

凡纳滨对虾多酚氧化酶的纯化及性质分析

鲍俊旺¹, 李越¹, 翁凌^{1,2}, 张凌晶^{1,2}, 孙乐常^{1,2}, 曹敏杰^{1,2}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2. 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 通过硫酸铵盐析、DEAE-Cellulose 离子交换、Phenyl-Sepharose 疏水层析、Hi-Trap Capto-Q 强阴离子交换层析等方法, 从凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 虾头中分离纯化出一种多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO), 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 显示其分子质量约为 210 ku。肽质量指纹图谱的比对结果表明, 纯化得到的 PPO 中含有 187 个氨基酸残基的 14 个片段与 NCBI 数据库中多酚氧化酶原 (gi | 147724160) 序列相似性为 100%。该酶的最适温度和最适 pH 值分别为 40 °C 和 6.0, 且在温度 0 ~ 50 °C 及 pH = 5.0 ~ 8.0 可保持相对稳定的活性。圆二色谱分析结果表明, 对虾 PPO 的二级结构主要为反平行结构及无规则卷曲。抗坏血酸、茶多酚和特丁基对苯二酚 (tertiary butylhydroquinone, TBHQ) 等具有生物活性羟基的抑制剂对其均有较好的抑制效果。

[关键词] 凡纳滨对虾; 多酚氧化酶; 纯化; 黑变

[中图分类号] Q 819

Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

BAO Junwang¹, LI Yue¹, WENG Ling^{1,2}, ZHANG Lingjing^{1,2}, SUN Lechang^{1,2}, CAO Minjie^{1,2}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. National & Local Joint Engineering Research Center for Aquatic Products Processing, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this study, a polyphenol oxidase (PPO) was purified to homogeneity from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by ammonium sulfate fractionation and column chromatographies including DEAE-Cellulose, Phenyl-Sepharose HP and Hi-Trap Capto-Q. SDS-PAGE showed that the molecular weight of *L. vannamei* PPO was about 210 ku and its optimal temperature and pH were 40 °C and 6.0, respectively. Comparison of sequences between the purified PPO and prophenol oxidase (gi | 147724160) of *L. vannamei* in the database of NCBI showed a similarity of 100% on 187 amino acid residues of 14 peptide fragments. The activity of PPO remained stable at 0-50 °C and in the pH range of 5.0-8.0. The secondary structure of PPO was mainly anti-parallel β sheet and random coil as revealed by circular dichroism (CD). Additives of ascorbic acid, tea-polyphenols, and tertiary butylhydroquinone (TBHQ) inhibited the enzyme activity effectively.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; polyphenol oxidase; purification; melanosis

[收稿日期] 2018-03-09

[基金项目] 福建省科技计划项目 (2017N5011); 厦门南方海洋研究中心项目 (14CZP030HJ04)

[作者简介] 鲍俊旺 (1991—), 男, 硕士生, 从事食品生物技术研究。通信作者: 曹敏杰 (1964—), 男, 教授, 主要从事蛋白质化学及水产品深加工研究。E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

0 引言

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*), 通称白对虾 (white shrimp), 是世界上养殖量最大的三大虾类之一。凡纳滨对虾肌肉中含有多种人体必需氨基酸, 而含量最高的是与呈味性质相关的谷氨酸, 其次还含有大量的精氨酸及天冬氨酸。此外, 对虾肌肉中还含有不饱和脂肪酸, 其中促进人脑智力发育的二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 的相对含量在脂肪酸总量中占比近 20%^[1]。同时, 由于凡纳滨对虾具有生长迅速、环境适应能力强以及肌肉含量高的特点, 因此, 它在我国沿海地区占有相当大的海水以及淡水养殖份额。广东省、广西省、浙江省、福建省等水温水质适宜的省份, 已成为我国凡纳滨对虾的重要养殖地和出产地^[2]。2016 年, 我国凡纳滨对虾的养殖总产量达 167 万 t^[3]。

然而, 对虾死后常出现由体内多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 作用所引起的黑变现象。黑变现象不仅严重影响了对虾的感官品质和新鲜程度, 也大幅降低了其商品价值。据研究, 对虾肝胰腺中的丝氨酸蛋白酶在对虾死后因肝胰腺破裂而释放, 导致无黑变效应的酚氧化酶原 (prophenol oxidase, proPO) 在丝氨酸蛋白酶的作用下转化为具有活性的 PPO^[4-5]。PPO 是一种以铜离子为催化中心的金属氧化酶, 可将单酚类物质氧化为双酚类物质, 而双酚类物质可被进一步氧化, 生成具有颜色的醌类物质。这些醌类物质与蛋白质或氨基酸相结合, 产生肉眼可见的黑色物质, 即为引起对虾黑变的主要原因^[6]。

对于虾类体内 PPO 的研究已有很多报道, 如: Simpson 等^[7]利用亲和层析法从白对虾 (*Penaeus setiferus*) 分离获得分子质量为 30 ku 的 PPO; Benjakul 等^[8]从日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 体内分离得到分子质量为 160 ku 的 PPO; Zamorano 等^[9]从长额拟对虾 (*Parapenaeus longirosteis*) 中分离的 PPO 分子质量为 200 ku; Lai 等^[10]利用分子克隆技术从凡纳滨对虾中克隆了 PPO 基因全序列, 并推测该酶的分子质量为 78.1 ku。综合国内外的研究结果, 来源于不同种类的对虾的 PPO 分子质量在 30 ~ 200 ku 不等, 差异很大。更值得关注的是, 从蛋白质水平对 PPO 的研究没有解决其结构问题, 而从基因水平的研究则缺乏酶学性质的分析。鉴于 PPO 在对虾保鲜加工中的重要作用, 有必要对其理化性质做更加深入全面的解析。因此, 本研究采用盐析、DEAE-Cellulose、Phenyl-Sepharose HP、Hi-Trap Capto-Q 等多种柱层析方法将凡纳滨对虾 PPO 进行分离纯化, 利用质谱技术对 PPO 的一级结构进行解析, 探讨不同温度、pH 值、抑制剂对其活性的影响, 并对其二级结构作了分析, 以期为进一步阐明凡纳滨对虾 PPO 的特性并有效抑制对虾的死后黑变提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

