

林建城,陈伟豪,曾水琴,等. 消毒剂对日本鳗鲡肠道 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶活性的影响[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(7):1366-1374.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2025.07.013

消毒剂对日本鳗鲡肠道 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶活性的影响

林建城, 陈伟豪, 曾水琴, 林娟娟

(莆田学院环境与生物工程学院/福建省新型污染物生态毒理效应与控制重点实验室/生态环境及其信息图谱福建省高等学校重点实验室<莆田学院>, 福建 莆田 351100)

摘要: *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶(*NAGase*)是几丁质酶系主要成员之一,为了探讨消毒剂对养殖鱼体消化道几丁质酶活性的影响,从日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)肠道中分离纯化获得*NAGase*酶制剂,利用酶促反应动力学和酶抑制作用动力学方法研究10种消毒剂[甲基蓝、高锰酸钾、硫酸铜、氧化钙、甲醛、戊二醛、乙醇、次氯酸钠、二氯异氰尿酸钠和三氯异氰尿酸(TCCA)]对日本鳗鲡*NAGase*活性的影响;通过对酶荧光发射光谱的测定,研究消毒剂对*NAGase*蛋白质空间构象的影响。结果表明,在特定质量浓度范围内,甲基蓝和硫酸铜对*NAGase*活性具有一定的激活作用,高锰酸钾对*NAGase*有较强的抑制效应,而40.0 mg/L氧化钙可使*NAGase*活性下降11.79个百分点;甲醛、戊二醛、乙醇、次氯酸钠、二氯异氰尿酸钠和三氯异氰尿酸等对*NAGase*活性均具有较强的抑制作用。甲醛对*NAGase*活性的抑制是可逆的,属于非竞争性抑制作用,抑制常数为1.43 mol/L;而TCCA对*NAGase*的抑制是不可逆的。此外,甲醛可使*NAGase*蛋白质内源荧光发射强度明显下降,荧光发射峰出现红移。说明甲醛可引起*NAGase*空间构象变化,也改变了酶中心微环境,导致酶的失活。而小于100 μ mol/L浓度的TCCA对*NAGase*蛋白质内源荧光发射光谱没有明显影响,即TCCA对*NAGase*空间构象影响很小,可能是通过对酶蛋白质巯基的氧化或与蛋白质氨基的共价结合引起*NAGase*的不可逆失活。本研究结果证实了10种消毒剂对日本鳗鲡肠道*NAGase*活性具有较大的调控作用,对水体消毒剂在鱼类养殖中的科学使用具有指导意义。

关键词: 消毒剂; 日本鳗鲡; *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶; 抑制作用; 构象变化

中图分类号: Q556+.2;S965.223 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)07-1366-09

Effects of disinfectants on *N*-acetyl- β -*D*-glucosaminidase activity of Japanese eel *Anguilla japonica*

LIN Jiancheng, CHEN Weihao, ZENG Shuiqin, LIN Juanjuan

(College of Environmental and Biological Engineering, Putian University/Fujian Provincial Key Laboratory of Ecology-toxicological Effects & Control for Emerging Contaminants/Key Laboratory of Ecological Environment and Information Atlas of Fujian Provincial University <Putian University>, Putian 351100, China)

Abstract: *N*-acetyl- β -*D*-glucosidase (*NAGase*) is one of the main components of chitinolytic enzymes. In order to investigate the effects of disinfectants on chitinase in the digestive tract of cultured fish, *NAGase* was extracted from the intestinal tract of Japanese eel, *Anguilla japonica*. The effects of ten disinfectants including methylene blue, potassium permanganate, copper sulfate, calcium oxide, formaldehyde, glutaraldehyde, ethanol, sodium hypochlo-

收稿日期:2024-11-04

基金项目:福建省自然科学基金项目(2023J011004)

作者简介:林建城(1966-),男,福建莆田人,硕士,教授,主要从事生物酶学与食品生物技术研究。(E-mail) ptljc660402@ sina.com

rite, sodium dichloroisocyanurate, and trichloroisocyanuric acid (TCCA) on *NAGase* activities were studied by using the kinetics method of enzyme-catalyzed reaction and kinetics method of enzymatic inhibition. Spatial conformation changes of the *NAGase* influenced by disinfectants were determined through measuring their fluorescence emission spectrum. The results showed that methylene blue and copper sulfate could activate the enzyme activity, while potassium permanganate had a strong inhibitory effect on the enzyme activity in a certain range of mass concentration. 40.0 mg/L of calcium oxide could lead to losing the enzyme activity by 11.79 percentage points, and formaldehyde, glutaraldehyde, ethanol, sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and TCCA also had strong inhibitory effects on *NAGase*. The inhibitory effect of formaldehyde on *NAGase* was reversible and was the non-competitive type. The inhibition constant (K_i) of formaldehyde on the enzyme was determined to be 1.43 mol/L. But the endogenous inhibitory effect of TCCA on *NAGase* was irreversible. Moreover, the fluorescence emission intensity of the *NAGase* treated by formaldehyde was decreased obviously and the fluorescence emission peaks were red-shifted. The results indicated that the inactivation effects of formaldehyde on *NAGase* were caused by the conformational changes and the microenvironment changes in active center of enzyme. But the fluorescence emission spectrum of the *NAGase* treated by TCCA less than 100 μ mol/L concentration had no obvious changes, indicating that TCCA had little effect on the conformation of *NAGase*. TCCA might oxidate the enzyme's sulfhydryls or covalently bound to the amino groups of enzyme, leading to the irreversible inactivation on *NAGase*. The results suggested that ten disinfectants have great regulatory effects on the activities of *NAGase* in the intestines of *Anguilla japonica*. The result is instructive for the scientific use of water disinfectants in fish culture.

