

黑斑蛙消化系统蛋白酶的活力*

张盛周 朱升学 刘·明** 朱晟** 樊爱绪***

(安徽师范大学生命科学院 芜湖 241000)

摘要: 用福林-酚试剂法对黑斑蛙 (*Rana nigromaculata*) 消化系统蛋白酶的活力进行了分析。结果表明, 黑斑蛙食道、胃、前肠、后肠、直肠和胰脏蛋白酶的最适 pH 值分别为 1.5、1.5、7.4、7.4、7.4 和 9.6, 最适温度分别为 55、55、50、50、50 和 50℃。在各自最适 pH 值和最适温度条件下, 各部位蛋白酶活力由高到低的顺序为: 胰脏 > 食道 > 胃 > 前肠 > 后肠 > 直肠。文中对黑斑蛙蛋白酶的特性进行了讨论, 并对蛙的人工养殖提出了几点建议。

关键词: 黑斑蛙; 消化系统; 蛋白酶; 最适 pH 值; 最适温度

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)01-25-04

Protease Activity in the Digestive System of *Rana nigromaculata*

ZHANG Sheng-Zhou ZHU Sheng-Xue LIU Ming ZHU Sheng FAN Ai-Xu

(College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: The activity of protease in the digestive system of *Rana nigromaculata* was analyzed by Folin-method. The optimum pH value of the protease in esophagus, stomach, fore gut, hind gut, rectum and pancreas was 1.5, 1.5, 7.4, 7.4, 7.4 and 9.6, respectively. The optimum temperature was 55, 55, 50, 50, 50 and 50℃, respectively. The protease activity changes in different parts of the digestive system: pancreas > esophagus > stomach > fore gut > hind gut > rectum. According to the characteristic of protease, some suggestions on the artificial culture of frog is given in this paper.

Key words: *Rana nigromaculata*; Digestive system; Protease; Optimum pH value; Optimum temperature

蛋白酶是一类重要的消化酶,它直接影响动物对食物的消化作用。目前,国内对低等脊椎动物消化酶的研究主要集中在经济养殖性鱼类^[1-6],爬行类有少量报道^[7]。两栖类消化酶的资料较少,国内仅奚刚等^[8]对牛蛙幼体消化酶进行了初步的探讨,国外亦有过报道^[9-11]。而对黑斑蛙消化酶的研究未见报道。黑斑蛙 (*Rana nigromaculata*) 属两栖类蛙科,在我国分布很广,是农田蛙类的优势种,捕食害虫,肉可食用,有较高的生态价值和经济价值。随着环境的恶化和滥捕滥杀,其数量正急剧下降。为

保护野生动物,维护生态平衡,人们正尝试进行人工养殖。本文对其消化系统蛋白酶的活力进行了研究,以为蛙类的人工养殖提供基础资料。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料 鲜活的黑斑蛙采自芜湖市

* 安徽省教育厅自然科学基金(No.2001KJ099)资助项目;

** 我院 2002 届毕业生; *** 我院 2000 级本科生;

第一作者介绍 张盛周,男,33 岁,博士研究生;研究方向:动物细胞学与生理生化;E-mail:asd-zsz@sohu.com。

收稿日期:2003-06-25,修回日期:2003-11-17

郊,重 40~80 g。毁髓处死,剖腹,迅速取出完整消化道,剪开,用 4℃ 蒸馏水迅速洗净,按食道、胃、前肠(自小肠中部分前肠和后肠)、后肠、直肠(大肠)和胰脏取材,用吸水纸轻轻吸干,称重。

1.2 粗酶液制备 依据所称得的组织克数,加入 20 倍体积的 4℃ 蒸馏水,在冰浴中充分匀浆,捣成糜状。4℃,4000 r/min,离心 20 min。取上清液,即为粗酶提取液。保存于 4℃ 冰箱,8 h 内分析完毕。

1.3 蛋白酶活力测定方法 主要采用福林-酚试剂法^[12],略有改动。

1.3.1 不同 pH 值下的蛋白酶活力 利用不同 pH 值的缓冲液来调节反应的 pH 条件。实验中共使用 4 种缓冲液,以 KCl-HCl 配制 pH 0.5~1.5 的缓冲液,以 Na₂HPO₄-柠檬酸配制 pH 2.2~8.0 的缓冲液,以巴比妥钠-盐酸配制 pH 8.0~9.6 的缓冲液,以甘氨酸-氢氧化钠配制 pH 10.0~10.6 的缓冲液。总的 pH 范围为 0.5~10.0,共 13 个梯度。

