

# 草鱼肠道胰蛋白酶(GT-A)的纯化及其 部分理化性质初探

刘忠义

(湘潭大学 生物与食品工程系,湖南 湘潭市 411105)

**[摘要]** 为了充分探讨草鱼内脏的利用途径并深入了解草鱼消化生理学,将草鱼肠道用冰丙酮脱脂,用磷酸盐缓冲溶液提取,然后经过硫酸铵分级沉淀,再经过离子交换层析、凝胶过滤层析等纯化,分离得到一种碱性蛋白酶,并对其部分理化性质进行了检测。结果表明,该酶是一种胰蛋白酶(GT-A),其相对分子质量为 30.75 ku;其最适温度为 40℃,最适 pH 为 8.0,在 pH 6.0~10.0 保持稳定,在 65℃ 加热 20 min 其活性丧失 95%。表明草鱼肠道中含有在低温下能很好发挥水解作用的胰蛋白酶。

**[关键词]** 草鱼;碱性蛋白酶;胰蛋白酶;纯化;SDS-底物-PA GE

**[中图分类号]** Q556.1;Q176

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)10-0189-07

## Purification and preliminary research of some properties of a Trypsin (GT-A) from the intestines of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

LIU Zhong-yi

(Department of Food and Biotechnology, Xiangtan University, Xiangtan, Hu'nan 411105, China)

**Abstract:** In order to widely investigate ways of utilizing the gut of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and intensively learn its digestive physiology, intestines of the grass carp were defatted with cooled acetone (-20℃), and then extracted with 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 6.8. And then, an alkaline protease was purified from the crude extract by ammonium sulfate fractionation of 10-40% saturation, Sepharose CL-6B gel chromatography, DEAE-Sepharose CL-6B ion exchange chromatography, and Sephadex G75 and Sephacryl S-100 HR gel chromatography. SDS-PAGE electrophoresis showed the enzyme was homogeneous. SDS-substrate-PA GE and inhibition assays showed that it was a trypsin, named as GT-A, with a relative molecular weight of 30.75 ku. GT-A had optimum temperature of 40℃ and optimum pH of 8.0 for *N*-benzoyl-L-arginine ethyl ester · HCl (BAEE). GT-A remained stable at range of pH 6.0-10.0, and lost 95% of its activity when heated for 20 min at 65℃, and exhibited some unique properties in comparison with those of trypsins from other fish species. These results showed that the intestines of grass carp contained an efficiently hydrolyzing trypsin at lower temperature.

**Key words:** grass carp; alkaline protease; trypsin; purification; SDS-substrate-PA GE

蛋白酶是生物生命活动中不可缺少的物质,在现代工业尤其是食品工业中具有十分重要的作

用<sup>[1-3]</sup>。鱼是一类重要的冷血动物,是人类重要的优质食物,其品种繁多、分布广泛、有典型的环境温度

**[收稿日期]** 2006-09-14

**[基金项目]** 湖南省教育厅中青年教师计划项目(02C580)

**[作者简介]** 刘忠义(1964-),男,湖南涟源人,副教授,主要从事生物技术 in 食品科学与工程中的应用研究。

E-mail: lzly@xtu.edu.cn

适应性,从炎热的热带地区到极度寒冷的南极洲冰层下面均有鱼类生长<sup>[46]</sup>。因此,不同鱼类的内脏可能含有从适冷酶到耐热酶的各种类型酶,鱼酶无疑是一个潜在的重要酶源,其中包括蛋白酶。许多鱼消化蛋白酶已被分离纯化和鉴定,如巴西热带鱼 Tambaqui (*Colossoma macropomum*)<sup>[47]</sup>、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)<sup>[51]</sup>、鲇鱼 (*Pneumatophorus japonicus*)<sup>[71]</sup>、大西洋鳕鱼 (*Gadus morhua*)<sup>[8]</sup>、极地鳕鱼 (*Boreogadus saida*)<sup>[91]</sup>、Greenlan 鳕鱼 (*Gadus ogac*)<sup>[10-11]</sup>、金枪鱼<sup>[12]</sup>、鳊鱼 (*Engraulis japonica*)<sup>[13]</sup> 和 *E. encrasicolus*<sup>[14]</sup>、虹鳟鱼<sup>[15]</sup>、鲟鱼 (*Procambarus clarkii*)<sup>[16]</sup>、观赏性鱼 *Tilapia nilotico*<sup>[17]</sup> 以及亚洲骨舌鱼 *Scleropages formosus* (Osteoglossidae)<sup>[18]</sup> 等。Jeong 等<sup>[16]</sup> 报道,来自无胃鱼的蛋白酶具有水解天然蛋白质(未变性)的能力,而其他有胃动物的蛋白酶却无此特性。