Key words: disinfectants; *Anguilla japonica*; *N*-acetyl- β -*D*-glucosaminidase; inhibition; conformational change

几丁质酶包括内切几丁质酶、外切几丁质酶以及 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶 (*N*-acetyl- β -*D*-glucosaminidase, *NAGase*, EC3.2.1.52)。几丁质酶可协同对几丁质进行降解^[1]。研究表明,来源于动物体不同部位的几丁质酶有着不同的生理功能,甲壳动物外壳膜几丁质酶与其周期性蜕皮生理密切相关^[2-3],动物精巢 *NAGase* 可能与其受精与生殖能力相关^[4-5],而水生动物消化道几丁质酶的功能主要表现在对含几丁质食物的消化上^[6]。近年来,有关鱼类几丁质酶性质和功能的研究越来越受到人们的重视。Abro 等^[7]发现北极红点鲑 (*Salvelinus alpinus*) 肠道具有较强的内切几丁质酶、外切几丁质酶活性,肠道后段酶活性较强,胃组织中内切几丁质酶活性比外切几丁质酶活性高几百倍。在吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 前肠和中肠中发现分布有 *tChit1a*、*tChit3* 和 *tChit* 等 3 种几丁质酶,均为非酸性几丁质酶,属于 18 家族几丁质酶;而且鱼胃中几丁质酶表达量相对较低,可能与其是杂食且偏素食的食性相关^[8]。Chen 等^[9]也从中华乌塘鳢 (*Bostrychus sinensis*) 的食道、胃、肝胰腺、肠道等不同部位检测到几丁质酶活性,发现食道和肝胰腺均有较高的几丁质酶转录水平,并从肝胰腺中分离到一种相对分子量为 58 000 的几丁质酶,它是一种耐热型酶,对食物中的几丁质具有强降解能力。相似地,

Pascon 等^[10]发现虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 在喂食 1.5 h 后胃内几丁质酶基因表达量达到峰值,但与欧洲舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 胃几丁质酶比较时,虹鳟鱼胃几丁质酶的活性要低些。此外,从尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[11] 肝脏中也分离到 *NAGase*,相对分子量为 61 800,由 1 个亚基组成,最适 pH 和最适温度分别为 5.8 和 55 $^{\circ}$ C。Kono 等^[12]从日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 胃内分离纯化到一种能降解几丁质的几丁质酶。本课题组也从日本鳗鲡肠道分离纯化到另一种几丁质酶——*NAGase*,并阐明了这种几丁质酶的基本性质和功能基因^[13]。鱼类几丁质酶已成为研究热点。

水体消毒剂在鱼类养殖中正被广泛使用,它主要起到杀虫和抗菌作用,消毒剂按化学本质划分可分为卤素类、氧化剂类、醇醛类、重金属类和染料类等,常见的有高锰酸钾、硫酸铜、甲醛和三氯异氰尿酸 (TCCA) 等。但是,这些消毒剂除了能给鱼类带来急性毒性作用外^[14],还可能进入鱼体内,影响到鱼类的生理代谢。近年来,有关外源性效应物对水生动物 *NAGase* 的影响已有不少研究。Rollin 等^[15]将锯齿长臂虾 (*Palaemon serratus*) 直接暴露在苯醚威、二硫代氨基甲酸盐、丙酮和甲醇等溶液中,发现这些溶液对锯齿长臂虾体内 *NAGase* 活性可直接产生影响。硫酸铜和硫酸锌对尼罗罗非鱼精巢的 *NAGase* 活性均具有较

强的抑制效应^[16],TCCA 还可以直接导致尼罗罗非鱼精巢 *NAGase* 失活^[17]。谢晓兰等^[18]研究发现,次氯酸钠和 TCCA 对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *NAGase* 活性均有较强的抑制作用,戊二醛对该酶则有微弱的激活效应。此外,甲醛对中国鲿(*Tachypleus tridentatus*)内脏 *NAGase* 活性也具有抑制作用,且呈现浓度效应^[19]。这些研究结果显示外源性效应物可直接对动物体 *NAGase* 产生影响。有关消毒剂对鱼类消化道几丁质酶的影响还未见报道,本研究拟选择 10 种常见养殖水体消毒剂,研究其对日本鳗鲡肠道 *NAGase* 活性的影响,进一步探讨甲醛和 TCCA 对 *NAGase* 活性的影响机理,为阐明消毒剂对鱼类消化道几丁质酶的调控机制奠定基础。本研究结果可为鳗鲡养殖水体消毒剂的科学使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

日本鳗鲡新鲜肠购于莆田东源水产食品有限公司。*NAGase* 是由本实验室按照参考文献^[13]的方法用日本鳗鲡肠道制备的电泳纯酶制剂。

对硝基苯-*N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷(pNP- β -*D*-GlcNAc)购于上海底物生化科技有限公司;葡聚糖凝胶(Sephadex G-100)与二乙基氨基乙基纤维素(DEAE-32)均购于北京吉泰科技生物有限公司;磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、氢氧化钠(NaOH)、对硝基苯酚、高锰酸钾、硫酸铜、氧化钙、甲醛、戊二醛、乙醇、次氯酸钠、二氯异氰尿酸钠和 TCCA 等药品均为国产分析纯;甲基蓝为国产生物染色剂。

1.2 试验方法

1.2.1 日本鳗鲡 *NAGase* 活性的测定 *NAGase* 活性的测定参照文献^[13]和文献^[20]的方法。2.0 mL 反应体系包括:0.2 mL 5 mmol/L pNP- β -*D*-GlcNAc 底物、1.0 mL 75 mmol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 缓冲液(pH 6.0)和 0.78 mL 无离子水,在 37 °C 下预保温 10 min,再加入 20 μL 酶制剂。催化反应 10 min,加入 2.0 mL 0.5 mol/L NaOH 终止反应,在 405 nm 波长下测定反应液吸光度(A_{405}),以先加入 2.0 mL 0.5 mol/L NaOH 后加入 20 μL 酶制剂为对照组。以对硝基苯酚为标准品,根据测定获得的标准曲线 $Y=0.0176x$ 计算酶活性,以酶促反应初速度(v) [$\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$]表示。1 个酶活性单位(U)定义

为:在上述条件下,每 1 min 催化产生 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 对硝基苯酚所需要的 *NAGase* 量。

