

# 栉孔扇贝蛋白酶和淀粉酶活力的初步研究

张 硕\*                      赵 艳  
(大连水产学院养殖系)

**摘 要** 研究了栉孔扇贝 (*Chlamys (Azumapecten) farreri*) 两种主要消化酶——蛋白酶和淀粉酶与温度和 pH 的关系。结果表明: 在 4.8°C 与 7.5°C 之间蛋白酶的最适温度为 6.0°C, 在 5°C 与 6.0°C 之间淀粉酶的最适温度为 2.5°C; 蛋白酶的最适 pH 值有两个, 分别是 2.6 和 7.77, 淀粉酶的最适 pH 值为 6.5。栉孔扇贝蛋白酶和淀粉酶的活性与酶本身的性质及栉孔扇贝的生理状态有关。

**关键词** 栉孔扇贝; 蛋白酶; 淀粉酶; 温度; pH 值

**中图分类号** S912

海洋无脊椎动物是分布较广、种类较多的海洋生物,也是海洋生物资源最重要的组成部分。尤其是海洋软体动物,是海水养殖的主要种类,如牡蛎、扇贝、鲍等。关于海洋软体动物消化酶的研究工作,国内外有一些报道。国外如 Coupin, Mita, Van Rynberk, Oakin, Youge 等人先后从拟心蛤 (*Cardilia*)、背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*)、贻贝、扇贝、沙海螂、鲍、锉石鳖 (*Lischnochiton* sp.) 等种类的某些消化器官中分析出了消化酶。牡蛎消化酶的研究较为详细,通过对花缘牡蛎 (*Ostrea* sp.) 和食用牡蛎 (*Ostrea edulis*) 的消化盲囊分析,得知其中的酶类大致分三类,即碳水化合物分解酶、脂肪分解酶和蛋白分解酶<sup>[1]</sup>。随着国内养殖业的发展,不少学者对不同软体动物的消化酶进行了研究,刘万顺<sup>[2]</sup>研究了紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 和短滨螺 (*Littorina brevicola*) 的消化酶活性,朱仁华<sup>[3]</sup>对花冠小月螺 (*Lunella cornata*)、单齿螺 (*Monodonta labio*) 和疣荔枝螺 (*Thais clavigera*) 的消化酶性质及应用进行了研究。

栉孔扇贝 (*Chlamys (Azumapecten) farreri*) 是我国北方主要的海水养殖贝类之一。目前,关于它的消化酶性质方面的研究工作还未见报道。笔者重点研究了温度和 pH 值的变化对栉孔扇贝蛋白酶和淀粉酶活性的影响,从而对栉孔扇贝的消化生理做进一步的了解。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料来源

全部实验材料由市场购买。实验样品取回后,用过滤海水暂养于水族箱内,使实验

收稿日期: 1997-04-11

\* 张硕: 1962年生,男,讲师,青岛海洋大学在读博士,大连 116023

样品处于 48 h 饥饿状态后再进行解剖,以消除消化道内食物对实验结果的影响,样本规格见表 1

表 1 实验用栉孔扇贝样本的规格

酶种类	mm			
	温度组		pH组	
	壳高 壳宽	体重 /g	壳高 壳宽	体重 /g
蛋白酶	60.60± 5.00	31.07± 6.65	63.00± 6.30	31.52± 7.32
	56.60± 5.90		55.80± 5.60	
淀粉酶	61.20± 3.30	27.72± 4.09	68.00± 8.30	39.38± 8.01
	55.60± 4.40		62.20± 9.00	

$n = 6$

## 1.2 酶液的制备

活体栉孔扇贝置冰盘内解剖,取出消化盲囊及其所包被的胃,去除多余组织块,用重蒸水冲洗,称重。将样品用玻璃研磨器充分研磨,以蛋白酶 1:20 ( $m/V$ ) 和淀粉酶 1:50 ( $m/V$ ) 的比例加入重蒸水,在低温下以 4000 r/min 离心 30 min,获得组织匀浆上清液,此粗酶提液在低温 4℃ 下保存,并于 24 h 内分析完毕。

## 1.3 pH 缓冲液的制备

缓冲液制备参照《生物化学实验指导》<sup>[4]</sup>,采用  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  (1/15M) 缓冲系统。

