

9种金属离子对缢蛏消化酶活力的影响

吴众望, 潘鲁青, 董双林

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:以酶学分析的方法研究9种金属离子(Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^{+} 和 Mn^{2+})对缢蛏(*Sinonovacula constricta*)蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活力的影响。缢蛏壳长(5.64 ± 0.25) cm, 9种金属离子浓度分别设置为 2×10^{-6} mol/L、 2×10^{-5} mol/L、 2×10^{-4} mol/L、 2×10^{-3} mol/L、 2×10^{-2} mol/L 5个梯度。实验表明, 缢蛏3种消化酶活力大小为淀粉酶>蛋白酶>纤维素酶; 在实验设置的浓度范围内, Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Pb^{2+} 对蛋白酶活力影响不显著, Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ag^{+} 、 Mn^{2+} 对蛋白酶活力影响显著; Mg^{2+} 、 Pb^{2+} 对淀粉酶活力影响不显著, Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ag^{+} 、 Mn^{2+} 对淀粉酶活力影响显著; Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 对纤维素酶活力影响不显著, Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Mn^{2+} 对纤维素酶活力影响显著。不同浓度金属离子对缢蛏蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活力的影响表现出不同的变化趋势。

关键词:金属离子; 缢蛏; 蛋白酶; 淀粉酶; 纤维素酶

中图分类号: Q558.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)04-0297-04

国内外关于贝类消化酶的研究主要集中在分析消化器官中某些消化酶的存在、性质和将消化酶作为工具酶进行多方面应用等^[1-9], 如刘万顺等^[9]研究了紫贻贝(*Mytilus edulis*)、滨螺(*Littorina* sp.)的消化酶活性的大小。而有关金属离子对贝类消化酶活力的影响的报道甚少^[5-6]。本研究以缢蛏为材料, 探讨9种金属离子对其消化酶活力的影响, 并分析金属离子对缢蛏消化酶的影响机制, 旨在深入研究金属离子消化生理研究和洁净养殖生产提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用缢蛏2001年10月购于青岛市南山水产品市场, 壳长4.25~6.85 cm, 平均壳长(5.64 ± 0.25) cm。去除其表面附着物, 置水族箱中以砂滤海水暂养5 d, 然后终止投饵, 饥饿48 h后, 将缢蛏置冰盘内解剖, 取出胃和消化盲囊, 并去除多余的组

织块, 作为酶液制备的样品, 缢蛏取样数量为60只。

1.2 酶液的制备

将上述样品用重蒸水冲洗, 加入预冷的重蒸水($0 \sim 4^\circ\text{C}$), 加入比例为1 mg样品/(10~15) mL重蒸水, 在冰浴中用玻璃匀浆器充分研磨匀浆(10~20 min), 将匀浆液在Sigma 1-15K型高速冷冻离心机以 $0 \sim 1^\circ\text{C}$, 10 000 r/min离心30 min, 取组织匀浆上清液作为酶液, 在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 低温下保存, 于24 h内分析完毕。

1.3 金属离子的种类、浓度及来源

9种金属离子的种类与来源见表1。其浓度根据预试验的结果设置为 2×10^{-6} mol/L、 2×10^{-5} mol/L、 2×10^{-4} mol/L、 2×10^{-3} mol/L、 2×10^{-2} mol/L 5个梯度, 所有梯度均设置3个重复, 不加金属离子组为对照组。

1.4 酶活力的测定

取0.25 mL酶液加至0.25 mL不同浓度的金属离子溶液中, 充分混匀10 min, 然后进行酶活力测定。5个浓度9种金属离子酶活力的测定均设置3个重复组。蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活力测定参照《生化技术导论》的方法^[10], 并根据范德鹏等的研究结果, 测定时取其最适pH、最适温度, 分别为:pH

收稿日期: 2002-08-15; 修订日期: 2003-01-12.

基金项目: 国家重点基础研究规划项目(G1999012011).

