

网络出版时间:2014-12-12 09:30

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.01.032

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20141212.0930.032.html

# 日本鳗鲡肠道蛋白酶的分离纯化及其酶学性质研究

林建城,王国玲,闵志勇

(莆田学院 环境与生物工程学院,福建 莆田 351100)

**[摘要]** 【目的】从日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)肠道中分离纯化蛋白酶并分析其酶学性质,为日本鳗鲡饲料的科学研制提供理论依据。【方法】通过硫酸铵沉淀分级分离及 Sephadex G-100 和 Sephadex G-75 两级凝胶柱层析纯化日本鳗鲡肠道蛋白酶,经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和 SDS-PAGE 鉴定蛋白酶纯度和亚基分子质量,利用凝胶层析法测定酶的分子质量,用等电聚焦电泳法测定酶的等电点,并研究以酪蛋白为底物时蛋白酶催化反应的动力学参数及 pH、温度、金属离子和修饰剂对蛋白酶活力的影响。【结果】日本鳗鲡肠道蛋白酶亚基分子质量为 65.3 ku,酶分子质量为 260.3 ku,等电点为 8.23;该蛋白酶的最适 pH 为 8.2,最适温度为 55 ℃,米氏常数( $K_m$ )为 4.832 mg/mL,最大反应速度( $V_{max}$ )为 0.269 U/min。日本鳗鲡肠道蛋白酶在 pH 为 6.6~9.0 时表现稳定,在 20~55 ℃时具有较好的热稳定性,在 60 ℃以上稳定性迅速下降。 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和  $Hg^{2+}$  对日本鳗鲡肠道蛋白酶的活力表现出不同程度的抑制作用,其中以  $Hg^{2+}$  的抑制作用最强,1 mmol/L  $Hg^{2+}$  可使酶活力丧失 87.63%;而  $Fe^{2+}$  有激活作用,5 mmol/L  $Fe^{2+}$  可使酶活力提高 134.53%。修饰剂 EDTA、对氯汞苯甲酸(pCMB)和 Cys 对酶活力没有影响,苯甲酰基磺酰氟(PMSF)和二硫苏糖醇(DTT)对酶活力则有不同程度的抑制作用。【结论】日本鳗鲡肠道蛋白酶由 4 条相同肽链组成,属于丝氨酸蛋白酶类,二硫键是维持其活性所必需的,酶活力易受环境中酸碱度、温度和金属离子调控。

**[关键词]** 日本鳗鲡;蛋白酶;分离纯化;酶学性质

**[中图分类号]** Q556+.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2015)01-0045-08

## Purification of protease from intestine of *Anguilla japonica* and its enzymatic characteristics

LIN Jian-cheng, WANG Guo-ling, MIN Zhi-yong

(College of Environment & Biological Engineering, Putian University, Putian, Fujian 351100, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study purified protease from intestine of *Anguilla japonica* and investigated its enzymatic characteristics to provide theoretical basis in scientific development of the diet for *Anguilla japonica*. 【Method】 The protease was purified by ammonium sulfate fractionation and Sephadex G-100 and Sephadex G-75 columns. The purity was determined by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE. Enzyme molecular weight was determined by gel chromatography, and isoelectric point was determined by isoelectric focusing method. The kinetic parameters of protease for hydrolysis of casein (enzyme substrate) and effects of 9 ions and modifiers were also determined. 【Result】 The molecular weight of enzyme was 260.3 ku and the molecular of enzyme subunit was 65.3 ku. The isoelectric point value was 8.23. The optimum pH and temperature were 8.2 and 55 ℃, respectively. The  $K_m$  value was 4.832 mg/mL and the  $V_{max}$  value was 0.269 U/min, respectively. The enzyme was stable with pH of 6.6 to 9.0 and temperature of 20—55 ℃. The stability of enzyme dropped rapidly when temperature was  $>60$  ℃.  $Fe^{2+}$  activated the enzyme, and the activity was increased by 134.53%.

**[收稿日期]** 2013-09-09

**[基金项目]** 福建省区域科技重大项目(2009N3002)

**[作者简介]** 林建城(1966—),男,福建莆田人,教授,硕士,主要从事海洋生物酶学研究。E-mail:ptljc660402@sina.com

when the concentration of  $\text{Fe}^{2+}$  was 5 mmol/L.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  showed various degrees of inhibitory effects on the enzyme.  $\text{Hg}^{2+}$  inhibited the enzyme the most, and the enzyme activity decreased by 87.63% when its concentration reached 1 mmol/L. EDTA, p-chloromercuribenzoate and cysteine had no influence on the enzyme, while benzoyl sulfonyl fluoride and dithiothreitol inhibited the enzyme. 【Conclusion】 The protease from intestine of *Anguilla japonica* contained four peptide chains with same mass. The enzyme was a serine proteinase and the disulfide bonds were essential for the active site of protease. The activity of protease was affected easily by acidity-alkalinity, temperature and metal ions.

**Key words:** *Anguilla japonica*; protease; purification; enzymatic characteristics

日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)又称河鳗,隶属于鳗鲡目鳗鲡科,经济价值高,是福建、广东等南部省份的主要养殖鱼类之一。鳗鲡是一种广盐性鱼类,在海水中繁殖、淡水中生长。幼鳗摄食水中的挠足类幼虫、水蚤及小虾等,成鳗则以小鱼虾、水生昆虫为食,人工饲养条件下,则主要摄食人工配合饲料。

