

# 皱纹盘鲍蛋白酶的研究

杨蕙萍 童圣英 王子臣

(大连水产学院, 116023)

**摘 要** 利用分光光度计比色法测定了 2~3cm 的皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)的蛋白酶的最适温度、最适 pH 以及 11 种金属离子对其的影响。结果表明:在最适温度 50℃ 下的活化能为  $4.89 \times 10^4$  J/mol;最适 pH 为 2.60 和 5.00。对其最适 pH 值的分析表明:皱纹盘鲍存在有胃蛋白酶,且活性颇高。在 11 种离子中,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^+$  对蛋白酶活性具有显著的抑制作用,而  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  则具有一定的促进作用。

**关键词** 皱纹盘鲍,蛋白酶

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)属软体动物门、腹足纲、前鳃亚纲、原始腹足目、鲍科,主要分布在日本、朝鲜和我国北方沿海,1973 年曾南移到福建试养,近几年在我国鲍的人工苗种生产及养殖已形成了一定的规模,成为我国海珍品的主要养殖种类。

有关皱纹盘鲍消化酶的研究,目前仅见于一些定性分析和总结[代田昭彦 1989]。最早对鲍的消化生理、食性和饵料方面进行研究的是日本科学家岸上氏,1894 年他对鲍的消化器官做了概略的论述,认为鲍饵料主要是褐藻类[猪野峻 1956]。之后猪野峻等又对皱纹盘鲍的各个方面予以研究,目前关于皱纹盘鲍消化器官的构造、饵料与生长、摄食的季节变化等方面的研究已相当清楚,但针对消化酶的性质等方面的研究却较为少见,本文分析皱纹盘鲍的蛋白酶的几个特性,从而在理论上对其消化生理予以弥补,而且为人工饵料合理配方的获得提供可靠的依据,为皱纹盘鲍人工养殖新技术和新途径做贡献。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料来源与规格

实验用皱纹盘鲍大小为 2.14~3.00cm,1993 年 5~7 月取自大连水产养殖公司海珍品养殖场,为 1992 年所采苗,投喂饵料为海带。

### 1.2 样本处理

样品取回后称重测体长,暂养于水族箱内,使样品处于饥饿状态后再进行处理,将鲍置冰盘内取消化盲囊及其所包被的嗉囊和胃,去除多余的组织块,用冰冻重蒸水冲洗、称重,置于低温冰箱内暂存。

### 1.3 酶液的制取

将样品用玻璃研磨器充分研磨匀浆(大约每克样品研磨 10~15 分钟左右),按样品重量

的适当倍数分次加入冰冻重蒸水,整个操作在冰浴中完成,然后在 VAC25 型高速冷冻离心机以 12 000 转/分的转速离心 30 分钟,获得组织匀浆抽提上清液,即为粗酶提液。此粗酶提液要在 24 小时内分析完毕。

## 1.4 蛋白酶活力测定方法

基本参照 Lwury 等的福林—酚试剂法[中山大学生化教研室 1978],略加修改。具体为:向试管中先后加入 2% 的酪蛋白溶液 1 mL 和缓冲液 4 mL,之后加入粗酶提液 1 mL,保温 20 分钟,加入 0.4 M 的三氯醋酸 2 mL 终止酶反应,取出静置 10 分钟后过滤,取滤液 1 mL,加入 0.4 N 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液 5 mL,再加入 1N 的福林试剂 1 mL,于 40℃ 恒温水浴显色 20 分钟,在 680 nm 波长下比色测定,以蒸馏水校零点,对照管在加入粗酶提液前,先加入 2 mL 的三氯醋酸使酶失活,其他同试验管。

酶活力定义:在一定的 pH 值和温度下保温 20 分钟,蛋白酶水解 2% 酪蛋白每分钟产生 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸的酶量定义为一个蛋白酶单位。

## 2 结果

### 2.1 蛋白酶与温度的关系

在 pH 为 6.28 条件下,温度范围为 2 ~ 70℃,温度间隔 5 ~ 10℃,恒温水浴控温测定蛋白酶活力,其大小以及随温度变化的情况见表 1 及图 1,从图中可看出:2 ~ 50℃ 随着温度的升高酶活力也逐渐上升,在 50℃ 达到最高为  $(85.8 \pm 8.66)$  活力单位/克湿组织,而后随温度的上升而快速下降, T 检验表明 40℃ 和 50℃ 下酶活力相差不显著 ( $\alpha = 0.05$ ),即蛋白酶适宜温度范围为 40 ~ 50℃,最适为 50℃,在最适范围内的  $Q_{10}$  值为 1.13,活化能值为  $4.89 \times 10^4 \text{ J/mol}$ 。

