为 × 10⁻²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

3 讨论

在三疣梭子蟹的个体发育过程中,各期幼体的消化酶活力有差异,表现出三种变化模式,其中胃蛋白酶、类胰蛋白酶和脂肪酶活力的变化趋势与 Lovett 和 Fider[1990]在白对虾(*Penaeus setiferus*)和汤 鸿等[1995]在锯缘青蟹(*Scylla serrata*)中的测定结果类似,而淀粉酶和纤维素酶活力的变化模式与刘玉梅等[1991]在中国对虾(*Penaeus chinensis*)中得到的结果相近,由此表明不同消化酶有各自的调节机制,也说明不同甲壳动物幼体消化酶有各自的调节体系。

甲壳动物幼体消化酶活力变化与幼体生长发育不同阶段的新陈代谢水平有关,而幼体的生长发育是伴随摄食数量的增多、营养物质消化吸收率增高和营养物质积累的增多而实现的。

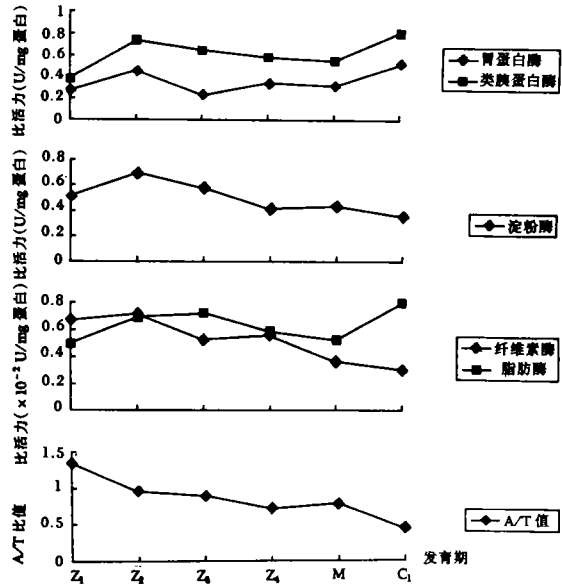


图 1 三疣梭子蟹幼体不同发育期消化酶活力的变化

Fig.1 The change of digestive enzyme activities in different larval stages of *Portunus trituberculatus*

完成这些复杂的过程需要有一个与之相适应的生理消化功能。据 Kamarudin 等[1994]报道虾类幼体不同发育期消化酶活力变化与虾的食性相一致。因此,在三疣梭子蟹幼体发育过程中,五种消化酶活力变化反映了幼体的食性和营养需求。胃蛋白酶和类胰蛋白酶活力在 Z_1 就较高,在 Z_2 出现明显跃升, $Z_3 \rightarrow C_1$ 酶活力呈上升趋势;淀粉酶活力在 Z_2 出现一个峰值,之后呈下降趋势,由此表明三疣梭子蟹在整个幼体发育过程中均为肉食性或肉食性为主。因此,在三疣梭子蟹苗种生产中,投饵种类应以动物性饵料和含蛋白质高的饵料为主,在蚤状幼体前期可投喂少量单细胞藻类,以满足幼体的食性要求和营养需求,提高幼体的成活率。

表 2 三疣梭子蟹各期幼体的氨基酸组成

Table 2 The composition of amino acid during larval development of *Portunus trituberculatus* (mg/100mg)