草鱼是一种分布极广泛的鱼类,在中国被称为“四大家鱼”之一,2001 年产量达到 300 多万 t<sup>[19]</sup>,但是目前尚未见有关草鱼肠道蛋白酶研究的相关报道。草鱼内脏是草鱼加工中的主要副产品,约占草鱼质量的 20%~25%。这些副产物并没有得到很好的利用而被直接丢弃或者直接作为鱼饲料,造成了严重的环境污染。本试验以草鱼消化道为原料,提取分离纯化了一种碱性蛋白酶——胰蛋白酶(GT-A),并对其理化性质进行了初步研究,以期对草鱼消化生理学及草鱼内脏利用研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 草鱼 草鱼购自水产市场,为本地渔场养殖的成年鱼,平均质量 2.0~2.5 kg,平均体长 35.5~38.25 cm,饲以商业颗粒鱼饲料以及天然草料。

1.1.2 试剂 Sepharose CL-6B、DEAE-Sepharose CL-6B、Sephadex G-75 及 Sephacryl S-100HR,购自 Pharmacia 公司(瑞典);丙烯酰胺、N,N'-甲叉二丙烯酰胺、甲苯磺酰氟(PMSF)、大豆胰蛋白酶抑制因子(SBTI)和 N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(BAEE),购自 Sigma 化学试剂公司(美国);酪蛋白酶购自上海国药集团;低分子质量蛋白质标准(磷酸化酶 b (97.4 ku)、牛血清白蛋白(66.8 ku)、肌动蛋白(43 ku)、碳酸酐酶(31 ku)、烟草花叶病毒外壳蛋白(17.5 ku)、溶菌酶(14.4 ku)),购自上海生物化学研究所;其他试剂均为分析纯或者生化专用试剂。

1.1.3 仪器 Mini PROTEAN 型电泳装置,美国 Bio-Red 公司生产;REC5004U20 型层析柜,美国 Kendro 实验室产品;Model Sigma 4 K15 高速冷冻离心机,德国 Sigma 实验离心机公司产品;Model ABCONCO 6L 冷冻干燥设备,美国 ABCONCO 实验室产品;HD-3 UV 检测器和 DBS-100 电脑全自动分部收集器,上海沪西分析仪器厂生产;AKTA 蛋白质纯化仪,瑞典 pharmacia 公司生产;UV-2102C UV-可见分光光度计,上海 UNICO 公司生产;HH-4 数显恒温水浴锅,江苏金坛荣华仪器制造有限公司产品;722 分光光度计,上海第三分析仪器厂生产。

### 1.2 草鱼肠道碱性蛋白酶的粗提

草鱼购回后在清水中养殖 24 h,然后宰杀,取出内脏,清洗干净。用剪刀剖开鱼肠,用去离子水反复清洗。将清洗干净的鱼肠用剪刀剪成碎片,用肠质量 4 倍左右的 -20 的冰丙酮脱脂,制成鱼肠丙酮干制剂,-20 冷藏。

向上述丙酮干制剂中加入约 5 倍质量的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(含 20 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 6.8, 4),在高速组织捣碎机中捣碎 30 s,冷冻离心(4, 12 000 r/min, 30 min),收集上清液。残渣用同样方法再提取 1 次,合并 2 次所得上清液即得粗酶液。立即用硫酸铵分级沉淀法提取粗酶,通过冷冻离心(4, 12 000 r/min, 30 min)收集硫酸铵饱和度为 10%~40% 时的沉淀物,溶于 4 去离子水中并透析过夜,中间换水 1 次。次日取出冷冻干燥,-20 冷藏。

### 1.3 草鱼肠道碱性蛋白酶的纯化

取前述冻干的粗酶 0.75 g,用约 10 mL 4 的去离子水溶解,依次用 Sepharose CL-6B 柱(2.6 × 100 cm,层析条件:0.05 mol/L pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液洗脱,洗脱速度 24 mL/h,每 20 min 收集 1 管)、DEAE-Sepharose CL-6B 柱(1.6 × 15 cm,层析条件:采用梯度洗脱,洗脱液分别为含 0.02, 0.35, 1.0 和 2.0 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L, pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液,洗脱速度 28.0 mL/h,每 10 min 收集 1 管。层析结束后,收集主要活性部分,在 pH 7.0 的条件下再进行一次离子交换层析)和 Sephadex G-75 柱(1.6 × 100 cm,层析条件:0.05 mol/L pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液洗脱,洗脱速度 12 mL/h,每 20 min 收集 1 管)分离。Sephadex G-75 柱洗脱物中有 2 个酶活性峰,酶活性峰 A 冻干物用少量的 4 去离子水溶解,过 Sephacryl S-