随着鳗鲡养殖业的发展,鳗鲡饲料种类繁多,可分为单一饲料、配合饲料和混合饲料等几种。单一饲料中有的以供能为主,如以蛋白质为主的单一饲料中蛋白质含量在 50% 左右;有的以供给矿物质或维生素等为主。配合饲料则是由饲料添加剂、蛋白质饲料、矿物质饲料和能量饲料等不同类别的营养组配而成,是营养价值完全的饲料产品。而与配合饲料相比,混合饲料中一般缺乏如微量元素、合成氨基酸、维生素和抗氧化剂等饲料添加剂。各种饲料均可能对鳗鲡蛋白酶的消化生理产生影响,而消化道蛋白酶活力的变化又会直接影响鳗鲡的生长发育及其对饲料的利用。目前,已有研究者就不同养殖模式、生长阶段、饲料和养殖环境等<sup>[1-4]</sup>对鳗鲡消化道蛋白酶活性的影响进行了研究。王志铮等<sup>[1]</sup>研究了池塘专养、日本沼虾套养以及水库放养等 3 种养殖模式对日本鳗鲡脏器消化酶的影响,发现以池塘专养养殖方式(属“饱食寡动型”的摄食方式)养殖的鳗鲡,其肝脏、肠、胰腺和胃的蛋白酶活力大,而以水库放养方式(属“寡食追逐型”的摄食方式)养殖的日本鳗鲡相应脏器的蛋白酶活力均较小。Chiu 等<sup>[2]</sup>比较研究了 2 个不同生长阶段日本鳗鲡胃蛋白酶活力,结果表明幼鳗胃蛋白酶活力比成鳗高 1.5~2.0 倍。陈度煌等<sup>[3]</sup>研究了不同饲料对莫桑比克鳗鲡(*Anguilla mossambica*)消化酶活性的影响,发现添加动物性蛋白饲料饲喂的鳗鲡胃蛋白酶活性整体较强,证明肉食性鱼类的消化道蛋白酶活性较杂食性和草食性鱼类强。此外,有关饲料对其他鱼类蛋白酶活力的影响也有较深入的研究。高梅等<sup>[5]</sup>研究发

现,南方鲇(*Silurus meridionalis* Chen)摄取碳水化合物饲料后,幼鱼胰蛋白酶活性显著提高,说明碳水化合物饲料会引起南方鲇蛋白酶活性的改变。而贾景涛等<sup>[6]</sup>研究表明,罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肠道蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶对饲料镉的敏感程度不同,饲料镉对蛋白酶具有较强的抑制作用。虽然这些研究为鳗鲡饲料的合理配制与使用提供了一定的借鉴,但目前尚未见关于日本鳗鲡肠道蛋白酶分离纯化及其酶学性质的研究报道。为此,本试验以日本鳗鲡肠道为原料提取蛋白酶,并研究其酶学性质,旨在为日本鳗鲡饲料的合理研制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

日本鳗鲡来自莆田市东源食品有限公司,选择体长( $43 \pm 2$ ) cm 的无病害活鳗 30 条,停食 24 h 后解剖,剔除肝脏、脂肪等附着物,取其小肠部分,清洗沥干后,将每条日本鳗鲡小肠装入一样品袋,于  $-18^\circ\text{C}$  下冷冻贮存,待用。

Sephadex G-200、G-100 和 G-75 均为 Pharmacia 产品;牛血清蛋白为标准蛋白;电泳使用的标准蛋白(19~117 ku)及测定蛋白酶分子质量使用的甲状腺球蛋白(TRG 670.0 ku)、 $\lambda$  球蛋白(GBL 150.0 ku)、牛白蛋白(BSA 67.0 ku)、鸡卵蛋白(OA 45.0 ku)和辣根过氧化物酶(HRP 44.0 ku)、DH020-1 载体两性电解质,均为天根生化科技有限公司出品;对氯汞苯甲酸(pCMB)和苯甲酰基磺酰氟(PMSF)为 Sigma 产品;二硫苏糖醇(DTT)和半胱氨酸(Cys)等其他试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 蛋白酶的分离纯化 随机取 3 袋日本鳗鲡小肠,解冻后切成 1 cm 小段,从每个样品袋中等量取样,共 150 g,加入 450 mL 预冷的 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5),10 000 r/min 下捣碎匀

浆 1 min, 4 ℃ 抽提 4 h 以上,  $30\,000\times g$  冷冻离心 30 min, 取上清液。依次采用体积分数 30% 和 70% 饱和硫酸铵分级分离酶蛋白, 收集沉淀物透析后冷冻离心 ( $45\,000\times g$ ) 30 min, 得粗酶制剂。再分别经过 Sephadex G-100 和 G-75 分子筛凝胶柱 (柱规格均为  $2.6\text{ cm}\times 60\text{ cm}$ ) 层析纯化。2 个柱层析的洗脱液均为 0.075 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 0.2 mol/L NaCl), Sephadex G-100 柱层析流速为 0.4 mL/min, 自动部分收集器收集流出液, 按每管 4 mL 收集, 收集 80 管, 集中有酶活力的收集管, 收集液用于 Sephadex G-75 柱层析; Sephadex G-75 柱层析流速为 0.5 mL/min, 每管收集 5 mL, 同样收集 80 管, 集中有酶活力的收集管, 收集液用于酶蛋白的纯度鉴定和酶学性质研究。

蛋白浓度测定采用 Bradford<sup>[7]</sup> 的方法进行, 以牛血清蛋白为标准蛋白; 分离纯化过程中, 各收集管内溶液蛋白浓度以波长 280 nm 处紫外吸收的吸光度 ( $OD_{280\text{ nm}}$ ) 表示。

采用 SDS-PAGE 测定蛋白酶亚基的相对分子质量, 采用 10.0% 分离胶和 3.0% 浓缩胶进行电泳, 使用考马斯亮蓝 R250 染色, 确定酶的纯度。从 SDS-PAGE 电泳图谱求各标准蛋白的相对迁移率, 以各标准蛋白的迁移率 (以变量  $x$  表示) 与相应分子质量的对数 (以变量  $y$  表示) 作图, 回归方程为:  $y = -2.216x + 5.460$ 。