鲜活凡纳滨对虾 (*L. vannamei*), 购于厦门集美菜市场。清水洗净后, 置于冰水中猝死, 取虾头用于实验。

DEAE-Cellulose, 美国 Whatman 公司产品; Phenyl Sepharose HP、Hi-Trap Capto-Q, 美国 GE Healthcare 公司产品; 蛋白质标准品, 立陶宛 Fermentas 公司产品; 左旋多巴 (*L-Dopa*), 美国 Aladdin 公司产品; 茶多酚 (Tea Polyphenols/GTP), 上海 EKEAR 公司产品。其他试剂均为国产分析纯 (AR)。

组织捣碎机 PT-2100 (Kinematica, 瑞士); 高速冷冻离心机 (Avanti JA-26.5 Beckman, 美国); 凝胶成像仪 (G-BOX Syngene, 英国); 圆二色光谱仪 (Chirascan Applied Photophysics, 英国); 恒温水浴锅 (Mettler, 德国); pH 计 (Sartorius, 德国)。

1.2 实验方法

1.2.1 凡纳滨对虾 PPO 的分离纯化

原料的前处理方法参照 Nirmal 等^[12]的方法作适当修改, 取 0.5 kg 对虾头部剪碎, 加入到 5 倍虾

头质量的冰冷 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (PBS, pH = 7.2) 中, 用组织捣碎机充分捣碎, 加入体积分数 0.2% Triton X-100 促溶, 搅拌静置后离心 (12000g, 30 min)。所获得的上清溶液进行 0 ~ 40% 饱和浓度的硫酸铵盐析, 离心取沉淀。将沉淀用适量的 50 mmol/L PBS (pH = 7.2) 溶解后装入透析袋中对相同缓冲液充分透析。用 DEAE-Cellulose (2.5 cm × 15 cm) 阴离子交换柱进行分离, 并以含 0 ~ 0.5 mol/L NaCl 的 50 mmol/L PBS (pH = 7.2) 溶液进行线性洗脱, 同时测定每个组分中的酶活力及蛋白质含量 (A_{280}) 并收集 PPO 酶活力较高的组分 (粗酶液)。

向粗酶液中加入等体积的 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 搅拌混合均匀后用 0.22 μm 膜抽滤。上样于 Phenyl-Sepharose HP (5 mL) 疏水层析柱, 先用含有 0.2 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的缓冲液进行洗脱, 后用含 0.2 ~ 0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的缓冲液进行线性洗脱, 测定每个组分中的酶活力及蛋白质含量, 收集酶活力较高的组分。将收集的组分用 50 mmol/L PBS (pH = 7.2) 透析, 0.22 μm 膜抽滤, 上样于 Hi-Trap Capto-Q (5 mL) 阴离子交换柱, 用含 0 ~ 0.5 mol/L NaCl 的 50 mmol/L PBS (pH = 7.2) 进行线性洗脱。测定各组分的酶活力及蛋白质含量, 收集酶活力较高的组分, 用 SDS-PAGE 鉴定其纯度。

1.2.2 PPO 的活力测定

PPO 的活力测定参照 Chen 等^[13]的方法略作修改。以左旋多巴 (*L*-Dopa) 为底物, 将 50 μL 粗酶液加入 500 μL 含底物 *L*-Dopa (15 mmol/L) 的缓冲液 (pH = 6.0) 中, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min, 用紫外分光光度计迅速测定反应液在 475 nm 处的吸光度值。PPO 作用于底物后, 在 475 nm 处释放出有最大吸光度的物质, 以该物质的浓度来衡量该条件下酶活力的大小。在上述条件下, 将每分钟催化底物使反应体系吸光度值增加 0.001 所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

1.2.3 SDS-PAGE

采用聚丙烯酰胺质量分数为 7.5% 的凝胶进行 SDS-PAGE 分析, 电泳结束后进行硝酸银染色, 用凝胶成像仪记录染色后的结果。

1.2.4 PPO 的多巴活性染色

PPO 活性染色的方法参照 Nirmal^[11]的方法略作修改。在不加热粗酶液样品的前提下, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 Native-PAGE。电泳后, 将凝胶与底物在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min。由于固定在凝胶上的 PPO 与 *L*-Dopa 反应将产生黑色物质, 因此在凝胶相应的位置上会出现黑色条带。

1.2.5 PPO 的肽指纹质量图谱分析

纯化的 PPO 样品进行聚丙烯酰胺质量分数为 7.5% 的 SDS-PAGE 分析, 用质谱银染法进行染色。将样品使用胰蛋白酶酶解处理后, 使用串联飞行时间质谱仪 (5800 MALDI-TOF/TOF, AB SCIEX) 进行测试分析, 设置激光源为 Nd: YAG 激光器 (波长 335 nm), 加速电压为 2 kV, 扫描范围为 800 ~ 4 000 u, 采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据。其中, 一级质谱 (MS) 中选择 8 个信噪比大于 50 的母离子进行二级质谱 (MS/MS) 分析, 二级质谱 (MS/MS) 激光累计叠加 2500 次。

质谱结果用 Mascot 2.2 软件在 NCBI 数据库检索, 最后得到鉴定的蛋白质结果, 根据 Mascot 2.2 标准 ($P < 0.05$) 对目的蛋白进行评分。

1.2.6 PPO 的最适温度和热稳定性

PPO 最适温度的测定在 0 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$ 下分别进行, 按照节 1.2.2 描述的酶活力测定方法进行测定。而 PPO 的热稳定性测定, 是将 PPO 置于 0 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$ 下 (每 10 $^{\circ}\text{C}$ 一个间隔) 孵育 30 min 后, 恢复至室温, 再测定酶活力。

