

文章编号:1000-0615(2007)01-0015-08

## 皱纹盘鲍内脏酶的酶学性质及 褐藻胶裂解酶的分离纯化

康平, 汪秋宽, 宋琳琳, 徐玲

(大连水产学院食品工程系辽宁省水产品加工及综合利用重点开放实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:**采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分段盐析、透析、阴离子(DEAE-52)交换柱层析、SephadexG-200凝胶柱层析等分离纯化技术,通过SDS-PAGE电泳分析了皱纹盘鲍内脏酶的组成,结果表明鲍内脏酶主要含有两种褐藻胶裂解酶I, II,一种纤维素酶,一种琼脂酶。对酶的酶学性质分析结果表明两种褐藻胶裂解酶I, II的最适pH分别为8.6, 7.2,最适温度为35℃,分子量分别为35.2 ku, 67 ku;两种褐藻胶裂解酶的热稳定性比较差,且易受金属离子影响;纤维素酶的最适pH为5.0,最适温度为40℃。并确定了皱纹盘鲍内脏酶分离纯化的方法及参数,为进一步研究鲍内脏复合酶的性能提供了基础参数。

**关键词:**皱纹盘鲍;褐藻胶裂解酶;纤维素酶;纯化

**中图分类号:**Q 814; S 917

**文献标识码:**A

## Characteristics of enzymes extracted from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) intestine and purification of the alginate lyase

KANG Ping, WANG Qiu-kuan, SONG Lin-lin, XU Ling

(Key and Open Laboratory of Aquatic Product Processing and Utilization of Liaoning Province,  
Department of Food Engineering, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** The enzymes extracted from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) intestine were studied for finding the alginate and cellulose degradation enzymes. The enzymes were separated and partially purified from abalone intestine by using ammonium sulfate precipitations, and successive fractionation on DEAE-52, SephadexG-200 column chromatography. The results showed that there were four types of enzyme separated, which were alginate lyase I, lyase II, cellulase and agarase. The characteristics of alginate lyase I, lyase II and cellulase related with pH, temperature and ions were also determined and the results indicated that alginate lyase I has the maximum activity at pH 8.6 and 35℃. Alginate lyase II has maximum activity at pH 7.2 and 35℃. Cellulase has maximum activity at pH 5.0 and 40℃. The alginate lyase I and lyase II were not stable at high temperature. The crude enzymes extracted could be obviously activated by  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and inhibited by  $\text{Na}^+$ . SDS-PAGE was used for estimating the molecular weights of enzymes and the findings showed that the molecular weights of alginate lyase I, II were to be 35.2 ku, 67 ku. The findings indicated that there were two types of alginate enzyme could be obtained from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) intestine and the studies established the purification steps

收稿日期:2006-06-22

资助项目:国家“九四八”项目(2005-Z23);辽宁省科技厅攻关项目(2004209001);大连市科技局攻关项目(2003BINS286)

作者简介:康平(1978-),男,辽宁营口人,硕士研究生,主要从事水产品加工及贮藏研究。

通讯作者:汪秋宽, E-mail: wqk320@dlfu.edu.cn

and theoretical base for further work, reconstruction, production and application of three enzymes. Further work should be carried out on the N-end and sequences of the enzymes.

**Key words:** *Haliotis discus hannai* Ino; alginate lyase; cellulose; purification

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)是鲍中分布较广泛,产量最大的一种<sup>[1]</sup>。皱纹盘鲍属软体动物门,腹足纲,前鳃亚纲,原始腹足目,鲍科,是我国北方海珍品的主要养殖种类<sup>[2]</sup>,其特殊的生长习性、营养及药用价值说明它的消化能力强,体内具有活力强的酶<sup>[3-4]</sup>。近年来,鲍内脏酶的研究越来越为人们所重视,特别是鲍内脏中的褐藻胶裂解酶、纤维素酶、琼脂酶的研究和应用<sup>[5]</sup>。

Clark 对产于新西兰虹鲍 Hart 的内脏消化酶进行研究,检测了鲍内脏 14 种多糖酶的活力,例如木糖酶、淀粉酶、羧甲基纤维素酶、褐藻酸酯酶、海藻多糖酶、 $\beta$ -N-乙酰氨基葡甘酶、 $\beta$ -D-葡糖醛酸酶、 $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶、蛋白酶,并指出这些酶作为商业酶制剂的可能性<sup>[5-6]</sup>。近些年我国学者对九孔鲍、皱纹盘鲍研究并发现其内脏酶主要包括褐藻胶酶、纤维素酶、琼脂酶与淀粉酶<sup>[7]</sup>,说明鲍内脏酶含多种酶,研究指出鲍内脏酶与贻贝酶的区别在于后者不含或含微量的褐藻胶酶,另鲍内脏酶对海带具有解壁作用,且鲍内脏褐藻胶酶的最适作用 pH 与解壁作用最适 pH 相近。研究还发现鲍内脏含有果胶酶和贻贝果胶酶,并指出至今未见动物体内含有果胶酶的报道,有待进一步研究证实<sup>[7]</sup>。

