

金属离子和 pH 值对九孔鲍几种消化酶活力的影响^{*}

吴永沛 蔡慧农

(集美大学生物工程学院 厦门 361021)

提要 研究了金属离子对九孔鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*) 褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶活力的影响。结果表明,3 种酶的最适 pH 不同。分别为褐藻酸酶 8.8、琼脂酶 4.2、纤维素酶 4.5~5.0。MgSO₄ 为褐藻酸酶的激活剂、BaCl₂ 为琼脂酶的激活剂、MnCl₂ 是纤维素酶的激活剂。

关键词 九孔鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*), 褐藻酸酶, 琼脂酶, 纤维素酶

中图分类号 Q47 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)05-0066-03

随着九孔鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*) 人工配合饲料的推广应用^[1~3], 理论和实践要求对其消化酶的酶学性质进行更加深入的研究。人工配合饲料常添加微量矿物质(金属盐)强化饲料效果, 而矿物质的消化吸收与饲养动物的消化道 pH 值关系密切。因此, 研究金属离子及 pH 值对九孔鲍褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶活力的影响, 在理论和实践上都极为重要。

1 材料和方法

1.1 材料来源与规格

九孔鲍采自福建省同安县大嶝养鲍场, 稚鲍壳长 (S.L) 约 19 mm, 养殖周期 4 个月; 中鲍壳长 (S.L) 约 37 mm, 养殖周期 7 个月; 成鲍壳长 (S.L) 约 49 mm, 养殖周期 10 个月。

1.2 样品处理

采集健康、大小较一致的鲍, 用刀取出鲍的整个消化器官, 包括消化盲囊及其所包被的嗦囊和胃、肝、生殖腺。用滤纸吸干组织液, 称重, 置于冰箱冻结贮存。

1.3 粗酶液的提取

称取 10g 冷藏的内脏, 在冰液中研磨, 然后加入 0.5% KCl 溶液 100 mL, 室温下抽提 30 min 后, 4 500 r/min 离心 30 min, 收集上清液。

1.4 酶液的提纯

1.4.1 盐析纯化 取粗酶液 20 mL, A 组加入固体硫酸铵至 60% 饱和度, B 组加入固体硫酸铵至 70% 饱和度。玻璃搅拌均匀溶解, 静置 30 min 后离心 4 500 r/min 15 min, 弃去上层清液, 沉淀物转移到半透膜进行透析, 透析在 4℃ 冰箱进行, 每 2~4 h 换水 1

次, 透析 24 h 完毕, 定容至 50 mL 分别制得盐析酶 A 组及 B 组。

1.4.2 葡聚糖凝胶 Sephadex G-100 纯化 在填充葡聚糖凝胶 Sephadex G-100, 并用 0.5% KCl 溶液平衡的层析柱中, 加入经过盐析纯化的酶液 2 mL, 0.5% KCl 作为洗脱液, 核酸蛋白检测仪波长调至 280 nm, 电流 1A, 启动分部收集器, 8 mL/管, 恒流泵流速为 20 mL/h。

盐析酶 A 组经葡聚糖凝胶 Sephadex G-100 层析纯化, 收集洗脱液第 8 试管 (8 mL/试管), 用于测定褐藻酸酶酶学性质。收集洗脱液第 10 管 (8 mL/管), 用于测定纤维素酶酶学性质。盐析酶 B 组经葡聚糖凝胶 Sephadex G-100 层析纯化, 收集洗脱液第 6 管 (8 mL/管), 用于测定琼脂酶酶学性质。

1.5 标准酶活力测定方法

褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶活力的测定方法见文献[4]。

2 结果

2.1 金属离子及浓度对酶活力的影响

实验结果见表 1。从表 1 可以看出, 金属离子对褐藻酸酶具有较强的抑制作用。在所实验的 9 种金属

^{*} 福建省自然科学基金资助项目 B0010031 号。

第一作者: 吴永沛, 出生于 1956 年, 学士, 教授, 从事生物工程领域的研究。E-mail: wuyongpei@china.com 电话: 0592-6183381

收稿日期: 2002-03-11; 修回日期: 2002-11-28

表 1 金属离子对九孔鲍褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶活力的影响

Tab.1 The effects of metal ion concentration on the enzymes algalase, agarase and cellulase of the abalone *H. diversicolor subperexta*

金属离子	褐藻酸酶活力(相对活力%) *		琼脂酶活力(相对活力%) *		纤维素酶活力(相对活力%) *	
	离子浓度(mol/L)		离子浓度(mol/L)		离子浓度(mol/L)	
	0.002	0.02	0.002	0.02	0.002	0.02
对照	100	100	100	100	100	100
CaCl ₂	90	70	100	76	96	106
MgSO ₄	103	90	68	50	98	105
ZnSO ₂	1.9	1.7	63	44	92	102
Fe(NO ₃) ₃	55	1.8	83	57	95	91
BaCl ₂	91	35	161	172	101	117
MnCl ₂	94	31	78	66	112	139
CuSO ₄	1.5	0	83	78	92	91
AgNO ₃	6.1	1.2	66	22	93	96
Pb(NO ₃) ₂	28	0	85	68	100	85

