

# 台湾海峡南部上升流区亮氨酸氨肽酶活性的初步研究

谷体华, 王 丹, 林丽贞, 黄邦钦

(厦门大学 近海海洋环境科学国家重点实验室, 环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 2006 年夏季, 在台湾海峡南部上升流区调查了亮氨酸氨肽酶活性(LAPA)的分布, 跟踪分析了上升流过程中该酶活性的变动规律, 探讨了环境因子对该海区 LAPA 的影响及水华过程中亮氨酸氨肽酶的应对机制。结果表明, 台湾海峡南部近岸区的 LAPA 明显高于浅滩区和陆架边缘区, 推测溶解有机氮(DON)是影响 LAPA 的主要因素。上升流过程中, LAPA 呈现递增趋势(尤其是表层), 在垂直方向上的分布总体表现为表层 > 10 m > 15 m 以深, 随着水华的发展, LAPA 逐渐升高, 浮游植物水华后期产生的大量 DON, 可诱导亮氨酸氨肽酶表达至最大值。

**关键词:** 亮氨酸氨肽酶; 台湾海峡; 上升流; 水华

中图分类号: Q178.53

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)12-0042-05

胞外酶是指那些在胞内合成、穿过细胞质膜后发挥水解作用的酶。它们有的镶嵌在细胞膜上, 有的存在于周质空间内, 有的则以游离态释放到外部环境中, 常见的胞外酶包括  $\beta$ -葡萄糖苷酶、碱性磷酸酶、亮氨酸氨肽酶等。水生生态系统中的有机物大都以高分子聚合物的形式存在, 这些高聚物只有通过胞外酶的作用, 才能水解成可穿过细胞质膜被吸收利用的小分子物质<sup>[1]</sup>。另一方面, 有机物的组分变化可通过“抑制-诱导”机制, 调控胞外酶在微生物体内的合成<sup>[2]</sup>, 可见, 胞外酶活性不仅能够反映水环境中有机物的数量和质量, 还能反映微生物对有机组分的改造程度及对其生长繁殖的营养贡献。因此对胞外酶活性的研究可为研究海洋环境中生源要素的生物地球化学循环过程及微生物对环境变化的适应机制提供科学依据, 是深入了解海洋生态系统所不可或缺的。目前国内在这方面所做的工作多集中于各海区  $\beta$ -葡萄糖苷酶和碱性磷酸酶活性的研究<sup>[3,4]</sup>, 但尚未见到亮氨酸氨肽酶的相关报道。亮氨酸氨肽酶能从 N 端依次水解 L 型氨基酸组成的肽和酰胺, 释放出游离的氨基酸, 从而为异养细菌的生长提供所需的氮源物质, 在海洋环境中氮元素的生物地球化学过程中起着非常重要的作用。

台湾海峡是东海和南海海水交换的重要通道, 海底地形变化多端, 多种性质和来源的水系交汇于此, 并明显受季风作用。海峡内的水文环境主要受 3 个流系所控制, 分别是沿岸流(浙闽沿岸水或是粤东沿岸水)、南海暖流水、黑潮入侵水<sup>[5]</sup>。夏季西南季风驱动暖水自南海北上, 在夏季风及地形的作用下, 形

成沿岸上升流和浅滩上升流<sup>[5,6]</sup>。由西南季风诱导的上升流可带来丰富的营养盐, 影响浮游植物数量及其群落结构, 提高初级生产力, 从而导致近岸发生季节性的水华<sup>[7]</sup>, 上述过程也将影响有机物组分, 进而影响细菌的二次生产。作者首次在台湾海峡上升流区进行了亮氨酸氨肽酶活性(LAPA)的研究, 并跟踪了 LAPA 在上升流藻类水华演替过程中的变化, 对该海区亮氨酸氨肽酶的分布特征及对水华发生的响应进行了初步探讨。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究海区

2006 年 6 月 20 日至 7 月 1 日, 对台湾海峡南部上升流区进行了为期 12 天的现场调查, 从中选取了几个不同区域代表性的测站进行了 LAPA 的测定, 分别为近岸海区(A1、B1、B3 测站)、浅滩区(A5、A7、B5 测站)、陆架外缘区(B9、C9 测站), 同时在上升流中心区测站 B1 的真光层内(30 m 以浅)进行水华跟踪分析, 跟踪时间为 6 月 26 日至 7 月 1 日, 具体测站布设见图 1。