本文对皱纹盘鲍内脏酶的组成及其性能进行了研究,并探讨了皱纹盘鲍内脏褐藻胶裂解酶提取分离纯化的技术和方法,为进一步研究和应用皱纹盘鲍内脏酶提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**原料** 皱纹盘鲍(壳长 3~4 cm)由大连碧龙公司提供。

**试剂** 褐藻酸钠(sodium alginate)、琼脂粉(agar powder)、牛血清蛋白均为分析纯试剂,羧甲基纤维素钠(sodium carboxy methyl cellulose)为食品级。SephadexG-200(Pharmacia Biotech 公司)、DEAE-52(Pharmacia Biotech 公司)。

**仪器** 自动部分收集器,蠕动泵(BT100),722s 可见分光光度计,紫外可见分光光度计(UV

-754),冷冻离心机(biofuge stratas),数显高速分散均质机,真空冷冻干燥(ALPHA I-5)。

### 1.2 方法

**鲍内脏原酶液的提取** 取采集的新鲜皱纹盘鲍,洗去杂质,破壳,取其内脏,加入 20 倍(W/V)预冷的 0.5% KCl 溶液,用数显高速匀浆机匀浆,4℃静置浸提过夜。匀浆液在 4℃下低温离心 10 000 g × 30 min,将上清液 4℃过滤即得原酶液,4℃保存备用。

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 分段盐析纯化** 取离心管 10 支,分别加入原酶液 10 mL,并分别将其(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>饱和度调为 20%,40%,60%,80%,90%,95%,100%。玻璃棒搅拌均匀溶解,静置 30 min,然后离心取上清液,检测蛋白质含量,同时用 DNS 法测其酶活力并确定最佳的盐析饱和度,盐析纯化后即得粗酶液。

**阴离子交换柱(DEAE-52)层析纯化褐藻酸裂合酶<sup>[8]</sup>** 将经过盐析透析后的酶液,用 DEAE-52 (2.6 cm × 30 cm)阴离子交换柱进行分离纯化,先用 Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol · L<sup>-1</sup>, pH 8.6)平衡,再用等量的 Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol · L<sup>-1</sup>, pH 8.6)和 KCl 溶液(0.5 mol · L<sup>-1</sup>)进行连续梯度洗脱,流速为 0.3 mL · min<sup>-1</sup>,收集活性峰溶液,透析脱盐并冷冻干燥浓缩, -20℃保存备用。

**SephadexG-200 凝胶柱层析法纯化褐藻酸裂解酶** SephadexG-200 经过浸泡、溶胀、抽气后装柱(1.6 cm × 100 cm),将样品用 Tris-HCl(0.05 mol · L<sup>-1</sup>, pH 8.6)缓冲液溶解上柱,用同样缓冲液洗脱,流速为 0.2 mL · min<sup>-1</sup>,检测蛋白质含量与酶活性,收集活性峰,冷冻干燥浓缩,得到褐藻胶裂解酶的单一组分。同时进行标准样洗脱。

### 酶活力测定

(1)紫外吸收法<sup>[9]</sup> 将 0.3 mL 酶液,0.3 mL 褐藻酸钠(1%)和 pH 8.6 的 2.4 mL Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol · L<sup>-1</sup>)混合,于 35℃水浴中反应 30 min,在 235 nm 波长下测其吸光值的变化。酶活力定义为在一定温度和 pH 值下,每毫升酶液每分钟催化褐藻酸钠裂解使底物吸光值升高

0.01 为 1 个酶活单位。

(2)DNS 法<sup>[10]</sup> 3 mL 底物(分别为 1% 褐藻酸钠、1% 纤维素钠、0.5% 琼脂)、3 mL 缓冲液和 1 mL 酶液,在一定温度的水浴中反应 30 min,100 °C 灭活 15 min。取 1 mL 反应液加入 3 mL DNS 溶液,沸水浴反应 15 min 后,冷却,定容至 25 mL,以蒸馏水为空白,于 520 nm 下测定吸光值。以葡萄糖做标准曲线,根据反应组和对照组吸光值的差计算还原糖的产生量。1 个酶活力单位(U)定义为在各自温度条件下 1 min 产生 1 μg 还原糖所需要的酶量。

蛋白质含量的测定<sup>[11]</sup> 蛋白质含量采用紫外吸收法,以牛血清蛋白作标准。

酶液脱盐浓缩 纯化后酶液用透析脱盐、冷冻干燥浓缩。

SDS-PAGE 电泳测定褐藻胶裂解酶分子量 将样品加入 2 倍浓度的 Sample Buffer 中,在沸水浴中加热 3 min 变性,取出冷却后进行电泳,同时进行低分子量标准蛋白电泳。固定后,用考马斯亮蓝 G-250 进行染色;以 Tris-Gly-SDS 为电泳缓冲系统,在室温下 100 V 恒压电泳。电泳结束后,将含有分子量标记的凝胶带切下进行染色和脱色。