1.2.2 消毒剂对日本鳗鲡 *NAGase* 活性的影响 以甲基蓝、高锰酸钾、硫酸铜、氧化钙、甲醛、戊二醛、乙醇、次氯酸钠、二氯异氰尿酸钠和 TCCA 等 10 种常见的水体消毒剂为效应物,研究消毒剂对日本鳗鲡 *NAGase* 活性的影响。参照文献^[19]的方法,在上述 *NAGase* 的活性测定体系中,分别加入不同浓度的消毒剂,测定 *NAGase* 的剩余活性,以没有加效应物的酶活性为 100%,计算加入消毒剂后酶的相对活性(%),分析各消毒剂对日本鳗鲡 *NAGase* 活性的影响。每个试验重复 3 次,结果以平均值 \pm 标准差表示,采用 Excel 2013 软件进行数据统计与分析,采用 OriginPro 8.5 软件作图。

1.2.3 甲醛和 TCCA 对日本鳗鲡 *NAGase* 活性抑制机理的判断 在 *NAGase* 活性测定体系中,固定底物浓度(S)为 0.5 mmol/L,改变 *NAGase* 的质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$),分别测定 5 种不同浓度(0 mol/L、0.5 mol/L、1.0 mol/L、2.0 mol/L、3.0 mol/L)甲醛和 5 种不同浓度(0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)TCCA 对 *NAGase* 活性的影响,以 v 对 *NAGase* 质量浓度作图,分析甲醛和 TCCA 对日本鳗鲡 *NAGase* 活性的抑制作用机理。

1.2.4 甲醛对日本鳗鲡 *NAGase* 活性的抑制作用类型 在 *NAGase* 活性测定体系中,*NAGase* 质量浓度恒定,改变底物浓度(0.167~0.500 mmol/L),测定 5 种不同浓度(0 mol/L、0.5 mol/L、1.0 mol/L、2.0 mol/L、3.0 mol/L)甲醛对 *NAGase* 活性的影响,采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法,根据在各底物浓度下,经不同浓度甲醛作用后测定的酶促反应速度,以 $1/v$ 对 $1/S$ 作图,测定不同浓度甲醛作用下 *NAGase* 的表观米氏常数(K_{mapp})和表观最大反应速度(V_{mapp}),分析甲醛对日本鳗鲡 *NAGase* 活性的抑制作用类型。

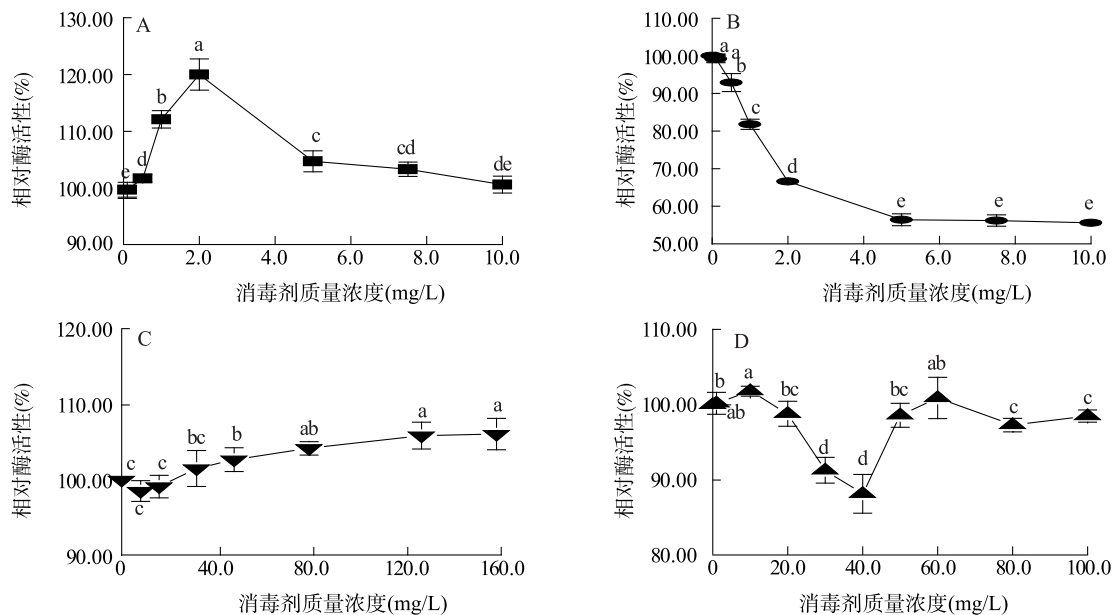
1.2.5 甲醛和 TCCA 对日本鳗鲡 *NAGase* 蛋白质空间构象的影响 分别测定 *NAGase* 蛋白质在不同浓度(0~5.00 mol/L)甲醛和不同浓度(0~200 $\mu\text{mol}/\text{L}$)TCCA 作用下的荧光发射强度,在 227 nm 波长的内源荧光激发光谱下,在 290~410 nm 波长范围内扫描 *NAGase* 蛋白质的荧光发射光谱,根据 *NAGase* 蛋白质的发射光谱的变化规律,分析甲醛和 TCCA 对日本鳗鲡 *NAGase* 蛋白质空间构象的影响。

2 结果与分析

2.1 10种消毒剂对日本鳗鲡 *NAGase* 活性的影响

甲基蓝是一种染料类水体消毒剂,在杀灭寄生虫药物中用于替代孔雀石绿等禁药被广泛使用。由图1可知,质量浓度为0.5~7.5 mg/L时,甲基蓝对日本鳗鲡 *NAGase* 有一定的激活效应,2.0 mg/L甲基蓝可使 *NAGase* 相对酶活性提高 19.97 个百分点。而高锰酸钾是具有强氧化性的消毒剂,能快速氧化酶蛋白质而使酶失活^[14]。质量浓度为0~5.0 mg/L时,高锰酸钾对日本鳗鲡 *NAGase* 活性具有较强的抑制效应,5.0 mg/L高锰酸钾会使 *NAGase* 相对酶活性下降 43.65 个