收稿日期: 2008-07-20; 修回日期: 2008-10-10

基金项目: 国家 973 计划项目(2006CB400604); 国家自然科学基金项目(40576055, 40776081)

作者简介: 谷体华(1980), 女, 山东莱芜人, 博士研究生, 研究方向为海洋生态学; 黄邦钦, 通讯作者, 电话: 0592-2187783, E-mail: bqhuang@xmu.edu.cn

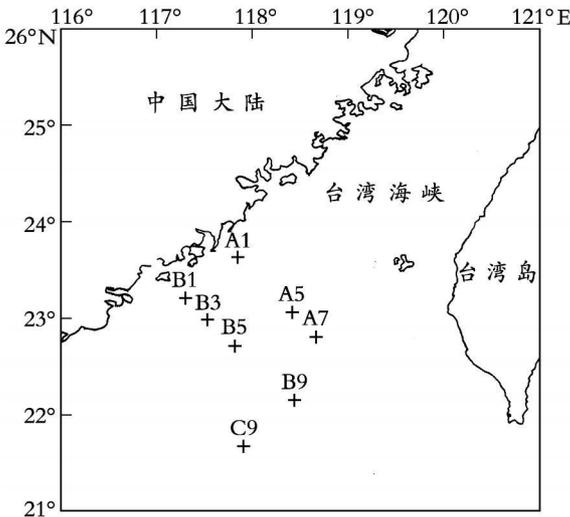


图 1 2006 年夏季台湾海峡南部上升流区采样站位

Fig. 1 Sampling stations in the southern Taiwan Straits in summer

### 1.2 物理及化学参数分析

采用 Sea Bird 19 CTD 现场监测海水的温度和盐度, 该数据由厦门大学胡建宇和陈照章老师提供。营养盐的测定均依据国家《海洋调查规范》或者国际通用方法进行, 该数据由福建海洋研究所的张钊研究员提供。Chl  $\alpha$  的检测采用荧光法<sup>[8]</sup>进行, 该数据由本实验室的胡俊博士提供。

### 1.3 亮氨酸氨肽酶活性的测定

通过外加荧光模拟底物法, 测定亮氨酸氨肽酶对底物的水解速率, 即为亮氨酸氨肽酶的活性<sup>[9]</sup>。亮氨酸氨肽酶可将加入到海水样品的 L-leucine-4-methyl-7-coumarylamide hydrochloride (Leu-MCA, Fluka 61888) 中的氨肽键断裂, 释放亮氨酸和荧光显色团 MCA, 底物的降解速率等于 MCA 的释放速率。现场测定酶活时, 多采用过量添加底物法, 测定水解速率, 并以此表示  $V_{max}$ , 具体方法如下: 现场采样后立即移取 3 mL 水样到 5 个 5 mL 的离心管中(2 个空白样和 3 个平行样), 立即往平行样中加入 Leu-MCA 底物工作液, 使其终浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ , 在各水层现场温度下避光培养(近岸水域培养时间 1~3 h, 开放水域适当延长, 多于 3 h, 记录时间), 培养结束后在空白样中加入等量的 Leu-MCA 底物工作液, 并用 60  $\mu\text{L}$  8 mmol/L 的 HgCl<sub>2</sub> 溶液终止反应。待加入 200  $\mu\text{L}$  的 CAPS 缓冲液(pH 为 10.3)后, 用 RF-5301PC 荧光分光光度计在激发波长 385 nm、发射波长 440 nm 的条件下迅速测定样品的荧光强度。同时, 用现场的灭菌海水配置 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1  $\mu\text{mol/L}$  的标准物 MCA 溶液, 绘制标准工作

曲线。亮氨酸氨肽酶活性由  $V = (F - F_b) / (T \times S)$  计算, 其中,  $V$  为亮氨酸氨肽酶水解底物的速率 ( $\mu\text{mol} / (\text{L} \cdot \text{h})$ );  $F$  为平行样品的荧光强度(平均值);  $F_b$  为空白样品的荧光强度(平均值);  $S$  为单位浓度标准荧光物质的荧光强度 ( $\mu\text{mol/L}$ ), 即标准工作曲线的斜率;  $T$  为培养时间(h)。