## 2 结果

### 2.1 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 分段盐析浓度的确定

蛋白质和酶活力的测定结果见图 1。由图 1 可以看出,当硫酸铵饱和度达 90% 时,蛋白质含量已不再降低,上清液中各种酶活力都很小,说明在硫酸铵饱和度达 90% 时,粗酶液中的酶几乎全部被沉淀下来。因此确定了硫酸铵盐析的饱和度为 90%。同时,由图 1 也可得出皱纹盘鲍内脏酶是一种复合酶,对海藻类食物的降解是多种酶共同作用的结果,其中尤以褐藻胶裂解酶活力最强,且在消化吸收海藻类食物中起主要作用。

### 2.2 粗酶液中褐藻胶裂解酶的酶学性质

温度和 pH 值对粗酶液中褐藻胶裂解酶活性的影响 在 pH 值为 8.6 的 Tris-HCl 缓冲液中,将酶于不同温度下反应 30 min 后,用 DNS 法测其褐藻胶裂解酶活力。由图 2 可知,该酶在 30 ~ 40 °C 区间活性最高,且在 35 °C 活性最强。以褐藻酸钠为底物,用 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 不同 pH 值的缓冲液

配制成反应液,在 35 °C 保温反应 30 min,测其酶活力,其测定结果由图 3 显示,由图 3 可见,皱纹盘鲍内脏褐藻胶裂解酶的活力有 3 个峰值,其 pH 值分别为 7.2、8.6、9.0,说明皱纹盘鲍内脏可能含有几种褐藻胶裂解酶或有其同功酶存在。

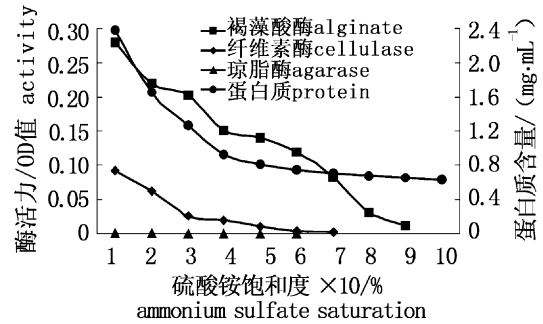


图 1 粗酶液在不同饱和度硫酸铵中上清液中各酶活性及蛋白质含量

Fig. 1 Enzyme activity and proteins of the supernatant fluid from crude enzyme in different ammonium sulfate saturation

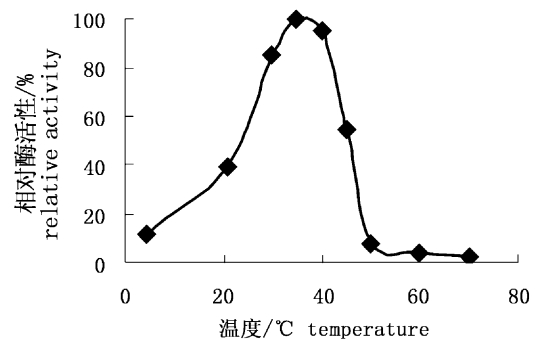


图 2 温度对褐藻胶裂解酶活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on alginate lyase activity

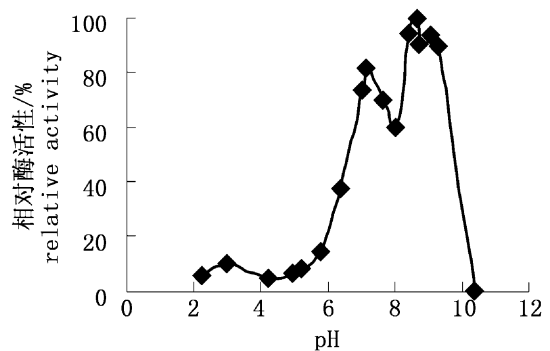


图 3 pH 对褐藻胶裂解酶活性的影响

Fig. 3 Effect of pH on alginate lyase activity

温度和 pH 值对粗酶液中褐藻胶裂解酶稳定性的影响 在 pH 8.6 的缓冲液中,将酶液于不同温度下保温 1 h,然后用 DNS 法测定褐藻胶裂解酶活力,测定结果见图 4,由图 4 可知该酶在 35 °C 保温 1 h 后,剩余酶活力为 85.3%;在 40 °C 保温 1 h 后,剩余酶活力为 43.6%;而在 45 °C 时剩余酶活力仅有 11.3%。说明褐藻胶裂解酶的热稳定性比较差。用不同 pH 缓冲液配制酶液,在 4 °C 放置 1 h,然后用 DNS 法测定酶活力,结果如图 5 所示。由图 5 显示当 pH 为 7~9.5 时,褐藻胶裂解酶活力最稳定。同时也看到有 3 个峰值印证皱纹盘鲍内脏含有几种褐藻胶裂解酶或有其同功酶的存在的可能性。

金属离子对粗酶液中褐藻胶裂解酶活性的影响 将酶液分别与各种金属离子混合置于 4 °C,静置 30 min 后,测定褐藻胶裂解酶活力,以不加金属离子的酶液为对照,结果见表 1。由表 1 可见  $Zn^{2+}$  和  $Na^+$  对褐藻胶裂解酶活性具有抑制作用,而  $Fe^{3+}$ 、 $Al^{3+}$  和  $Ca^{2+}$  则对其具有明显的促进作用。进而说明褐藻胶裂解酶活性受金属离子影响较大。

