

鲍鱼酶的制备及其性质

王运吉 刘金珍 孙勉英 陈 隼 高绪生
(大连轻工业学院分部,大连) (辽宁海洋水产研究所,大连)

提 要

为了开发对海带 (*Laminaria japonica*) 具有解壁或破壁作用的工具酶,从皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino) 的消化腺提取制备了鲍鱼酶干粉。本文报道鲍鱼酶的制备及其主要性质,并与贻贝酶进行了比较。

关键词 鲍鱼酶,褐藻酸酶,果胶酶

引 言

随着人类对海洋开发认识的深入,海洋藻类组织和细胞培养的研究越来越引起人们的重视。应用酶法制备单细胞或原生质体,首先要有适当的工具酶。因大多数海藻的细胞壁之主要成分不同于高等植物,现有的大部分商品酶制剂只适用于部分细胞壁水解,或者仅适用于绿藻^[1,2]。

褐藻中富含海藻酸,含有较高活性海藻酸酶是工具酶必须具备的条件之一。对于海藻酸酶已有研究报道^[3,4]。但用于褐藻解壁与破壁的工具酶却很少。

根据皱纹盘鲍的食性特点,从其消化腺中提取鲍鱼酶,得到分离褐藻细胞及其破壁酶。本文报道鲍鱼酶的制备方法及其主要性质,并与贻贝酶进行了比较。

一、鲍鱼酶的制备

材料 皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino) 与紫贻贝 (*Mytilus edulis* Linné) 购自大连市小平岛渔业队。

鲍鱼酶干粉的制备方法^[5,6]: 取摄食盛期的鲍鱼,用蒸馏水充分洗涤后置于海水中饥饿3—4天,再用海水洗涤干净,速冻,剥离消化腺,加8—10倍磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH

7.2),匀浆,水融后置冰箱内(4℃)静置抽提10—13小时,经离心,取其上清液,加入固体硫酸铵到20%饱和度,离心除掉沉淀物,在上清液中加固体硫酸铵到0.95饱和度,静置5—6小时后,离心收集沉淀物,弃去上清液,然后用蒸馏水溶解沉淀物,经G-25葡聚糖凝胶脱盐,冷却干燥后制成酶粉。

制备过程中因收集了20—90%饱和度硫酸铵的沉淀物,因此,所得到的鲍鱼酶几乎是含有鲍鱼消化腺中所有水解酶类的复合酶制剂。用该法制备,得率在3%左右。

二、鲍鱼酶的性质

根据海带细胞壁的主要成分,仅对鲍鱼酶所含的有关水解酶进行了测定,同时测定了这些组成酶的最适pH,为该酶应用提供一些信息。

1. 鲍鱼酶的组分分析

(1) 测定方法: CMC酶、褐藻酸酶、果胶酶与淀粉酶均按文献[7]法进行。在30℃下, pH分别为6.0, 7.0, 5.0与6.5时作用相应底物30分钟测定其酶活力,除CMC酶的活力定义为每分钟分解CMC-Na生成1 μg还原糖的酶量为1单位外,其余酶皆以每小时分解其底物生成1 mg产物所需的酶量为1单位。比活力用每mg酶粉所含的相应酶活力单位数表

示。上述酶的作用底物分别为 CMC-Na, Alg-Na、果胶与可溶性淀粉。

(2) 鲍鱼酶的主要组分: 分析证明鲍鱼酶中至少含有 CMC 酶、淀粉酶、褐藻酸酶与果胶酶。由表 1 可见, 鲍鱼酶与贻贝酶的主要差别是前者含有褐藻酸酶, 而后者极微, 这是由于二者食性的差别所致。

表 1 鲍鱼酶的主要组成酶类

消化酶	序号	比活力(单位/毫克干粉)			
		CMC 酶	果胶酶	褐藻酸酶	淀粉酶
鲍鱼酶	1	24.3	2.5	6.2	2.8
	2	23.6	2.2	6.5	3.3
	3	24.1	2.3	5.8	2.7
贻贝酶 ¹⁾	4	+	+	-(+)	+

