

温度、pH 和金属离子对仿刺参蛋白酶活力影响的研究

王吉桥¹, 唐黎^{1,3}, 许重¹, 程骏驰¹, 王年斌²

(1. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023; 2. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省应用海洋生物技术开放性实验室, 辽宁 大连 116023; 3. 贵州大学 动物科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 利用分光光度计比色法测定了温度、pH 值和 Hg^{2+} 等 9 种金属离子对体长 $24.2 \text{ cm} \pm 0.7 \text{ cm}$ 仿刺参(*Apostichopus japonicus*)消化道中蛋白酶活性的影响。结果表明, 蛋白酶的最适温度为 40°C , 对热不稳定, 最适 pH 为 7.2。 Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} 对蛋白酶的活性有抑制作用, 抑制作用由强至弱依次为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Mn}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$, 其中 Hg^{2+} 和 Ag^+ 与对照差异极显著($P < 0.01$), 表现出极强的抑制作用; Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} 则对酶活有一定的促进作用, 其促进作用大小依次为 $\text{Mg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$, Mg^{2+} 与对照差异显著($P < 0.05$)。

关键词: 仿刺参 (*Apostichopus japonicus*); 蛋白酶; 温度; pH 值; 金属离子

中图分类号: Q48; Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2007)11-0014-05

大规模养殖仿刺参急需开发出科学合理的人工饲料。了解仿刺参的营养需求和消化酶的动力学是配制人工饲料的理论基础。国内外有关水产动物消化酶的研究很多, 对水产无脊椎动物消化酶的研究也取得了一定的进展^[1-8], 但对于仿刺参消化生理方面的研究尚未见报道。为此, 作者在实验室研究了温度、pH 值和 Hg^{2+} 等 9 种金属离子对体长 $24.2 \text{ cm} \pm 0.7 \text{ cm}$ 仿刺参消化道中蛋白酶活性的影响, 以探讨仿刺参的消化生理, 为科学配制仿刺参人工饲料提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用仿刺参共 16 个, 体长 $24.2 \text{ cm} \pm 0.7 \text{ cm}$ (麻醉状态下), 体质量 $179.866 \text{ g} \pm 1.609 \text{ g}$, 取自大连市黑石礁海区, 为自然生长的个体。饲养在大连水产学院海水养殖综合实验室, 饲养用水为沙滤海水, 每天 4/5 换水量, 盐度为 30~32, 水温为 $12.0 \sim 16.0^\circ\text{C}$, 投喂鼠尾藻粉和海泥, 常规管理。

酪蛋白 (TAME) 购自美国 Sigma 公司; 其他试

剂均为国产 AR 试剂; 采用 721 型光栅分光光度计、美国 Beckman 公司的大容量高速冷冻离心机和数字控温式水浴锅。

1.2 方法

正常饲养的仿刺参停食 72 h, 尽量使其排空消化道内的食物残渣, 称体质量, 测体长, 于冰盘内注射 0.35 mol/L KCl 溶液, 诱导排脏, 获得消化道, 剔除与消化道末端相连的呼吸树, 用冰冻重蒸水配置的 pH 值 7.0 磷酸盐缓冲溶液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) 冲洗, 在称量瓶中摇匀后称质量, 置于冰箱中暂存备用。酶液的制取: 在冰浴中用玻璃研磨器匀浆样品, 每 1 g 样品研磨 10~15 min, 按 1.0 g 样品 10.0 mL 缓冲溶液的比例分次加入 pH 值 7.00 的磷酸缓冲溶液。然后在高速冷冻离心机中将匀浆液以 4°C 冷冻离心 30

收稿日期: 2005-04-26; 修回日期: 2005-09-20

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目 (20022109)