## 1.4 酶活力测定

### 1.4.1 不同温度下蛋白酶和淀粉酶活力的测定

蛋白酶活性测定参照《生化技术导论》<sup>[5]</sup>中 Lawry 等的福林酚试剂法,淀粉酶活性测定参照《临床生化检验》<sup>[6]</sup>的淀粉—碘显色法。用 72 型光栅分光光度计测定, pH 为 6.6, 反应温度范围为 5~75℃, 梯度间隔为 5℃, 于恒温水浴中控制温度。

蛋白酶活力定义为在 pH=6.6, 底物酪蛋白浓度为 0.5% 和一定温度下, 保温 20 min, 以每分钟蛋白酶水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸为一个活力单位。

淀粉酶活性定义为在 pH=6.6 和一定温度条件下, 30 min 内 100 mL 酶液中的淀粉酶完全水解淀粉 100 mg, 称为一个淀粉酶活力单位。

### 1.4.2 不同 pH 下蛋白酶和淀粉酶活力的测定

测定方法基本同 1.4.1, pH 值范围为 2.20~8.61, 梯度间距为 0.3~0.8。测定蛋白酶时, 反应温度控制在 60℃; 测定淀粉酶时反应温度控制在 25℃, 恒温水浴控温。

### 1.4.3 栉孔扇贝消化盲囊及胃的 pH 值的测定

利用 pH 试纸进行测定, 然后根据测定的范围, 再用精密 pH 试纸在样品解剖时直接

## 浸渍测试

以上所有实验均进行三次重复平行试验,  $n = 3$

## 2 实验结果

### 2.1 温度与酶活性的关系

#### 2.1.1 蛋白酶活性与温度的关系

在 4.8~75°C 温度范围内, 栉孔扇贝消化盲囊蛋白酶的活性见图 1-a 从图 1-a 中可以看出, 在 4.8~60°C 之间随温度升高, 酶活力逐渐增大, 60°C 时达到最高值, 而后随温度升高, 酶活力快速下降, 即栉孔扇贝蛋白酶的最适温度为 60°C。

#### 2.1.2 淀粉酶活性与温度的关系

在 5~65°C 温度范围内, 栉孔扇贝消化盲囊淀粉酶活性的变化曲线见图 1-b 从图 1-b 中可以看出, 在 5~25°C 范围内, 淀粉酶活性随温度升高呈上升状态, 在 25°C 时达到最大值, 在 25~45°C 范围内呈下降趋势, 在 45~65°C 之间出现小范围波动, 即淀粉酶的最适温度为 25°C。

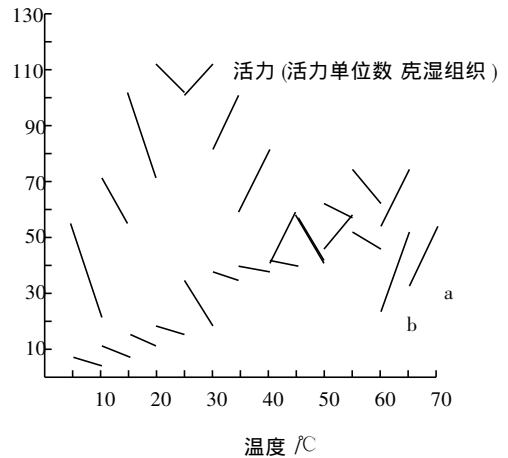


图 1 栉孔扇贝蛋白酶和淀粉酶与温度的关系

### 2.2 pH值与酶活性的关系

#### 2.2.1 栉孔扇贝消化盲囊的 pH值

消化盲囊的 pH 值在 6.4~6.7 范围之间, 呈微酸性

#### 2.2.2 pH值对蛋白酶的影响

在 60°C 的温度条件下, 蛋白酶活力与 pH 值之间的关系曲线见图 2-a 由图 2-a 可以看出, 在 pH 2.2~8.61 之间蛋白酶活力出现了两个明显的高峰值, 分别在 pH 2.6 和 pH 7.77, 前者略高于后者。两高峰值之间的活力变化不规则, 最低值出现在 pH 值为 6.0 处