氨基酸	发育期					
	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4	M	C_1
必需氨基酸总量	9.90	10.24	10.61	10.85	11.73	12.74
苏氨酸	1.05	1.26	1.25	1.27	1.36	1.48
缬氨酸	1.61	1.64	1.81	1.88	1.94	2.17
蛋氨酸	0.31	0.28	0.32	0.31	0.40	0.45
异亮氨酸	1.58	1.60	1.61	1.61	1.87	1.94
亮氨酸	1.94	1.98	2.08	2.10	2.16	2.27
苯丙氨酸	1.41	1.46	1.48	1.50	1.59	1.61
赖氨酸	1.79	1.80	1.82	1.94	2.15	2.53
色氨酸	0.21	0.22	0.24	0.24	0.26	0.29
半必需氨基酸总量	2.63	2.71	2.74	2.86	3.07	3.26
组氨酸	0.54	0.61	0.57	0.64	0.71	0.77
精氨酸	2.09	2.10	2.17	2.22	2.36	2.49
非必需氨基酸总量	12.77	13.41	15.21	15.50	16.88	19.33
天门冬氨酸	2.27	2.30	2.79	2.81	2.90	3.27
丝氨酸	0.92	1.00	1.10	1.13	1.19	1.32
谷氨酸	3.82	4.07	4.31	4.54	4.67	5.19
甘氨酸	1.70	1.73	2.16	2.18	2.78	3.60
丙氨酸	0.72	0.92	1.01	1.04	1.32	1.53
胱氨酸	0.22	0.22	0.23	0.26	0.30	0.39
酪氨酸	0.81	0.86	0.86	0.85	0.91	0.99
脯氨酸	2.31	2.31	2.75	2.69	2.81	3.04
氨	0.60	0.78	0.96	1.32	1.45	1.61
氨基酸总量	25.30	26.36	28.56	29.21	31.68	35.33

表 3 三疣梭子蟹各期幼体 A/E 比值的比较

Table 3 The comparison of A/E during larval development of *Portunus trituberculatus*

氨基酸	发育期					
	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4	M	C_1
苏氨酸	8.38	9.73	9.36	9.26	9.19	9.25
缬氨酸	12.85	12.66	13.56	13.71	13.11	13.56
蛋氨酸	2.47	2.16	2.40	2.26	2.70	2.81
异亮氨酸	12.61	12.36	12.06	11.74	12.64	12.13
亮氨酸	15.48	15.29	15.58	15.32	14.60	14.19
苯丙氨酸	11.25	11.27	11.09	10.94	10.74	10.06
赖氨酸	14.29	13.90	13.63	14.15	14.53	15.81
色氨酸	1.68	1.70	1.80	1.75	1.76	1.81
组氨酸	4.31	4.71	4.27	4.67	4.80	4.81
精氨酸	16.68	16.22	16.26	16.19	15.95	15.56

注:A/E 比值为单个必需氨基酸含量/必需氨基酸与半必需氨基酸含量之和的百分数

三疣梭子蟹幼体具有两种糖类水解酶:淀粉酶和纤维素酶,而且淀粉酶活力较高,这与幼

体的食性似乎不符。Hirche 和 Anger[1987]认为高的淀粉酶活力不是对食物生化组成的反应,而可能是祖先部分草食性幼体系统发育的残余。笔者也赞同这一观点。甲壳动物能否产生纤维素酶目前尚有争议。据于书坤和张树荣[1986]的报道在肉食性甲壳动物中,纤维素酶是退化的痕迹,毫无功能。

实验还表明,三疣梭子蟹幼体脂肪酶活力很低。这可能因为反应条件不是最适或方法不够灵敏;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。Berner 和 Hammond[1970]发现在测试的许多无脊椎动物中,只有一半种类具有脂肪酶活力,但全部具有酯酶活力。

在甲壳动物幼体发育过程中,幼体消化酶活力变化复杂,许多学者试图建立一个划分幼体食性和营养状态的标准。Biesiot 和 Capuzzo[1990]提出采用淀粉酶/蛋白酶活力(A/P)比值或淀粉酶/类胰蛋白酶活力(A/T)比值作为营养状态指标来指导投饵,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。本文所测定三疣梭子蟹幼体的 A/T 比值呈明显下降趋势,说明三疣梭子蟹在整个幼体发育过程中为肉食性或偏肉食性。