作者简介: 吴众望(1980-), 男, 硕士, 从事水产动物生态毒理学的研究. E-mail: lvfu@ouc.edu.cn

9.2、6.3、5.2; 温度 55℃、65℃、45℃, 上述各测定方法均有改进¹⁾。酶液蛋白含量以牛血清蛋白作标准, 用双缩脲法测定。酶活力以比活力表示 (U/mg 蛋白), 设对照组酶活力为 100, 其他实验组的酶活力以实测酶比活力与正常酶比活力的比值表示, 并采用 ANOVA 单因素方差分析和 Duncan 多重比较进行显著性检验。

表 1 金属离子的种类和来源
Table 1 Metal ions and their sources

金属离子 Metal ion	来源 Source
Ag ⁺	AgNO ₃
Ca ²⁺	CaCl ₂
Cu ²⁺	CuSO ₄
Fe ³⁺	Fe(NO ₃) ₃
Hg ²⁺	HgCl ₂
Mg ²⁺	MgSO ₄
Mn ²⁺	MnCl ₂
Pb ²⁺	Pb(NO ₃) ₂
Zn ²⁺	ZnSO ₄

2 结果

2.1 金属离子对蛋白酶活力的影响

对照组的缢蛏蛋白酶实测酶比活力为 (1.47 ± 0.72) U/mg 蛋白。由表 2 可看出, Cu²⁺、Fe³⁺、Mg²⁺、Pb²⁺ 对蛋白酶活力影响不显著, 其他金属离子影响显著。Ag⁺ 在 2 × 10⁻² mol/L 浓度下, 表现为抑制作用, 其他低浓度均为促进作用; Ca²⁺ 在 2 × 10⁻⁴ mol/L 浓度时, Hg²⁺、Zn²⁺ 在 2 × 10⁻² mol/L 浓度下均表现为显著性抑制作用, 其他浓度与对照组差异不显著 (P > 0.05); Mn²⁺ 除 2 × 10⁻² mol/L 浓度与对照组差异不显著, 其他浓度均表现为显著性抑制作用。

2.2 金属离子对淀粉酶活力的影响

对照组的缢蛏淀粉酶实测酶比活力为 (126 ± 53.5) U/mg 蛋白, 测定结果见表 3。Mg²⁺、Pb²⁺ 对淀粉酶活力影响不显著, 而其他金属离子影响显著。Ag⁺ 表现为显著抑制作用, 且在高浓度时抑制作用较强; Ca²⁺ 在 2 × 10⁻⁵ mol/L 时有最强的抑制作用; Cu²⁺ 在 2 × 10⁻³ mol/L、2 × 10⁻⁶ mol/L 和 Fe³⁺ 在 2 × 10⁻⁵ mol/L 时都表现为促进作用, 其他浓度影响

不显著; Hg²⁺ 低浓度时表现促进或不显著, 在高浓度时表现为抑制作用; Mn²⁺ 表现为抑制作用, 且在低浓度较强; Zn²⁺ 只在 2 × 10⁻⁵ mol/L 表现促进作用, 其他浓度均为抑制作用, 2 × 10⁻⁶ mol/L 时表现为最大的抑制作用。

2.3 金属离子对纤维素酶活力的影响

对照组的缢蛏纤维素酶实测酶比活力为 (0.543 ± 0.0197) U/mg 蛋白。由表 4 可见, Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺ 对纤维素酶活力影响不显著, 其他金属离子影响显著。Ag⁺、Fe³⁺、Hg²⁺ 在高浓度时表现为抑制作用, 低浓度时影响不显著; Cu²⁺ 在 2 × 10⁻² mol/L、2 × 10⁻⁴ mol/L 表现为抑制作用, Mn²⁺ 在 2 × 10⁻² mol/L、2 × 10⁻⁶ mol/L 表现为促进作用, 其他浓度影响不显著; Pb²⁺ 除在 2 × 10⁻² mol/L 时影响不显著外, 其他浓度均表现为显著促进作用。

表 2 金属离子对缢蛏蛋白酶活力的影响

Table 2 Protease activities of *Sinonovacula constricta* under effects of different metal ions

金属离子 Metal ion	金属离子浓度/(mol · L ⁻¹) Concentration of metal ion	0	2 × 10 ⁻⁶	2 × 10 ⁻⁵	2 × 10 ⁻⁴	2 × 10 ⁻³	2 × 10 ⁻²
Ag ⁺	100 ^a	123.82 ^b	126.47 ^b	124.28 ^b	113.94 ^b	74.10 ^c	
Ca ²⁺	100 ^{ab}	109.33 ^a	88.39 ^{ac}	76.72 ^c	81.32 ^{bc}	102.72 ^{ab}	
Cu ²⁺	100 ^a	102.51 ^a	100.40 ^a	91.10 ^a	98.12 ^a	87.72 ^a	
Fe ³⁺	100 ^a	105.28 ^a	99.55 ^a	102.98 ^a	103.13 ^a	105.47 ^a	
Hg ²⁺	100 ^a	100.27 ^a	104.60 ^a	100.96 ^a	92.25 ^a	63.33 ^b	
Mg ²⁺	100 ^a	106.57 ^a	111.27 ^a	100.19 ^a	108.24 ^a	106.07 ^a	
Mn ²⁺	100 ^a	82.10 ^b	81.58 ^b	78.52 ^b	82.41 ^b	109.05 ^a	
Pb ²⁺	100 ^a	118.64 ^a	117.73 ^a	130.65 ^a	124.83 ^a	117.57 ^a	
Zn ²⁺	100 ^a	100.10 ^a	117.06 ^a	106.69 ^a	102.88 ^a	72.26 ^b	