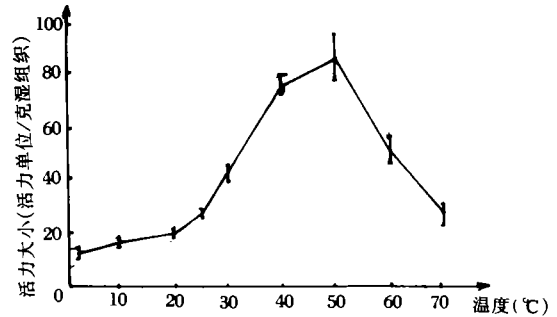


图 1 皱纹盘鲍蛋白酶活力与温度的关系

Fig.1 The relationship between abalone's protease activity and temperature

表 1 皱纹盘鲍蛋白酶在各温度下的活力大小(活力单位数/克湿组织)

Table 1 The protease of Pacific abalone in different temperature

| 温度(°C) | 2         | 10        | 20        | 25        | 30        | 35        | 40        | 50        | 60        | 70        |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 蛋白酶活力  | 11.7±1.15 | 16.6±0.23 | 20.0±0.96 | 27.0±0.78 | 42.4±1.78 | 57.8±1.10 | 75.7±3.18 | 85.8±8.66 | 50.3±4.50 | 26.4±4.00 |

### 2.2 蛋白酶与 pH 的关系

在分析蛋白酶活力之前,利用 pH 试纸对皱纹盘鲍消化道 pH 值进行了测定,具体操作是将试纸剪成细条,解剖时直接浸渍测试即可,所得结果如表 2,即皱纹盘鲍的消化道内基本呈中性,消化盲囊呈酸性。

表 2 皱纹盘鲍消化系统各部位的 pH 值

Table 2 The pH value of digestive system in abalone

| 部位   | 食道      | 肠       | 消化盲囊    |
|------|---------|---------|---------|
| 样本数  | 16      | 17      | 16      |
| pH 值 | 6.3~6.8 | 6.9~7.5 | 5.5~6.5 |

在 50℃ 的温度条件下, pH 值范围为 2.20 ~ 8.82 内(梯度为 0.30 ~ 0.50)蛋白酶的活力变化情况及大小见表 3 及图 2, 从图中看出, 蛋白酶的活力值出现了两个高峰, 分别在 pH = 2.60 和 pH = 5.00 处, 活力值为 (332 ± 10.2) 活力单位/克湿组织和 (162 ± 11.7) 活力单位/克湿组织, T 检验 (α = 0.05) 表明两者之间的差异显著, pH = 2.60 处的活力值远高于 pH = 5.0 处的活力值, 在 pH = 7.00 以后酶活力值变化较为平缓, 亦即蛋白酶的最适 pH 值为 2.60 和 5.00。

表 3 皱纹盘鲍蛋白酶在各 pH 值下的活力大小(活力单位数/克湿组织)

Table 3 The protease activity of Pacific abalone in different pH value

| pH 值  | 2.20       | 2.60       | 3.00       | 3.40       | 3.80        | 4.20        | 4.60       | 5.00       | 5.40       | 5.84       | 6.24        | 6.75        | 7.19        | 7.64        | 8.00        | 8.45        | 8.82         |
|-------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 蛋白酶活力 | 289 ± 10.9 | 332 ± 10.2 | 266 ± 12.4 | 152 ± 37.3 | 98.3 ± 7.80 | 76.8 ± 10.2 | 122 ± 16.9 | 162 ± 11.7 | 150 ± 6.12 | 126 ± 5.14 | 58.1 ± 5.45 | 31.0 ± 6.11 | 24.1 ± 2.94 | 17.4 ± 2.24 | 18.7 ± 1.40 | 27.1 ± 2.00 | 29.1 ± 0.810 |