100HR( 1.6 ×60 cm)凝胶层析柱分离(柱被连接到 A KTA 蛋白质纯化仪上),收集主要的碱性蛋白酶活性部分,冷冻干燥, - 20 贮藏。所有分离纯化操作均在 4 下完成。整个分离纯化过程用酪蛋白溶液作底物检测碱性蛋白酶活性。

1.4 草鱼肠道碱性蛋白酶活性的测定

按照 Folin 方法<sup>[20]</sup>,用 10 g/L 酪蛋白溶液作底物(含 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液,含 20 mmol/L CaCl<sub>2</sub> ,pH8.5),在 680 nm 处测定三氯乙酸可溶物与福林试剂反应产物的吸光度。酶活力单位定义为:在 37 和 pH8.5 条件下,每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量为 1 个酶活性单位,在分离图谱中酶活力以 680 nm 处的吸光度表示。

1.5 草鱼肠道 GT-A 活力的测定

按照文献[21]介绍的胰蛋白酶测定方法进行,用 BAEE 作底物。在分离图谱中蛋白质浓度以 280 nm 处的吸光度表示。

1.6 酶液中蛋白质含量的测定

采用 Lorry 法<sup>[22-23]</sup>进行。

1.7 草鱼肠道 GT-A 活性抑制试验

分别用 PMSF 以及 SB TI 与酶溶液混合均匀并在室温下放置 30 min ,然后用 BAEE 作底物测定残余的碱性蛋白酶活性。试验重复 3 次,结果取其平均值。

1.8 草鱼肠道 GT-A 同质性和活性组分的测定

按照 Blackshear 等<sup>[24]</sup>所述的 SDS-PAGE 方法检测纯化酶的同质性。选用分离胶浓度为 150 g/L,浓缩胶浓度为 40 g/L,胶片厚 0.75 mm。电泳在 110 V 恒压条件下完成。

参照 Garc ía-Carre o 等的 SDS-底物-PAGE 方法<sup>[25]</sup>,检测 GT-A 的活性组分,其中分离胶浓度为 150 g/L,浓缩胶浓度为 40 g/L,胶片厚为 0.75 mm。先将硫酸铵沉淀的粗酶以及纯化所得酶分别和 PMSF 在室温下放置 20 min。然后和未被抑制剂处理的酶分别用含 SDS 的处理液(不含还原剂)按 1 : 1 稀释,不加热直接加到胶片上。在 1 个泳道里加入 6 μL 蛋白质相对分子质量标准溶液。电泳在 pH 8.3 的缓冲溶液中于 110 V 恒压和 4 的条件下完成。电泳结束后,将胶片放入 30 g/L 的酪蛋白溶液中(用 0.05 mmol/L、pH 8.0 的 Tris-HCL 缓冲溶液配制),于 4 放置 90 min ,然后 35 放置 2 h。取出胶片用去离子水冲洗,在 120 g/L 的三氯醋酸溶液固定 20 min ,取出,去离子水冲洗,用 1

g/L 的考马斯亮蓝染色,然后脱色。

1.9 草鱼肠 GT-A 部分理化性质测定

1.9.1 最适作用温度和温度稳定性 用 BAEE 作底物,分别在 15, 28, 35, 40, 45, 50 和 60 下测定 GT-A 活力,确定酶的最适作用温度。调整 GT-A 的 pH 值为 8,分别在 30, 40, 50, 60, 65 和 70 下保温 1, 3, 5, 10, 20, 30, 60, 90 min ,用 BAEE 作底物测定酶的残余活力,确定酶的温度稳定性。试验重复 3 次,结果取其平均值。

1.9.2 最适 pH 和 pH 的稳定性 用 BAEE 作底物,分别在 pH 为 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 10, 11, 12 和 13 的条件下测定酶活力,确定酶的最适作用 pH。调整 GT-Ad 的 pH 分别为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 和 13,在 30 的条件下放置 30 min ,用 BAEE 作底物测定残余酶活力,确定酶的 pH 稳定性。所用缓冲溶液均为 0.2 mol/L ,现配现用。试验重复 3 次,结果取其平均值。

2 结果与分析

2.1 草鱼肠道碱性蛋白酶的纯化

经过 7 步纯化,得到一种草鱼肠道碱性蛋白酶。表 1 表明,经过纯化后,GT-A 的比活力为 84.75 U/ mg,纯化倍数为 100.86 倍。

2.1.1 硫酸铵沉淀和透析 表 1 表明,硫酸铵沉淀和透析可以略微提高草鱼肠道碱性蛋白酶的纯化倍数,与文献[17, 26]报道一致。透析主要去除了相对分子质量低于 10 ku 的肽和杂蛋白质。