在三疣梭子蟹幼体发育过程中,氨基酸含量呈上升趋势,如氨基酸总量由 Z_1 的 25.3%,到 C_1 增至 35.33%;必需氨基酸由 9.9%增至 12.74%,这表明在幼体变态发育中,由于各种组织和器官的不断形成和生长,蛋白质合成也随着迅速增加。这一结果与刘玉梅等[1991]在中国对虾幼体中得到的结果相似。在必需氨基酸中以亮氨酸含量最高,色氨酸含量最低;半必需氨基酸中以精氨酸含量最高;非必需氨基酸中含量最高的为谷氨酸,最低的为胱氨酸,这与陈立侨等[1994]对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)蟹种的分析结果类似。目前大家公认为作为饵料的蛋白质其氨基酸组成及含量等方面与动物体本身相似者可被认为是最佳的饵料[楼伟风等 1989],因此研究三疣梭子蟹幼体的氨基酸组成不仅为幼体的营养需求与营养生理研究奠定理论基础,也为人工饵料的配方提供科学依据。

实验还表明,三疣梭子蟹在整个幼体发育过程中,氨基酸含量的多少与增幅大小并不一致,即总量最高的氨基酸并非增幅最大者。如必需氨基酸中亮氨酸含量最高,而增幅最大的为赖氨酸;非必需氨基酸中含量最高者为谷氨酸,而增幅最大的为甘氨酸。同时单个必需氨基酸含量与必需氨基酸总量的比值(A/E)在幼体不同发育期基本趋于一致,如亮氨酸的 A/E 比值在 14.19~15.85 之间,这表明不同必需氨基酸之间存在着一种相对稳定的比例关系,这种比例不会因个体发育及氨基酸总量的增长而受影响。

本研究系青岛海洋大学青年科学基金资助项目。

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.中国对虾幼体和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.
陈立侨等.1994.中华绒螯蟹蟹种配饵中豆饼替代部分鱼粉的适宜含量.水产学报,18(1):24~31.
梁亚全等.1995.斑节对虾蛋白质的氨基酸分析.海洋科学,19(3):27~30.
楼伟风等.1989.中国对虾粗蛋白的氨基酸含量的比较分析.青岛海洋大学学报,19(2):69~79.

- Berner D L, Hammond E G. 1970. Phylogeny of lipase specificity. *Lipids*, 5: 558 ~ 562.
- Biesiot P M, Capuzzo J M. 1990. Change in digestive enzyme activities during early development of the american lobster *Homarus americanus*. *Mar Biol Ecol*, 136(2): 107 ~ 122.
- Hirche H J, Anger K. 1987. Digestive enzyme activities during larval development of *Hyas araneus*. *Comp Biochem Physiol*, 87B(2): 297 ~ 302.
- 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.

STUDIES ON DIGESTIVE ENZYME ACTIVITIES AND AMINO ACID IN THE LARVAE OF *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

PAN Lu-Qing, WANG Kui-Qi

(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, 266003)

ABSTRACT The experimental results indicate that activities of five digestive enzyme showed three different patterns during larval development of *Portunus trituberculatus*. The activities of pepsin enzyme and tryptase increased along with growth of larval and it were higher in first Zoea stage, and the activities of amylase decreased. The activities of cellulase and lipase were fairly low. The contents of amino acid increased during larval development of the crab. In the total content of amino acid, the highest EAA is Leu, the lowest is Trp; the highest NEAA is Glu, the lowest NEAA is Cys. There were little difference in essential amino acid ratio (A/E) at different stages of larvae.

KEYWORDS *Portunus trituberculatus*, Larvae, Digestive enzyme activities, Amino acid

1998 年《水产养殖》征订启事

《水产养殖》是中级水产科技刊物,国内外公开发行。内容包括鱼虾贝藻等海淡水水产品的养殖技术、人工繁殖技术、苗种培育技术、病害敌害防治技术等。内容丰富,技术实用,贴近生产。适合于水产科技人员、水产院校师生、水产养殖者、水产生产管理人员阅读和参考。本刊为双月刊,每期定价 2.50 元,全年 6 期共 15 元,全国各地邮局都可订阅,邮发代号 28-67。如错过当地邮局收订时间,也可直接汇款到《水产养殖》编辑部订阅。地址:南京市新模范马路 90 号,邮政编码:210003。电话/传真:025-3421419。