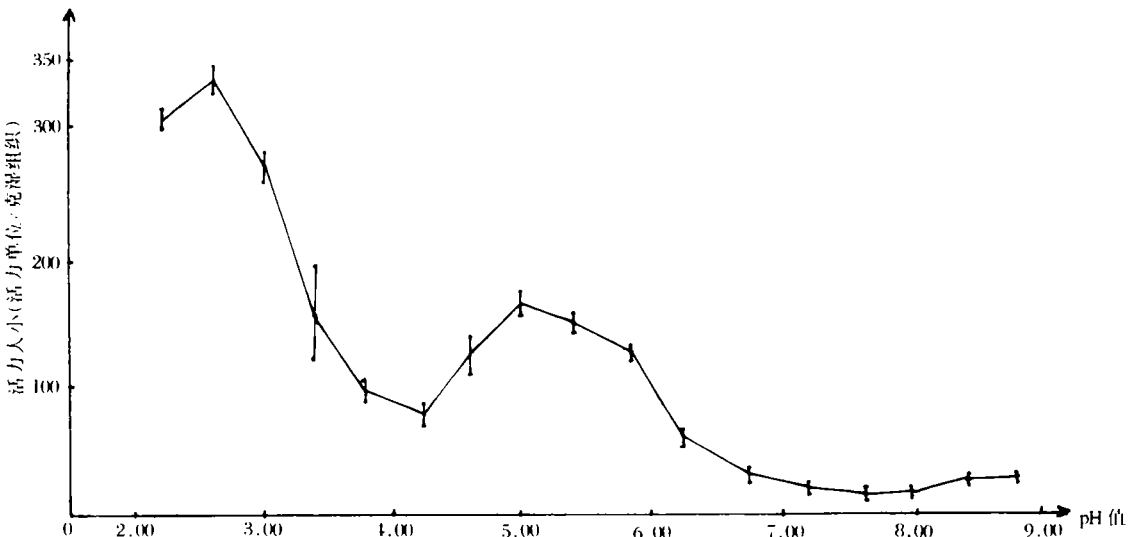


图 2 皱纹盘鲍蛋白酶活力大小与 pH 值的关系

Fig.2 The relationship between Pacific abalone's protease activity and pH value

### 2.3 几种金属离子对蛋白酶的影响

采用的金属离子种类及金属盐来源见表 4, 测定时选用温度 T = 50℃, 选用 pH = 5.00, 1 mL 的酶液由 0.5 mL 金属离子溶液和 0.5 mL 的酶液代替。测定的活力大小及与空白对照的结果见表 5. 从表中看出: Hg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup> 三种离子对酶活力具较强的抑制作用, Mg<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup> 则有或多或少的促进作用。

表 4 金属离子种类及其来源、浓度

Table 4 The species of metal ions the sources and concentration

| 金属离子 | Li <sup>+</sup>           | Mn <sup>2+</sup>  | Cu <sup>2+</sup>  | Fe <sup>3+</sup>                  | Ba <sup>2+</sup>  | Pb <sup>2+</sup>                  | Ca <sup>2+</sup>  | Zn <sup>2+</sup>  | Mg <sup>2+</sup>  | Ag <sup>+</sup>   | Hg <sup>2+</sup>       |
|------|---------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------|
| 化合物  | LiSO <sub>4</sub>         | MnCl <sub>2</sub> | CuSO <sub>4</sub> | Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> | BaCl <sub>2</sub> | Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | CaCl <sub>2</sub> | ZnSO <sub>4</sub> | MgSO <sub>4</sub> | AgNO <sub>3</sub> | HgCl <sub>2</sub>      |
| 离子浓度 | 均为 2 × 10 <sup>-3</sup> M |                   |                   |                                   |                   |                                   |                   |                   |                   |                   | 1 × 10 <sup>-3</sup> M |

表5 皱纹盘鲍蛋白酶在金属离子存在情况下的活力大小(活力单位数/克湿组织)

Table 5 The protease activity of Pacific abalone when metal ions exist

| 金属离子  | 空白 H <sub>2</sub> O | Li <sup>+</sup> | Mn <sup>2+</sup> | Cu <sup>2+</sup> | Fe <sup>3+</sup> | Ba <sup>2+</sup> | Pb <sup>2+</sup> | Ca <sup>2+</sup> | Zn <sup>2+</sup> | Mg <sup>2+</sup> | Ag <sup>+</sup> | Hg <sup>2+</sup> |
|-------|---------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|
| 蛋白酶活力 | 47.0±<br>2.51       | 43.7±<br>6.63   | 46.7±<br>0.780   | 33.0±<br>3.24    | 59.7±<br>3.68    | 46.4±<br>3.92    | 46.0±<br>2.62    | 42.3±<br>1.84    | 43.2±<br>4.06    | 50.5±<br>6.42    | 22.6±<br>2.37   | 15.4±<br>2.15    |
| 比值    | 100                 | 92.8            | 99.2             | 67               | 126.7            | 98.6             | 98               | 90               | 91.7             | 107              | 48              | 32.8             |

