

暗纹东方鲀蛋白酶活性的研究

殷宁 赵强 李朝晖 赵清良

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

[摘要] pH 是影响蛋白酶活性的显著因素之一. 本文仅初步探讨了 pH 对一龄、二龄两种规格暗纹东方鲀的胃、肠、肝胰脏蛋白酶活性的影响. 结果表明, 一、二龄鱼的胃蛋白酶最适 pH 均在 2.2, 肠蛋白酶最适 pH 为 8.5, 而一龄鱼肝胰脏蛋白酶最适 pH 在 9.0 以上, 二龄鱼的最适 pH 为 8.5. 另外, 蛋白酶活性大小依序为胃、肠、肝胰脏. 0.5mol/L CaCl_2 溶液能明显的抑制胃蛋白酶的活性.

[关键词] 暗纹东方鲀 pH 消化酶 蛋白酶活性

[中图分类号] Q959.460.5 S965.225; [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)01-0101-04

鱼类消化酶的研究一直是鱼类消化生理的重要研究内容, 也为配合饲料的研制提供科学的依据. 暗纹东方鲀, 俗称河豚, 肉味鲜美, 质地鲜嫩, 营养丰富, 自古一直被奉为极品佳肴. 随着人工繁殖技术的成功, 暗纹东方鲀也成了具有极高经济价值的特种水产养殖对象, 因此对其消化酶的研究具有重要现实意义, 但有关研究未见报道. 消化酶活性与环境因素有密切关系, 其中 pH 是主要影响因素. 酶的最适 pH 值是该种酶的重要的理化性质. 此特性使得暗纹东方鲀饲料 pH 值与暗纹东方鲀蛋白酶最适 pH 值密切相关. 本文报道了 pH 影响暗纹东方鲀蛋白酶活性的初步研究结果, 期望对暗纹东方鲀配合饲料的研制有所帮助, 供有关方面参考.

1 材料与方法

1.1 材料与样品制备

实验用一、二龄鱼分别为 1998、1999 年春季用长江产种鱼经人工繁殖获得的鱼苗通过人工培育而成的. 淡水养殖, 均健康无伤. 一龄鱼全长范围 12.0 ~ 15.0 cm, 体重范围 47.5 ~ 89.8 g; 二龄鱼全长范围 18.3 ~ 20.5 cm, 体重范围 282.1 ~ 375.0 g. 取回后水族箱暂养, 饥饿 72 h 后^[1] 取鱼称重解剖, 取出胃、肠、肝胰脏(肝脏与胰腺组织彼此是分开的, 实验时混在一起), 剔除附属物, 剖开胃、肠, 用冷却去离子水(4℃)冲洗, 滤纸吸干. 每种规格的实验鱼分为 3 个平行组, 每组 3 尾. 将每组相同的样品混合后称重. 按样品重的 20 倍分次加进 pH 7.0 的冷却去离子水, 高速捣碎, 用冷冻离心机经 4000 r/min 离心 30 min, 取上清液于 4℃ 冰箱保藏备用. 24 h 内分析完毕. 另外, 胃中加 0.5 mol/L CaCl_2 溶液按上述方法进行匀浆离心, 在 pH 2.2 处测光密度值, 以期研究 CaCl_2 对胃蛋白酶活性的影响.

收稿日期 2000-03-07

基金项目 江苏省科技厅基金资助项目(Z11100B463)

作者简介 殷宁, 1976—, 南京师范大学生命科学学院硕士研究生, 主要从事动物生理生化的学习与研究.

1.2 蛋白酶活性测定

蛋白酶活性测定采用福林-酚试剂法^[2],1%酪蛋白溶液 1 mL,加不同梯度 pH 值的缓冲液各 4 mL,30℃水浴中保温 5~10 min,然后加入 1 mL 酶液,再继续保温 15 min 后加 3 mL 10%三氯乙酸终止反应.取滤液 1 mL,加入 0.55 mol/L 碳酸钠 5 mL,再加入福林试剂 1 mL,30℃水浴中显色 15 min,使用 722 型分光光度计在波长为 680 nm 条件下测定各自的光密度值.

蛋白酶活性大小以 30℃条件下 1 min 内经酶分解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸表示一个活性单位.