1.2.7 PPO 的最适 pH 值及 pH 值稳定性

PPO 的最适 pH 值及 pH 值稳定性的测定参照蒋经纬等^[14]的方法略作修改。最适 pH 值的测定方法为: 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下, 于不同 pH 值的缓冲液中加入终浓度为 15 mmol/L 的 *L*-Dopa, 测定 PPO 在不同 pH 值反应条件下的活力。pH 值稳定性的测定方法为: 将纯化的酶液置于 pH = 3.0 ~ 9.0 的一系列缓冲液中孵育 30 min 后, 取出少量酶液置于 pH = 6.0 的缓冲液中, 测定其酶活力。

1.2.8 PPO 的圆二色谱测定

将纯化的 PPO 溶液超滤浓缩, 调整其蛋白质质量浓度至 0.2 g/L, 放入 0.2 cm 光径长度的比色皿中进行圆二色谱分析。设置波长范围为 190 ~ 260 nm, 步进值为 1.0, 带宽为 1 nm, 单点扫描时间为 0.5 s, 温度为 20 ℃, 对同一样品重复测量 3 次。

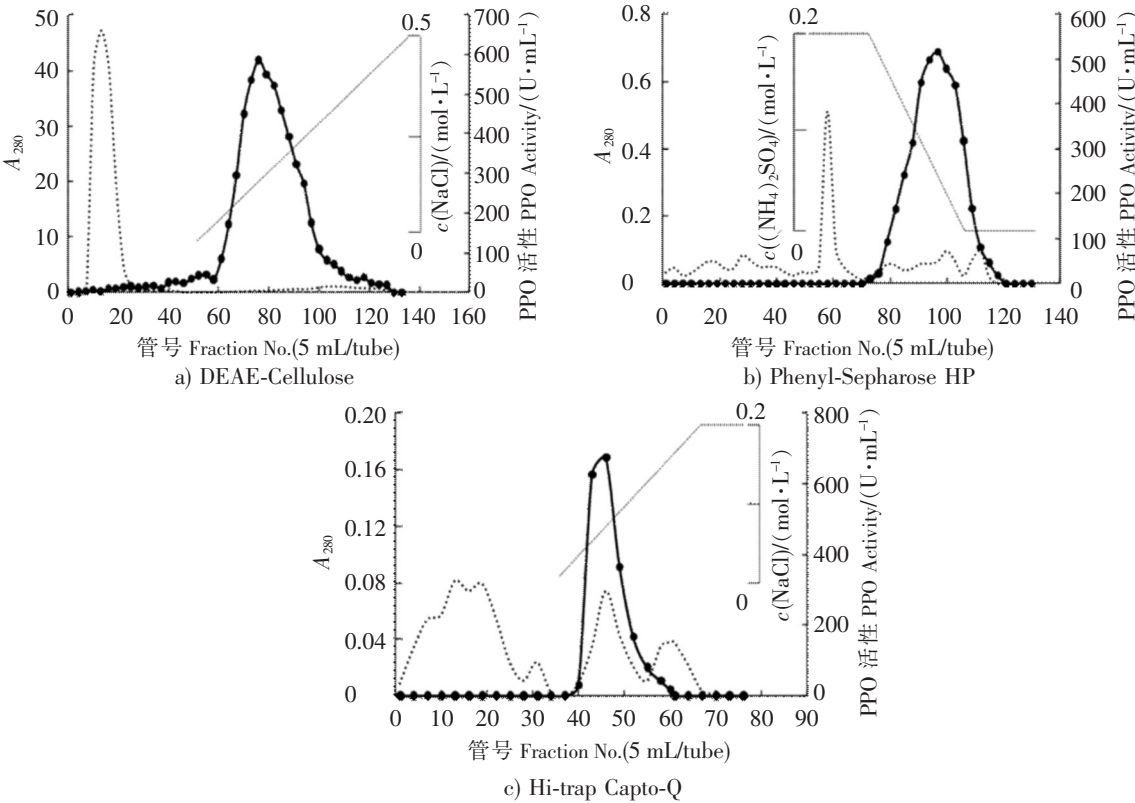
1.2.9 抑制剂对 PPO 活性的影响

将酶液置于 pH = 6.0 的缓冲液中, 加入不同的抑制剂至相应终浓度, 在 37 ℃ 下孵育 30 min。在孵育后的体系中加入底物 *L*-Dopa 至终浓度为 15 mmol/L, 反应 30 min 后, 测定酶活力。

2 结果与讨论

2.1 PPO 的分离纯化

图 1 为对虾 PPO 分离纯化的柱层析图谱。由图 1a 可知, 样品经过 DEAE-Cellulose 阴离子交换柱后, 去除了大量未吸附杂蛋白质, 而以 *L*-Dopa 为底物的具有活性的对应组分被吸附。采用含 0 ~ 0.5 mol/L NaCl 的 50 mmol/L PBS (pH = 7.2) 对上述组分进行线性洗脱, 收集活性组分并加入 (NH₄)₂SO₄ 固体至终浓度为 1 mol/L, 之后对该溶液进行 Phenyl-Sepharose HP 疏水柱层析。样品经过 Phenyl-Sepharose HP 柱层析的结果如图 1b 所示。经 0.2 mol/L (NH₄)₂SO₄ 缓冲液阶段洗脱, 去除了大量的未吸附杂蛋白质。将目的蛋白用浓度为 0.2 ~ 0 mol/L 的 (NH₄)₂SO₄ 进行线性洗脱, 收集活性组分进行 Hi-Trap Capto-Q 强阴离子交换层析。样品经过 Hi-Trap Capto-Q 层析的结果如图 1c 所示, 目的蛋白与杂蛋白得到了有效分离, 且酶活力峰与其中一个蛋白质峰重叠, 说明该蛋白质峰为具酶活力的主要组分。