**1.2.2 蛋白酶活力的测定** 蛋白酶活力测定参照文献[8]的方法进行。在 2 mL 测定体系中加入体积分数 2% 酪蛋白底物 0.5 mL、0.075 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 0.5 mL、双蒸馏水 0.95 mL 及酶液 50  $\mu\text{L}$ , 55 ℃ 下反应 20 min, 加入 3 mL 质量分数 5% 的三氯乙酸 (TCA) 终止反应,  $3\,000\text{ r/min}$  离心 10 min, 取上清液在 Beckman DU2650 型紫外分光光度计上测定其  $OD_{280\text{ nm}}$ 。以先加质量分数为 5% 的三氯乙酸 (TCA)、后加酶液为空白对照。将 1 个酶活力单位 (U) 定义为: 每 min 产生 1  $\mu\text{mol/L}$  酪氨酸所需要的酶量。酶比活力的单位为 U/mg。

**1.2.3 蛋白酶的酶学性质** 1) 分子质量的测定。采用 Sephadex G-200 凝胶层析法<sup>[9]</sup> (柱规格为  $2.6\text{ cm}\times 60\text{ cm}$ ), 选用甲状腺球蛋白、 $\lambda$  球蛋白、牛白蛋白和鸡卵蛋白及辣根过氧化物酶 5 种标准蛋白, 以 5 种标准蛋白的洗脱体积对蛋白质分子质量的对数作图, 绘制标准曲线; 根据待测纯酶的洗脱体积, 求算蛋白酶的分子质量。

2) 等电点的测定。采用等电点聚焦电泳法<sup>[9]</sup> 测

定。

**1.2.4 pH 对蛋白酶活力的影响** 测定不同 pH (3.6, 4.0, 5.0, 5.6, 5.8, 6.0, 6.6, 7.0, 7.4, 7.8, 8.0, 8.2, 8.6, 9.0, 9.4, 10.0, 10.6) 时的蛋白酶活力, 确定其最适 pH。其中 pH 为 3.0~7.0 时选择柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液, pH 为 7.4~8.6 时使用 Tris-HCl 缓冲液, pH 为 9.0~10.6 时使用甘氨酸-NaOH 缓冲液, 缓冲液浓度均为 0.15 mol/L。然后将酶液分别与各种缓冲液混合, 4 ℃ 下处理 1 h, 在最适 pH 下测定酶活力, 分析蛋白酶的酸碱稳定性。以试验组最大酶活力为 100%, 其他试验组以相对酶活力表示。

**1.2.5 温度对蛋白酶活力的影响** 检测不同温度 (20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 ℃) 下蛋白酶的活力, 确定其最适温度。再将蛋白酶液置于不同温度下处理 1 h, 然后取 50  $\mu\text{L}$  处理过的酶, 在最适温度下检测其酶活力, 分析酶的温度稳定性。以试验组最大酶活力为 100%, 其他试验组以相对酶活力表示。

**1.2.6 金属离子和修饰剂对蛋白酶活力的影响** 在蛋白酶活力的测定体系中, 分别加入  $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{BaCl}_2$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  和  $\text{ZnSO}_4$ , 使其最终浓度为 100 mmol/L, 或者加入 1 mmol/L  $\text{HgCl}_2$  或 5 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ , 测定加入各金属离子后的蛋白酶活力。再以同样的方法分别加入 10 mmol/L DTT、0.1 mmol/L PMSF、10 mmol/L pCMB、10 mmol/L Cys 和 100 mmol/L EDTA 修饰剂, 测定加入修饰剂后的蛋白酶活力。以未添加金属离子和修饰剂的对照组酶活力为 100%, 测定各试验组的相对酶活力。

**1.2.7 蛋白酶水解底物酪蛋白的动力学分析** 在蛋白酶活力测定体系中, 改变酪蛋白底物的质量浓度, 测定底物质量浓度分别为 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 4.5, 5.0 mg/mL 时的酶活力, 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求取蛋白酶的米氏常数 ( $K_m$ ) 和最大反应速度 ( $V_{\max}$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 日本鳗鲡肠道蛋白酶的分离纯化

日本鳗鲡肠道经匀浆抽提, 用体积分数 30% 和 70% 饱和硫酸铵分级分离、透析离心后得到蛋白酶粗酶制剂, 经过 Sephadex G-100 分子筛柱层析分离纯化, 出现 3 个蛋白质吸收峰 (图 1), 但只有第 2 个蛋白峰周围具有蛋白酶活性, 收集酶活力峰; 再经

Sephadex G-75 分子筛柱层析分离, 去除杂蛋白, 只出现 1 个蛋白峰(图 2), 收集酶活力峰, 最终得到纯化倍数为 18.12、酶比活力为 104.01 U/mg 的蛋白酶制剂。由表 1 的各步分离纯化结果可知, 每经一

步纯化, 收集到的蛋白酶比活力不断提高, 纯化倍数不断增大, 说明纯化过程中杂蛋白逐渐被去除, 纯化倍数较高, 最终蛋白酶得率达到 42.01%, 说明该纯化方案有效可行。

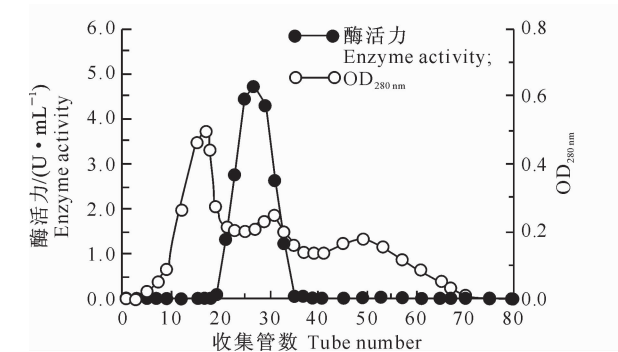


图 1 日本鳗鲡肠道蛋白酶经 Sephadex G-100 层析的洗脱曲线

Fig. 1 Column chromatography of protease from intestine of *Anguilla japonica* on Sephadex G-100 column