取 0.5 ml 1% 的酪蛋白溶液,分别加入不同 pH 值的缓冲液 2 ml,混匀,(30 ± 1)℃ 下预热 5~10 min。通过预实验发现胰脏、食道与胃、肠道蛋白酶活力相差很大,为保证各部位的酶有充分的底物(1% 的酪蛋白溶液),取不同体积的粗酶液。按食道、胃、前肠、后肠、直肠和胰脏分别加入 0.25、0.25、0.5、0.5、0.5 和 0.1 ml 预热的粗酶液。水浴(30 ± 1)℃,充分反应 15 min。加 1.5 ml 10% 三氯乙酸终止反应,静置 15 min。过滤,取滤液 1 ml,加 0.55 mol/L 的 Na₂CO₃ 5 ml,酚试剂 1 ml,摇匀。(30 ± 1)℃,显色 15 min。用 751G 型分光光度计,680 nm 波长条件下测光吸值。

1.3.2 不同温度下的蛋白酶活力 由上面所测结果得出各个部位的最适 pH 值,然后选择对应的缓冲液按上述方法测定不同温度下的蛋白酶活力。温度范围为 15~60℃,反应 15 min,共设 10 个梯度。用恒温水浴锅控制反应温度。

1.4 数据处理 根据酪氨酸标准曲线方程 $y = 91.586x$ (其中 x 为光吸值, y 为酪氨酸值)

($r^2 = 0.9961$),求出各个光吸收值对应的酪氨酸含量,再换算成酶活力,取 5 次测量的平均值(平均值 ± 标准差)。以(30 ± 1)℃ 下每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸作为 1 个酶活单位(U)。

2 结果

2.1 pH 对蛋白酶活力的影响 食道、胃、前肠、后肠、直肠和胰脏蛋白酶的最适 pH 值分别为 1.5、1.5、7.4、7.4、7.4 和 9.6。不同 pH 值条件下,黑斑蛙食道、胃、肠和胰脏蛋白酶的活力变化情况见图 1。由图 1 可知,食道和胃蛋白酶活力与 pH 值关系曲线呈单峰型,pH 值对蛋白酶活力影响很大,pH 值大于 2.2 时,酶活力急剧下降,pH 值大于 6.2 时,蛋白酶活力下降到只有最大活力的 2% 左右。肠蛋白酶活力在不同 pH 值变化较平缓,且呈现出一定的波动。胰脏蛋白酶活力变化亦为单峰型,pH 值大于 8.0 时,酶活力变化较平缓,pH 值小于 7.4 时,酶活力急剧下降,pH 值达 4.2 时,蛋白酶活力下降到接近最大活力的 1%。

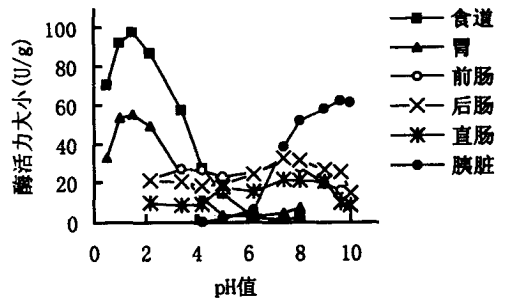


图 1 pH 值对蛋白酶活力的影响

食道、胃蛋白酶活力单位数 × 10 = 实际活力,
胰脏活力单位数 × 100 = 实际活力(下图同)

2.2 温度对蛋白酶活力的影响 食道、胃、前肠、后肠、直肠和胰脏蛋白酶的最适温度分别为 55、55、50、50、50 和 50℃。不同温度条件下,黑斑蛙食道、胃、肠和胰脏蛋白酶的活力变化情况见图 2。由图 2 可知,各部位蛋白酶活力与温度的关系曲线均呈单峰型,温度对酶活力影响较大,从 15℃ 至最适温度上升了 4~5 倍。