¹⁾ 贻贝酶的相应组成酶均为定性结果(+与-)

2. 组成酶的最适 pH

鲍鱼褐藻酸酶的最适 pH 在 6.5—8.0 左右(图 1); CMC 酶在 5.5—6.5 左右(图 2); 果胶酶有三个最适区, 分别在 5.0, 6.5 与 9.0 左右(图 3); 淀粉酶也有三个最适区, 分别在 3.5, 5.0 与 6.5 左右。贻贝酶中的果胶酶也有三个最适区, 分别为 4.5, 6.0 与 8.0 左右, 稍低于鲍鱼果胶酶的最适 pH (图 3); CMC 酶的最适 pH 与鲍鱼酶相近, 为 5.5—6.5 左右(图 2)。

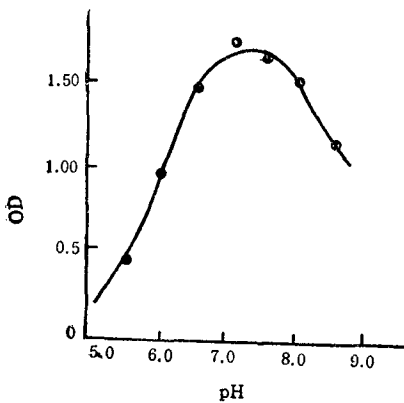


图 1 鲍鱼褐藻酸酶最适 pH

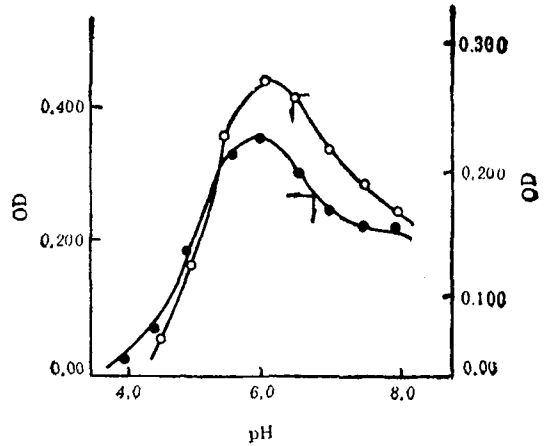


图 2 鲍鱼与贻贝 CMC 酶的最适 pH

○——○ 贻贝 CMC 酶 ●——● 鲍鱼 CMC 酶

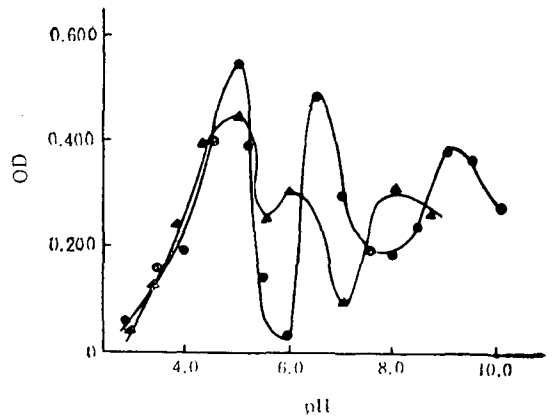


图 3 鲍鱼与贻贝果胶酶最适 pH

●——● 鲍鱼果胶酶 ▲——▲ 贻贝果胶酶

三、结果与讨论

本文得到的鲍鱼酶是一种复合酶制剂, 它至少含有褐藻酸酶等四种水解酶。鲍鱼酶与贻贝酶的区别在于后者不含或含微量的褐藻酸酶。因此只有鲍鱼酶对海带具有解壁作用, 同时, 鲍鱼褐藻酸酶的最适作用 pH 与解壁作用最适 pH 相近。本研究发现有鲍鱼果胶酶和贻贝果胶酶存在, 至今未见到动物体内含有果胶酶的报道^[8,9], 有待进一步研究证实。