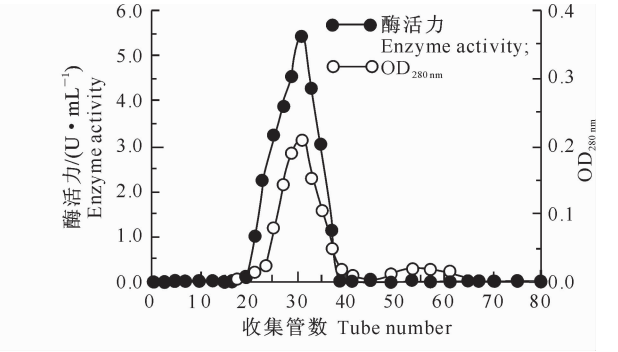


图 2 日本鳗鲡肠道蛋白酶经 Sephadex G-75 层析的洗脱曲线

Fig. 2 Column chromatography of protease from intestine of *Anguilla japonica* on Sephadex G-75 column

表 1 日本鳗鲡肠道蛋白酶的分离纯化

Table 1 Purification of protease from intestine of *Anguilla japonica*

| 纯化步骤<br>Purification steps                                                          | 总蛋白量/mg<br>Total protein | 酶活力/<br>(U · mL <sup>-1</sup> )<br>Enzyme activity | 总酶活力/U<br>Total activity | 酶比活力/<br>(U · mg <sup>-1</sup> )<br>Specific activity | 纯化倍数<br>Purification (fold) | 得率/%<br>Yield |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------|
| 粗酶液 Crude extract                                                                   | 55.38                    | 1.81                                               | 317.85                   | 5.74                                                  | 1.00                        | 100.00        |
| 体积分数 30% 饱和硫酸铵盐析上清液<br>30% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fraction | 32.26                    | 2.22                                               | 273.82                   | 8.23                                                  | 1.43                        | 86.15         |
| 体积分数 70% 饱和硫酸铵盐析透析液<br>70% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fraction | 21.58                    | 2.77                                               | 249.72                   | 11.57                                                 | 2.02                        | 78.57         |
| 葡聚糖凝胶 G-100 层析<br>Sephadex G-100 fraction                                           | 7.75                     | 2.29                                               | 193.95                   | 25.02                                                 | 4.36                        | 61.02         |
| 葡聚糖凝胶 G-75 层析<br>Sephadex G-75 fraction                                             | 1.28                     | 2.74                                               | 133.53                   | 104.01                                                | 18.12                       | 42.01         |

纯化后的蛋白酶制剂经 PAGE 鉴定为单一蛋白质成分(图 3-A), 说明该酶制剂达到电泳纯要求。SDS-PAGE 电泳检测结果(图 3-B)表明, 分离纯化获得了单一的日本鳗鲡肠道纯蛋白酶制剂。

根据蛋白酶的相对迁移率, 求得蛋白酶亚基分子质量为 65.3 ku。单一的日本鳗鲡肠道纯蛋白酶通过凝胶柱层析后的洗脱体积为 104.5 mL, 蛋白酶的分子质量为 260.3 ku, 等电点为 8.23。

2.2 pH 对日本鳗鲡肠道蛋白酶活力的影响

图 4 显示, pH 值对日本鳗鲡肠道蛋白酶酶活力的影响呈钟罩型曲线变化, 蛋白酶最适 pH 值为 8.2。为分析该蛋白酶的酸碱稳定性, 将其在不同 pH 下处理 1 h 后, 结果表明蛋白酶在 pH 6.6~9.0 区域内相对稳定, 经 pH 10.0 缓冲液处理后相对酶活力仅有 10.1%, 而在 pH 6.0 以下处理 1 h 后酶失活加速, 说明该蛋白酶对酸、碱均比较敏感。

2.3 温度对日本鳗鲡肠道蛋白酶活力的影响

由图 5 可见, 日本鳗鲡肠道蛋白酶催化酪蛋白水解的最适温度为 55 ℃, 温度升高到 65 ℃ 以后酶活力迅速下降, 温度达 80 ℃ 时酶活力仅有 13.8%。进一步考察蛋白酶在不同温度下处理 1 h 后的酶活

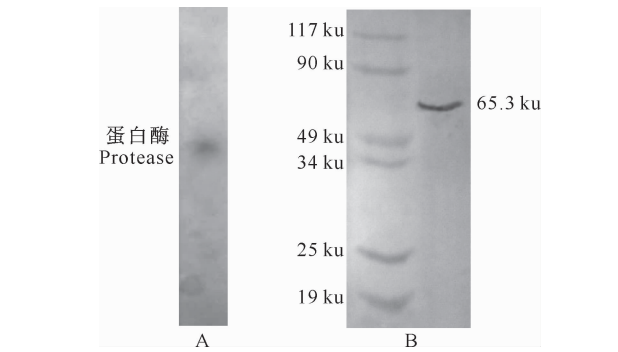


图 3 日本鳗鲡肠道蛋白酶的 PAGE(A) 及 SDS-PAGE(B) 电泳图谱

Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (lane A) and SDS-PAGE (lane B) of the purified protease from intestine of *Anguilla japonica* (*M<sub>w</sub>* molecular weight)