2 结果

2.1 pH 对蛋白酶活性的影响

pH 对一龄鱼蛋白酶活性影响的测定结果如图 1 所示.胃蛋白酶活性的最适 pH 为 2.2,肠蛋白酶活性的最适 pH 为 8.5,肝胰脏蛋白酶活性的最适 pH 在 9.0 以上.胃蛋白酶活性与 pH 关系曲线呈单峰型,在 pH 2.2 处出现明显的峰值(为 92.73);在 pH 2.2~4.0 范围内,活性减小,变化较平缓,紧接着随 pH 值升高,胃蛋白酶活性呈急剧的下降,pH 大于等于 7.0 无活性.肠蛋白酶当 pH 小于 6.0 时几乎无活性;pH 6.5~8.5 时肠蛋白酶活性随 pH 值的升高变化幅度逐渐增加,并在 pH 8.5 处达到峰值(为 44.61).肝胰脏蛋白酶活性较低,pH 7.5 时活性较低(为 4.67),在 pH 8.0~8.5 范围内活性急剧增高,而 pH 8.5~9.0 间也呈增高趋势,但已经极为平缓.

pH 对二龄鱼蛋白酶活性的影响结果如图 2 所示.胃、肠、肝胰脏蛋白酶活性的最适 pH 值分别为 2.2 8.5 8.5.胃蛋白酶与 pH 关系曲线亦呈单峰型,pH 2.2 处出现峰值(酶活性为 41.23),随后曲线呈直线下降,pH 4.0 时蛋白酶活性为 2.03,pH 6.0 时蛋白酶活性极低,几乎已经属于实验误差范围之内.肠蛋白酶活性在 pH 7.5 以下几乎无活性,接着随 pH 梯度的增加活性也升高,pH 8.5 时达到峰值(酶活性为 12.90),随后酶活性下降.肝胰脏蛋白酶活性在 pH 7.5 时酶活性为 1.70,活性随后急剧增加,在 pH 8.5 时达到最大值 8.26,至 pH 9.0 时酶活性就下降了.

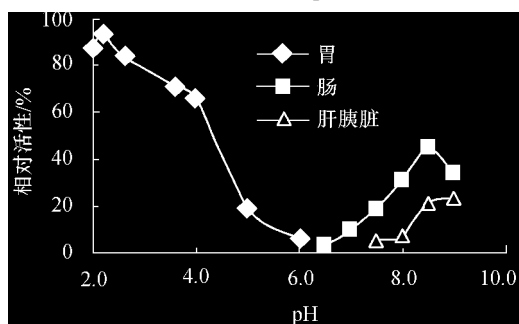


图 1 pH 对一龄鱼蛋白酶活性的影响

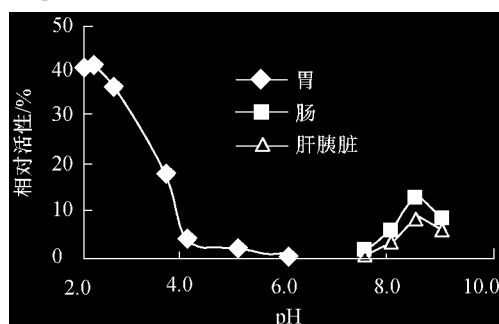


图 2 pH 对二龄鱼蛋白酶活性的影响

综合图 1 和 2,可以看出暗纹东方鲀消化系统胃、肠、肝胰脏蛋白酶活性适应的 pH 范围相对较窄,彼此间酶活力差异较明显.在各自最适的 pH 时,3 种组织蛋白酶活性大小依序为胃、肠、肝胰脏.一龄鱼胃、肠、肝胰脏蛋白酶活性比二龄鱼相应组织的蛋白酶活性高,若以一龄鱼胃蛋白酶最适 pH 时活性定为 100%,

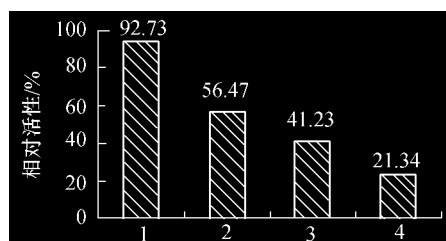


图 3 氯化钙溶液对蛋白酶活性的影响

则二龄鱼胃蛋白酶活性仅为其 44.5%。

2.2 CaCl_2 溶液对胃蛋白酶活性的影响

如图 3 所示,虚线柱形图表示加入 CaCl_2 溶液胃蛋白酶活性的大小,结果表明 0.5 mol/L CaCl_2 溶液明显抑制了胃蛋白酶的活性,加入 CaCl_2 溶液后,一龄鱼、二龄鱼的胃蛋白酶活性的大小为 56.47、21.34,分别为未加 CaCl_2 溶液蛋白酶活性大小的 60.9%、51.8%。

3 讨论

鱼类消化器官组织的结构和消化机能是与其的食性相适应的,消化器官的不同部位,因所承担的消化机能不同,消化酶活性也会呈明显的差异,消化系统不同部位蛋白酶活性的最适 pH 也会呈现不同,暗纹东方鲀胃蛋白酶在 pH 2.2 时活性最强,在中性以及偏碱性环境下则失活,这与尾崎久雄^[3]的报道是一致的,肠蛋白酶活性最适 pH 为 8.5,与许多有胃鱼,如鲑鱼^[4]、虹鳟^[5]、大鳞大麻哈鱼^[6]、莫桑比克罗非鱼^[7]等的肠蛋白酶最适 pH 7.0~9.5 也是一致的,鱼类肝胰脏蛋白酶的最适 pH 值的资料较少,鲶形目的叉尾鲶^[5]肝胰脏蛋白酶的最适 pH 为 7.8,为弱碱性,而暗纹东方鲀肝胰脏蛋白酶最适 pH 则趋于强碱性,鱼的胃内为强酸环境,饱食后肠内多呈碱性,消化道不同部位的特定环境,是导致暗纹东方鲀胃、肠、肝胰脏蛋白酶活性最适 pH 差异和适应 pH 范围较窄的原因,也是有胃鱼的共同特点。