2.1.2 Sepharose CL-6 凝胶过滤层析 图 1 和表 1 表明,经过 Sepharose CL-6 凝胶过滤层析,虽然没有大幅度提高酶的纯化倍数,但是大量杂蛋白被去除。

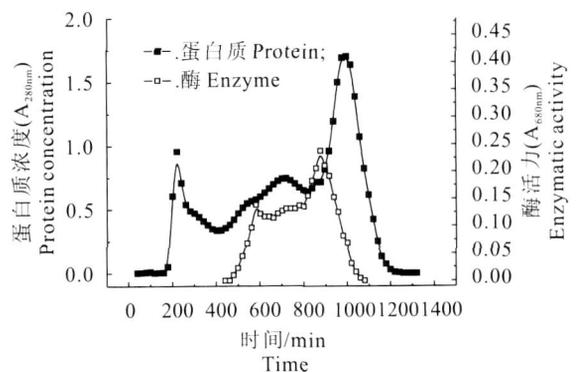


图 1 草鱼肠道碱性蛋白酶的 Sepharose CL-6B 层析图谱  
Fig. 1 Gel filtration pattern of the alkaline proteases of grass carp on Sepharose CL-6B

表 1 草鱼肠道碱性蛋白酶 GT-A 的纯化过程

Table 1 Purification steps of the alkaline protease GT-A from intestines of the grass carp.

纯化步骤 Purification step	总酶活力/U Total enzyme activity	总蛋白质质量/mg Total protein content	比活力/ (U·mg <sup>-1</sup> ) Specific activity	活力回收率/% Activity recovery	蛋白回收率/% Protein recovery	纯化倍数 Purification fold
原液 Crude enzyme solution	1156.64±78.01	1344.90±101.62	0.86	100.00	100.00	1.00
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate fractionation	1098.78±69.05	1181.48±98.16	0.93	95.00	87.85	1.08
透析 Dialysis	1055.06±68.18	1023.69±92.22	1.03	91.22	76.12	1.20
CL-6B 凝胶过滤层析 Sephacryl CL-6B	1010.88±62.51	306.88±12.89	3.29	87.4	22.82	3.83
pH8.0 CL-6B 离子交换层析 DEAE Sepharose CL-6B at pH8.0	512.92±30.75	143.11±6.79	3.58	44.35	10.64	4.16
pH7.0 CL-6B 离子交换层析 DEAE Sepharose CL-6B at pH7.0	360.98±15.58	58.72±3.92	6.14	31.20	4.37	7.14
G-75 凝胶过滤层析 Sephadex G-75	59.35±3.15	1.97±0.17	30.13	5.13	0.15	35.03
S-200HR 凝胶过滤层析 Sephacryl S-200HR	56.38±2.89	0.65±0.05	84.75	4.87	0.05	100.86

2.1.3 DEAE-Sephacryl CL-6B 凝胶层析 图 2 和图 3 表明,在进行 DEAE-Sephacryl CL-6B 离子交换层析时,无论是 pH 8.0(图 2)还是 pH 7.0(图 3),只表明了主要碱性蛋白酶被洗脱的部分,主要的碱性蛋白酶没有被交换剂吸附,而是在平衡液洗脱

时被洗脱出来。这和文献[4-5,8,10,16]报道的结果有差异,说明草鱼肠道碱性蛋白酶可能具有与其他鱼碱性蛋白酶不同的等电点和不同电荷性质的蛋白质外层(在 pH 相同的条件下)。

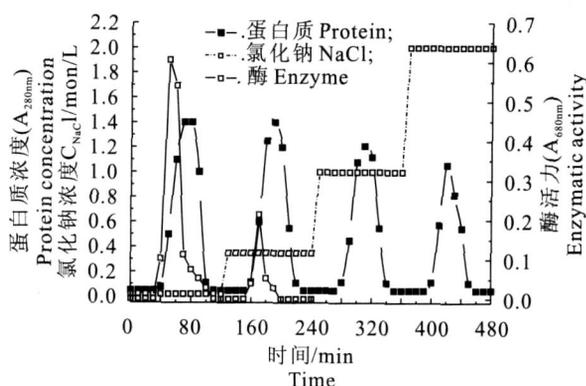


图 2 pH 8.0 时草鱼肠道碱性蛋白酶的 DEAE-Sephacryl CL-6B 离子交换层析图谱

Fig. 2 Ion exchange pattern of the alkaline proteases of grass carp on DEAE-Sephacryl CL-6B at pH 8.0

2.1.4 Sephadex G-75 凝胶过滤层析 图 4 和表 1 表明,经过 Sephadex G-75 凝胶层析后,得到 2 个主要的草鱼碱性蛋白酶活性峰,依据洗脱顺序分别命名为峰 A 和峰 B。与前面的分离步骤相比,Sephadex G-75 凝胶层析取得较好的分离效果。

