

# 东海中华管鞭虾多酚氧化酶(PPO)的纯化及特性研究

吕敏<sup>1</sup>, 黄光华<sup>1</sup>, 杨慧赞<sup>1</sup>, 王瑞<sup>1</sup>, 马华威<sup>1</sup>, 甘晖<sup>3</sup>, 曾兰<sup>1</sup>, 相兴伟<sup>2</sup>

(1. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021) (2. 浙江省海洋开发研究院, 浙江舟山 316000) (3. 广西水产畜牧学校, 水产养殖研究室, 广西南宁 530021)

**摘要:** 本文采用匀浆浸提法提取中华管鞭虾(*Solenocera crassicornis*, *S. crassicornis*)多酚氧化酶(polyphenoloxidase, PPO), 经硫酸铵质量分级、离子交换、凝胶过滤纯化后, 以左旋多巴(L-DOPA)为底物研究其底物专一性和动力学特性, 并选取不同抑制剂和金属离子探讨对该PPO的抑制影响。结果显示, 匀浆浸提法提取PPO的最佳条件为料液比1:2(W/V)、pH 7.5、浸提3 h、温度50℃, 从100 g中华管鞭虾中获取的PPO的产量和纯化倍数分别是1.2%和25.9, 中华管鞭虾PPO对L-DOPA和儿茶酚具有很显著地催化氧化作用( $p \leq 0.05$ ),  $K_m$ 值为分别是3.8 mM和8.12 mM, 说明该酶为儿茶酚家族酶。PPO活性对苯硫脲、抗坏血酸、柠檬酸较为敏感, 能显著被 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、乙二胺四乙酸(EDTA)抑制。结果表明, 中华管鞭虾PPO可能是活性部位含 $\text{Cu}^{2+}$ 的金属酶, 为控制中华管鞭虾黑变提供基础的信息。

**关键词:** 中华管鞭虾; 多酚氧化酶(PPO); 酶学性质; 纯化

文章编号: 1673-9078(2018)11-138-144

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.11.022

## Purification and Characterization of the Polyphenoloxidase (PPO) from *Solenocera crassicornis* in the East Sea of China

LYU Min<sup>1</sup>, HUANG Guang-hua<sup>1</sup>, YANG Hui-zan<sup>1</sup>, WANG Rui<sup>1</sup>, MA Hua-wei<sup>1</sup>, GAN Hui<sup>3</sup>, ZENG Lan<sup>1</sup>, XIANG Xing-wei<sup>2</sup>

(1. Guangxi Zhuang Autonomous Region Aquatic Research Institute, Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture, Nanning 530021, China)

(2. Zhejiang Ocean Development Research Institute, Zhoushan 316000, China) (3. Guangxi Fishery and Animal Husbandry College of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Aquaculture research center, Nanning 530021, China)

**Abstract:** In this study, the polyphenoloxidase (PPO) was extracted using the homogenate extraction from *Solenocera crassicornis* (*S. crassicornis*) in the East China Sea, and purified through ammonium sulphate precipitation, ion-exchange and gel filtration. The substrate specificity (L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) as the substrate) and kinetic properties of the purified PPO, along with the effects of different inhibitors and metal ions on the PPO, were determined. The obtained results showed the optimal conditions for the homogenate extraction were: the material to liquid ratio 1:2 (W/V), pH 7.5, time 3 h, and temperature 50 °C. The yield and purification factor were 1.2% and 25.9, respectively. This PPO significantly catalyzed the oxidation of L-DOPA and catechol ( $p \leq 0.05$ ), with the  $K_m$  values being 3.8 mM and 8.12 mM, respectively, indicating that the PPO belongs to the catechol enzyme family. The PPO was sensitive to phenylthiourea, ascorbic acid, and citric acid, and its activity was strongly inhibited by  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Thus, the PPO from *S. crassicornis* could be a metalloenzyme containing  $\text{Cu}^{2+}$  in its active center. The results of this study provide the basis for controlling the melanotic blackening of *S. crassicornis*.

**Keywords:** *Solenocera crassicornis* (*S. crassicornis*); polyphenoloxidase (PPO); enzymatic properties; purification

收稿日期: 2018-04-08

资助项目: 广西省重点研发项目(2018AB45010); 浙江省海洋产业公益类基金项目(ZM201508741)

作者简介: 吕敏(1977-), 女, 工程师, 水产养殖与保鲜

通讯作者: 马华威(1986-), 男, 工程师, 水产养殖与精深加工

虾类在储藏和运输过程中, 其体内多酚氧化酶(polyphenoloxidase, PPO)诱导的黑变大大降低了虾的品质和市场价值, 造成巨大损失<sup>[1]</sup>。因此, 我们需要获取的高纯度的PPO, 并对其特性进行研究, 为了有效地控制中华管鞭虾在运输和储藏过程的黑变提供参