百分点;之后随着高锰酸钾质量浓度的升高,对 *NAGase* 活性的抑制逐渐趋于平缓。硫酸铜属于重金属类消毒剂,在硫酸铜质量浓度小于 32.0 mg/L时,它对 *NAGase* 活性没有明显影响($P>0.05$),随着质量浓度增大,表现出对酶的微弱激活效应,质量浓度为 160.0 mg/L的硫酸铜可以使 *NAGase* 相对酶活性提升 6.14 个百分点。氧化钙即呈碱性的生石灰,也是养殖水体的消毒剂。质量浓度为10.0~40.0 mg/L时,氧化钙对日本鳗鲡 *NAGase* 表现出明显的抑制效应,质量浓度为 40.0 mg/L的氧化钙可使 *NAGase* 相对酶活性下降 11.79 个百分点,随氧化钙质量浓度增大,其对 *NAGase* 活性的影响效应有所减弱。



A: 甲基蓝; B: 高锰酸钾; C: 硫酸铜; D: 氧化钙。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图1 4种常用消毒剂对日本鳗鲡 *N*-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(*NAGase*)活性的影响

Fig.1 Effect of four common disinfectants on the activity of *NAGase* from *Anguilla japonica*

甲醛和戊二醛作为醛类杀虫药物,对日本鳗鲡 *NAGase* 活性均具有抑制效应(图2),甲醛对 *NAGase* 活性的抑制作用呈明显的浓度效应,浓度为 1.0 mol/L的甲醛可使 *NAGase* 相对酶活性降低 38.29 个百分点,当甲醛浓度达到 5.0 mol/L时, *NAGase* 相对酶活性下降 83.27 个百分点。相似地,0.5 mol/L浓度的戊二醛可使 *NAGase* 相对酶活性下降 50.50 个百分点。乙醇浓度小于 2.0 mol/L时,对日本鳗鲡 *NAGase* 有轻微的激活作用,随着浓度升高,转为对 *NAGase* 活性的抑制作用,6.0 mol/L的乙醇会使 *NAGase* 相对酶活性下降 35.87 个百分点,8.5 mol/L乙

醇可使 *NAGase* 活性几乎全部丧失。

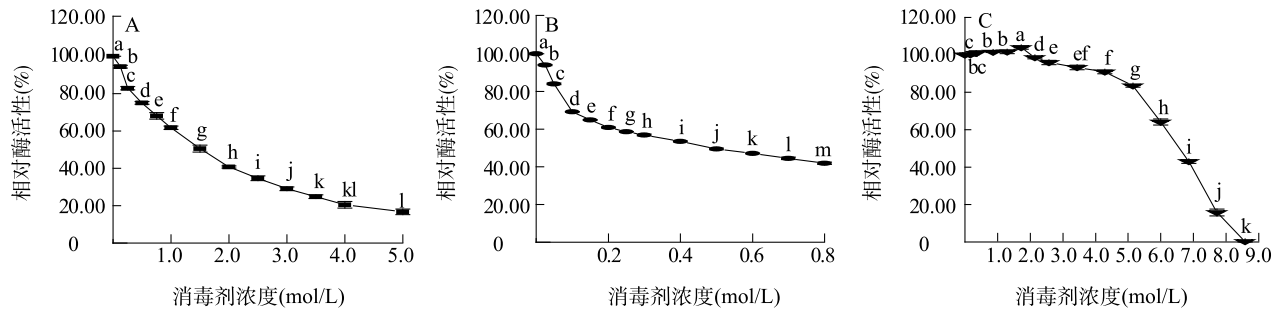
次氯酸钠、二氯异氰尿酸钠和 TCCA 都是氯制剂杀菌药物,3种氯制剂对日本鳗鲡 *NAGase* 活性均有较强的抑制效应(图3),2.0 mmol/L的次氯酸钠可使日本鳗鲡 *NAGase* 相对酶活性下降 91.85 个百分点;而 0.10 mmol/L浓度的二氯异氰尿酸钠和 TCCA 可分别使 *NAGase* 相对酶活性降低 89.87 个百分点和 82.80 个百分点,二氯异氰尿酸钠和 TCCA 对日本鳗鲡 *NAGase* 的抑制作用较强。

2.2 甲醛对日本鳗鲡 *NAGase* 活性抑制机理的判断

以酶促反应速度(v)对 *NAGase* 质量浓度作图

(图 4), 在 0 mol/L、0.5 mol/L、1.0 mol/L、2.0 mol/L 和 3.0 mol/L 等 5 种甲醛浓度下, 获得了 5 条相交于原点的直线, 即 v 与酶质量浓度间呈线性关系, 同时随着甲醛浓度逐渐增大, 相应的直线斜率则不断下降。t 检验分析结果表明, 在甲醛作用下, 相同酶质量浓度下各试验组 *NAGase* 活性之间均存在

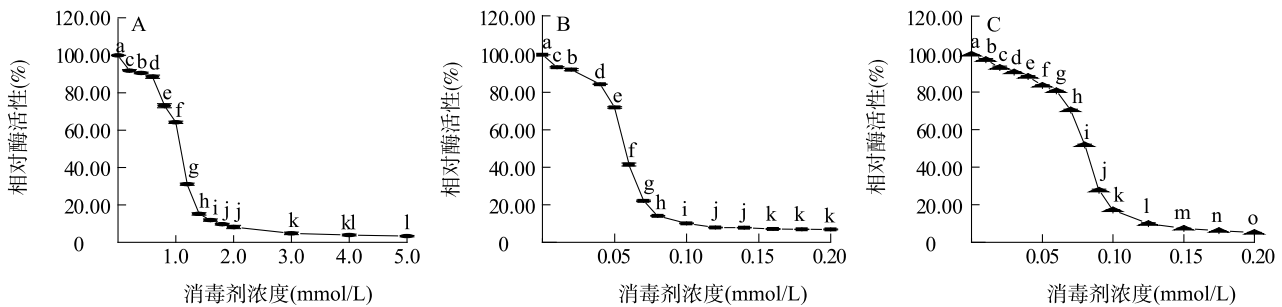
显著差异 ($P < 0.05$)。说明甲醛浓度恒定时, *NAGase* 活性受到的抑制与酶质量浓度成比例, 从而获得了一组随甲醛浓度增大而斜率不断降低的直线^[21]。说明甲醛对日本鳗鲡 *NAGase* 活性的抑制作用是可逆的。