2.1.5 Sephacryl S-100HR 凝胶过滤层析 图 5 和表 1 表明,Sephadex G-75 凝胶层析后所得峰 A 收集物经过 Sephacryl S-100HR 凝胶层析分离后,

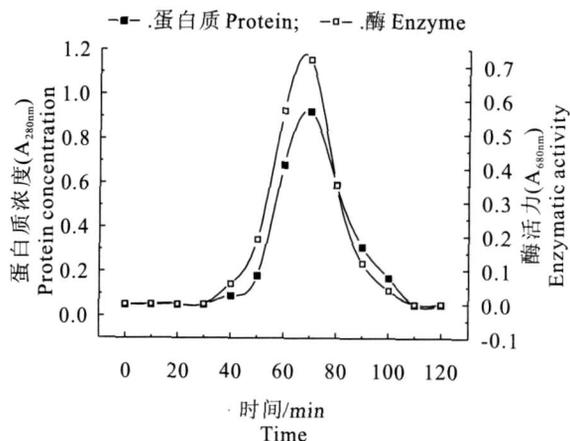


图 3 pH 7.0 时草鱼肠道碱性蛋白酶的 DEAE-Sephacryl CL-6B 离子交换层析图谱

Fig. 3 Ion exchange pattern of the alkaline proteases of grass carp on DEAE-Sephacryl CL-6B at pH 7.0

得到一个比较对称的碱性酶蛋白峰,酶的纯化倍数显著提高。Sephacryl S-100HR 层析能显著提高酶的纯化倍数,其原因除了 Sephacryl S-100HR 有较高的分辨率外,还与柱被连接在 AKTA 蛋白质纯化仪上有关。对峰 A 收集物进行 UV 扫描发现,收集物在波长 210 nm 处有最大吸收,故在 Sephacryl S-100HR 层析分离时采用 210 nm 的波长进行检测。

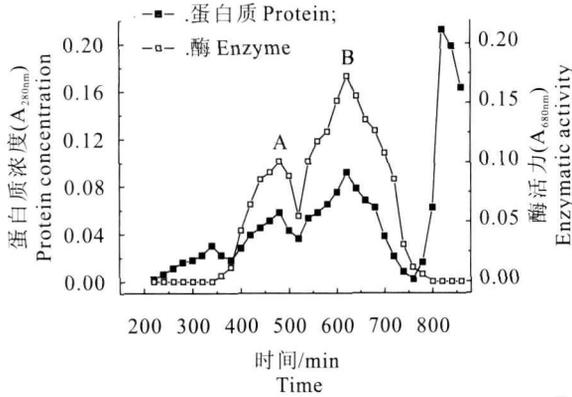


图 4 草鱼肠道碱性蛋白酶的 Sephadex G-75 层析图谱  
Fig. 4 Gel filtration pattern of the alkaline proteases of grass carp on Sephadex G-75

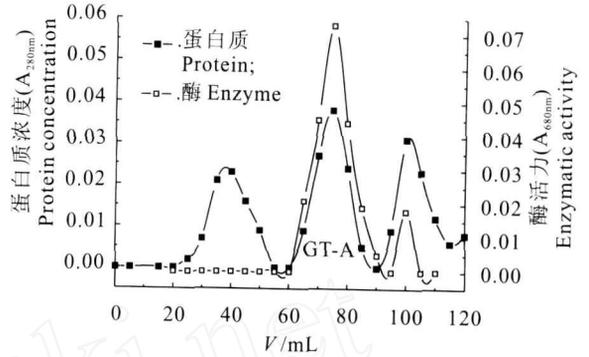


图 5 草鱼肠道碱性蛋白酶 GT-A 的 Sephacryl S-100HR 层析图谱  
Fig. 5 Gel filtration pattern of the alkaline proteases GT-A of grass carp on Sephacryl S-100HR

2.2 草鱼肠道胰蛋白酶的鉴定

SDS-PAGE 结果(图 6)和 SDS-底物-PAGE 结果(图 7)均表明,GT-A 为单带,其相对分子质量约为 30.75 ku。SDS-底物-PAGE(图 7)进一步表明,草鱼消化道提取物中有 4 种碱性蛋白酶,其中 1 种相对分子质量约为 105 ku,对 PMSF 不敏感,是非丝氨酸碱性蛋白酶;另外 3 种酶相对分子质量分别约为 26.4,30.75 和 40.5 ku,均对 PMSF 敏感,是丝氨酸碱性蛋白酶,本试验所纯化的酶只是其中的一种。图 8 表明,SBTI 和 PMSF 均对所纯化的酶活性有很强的抑制作用,同时该酶能很好地利用 BAEE 作底物,说明其是一种胰蛋白酶(命名为 GT-A)。SDS-PAGE 结果表明,GT-A 只有 1 条清晰的单带,可以推测该酶主要由 1 条多肽链组成,与人们对 Tambaqui<sup>[4]</sup>、鲤鱼<sup>[5]</sup>、鲑鱼<sup>[7]</sup>、鳃鱼<sup>[13-14]</sup>、大西洋鳕鱼<sup>[8]</sup>和 Greenlan 鳕鱼<sup>[10]</sup>胰蛋白酶的研究结果一致。