说明: 280 nm 吸收值(···), PPO 酶活性(●)
Notes: 280 nm adsorption value(···), PPO enzyme activity(●)

图 1 凡纳滨对虾 PPO 的柱层析纯化图
Fig.1 Column chromatographic purification of *L. vannamei* PPO

将经过 Hi-Trap Capto-Q 纯化后的组分进行 SDS-PAGE、Native-PAGE 及多巴活性染色分析，其结果如图 2 所示，可见，SDS-PAGE 及 Native-PAGE 中均显示单一条带，表明本研究中的 PPO 得到了纯化，其分子质量约为 210 ku。纯化后的 PPO 经活性染色处理后，对应的条带位置与 Native-PAGE 的条带位置一致，进一步说明所得到的物质为 PPO。相比于前期对 PPO 的研究结果报道，本文所获得的 PPO 分子质量不同于 Simpson 等^[7]从白对虾（*Penaeus setiferus*）分离的 PPO（30 ku）和 Benjakul 等^[8]从日本对虾（*Penaeus japonicus*）中获得的 PPO（160 ku），而与 Zamorano 等^[9]从长额拟对虾（*Parapenaeus longirosteis*）中分离的 PPO（200 ku）相似。

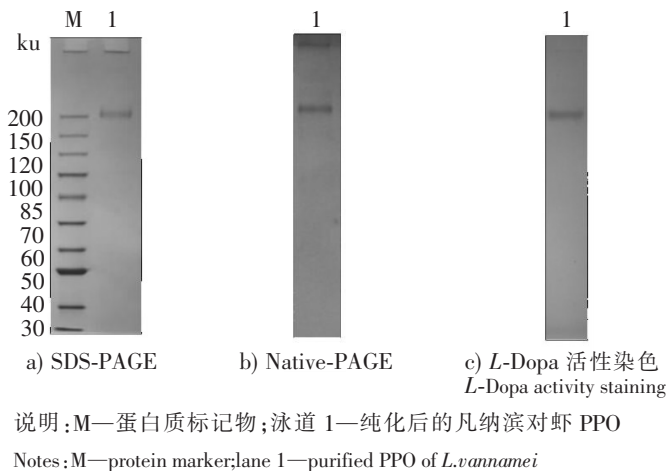


图 2 对虾 PPO 的电泳分析

Fig.2 Electrophoresis analysis of PPO

为了获得 PPO 的一级结构信息，对纯化 PPO 进行质谱分析。选择一级质谱结果中信噪比大于 50 的肽段进行 MS/MS 分析，二级质谱结果如图 3 所示，共得到 14 个肽段，含有 187 个氨基酸残基（见表 1）。将 MS/MS 分析结果与 NCBI 数据库中的蛋白质序列进行比对发现，与凡纳滨对虾（*L. vannamei*）的酚氧化酶原（gi|147724160）的序列相似性为 100%（见图 4），进一步证明纯化的酶为酚氧化酶。但是，酚氧化酶原全长仅为 690 个氨基酸残基（见图 4），推测分子质量为 78.5 ku，远低于 SDS-PAGE 所显示的 210 ku（图 2）。分析原因，可能是由于 PPO 易生成难于被 SDS 化解离的多聚体而导致的。Zamorano 等^[9]利用活性染色法对长额拟对虾 PPO 的研究发现了分子质量为 500 ku 的条带，表明 PPO 易形成多聚体。在本文中，仅图 2a 的样品经非还原的 SDS 化，而图 2b、图 2c 的样品均未经加热处理，PPO 仍可能以多聚体的形式存在，详细原因有待进一步分析。