## 2 结果与分析

### 2.1 台湾海峡南部上升流区亮氨酸氨肽酶活性的分布特征

台湾海峡南部调查测站的表层 LAPA 为 13.90~41.17  $\text{nmol} / (\text{L} \cdot \text{h})$ , 平均值为  $(21.40 \pm 8.87) \text{nmol} / (\text{L} \cdot \text{h})$  (表 1)。酶活性在近岸区的表达量高于浅滩区和陆架边缘区。

LAPA 受到无机氮(DIN)、溶解有机氮(DON)、微型生物对 N 的需求、Chl  $\alpha$ 、细菌生物量、温度等多因素的共同影响<sup>[10]</sup>。众多可能影响因素中研究最多的当属氮循环的关键形态 DIN, 在哈德逊河<sup>[11]</sup>、南极水域<sup>[12]</sup>和波美拉尼亚湾、波罗地海<sup>[13]</sup>的调查中发现 LAPA 与 DIN 成一定负相关性, 而 Clayton<sup>[14]</sup>在佛罗里达湾及 Nausch & Nausch<sup>[15]</sup>在波罗地海的研究发现两者并不存在相关性, 本研究的 LAPA 与 DIN 的相关性系数仅为 0.17 ( $n = 8, P > 0.05$ ), 两者间并不存在显著的相关性, 此外, LAPA 及其他理化因子的相关性均不显著(均低于 0.24, 且  $P > 0.05$ )。Chróst<sup>[16]</sup>指出亮氨酸氨肽酶降解蛋白质的目的可能并不仅仅是为了提供氮源, 也可以提供碳源, 这也是在其研究中葡萄糖也能够抑制肽酶的原因。可见, 目前对 LAPA 的影响机制存在较大分歧, 仍有待于深入研究。

表 1 2006 年夏季台湾海峡南部上升流区表层环境因子及亮氨酸氨肽酶活性(LAPA)的分布

Tab. 1 The environmental parameters and leucine aminopeptidase activity (LAPA) in the upwelling region of the southern Taiwan Straits in summer 2006

| 测站 | 温度<br>( $^{\circ}\text{C}$ ) | 盐度    | Chl $\alpha$ 质量浓度<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | DIN 浓度<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | LAPA<br>( $\text{nmol} / (\text{L} \cdot \text{h})$ ) |
|----|------------------------------|-------|--|---------------------------------|---|
| A1 | 24.93                        | 32.88 | 1.36                                     | 1.95                            | 41.17   |
| A5 | 26.40                        | 32.92 | 0.48                                     | 1.49                            | 13.90   |
| A7 | 24.74                        | 33.90 | 2.74                                     | 0.39                            | 20.68   |
| B1 | 27.91                        | 31.96 | 0.69                                     | 0.99                            | 25.65   |
| B3 | 28.24                        | 30.80 | 2.90                                     | 1.73                            | 15.65   |
| B5 | 29.94                        | 32.18 | 0.58                                     | 0.50                            | 19.65   |
| B9 | 28.63                        | 33.64 | 0.11                                     | 0.44                            | 14.55   |
| C9 | 28.32                        | 33.50 | 0.15                                     | 0.30                            | 19.97   |

郑天凌等<sup>[2]</sup>在研究台湾海峡β-葡萄糖苷酶(同为细菌分泌的胞外酶)活性时也得出相似的分布规律。由于近岸陆源输入的有机物所占比例较大, DON 含量相对较高, 而离岸的 DON 主要来源于初级生产, 含量较低<sup>[17,18]</sup>。近岸初级生产力较高, 提高了细菌的二次生产, 而大组分的有机物不能为细菌直接吸收利用, 只能通过亮氨酸氨肽酶的分解作用使之转化为小分子有机物, 方可成为细菌生长繁殖的有效营养。作者认为按照胞外酶合成的“抑制诱导”理论, 近岸高含量的 DON 可诱导细菌产生胞外酶, 从而表现出较高的活性, 因此初步推测 DON 含量是影响台湾海峡 LAPA 分布的主要因素。