作者简介: 王吉桥 (1950-), 男, 辽宁大连人, 博士, 教授, 研究方向: 无脊椎动物学, 水产动物营养与饲料, 水产生物技术, 电话: 13130025206, E-mail: jqwang1950@163.com

min(5 000 r/min), 其上清液即为粗酶提液, 4℃保存。此粗酶提液必须在 24 h 内分析完毕。

实验温度范围为 5~70 ℃, 梯度为 5 ℃。用恒温水浴锅控温。pH 范围为 5.2~9.0, 梯度为 0.4~0.6。 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲体系的 pH 值为 5.2~8.2;

Tris-盐酸缓冲液^[9~12]体系的 pH 范围为 8.2~9.0。

金属离子种类及来源如表 1 所示, 其中 Hg^{2+} 离子浓度为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 其他离子浓度为 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。

表 1 金属离子的种类及来源化合物

Tab. 1 The metal ions and their compounds used in the experiment

金属离子	Mn^{2+}	Cu^{2+}	Ba^{2+}	Pb^{2+}	Ca^{2+}	Zn^{2+}	Mg^{2+}	Ag^{+}	Hg^{2+}
来源化合物	MnCl_2	CuSO_4	BaCl_2	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	CaCl_2	ZnSO_4	MgSO_4	AgNO_3	HgCl_2

1.3 蛋白酶活力的测定

依福林-酚试剂法^[9], 略加修改。具体操作方法是: 向试管中加入 0.5% 的酪蛋白溶液 2.0 mL 和各 pH 梯度的缓冲溶液 4.0 mL, 在各个温度下保温 5 min, 然后加入酶粗提液 1.0 mL, 保温 20 min, 立即加入 10% 三氯醋酸 2.0 mL 终止反应。取出常温离心 (3 000 r/min) 10 min 后的上清滤液 1.0 mL, 加入 0.4 mol/L 的碳酸钠溶液 5.0 mL, 再加入 1 mol/L 的福林试剂 1.0 mL, 于 40 ℃ 恒温水浴中显色 20 min, 然后在 680 nm 波长下比色测定, 以蒸馏水校零作为参照, 对照管在加入酶粗提液前先加 2.0 mL 10% 的三氯醋酸使酶失活, 其他同测定管。

蛋白酶活力单位定义: 在一定 pH 值和温度下保温 20 min, 1 g 仿刺参消化道 1 min 水解 0.5% 的酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸即为 1 个蛋白酶活力单位。

样品蛋白质浓度的测定 (考马斯亮蓝 G-250 法), 取 0.1 mL 酶液放入试管中, 加入 5.0 mL 考马斯亮蓝 G-250, 将溶液混匀, 5 min 后在 595 nm 波长下比色测定, 以蒸馏水代替酶液作为参照。

标准曲线方程: $y=0.0006x-0.0014$ ($r=0.9970$) 式中: x 为蛋白质质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。

蛋白酶活力以比活力单位表示即每 mg 蛋白质所显示的活力, 表示为 (活力单位/mg)。

2 结果

2.1 蛋白酶的反应进程曲线

在 pH 7.8、温度 40℃ 条件下, 分别测定反应 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 min 的酶活力, 结果如图 1 所示。蛋白酶的反应进程曲线表明: 在 0~20 min 内, 稳态过程刚刚建立起来。各种干扰因素尚

未起作用, 产物的变化量随反应时间延长而线性地增加, 反应速度恒定。代表蛋白酶的反应初速度和蛋白酶的催化活性; 20 min 后随着反应的进行, 底物浓度下降、产物浓度不断增加, 反应趋势向逆反应方向进行; 同时酸、碱、热等干扰因素也在慢慢地使酶丧失部分活性, 使反应速度逐渐降低, 蛋白酶的反应进程曲线逐渐地弯曲下来。因此选择蛋白酶的反应时间为 20 min。