考。黑变发生主要是 PPO 诱导酚类化合物生成醌, 醌非酶聚合促进高分子不溶性黑色素沉淀, 造成虾黑变<sup>[2]</sup>。研究发现, 由于虾体内的酚类化合物含量高以及纯化过程中这些酚类物质易于与 PPO 形成不可逆结合, 给从虾类获得高纯均一的 PPO 带来了困难<sup>[3]</sup>。目前, 国内外研究了挪威龙虾(*Nephrops norvegicus*)、日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、佛罗里达龙虾(*Panulirus argus*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的 PPO 纯化技术和酶特性<sup>[4,5]</sup>, 比如 Zotos 和 Taylorp 等研究了挪威龙虾 PPO 的部分提纯工艺和在黑变激活机制中的作用<sup>[6]</sup>; Encarnacion 等<sup>[7]</sup>发现蘑菇提取活性物对日本对虾黑变具有抑制作用; Manheem 等<sup>[8]</sup>报道称, 不同冷藏条件下凡纳滨对虾 PPO 变化不同, 温度与 PPO 活性呈反比, 温度越低其活性较弱; Ali 等<sup>[9]</sup>报道了佛罗里达龙虾黑变的 PPO 提纯和激活机制, Nirmal 等<sup>[10]</sup>研究了凡纳滨对虾 PPO 纯化手段和生物学特性。

国内初步研究了中华管鞭虾(*Solenocera crassicornis*) PPO 的提纯手段和部分生物特性, 主要匀浆浸、硫酸铵无分级沉淀提纯, 并调查了该 PPO 在各组织分布、选取部分底物研究酶特性, 以及筛选抑制剂<sup>[11~15]</sup>, 国外未见相关报道。未高度纯化的中华管鞭虾 PPO, 限制了对其酶特性的深入研究, 因而, 我们需要选择合适的纯化技术和步骤对中华管鞭虾 PPO 进行高度纯化, 再对其酶特性进行研究。本文主要采用硫酸铵分级沉淀、DEAE 离子、苯基琼脂糖凝胶过滤纯化从中华管鞭虾体内提取的 PPO, 对其动力学特征进行探讨, 并选取不同抑制剂和金属离子为底物研究该 PPO 特性, 为寻找廉价、安全、有效、新型的中华管鞭虾黑变抑制物质提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

中华管鞭虾于 2015 年 10 月捕捞于浙江舟山市普陀区沈家门港近岸东海海域(东经 121.39°, 北纬 29.51°), 平均体长 9.0±0.9 cm 和体重 18.5±3.5 g, 冰块冷冻送至实验室后去除头胸部, 冷水冲洗后液氮冷冻, 搅切器粉碎成粉末, 真空包装-60 °C 保存备用。

### 1.2 试剂

Tris-HCl 缓冲液、丙酮、乙二胺四乙酸(EDTA)、L-3-(3,4-二羟基苯基)-2-甲基丙氨酸(L-DOPA)、考马斯亮蓝 R250、硫酸铵、苯硫脲、半胱氨酸(Cys)、柠檬酸、抗坏血酸, 购买于国药集团化学试剂有限公司;

4-甲基邻苯二酚、儿茶酚、苯酚、苯二酚, 购买于北京索莱宝科技有限公司; 5-Triton X-100、苯基-琼脂糖凝胶 CL4B、DEAE CI-16B、琼脂糖 6B, 购买于南京建成生物工程; 其它均为分析纯。

### 1.3 仪器与设备

CR21G 冷冻离心机, 购买于日本日立; 立式压力灭菌器、Waring 搅切器, 购买于国华电器有限公司; TSK 凝胶 SW3000 色谱柱、DEAE-16B 色谱柱、UV-2102C 型紫外可见分光光度计, 购买与上海生物工程有限公司。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 匀浆浸提法提取 PPO

PPO 提取按照郑斌等<sup>[11]</sup>人的方法, 并略作修改。称取备用虾粉末样品 100 g, 设置料液比 1:2 (W/V), 缓冲液 pH 7.5, 浸提 4 h, 水浴温度 50 °C, 添加 40 mL pH 7.5 的 Tris-HCl 溶液, 4 °C 下研磨后, 静置 4 h, 4 °C 环境下 1000 g 冷冻离心 30 min, 取上清液作粗酶液, 并根据 Bibhuti 等<sup>[17]</sup>人方法计算 PPO 活性、蛋白质含量、回收率、酶比活和纯化倍数。

以 4-甲基邻苯二酚为底物, 添加 0.88 mL 磷酸盐缓冲液(pH 6.8, 0.05 mM)、0.1 mL 底物(0.1 M)和 0.02 mL 酶提取液, 制备成混合液, 在 420 nm 每隔 30 s 记录一次, 共记录 3 min, 计算每分钟平均吸光值, 酶活单位就是引起每分钟吸收变化 0.1 的酶量, PPO 活力以 Units/ml 表示, 产量以体积比(%)表示, 酶比活以 Units/(mg protein)表示, 为方便计算每一步纯化后的酶产量, 中华管鞭虾 PPO 的总酶活被认为 100%。

#### 1.4.2 纯化

硫酸铵分级沉淀按照杨会成等<sup>[12]</sup>人方法并略作修改。粗酶液置于 7 个小烧杯于 4 °C 冰箱内磁力搅拌, 5~10 min 内分别加入 10%、20%、30%、40%、50%、60%和 70%研磨好的硫酸铵, 再搅拌 30 min, 冷冻离心机 4 °C 环境下 10000 g 离心 30 min, 收集沉淀, 用 pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液溶解。在 4 °C 用 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5, 0.05 mM)透析去除多余的硫酸铵。各样品分别取 2 mL, 测定各分级沉淀样品的酶活性和蛋白质含量。将活性较高质量分数片段范围的 PPO 混合后, 冷冻干燥后-60 °C 保存。