#### 2.2.3 pH值对淀粉酶的影响

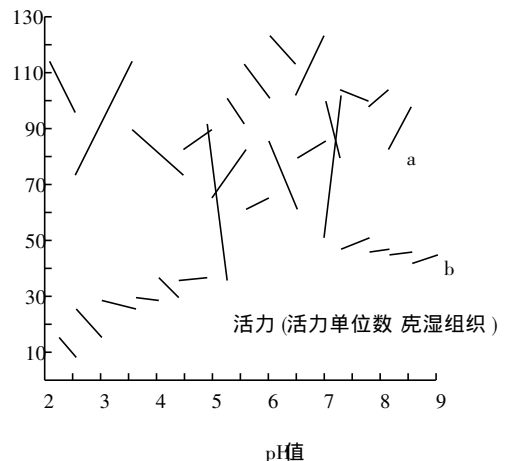


图 2 栉孔扇贝蛋白酶和淀粉酶与 pH 的关系

在 pH 2.2~ 8.6 范围内, 温度 25℃ 条件下, 淀粉酶活力的变化曲线见图 2-b。由图 2-b 可以知道, 在 pH 2.2~ 4.84 之间, 酶活力变化比较平缓, pH 4.84 以后急剧上升, 在 6.49 处达到最高点, 以后急剧下降, 在 pH 7.33 以后呈平缓状态。最低点为 pH 2.2 处的酸性状态下。

### 3 讨论

#### 3.1 栉孔扇贝消化盲囊及胃蛋白酶和淀粉酶的最适温度

栉孔扇贝消化盲囊及胃的蛋白酶和淀粉酶的活性均受到温度的影响。当其它反应条件如 pH 值、反应时间、酶浓度保持一定时, 在一定范围内酶反应速度随温度升高而加快, 酶反应速度达到最大值时, 即为酶的最适温度。当温度过高时, 酶蛋白开始变性, 酶活力降低。在本实验条件下, 栉孔扇贝消化盲囊及胃蛋白酶的最适温度为 60℃, 淀粉酶的最适温度为 25℃。栉孔扇贝消化盲囊及胃蛋白酶的最适温度高于淀粉酶的最适温度, 这与一些学者在虾、鱼体上测定的结果较为一致<sup>[7,8,9]</sup>。栉孔扇贝蛋白酶最适温度远远高于生物本身的生理极限温度, 其生长水温为 5~ 25℃, 淀粉酶的最适温度也是其生长的上限温度, 这说明消化酶的活性与生物本身的生理机能密切相关。两种消化酶在 5℃ 的温度下仍具有活力, 与其生长的温度下限相适应。在不同的条件下, 消化酶的最适温度值也不同。作用时间长, 最适温度值下降。所以, 酶的最适温度只是在一定条件下才有意义。

#### 3.2 栉孔扇贝蛋白酶和淀粉酶的温度系数 ( $Q_{10}$ ) 值

温度系数 ( $Q_{10}$ ) 是温度升高 10℃ 时, 酶反应速度增加的倍数。是该酶的一个特性值。从表 2 可以看出, 栉孔扇贝蛋白酶的温度系数在 5~ 15℃ 范围内为 3, 在 15~ 60℃ 范围内大于 1, 在 60~ 75℃ 范围内小于 1。淀粉酶在 5~ 15℃ 之间大于 3, 在 15~ 25℃ 范围内大于 1, 在 25~ 60℃ 范围内小于 1。

表 2 栉孔扇贝蛋白酶和淀粉酶的  $Q_{10}$  值和最适温度

酶种类	温 度 /℃								最适温度 /℃
	5~ 15	15~ 25	25~ 35	35~ 45	40~ 50	50~ 60	60~ 70	65~ 75	
蛋白酶	3.00	1.56	2.05	1.10	1.37	1.40	0.20	0.61	60
淀粉酶	3.35	1.60	0.78	0.50	1.02	0.87	-	-	25

Chesley<sup>[8]</sup>报道了人、鳖和鱼的淀粉酶  $Q_{10}$  值, 结论是鱼有向低温适应的趋势。将本实验淀粉酶的  $Q_{10}$  值与上述结论相比较, 栉孔扇贝的  $Q_{10}$  值在 25~ 35℃ 时即小于 1, 说明栉孔扇贝更有向低温适应的趋势。栉孔扇贝是北方沿海的种类, 其生长的水温范围为 5~ 25℃, 其消化酶也是适应于该温度范围。

### 3.3 无脊椎动物消化酶最适 pH 值的问题

目前, 有一些关于蛋白酶最适 pH 值的报道<sup>[10, 11, 12, 13, 14]</sup> (表 3), 由表 3 可以看出, 有些种类只有一个最适值, 而另外一些种类具有两个最适值, 如食用牡蛎、美国龙虾。第一个最适值出现在 2.6~4 之间, 第二个最适值与单峰值的种类均在 5.40~9.0 之间。本实验的结果是, 栉孔扇贝也有两个最适值, 分别在 2.6 和 7.7 处 (图 2), 与表 3 中的部分种类相似。这说明栉孔扇贝的蛋白酶不但与酶性质有关, 亦与栉孔扇贝对温度的适应密切相关。