如图所示,一龄鱼、二龄鱼胃、肠蛋白酶活性的最适 pH 呈一致性,肝胰脏蛋白酶活性的最适 pH 也趋于一致,这说明了一、二龄鱼的消化系统发育完善,消化系统内环境相对保持恒定,鱼体在生长过程中蛋白酶的分泌机能由不完善到完善,然后维持一定的水平,以后又受食性、饵料及其它因子的影响而下降,消化酶的活性随生长发育呈现不同的变化,本实验中二龄鱼蛋白酶活性整体水平上比一龄幼鱼低,这种情况提示我们在研制暗纹东方鲀人工配合饲料时,应考虑到不同生长阶段蛋白酶活力出现与鱼体生长条件相适应的变化,因此,饲料配方时应分不同生长阶段进行。

Yoshinaka R^[9]发现浓度高于 50 mmol/L CaCl_2 溶液能抑制酶的活性,低于 50 mmol/L CaCl_2 溶液能提高酶的活性,本文得出 0.5 mol/L CaCl_2 溶液能强烈抑制蛋白酶的活性,这在一定程度上提示我们在向暗纹东方鲀人工配合饲料添加钙剂时,要考虑到水体中 Ca^{2+} 的含量,以尽量减少成本。

暗纹东方鲀肠壁无分泌消化酶的能力,但肝胰脏蛋白酶活性比肠蛋白酶低,这可能由于肝胰脏能分泌的部分蛋白酶原,酶原在肠中被肠液激活,再加上肠壁对蛋白酶有较强的吸附能力造成的,但胃蛋白酶活性明显高于肠和肝胰脏蛋白酶活性,这一结果与尼罗罗非鱼相同^[8],很可能胃就是暗纹东方鲀消化蛋白质的主要器官,因此,在生产中,有必要考虑饲料组成及加工形式,使食物蛋白尽可能在胃部消化,以利于提高食物蛋白及其营养成分的利用。

[参考文献]

- [1] Olatunde A A, Ogunbiyi O A. Digestive enzymes in the alimentary tracts of three tropical catfish[J]. Hydrobiologia, 1977, 56(1): 21—24.
- [2] 中山大学生物系生化微生物教研室编. 生化技术导论[M]. 北京: 科学出版社, 1979. 151.
- [3] 尾崎久雄 著, 吴尚忠 译. 鱼类消化生理(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983. 73.

- [4] 桥本芳郎,著.蔡完其,译.养鱼饲料学[M].北京:农业出版社,1980.27—40.
- [5] Agrawal V P, Sastery K V, Kaushab S K. Digestive enzymes of three teleost fishes. Acta[J]. Physiol. Hung, 1975 46: 93—98.
- [6] Croston C B. Tryptic enzymes of chinook salmon[J]. Archives of Biochem and Biophysis, 1960 89: 202—206.
- [7] Fish G R. The comparative activity of some digestive enzymes in alimentary tract of Tilapia and Perch[J]. Hydrobiologia, 1960 15: 167—178.
- [8] 倪寿文,桂远明,刘焕亮.草鱼、鲤、鲢、鳙和尼罗罗非鱼肝胰脏和肠道蛋白酶活性的初步探讨[J].动物学报,1993 39(2): 160—168.
- [9] Yoshinaka R. Distribution of trypsin and chymotrypsin and their zymogens in digestive organs of the eel[J]. Anguilla japonica. Comp. Biochem. Physiol. B, 1984 78(3): 569—574.

Preliminary Studies on Protease Activities in *Fugu obscurus* Cultured in Fishery

Yin Ning, Zhao Qiang, Li Zhaohui, Zhao Qingliang

(The College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, PRC)

Abstract pH is one of the most important factors that can effect Protease Activities. The results showed that the optimum pH for protease activities were 2.2, 8.5 respectively in the stomach, the intestine in one year old and two year old *Fugu obscurus*. The optimum pH for protease activities was above 9.0 in the hepatopancreas in one-aged fish, But it was 8.5 in two-aged fish. Additionally, the protease activities of the stomach were the highest, those of the intestine were less and the hepatopancreas were the lowest in the general level. 0.5mol/L CaCl_2 can strongly inhibit protease activities.

Key words : *Fugu obscurus* ; pH ; digestive enzyme ; protease activity

[责任编辑 孙德泉]