DEAE 离子交换层析前, 首先将 250 mL 蒸馏水冲洗 DEAE CI-16B 琼脂糖柱材料(40 mL), 然后硫酸盐缓冲液(pH 7.5, 2 mM)冲洗。超纯水稀释硫酸铵纯化品至 700 mL (pH 调至 7.5), 与 DEAE 柱材料混合。

在 4 ℃ 保持慢速搅拌 30 min, 然后 500 mL 磷酸缓冲液(pH 7.5, 2 mM) 冲洗 2 次后过柱, 用梯度 NaCl 液(0~0.5 M, NaCl 溶于 pH 为 7.5 的 2 mM 硫酸盐缓冲液制备而成)进行梯度洗脱, 别分收集后, 透析除盐, 测定各梯度洗脱样品的酶活力和蛋白质含量。合并酶活较好的部份, 冷冻干燥, -60 ℃ 保存。

苯基琼脂糖凝胶疏水层析前, 预先用 50 mL 蒸馏水以洗脱平衡苯基琼脂糖填柱料(10 mL), 然后 500 mL 磷酸缓冲液(pH 7.5, 2 mM)冲洗。取多酚氧化酶纯化品, 超纯水将其稀释至 15 mL, 用 25 mL 18%硫酸铵饱和(硫酸铵溶解于 20 mM 硫酸盐缓冲液中), 然后注射器 8 Mpa 缓慢匀速注入, 50 mL 磷酸盐(pH 7.5, 2 mM)洗脱液按含 18%~0%硫酸铵梯度顺序洗脱, 收集洗脱样品。分别收集洗脱样品, 透析除盐, 测定洗脱样品的酶活力和蛋白质含量, 合并酶比活较好的 PPO 纯化品, 冷冻干燥后-60 ℃ 保存。

计算 PPO 活性、蛋白质含量、回收率、酶比活和纯化倍数, 以粗酶液的酶比活为基准, 每一步纯化后 PPO 增加的倍数被认为是纯化倍数。

#### 1.4.3 底物专一性分析

按照吴亮亮等<sup>[16]</sup>人方法并略作修改。配制浓度为 0.01 M 的 L-DOPA、儿茶酚、对苯二酚和苯酚。取 1 mL 酶液分别与 2.5 mL 的 L-DOPA、儿茶酚、对苯二酚和苯酚混合后, 再加入 3 mL 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5), 在 50 ℃ 水浴加热 10 min, 在 490 nm 处测定其吸光值, 绘制曲线。

#### 1.4.4 以 L-DOPA 为底物的 PPO 动力学特性

以 L-DOPA 为底物, 分别设置浓度为 0.01、0.05、0.10、0.15、0.2、0.3 和 0.4 M。取 1 mL 底物液与 1 mL 高效液相纯化酶液混合, 45 ℃ 水浴 10 min, 490 nm 处测定吸收值, 计算酶活力, 用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法绘制出 PPO 动力学曲线。

#### 1.4.5 不同抑制剂和金属离子对 PPO 活性的影响

将柠檬酸、抗坏血酸、苯硫脲、Cys、EDTA、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub> 和 ZnCl<sub>2</sub> 分别溶于 2 mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5), 各抑制剂均配成 12 个梯度样品液, 即 0.01、0.015、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1 和 0.2 M。

各取 1 mL 的抑制剂梯度液, 分别加入 1 mL 高效液相纯化酶液, 在 4 ℃ 冰箱中抑制 0.5 h, 随后添加 2.5 mL 底物 L-DOPA 液、3 mL Tris-HCl 缓冲液, 在 50 ℃ 下水浴 10 min, 加 3 mL 蒸馏水, 终止反应。在 490 nm 处测定吸光值, 阳性对照以 1 mL 的蒸馏水为参照, 选取不同抑制剂和金属离子的最佳浓度所对应