表 3 表明, 淀粉酶的最适 pH 值只有一个, 出现在 pH 5~7 之间, 呈微酸性。本实验的结果中栉孔扇贝淀粉酶也只有一个最适 pH 值, 为 6.45。该最适值在测定的消化盲囊 pH 值范围内, 与所在的体内环境 pH 值一致。上述结果也说明, 无脊椎动物之间淀粉酶的最适 pH 值差异不大。

表 3 不同生物水脂酶的最适 pH 值

研究种类	蛋白酶	淀粉酶	作者	研究年代
食用牡蛎	3.7, 9.0	Younge	1924	
白 虾	7.0~9.5	-	B. J. Gafes 等	1964
美国龙虾	4, 8	-	H. Brocherhoff 等	1970
海 胆	-	6~6.5	Victor D. Vacguler	1977
鹰爪虾	8.5~9.0	-	Mistsuo Asahara	1973
日本对虾	8.0	6.8	Paul D. Magule 等	1982
臂尾轮虫	8~10	-	Kenjihara	1984
中国对虾	8~9	5~6	于书坤	1987
日本鲟	7.8	6.0	刘万顺	1988
滨 螺	7.0	5.0, 6.6	刘万顺	1988
贻 贝	6.5, 8.0	5.8	刘万顺	1988
美国龙虾幼体	5.3, 6.4	6.5~7.0	Patricia M. Biesro t	1990

## 参 考 文 献

- 1 蔡英亚, 张英, 魏若飞. 贝类学概论. 上海: 上海科学技术出版社, 1979
- 2 刘万顺等. 海洋无脊椎动物消化酶的研究 I 紫贻贝、日本鲟、滨螺消化酶的初步分析和应用. 山东海洋学院学报, 1988, 18(1): 53~57
- 3 朱仁花. 海螺酶解壁作用的研究. 山东海洋学院学报, 1983, 13(4): 46~47
- 4 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导. 北京: 人民教育出版社, 1979
- 5 中山大学生化教研室主编. 生化技术导论. 北京: 人民教育出版社, 1978
- 6 上海市医学化验所主编. 临床生化检验. 上海: 上海科学技术出版社, 1982
- 7 桂远明等. 温度对草鱼、鲤、鲢、鳙主要消化酶活性的影响. 大连水产学院学报, 1992, 7(4): 1~8
- 8 尾崎九雄著. 鱼类消化生理. 下册. 李爱杰, 沈宗武译. 上海: 上海科学技术出版社, 1985

- 9 于书坤. 中国对虾消化酶的研究I —— 消化酶活力测定及性质的研究. 海洋科学集刊, 1987, 第28集: 85~ 90
- 10 Paul D M augle, Osamu Deschimar. Characteristics of amylase and protease of the shrimp, *Penaeus japonicus*. 日水志, 1982, 48(12): 1153~ 1575
- 11 Brocherhoff H, Hoyle R J. Digestive enzymes of the American lobster. J Fish Res Board of Canada, 1970, 27 (8): 1357~ 1370
- 12 Patricia M B, Judith Midowell Capuzzo. Changes in digestive enzymes activities during early development of American lobster. J Exp Mar Bio Ecol, 1990, 136 107~ 122
- 13 Victor D Vacquier, Laurence J Kone. The appearance of amylase activity during gut differentiation in sand dollar plutei. Developmental Biology, 1971, 26 293~ 299
- 14 Ken j Hara, Hiraki Arano, Tadashi Ishihara. Some Enzymatic Properties of alkaline protease of the rotifer. *Brachionus plicatilis*. 日水志, 1984, 50 (9): 1611~ 1616

## The Studies on the Activities of Protease and Amylase of *Chlamys (Azumapecten) farreri*

Zhang Shuo      Zhao Yan  
(Department of Aquaculture, DFU)

**Abstract** This paper studies the activities of protease and amylase on *Chlamys (Azumapecten) farreri*. The results indicate that the optimum temperatures of protease and amylase are 60°C and 25°C, respectively. The optimum pH values of protease are 2.61 and 7.77, and that in amylase is 6.45. There are two optimum pH values in protease of *Chlamys (Azumapecten) farreri*.

**Key words** *Chlamys (Azumapecten) farreri*; protease; amylase; temperature; pH values