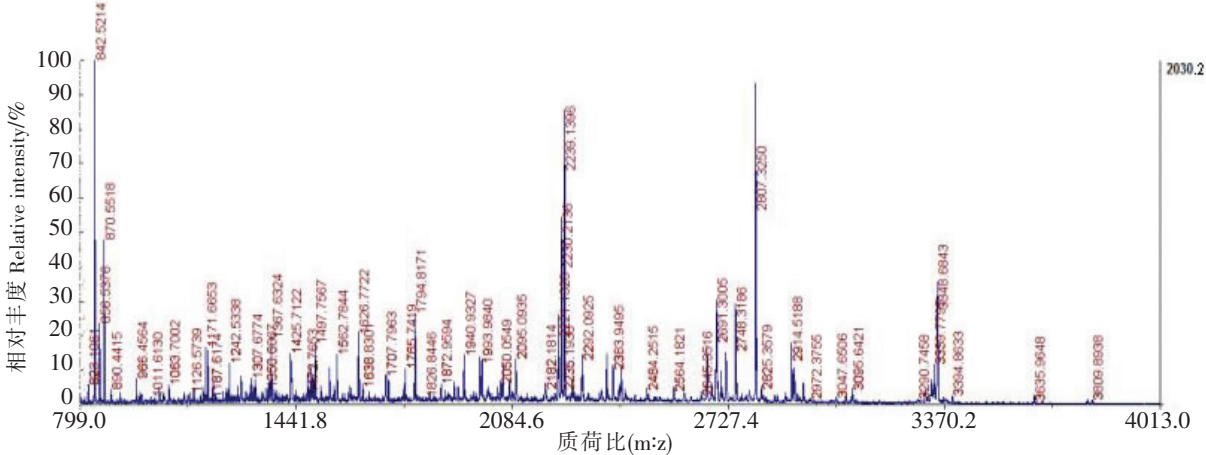


图 3 凡纳滨对虾 PPO 的二级肽指纹图谱

Fig.3 MS/MS analysis of purified *L.vannamei* PPO

表 1 二级质谱所获得的肽段序列
Tab.1 Peptide sequences of PPO obtained from MS/MS

起始位点 – 终止位点	理论分子质量	检测分子质量	分子量差值	肽段序列
Start-end	Calc. mass/u	Obsrv. mass/u	Molecular weight difference/u	Peptide sequence
153 – 168	1 910.052 7	1 909.939 2	–0.1135	LIPQEQLMKAQLEVNR
227 – 241	1 884.924 8	1 884.929 2	0.0044	KGELFFYMHQQMVAR
262 – 271	1 136.562 3	1 136.571 3	0.0090	APIEDGYFPK
280 – 295	1 940.892 0	1 940.934 2	0.0422	AWGSRQDDTVMQDFLR
315 – 327	1 562.778 4	1 562.783 3	0.0049	LFDAIHQGF MIDR
388 – 401	1 528.644 0	1 528.639 5	–0.0045	EEMAVMGDTSTAMR
411 – 420	1 291.584 1	1 291.591 7	0.0076	FVDDTFQEYK
421 – 437	1 976.027 0	1 976.021 0	–0.0060	LMQRPYTEQDLNLAGVK
426 – 459	1 626.762 0	1 626.771 6	0.0096	NNEADVLHTGWNTR
466 – 477	1 360.715 5	1 360.721 7	0.0062	GLDFNGRPVMVR
516 – 525	1 242.524 2	1 242.535 3	0.0111	GQEMSFM EQR
534 – 547	1 540.859 5	1 540.863 8	0.0043	FTVSLKPGSNHVVR
551 – 563	1 482.707 2	1 482.708 5	0.0013	DSSITNAEELTFR
639 – 651	1 598.742 1	1 598.785 2	0.0431	YPDTRPMGF PFDR

Prophenol oxidase (Litopenaeus vannamei)	MDKSRKNLLYFELPHDPISLFRGGGKIHFLENLDRFPVVVATRLGGGVFVETTFVPDR	60
Purified PPO (Litopenaeus vannamei)	0
Prophenol oxidase (Litopenaeus vannamei)	EDALPQNLTGAASVPIGSPFSFFIKSHRQAAKDLCDVFMRTKGAEDLLQVAARVHGQVNE	120
Purified PPO (Litopenaeus vannamei)	0
Prophenol oxidase (Litopenaeus vannamei)	TLFIYALSFVILRKKELRNVRLPSIIIEVFPGRLIPQEQLMKAQLEVNRTPDNQSEPVVVE	180
Purified PPO (Litopenaeus vannamei)LIPQEQLMKAQLEVNR.....	16
Prophenol oxidase (Litopenaeus vannamei)	HGLEFSGTHLKEPHRLAYWREDYGINAHHWHHLVYPIDMGVNRDRKGELFFYMHQQMVA	240
Purified PPO (Litopenaeus vannamei)KGELFFYMHQQMVA	30
Prophenol oxidase (Litopenaeus vannamei)	EYDMERLSLGLPRVQKLENWRAPIEDGYFPKLTVNNSGRAWGSRQDDTVMQDFLRNDFGL	300
Purified PPO (Litopenaeus vannamei)	R.....APIEDGYFEK.....AWGSRQDDTVMQDFLR.....	57
Prophenol oxidase (Litopenaeus vannamei)	DFTDVTDLIEWRSRLFDAIHQGF MIDRAGKRVVLSDDVTSGRRGIDILGDALEADSNLSV	360
Purified PPO (Litopenaeus vannamei)LFDAIHQGF MIDR.....	70
Prophenol oxidase (Litopenaeus vannamei)	NSFYYGDLHNMGHVLIASFHSDPFAHEEEMAVMGDTSTAMRDFVFYRWHEFVDDTFQEYK	420
Purified PPO (Litopenaeus vannamei)EEMAVMGDTSTAMR.....FVDDTFQEYK	94
Prophenol oxidase (Litopenaeus vannamei)	LMQRPYTEQDLNLAGVKIERAGVVRNNEADVLHTGWNTLFEASRLGLDFNGRFVMVRLTH	480
Purified PPO (Litopenaeus vannamei)	LMQRPYTEQDLNLAGV.....NNEADVLHTGWNTR.....GLDFNGRFVMVR...	137
Prophenol oxidase (Litopenaeus vannamei)	LDHEPFNYHLQVSNSGRGVKEVTVRVFLAPKLNARGQEMSFM EQRILWAEMDRFTVSLKP	540
Purified PPO (Litopenaeus vannamei)GQEMSFM EQR.....FTVSLKP	154
Prophenol oxidase (Litopenaeus vannamei)	GSNHVVRSRKDSSITNAEELTFRDLNANIDPASFEATGFNFCGCGWQFCHMLLPRGRPEG	600
Purified PPO (Litopenaeus vannamei)	GSNHVVR...DSSITNAEELTFR.....	174
Prophenol oxidase (Litopenaeus vannamei)	MFFQLFFMLTDYADKVTQPAARGCANGVSFCGIQDAKYEDTRPMGF PFDRRFPPTLLDQ	660
Purified PPO (Litopenaeus vannamei)YEDTRPMGF PFDR.....	187
Prophenol oxidase (Litopenaeus vannamei)	FVNTAADYARLENAFIHEISIKFLAERLNR	690
Purified PPO (Litopenaeus vannamei)	187

图 4 纯化的 PPO 与凡纳滨对虾的酚氧化酶原(gil147724160)的序列比对结果 (相符片段已加粗标注)
Fig.4 Comparison of purified PPO and prophenol oxidase (gil147724160) of *L. vannamei*
(Identical amino acid residues were shown in dark)

2.2 凡纳滨对虾 PPO 的性质分析

2.2.1 PPO 的最适温度和热稳定性

由图 5a 可见，PPO 的最适温度为 40 ℃。对 PPO 热稳定性的测量结果如图 5b 所示，由图 5b 可见，在 0~40 ℃ 下，酶活力基本保持不变，当温度高于 40 ℃ 时，酶活力呈现明显的下降趋势，并于 80 ℃ 时消失。PPO 的最适温度为 40 ℃，与挪威海龙虾 (*Nephrops norvegicus*)^[6]、中国对虾 (*Fenneropenous chinensis*)^[15]、日本对虾的 PPO 最适温度一致^[17]，高于长额拟对虾 (*Parapenaeus longirosteis*)^[10] PPO 的最适温度 (30 ℃)。在热稳定性方面，PPO 在 0~50 ℃ 下保持相对稳定，当温度高于 50 ℃ 时，酶活力迅速下降。