的酶活力数值作图。

### 1.5 统计分析

实验数据用 Excel 和 Origin 7.0 软件进行统计分析, 结果以平均值±标准差( $\bar{x}\pm sd$ )表示。

## 2 结果

### 2.1 纯化

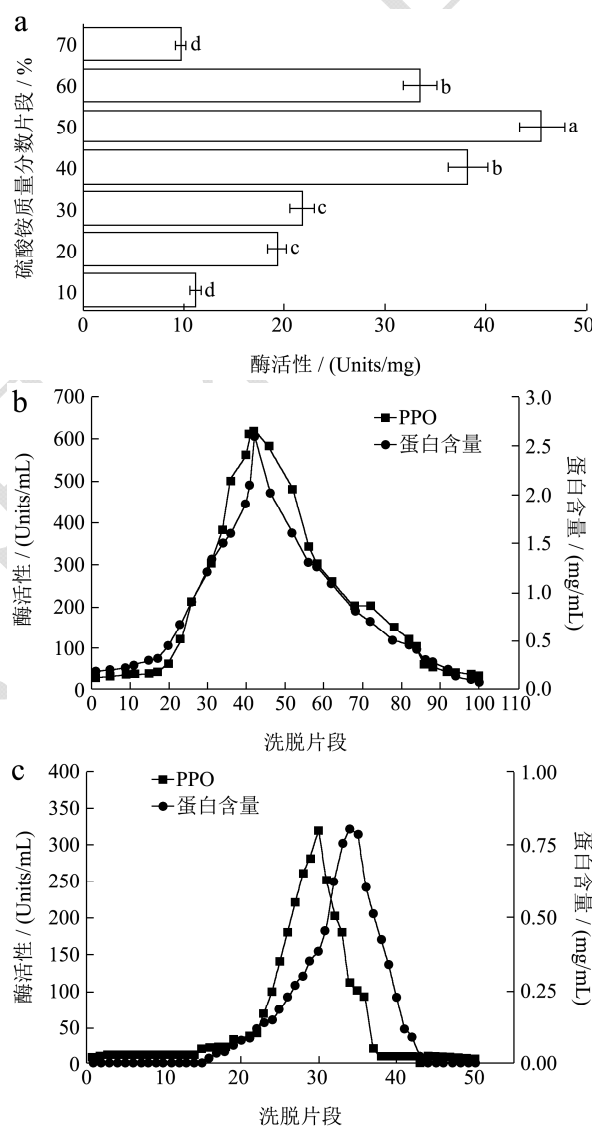


图1 中华管鞭虾 PPO 纯化

Fig.1 The profiles of PPO from *Solenocera crassicornis*

注: (a)表示硫酸铵沉淀, 其中图中不同字母表示差异显著( $p<0.05$ ); (b)表示 DEAE-离子交换色谱; (c)表示苯基琼脂糖凝胶过滤层析。

本实验采用匀浆浸提法从中华管鞭虾体内提取 PPO 的活力可达 86.79 Units/(mg protein)。经硫酸铵分级沉淀、DEAE 离子交换、苯基琼脂糖凝胶过滤纯化如图 1 (a)~(c)所示。

图 1(a)表示粗 PPO 经硫酸铵质量分数 10%~70% 分级沉淀后的活性,结果显示,中华管鞭虾粗 PPO 的酶活集中在硫酸铵质量分数 40%~60%,且显著高于其它质量分数,因此,收集该质量分数的 PPO 用于 DEAE 离子交换纯化。

图 1(b)为经 DEAE 离子交换的 PPO 活性和蛋白含量,结果表明,PPO 在 pH 7.5 条件下与 DEAE 色谱柱结合,0~0.5 mol/L 盐浓度梯度洗脱后,洗脱峰出现在 30~62 号管且 42 号管为活性最高峰值,而在此范围,蛋白质含量不断增加,在 42 号管中出现最高峰值,随后下降。因而,收集 PPO 的活性较高的 30~62 号管中的 PPO 进行下一步纯化。

图 1(c)表示经苯基琼脂糖凝胶过滤的 PPO 活性和蛋白含量。PPO 洗脱峰出现在 24~36 号管且 30 号管的活性最高,蛋白质洗脱峰位于 38~40 号管。因此,收集活性较高的 28~36 号管,以用于下一步测试。