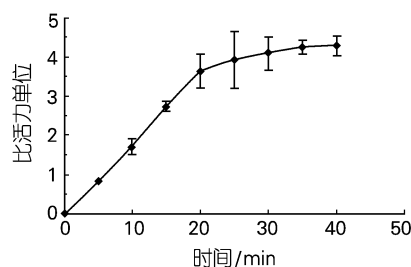


图 1 仿刺参蛋白酶的反应进程曲线

Fig. 1 The reaction curve of protease in the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

2.2 蛋白酶的活力与温度的关系

pH 7.8 时, 在 5~40 ℃ 范围内, 蛋白酶的活力随着温度的升高而逐渐上升 (图 2), 40 ℃ 达到最高值, 之后, 随着温度的上升而快速下降。在温度 35 ℃ 和 40 ℃ 下酶活力差异不显著 ($P>0.05$), 即蛋白酶的适宜温度范围为 35~40 ℃, 最适为 40 ℃。温度系数 Q_{10} 是温度升高 10 ℃ 时, 酶反应速度增加的倍数, 是该酶的一个特征值, 仿刺参蛋白酶的温度系数测定见表 2, 由表可知在最适范围内的 Q_{10} 最大。时

间为 20 min。

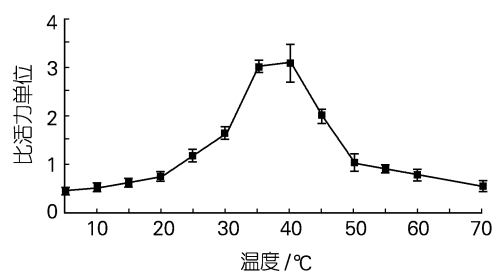


图2 仿刺参蛋白酶活力与温度的关系

Fig. 2 The relationship between protease activities and temperature in the sea cucumber

表2 仿刺参蛋白酶的温度系数

Tab.2 Q_{10} of protease activities in the sea cucumber

温度 (°C)	Q_{10}
0~10	1.09
10~20	1.96
20~30	3.25
30~40	3.68
40~50	0.49
50~60	0.69
60~70	0.81

2.3 蛋白酶的活力与 pH 值的关系

测定表明, 仿刺参消化道呈中性略偏酸。40 °C 下, pH 在 5.2~7.2 范围内时, 蛋白酶活力随着 pH 升高而增大 (图 3), pH7.2 时蛋白酶的活力最大。pH7.2~9.0 时, 蛋白酶活力随着 pH 升高而降低。pH6.8

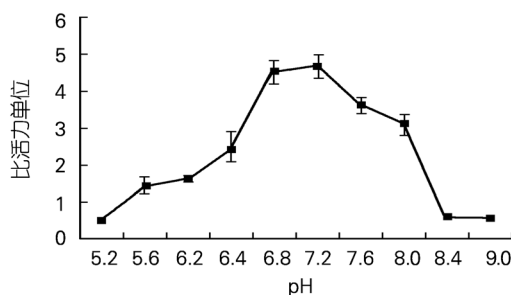


图3 仿刺参消化道蛋白酶活力大与 pH 值的关系

Fig. 3 The relationship between protease activities and pH values in digestive tracts in the sea cucumber

和 pH7.2 时酶活力差异不显著 ($P>0.05$), 即蛋白酶的适宜 pH 范围为 6.8~7.2, 最适为 7.2。pH8.4 和 pH9.0 时酶活力差异不显著 ($P>0.05$), 表明在偏碱性环境中, 仿刺参蛋白酶活力很低, 当 pH>8.4 时, 酶活力降低的趋势缓慢。

2.4 金属离子对蛋白酶活力的影响

在 40 °C 和 pH7.2 下, Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Ba^{2+} 和 Ca^{2+} 对蛋白酶的活性有抑制作用, 其抑制作用由强至弱依次为 $Hg^{2+}>Ag^+>Mn^{2+}>Pb^{2+}>Ca^{2+}>Ba^{2+}$, 其中 Hg^{2+} 和 Ag^+ 与对照差异极显著 ($P<0.01$) (表 3); Cu^{2+} , Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 对酶活性有促进作用, 其促进作用由强至弱依次为 $Mg^{2+}>Zn^{2+}>Cu^{2+}$, Mg^{2+} 与对照差异显著 ($P<0.05$)。