注: 表中同一行数据右上角相同字母表示差异不显著 (P > 0.05), 不相同表示差异显著 (P < 0.05)。

Note: The superscripts with the same letter on the same line mean insignificant difference (P > 0.05), while the different letters mean significant difference (P < 0.05).

3 讨论

3.1 金属离子对缢蛏消化酶活力的影响

刘万顺等^[9]在对紫贻贝 (*Mytilus edulis*)、滨螺 (*Littorina* sp.) 消化酶活力的研究中发现, 紫贻贝的淀粉酶、蛋白酶活力较高, 纤维素酶活力较低, 主食浮游单细胞藻类; 并认为不同种类动物体内同一功能的消化酶活力与动物的遗传性和食性有关。本实验测得缢蛏胃和消化盲囊中具有淀粉酶、纤维素酶和蛋白酶活力, 其活力大小为: 淀粉酶 > 蛋白酶 > 纤

1) 范德鹏. 温度、pH 对缢蛏消化酶活力的影响. 海洋湖沼通报, 待发表.

纤维素酶活力,3种消化酶活力基本反映出缢蛏对食物消化利用的能力。缢蛏的主要饵料为浮游性弱而易于下沉的硅藻和底栖硅藻等,其消化酶的测定结果与紫贻贝的类似。

表3 金属离子对缢蛏淀粉酶活力的影响

Table 3 Amylase activities of *Sinonovacula constricta* under effects of different metal ions

金属离子 Metal ion	金属离子浓度/(mol·L ⁻¹) Concentration of metal ion					
	0	2×10 ⁻⁶	2×10 ⁻⁵	2×10 ⁻⁴	2×10 ⁻³	2×10 ⁻²
Ag ⁺	100 ^a	71.15 ^b	59.76 ^b	68.46 ^b	42.38 ^c	33.16 ^c
Ca ²⁺	100 ^{ab}	89.52 ^{bc}	40.71 ^d	111.42 ^a	82.79 ^c	99.05 ^{abc}
Cu ²⁺	100 ^{ab}	180.36 ^{cd}	133.54 ^{bc}	74.35 ^a	192.20 ^c	124.88 ^{abd}
Fe ³⁺	100 ^a	52.41 ^b	175.40 ^c	114.71 ^a	109.59 ^a	84.65 ^a
Hg ²⁺	100 ^a	133.87 ^b	96.35 ^a	134.42 ^b	33.37 ^c	16.93 ^d
Mg ²⁺	100 ^a	73.39 ^a	72.76 ^a	73.67 ^a	68.57 ^a	73.61 ^a
Mn ²⁺	100 ^a	7.80 ^b	10.92 ^b	44.32 ^{cd}	58.34 ^c	42.24 ^d
Pb ²⁺	100 ^a	102.13 ^a	109.05 ^a	95.70 ^a	97.05 ^a	88.58 ^a
Zn ²⁺	100 ^a	20.75 ^b	148.81 ^c	84.76 ^d	75.19 ^d	85.78 ^d

注:表中同一行数据右上角相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不相同表示差异显著($P<0.05$)。

Note: The superscripts with the same letter on the same line mean insignificant difference($P>0.05$), while the different letters mean significant difference($P<0.05$).