## 2.2 纯化结果分析

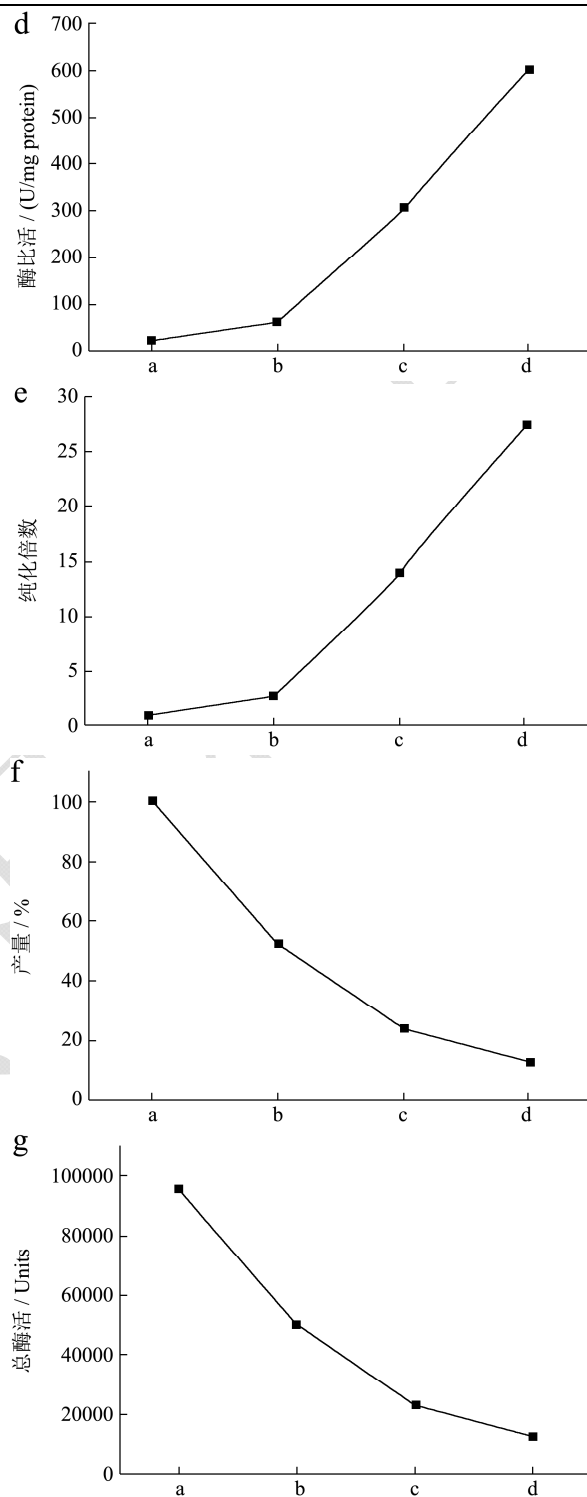
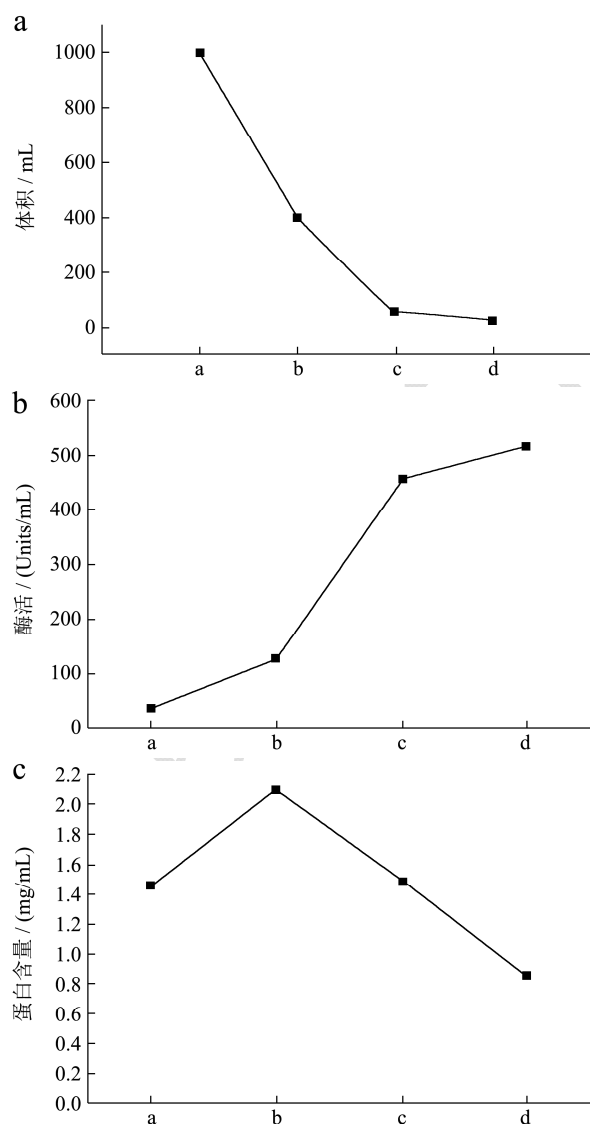


图 2 部分纯化后的中华管鞭虾 PPO 的纯化结果

Fig.2 The profiles of purified PPO from *Solenocera crassicornis*

注: 横坐标中的 a、b、c、d 分别表示粗品、硫酸铵质量分数片段 (40%~60%) 样品、离子交换样品、凝胶过滤样品

中华管鞭虾 PPO 经过纯化后的结果所示如图 2 (a-g)。结果表明,PPO 的液体体积、蛋白含量和总酶活不断减少,而酶比活不断增加,回收率与纯化倍数之间呈负相关。硫酸铵分级沉淀、DEAE 离子交换色谱层析、苯基琼脂糖凝胶过滤后的体积、产量、纯化



倍数结果如表 1, PPO 的最终获得体积为 3.7 mL, 纯化倍数为 25.9, 而产量仅为 1.2%。主要是由于每个纯化步骤后有目的的收集峰值区域的 PPO 用于下一步的纯化, 导致酶比活和纯化倍数增加, 总酶活、体积、产量减少。

表 1 纯化后的中华管鞭虾 PPO 纯化结果

Table 1 The results of purified PPO from *Solenocera*

| <i>crassicornis</i>    |              |             |            |
|------------------------|--------------|-------------|------------|
| 纯化步骤                   | 体积/mL        | 产量/%        | 纯化倍数       |
| 粗品                     | 3000.00±0.00 | 100.00±0.00 | 1.00±0.00  |
| 硫酸铵质量分数<br>片段(40%~60%) | 400.00±8.26  | 52.10±2.17  | 2.68±0.01  |
| 离子交换                   | 50.00±1.63   | 13.20±0.98  | 7.81±0.13  |
| 凝胶过滤                   | 3.70±0.87    | 1.20±0.11   | 25.90±0.38 |