* 以对照组的酶活力为 100% 比较得出

离子中,只有 0.002 mol/L 的 Mg²⁺ 具有微弱的激活作用,其余均抑制了褐藻酸酶的活力。并且,随着金属离子浓度的提高,褐藻酸酶活力更进一步降低,其中以 Zn²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、Ag⁺ 及 Pb²⁺ 的抑制作用最为显著。浓度为 0.02 mol/L 的 Cu²⁺ 及 Pb²⁺ 使褐藻酸酶活力完全丧失,相对酶活力为 0。

金属离子对琼脂酶活力的影响情况为,在实验的 9 种金属离子中,发现 Ba²⁺ 是该酶的激活剂,激活作用较强,相对酶活力为 161(0.002 mol/L) ~ 172(0.02 mol/L),其余 8 种 Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Ag⁺、Pb²⁺ 均为抑制剂。金属离子对琼脂酶活力的抑制作用不及褐藻酸酶显著,最低酶活力仍然有 22% (Ag⁺, 0.02 mol/L) 的相对酶活力。

金属离子及浓度对纤维素酶活力的影响情况较为复杂。Cu²⁺ (0.02 mol/L)、Mg²⁺ (0.02 mol/L)、Zn²⁺ (0.02 mol/L)、Ba²⁺ (0.002 mol/L、0.02 mol/L)、Mn²⁺ (0.002 mol/L、0.02 mol/L) 均为该酶的激活剂,其中以 Mn²⁺ (0.02 mol/L) 的激活作用最大,达到 139%, Ba²⁺ (0.02 mol/L) 次之,为 117%。离子浓度对纤维素酶活力的影响不大,0.002 mol/L 浓度与 0.02 mol/L 浓度条件下纤维素酶活力基本相同。

2.2 pH 值对酶活力的影响

pH 值对褐藻酸酶活力的影响见图 1。从图 1 可以看出,褐藻酸酶的最适 pH 值为 8.8,高于此 pH 值或低于此 pH 值,酶活力均下降。在 pH 5 ~ 9 之间,酶活力最高值(pH 8.8)是最低值(pH 4.8)的 7 倍。在该酶最适 pH 值的两侧,pH 值无论增大或降低,均引起

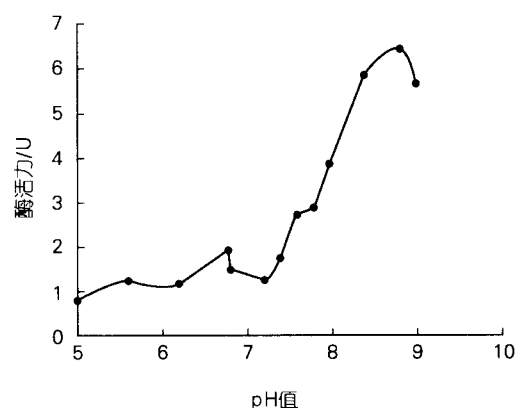


图 1 褐藻酸酶最适 pH 值曲线

Fig. 1 The optimum pH curve of Algalase

褐藻酸酶活力的急剧下降。换言之,pH 值对酶活力的影响十分明显。这是褐藻酸酶与琼脂酶及纤维素酶的显著不同之一。

pH 值对琼脂酶活力的影响情况见图 2。在 pH 值 3.6 ~ 7.8 范围,酶的最适 pH 值为 4.2,高于或低于此 pH,酶活力均下降。pH 值低于 4.2 时,酶活力急剧下降,而 pH 值高于 4.2 时酶活力呈缓慢下降。

pH 值对纤维素酶活力的影响情况见图 3。在 pH 值 4.2 ~ 7.8 范围,最适 pH 为 4.5 ~ 5.0, pH 值高于或低于此值,酶活力均下降。与琼脂酶相似,在 pH 值 < 4.5 一侧,降低 pH 对纤维素酶活力的影响十分明显,在 pH > 5.0 一侧,提高 pH 值对纤维素酶活力的影响