力,结果表明,在 20~55 ℃ 处理 1 h 后相对酶活力还保持在 82% 以上,表明日本鳗鲡肠道蛋白酶在此温度区间具有较好的热稳定性;但在 70 ℃ 下处理 1

h 相对酶活力仅为 16.1%,90 ℃ 下处理 1 h 后酶接近失活。

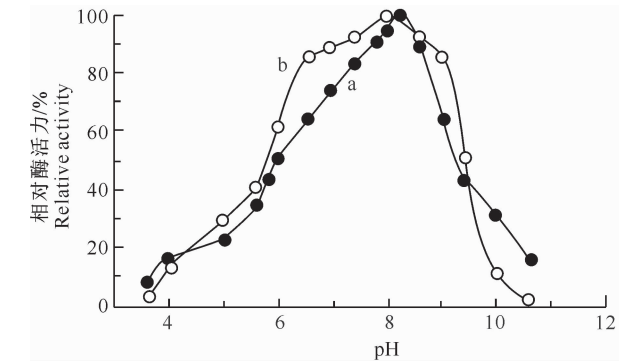


图 4 pH 对日本鳗鲡肠道蛋白酶活力的影响  
(a) 最适 pH;(b) 酸碱稳定性  
Fig. 4 Effects of pH on the activity of protease from intestine of *Anguilla japonica*  
(a) Optimum pH;(b) pH stability

2.4 金属离子和修饰剂对日本鳗鲡肠道蛋白酶活力的影响

从表 2 可知,在本试验条件下,100 mmol/L 的  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  可分别使日本鳗鲡肠道蛋白酶活力丧失 3.64%,28.80%,43.30%,45.80%,57.04%,92.42% 和 96.20%; $Fe^{2+}$  对酶活力有较强的激活作用,5 mmol/L  $Fe^{2+}$  可使酶活力提高 134.53%; $Hg^{2+}$  对蛋白酶有强烈的抑制作用,1 mmol/L  $Hg^{2+}$  可使酶活力丧失 87.63%。上述结果说明,除了  $Fe^{2+}$  外,其余 8 种金属离子对日本鳗鲡肠道蛋白酶活力均有不同程度的抑制作用, $Mg^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  对蛋白酶活力影响较小,重

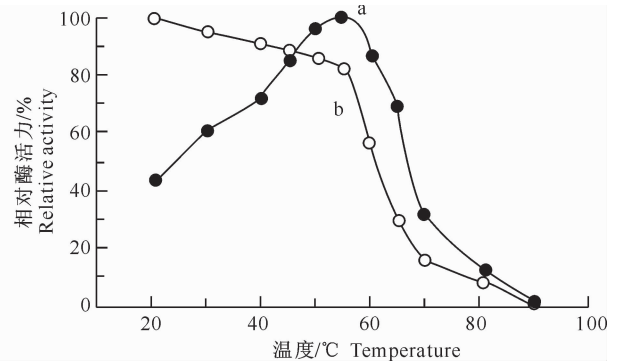


图 5 温度对日本鳗鲡肠道蛋白酶活力的影响  
(a) 最适温度;(b) 热稳定性  
Fig. 5 Effects of temperature on the activity of protease from intestine of *Anguilla japonica*  
(a) Optimum temperature;(b) Temperature stability

金属离子  $Cu^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  对蛋白酶的抑制作用较强, $Hg^{2+}$  的抑制作用最强。从表 2 还可知,金属蛋白酶类抑制剂 EDTA 对蛋白酶活力没有影响,说明日本鳗鲡肠道蛋白酶的活性中心不含金属离子,属非金属蛋白酶;巯基修饰剂 pCMB 和巯基化合物 Cys 对蛋白酶活性几乎无影响,说明日本鳗鲡肠道蛋白酶不是巯基蛋白酶;DTT 与 PMSF 对日本鳗鲡肠道蛋白酶均表现出不同程度的抑制作用,其中 PMSF 的抑制作用最强。由于 PMSF 是丝氨酸蛋白酶抑制剂,DTT 是二硫键的修饰剂,说明日本鳗鲡肠道蛋白酶是一种丝氨酸蛋白酶,二硫键对蛋白酶活性的维持是必需的。

表 2 9 种金属离子和 5 种修饰剂对日本鳗鲡肠道蛋白酶活力的影响  
Table 2 Effects of metal ions and modifiers on the activity of protease from intestine of *Anguilla japonica*

| 化合物<br>Compounds                | 浓度/<br>(mmol · L <sup>-1</sup> )<br>Concentration | 相对酶活力/%<br>Relative<br>activity | 化合物<br>Compounds  | 浓度/<br>(mmol · L <sup>-1</sup> )<br>Concentration | 相对酶活力/%<br>Relative<br>activity |
|---------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------|
| 对照 Control                      | —                                                 | 100.00                          | HgCl <sub>2</sub> | 1                                                 | 12.37±2.43                      |
| MgCl <sub>2</sub>               | 100                                               | 96.36±0.83                      | FeSO <sub>4</sub> | 5                                                 | 234.53±6.58                     |
| CaCl <sub>2</sub>               | 100                                               | 71.20±2.36                      | DTT               | 10                                                | 73.08±1.53                      |
| CoCl <sub>2</sub>               | 100                                               | 56.70±2.28                      | PMSF              | 0.1                                               | 0.00±0.00                       |
| BaCl <sub>2</sub>               | 100                                               | 54.20±2.91                      | pCMB              | 10                                                | 99.88±0.13                      |
| MnCl <sub>2</sub>               | 100                                               | 42.96±3.02                      | Cys               | 10                                                | 99.92±0.52                      |
| Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 100                                               | 7.58±1.56                       | EDTA              | 100                                               | 100.02±0.25                     |
| ZnSO <sub>4</sub>               | 100                                               | 3.80±1.01                       |                   |                                                   |                                 |

2.5 日本鳗鲡肠道蛋白酶水解底物酪蛋白的动力学分析

在蛋白酶水解底物酪蛋白质量浓度 1.5~5.0 mg/mL 时,测定日本鳗鲡肠道蛋白酶的活力,通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,以底物质量浓度的

倒数(y)与反应速度的倒数(x)作图,回归得到直线方程为  $y=17.965x+3.718$ ,求得蛋白酶的米氏常数( $K_m$ )为 4.832 mg/mL,最大反应速度( $V_{max}$ )为 0.269 U/min。