2.3 底物专一性分析及动力学特征

以不同浓度的 L-DOPA、儿茶酚、对苯二酚、苯酚为底物, 研究部分纯化后 PPO 的底物专一性, 结果如图 3 所示。PPO 催化 L-DOPA 和儿茶酚催化作用较强, 对苯酚和对苯二酚作用较小, 因而本实验选取 L-DOPA 和儿茶酚作为 PPO 的特异性底物研究动力学特性。如图 4(a)和图 4(b)分别表示以 L-DOPA 和为底物的 Lineweaver-Burk 双倒数图所示, L-DOPA 的  $K_m$  值最低, 为 3.8 mM, 儿茶酚 8.12 mM。

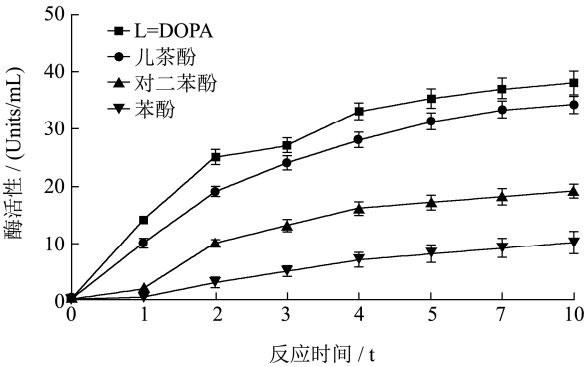


图 3 纯化后的中华管鞭虾 PPO 底物的专一性

Fig.3 The substrate specificity of purified PPO from *Solenocera crassicornis*

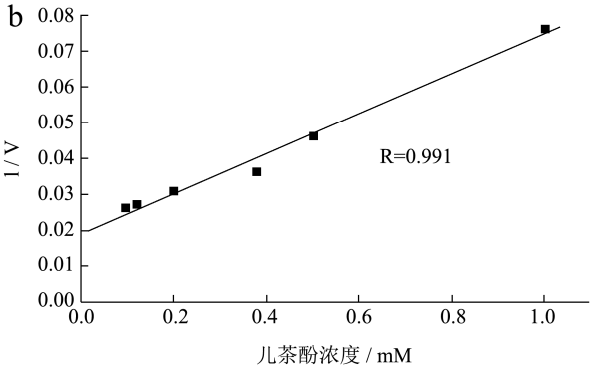
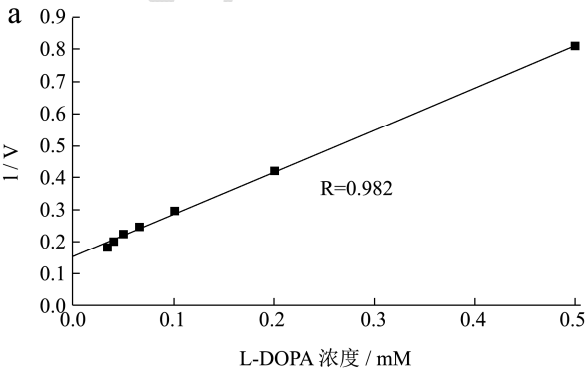


图 4 部分纯化后的中华管鞭虾 PPO 的动力学特性

Fig.4 The kinetic properties and profiles of partially purified PPO from *Solenocera crassicornis*

注: (a)表示以 L-DOPA 为底物 Lineweaver-Burk 图, (b)表示以儿茶酚为底物 Lineweaver-Burk 图。

2.4 对酶活抑制效果

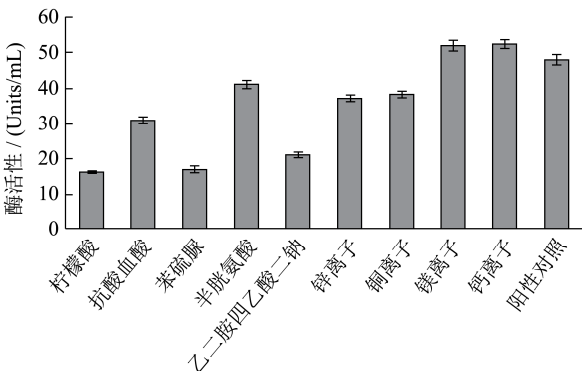


图 5 不同抑制剂和金属离子对部分纯化后的中华管鞭虾 PPO 活性的影响

Fig.5 Effects of different inhibitors and some metal ions on the oxidizing activity of the purified PPO from *Solenocera crassicornis*

$Zn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、EDTA、Cys、苯硫脲、抗坏血酸和柠檬酸对 PPO 活性抑制效果如图 5。不同抑制剂和金属离子的抑制结果均采用各最佳浓度所对应的酶活数值, 结果表明, 苯硫脲、抗坏血酸、 $Cu^{2+}$ 、Cys、 $Zn^{2+}$ 、柠檬酸、EDTA 能抑制 PPO 活性, 而  $Ca^{2+}$  和  $Mg^{2+}$  无抑制作用, 柠檬酸、EDTA、苯硫脲对 PPO 活性抑制作用较强。

3 结论

3.1 匀浆浸提法能够使原料充分匀浆, 增大虾体内 PPO 与浸提液的接触面, 提高提取率<sup>[12]</sup>。浸提过程中, 浸提时间的过久能使 PPO 与底物反应生成中间产物, 中间产物的聚合可导致酶的沉淀和活力降低, 降低了 PPO 的活性<sup>[9,14]</sup>。在本研究中中华管鞭虾 PPO (4 h)酶比活可达 86.79 Units/(mg protein), 略高于杨会成等人