表4 金属离子对缢蛏纤维素酶活力的影响

Table 4 Cellulase activities of *Sinonovacula constricta* under effects of different metal ions

金属离子 Metal ion	金属离子浓度/(mol·L ⁻¹) Concentration of metal ion					
	0	2×10 ⁻⁶	2×10 ⁻⁵	2×10 ⁻⁴	2×10 ⁻³	2×10 ⁻²
Ag ⁺	100 ^a	104.65 ^a	99.77 ^a	107.43 ^a	63.98 ^b	64.95 ^b
Ca ²⁺	100 ^a	97.91 ^a	90.38 ^a	101.19 ^a	94.25 ^a	97.37 ^a
Cu ²⁺	100 ^a	99.95 ^a	91.03 ^{ab}	83.44 ^b	97.75 ^a	47.73 ^c
Fe ³⁺	100 ^a	105.31 ^a	101.63 ^a	104.20 ^a	111.02 ^a	72.09 ^b
Hg ²⁺	100 ^a	104.65 ^a	100.31 ^a	102.43 ^a	57.22 ^b	43.76 ^c
Mg ²⁺	100 ^a	110.02 ^a	102.01 ^a	117.52 ^a	115.86 ^a	103.99 ^a
Mn ²⁺	100 ^a	154.35 ^b	119.69 ^a	138.13 ^{ab}	127.92 ^{ab}	188.05 ^c
Pb ²⁺	100 ^a	146.41 ^b	151.40 ^b	129.79 ^b	129.00 ^b	93.59 ^a
Zn ²⁺	100 ^a	97.04 ^a	103.05 ^a	106.19 ^a	101.29 ^a	99.42 ^a

注:表中同一行数据右上角相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不相同表示差异显著($P<0.05$)。

Note: The superscripts with the same letter on the same line mean insignificant difference($P>0.05$), while the different letters mean significant difference($P<0.05$).

杨惠萍等^[5-6]研究了皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)的消化酶,结果认为2×10⁻³ mol/L浓度下,Zn²⁺、Ca²⁺、Pb²⁺对其蛋白酶无显著影响,与本实验结果相符;而Hg²⁺、Ag⁺、Cu²⁺对蛋白酶的抑制

作用、Mg²⁺、Fe³⁺的促进作用和Mn²⁺的无显著影响,与本实验不同。对于淀粉酶,Hg²⁺、Ag⁺的抑制作用和Mg²⁺的无影响,与本实验相同;而Cu²⁺、Pb²⁺的抑制作用和Fe³⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺的促进作用,与本研究结果不同。Vega-Villasante等^[11-12]对加州对虾(*Penaeus californiensis*)消化酶的研究表明,在1×10⁻² mol/L浓度下,Mg²⁺、Ca²⁺对蛋白酶活力无影响,Hg²⁺、Zn²⁺对淀粉酶活力有明显的抑制作用,与本实验类似;而1×10⁻² mol/L的Hg²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺对蛋白酶活力有抑制作用,5×10⁻³ mol/L的Mg²⁺、Ca²⁺对淀粉酶活力具有促进作用,又与本实验的结果不符。可见,金属离子对不同种类生物消化酶的作用效果并不完全一致,对同种贝类的不同消化酶作用也不同,对同种贝类的同类消化酶(如淀粉酶和纤维素酶)影响也有很大差异。

3.2 金属离子对缢蛏消化酶影响机制的探讨

现已证实,金属离子能以不同的方式与底物、酶的活性产物和酶本身产生极强的亲和力,从而导致酶活性的改变,有些能对酶活性产生抑制作用,有些则激发酶的催化功能。有毒金属离子与酶之间可能存在着2种作用形式。即有毒金属离子置换酶活性中心的必需金属;或有金属离子结合酶分子中的咪唑基、巯基、羟基、氨基、肽基等功能基团,从而导致酶失活^[13]。本实验表明,9种金属离子对缢蛏3种消化酶活力的影响表现出不同的变化趋势,这可能是由于金属离子对不同消化酶的作用机制不同。

据Bryan等^[14]报道,疣鲍(*Haliotis tuberculata*)的消化盲囊对Ca²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺具有极高的累积作用。崔毅等^[15]研究了乳山湾菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinaram*)、牡蛎(*Oyster* sp.)体内重金属含量。结果表明Cu²⁺、Zn²⁺在其体内含量较高时,贝类仍能正常的存活与生长,这说明贝类对某些金属离子有一定的累积作用和适应性。本实验中Cu²⁺在2×10⁻³ mol/L和Zn²⁺在2×10⁻⁵ mol/L浓度下(已分别超出中华人民共和国渔业水质标准^[16]约10 000倍、10倍)对缢蛏淀粉酶活力均表现出促进作用,由此表明某些金属离子可提高贝类的摄食和消化吸收功能,促进其生长。同时还应注意到,有毒重金属离子通过贝类食物链对人类的危害作用。因此,深入研究金属离子对贝类消化酶的影响机制,开展贝类的洁净养殖生产和有针对性的脱毒暂养,对于保证贝类养殖生产的健康、稳定发展十分重要。