### 3 讨 论

本试验结果表明,日本鳗鲡小肠蛋白酶亚基分子质量为 65.3 ku,而其蛋白酶分子质量为 260.3 ku,由此可以推断,日本鳗鲡蛋白酶可能由 4 条相同肽链组成。不同鱼类蛋白酶亚基组成及其大小不同。黄鳝(*Monopterus albus* Zuiew)<sup>[10]</sup>和大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L.)<sup>[11]</sup>肠道蛋白酶亚基分子质量分别为 25.5 和 58 ku,而青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)<sup>[12]</sup>和星鲨(*Mustelus mustelus*)<sup>[13]</sup>胰蛋白酶亚基分子质量分别为 44 和 24 ku,黄鳝肠道蛋白酶和青鱼胰蛋白酶均由 1 条肽链组成,说明日本鳗鲡肠道蛋白酶亚基组成数量较多,相对分子质量也较大。

本试验结果表明,日本鳗鲡肠道蛋白酶是一种丝氨酸蛋白酶,而胰蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶家族的消化酶,因此推断日本鳗鲡肠道蛋白酶应是一种胰蛋白酶。黄鳝<sup>[10]</sup>内脏蛋白酶和奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)<sup>[14]</sup>肠道胰蛋白酶也是丝氨酸蛋白酶,而大菱鲆<sup>[11]</sup>肠道蛋白酶是一种巯基蛋白酶,青鱼<sup>[12]</sup>胰蛋白酶则是一种金属蛋白酶。

本研究结果表明,日本鳗鲡肠道蛋白酶的最适反应 pH 为 8.2,在 pH 6.6~9.0 内可以保持较高活性,等电点偏碱性,因此推测其为碱性蛋白酶。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)<sup>[15]</sup>和北极沙丁鱼(*Sardinella aurita*)<sup>[16]</sup>胰蛋白酶(A、B、C)最适 pH 均为 9.0,星鲨<sup>[13]</sup>和新金枪鱼(*Thunnus tonggol*)<sup>[17]</sup>胰蛋白酶最适 pH 则是 8.5,而暗纹东方鲀(*Fugu obscurus*)<sup>[18]</sup>胃蛋白酶最适 pH 为 2.5;Chiu 等<sup>[2]</sup>研究了日本鳗鲡幼鳗和成鳗的 2 种胃蛋白酶 P I 和 P II,P I 在幼鳗和成鳗中的最适 pH 分别为 1.5 和 2.5,P II 在幼鳗和成鳗中的最适 pH 均为 3.5,2 种胃蛋白酶的最适 pH 均偏酸性。本研究中,日本鳗鲡肠道蛋白酶在 pH 6.6~9.0 内稳定,在 pH 8.6 下处理 1 h 后,蛋白酶活力还有 91.7%;但在 pH 10.0 的缓冲液中处理 1 h 后,蛋白酶活力只有 10.1%。日本鳗鲡成鳗适宜在 pH 7.2~9.0 的水体中生长<sup>[19]</sup>,与星鲨<sup>[13]</sup>胰蛋白酶的稳定酸碱度(pH 7.0~9.0)相近。黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacores*)<sup>[20]</sup>胰蛋白酶(A、B)在 pH 6~11 内稳定;青鱼<sup>[12]</sup>胰蛋白酶也具有耐碱性,在 pH 7~10 下放置 5 h 之后仍然有 80% 以上的活力;黄鳝<sup>[10]</sup>肠道蛋白酶是耐碱蛋白酶,在 pH 12 下室温处理 5 h,活力还有 55%。而樊海平等<sup>[21]</sup>发现,在 20 °C 水体中,双色

鳗鲡(*Anguilla bicolor*)适宜生长的 pH 为 4.0~9.0,体现出更强的耐酸能力。

桂远明等<sup>[22]</sup>研究报道,鲢、鳙、草鱼、鲤鱼肠和肝胰脏蛋白酶较适温度为 45~55 °C。另有研究表明,美洲鳗<sup>[4]</sup>肝胰脏蛋白酶的最适温度则为 50 °C,草鱼<sup>[15]</sup>酸性蛋白酶的最适温度为 37 °C,新金枪鱼<sup>[17]</sup>胰蛋白酶的最适温度则为 65 °C,而斑点叉尾鲷鱼(*Ictalurus punctatus*)<sup>[23]</sup>胰蛋白酶(A)和北极沙丁鱼<sup>[16]</sup>内脏胰蛋白酶(A、C)的最适温度均为 55 °C,与本试验中日本鳗鲡肠道蛋白酶的最适温度相同。

不同鱼类蛋白酶的热稳定性不同。大菱鲆<sup>[11]</sup>蛋白酶在 60 °C 时保温 30 min 后酶活力完全丧失,青鱼<sup>[12]</sup>胰蛋白酶在 55 °C 条件下水浴 1 h,活力仅有 20%。本研究表明,日本鳗鲡肠道蛋白酶在 55 °C 下处理 1 h 后,酶活力还有 82.1%,说明日本鳗鲡蛋白酶具有较好的热稳定性。鱼类栖息水域的温度一般较鱼蛋白酶的最适温度低,有研究发现日本鳗鲡生长的适宜水温为 13~30 °C<sup>[19]</sup>。本研究于离体条件下测定的日本鳗鲡肠道蛋白酶的较适温度并不在此范围内,原因可能是自然水温下生长的鳗鲡肠道蛋白酶由于对底物进行了较长时间的酶解作用,导致酶最适温度下降,以适应其生存的水环境。所以离体条件下测定的酶最适温度会出现偏差,今后应着重研究饲养水温对日本鳗鲡消化道蛋白酶活力的影响。