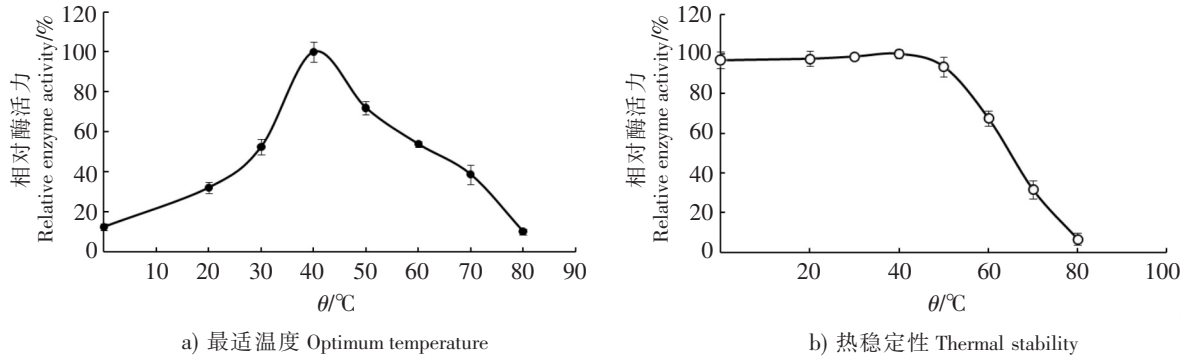


图 5 温度对 PPO 活性的影响
Fig.5 Effects of temperature on PPO activity

2.2.2 PPO 的最适 pH 值和 pH 值稳定性

由图 6a 可知，PPO 的最适 pH 值为 6.0，随着体系中 pH 值的下降或升高，其酶活力均呈下降趋势。当 pH > 8.0 或 pH < 6.0 时，酶活力下降十分明显。

体系中的 pH 值对 PPO 稳定性的影响结果如图 6b 所示。在 pH = 5.0~8.0 较为稳定，相对活性保持在 70% 以上。当 pH < 5.0 或 pH > 8.0 时，酶活力开始下降。

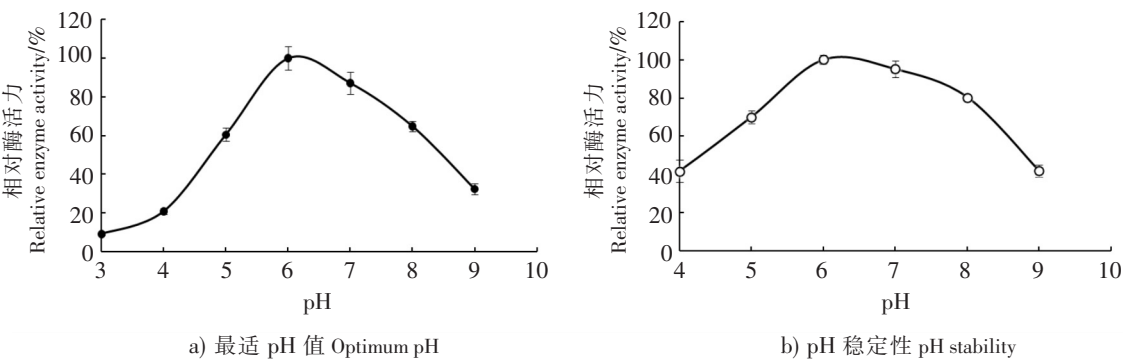


图 6 pH 值对 PPO 活性的影响
Fig.6 Effects of pH on PPO activity

2.2.3 PPO 的圆二色谱分析

圆二色谱扫描结果如图 7 所示。通过软件分析 180~260 nm 部分的数据，PPO 的主要二级结构为反平行 β 折叠和无规则卷曲。其中，反平行 β 折叠占 33.6%，无规则卷曲占 28.2%， β 转角占 19.6%， α 螺旋占 13.6%，平行结构占 4.6%。蛋白质分子中， α 螺旋结构、 β 折叠作为维持蛋白质结构稳定性的重要组成部分，其在蛋白质结构中所占比例在很大程度上影响该蛋白质的稳定性。凡纳滨对虾 PPO 中 α 螺旋和 β 折叠结构占比为 47.2%，比其他能够保持较好稳定性的蛋白质如原肌球蛋白^[16]低，因此，对应了其温度、pH 值较为敏感的表现。

2.2.4 抗坏血酸对 PPO 的抑制作用

不同浓度的抗坏血酸对 PPO 活性的抑制作用结果如图 8 所示。由图 8a 可以看出, 随着体系中抗坏血酸浓度的逐渐上升, PPO 活力逐渐下降, 当抗坏血酸浓度达到 6 mmol/L 时, PPO 的活力几乎完全丧失。同样结果也可从图 8b 的活性染色中得到, 当蛋白质条带经不同浓度的抗坏血酸孵育后, 随着浓度的上升, 活性染色显示出的条带颜色也在逐渐消退。当抗坏血酸浓度达到 15 mmol/L 时, 该条带基本消失, 进一步说明抗坏血酸对 PPO 的活性具有抑制效果。

2.2.5 茶多酚对 PPO 的抑制作用

不同浓度的茶多酚对 PPO 活性的抑制作用结果见图 9。由图 9a 可知, 随着茶多酚浓度的逐渐上升, PPO 的活力逐渐下降, 当茶多酚浓度达到 15 mmol/L 时, PPO 的活力基本丧失。图 9b 的活性染色也反映了同样的结果, 当茶多酚浓度达到 16 mmol/L 时, 相对酶活力下降至 20%, 说明茶多酚对 PPO 的活性具有良好的抑制效果。