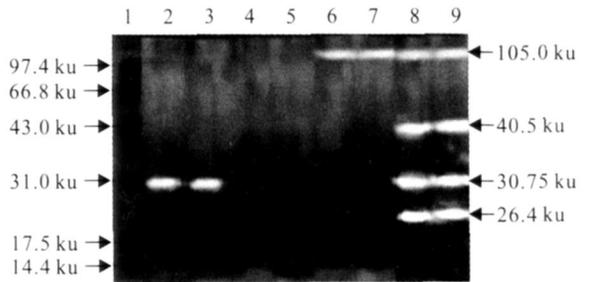


图 7 草鱼碱性蛋白酶在碱性条件下的 SDS-底物-PAGE 图谱  
1. 蛋白质分子质量标准;2~3. GT-A; 4~5. GT-A 加 PMSF; 6~7. 粗鱼酶加 PMSF;8~9. 粗鱼酶  
Fig. 7 SDS-substrate-PAGE pattern of the grass carp alkaline protease at pH 8.3  
1. Protein molecular weight standards;2~3. GT-A; 4~5. GT-A + PMSF;6~7. Crude fish enzyme + PMSF;8~9. Crude fish enzyme

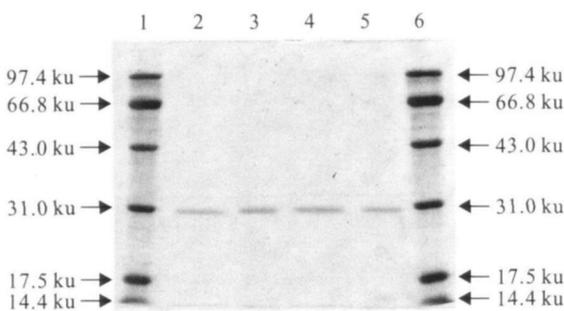


图 6 GT-A 的 SDS-PAGE 电泳图谱

1,6. 蛋白质分子质量标准;2~5. GT-A

Fig. 6 SDS-PAGE pattern of the GT-A

1,6. Protein molecular weight standards;2~5. GT-A

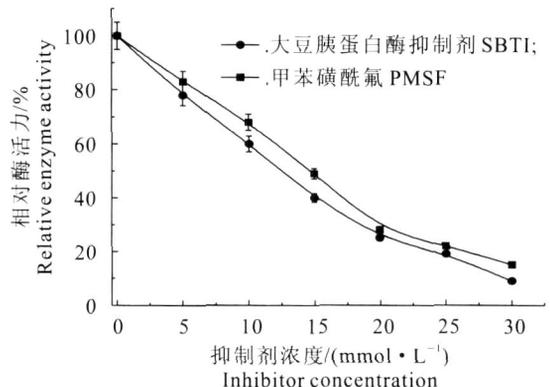


图 8 草鱼肠道 GT-A 的抑制

Fig. 8 Inhibition of the GT-A by PMSF and SBTI

### 2.3 GT-A 的最适温度及温度稳定性

图 9 表明,GT-A 的最适作用温度为 40 。不同鱼种的胰蛋白酶有各自不同的最适温度,如 Tambaqui 为 60 [4], 鲤鱼为 45 [5], 鲇鱼为 50 [7], 鳊鱼为 45 [13-14], 大西洋鳕鱼为 40 [8], Greenlan 鳕鱼为 30 [10]。GT-A 的最适作用温度及其在低温中的表现是比较独特的。草鱼 GT-A 的最适作用温度和大西洋鳕鱼酶相同,高于 Greenlan 鳕鱼酶而较其他鱼酶低。GT-A 在 15 时的活性约为 40 时的 61%,表明该酶能适应较低的温度环境。而其他鱼胰蛋白酶在 15~20 时的活力仅

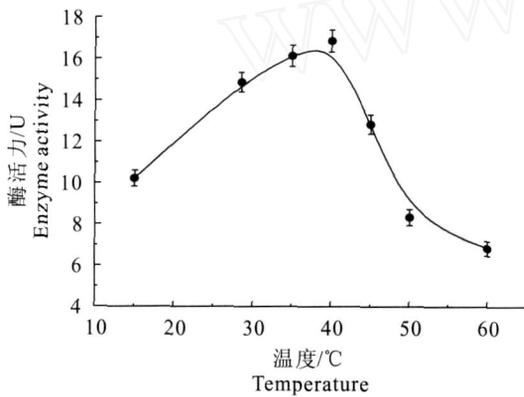


图 9 草鱼肠道 GT-A 的最适温度

Fig.9 Optimal temperature of the GT-A

### 2.4 GT-A 的最适 pH 及 pH 稳定性

图 11 表明,以 BAEE 为底物时,草鱼 GT-A 的最适 pH 为 8.0;在 pH 为 7.0(鱼的生理 pH)时,酶活性为最适 pH 时的 80%。图 12 表明,在 pH 6~10