A: 甲醛; B: 戊二醛; C: 乙醇。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 2 醛类和醇类消毒剂对日本鳗鲡 *N*-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (*NAGase*) 活性的影响

Fig.2 Effects of aldehyde and alcohol disinfectants on the activity of *NAGase* from *Anguilla japonica*



A: 次氯酸钠; B: 二氯异氰尿酸钠; C: 三氯异氰尿酸。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 3 氯制剂消毒剂对日本鳗鲡 *N*-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (*NAGase*) 活性的影响

Fig.3 Effects of disinfectant-chlorinated on the activity of *NAGase* from *Anguilla japonica*

2.3 甲醛对日本鳗鲡 *NAGase* 活性的抑制作用类型

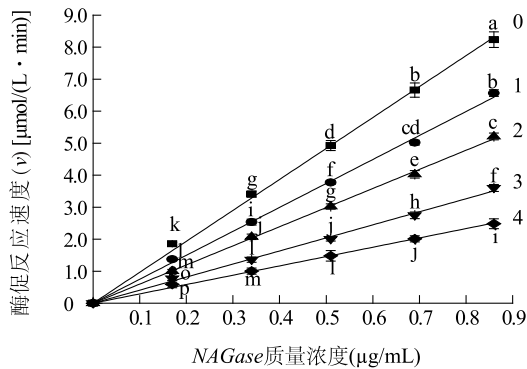
以酶促反应速度倒数 ($1/v$) 对底物浓度倒数 $1/S$ 进行双倒数作图 (图 5), 获得了 5 条斜率不同的直线, 且 5 条直线几乎相交于第二象限横轴上的一点, 而各直线在纵轴上有不同的截距, 随着甲醛浓度增大, 直线在纵坐标上的截距也增大。说明在不同浓度的甲醛作用下, 日本鳗鲡 *NAGase* 的表现米氏常数 (K_{mapp}) 值不变, 随着甲醛浓度增大, 其表现最大反应速度 (V_{mapp}) 值则不断下降, 这符合酶的非竞争性抑制作用动力学的特性^[21]。可以说明甲醛对日本鳗鲡肠道 *NAGase* 活性的抑制属于非竞争性抑制作用。

求出图 5 中 5 条直线的斜率 (k), 以 k 对相应的甲醛浓度作图 (图 6), 获得一条直线, 从该直线在第

二象限横轴上的交点, 可求出甲醛对日本鳗鲡 *NAGase* 的抑制常数 (K_i) 为 1.43 mol/L。

2.4 甲醛对日本鳗鲡 *NAGase* 蛋白质空间构象的影响

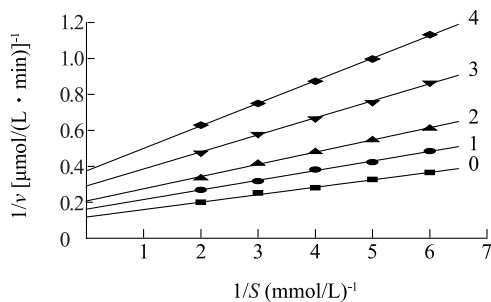
日本鳗鲡 *NAGase* 蛋白质荧光发射峰在 335.9 nm 处, 在 *NAGase* 内源荧光发射光谱扫描波长范围内, 随着甲醛浓度的增大, *NAGase* 蛋白质荧光发射峰呈逐渐降低趋势 (图 7), 1.00 mol/L 甲醛可使 *NAGase* 蛋白质荧光发射峰值下降 34.23%。随着甲醛浓度的增大, *NAGase* 蛋白质荧光发射峰还有轻微的红移, 在 5.00 mol/L 甲醛作用下, *NAGase* 从原蛋白质荧光发射峰的光波长 335.9 nm 红移至 342.0 nm 处。说明加入甲醛会使日本鳗鲡 *NAGase* 蛋白质的空间构象发生改变, 从而导致 *NAGase* 失活。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。0~4 分别对应甲醛浓度为 0 mol/L、0.5 mol/L、1.0 mol/L、2.0 mol/L 和 3.0 mol/L 时所作的直线。

图4 甲醛对日本鳗鲡 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶 (*NAGase*) 活性的抑制机理

Fig.4 Inhibitory mechanism of formaldehyde on *NAGase* from *Anguilla japonica*



0~4 分别对应甲醛浓度为 0 mol/L、0.5 mol/L、1.0 mol/L、2.0 mol/L 和 3.0 mol/L 时所作的直线。1/ v 为酶促反应速度倒数; 1/ S 为底物浓度倒数。

图5 甲醛对日本鳗鲡 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶 (*NAGase*) 抑制作用的 Lineweaver-Burk 关系

Fig.5 Lineweaver-Burk plots for inhibitory effect of formaldehyde on the activity of *NAGase* from *Anguilla japonica*

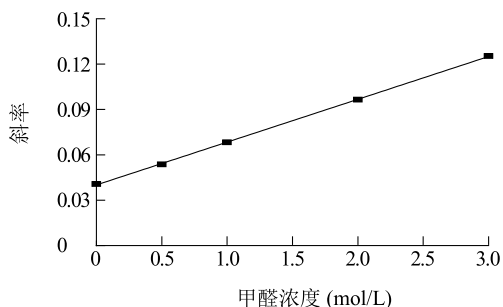
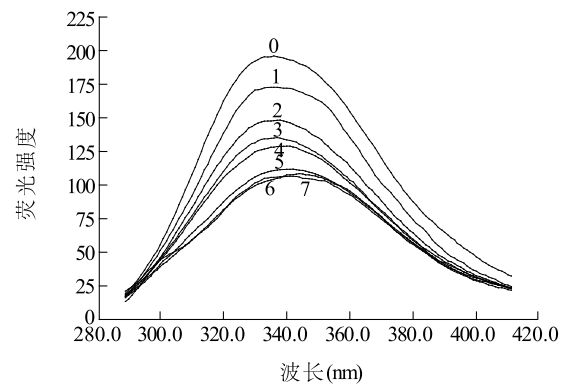