本试验结果还表明,Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>等 8 种金属离子对日本鳗鲡肠道蛋白酶均有不同程度的抑制作用,而 Fe<sup>2+</sup> 却表现出较大的激活作用,这与叶玫等<sup>[24]</sup>有关 Mg<sup>2+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 对鳗鲡蛋白酶有一定激活作用的研究结果不同。此外,Cu<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 能显著抑制大菱鲆<sup>[11]</sup>的肠蛋白酶活性,而 Mn<sup>2+</sup> 对其又有明显的激活作用;Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 对暗纹东方鲀<sup>[18]</sup>蛋白酶有明显的激活作用,Zn<sup>2+</sup> 和 Fe<sup>2+</sup> 对该酶又表现出抑制作用;于国英等<sup>[25]</sup>研究表明,Mg<sup>2+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 对鲈鱼消化道蛋白酶有激活作用,但 Cu<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup> 和 Hg<sup>2+</sup> 对其又表现为抑制作用。说明水中的金属离子及配合饲料中添加的矿物质均可对蛋白酶活力产生影响,因此在配合饲料中添加矿物质时要注意控制添加量,以免使鳗鲡肠道蛋白酶的活性降低,影响其对蛋白质的消化与吸收。目前对鳗鲡配合饲料中微量元素的添加量尚无系统研究<sup>[26]</sup>,具体的添加量应根据饲养试验来进一步确定。

## [参考文献]

- [1] 王志铮,赵 晶,杨 磊,等. 三种养殖模式下日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)养成品血清生化指标和脏器消化酶、抗氧化酶活力的差异 [J]. 海洋与湖沼,2013,44(2):403-408.  
Wang Z Z,Zhao J,Yang L,et al. Variations of serum biochemical indices, viscera digestive enzymes activity and antioxidant enzyme activity of three cultured population of *Anguilla japonica* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica,2013,44(2):403-408. (in Chinese)
- [2] Chiu S T,Pan B S. Digestive protease activities of juvenile and adult eel(*Anguilla japonica*) fed with floating feed [J]. Aquaculture,2002,205(1/2):141-156.
- [3] 陈度煌,林建斌,朱庆国,等. 不同饲料对莫桑比克鳗鲡消化酶活性的影响 [J]. 饲料工业,2010,31(12):17-19.  
Chen D H,Lin J B,Zhu Q G,et al. Effects of different dietary on the digestive enzyme activities to *Anguilla mossambica* [J]. Feed Industry,2010,31(12):17-19. (in Chinese)
- [4] 王 琨,叶继丹. 不同温度、pH 值对鳗鱼消化道蛋白酶和淀粉酶活性的影响 [J]. 安徽农业科学,2007,35(33):10727-10729.  
Wang K,Ye J D. Effects of different temperatures and pH on the protease and amylase activities in the digestive tract of *Anguilla rostrata* [J]. Journal of Anhui Agriculture Science,2007,35(33):10727-10729. (in Chinese)
- [5] 高 梅,罗毅平,曹振东. 饲料碳水化合物对南方鲂幼鱼消化酶活性的影响 [J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2006,21(2):119-123.  
Gao M,Luo Y P,Cao Z D. Effect of dietary carbohydrate on digestive enzyme activities in southern catfish(*Silurus meridionalis* Chen) juveniles [J]. Journal of Southwest China Normal University:Natural Science,2006,21(2):119-123. (in Chinese)
- [6] 贾景涛,翟少伟,阙炳根. 不同水平饲料镉对罗非鱼生长性能和肠道消化酶活性影响的研究 [J]. 农学报,2012,2(10):58-61.  
Jia J T,Zhai S W,Que B G. Effects of different level of dietary Cd on growth and digestive enzyme activities to tilapia(*Oreochromis niloticus*) [J]. Journal of Agriculture,2012,2(10):58-61. (in Chinese)
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitivity method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. Analytical Biochemistry,1976,72(2):248-254.
- [8] 施特尔夫马赫 B. 酶的测定手册 [M]. 钱嘉洲,译. 北京:中国轻工业出版社,1992:253-254.  
Stellmach B. Manual for determination of enzyme activity [M]. Qian J Y, translation. Beijing: China Light Industry Press,1992:253-254. (in Chinese)
- [9] Xie X L,Chen Q X,Lin J C,et al. Purification and some properties of  $\beta$ -N-Acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) [J]. Marine Biology,2004,146:143-148.
- [10] 江信红,唐云明. 黄鳝肠道蛋白酶的分离纯化及其性质 [J]. 中国水产科学,2005,12(3):329-335.  
Jiang X H,Tang Y M. Isolation, purification and some properties of *Monopterus albus* Zuiew protease [J]. Journal of Fishery Sciences of China,2005,12(3):329-335. (in Chinese)
- [11] 王海英,薛长湖,孙 谧,等. 大菱鲷肠道蛋白酶的分离纯化及性质的初步研究 [J]. 水产学报,2005,29(5):624-629.  
Wang H Y,Xue C H,Sun M,et al. Preliminary study on purification and partial characterization of the intestine protease from *Scophthalmus maximus* L. [J]. Journal of Fisheries of China,2005,29(5):624-629. (in Chinese)
- [12] 陈荣昌,杜泓璇,马 尧,等. 青鱼胰蛋白酶的分离纯化及部分性质研究 [J]. 安徽农业科学,2008,36(11):4541-4543,4549.  
Chen R C,Du H X,Ma Y,et al. Study on the isolation and purification of trypsinase from *Mylopharyngodon piceus* and its properties [J]. Journal of Anhui Agriculture Science,2008,36(11):4541-4543,4549. (in Chinese)
- [13] Bougateg A,Balti R,Nasri R,et al. Biochemical properties of anionic trypsin acting at high concentration of NaCl purified from the intestine of a carnivorous fish: Smooth hound(*Mustelus mustelus*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2010,58(9):5763-5769.
- [14] Wang Q,Gao Z X,Zhang N,et al. Purification and characterization of trypsin from the intestine of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*  $\times$  *O. aureus*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2010,58(1):655-659.
- [15] Liu Z Y,Wang Z, Zhang J. An acidic protease from the grass carp intestine(*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology,2008,149(1):83-90.
- [16] Ben Khaled H,Jellouli K,Souissi N,et al. Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle(*Sardinella aurita*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry,2011,37(1):123-133.
- [17] Klomklao S,Benjaku S,Visessanguan W,et al. Purification and characterization of trypsin from the spleen of tongol tuna (*Thunnus tonggol*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2006,54(15):5617-5622.
- [18] 张继平,郭照良,唐冬生,等. 暗纹东方鲀胃蛋白酶的分离纯化及部分性质研究 [J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2004,30(6):526-529.  
Zhang J P,Guo Z L,Tang D S,et al. Purification and property of stomach proteinase from *Fugu obscurus* [J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences,2004,30(6):526-529. (in Chinese)
- [19] 郑建平. 日本鳗鲡的生物学特征及人工饲养技术 [J]. 江西农业科技,1995(4):39-42.  
Zheng J P. Biological characteristics and artificial rearing technique of *Anguilla japonica* [J]. Jiangxi Agricultural Science & Technology,1995(4):39-42. (in Chinese)
- [20] Klomklao S,Benjaku S,Visessanguan W,et al. Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology,2006,144(1):47-56.