## 2.2 台湾海峡上升流过程中亮氨酸氨肽酶活性的变化规律

2006年6月26日在B1测站观测到上升流现

象, 但该现象较弱, 对 B1 站的影响只能到达 10~15 m(图 2), 下层由低温高盐水团控制, 其温度为  $22.90^{\circ}\text{C} \pm 0.62^{\circ}\text{C}$ , 盐度为  $34.21 \pm 0.07$ , 上层表现为高温低盐特性, 受陆地径流的影响显著。29日是上升流演替过程的转折点, 当天下层水温度降到最低(约  $22^{\circ}\text{C}$ ), 之后上层高温低盐水的厚度逐渐由 10 m 左右增至 15 m, 下层水为其营养盐补充也逐渐减弱。此外, 受上升流的影响, 浮游植物开始大量繁殖, 跟踪过程中, Chl α 波动范围在整个剖面上都呈现递增的趋势, 其中 10 m 以浅最为明显。由于生物体对外界响应的滞后效应, 直到 30日整个水柱的生物量才增长到最大值(Chl α 质量浓度高达  $5.67 \mu\text{g/L}$ ), 7月1日, Chl α 值开始降低, 特别是表层, 每升海水中 Chl α 降低了  $2.28 \mu\text{g}$ , 上升流引起的水华由此进入衰减阶段。

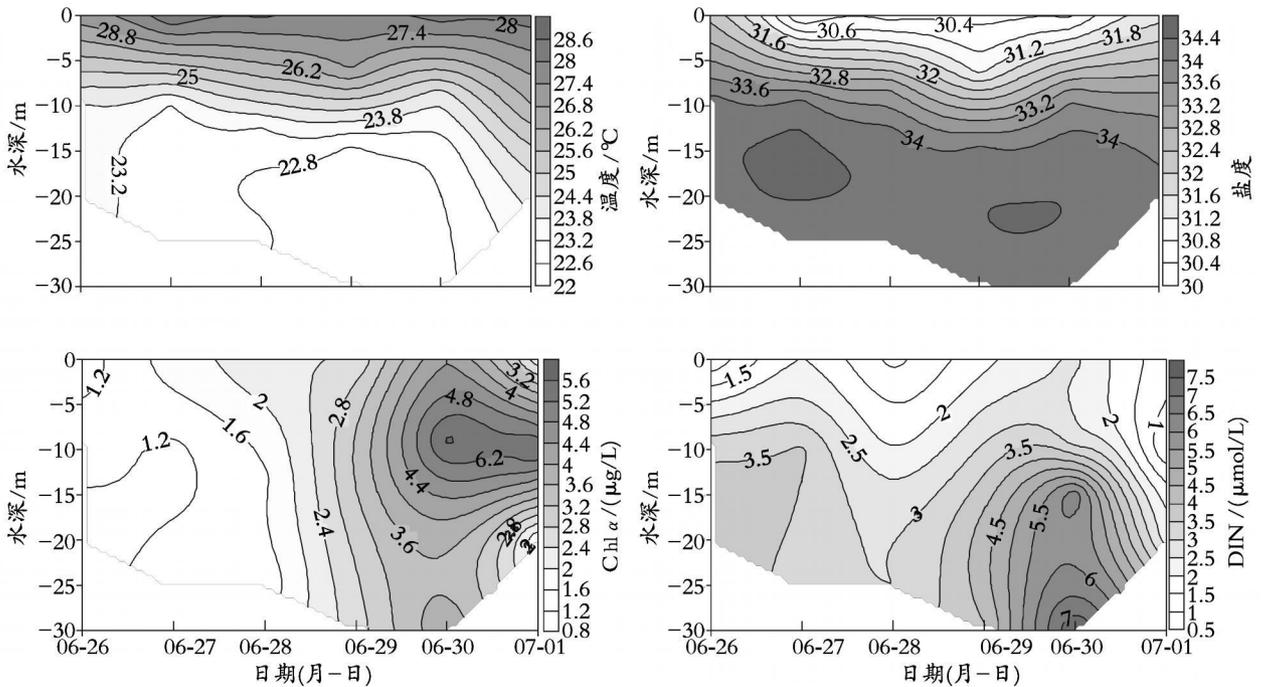


图 2 2006年夏季台湾海峡南部 B1 站上升流过程中各环境参数的变动

Fig. 2 Variations of environmental parameters of Stn B1 during the upwelling of the southern Taiwan Straits in summer 2006