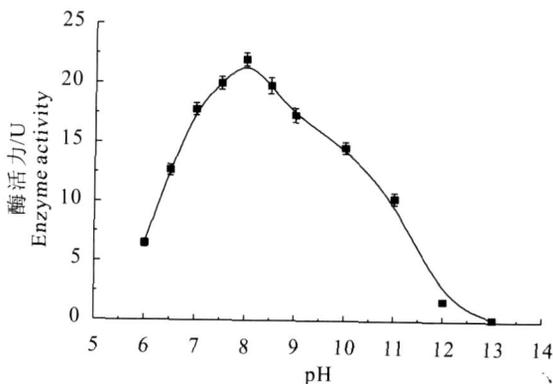


图 11 25 时 pH 值对草鱼 GT-A 活力的影响

Fig.11 Effect of pH on the GT-A activity at 25

Jeong 等[16]报道鲶鱼胰蛋白酶的最适 pH 是 8.0,在 pH 6~10 有很好的稳定性,但是在鱼的生理 pH 时,酶只保留其最适 pH 时活性的 60%。其他鱼胰蛋白酶的最适 pH 不尽相同,Tambaqui 为

为其最适温度时的 10%~20%。因为鱼的实际生长环境温度在大部分季节里低于 20 ,故 GT-A 对环境温度有更好的适应性。

图 10 表明,草鱼 GT-A 在 30 时很稳定,在 60 时,也相当稳定;但当温度达到 65 时,GT-A 失去稳定性,在 65 加热 10 min,其活性丧失 80%,加热 20 min 其活性丧失 95%;在 70 加热 2 min 活性基本丧失殆尽,可以推测酶蛋白 A 的热变性温度可能是 65 。和其他鱼酶相比,草鱼酶的热稳定性低于 Tambaqui[4]而高于 Greenlan 鳕鱼[10],与大西洋鳕鱼[8]、鲤鱼[5]和鳊鱼[13-14]等相当。

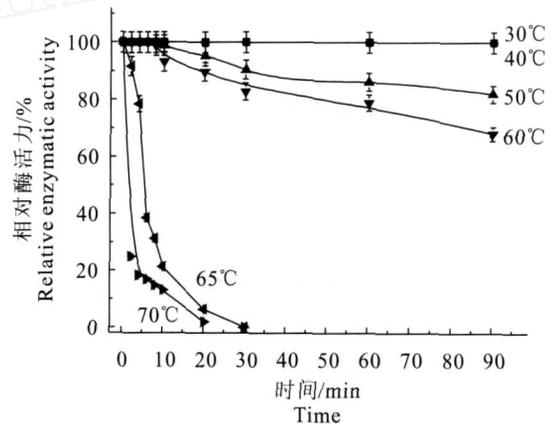


图 10 草鱼肠道 GT-A 的温度稳定性

Fig.10 Temperature stability of the GT-A

的范围内,GT-A 有很好的稳定性,表明在草鱼的实际生理状况下,GT-A 具有良好的稳定性并且能有效发挥作用;GT-A 在碱性条件下较其在酸性条件下具有更好的稳定性。

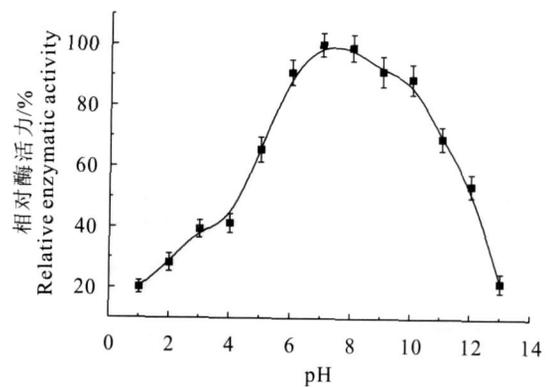


图 12 草鱼 GT-A 在 30 时的 pH 稳定性

Fig.12 pH stability of the GT-A at 30

9.0[4], 鲤鱼为 8.5[5], 鲇鱼为 9.0[7], 鳊鱼为 8.0[13-14], 大西洋鳕鱼为 7.5[8], Greenlan 鳕鱼为 8.5[10]。所有这些酶在 pH 为 6~10 时均有很好的稳定性,但是在生理 pH 条件下的活性均不到其最适

pH 时的 60 %。

### 3 结 论

本试验从草鱼消化道中分离纯化出一种胰蛋白酶(GT-A),该酶在 15 时表现出很高的酶活性,为其最适温度时酶活性的 61 %。GT-A 是一种在低温下能很好发挥水解作用的碱性蛋白酶。同时,在生理 pH 条件下具有很高的水解 BAE 的活性,其活性达到其最适 pH 时活性的 80 % 以上。该酶的这些特性与已经报道的鱼胰蛋白酶有明显不同,由此可以认为,草鱼内脏是一个很好的酶资源。充分研究草鱼消化蛋白酶,不仅可充分利用资源,提高鱼类加工工业的收益,而且可以在很大程度上减少鱼类加工废弃物所造成的环境污染。