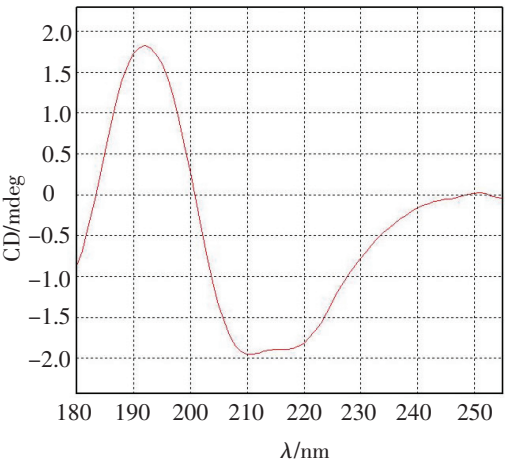
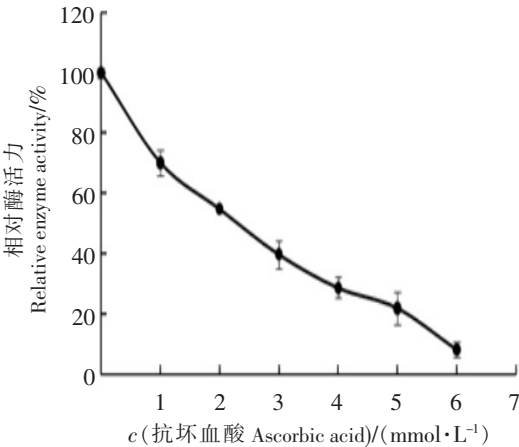
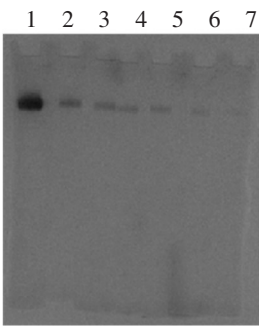


图 7 凡纳滨对虾 PPO 的圆二色谱图
Fig.7 CD spectra of PPO



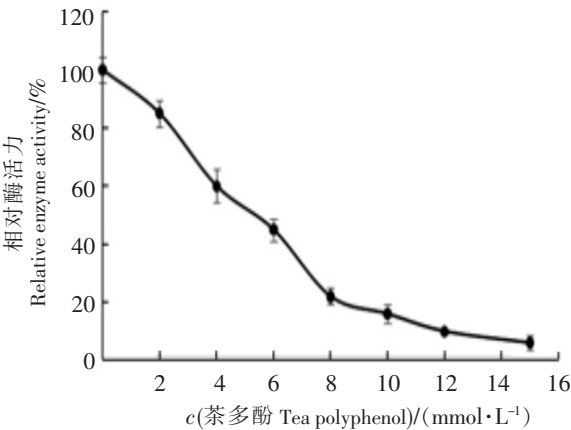
a) 抗坏血酸 Ascorbic acid



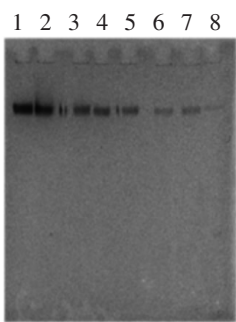
说明: 1 为对照; 2~7 分别为 c (抗坏血酸) = 3, 5, 7, 9, 12, 15 mmol/L
Notes: 1 indicated control; 2~7 indicated c (ascorbic acid) = 3, 5, 7, 9, 12, 15 mmol/L
b) PPO 活性染色 PPO activity staining

图 8 抗坏血酸对 PPO 活性的影响

Fig.8 Effects of ascorbic acid on PPO activity



a) 茶多酚 Tea polyphenol



说明: 1 为对照; 2~8 分别为 c (茶多酚) = 2, 4, 8, 12, 15, 18, 20 mmol/L
Notes: 1 indicated control; 2~8 indicated c (tea polyphenol) = 2, 4, 8, 12, 15, 18, 20 mmol/L
b) PPO 活性染色 PPO activity staining

图 9 茶多酚对 PPO 活性的影响

Fig.9 Effects of tea polyphenols on PPO activity

2.2.6 TBHQ 对 PPO 的抑制作用

由图 10a 可知，随着 TBHQ 浓度的上升，PPO 的相对活力逐渐下降。从图 10b 的电泳分析结果也可以看出，随着溶液中 TBHQ 浓度的上升，对应条带逐渐变淡，当 TBHQ 浓度达到 20 mmol/L 时，该条带基本消失。进一步说明 TBHQ 浓度与 PPO 抑制效果之间的正相关性。

阻止或延缓对虾在冷藏过程中黑变的发生是提升其商品价值的重要手段。实际生产中，低温并添加可抑制黑变的食品添加剂是主要做法。因此，本研究选择抗坏血酸、茶多酚和 TBHQ 等 3 种常见并符合国家要求的食品添加剂对 PPO 的活力影响进行研究。结果表明，PPO 对抗坏血酸的浓度较为敏感，6 mmol/L 的抗坏血酸对 PPO 的活性抑制率高达 91.7%，这与樊廷俊等^[15]的研究结果基本一致。茶多酚对该酶的活性具有一定的抑制作用，15 mmol/L 的茶多酚对 PPO 的活性抑制率高达 94.0%。Nirmal 等^[12,17]的研究表明，当儿茶酚作为 PPO 的抑制剂时，其反映出的混合型抑制性质表明，其对 PPO 及其底物复合物均有着较强的结合作用。TBHQ 对 PPO 的活性亦产生一定的抑制作用，当 TBHQ 的浓度达到 15 mmol/L 时，其对 PPO 的抑制率达 77%。但 TBHQ 是脂溶性物质，几乎不溶于水，影响了其在对虾保鲜中的实际使用。最近，Sun 等^[18]报道了利用酸性电解水抑制对虾黑变，其原理是酸性电解水以混合型抑制方式抑制了 PPO 的活性，并使 PPO 蛋白质结构中 α 螺旋比例下降而无规则卷曲比例增加，从而达到破坏 PPO 构象的效果。