参 考 文 献

1 朱仁华, 生物化学与生物物理进展 1982; (2): 43

5-碘吲哚酚 [3] 苯基磷酸酯的 合成及应用

韩刚毅

(济南军区军事医学研究所, 济南)

提 要

本文利用苯基氧氯化磷和 N-乙酰-5-碘吲哚酚 [3] 为原料, 建立了 5-碘吲哚酚 [3] 苯基磷酸酯铵盐的合成和纯化方法。并报道该产品的紫外光谱、红外光谱、元素分析等理化性质, 以及作为酶底物的应用情况。实验结果说明, 合成的产品经提取和重结晶可达到层析纯。氢、氮、碳元素分析数据与理论结构计算值相符。产品在常温条件下保存两年以上无结构变化, 受酶催化的专一性好, 能用于磷酸二酯酶分析和组织化学研究。

关键词 5-碘吲哚酚 [3] 苯基磷酸酯的合成, 5'核苷酸磷酸二酯酶, 磷酸二酯酶 I

目前应用的检测磷酸二酯酶 I (PDEI) 底物主要有三大类: 寡核苷酸类、双对硝基苯酚磷酸酯类和 5'-核苷酸衍生物类。其中寡核苷酸类合成复杂、成本高、检测效果差, 而双对硝基苯酚磷酸酯缺乏必要特异性, 不适用于区分 PDE I 和 PDE II (磷酸二酯酶 II)。5'-核苷酸与呈色基团定位缩合的衍生物类是应用较为广泛的磷酸二酯酶 I 底物^[1-3]。1975年 Kelly 等曾报道苯基磷酸单酯可以用于 PDE I 的特异性鉴定, 并认为此类底物较核苷酸类衍生物成本低, 有一定的实用价值^[4,5]。本文将介绍有关 5-碘吲哚酚 [3] 苯基磷酸单酯铵盐的合成方法及作为 PDE I 底物的应用情况。

材料与方 法

磷酸二酯酶 I (蛇毒): 西德 Boehringer

产品 (1 mg/ml); 磷酸二酯酶 II (猪脾): 上海细胞生物研究所产品(冻干品); 4-甲基伞形酮-5-胸腺嘧啶核苷磷酸二酯铵盐 (MUT) 由本实验室合成^[6]。

苯基氧氯化磷 (PhPoCl₂) 按照 Ye 等 (1962) 方法合成^[7]。bp 137—138°C/15 mm, 260—263°C/760 mm(未校正)。经水解后鉴定苯基磷酸(PhPo(OH)₂) 为层析纯, m.p 160—163°C, 红外光谱 (IU): 2727, 2226, 1438, 1145, 1017, 941, 755, 695 cm⁻¹ (KBr 池)。

N-乙酰-5-碘吲哚酚 (N-AcII) 按照 Rabiniger 等^[8] Holt 等^[9]法合成, 经一次重结晶, mp 191—193°C IU: 1713, 1673, 1455, 828, 655 cm⁻¹ (KBr 池)。

5-碘吲哚酚 [3] 苯基磷酸单酯铵盐 (5-IIPh) 的合成方法: 在 250 ml 磨口烧瓶中加入

2 王素娟等, 中国海洋湖沼学会第三届代表大会暨学术年会论文集汇编, 生物部分(植物) 1979: 401

3 Preiss J *et al.* *J Biol Chem*, 1962; 237: 309

4 Nakada H I *et al.* *J Biol Chem*, 1967; 242: 845

5 Fukuda M *et al.* *Biochem Biophys Soc*, 1968; 159: 215

6 Fukuda M *et al.* *J Biochem*, 1969; 65:2

7 中山大学生物系生化微生物教研室、生化技术导论. 北京: 人民教育出版社, 1978: 52

8 齐义鹏. 纤维素酶及其应用. 成都: 四川人民出版社, 1980: 90

9 张树政等. 酶制剂工业. 北京: 科学出版社, 1984: 626

[本文于 1989 年 5 月 20 日收到]