### 3 讨论

#### 3.1 蛋白酶的最适温度

象一般化学反应一样,温度对酶反应影响很大,酶的蛋白质本性又决定酶对温度的高度敏感性,温度升高一方面使酶促反应的速度加大,另一方面也加速酶活性的丧失,因此构成了一个矛盾性的动态平衡,当反应条件诸如 pH 值、反应时间等恒定时,酶反应就有一个“最适温度”,此时酶的活性最大。我们观察最适温度值时发现,它远远高于生物本身的生理极限温度,这主要是由最适温度的不易确定性决定的。最适温度受实验条件的影响特别是反应时间,作用时间延长,最适温度值就下降。在正常生活条件下,酶消化食物进行的时间是相当长的,这也就不难理解最适温度高于生理温度的现象了。最适温度虽然只是在一定条件下才有意义的数值,但也反应了酶的热稳定性的大致情形,皱纹盘鲍的蛋白消化酶与褐藻酸酶、淀粉酶相比较,其抗热性要好即热稳定性好。运用到实际的饵料配制中,就是当培育温度较高时,饵料中蛋白的配比需适当加大,具体的加大程度还需进一步摸索。

#### 3.2 皱纹盘鲍消化道的 pH 值及蛋白酶与 pH 值的关系

对皱纹盘鲍消化道的 pH 值的测定本实验采用的是试纸,由于试纸方法是通过目测对比色板读数,故带有一定的粗略性。但据前人的测定与总结,认为海洋无脊椎动物的肠胃 pH 值范围为 5.5~7.9[Fred 1977],本实验的结果与此相一致。然而,由于测定方法的问题,本实验未能对消化系统的各个器官进行测定,而且测定的结果也缺乏一定的精确性,所以还有待于今后采用更先进的方法,做进一步详细的测定,因为了解体内环境 pH 值对理解和解释某些生理现象至关重要。

蛋白酶族包括许多种酶,如胰蛋白酶、弹性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶等,最适 pH 值和最适温度与蛋白酶的酶源有很大关系,蛋白酶还可据其反应底物、最适 pH 值和激活物、抑制物的反应来划分种类。

早期有关蛋白消化酶的研究是关于混合蛋白酶,之后在低等动物中发现了不同种类的蛋白酶,但据 Norris 和 Mathies[1940, 1953]的研究总结:在无脊椎动物中不存在胃蛋白酶,而且 Vonk[1953]、Gibson[1953]及于书坤[1987]在对甲壳类的研究中也认同了这个结果,但刘玉梅[1990]等在研究中国对虾不同发育阶段的消化酶时,于 pH=3.00 条件下测得了胃蛋白酶的活力,而且还证明其总体趋势随着个体发育活力增大,只是增大的幅度没有类胰蛋白酶增长的快。此外,据代田昭彦[1989年中译本]对主要的鱼、虾、贝消化酶种类的总结可知:无脊椎动物如龙虾(*Homarus americanus*)、日本巨蜆(*Ostrea imbricata*)、海胆(*Dendraster excentricus*)、海盘车(*Asterias* sp.)中均存有胃蛋白酶,这就对所谓无脊椎动物中不存在胃蛋白酶的结论提出了

质疑。本实验的结果表明:当用酪蛋白做底物进行酶反应时,蛋白酶在  $\text{pH}=2.60$ 、 $5.00$  处出现高峰,且通过数学分析又知  $\text{pH}=2.60$  处的活力值远高于  $\text{pH}=5.00$  处的。一般来说,酪蛋白是能同所有蛋白酶进行反应的通用的底物,通过最适  $\text{pH}$  值的选择可以确定蛋白酶的酶源,这样从本实验的结果就得出结论:皱纹盘鲍存在胃蛋白酶。此结论和代田昭彦的结果相符,而与 Norris 和 Mathies[1940,1953]的结论相悖,这有待于今后利用专一性底物作进一步的验证。