表 1 金属离子对酶稳定性的影响

Tab. 1 Effects of metal ions on relative enzyme activity

金属离子 metal ions ( $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	对照 control	$Mn^{2+}$	$K^+$	$Na^+$	$Al^{3+}$	$Ca^{2+}$	$Cu^{2+}$	$Mg^{2+}$	$Ba^{2+}$	$Zn^{2+}$
相对酶活力 relative activity	100	149.7	102.1	72.7	159.6	175.5	170.4	104	113.1	98

皱纹盘鲍内脏中褐藻胶裂解酶的米氏常数 通过测定不同底物浓度  $[S]$  下的反应速度  $V$ ,可以确定酶催化的最大速度  $V_{max}$  和米氏常数  $K_m$ 。在试管中加入 0.3 mL 酶液和 Tris-HCl 缓冲液 ( $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.0),于 40 °C 恒温 2 min。再分别加入不同量的 1% 褐藻酸钠,使总体积为 3.0 mL。于 40 °C 反应 20 min,再分别测定反应前后的  $OD_{235}$ 。 $1/V$  为各测得的酶活力的倒数。以  $1/V$  为纵坐标, $1/[S]$  为横坐标作图。根据双倒数作图法(Lineweave-Burt),求出最大反应速度  $V_{max} = 2000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,米氏常数  $K_m = 1.617 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.3 粗酶液中纤维素酶的酶学性质

温度和 pH 值对粗酶液中纤维素酶活性的影响 在 pH 值为 5.0 的磷酸盐缓冲液中,将酶于不同温度下反应 30 min,用 DNS 法测纤维素酶

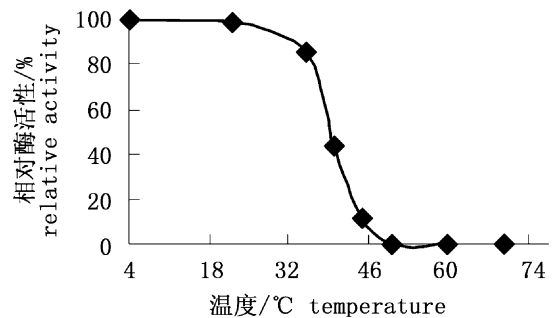


图 4 温度对褐藻胶裂解酶稳定性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on stability of alginate lyase

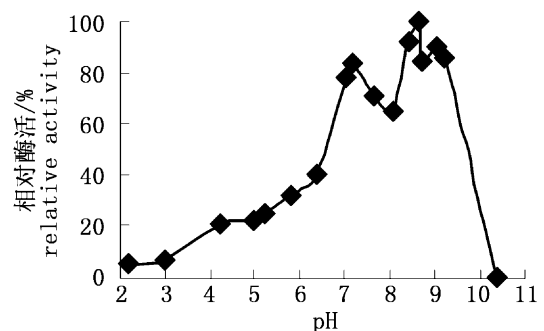


图 5 pH 对褐藻胶裂解酶稳定性的影响

Fig. 5 Effect of pH on stability of alginate lyase

活力。由图 6 结果可知该酶在 35~60 °C 区间活性最强,且在 40 °C 达最高,因此纤维素酶的最适作用温度为 40 °C。以羧甲基纤维素钠为底物,用  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  不同 pH 值的缓冲液配制成反应液,于 40 °C 反应 30 min,测纤维素酶活力,由图 7 结果可知纤维素酶在 pH 5.0 时酶活力达最大。

温度和 pH 值对粗酶液中纤维素酶稳定性的影响 在 pH 5.0 的缓冲液中,将酶液于不同温度下保温 1 h,然后用 DNS 法测定纤维素酶活力。结果表明该酶在 40 °C 保温 1 h 后,剩余活力为 70.4% (图 8);在 50 °C 保温 1 h 后,剩余活力为 48%;在 60 °C 时酶剩余活力仅有 2.4%。说明纤维素酶的热稳定性也比较差,但较褐藻胶裂解酶稳定。将酶液用不同 pH 缓冲液配制,在 4 °C 放置 1 h,然后测定酶活力。由图 9 结果可知纤维素酶活力在 pH 5.0~6.0 最稳定。

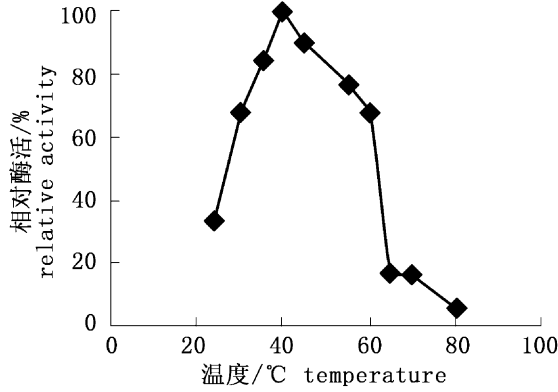


图 6 温度对纤维素酶活性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on a cellulase activity