B1 测站的 LAPA 在垂直方向上的分布总体表现为表层  $> 10 \text{ m} > 15 \text{ m}$  以深(图 3), 表层的 LAPA 明显高于该测站未受上升流影响时的活性(表 1), LAPA 与各理化因子的相关性均不显著(均低于 0.19, 且  $P > 0.05$ )。在跟踪观测过程中, LAPA 和 Chl α 的变化趋势基本一致, 在整个剖面上都呈现递增的趋势, 表层尤为明显, 不同的是, 7月1日 LAPA 仍然维持很高的值( $73.46 \text{ nmol}/(\text{L} \cdot \text{h})$ )。

因台湾海峡上升流过程中水华的衰减阶段本研究未继续跟踪, 未捕捉到 LAPA 进一步的变化趋势,

但作者在 2007 年 4 月对黄海春季水华的调查中发现(未发表), 水华衰减初期, LAPA 仍逐渐增高, 衰减末期逐渐降低至正常值, 本研究中, 7月1日水华进入衰减阶段时 LAPA 仍处于增长趋势, 也恰恰验证了相似的变化规律。亮氨酸氨肽酶在水华发展过程中的表达明显增强, 而较高的 DIN 并未抑制该酶的活性, 推断该过程中 LAPA 升高的现象应该主要跟水华引起的细菌二次生产有密切关系。而在水华衰减阶段, 无机营养盐的消耗殆尽, 浮游植物的死亡产生了大量高分子的 DON, 按照胞外酶合成的底物

“诱导”理论,亮氨酸氨肽酶大量合成,活性显著升高,到水华消退后期才逐渐恢复。这一变化是细菌对水体中有机物组分变化的一种积极的响应,反映了细菌在环境变动条件下对有机物利用的最佳对策<sup>[19,20]</sup>。

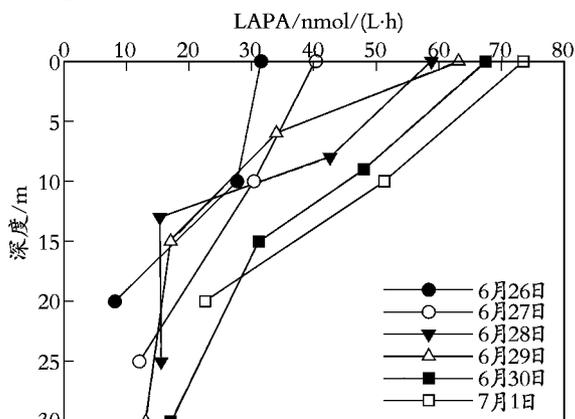


图3 2006年夏季台湾海峡南部B1测站上上升流过程中亮氨酸氨肽酶(LAPA)的变化

Fig. 3 Variations of leucine aminopeptidase activity (LAPA) at Stn B1 during the upwelling of the southern Taiwan Straits in summer 2006

### 3 结论

台湾海峡南部近岸区的LAPA明显高于浅滩区和陆架边缘区,推测近岸高含量的DON是诱导亮氨酸氨肽酶合成的主要原因。台湾海峡南部近岸上升流为上层海水提供了较为丰富的营养盐,进而诱发浮游植物水华发生。LAPA随着水华的发展呈现递增趋势(尤其是表层),在垂直方向上的分布总体表现为表层>10m>15m以深。水华发生阶段,LAPA升高的现象可能跟水华引起的细菌二次生产有密切关系,在其衰减初期,浮游植物的死亡产生的大量DON诱导细菌产生亮氨酸氨肽酶,使其活性表达显著增强。

#### 参考文献:

[1] 欧林坚, 黄邦钦, 洪华生, 等. 海水中胞外酶及其与赤潮发生关系研究进展 [J]. 应用生态学报, 2003, 14 (7): 1197-1199.

[2] Chróst R J. Photosynthetic production and exoenzymatic degradation of organic matter in euphotic zone of an eutrophic lake [J]. *Journal of Plankton Research*, 1989, 11: 233-242.

[3] 郑天凌, 王斐, 徐美珠, 等. 台湾海峡水域的β-葡萄糖苷酶活性 [J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(2): 175-182.

[4] 林丽贞. 台湾海峡南部上升流区浮游植物的磷胁迫与

限制 [D]. 厦门: 厦门大学, 2007.