### 3.3 金属离子对蛋白酶的影响

许多物质可以减弱、抑制甚至破坏酶的作用,称之为酶的抑制剂;与此相反也有许多物质可以使酶的作用加强,且在有些情况下只有它们存在时酶反应才能进行,这些物质被称之为酶的活化剂。鲍栖息于海水中,其所食饵料亦生活在海水中,而海水中富含各种金属离子, Bryan[1977]曾对疣鲍(*Haliotis tuberculata*)的金属离子累积作用进行测定,结果表明:其消化盲囊对  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  具有极高的积累,分别达  $(5\ 800 \pm 4\ 200)$ 、 $(13\ 700 \pm 1\ 100)$ 、 $(4\ 920 \pm 2\ 620)$   $\text{mmp/g}$  干组织,这样高的存在能使生物安全生活,表明生物对这些离子有了一定的适应性,甚至作为必需元素进行利用。有关皱纹盘鲍的金属离子累积情况目前未见报道,但从上述对疣鲍的测定结果,再结合本实验得到的  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  离子对蛋白消化酶促进作用的结果,说明某些金属离子的高积累并不会对生物造成危害,有时甚至是有益的,而且这种有益还可能通过酶的作用来实现的。

一般来讲重金属离子为酶的抑制剂,本实验的结果也证实了这一点,  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$  对蛋白消化酶具极强的抑制作用。前人对日本对虾(*Penaeus japonicus*)、鹰爪虾(*Trachypenaeus curvirostris*)蛋白消化酶的测定结果也表明有极大的抑制作用。

鉴于上述生产中应该充分利用有利的金属离子,而尽量避免有害的重金属离子。有关金属离子在人工配合饵料中的添加已有报导,如李荷芳[1993]报道的在中国对虾饵料中添加锰,浮永久等[1985]报道在皱纹盘鲍人工饵料中添加  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ ,均证明了饵料中添加矿物质是相当必要的。这些都为提高皱纹盘鲍人工配合饵料的值提供了科学依据。

本文承蒙青岛海洋大学水产学院的王如才教授审阅,实验中得到大连水产学院桂远明老师、崔铁军老师的大力帮助,特此谢忱。杨蕊萍现为青岛海洋大学水产学院 94 级博士生。

### 参 考 文 献

- 于书坤.1987.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.海洋科学集刊,28:85~90.
- 中山大学生化教研室主编.1978.生化技术导论.北京:人民教育出版社.53~55.
- 刘玉梅,朱谨钊,吴厚余.1990.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.
- 李荷芳,郝 斌.1993.饵料中添加锰对中国对虾的影响.海洋科学,4:48~51.
- 代田昭彦(刘世英、雍文岳译).1969.水产饵料生物学.北京:农业出版社.319~321.
- 浮永久,火野山影,渡边武.1985.アワビ用试验饲料的基本组成の检讨.日本水産学会誌,51(11):1825~1833.
- 猪野峻.1956.邦产アワビ属の増殖にする生物的研究.东海书房.1~10.
- Bryan G W, Potts G W, Forster G T.1977. Heavy metals in the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. J Mat Biol AssU K, 57:379~390.
- Fred P.1977. The pH of body fluids from marine intertidal invertebrates. J Exp Mar Biol Ecol,30:327~331.
- Gibson R, Barker P L.1953. The decapod hepatopancreas. In Oceanography and marine biology annual review. Aberdeen Univ Press,17:

305 ~ 326.

Norris E R, Mathies J C. 1940. Preparation and properties of crystalline salmon pepsin. *J Biol Chem*, 134:443.

Norris E R, Mathies J C. 1953. Preparation and properties of crystallization of tuna pepsin. *J Biol Chem*, 204:673 ~ 678.

Vonk H J. 1953. Digestion and metabolism in the physiology of crustacea. New York: Academic Press. 1:295 ~ 297.

## THE STUDY OF PROTEASE IN *HALIOTIS DISCUS HANNAI* INO

YANG Hui-Ping, TONG Shen-Ying, WANG Zi-Cheng

(*Dalian Fisheries College*, 116023)

**ABSTRACT** The protease of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) was measured during the length of 2 ~ 3cm by means of spectrophotometer. The optimum temperature is 50°C, The optimum pH value is 2.60 and 5.00. Under the optional temperature, the active energy of protease was  $4.89 \times 10^4$  J/mol. Pepsin was detected and found that its activity was very high. The effects of eleven species metal ions were analysed, the result indicated that  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^+$  were inhibited the activity of protease and  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  promoted the activity.

**KEYWORDS** Pacific abalone (*Haliotis discus hannai* ino), Protease