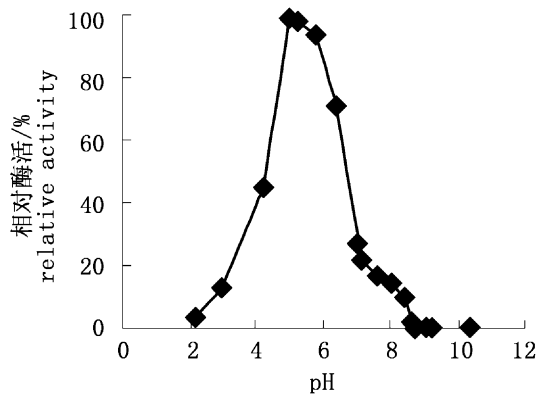


图 7 pH 对纤维素酶活性的影响

Fig. 7 Effect of pH on a cellulase activity

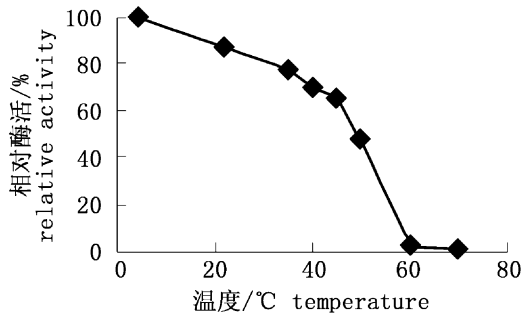


图 8 温度对纤维素酶稳定性的影响

Fig. 8 Effect of temperature on stability of cellulase

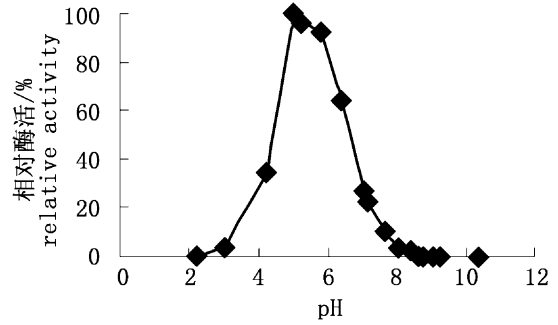


图 9 pH 对纤维素酶稳定性的影响

Fig. 9 Effect of pH on stability of cellulase

金属离子对粗酶液中纤维素酶活性的影响

将酶液分别与各种金属离子混合置于 4 °C, 静置 30 min 后, 测定纤维素酶活力, 以不加金属离子的酶液为对照, 结果见表 2, 由表 2 可见 Ba<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 和 Al<sup>3+</sup> 对纤维素酶活性具有促进作用, 而 Cu<sup>2+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 则对其具有明显的抑制作用。

纤维素酶的米氏常数 通过测定不同底物浓度 [S] 下的反应速度 V, 可以确定酶催化的最大速度 V<sub>max</sub> 和米氏常数 Km。在试管中加入 0.3 mL 酶液和 Tris-HCl (0.05 mol · L<sup>-1</sup>, pH 7.0) 缓冲液, 于 40 °C 恒温 2 min。再分别加入不同量的 1% 纤维素, 使总体积为 3.0 L。于 40 °C 反应 20 min 分别测定反应前后的 OD<sub>520</sub>, 1/V 为各测得的酶活力的倒数。以 1/V 为纵坐标, 1/[S] 为横坐标作图。根据双倒数作图法 (Lineweave-Burt), 求出最大反应速度 V<sub>max</sub> = 79.4 U · mL<sup>-1</sup>, 米氏常数 Km = 223.4 mg · mL<sup>-1</sup>。

2.4 褐藻胶裂解酶的 DEAE-52 柱层析纯化

将粗酶液用 DEAE-52 柱层析, 层析曲线呈 3 个蛋白质洗脱峰, 2 个褐藻胶裂解酶的活性峰 (图 10)。将 2 个活性峰分别收集、透析脱盐、冷冻浓缩得两个褐藻胶裂解酶组分, 各步纯化结果见表 3。

表 2 金属离子对酶稳定性的影响

Tab. 2 Effects of metal ions on relative enzyme activity

金属离子 metal ions (2 mmol · L <sup>-1</sup> )	对照 control	Mn <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Al <sup>3+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ba <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
相对酶活力 relative activity	100	44.2	111.5	109.6	105.7	84.6	25	71.2	115.4	84.6