提取的 PPO(3 h), 主要差异原因可能是本实验浸提时间较长。

3.2 生物体内丰富的酚化合物与 PPO 结合生成不可逆结合, 影响该酶的离子和疏水特性, 干扰洗脱, 给高度纯化过程带来了难度<sup>[7]</sup>。硫酸铵分级沉淀是纯化 PPO 的常用方法之一, 杨会成等<sup>[12]</sup>人采用 10%~60% 硫酸铵质量分数片段沉淀获取中华管鞭虾 PPO, 发现 40%~50% 质量分数范围活性较强, 本研究采用硫酸铵质量分数片段为 20%~70%, 40%~60% 范围活性均较强, 最佳硫酸铵饱和度为 50%, 可能中等质量分数更能诱导中华管鞭虾 PPO 的构象变化而导致沉淀。另外, 人们发现硫酸铵提纯虾 PPO 时, 最佳质量分数片段位于低质量片段范围, 比如凡纳滨对虾(40%)<sup>[9]</sup>、日本对虾(30%~40%)<sup>[13]</sup>, 表明不同虾类提取 PPO 时, 所采用的硫酸铵饱和度也不相同, 进一步证实了沉淀 PPO 的硫酸铵饱和度依赖于种类<sup>[15]</sup>。本研究发现, 除硫酸铵质量分数 40%~60% 以外, 中华管鞭虾 PPO 在其他质量分数片段活性低, 可能由于该 PPO 与酚类化合物的结合生成了非专一性沉淀的结果。经过 DEAE 离子交换色谱层析、苯基琼脂糖凝胶过滤纯化后, PPO 的最终产量却仅占 1.2%, 而纯化倍数为 25.9, 高于凡纳滨对虾(2.4 倍)<sup>[11]</sup>、日本对虾(19.4 倍)<sup>[7]</sup>, 可能由于不同种类虾体内含有不同种类和数量的酚类物质, 以及其与 PPO 产生不可逆结合程度存在差异, 不同程度的干扰 PPO 纯化所致<sup>[16]</sup>, 也可能与纯化技术、操作过程相关。

3.3 本研究发现, 中华管鞭虾 PPO 对儿茶酚、L-DOPA 具有较大催化活力, 对 L-DOPA( $K_m$  为 3.8 mM 和  $R=0.982$ )、儿茶酚( $K_m$  为 8.12 mM 和  $R=0.991$ ) 具有高度相关性和较高亲和力, 而对对苯二酚、苯酚氧化作用极低, 推断其可能属于儿茶酚酶家族(EC 1.10.3.1)。此外, 中华管鞭虾 PPO 对 L-DOPA 的  $K_m$  值大大高于白对虾(2.8 mM)<sup>[2]</sup>、挪威龙虾(1.6 mM)<sup>[4]</sup>、美国龙虾(2.13 mM)<sup>[5]</sup>、凡纳滨对虾(0.81 mM 和 3.48 mM)<sup>[10,18]</sup>、黑虎对虾(4.45 mM)<sup>[3]</sup> 以及日本蟳(3.41 mM)<sup>[17]</sup>, 可能虾蟹类 PPO 的  $K_m$  值大小与种类及其生境相关。

3.4 本研究发现, 苯硫脲、抗坏血酸、Cys、 $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、柠檬酸、EDTA 能抑制 PPO 活性, 柠檬酸、苯硫脲、EDTA 抑制最强, 而  $Ca^{2+}$  和  $Mg^{2+}$  能增强其活性<sup>[18]</sup>。EDTA 是一种专一性二价金属离子螯合剂, 与 PPO 结合能抑制虾黑变<sup>[14]</sup>。EDTA 对该 PPO 具有显著抑制作用, 推断该中华管鞭虾 PPO 可能是一种金属酶。苯硫脲是  $Cu_2^{+}$  螯合剂, 柠檬酸通过降低 pH 和螯合 PPO 活性区域的  $Cu_2^{+}$  而起到抑制作用<sup>[19]</sup>。苯硫脲能够通过螯合日本对虾体内的 PPO 金属酶活中心的  $Cu_2^{+}$  促使

酶活丧失<sup>[2]</sup>。本研究发现, 中华管鞭虾 PPO 对苯硫脲和柠檬酸较敏感, 进一步表明该酶可能是一种活性部位含  $Cu^{2+}$  的金属酶。本研究结果与日本对虾<sup>[13]</sup>、凡纳滨对虾<sup>[9]</sup>、龙虾<sup>[5]</sup> 的报道的结果相一致, 表明中华管鞭虾 PPO 属于含有  $Cu^{2+}$  的儿茶酚氧化金属酶。另外,  $Ca^{2+}$  和  $Mg^{2+}$  对 PPO 无任何抑制作用, 反而增加了 PPO 的酶活力, 与郑斌等<sup>[11]</sup> 人研究符合, 可能是  $Ca^{2+}$  和  $Mg^{2+}$  作为中华管鞭虾 PPO 的金属激活剂起着激活作用。本实验为控制中华管鞭虾 PPO 黑变提供有价值的基础数据。