表3 在各种金属离子存在下仿刺参消化道蛋白酶活力

Tab.3 The protease activities in digestive tracts in the sea cucumber exposed to various metal ions

金属离子	比活力 (活力单位/mg 蛋白)	比值 (%)
H_2O	4.13±0.27	100
Mn^{2+}	2.95±0.16	71.4
Cu^{2+}	4.27±0.15	103.3
Ba^{2+}	3.83±0.21	92.6
Pb^{2+}	3.16±0.32	76.5
Ca^{2+}	3.69±0.11	89.3
Zn^{2+}	4.50±0.33	108.8
Mg^{2+}	5.15±0.31	125.1
Ag^+	1.63±0.21	39.5
Hg^{2+}	1.03±0.14	24.8

3 讨论

3.1 仿刺参消化道蛋白酶的最适温度

酶的蛋白质本性决定了酶对温度的高度敏感性。在适宜条件下 (pH、反应时间和温度等) 下, 酶活性最高的最适温度是酶的热稳定性和生物活性的统一。本实验表明: 仿刺参消化道中蛋白酶的最适温度是 40 °C, 与虾夷马粪海胆相近, 而低于其它水生无脊椎动物 (表 4)。这可能是海参对低温和夏眠等习性的一种生理适应。

水生无脊椎动物消化酶反应的最适温度远高于

其生理极限温度（表 4）；它们正常生理条件下的酶促反应是在低于酶的最适温度下进行。这可能是生物在长期进化过程中的一种适应，因为温度越高，对酶蛋白的破坏越大；而在较低温度，比较温和又能保证正常生理机能条件下进行酶促反应是对生物本身的一种保护。

仿刺参消化道蛋白酶的 Q_{10} 在 5~40 °C 内大于 1，40~70 °C 内小于 1（表 2）。这说明仿刺参有适应

低温的趋势。这与杨惠萍^[2, 3]对皱纹盘鲍的蛋白酶、淀粉酶、褐藻酸酶的研究结论相符，同仿刺参生活在北方低温水域的生活习性相符。

仿刺参消化道蛋白酶的最适温度为 40 °C，表明它的抗热性强。在仿刺参生长的适当高温期，配制饲料时，应适当增加饲料蛋白的比例，提高消化率和饲料的利用率。

表 4 不同水产无脊椎动物消化酶的最适温度

Tab.4 The optimum temperatures of digestive enzymes in different aquatic invertebrate species

种类名称	温度（°C）			文献
	蛋白酶	淀粉酶	褐藻酸酶	
虾夷马粪海胆（ <i>Strongylocentrotus intermedius</i> ）	40(胰)			[5]
	50(胃)	35	30	
日本囊对虾（ <i>Marsupenaeus japonicus</i> ）	44	40		[13]
中国明对虾（ <i>Fenneropenaeus chinensis</i> ）	47	37		[1]
皱纹盘鲍（ <i>Haliotis discus hannai</i> ）	50	30	35	[2, 3]
罗氏沼虾（ <i>Macrobrachium rosenbergii</i> ）		30		[4]
栉孔扇贝（ <i>Chlamys farreri</i> ）	60	25		[6]
仿刺参（ <i>Apostichopus japonicus</i> ）	40			本文

3.2 仿刺参消化道蛋白酶的最适 pH 值

多数研究表明，海洋无脊椎动物消化道的 pH 值在 5.7~7.9^[14]。本实验发现，仿刺参消化道蛋白酶

的最适 pH 值在此范围的近上限内，低于和窄于其它水生无脊椎动物（表 5），而与海水的 pH 值（7.8）趋于等渗，这是动物长期进化适应的结果。

表 5 不同水产无脊椎动物消化酶最适 pH

Tab.5 The optimum pH values of digestive enzymes in different aquatic invertebrate species