#### [参考文献]

- [1] Haard N F. Specialty enzymes from marine organisms[J]. Food Technology, 1998, 52: 64-67.
- [2] De V S, Coppes Z. Marine fish digestive proteases-relevance to food industry and the south-west Atlantic region-A review[J]. J Food Biochem, 1996, 20: 193-214.
- [3] Shahidi F, Janak Kamil Y V A. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry[J]. Trends in Food Sci and Tech, 2001, 12: 435-564.
- [4] Bezerra R S, Santos J F, Paiva P M G, et al. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of Tambaoui (*Colossoma macropomum*) [J]. J Food Biochem, 2001, 25: 199-211.
- [5] Cohen T, Gertler A, Birk Y. pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*): . Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase[J]. Comp Biochem Physiol, 1981, 69B: 639-646.
- [6] Feller G, Payan F, Theys F, et al. Stability and structural analysis of  $\alpha$ -amylase from the Antarctic Psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23[J]. Eur J Biochem, 1994, 222: 441-447.
- [7] 于国英, 朱 莉, 韩志武, 等. 鲑鱼消化道中蛋白酶的分离纯化及其活性研究[J]. 中国海洋药物. 2002, (4): 54-56.
- [8] Simpson B K, Simpson M V, Haard N F. Properties of trypsin from the pyloric caeca of Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. J Food Sci, 1990, 55: 959-961.
- [9] Arunchalam K, Haard N F. Isolation and characterization of pepsin from Polar cod (*Boreogadus saida*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1985, 80B: 467-473.
- [10] Simpson B K, Haard N F. Purification and characterization of trypsin from the Greenland cod, (*Gadus Ogac*) . I. Kinetic and thermodynamic characteristics[J]. Can J Biochem Cell Biol, 1984, 62: 894-900.
- [11] Squires E J, Haard N F, Feltham L A W. Gastric proteases of the Greenland cod *Gadus ogac*. . Isolation and kinetic properties[J]. Biochem Cell Biol, 1986, 64: 676-685.
- [12] Tanji M, Kageyama T, Takahashi K. Tuna pepsinogens and pepsins: purification, characterization and amino-terminal sequences[J]. Eur J Biochem, 1988, 177: 251-259.
- [13] Heu M S, Kim H R, Pyenu J H. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*[J]. Comp Biochem Physiol, 1995, 112B: 557-567.
- [14] Martinez A, Olsen R L, Serra J L. Purification and characterization of two trypsin-like enzymes from the digestive tract of anchovy *Engraulis encrasicolus*[J]. Comp Biochem Physiol, 1988, 91B: 677-684.
- [15] Dimes L E, Haard N F. Estimation of protein digestibility. 3. Studies on the digestive enzymes from the pyloric caeca of rainbow trout and salmon[J]. Comp Biochem Physiol, 1994, 109A: 677-684.
- [16] Jeong Y, Wei C, Preston J F, et al. Purification and characterization of proteases from hepatopancreas of crawfish (*Procambarus clarki*) [J]. J Food Biochem, 2000, 24: 311-332.
- [17] El-Beltagy A E, El-Adawy T A, Rahma E H, et al. Purification and characterization of acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*) [J]. Food Chem, 2004, 86: 33-39.
- [18] Natalia Y, Hashim R, Ali A, et al. Characterization of digestive enzymes in carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (*Osteoglossidae*) [J]. Aquaculture, 2004, 223: 305-320.
- [19] 中国水产信息中心. 水产统计信息[DB/OL]. (2004-09-06). <http://www.fishinfo.cn>, 2004. 9.
- [20] 中山大学生物系生化微生物教研室. 生化技术导论[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [21] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化工出版社, 2005: 624-626.
- [22] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.
- [23] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [24] Blackshear P J. System for Polyacrylamide gel electrophoresis [J]. Meth Enzymol, 1984, 104: 237-255.
- [25] Garcia-Carreño F L, Dimes L E, Haard N F. Substrate- Gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors[J]. Analytical Biochem, 1993, 214: 65-69.
- [26] Raksakulthai R, Haard N F. Purification and characterization of amino peptidase fraction from squid (*Illex Illecebrosus*) [J]. J Food Biochem. 1999, 23: 123-144.