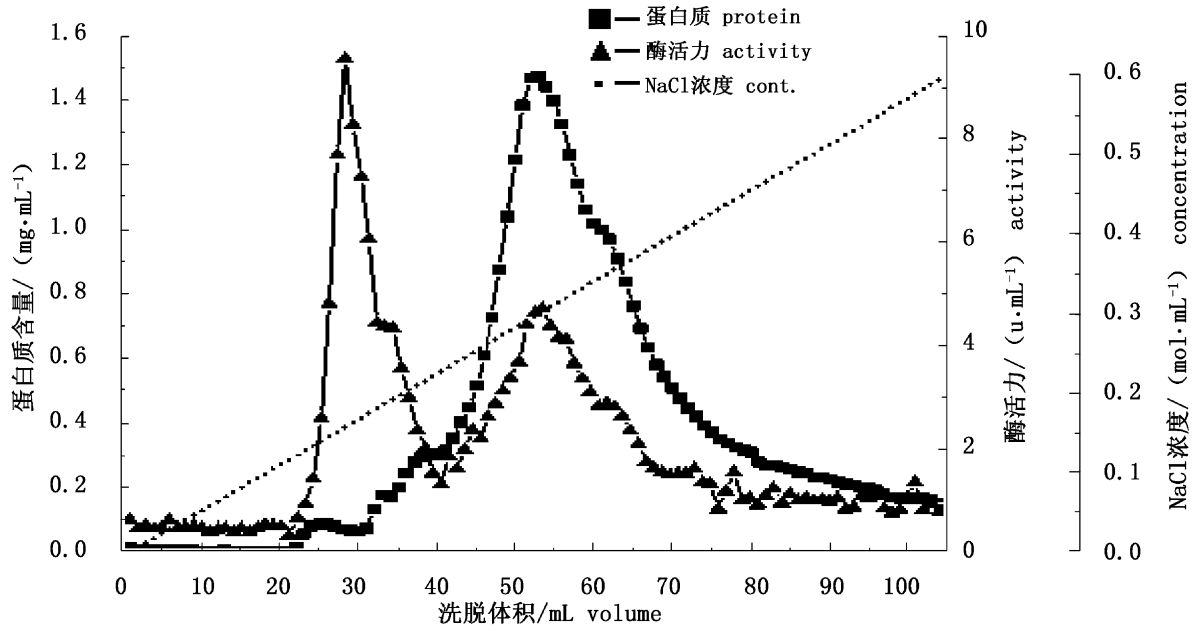


图 10 DEAE-52 离子交换柱层析梯度洗脱曲线、酶活曲线  
Fig. 10 Elution profile of proteins activity in DEAE-52 chromatography

表 3 褐藻胶裂解酶各步纯化结果  
Tab. 3 Purification of alginate lyase

步骤 purification	总活力(U) total activity	总蛋白(mg) total protein	比活力(U·mg <sup>-1</sup> ) sepecific activity	回收率(%) yield	纯化倍数 purification times
crude	4800	1944.2	2.47	100	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (90%)	2959	1066.1	2.78	62	1.13
DEAE-52					
enzyme I	1313.9	43.75	30.03	27.4	12.27
enzyme II	1608.1	501.4	3.21	33.5	1.30

用紫外吸收法对上述所得褐藻酸裂解酶组分 I、II 的最适 pH 进行检测。如图 11 所示,酶组分 I 的最适 pH 值为 8.6,酶组分 II 的最适 pH 为 7.2。粗酶液中不同的褐藻胶裂解酶所带电荷不同,经 DEAE-52 阴离子交换吸附后,再由 NaCl 梯度洗脱;根据吸附能力不同,不同的褐藻胶裂解酶被分别洗脱出来。因此,实验分离纯化所得的褐藻胶裂解酶组分至少是两种褐藻胶裂解酶:酶 I、II,且它们的最适 pH 值与粗酶液的酶学性质相对应。酶 I 的比活力较高,说明其有较高的应用价值。但如表 3 所示,经 DEAE-52 柱层析纯化,两种酶的回收率都较低。

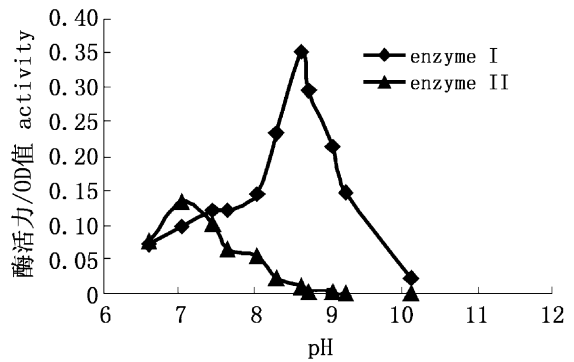


图 11 Enzyme I、enzyme II 的最适 pH 值  
Fig. 11 Effect of pH on enzyme I, enzyme II activity

**2.5 SephadexG-200 柱层析进一步纯化褐藻胶裂解酶** 对 DEAE-52 分离纯化后的褐藻胶裂解酶 I、II 进一步纯化,将粗酶 I、II 分别上 SephadexG-200 柱(1.6 cm × 100 cm),以 Tris-HCl

(0.05 mol · L<sup>-1</sup>, pH 8.6) 缓冲液为洗脱液,进行洗脱,检测蛋白峰同时采用紫外吸收法检测褐藻胶裂解酶活性并收集活性峰,透析后真空冷冻干燥,得到褐藻胶裂解酶的单一组分。如图 12 和

13 所示得到进一步纯化的褐藻胶裂解酶 I, II。

对于褐藻胶裂解酶 I,由图 12 的 SephadexG-200 分子量分布曲线可见,有一个明显的褐藻胶裂解酶活洗脱峰,峰值  $K_{av} = 0.4966$ , 根据 SephadexG-200 标准曲线计算蛋白质分子量得其峰值处的褐藻胶裂解酶的分子量为 35 ku。对于褐藻胶裂解酶 II,也有一个明显的酶活洗脱峰,如图 13 峰值  $K_{av} = -0.0608$ , 其峰值处于