种类名称	pH			文献
	蛋白酶	淀粉酶	褐藻酸酶	
虾夷马粪海胆		6~6.5		[5]
太平洋牡蛎（ <i>Crassostrea gigas</i> ）	3.7; 9.0	5.5		[16]
中国明对虾	8~9	5~6		[1]
皱纹盘鲍	2.6; 5.0~5.6	6.24	7.19	[2, 3]
紫贻贝（ <i>Mytilus edulis</i> ）	6.5; 8 以上	5.8		[7]
日本囊对虾（ <i>Marsupenaeus japonicus</i> ）	8.0	6.8		[13]
日本滨螺（ <i>Littorina littouea</i> ）	7.0	5.0; 6.6	6.2	[7]
仿刺参	7.2			本文

多种因素影响酶促反应的最适 pH 值，如缓冲体系、金属离子和各种抑制剂等。本实验中，蛋白酶的

最适 pH 值随温度升高而上升(曲线后移)。这同一些学者的观点相一致^[8,13,17~20],表明在仿刺参生长的适当高温期,配制饲料时,不仅要增加饲料蛋白比例,还要保持弱碱性以提高消化率和饲料利用率。

蛋白酶族包括多种酶^[11],如胰蛋白酶、胃蛋白酶、糜蛋白酶等。迄今已在低等动物中发现了不同种类的蛋白酶^[2, 3, 5, 7, 16]。Gibson^[21]及于书坤^[1]认为,在低等无脊椎动物中不存在胃蛋白酶。但也有学者发现:无脊椎动物如中国明对虾^[22, 23]和虾夷马粪海胆^[5]中均存在胃蛋白酶。本实验所选用的底物是能同各种蛋白酶反应的通用底物酪蛋白。仿刺参消化道中是否存在多种蛋白酶还有待于用专一性底物进一步验证。

3.3 金属离子对蛋白酶的影响

近年,有关在某些水产养殖动物人工配合饲料中添加金属离子的报道较多。李荷芳等^[24]表明,在中国明对虾饲料中添加锰离子,虽对增长、增质量无明显影响,但却能激活肝胰脏中的羧肽酶 A;在皱纹盘鲍^[2, 3]人工饲料中添加 Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} 等也有促长作用。本实验中 Mg^{2+} , Zn^{2+} 离子对蛋白消化酶有促进作用,表明某些金属离子的积极作用可能是通过消化道酶来实现的。

对日本对虾^[13]、中国明对虾^[22, 23]、皱纹盘鲍^[2, 3]蛋白消化酶的测定结果表明,许多重金属离子为酶抑制剂。本实验中的 Hg^{2+} , Ag^{+} 对仿刺参消化道蛋白消化酶具极强的抑制作用。因此,在仿刺参的饲料中应适量添加有利的金属离子,消除有害重金属离子,以提高饲料的营养价值。

参考文献:

- [1] 于书坤.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[A].中国科学院海洋研究所.海洋科学集刊(28)[C].北京:科学出版社,1987.85-91.
- [2] 杨惠萍,童圣英,王子臣.皱纹盘鲍蛋白酶的研究[J].水产学报,1997,21(2):128-133.
- [3] 杨惠萍,童圣英,王子臣.皱纹盘鲍淀粉酶和褐藻酸酶的研究[J].水产学报,1998,22(4):345-351.
- [4] 魏华,赵维信.罗氏沼虾幼体及成虾消化酶活性[J].水产学报,1996,20(1):61-64.
- [5] 李立志.虾夷马粪海胆蛋白酶性质研究[J].辽宁师范大学学报,2002,25(3):301-304.
- [6] 张硕,赵燕.栉孔扇贝蛋白酶和淀粉酶活力的初步研究[J].大连水产学院学报,1997,12(1):15-20.
- [7] 刘万顺,李灏.海洋无脊椎动物消化酶的研究:紫贻贝、日本滨螺消化酶的初步分析和应用[J].山东海洋学院学报,1988,18(1):549-576.
- [8] Victor D V, Laurence T K. The appearance of α -amylase activity during get differentiation iation in sand Dollar Putei[J]. *Develop mental Biology*, 1971, 26: 293-299.
- [9] 中山大学生化教研室.生化技术导论[M].北京:人民教育出版社,1978.53-55.
- [10] 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:高等教育出版社,1987.144-147.
- [11] 余冰宾.生物化学实验指导[M].北京:清华大学出版社,2004.106-113.
- [12] 周慧,鲁治斌,齐杰,等.蛋白水解酶活力测定新方法[J].生物化学杂志,1994,10(5):630-633.
- [13] Maugle P D, Deshimaru O, Katayama T, *et al.*. Characteristics of amylase and protease of the shrimp *Penaeus japonicus* [J]. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1982, 48(12): 1 753-1 757.
- [14] Fred P. The pH of body fluids from marine intertidal invertebrates[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1977, 30: 327-331.
- [15] 常亚青,丁君,宋坚,等.海参、海胆生物学研究与养殖[M].北京:海洋出版社,2004.51-53.
- [16] 刘世英.水产饵料生物学[M].北京:农业出版社,1989.319-321.
- [17] 吴永沛,郭彩华.真鲷肝脏蛋白酶的性质[J].厦门水产学院学报,1992,14(2):13-17.
- [18] 桂远明,吴垠.温度对草鱼、鲤、鲢、鳙主要消化酶活性的影响[J].大连水产学院学报,1993,8(4):1-8.
- [19] 黄峰,严安生,汪小东.鲢、鳙胰蛋白酶的研究[J].水产学报,1996,20(1):68-71.
- [20] 黄耀桐,刘永坚.草鱼肠道肝胰脏蛋白酶活性初步研究[J].水生生物学报,1988,12(4):328-333.
- [21] Gibson R, Barker P L. The decapod hepatopancreas[A]. Gibson R, Barker P L. *Oceanography and marine biology annal review* (17) [C]. Sydney: Aberdeen Univ Press, 1953. 379-390.
- [22] 刘玉梅,朱谨钊.对虾消化酶的研究[J].海洋科学,1984,5:46-50.
- [23] 刘玉梅,朱谨钊,吴厚余.中国对虾幼体和仔虾消化酶活力及氨基酸组成的研究[J].海洋与湖沼,1991,22(6):571-575.
- [24] 李荷芳,郝斌.饵料中添加锰对中国对虾的影响[J].海洋科学,1993,4:48-51.

(下转第 85 页)

Effects of temperature, pH value and metal ions on protease activities in the digestive tract from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

WANG Ji-qiao¹, TANG Li^{1,3}, XU Chong¹, CHENG Jun-chi¹, WANG Nian-bin²

(1. School of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China; 2. Liaoning Marine Fisheries Research Institute, Liaoning Open Laboratory of Applied Marine Biology, Dalian 116023, China; 3. School of animal science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Received: Apr., 26, 2005

Key words: sea cucumber (*Apostichopus japonicus*); protease; temperature; pH value; metal ions

Abstract: Effects of temperature, pH and metal ions on protease activities in the digestive tract were studied in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) with body length of 24.2 cm $\pm$ 0.7 cm by means of spectrophotometer. The results showed that the optimum temperature and pH value are 40 $^{\circ}$ C and 7.20, respectively. The metal ions including Hg²⁺, Mn²⁺, Ag⁺, Pb²⁺, Ba²⁺, and Ca²⁺ were found to inhibit the protease activities while the Cu²⁺, Zn²⁺, and Mg²⁺ promote the activities.

(本文编辑: 刘珊珊)