参考文献:

- [1] Hernández-Santoyo A, Hernández-Arana A, Arreguín-Espinosa R, et al. Purification and characterization of several digestive protease from the blue abalone, *Haliotis fulgens* [J]. *Aqu*, 1998, 159:203-216.
- [2] Picos-García C, García-Carreñ F L, Serviere-Zaragoza E. Digestive proteases in juvenile Mexican green abalone, *Haliotis fulgens* [J]. *Aqu*, 2000, 181:157-170.
- [3] 戴继勋. 五种海产贝类消化酶对紫菜细胞的分离[J]. 海洋湖沼通报, 1987, (1):84-87.
- [4] 陈菊峰. 大瓶螺消化酶对海藻解壁作用的初步研究[J]. 厦门水产学院学报, 1991, 13(1):1-6.
- [5] 杨惠萍, 童圣英, 王子臣. 皱纹盘鲍蛋白酶的研究[J]. 水产学报, 1997, 21(2):128-133.
- [6] 杨惠萍, 童圣英, 王子臣. 皱纹盘鲍淀粉酶褐藻酸酶的研究[J]. 水产学报, 1998, 22(4):345-351.
- [7] 张 颖, 赵 艳. 栉孔扇贝蛋白酶和淀粉酶活力的初步研究[J]. 大连水产学院学报, 1997, 12(1):15-20.
- [8] 杨惠萍, 童圣英, 王子臣. 国内外关于水产动物消化酶研究的概况[J]. 大连水产学院学报, 1998, 13(3):64-71.
- [9] 刘万顺, 李 源. 海洋无脊椎动物消化酶的研究 I: 紫贻贝、日本滨螺消化酶的初步分析和应用[J]. 山东海洋学院学报, 1988, 18(1):54-57.
- [10] 中山大学生化教研室. 生化技术导论[M]. 北京: 人民教育出版社, 1978. 53-55.
- [11] Vega-Villasante F, Nolasco H, Civera R. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis* I. Properties of amylase activity in the digestive tract[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1993, 106B(3):547-550.
- [12] Vega-Villasante F, Nolasco H, Civera R. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis* II. Properties of protease activity in the whole digestive tract[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1995, 112B(1):123-129.
- [13] 吴 坚. 微量金属对海洋生物的生物化学效应[J]. 海洋环境科学, 1992, 10(2):58-64.
- [14] Bryan G W, Potts G W, Forster G T. Heavy metals in the gastropod moll - use, *Haliotis tuberculata* [J]. *J Mar Biol Ass U K*, 1977, 57:379-390.
- [15] 崔 毅, 辛福言, 马绍赛, 等. 乳山湾贝类体中重金属含量及其评价研究[J]. 海洋水产研究, 1997, 18(2):46-54.
- [16] GB11607-89, 国家渔业水质标准[S].

Effects of nine metal ions on digestive enzyme activities of *Sinonovacula constricta*

WU Zhong-wang, PAN Lu-qing, DONG Shuang-lin

(The Key Laboratory of Marine Culture of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The concentrations of nine metal ions (Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} , Ag^{+} and Mn^{2+}) were designed at 2×10^{-6} mol/L, 2×10^{-5} mol/L, 2×10^{-4} mol/L, 2×10^{-3} mol/L and 2×10^{-2} mol/L, respectively, and the *Sinonovacula constricta* samples were employed with shell length at 4.25-6.85 cm. After 48 h starvation, the activities of protease, amylase and cellulase in the *S. constricta* were analyzed by using enzyme analytical method. The results indicate that the activity of amylase in *S. constricta* is the highest among the three digestive enzymes, and the activity of protease is higher than that of cellulase. Within the experimental concentration range, Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} and Pb^{2+} have no significant effects, whereas Hg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ag^{+} and Mn^{2+} have significant effects on protease activity of *S. constricta*; Mg^{2+} and Pb^{2+} have no significant effects, whereas Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ag^{+} and Mn^{2+} have significant effects on amylase activity; Ca^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} have no significant effects, whereas Pb^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Ag^{+} and Mn^{2+} have significant effects on cellulase activity. The activities of protease, amylase and cellulase in *S. constricta* show different variation patterns under the different concentrations of metal ions.

Key words: metal ions; *Sinonovacula constricta*; protease; amylase; cellulose