SephadexG-200 凝胶柱的外水体积以外,无法计算分子量。有待于采用电泳方法测定其纯度和分子量。

**2.6 SDS-PAGE 电泳测定褐藻胶裂解酶的纯度及相对分子量** 纯化得酶 I、II SDS-PAGE 电泳结果如图 14,考马斯亮蓝染色分别显示两条蛋白带,证明酶 I、II 已经被纯化,由标准蛋白质计算得到该蛋白酶的分子量分别是 35.2 ku、67 ku。

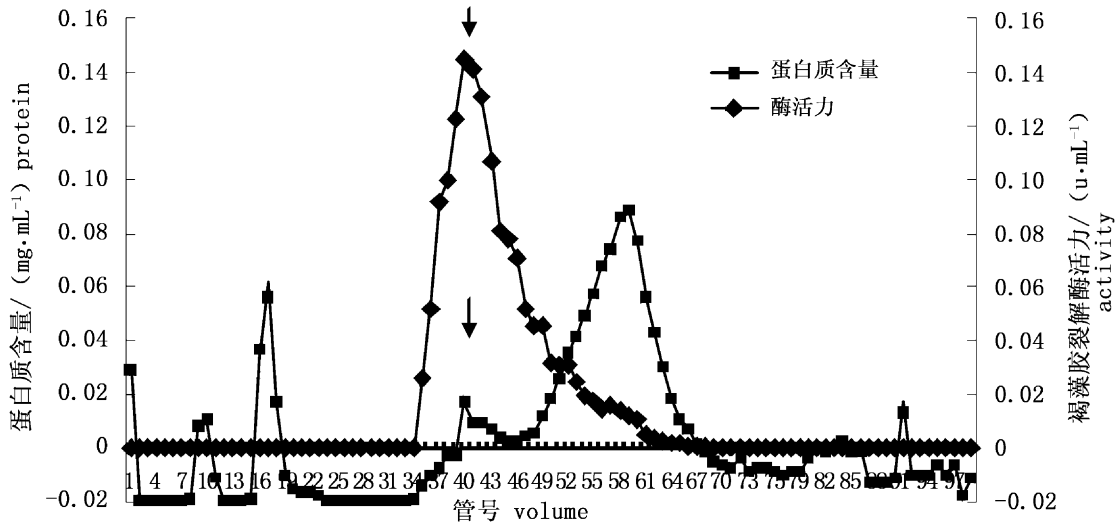


图 12 SephadexG-200 凝胶柱层析洗脱曲线、酶活曲线(酶 I)  
Fig. 12 Elution profile of proteins and activity in SephadexG-200 chromatography (enzyme I)

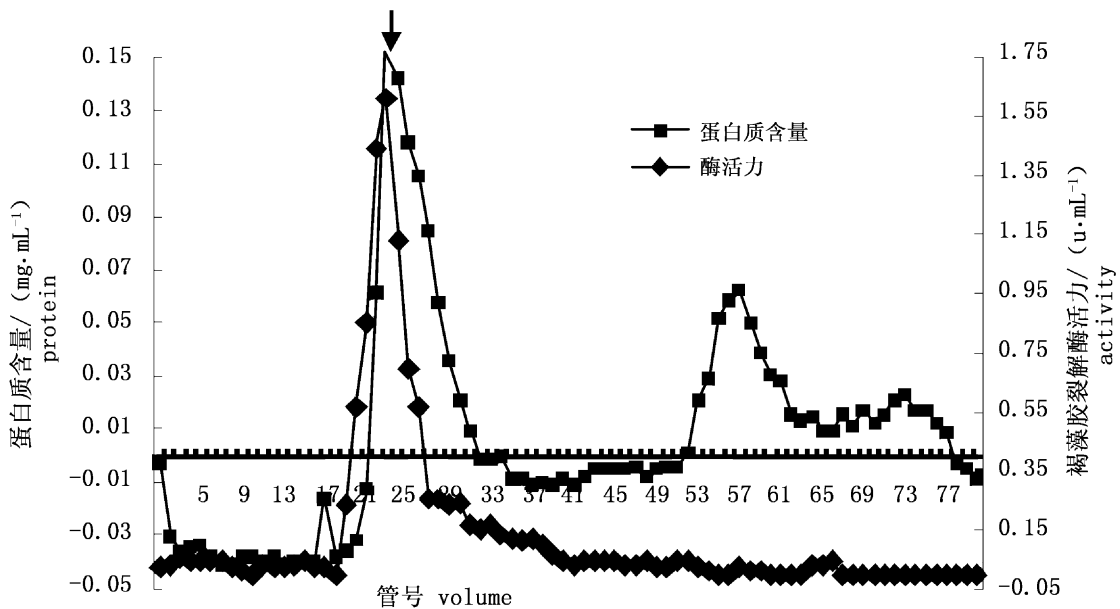


图 13 SephadexG-200 凝胶柱层析洗脱曲线、酶活曲线(酶 II)  
Fig. 13 Elution profile of proteins and activity in SephadexG-200 chromatography (enzyme II)