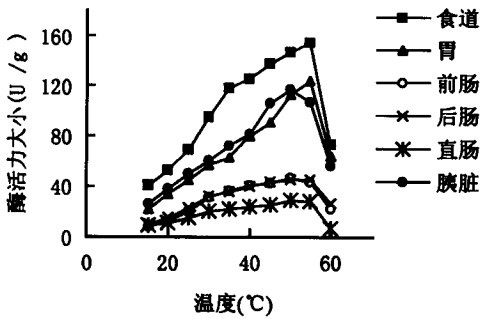


图2 温度对蛋白酶活力的影响

3 讨论

3.1 不同部位蛋白酶活力比较 在各自最适 pH 值和最适温度条件下,各部位蛋白酶的活力大小依次为胰脏 > 食道 > 胃 > 前肠 > 后肠 > 直肠。其中,胰脏蛋白酶的活力比食道和胃蛋白酶的活力高一个数量级,差异非常显著 ($P < 0.0001$);食道和胃蛋白酶的活力又比肠蛋白酶的活力高一个数量级,差异非常显著 ($P < 0.001$)。这与鱼类^[1,2]的胃 > 肠 > 肝胰脏和中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 幼鳖^[7]的胃 > 胰脏 > 肠不同。食道蛋白酶仅在两栖类有报道,组织学研究表明^[9],蛙类食道壁腺体中有分泌蛋白酶原的细胞,且与胃蛋白酶原细胞同源。本研究在黑斑蛙食道中检测到了蛋白酶活力,且略高于胃,但差异不显著 ($P > 0.05$),其最适 pH 值和最适温度也与胃蛋白酶一致,从生化角度证明了上述组织学结论。黑斑蛙胃蛋白酶的活力较肠道高,与鱼类^[1-3]和中华鳖幼鳖^[7]一致,这提示了低等脊椎动物食物中蛋白质的消化主要发生在胃中。多数鱼类^[3,4]和中华鳖幼鳖^[7]肠道蛋白酶活力由前向后递减,与黑斑蛙一致,但黑斑蛙肠道各段蛋白酶活力差异不显著 ($P > 0.05$)。有少数例外,如鳊 (*Cyprinus carpio*) 为中肠 > 前肠 > 后肠,尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*) 为前肠 > 后肠 > 中肠,原因尚不清楚^[3]。

3.2 pH 值对蛋白酶活力的影响 pH 值对黑斑蛙食道、胃和胰蛋白酶活力影响较大,呈明显的单峰型,对肠道蛋白酶活力影响较小,且影响曲线有一定的波动性,这可能是一类其水解产

物为氨基酸的酶类作用的结果,有待进一步研究。黑斑蛙胃蛋白酶最适 pH 值为 1.5,与海蟾蜍 (*B. marinus*)^[10] 的 1.6 相当,较黑眶蟾蜍 (*B. melanostictus*)^[11] 的 2.0 ~ 2.2、中华鳖幼鳖^[7] 的 2.2 和鱼类^[1,2,5] 的 2.2 ~ 4.2 低。鱼类肠道蛋白酶的最适 pH 值为 6.5 ~ 9.5^[1-3,5],黑斑蛙最适 pH 值为 7.4,与野鲮 (*Labeo rohita*)^[3]、长吻鮠 (*Leiocassis longirostris*)^[5] 和中华鳖幼鳖^[7] 相同,与黑眶蟾蜍的 7.2^[11] 相近。多数鱼类肝胰脏蛋白酶的最适 pH 值为 7.0 ~ 8.7^[3],中华鳖幼鳖为 6.2^[7],都比黑斑蛙的 9.6 低,但暗纹东方鲀^[2] 在 9.0 以上、淡水白鲟和黄颡鱼^[1] 为 10.0 与黑斑蛙相近。

虽然不同动物蛋白酶的最适 pH 值差异较大,但一般来说^[6],其消化道内的 pH 值条件能极大地满足其不同种消化酶活力的表现。作者在实验中用精密 pH 试纸测得黑斑蛙食道、胃、前肠、后肠、直肠和胰脏的 pH 值依次为:6.0 ~ 7.5、2.0 ~ 6.5、7.5 ~ 8.5、8.0 ~ 9.0、7.0 ~ 7.5 和 7.5 ~ 8.0,蛙类食道蛋白酶主要随食物进入胃而发挥消化作用^[9],胰消化酶主要通过胰总管进入十二指肠,在肠道中发挥消化作用,这样,黑斑蛙消化道 pH 值条件与各部位蛋白酶的最适 pH 值要求基本一致。