[21] 樊海平,林 煜,廖碧钗,等. 双色鳊鲮玻璃鳊对温度、盐度和 pH 的耐受性研究 [J]. 福建农业学报,2012,27(9):965-967. Fan H P, Lin Y, Liao B C, et al. Study on the tolerance of *Anguilla bicolor* to water temperature, salinity and pH [J]. Fujian Journal of Agricultural Science, 2012, 27(9):965-967. (in Chinese)

[22] 桂远明,吴 垠,刘焕亮,等. 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,1993,7(4):1-8. Gui Y M, Wu Y, Liu H L, et al. The effect of temperature on the main digestive enzyme activities of grass carp, common carp, silver carp and bighead carp [J]. Journal of Dalian Fisheries College, 1993, 7(4):1-8. (in Chinese)

[23] 黄丽洋,丁建君,姜 山,等. 斑点叉尾鲷鱼肠蛋白酶的分离纯化及其酶学性质 [J]. 大连海洋大学学报,2012,27(1):83-85. Huang L Y, Ding J J, Jiang S, et al. Purification and characterization of protease from intestines of *Ictalurus punctatus* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(1):83-85. (in Chinese)

[24] 叶 玫,吴成业,王 勤,等. 鳊鲮消化道蛋白酶的初步分离提取及某些性质的研究 [J]. 海洋学报,2000,22(3):132-136. Ye M, Wu C Y, Wang Q, et al. Rough extraction and some properties of proteinase from digestive tube of eel [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2000, 22(3):132-136. (in Chinese)

[25] 于国英,朱 莉,韩志武,等. 鲈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. Yu G Y, Zhu L, Han Z W, et al. Study on the isolation, purification and its properties of the protease from the alimentary canal of *Pneumatophorus japonicas* [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2002(4):54-56. (in Chinese)

[26] 林建斌. 对当前鳊鱼配合饲料生产若干问题的探讨 [J]. 台湾海峡,1996,15(S1):67-70. Lin J B. Some points on current production of compound feed [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 1996, 15(S1):67-70. (in Chinese)

(上接第 44 页)

[22] 胡永娜,王之盛,李爱科. 固态发酵菜籽粕对肉仔鸡生长性能、免疫功能及消化酶活性的影响 [J]. 动物营养学报,2012,24(7):1293-1301. Hu Y N, Wang Z S, Li A K. Effects of solid-state fermented rapeseed meal on growth performance, immune function and digestive enzyme activity of broilers [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(7):1293-1301. (in Chinese)

[23] 徐基利,许 丽. 小肽在动物营养中的作用及研究趋势 [J]. 饲料工业,2011,32(8):59-62. Xu J L, Xu L. Function and research tendency of small peptide in animal nutrition [J]. Feed Industry, 2011, 32(8):59-62. (in Chinese)

[24] 丁小玲,李吕木,许发芝,等. 固态发酵菜籽粕替代膨化豆粕对断奶仔猪生长性能及血清生化指标的影响 [J]. 中国农业大学学报,2011,16(4):107-112. Ding X L, Li L M, Xu F Z, et al. Effects of solid-state fermented rapeseed meal replacing expanding soybean meal on the growth performance and the blood biochemical parameters in weaned piglets [J]. Journal of China Agricultural University, 2011, 16(4):107-112. (in Chinese)

[25] Feng J, Liu X, Xu Z, et al. Effects of *Aspergillus oryzae* 3.042 fermented soybean meal on growth performance and plasma biochemical parameters in broilers [J]. Animal Feed Science and Technology, 2007, 134(3):235-242.

[26] Maga J A, Yamaguchi S. Flavor potentiators [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1983, 18(3):231-312.

[27] Davidek J, Khan A. Estimation of inosinic acid in chicken muscle and its formation and degradation during post-mortem aging [J]. Journal of Food Science, 1967, 32(2):155-157.

[28] Jiang X, Liu G, Xiong Y, et al. Phenotypic and genetic parameters for inosine acid in relation to carcass and meat quality traits in pigs [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2003, 16(2):257-260.

[29] Chen G, Li H, Wu X, et al. Factors affecting the inosine monophosphate content of muscles in Taihe silkies chickens [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2002, 15(9):1359-1363.

[30] 董金格,邹晓庭,胡家澄,等. 日粮中添加谷氨酰胺对肉仔鸡肉品质和抗氧化指标的影响 [J]. 动物营养学报,2009,21(2):245-250. Dong J G, Zou X T, Hu J C, et al. Effects of dietary supplementation of glutamine on meat quality and antioxidant indexes of broilers [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2009, 21(2):245-250. (in Chinese)