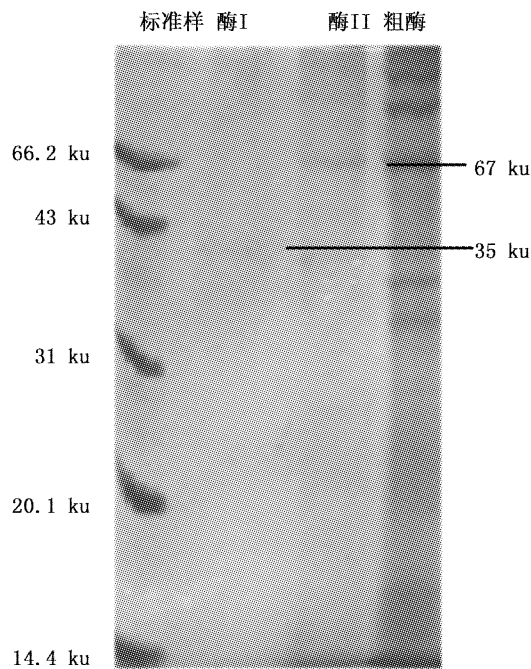


图 14 SDS-PAGE 电泳结果  
Fig. 14 SDS-PAGE profile of the alginate lyase

### 3 讨论

研究针对皱纹盘鲍内脏酶,通过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分段盐析、透析、阴离子(DEAE-52)交换柱层析、SephadexG-200 凝胶柱层析等技术,分离纯化得到了两种褐藻胶裂解酶、一种纤维素酶、一种琼脂酶。经纯化后的琼脂酶活力较弱,本研究没有进一步深入。王运吉等<sup>[7]</sup>曾研究皱纹盘鲍内脏酶发现其至少含有 4 种水解酶,褐藻胶酶在 pH 6.5~8.0 内稳定;纤维素酶在 pH 5.5~6.5 内稳定。这与本研究所得结果相类似。杨慧萍等<sup>[2]</sup>对皱纹盘鲍的淀粉酶和褐藻胶酶进行研究,得到褐藻胶酶最适温度与本研究结果一致为 35℃。Eri Shimizu 等<sup>[12]</sup>对盘鲍(*Haliotis discus hannai*)胰腺中的褐藻胶裂解酶进行研究并对其氨基酸测序,建立了 cDNA 库,最终在细菌中表达,人工合成了褐藻胶裂解酶。本研究确定了皱纹盘鲍内脏酶提取盐析的最佳条件及用 DEAE-52 柱层析分离纯化酶的参数,通过 SephadexG-200 凝胶柱层析分离纯化到单一组分的褐藻胶裂解酶 I、II,并计算出它们的分子量分别为 35.2 ku、67 ku,为深入研究皱纹盘鲍内脏复合酶奠定了基础。

在酶学性质研究方面,纯化后的褐藻胶裂解酶具有降解褐藻酸钠的活性,同时发现两种褐藻胶裂解酶受金属离子影响较大。而金属离子对纤维素酶影响较小。金属离子是褐藻胶裂解酶获得最大活性所必须的,但是由于酶的性质差异,即使同一种属来源的褐藻胶裂解酶,其受金属离子的影响也是不同。在酶的热稳定性实验中,发现粗酶液(硫酸铵沉淀的酶液)中各种酶的热稳定性都较差。

### 参考文献:

- [1] 徐君卓. 养鲍新动向及其思考[J]. 海洋水产科技, 1997, 53(1): 17-19.
- [2] 杨慧萍, 童圣英, 王子臣. 皱纹盘鲍淀粉酶和褐藻胶酶的研究[J]. 水产学报, 1998, 22(4): 345-351.
- [3] Garcia-Carreno F L, Navarrete del Toro M M, Serviere-Zaragoza E. Digestive enzymes in juvenile green abalone, *Haliotis fulgens*, fed natural food [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2003, 134: 143-150.
- [4] 易美华, 王锡彬, 周秋华. 海南鲍营养成分及活性物质的分析研究[J]. 农牧产品开发, 1997, (12): 35-38.
- [5] 吴永沛, 何碧烟. 九孔鲍的褐藻胶酶、琼脂酶及纤维素酶的提取纯化[J]. 海洋科学, 2002, 26(3): 4-7.
- [6] 杜少波. 皱纹盘鲍稚鲍消化生理和营养需求[J]. 中国饲料, 2000, 11: 21-23.
- [7] 王运吉, 刘金珍, 孙勉英, 等. 鲍鱼酶的植被及其性质[J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(4): 302-304.
- [8] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京: 人民教育出版社, 1979: 94-96.
- [9] 孙丽萍, 薛长湖, 许家超, 等. 锈凹螺褐藻胶裂解酶的分离纯化及性质研究[J]. 中国水产科学, 2004, 11(3): 266-271.
- [10] 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: 61-62.
- [11] 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 102-208.
- [12] Eri Shimizu, Takao Ojima, Kiyoyoshi Nishita. cDNA cloning of an alginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai* [J]. Carbohydrate Research, 2003, 338: 2841-2852.