[5] 洪华生. 闽南台湾浅滩渔场上升流区生态系研究概述 [A]. 洪华生, 丘书院, 阮五崎, 等. 闽南台湾浅滩渔场上升流区生态系研究 [C]. 北京: 科学出版社, 1991. F18.

[6] Shang S S, Zhang C Y, Hong H S, *et al.* Hydrographic and biological changes in the Taiwan Strait during the 1997-1998 El Niño winter [J]. *Geophysical Research Letters*, 2005, 32: L11601.

[7] Pennington J T, Chavez F P. Seasonal fluctuations of temperature, salinity, nitrate, chlorophyll and primary production at station H3/M1 over 1989-1996 in Monterey Bay, California [J]. *Deep Sea Research II*, 2000, 47: 947-973.

[8] Parsons T R, Maita Y, Lalli C M. A manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis [M]. New York: Pergamon Press, 1984. 7-9.

[9] Hoppe H G. Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria [A]. Kempt P F, Sherr B F, Sherr E B, *et al.* Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology [C]. Boca Raton: Lewis Publishers, 1983. 423-431.

[10] Debroas D. Decomposition of protein compounds in an eutrophic lake: spatial and temporal distribution of exopeptidase and endopeptidase activities in various size fractions [J]. *Hydrobiologia*, 1999, 382: 161-173.

[11] Taylor G T, Way J, Yu Y, *et al.* Ecto-hydrolase activity in surface waters of the Hudson River and western Long Island Sound estuaries [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 263: F15.

[12] Sala M M, Arin L, Balagué V, *et al.* Functional diversity of bacterioplankton assemblages in western Antarctic seawaters during late spring [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2005, 292: 13-21.

[13] Nausch M, Nausch G. Stimulation of peptidase activity in nutrient gradients in the Baltic Sea [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32: 1973-1983.

[14] Clayton J W, Frank J J. Ecto-enzyme kinetics in Florida Bay: Implications for bacterial carbon source and nutrient status [J]. *Hydrobiologia*, 2006, 569: 113-127.

[15] Nausch M. Experimental evidence for interactions between bacterial peptidase and alkaline phosphatase activity in the Baltic Sea [J]. *Aquatic ecology*, 2000, 34: 331-343.

[16] Chróst R J. Microbial enzymes in aquatic environments [A]. Overbeck J, Chróst R J. Aquatic Microbial Ecology, Biochemical and Molecular Approaches [C]. New York: Springer verlag, 1990. 47-79.

[17] 沈志良, 刘群, 张淑美. 长江总氮和有机氮的分布变化与迁移 [J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(6): 577-585.

- [ 18] 韦蔓新, 童万平, 何本茂, 等. 北部湾各种形态氮的分布及其影响因素 [ J]. 热带海洋, 2000, 19( 3): 59-66.
- [ 19] Chróst R J. Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial enzymes [ A]. Chróst R J. Microbial Enzymes in Aquatic Environments [ C]. New York: Springer verlag, 1991. 29-84.
- [ 20] Karner M, Rassoulzadegan F. Extracellular enzyme activity: Indications for high short term variability in a coastal marine ecosystem [ J]. **Microbial ecology**, 1995, 30: 143-156.

## Preliminary study on Leucine aminopeptidase activity in the upwelling region of the Southern Taiwan Straits

GU Ti-hua, WANG Dan, LIN Li-zhen, HUANG Bang-qin

(State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Received:** Jul. , 20, 2008

**Key words:** Leucine aminopeptidase; Taiwan Strait; upwelling; algal bloom

**Abstract:** In the southern Taiwan Straits in summer 2006, distribution of leucine aminopeptidase activity (LAPA) and its variations during the upwelling were investigated to analyze the main factors influencing LAPA distribution and response of leucine aminopeptidase to algal bloom. The results showed that LAPA was higher at coastal waters than that in the Taiwan Bank and offshore waters. Dissolved organic nitrogen (DON) might be the main factor influencing LAPA. LAPA increased during the upwelling, and decreased vertically from the surface, 10 m and below 15 m in depth. LAPA was getting higher during the development of algal bloom. Abundant DON due to the death of phytoplankton in late algal bloom might induce the synthesis of leucine aminopeptidase.

( 本文编辑: 张培新)