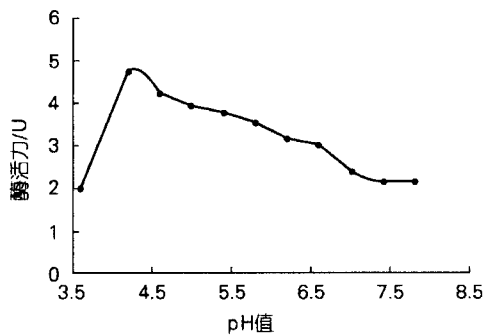


图2 琼脂酶最适 pH 值曲线

Fig.2 The optimum pH curve of Agarase

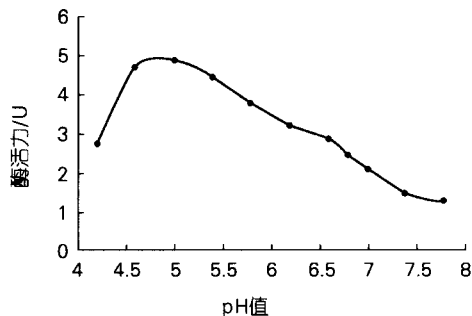


图3 纤维素酶最适 pH 值曲线

Fig.3 The optimum pH curve of Cellulase

表2 九孔鲍几种消化酶性质比较

Tab.2 Comparisons of the enzyme properties

酶	激活剂(相对酶活力%)	抑制剂(相对酶活力%)	最适 pH 值
褐藻酸酶	Mg ²⁺ (103)	Cu ²⁺ (0), Pb ²⁺ (0), Ag ⁺ (1.2), Zn ²⁺ (1.7), Fe ³⁺ (1.8)	8.8
琼脂酶	Ba ²⁺ (161~172)	Ag ⁺ (22), Zn ²⁺ (44)	4.2
纤维素酶	Ba ²⁺ (101~117), Mn ²⁺ (112~139)	Pb ²⁺ (85)	4.5~5.0

孔鲍对褐藻酸的消化能力比不上对琼脂的消化能力。在养殖实验上,喂食江蓠的九孔鲍生长速度大于喂食海带。这一现象常常被认为是由于江蓠更富含营养物质的缘故。现在看来与九孔鲍的消化酶性质有关。

九孔鲍人工配合饲料的黏合剂常常采用褐藻酸钠,理由是褐藻酸钠比琼脂更便宜。采用褐藻酸钠作为饲料黏合剂时,金属矿物质元素的添加要更谨慎,许多有益元素如 Zn²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺ 都是褐藻酸酶的抑制剂。

不十分明显,在 pH5.0~6.5 之间, pH 值的升高仅引起酶活力缓慢的下降,并且保持约 58% 的相对酶活力。

2.3 九孔鲍几种消化酶特性的比较

九孔鲍褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶的抑制剂、激活剂、及最适 pH 值等酶学性质,总结见表 2。

3 讨论

九孔鲍的最适天然饲料为江蓠^[5],江蓠是一种生长于热带、亚热带的红藻,琼脂是该藻所含的主要多糖,也是九孔鲍主要能量来源。因此,若以红藻粉末作为人工饲料添加剂,可以添加 BaCl₂ 作为酶的激活剂,以促进多糖物质的消化吸收。若九孔鲍以海带等褐藻为主食,褐藻酸是其主要多糖。在人工配合饲料中,往往添加 10%~30% 的褐藻酸钠,一方面作为饲料黏合剂,另一方面也起到诱食剂的效果^[1]。在此种情况下,添加金属矿物质盐,大都会引起鲍褐藻酸酶活力的下降,这种酶活力的下降可能是由于金属离子使褐藻酸变得酸度更高,造成更难于消化吸收。

鲍消化道有食物时,其 pH 值约为 6.5。本研究结果表明,在 pH6.5 情况下,褐藻酸酶的活力仅为其最适 pH 值(pH8.8)时活力的 20%。而琼脂酶的活力为其最适 pH(pH4.2)的 63%,纤维素酶为其最适 pH(pH4.5~5.0)的 58%。因此,从酶学性质上来说,九

参考文献

- 1 吴永沛,陈昌生,蔡慧农,等. 人工配合饲料养殖九孔鲍稚鲍的效果. 台湾海峡,1998,17(s):125-128
- 2 吴永沛. 鲍人工配合饲料稳定性的研究. 海洋科学,2000,24(4):47-49
- 3 吴永沛,陈昌生,蔡慧农,等. 人工饲料及海藻养成九孔鲍营养成分的比较. 海洋科学,2000,24(9):4-6
- 4 吴永沛,何碧烟. 九孔鲍褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶的提取纯化. 海洋科学,2002,26(3):4-7
- 5 钟幼平,陈昌生,吴永沛,等. 国内南方鲍鱼工厂化育苗和养殖技术. 集美大学学报,1999,4(1):51-58

EFFECTS OF METAL IONS AND pH VALUE ON THE ACTIVITIES OF DIGESTIVE ENZYMES FROM *Haliotis diversicolor supertexta*

WU Yong-Pei CAI Hui-Nong

(Biotechnological School, Jimei University, Xiamen, 361021)

Received: Mar., 11, 2002

Key Words: *Haliotis diversicolor supertexta*, Algalase, Agarase, Cellulase

Abstract

In this paper, the effects of metal ions and pH value on the enzymic activity of algalase, agarase and cellulase of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta* were studied. The results showed that Mg^{2+} is the activator for the enzyme algalase; Ba^{2+} that for the enzyme agarase; and Ba^{2+} and Mn^{2+} are that for the enzyme cellulase. The studies also revealed that the enzyme algalase activity is very sharply inhibited by the metal ions such as Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ag^{+} , Zn^{2+} and Fe^{3+} .