3.5 本实验纯化了中华管鞭虾 PPO, 研究其动力学特征和 PPO 特性。研究发现, 4 h 提取时间的酶比活可达 86.79 Units/(mg protein), PPO 的最终产量却仅占 1.2%, 而纯化倍数为 25.9, 以对苯二酚、苯酚、儿茶酚、L-DOPA 为底物时, 对儿茶酚、L-DOPA 具有较大催化活力, 而对对苯二酚、苯酚氧化作用极低, 柠檬酸、苯硫脲、EDTA 抑制 PPO 活性最强, 通过结果推断该 PPO 属于含有  $Cu^{2+}$  的儿茶酚氧化金属酶家族。本研究能为控制中华管鞭虾 PPO 黑变提供有价值的基础数据, 为寻找廉价、安全、有效、新型的中华管鞭虾黑变抑制物质提供参考。

## 参考文献

- [1] Monter O P, Avalos A, Perez M M. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*), alternatives to inhibition: Additives and high pressure treatment [J]. Food Chemistry, 2001, 75: 317-324
- [2] Simpson B K, Mashall M R, Otwell W S. Phenoloxidases from pink and white shrimp: Kinetic and other properties [J]. Journal of Food Biochemistry, 1988, 12: 205-217
- [3] Barjinder P K, Rao P S. Kinetic modeling of polyphenoloxidase inactivation during thermal-assisted high pressure processing in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Food Control, 2017, 80: 388-394
- [4] Gimenez B, Martinez A O, Monetero P, et al. Characterization of phenoloxidase activity of carapace and viscera from cephalothorax of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 43(8): 1240-1245
- [5] Vazquez J A, Amado I R, Montemayor M I, et al. Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: Characteristics, applications and eco-friendly processes: A review [J]. Marine Drugs, 2013, 11, 747-774
- [6] Zotos A, Taylor K D A. Partial purification and

- characterization of proteases from Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) and their role in the phenolase activation process [J]. Food Chemistry, 1996, 56: 61-68
- [7] Encarnasion A B, Fagutao F, Hiriyama J, et al. Edible mushroom (*Flammulina velutipes*) extract inhibits melanosis in Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(1): 52-58
- [8] Manheem K, Benjakul S, Kijroongrojana K, et al. The effect of heating conditions on polyphenol oxidase, proteases and melanosis in precooked Pacific white shrimp during refrigerated storage [J]. Food Chemistry, 2012, 131(4): 1370-1375
- [9] Ali M T, Gleeson R A, Wei C I, et al. Activation mechanisms of prophenoloxidase on melanosis development in Florida spiny lobster (*Panulirus argus*) cuticle [J]. Journal of Food Science, 1994, 59: 1024-1030
- [10] Nirmal N P, Benjakul S. Biochemical properties of polyphenoloxidase from the cephalothorax of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. International Aquatic Research, 2011a, 4(6): 1-13
- [11] 郑斌,郝云彬,杨会成,等.中华管鞭虾 PPO 生化特性研究[J]. 浙江海洋学院:自然科学版,2010,29(6):526-530
- ZHENG Bin, HAO Yun-bin, YANG Hui-cheng, et al. Study of biochemical characteristics of polyphenoloxidase in deepwater pink shrimp (*Solenocera crassicornis*) [J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2010, 29(36): 526-530
- [12] 杨会成,郝云彬,郑斌,等.中华管鞭虾 PPO 的分离制备[J].食品科技,2011,36(7):24-28
- YANG Hui-cheng, HAO Yun-bin, ZHENG Bin, et al. Extraction of polyphenoloxidase in deepwater pink shrimp (*Solenocera crassicornis*) [J]. Food Science and Technology, 2011, 36(7): 24-28
- [13] 吴亮亮,杨会成,廖妙飞,等.不同对虾中 PPO 的提取比较及在虾体的分布研究[J].食品工业科技,2012,33(7):5-62
- WU Liang-liang, YANG Hui-cheng, LIAO Miao-fei, et al. Study on extraction of polyphenoloxidase and enzyme distribution on different shrimps [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(7): 55-62
- [14] Bibiuti B, Mishr A, Satyendra G, et al. Purification and characterization of polyphenol oxidase (OPP) from eggplant (*Solanum melongena*) [J]. Food Chemistry, 2012, 13(4): 1855-1861
- [15] Zamorano J P, Oscar M A, Pilar M, et al. Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) [J]. Food Chemistry, 2009, 112: 104-111
- [16] Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M. Inhibitory effect of cysteine and glutathione on phenoloxidase from kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) [J]. Food Chemistry, 2006, 98: 158-163
- [17] Liu G, Yang L, Fan T, et al. Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2006, 20: 47-57
- [18] Chakraborty A, Raro P S, Mishra H N. Kinetic modeling of polyphenoloxidase and peroxidase inactivation in pineapple (*Ananas comosus* L.) puree during high-pressure and thermal treatments [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2015, 27: 57-68
- [19] Nirmal N P, Benjakul S. Inhibitory effect of mimosine on polyphenoloxidase from cephalothoraxes of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011b, 59(18): 10256-10260