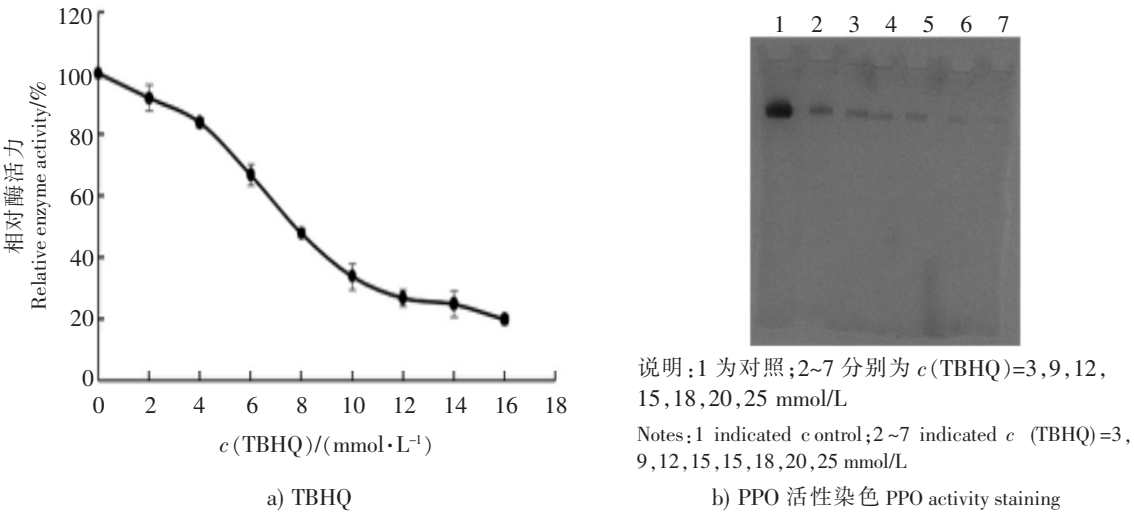


图 10 TBHQ 对 PPO 活性的影响
Fig.10 Effects of TBHQ on PPO activity

3 结论

利用现代分离技术从凡纳滨对虾中分离获得高纯度 PPO。PPO 的分子质量为 210 ku，可能以多聚体的形式存在，其最适温度和最适 pH 值分别为 40 ℃ 和 6.0。该酶的二级结构以反平行 β 折叠和无规则卷曲为主，占 61.8%。食品添加剂抗坏血酸、茶多酚等对其活性有良好的抑制效果。

[参考文献]

[1] 张高静, 韩丽萍, 孙剑锋, 等. 南美白对虾营养成分分析与评价 [J]. 中国食品学报, 2013, 13(8): 254-260.
[2] 符云, 麦良彬, 钟小庆. 2016 年全国南美白对虾养殖渔情报告 [J]. 当代水产, 2017(3): 43-45.
[3] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴 2017 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 26-34.
[4] 翁凌, 李腾, 阴利华, 等. 南美白对虾丝氨酸蛋白酶的分离纯化及性质研究 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2010, 15(4): 272-278.
[5] MONTERO P, ÁVALOS A, PÉREZ-MATEOS M. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*).
<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

- Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment [J]. Food Chemistry, 2001, 75(3): 317-324.
- [6] BARTOLO I, BIRK E O. Some factors affecting Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) cuticle polyphenol oxidase activity and black spot development [J]. International Journal of Food Science & Technology, 1998, 33(3): 329-336. DOI:10.1046/j.1365-2621.1998.00168.x.
- [7] SIMPSON B, MARSHALL M R, OTWELL W S. Phenol oxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): purification and some properties [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1987, 35(6): 918-921. DOI:10.1021/jf00078a017.
- [8] BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, TANAKA M. Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) [J]. Journal of Food Biochemistry, 2005, 29(5): 470-485. DOI:10.1111/j.1745-4514.2005.00042.x.
- [9] ZAMORANO J P, MARTÍNEZ-ÁLVAREZ O, MONTERO P, et al. Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) [J]. Food Chemistry, 2009, 112(1): 104-111.
- [10] LAI C Y, CHENG W, KUO C M. Molecular cloning and characterisation of prophenol oxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2005, 18(5): 417-430. DOI:10.1016/j.fsi.2004.10.004.
- [11] NIRMAL N P, BENJAKUL S. Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenol oxidase and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage [J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 323-331.
- [12] NIRMAL N P, BENJAKUL S. Inhibition kinetics of catechin and ferulic acid on polyphenol oxidase from cephalothorax of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Food Chemistry, 2012, 131(2): 569-573.
- [13] CHEN B N, XING R, WANG F, et al. Inhibitory effects of $\alpha\text{-Na}_8\text{SiW}_{11}\text{CoO}_{40}$ on tyrosinase and its application in controlling browning of fresh-cut apples [J]. Food Chemistry, 2015, 188: 177-183.
- [14] 蒋经伟. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 酚氧化酶的分离纯化及特性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [15] 樊廷俊, 汪小锋. 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 酚氧化酶的分离纯化及其部分生物化学性质 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2002, 34(5): 589-594.
- [16] 林江伟, 游洪燕, 沈海旺, 等. 克氏原螯虾原肌球蛋白的纯化及过敏性分析 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2012, 17(3): 167-174.
- [17] NIRMAL N P, BENJAKUL S. Use of tea extracts for inhibition of polyphenol oxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage [J]. LWT Food Science and Technology, 2011, 44(4): 924-932.
- [18] SUN J, WANG M, LIU H, et al. Acidic electrolysed water delays browning by destroying conformation of polyphenol oxidase [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(1): 147-153.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)