胃内 pH 值变化较大,蛙类胃酸的分泌主要靠食物对胃壁的刺激^[9]。蛙类主要以吞食的方式进食,将食物不经咀嚼便整个吞下,这样,一方面,块状的食物增加了对胃壁的刺激,促进了胃酸的分泌,降低胃内 pH 值,从而提高胃蛋白酶的活力,有利于消化的进行;另一方面,蛋白酶不易进入块状食物内部,又影响了其对食物的消化。这种矛盾提示在配制蛙类人工饲料时,应兼顾易分散和难分散颗粒的比例,蛋白酶可快速进入易分散颗粒进行消化,难分散颗粒可对胃壁产生较持久的刺激,分泌胃酸,提高胃蛋白酶的活力。考虑到蛙胃内 pH 值往往高于胃蛋白酶的最适 pH 值,可向饲料中添加适量的酸化剂。

3.3 温度对蛋白酶活力的影响 温度对黑斑蛙各部位蛋白酶活力影响较大,酶活力从 15°C

至最适温度上升了 4~5 倍。各部位蛋白酶的最适温度远远高于蛙的生活环境温度,也远远高于其生理极限温度,这种现象在鱼类及其它动物也普遍存在^[1,5,6]。酶的蛋白质本性决定其对温度的高度敏感性,温度升高,一方面使酶促反应的速度加快,另一方面也加速酶活性的丧失。当反应条件诸如 pH 值、反应时间等恒定时,反应就有一个“最适温度”,此时酶的活性最大。最适温度受实验条件的影响,特别是反应时间、作用时间延长最适温度就下降。在正常生活条件下,酶消化食物进行的时间相当长,这样就可以解释最适温度高于生理温度的现象^[6]。黑斑蛙蛋白酶活力随温度上升增加较快,提示在蛙的人工养殖过程中当环境温度较高时,可在饲料中适当增加蛋白成分的配比。

参 考 文 献

- [1] 陈章宝,郑曙明.淡水白鲢、团头鲂、黄颡鱼主要消化酶活力研究.四川畜牧兽医学院学报,2001,15(3):10~15.
- [2] 殷宁,赵强,李朝辉.暗纹东方豚蛋白酶活性的研究.南京师大学报,2001,24(1):101~104.
- [3] 倪寿文,桂远明,刘焕亮.草鱼、鲤、鲢、鳙和尼罗罗非鱼肝胰脏和肠道蛋白酶活性的初步探讨.动物学报,1993,39(2):160~167.
- [4] 龙良启,熊邦喜,白东清等.池养鳊鲫胃肠组织消化的初步研究.华中农业大学学报,1997,32(6):23~26.
- [5] 叶元土,林仕梅,罗莉等.温度、pH 值对南方大口鲶、长吻鮠蛋白酶和淀粉酶活力的影响.大连水产学院学报,1998,13(2):16~23.
- [6] 杨蕙萍,董圣英,王子臣.国内外关于水产动物消化酶研究的概况.大连水产学院学报,1998,13(3):64~71.
- [7] 龙良启,白东清,梁拥军等.幼鳖胃肠肠组织中主要消化酶活性分布.动物学杂志,1997,32(6):23~26.
- [8] 奚刚,许梓荣,钱利纯等.牛蛙幼体消化酶活力及其机体主要营养成分含量变化的研究.经济动物学报,1999,3(3):50~56.
- [9] Reeder W G. The digestive system. In: Moore J A ed. *Physiology of the Amphibia*. New York and London: Academic Press, 1964, 99~149.
- [10] Taylor P M, Tyler M J. Pepsin in the toad *Bufo marinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1986, 84A(4): 669~672.
- [11] Teo L H, Chen T W, Tan L L. The proteases of the common Malayan toad *Bufo melanostictus* Schneider. *Comp Biochem Physiol*, 1990, 96B(4): 715~720.
- [12] 北京师范大学生物系生物化学教研室编.基础生物化学实验.北京:高等教育出版社,1982,142~145.