图6 甲醛对日本鳗鲡 *NAGase* 活性抑制常数的测定

Fig.6 Determination of inhibition constants of formaldehyde on the *NAGase* activity from *Anguilla japonica*

2.5 TCCA 对日本鳗鲡 *NAGase* 抑制机理的判断

改变 *NAGase* 质量浓度, 测定了 TCCA 对 *NAGase*



0~7 分别对应甲醛浓度为 0 mol/L、0.125 mol/L、0.250 mol/L、0.500 mol/L、1.00 mol/L、2.00 mol/L、3.00 mol/L 和 5.00 mol/L 时的曲线。

图7 日本鳗鲡 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶 (*NAGase*) 在甲醛溶剂中的内源荧光发射光谱

Fig.7 Endogenous fluorescence emission spectra of *NAGase* from *Anguilla japonica* in formaldehyde solution

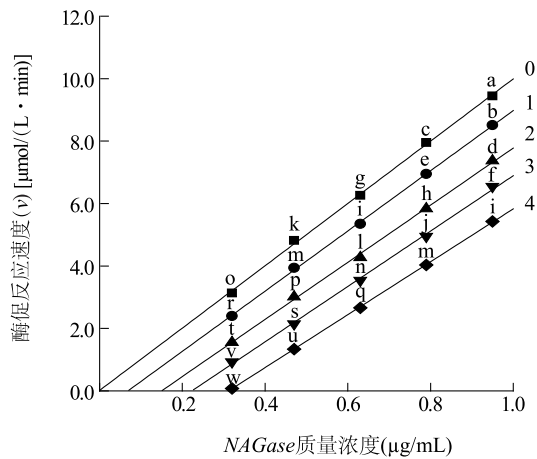
酶促反应速度 (v) 的影响, 以 v 对 *NAGase* 质量浓度作图, 结果 (图 8) 显示: v 与 *NAGase* 质量浓度之间呈线性关系, 随着 TCCA 浓度的增大, 相应的直线不断向右平移, 最终获得 5 条平行线。t 检验分析结果表明, 在 TCCA 作用下, 相同酶质量浓度下各试验组 *NAGase* 活性之间差异显著 ($P < 0.05$), 说明 TCCA 对 *NAGase* 抑制作用是不可逆的^[21]。经 TCCA 作用后, *NAGase* 蛋白质失活, 只有当酶质量大于 TCCA 溶剂量时, 才能表现出酶活性, TCCA 是 *NAGase* 活性的不可逆抑制剂。

2.6 TCCA 对日本鳗鲡 *NAGase* 蛋白质空间构象的影响

TCCA 浓度为 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 时, *NAGase* 蛋白质经 TCCA 作用后, 蛋白质的荧光强度发生微弱的下降; 荧光发射峰没有发生位移现象 (图 9)。随着 TCCA 浓度的增大, *NAGase* 蛋白质的荧光发射强度变化不明显, 与原酶的荧光强度相比, 100 $\mu\text{mol/L}$ TCCA 仅仅使 *NAGase* 蛋白质的荧光发射强度下降 5.25%, 而在该 TCCA 浓度下 *NAGase* 活性已丧失 82.80%; 当 TCCA 溶剂浓度升至 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 酶蛋白质的荧光发射强度下降了 15.40%。分析结果表明, 低于 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 TCCA 对日本鳗鲡 *NAGase* 蛋白质空间构象影响很小。

3 讨论

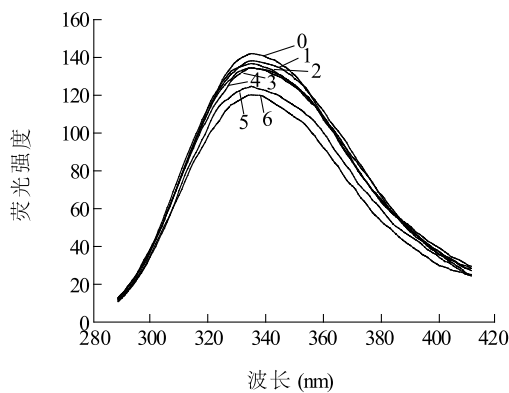
水体消毒剂已被广泛应用在水产养殖中, 起到



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。0~4 分别对应 TCCA 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 、60 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 时作出的直线。

图 8 三氯异氰尿酸 (TCCA) 对日本鳗鲡 *N*-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 的抑制机理

Fig. 8 Determination of the inhibitory mechanism of trichloroisocyanuric acid (TCCA) on NAGase from *Anguilla japonica*



曲线 0~6 对应的 TCCA 浓度分别为 0 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 、60 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、150 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 9 日本鳗鲡 *N*-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 在三氯异氰尿酸 (TCCA) 溶剂中的内源荧光发射光谱

Fig. 9 Endogenous fluorescence emission spectra of NAGase from *Anguilla japonica* in trichloroisocyanuric acid (TCCA) solution

防腐、杀菌和杀虫的作用,这些消毒剂的使用不仅污染了生态环境,对水产动物的生理代谢也会产生直接影响。Wang 等^[22]的研究结果表明,斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 在含硫酸铜环境中暴露 25 d,不仅幼鱼生长性能下降,幼鱼肝脏、胃和肠道中的蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶等消化酶活性也会受到抑制。

而罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 在 1.4 mg/L 亚甲基蓝中暴露 4 d 后,虾肝胰腺超氧化物歧化酶、碱性磷酸酶和酸性磷酸酶等的活性也均显著低于对照组,亚甲基蓝对虾体内的氧化应激系统和免疫能力可直接产生影响^[23]。硫酸铜和硫酸锌均能影响到尼罗罗非鱼精巢 NAGase 蛋白质的内源荧光发射强度,使酶蛋白质空间构象发生改变,从而引起对罗非鱼 NAGase 活性的抑制作用^[16]。在本研究中,在特定浓度范围内,甲基蓝对日本鳗鲡 NAGase 有一定的激活效应;高锰酸钾对 NAGase 活性有较强的抑制作用,当硫酸铜质量浓度达到 32.0 mg/L 后,对日本鳗鲡 NAGase 也具有较小的激活作用,而在 30.0~40.0 mg/L 的质量浓度范围内,氧化钙对日本鳗鲡 NAGase 活性呈现一定的抑制效应。可见,不同消毒剂对日本鳗鲡肠道 NAGase 活性的影响存在差异。

陈宏惠等^[24]研究发现,甲醛对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 内脏 NAGase 活性有较强抑制作用,属于可逆非竞争性抑制;低浓度乙醇对中华绒螯蟹 NAGase 有激活作用,高浓度乙醇对 NAGase 有可逆的抑制作用,而戊二醛对中华绒螯蟹 NAGase 活性没有明显影响。还有研究结果显示,甲醛对中国鲎内脏 NAGase 活性也具有抑制作用,1.0 mol/L 甲醛可使中国鲎 NAGase 活性下降 81.87 个百分点;而乙醇对中国鲎 NAGase 活性的抑制作用相对较弱^[19]。此外,甲醛对中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)^[25] 体壁 NAGase 活性和尼罗罗非鱼^[26] 精子 NAGase 活性均有可逆的抑制作用。本研究结果表明,甲醛、戊二醛和乙醇对日本鳗鲡肠道 NAGase 活性均具有较强的抑制作用,其中甲醛对 NAGase 活性的抑制作用具有浓度效应,属于可逆的非竞争性抑制作用,原因可能是,甲醛有机溶剂的加入可降低 NAGase 溶液的介电常数,破坏酶蛋白质分子表面的水膜,从而引起酶蛋白质相互凝聚而发生变性现象。同时,甲醛还具有较高的反应活性,可以与 NAGase 蛋白质中较强的亲核基团赖氨酸 (Lys) 的 ϵ -氨基发生可逆反应,形成席夫碱^[27],酶蛋白质分子表面的水膜被破坏后也加剧了该反应的进行。Lys 的 ϵ -氨基是日本鳗鲡 NAGase 的必需基团^[13],甲醛对酶蛋白质的功能基团 ϵ -氨基进行化学修饰后还可引起 NAGase 蛋白质空间构象变化,导致酶变性失活^[26]。内源性荧光光谱的变化可以反映蛋白质的构象变化情况^[28],酶蛋白质荧光发射主要是由蛋白质内

源生色基团色氨酸(Trp)引起的^[21],酶蛋白质空间构象的变化使得原来处于酶蛋白质内核疏水区的生色基团 Trp 暴露于极性溶剂中,从而改变了酶蛋白质活性中心疏水微环境,导致酶蛋白质荧光发射强度降低,荧光发射峰发生红移^[29]。本研究结果显示,经甲醛溶剂作用后日本鳗鲡 *NAGase* 蛋白质荧光发射强度降低,荧光发射峰发生微弱的红移,证明甲醛溶剂改变了 *NAGase* 蛋白质空间构象,从而导致酶失活。

次氯酸钠和 TCCA 对凡纳滨对虾内脏 *NAGase* 活性具有不可逆的抑制作用^[18];而 TCCA 对尼罗罗非鱼精巢 *NAGase* 活性则具有可逆的反竞争型抑制作用^[17]。在本研究中,次氯酸钠、二氯异氰尿酸钠和 TCCA 3 种含氯消毒剂对日本鳗鲡 *NAGase* 活性均有较强的抑制效应,TCCA 对日本鳗鲡 *NAGase* 活性的抑制作用是不可逆的。这些说明了 TCCA 消毒剂对不同生物来源的 *NAGase* 活性的抑制机理有差异。此外,TCCA 溶解在水中可产生次氯酸,进而释放出新生态氧和活性氯,它们分别是极强的氧化剂和氯化剂^[30]。研究表明,巯基和 Lys 的 ϵ -氨基都是日本鳗鲡 *NAGase* 的必需基团^[13],所以,TCCA 可能通过对 *NAGase* 蛋白质的巯基产生氧化作用,或者是与酶蛋白质的 ϵ -氨基共价结合形成氯胺,从而使 *NAGase* 蛋白质不可逆地失活。而 TCCA 对蛋白质内源荧光发射强度影响较小,说明 TCCA 溶剂对 *NAGase* 蛋白质的空间构象影响不大,TCCA 可能不是通过改变酶蛋白质的空间构象对酶产生抑制作用。有关 TCCA 与酶蛋白质之间的互作机制,还有待进一步研究。

4 结论

甲基蓝、高锰酸钾和硫酸铜等 10 种消毒剂对日本鳗鲡肠道 *NAGase* 活性有不同的调控作用,其中醇醛类和氯制消毒剂对 *NAGase* 具有较强的抑制作用。甲醛对 *NAGase* 活性的抑制属于可逆的非竞争性抑制,而 TCCA 对 *NAGase* 活性的抑制是不可逆的。甲醛可引起 *NAGase* 蛋白质空间构象变化,而 TCCA 对 *NAGase* 蛋白质空间构象影响很小。为此,在日本鳗鲡养殖水体的消毒中,应谨慎选择消毒剂,才能既起到杀灭水体有害菌类和寄生虫的作用,又能达到健康养殖的功效。

参考文献:

- [1] WANG Y, ZOU H B, LAI J, et al. The miR-282-5p regulates larval moulting process by targeting chitinase 5 in *Bombyx mori*[J]. *Insect Molecular Biology*, 2022, 31(2): 190-201.
- [2] ZHANG B L, LI C L, LUAN Y, et al. The role of chitooligosaccharidolytic β -*N*-acetylglucosaminidase in the molting and wing development of the silkworm *Bombyx mori*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(7): 3850.
- [3] ROLLIN M, COULAUD R, ROCHER B, et al. *N*-acetyl- β -*D*-glucosaminidase activity in *Palaemon serratus*-Methodological optimisation and intrinsic variability[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 2021, 256: 110932.
- [4] SAROSIEK B, GLOGOWSKI J, CEJKO B, et al. Inhibition of β -*N*-acetylglucosaminidase by acetamide affects sperm motility and fertilization success of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) [J]. *Theriogenology*, 2014, 81(5): 723-732.
- [5] SAROSIEK B, DRYL K, KOWALSKI R K, et al. Optimisation of the activation medium and effect of inhibiting activities of acid phosphatase, lactate dehydrogenase and β -*N*-acetylglucosaminidase on the fertilisation success of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) [J]. *Animals*, 2022, 12(3): 307.
- [6] IKEDA M, KAKIZAKI H, MATSUMIYA M. Biochemistry of fish stomach chitinase [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 104: 1672-1681.
- [7] ABRO R, SUNDELL K, SANDBLOM E, et al. Evaluation of chitinolytic activities and membrane integrity in gut tissues of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) fed fish meal and zygomycete biomass [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 175: 1-8.
- [8] 黄金凤,李波,白莹,等. 吉富罗非鱼胃肠道几丁质酶的克隆、组织分布和纯化 [J]. *广东农业科学*, 2021, 48(6): 107-115.
- [9] CHEN Y L, TAO Z P, ZHANG M H, et al. Identification of a chitinase from the hepatopancreas of Chinese black sleeper (*Bostrychus sinensis*) [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2021, 40(6): 50-60.
- [10] PASCON G, DANISO E, CARDINALETTI G, et al. Postprandial kinetics of digestive function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): genes expression, enzymatic activity and blood biochemistry as a practical tool for nutritional studies [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2024, 288: 111559.
- [11] 陈晓佳,孙林浩,袁阳,等. 尼罗罗非鱼肝脏 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质分析 [J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2019, 58(5): 685-691.
- [12] KONO M, MATSUI T, SHIMIZU C, et al. Purification and some properties of chitinase from the stomach of Japanese eel, *Anguilla*

- japonica*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1990, 54(4): 973-978.
- [13] 林建城, 胡建辉, 吴钦端. 日本鳗鲡肠道 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质[J]. 水生生物学报, 2022, 46(9): 1301-1309.
- [14] 刘银华, 何国森, 钱毅, 等. 5种常用消毒剂对锦鲤幼鱼的急性毒性试验[J]. 渔业研究, 2019, 41(1): 70-74.
- [15] ROLLIN M, COULAUD R, ROCHER B, et al. Effects of chemical compounds on the activity of the *N*-acetyl- β -*D*-glucosaminidase of the marine prawn, *Palaemon serratus*: screening *in vitro*[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2023, 42(4): 846-858.
- [16] 张伟妮, 谢璐娜, 黄小红. CuSO_4 和 ZnSO_4 对尼罗罗非鱼 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶的影响[J]. 水生生物学报, 2015, 39(6): 1093-1099.
- [17] 张伟妮, 陈晓佳, 沈林松, 等. 强氯精对尼罗罗非鱼精巢 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶的失活动力学[J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23(2): 306-311.
- [18] 谢晓兰, 黄乾生, 魏晓倩, 等. 养殖常用消毒药物对凡纳滨对虾 *NAGase* 活力的影响[J]. 水生态学杂志, 2009, 30(4): 108-112.
- [19] 林建城, 吴建洪, 林娟娟. 有机溶剂来源污染物对中国鲎 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51(6): 42-49.
- [20] ZHANG W N, BAI D P, HUANG Y F, et al. Enzymatic characterizations and activity regulations of *N*-acetyl- β -*D*-glucosaminidase from the spermary of Nile *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*) [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 117(2): 153-157.
- [21] 陈清西. 酶学及其研究技术[M]. 2版. 厦门: 厦门大学出版社, 2015.
- [22] WANG T, LONG X H, CHENG Y Z, et al. A comparison effect of copper nanoparticles versus copper sulphate on juvenile *Epinephelus coioides*: growth parameters, digestive enzymes, body composition, and histology as biomarkers[J]. International Journal of Genomics, 2015, 2015(1): 783021.
- [23] 敖士齐, 翟乾, 纪鹏, 等. 亚甲基蓝对罗氏沼虾组织结构、抗氧化系统及免疫能力的影响[J]. 淡水渔业, 2023, 53(1): 49-56.
- [24] 陈宏惠, 李文迹, 黄小红, 等. 醇、醛类有机物对中华绒螯蟹 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶的影响[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2007, 36(1): 82-87.
- [25] 林娟娟, 朱秋香, 林建城. 有机溶剂对中国明对虾体壁 *N*-乙酰- β -*D*-氨基葡萄糖苷酶活力的影响[J]. 福建农业学报, 2015, 30(12): 1143-1148.
- [26] ZHANG W N, BAI D P, LIN X Y, et al. Inactivation kinetics of formaldehyde on *N*-acetyl- β -*D*-glucosaminidase from Nile *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2014, 40(2): 561-569.
- [27] 韩庚, 张翠英, 朱蕾蕾. 甲醛对甲醛裂合酶结构的修饰作用研究[J]. 天津科技大学学报, 2024, 39(3): 9-14, 63.
- [28] DOS SANTOS RODRIGUES F H, DELGADO G G, SANTANA DA COSTA T, et al. Applications of fluorescence spectroscopy in protein conformational changes and intermolecular contacts [J]. BBA Advances, 2023, 3: 100091.
- [29] CHAI W M, LIN M Z, SONG F J, et al. Rifampicin as a novel tyrosinase inhibitor: inhibitory activity and mechanism [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 102: 425-430.
- [30] 张健, 李赫, 李敬伟, 等. 3种水产药物对松荷鲤的急性毒性[J]. 渔业研究, 2024, 46(2): 162-170.

(责任编辑: 陈海霞)