

2 种钼簇化合物对酪氨酸酶的抑制作用及对凡纳滨对虾的保鲜效果研究

户晶晶¹, 陈丙年², 王力¹, 邓阳阳¹

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建厦门 361021) (2. 厦门大学医院外科, 福建厦门 361005)

摘要: 通过合成 2 种高核钼簇 $(\text{NH}_4)_{12}[\text{Mo}_3\text{O}_{108}(\text{NO})_4(\text{H}_2\text{O})_{16}]\cdot 33\text{H}_2\text{O}$ (Mo_{36})和 $[\text{Mo}_3\text{O}_{112}(\text{OH})_{16}(\text{H}_2\text{bipy})_4]\cdot 28\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$), 其对酪氨酸二酚酶活性的抑制作用机理以及对凡纳滨对虾的防黑变保鲜效果进行研究。结果表明 Mo_{36} 和 $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 对酪氨酸二酚酶 IC_{50} 值分别为 0.0358 mmol/L 和 0.0601 mmol/L, Mo_{36} 对酪氨酸酶的抑制作用为可逆竞争性抑制, $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 对酪氨酸酶的抑制作用为可逆混合性抑制, 且 Mo_{36} 对酪氨酸酶活性的抑制作用效果优于 $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 。将凡纳滨对虾在 4 °C 环境下贮藏 10 d, 通过对感官评分、颜色、pH 值、TVB-N 和菌落总数等指标检测, 发现高核钼簇对样品具有一定保鲜效果。其均能适当提升感官分值、 L^* 值, 降低 pH 值与菌落总数。本研究结果为开发一种新型的抗虾体黑变的保鲜剂提供实验基础, 并对多金属钼酸盐的应用研究拓展新的研究领域。

关键词: 酪氨酸酶; 钼簇; 抑制剂; 虾保鲜

文章编号: 1673-9078(2019)01-44-50

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.007

Inhibitory Effects of 2 Kinds of Molybdenum Cluster Compounds on Tyrosinase and their Preservative Effects on *Litopenaeus vannamei*

HU Jing-jing¹, CHEN Bing-nian², WANG Li¹, DENG Yang-yang¹

(1. Food and Bioengineering College of Jimei University, Xiamen 361021, China)

(2. The Surgery of the Medical School of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Two kinds of high-nuclear molybdenum clusters $(\text{NH}_4)_{12}[\text{Mo}_3\text{O}_{108}(\text{NO})_4(\text{H}_2\text{O})_{16}]\cdot 33\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Mo}_3\text{O}_{112}(\text{OH})_{16}(\text{H}_2\text{bipy})_4]\cdot 28\text{H}_2\text{O}$ were synthesized. Inhibition mechanisms on diphenolase activity of tyrosinase, anti-melanosis effects of *Litopenaeus vannamei* and preservation of Mo_{36} and $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ were investigated. The result showed that the IC_{50} values of tyrosine diphenolase respectively were 0.0358 mmol/L and 0.0601 mmol/L. The inhibitory effect of Mo_{36} on tyrosinase was reversible competitive inhibition, the inhibition of tyrosinase by $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ was reversible mixed inhibition, and the inhibitory effect of Mo_{36} on tyrosinase activity was better than that of $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$. *Litopenaeus vannamei* was stored under 4 °C environment for 10 days, and the sensory score, color, pH value, TVB-N and total number of colonies was detected. It was found that the high-nuclear molybdenum clusters had a certain preservation effect on *Litopenaeus vannamei* ($p < 0.05$). Mo_{36} and $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ can significantly improve the value of sensory score and L^* , and reduce the pH value and the total number of colonies. This paper can provide experimental basis for the preservation of the *Litopenaeus vannamei* body and the application of polyoxometalates to new areas.

Key words: tyrosinase; high-nuclear molybdenum clusters; inhibitors; fresh shrimp

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*), 又称南美白对虾, 是我国重要的养殖虾种, 其营养价值丰富, 且年产量较高^[1]。然而, 凡纳滨对虾在贮运期间易发生虾体黑变现象, 黑色素的产生虽对人体无明显伤害,

收稿日期: 2018-08-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21871110)

作者简介: 户晶晶 (1993-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程

通讯作者: 王力 (1965-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 多酸化学以及酶动力学

但易造成营养损失, 影响其销售价格, 并缩短货架期^[2]。研究表明, 虾体黑变与广泛存在于自然界中一类含铜氧化还原酶的作用有关, 酪氨酸酶属于一种独特的具有双重催化功能的酶, 可以使虾体内所含的酪氨酸或其衍生物催化氧化成多巴醌, 后者再经过一系列反应聚合成为黑色素^[3,4]。因此, 通过抑制酪氨酸酶活性就可达到保鲜目的。目前, 国内外研究学者已将亚硫酸盐、有机酸和双歧杆菌^[5,6]、壳聚糖^[7,8]、与复合保鲜剂^[9,10]等作为酪氨酸酶抑制剂, 用于抑制虾体黑变。然而, 如上酪氨酸酶抑制剂在达到虾体保鲜的同时,

还存在使用成本与食用安全等问题。因此,将新型无毒,生产成本低的多金属钼酸盐等作为酪氨酸酶抑制剂是一项有意义的研究。

高核化多金属钼酸盐是具有 $\{MO_x\}$ ($M=Mo, W, V$ 等)的多面体单元或低聚的 $\{M_xO_y\}$ 片段,其结构的新颖多样化和性质的独特性^[11]决定它们在催化^[12]、电化学、生物学^[13]、医学^[14]和食品等多领域的应用。Balici 等人发现七种多钼酸盐-九种抗生素对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌具有显著抗菌活性^[15]。Colovic 等人合成的两种毒性较低 Keggin 型杂多钼酸盐对乙酰胆碱酯酶活性具有不同的抑制效力^[16]。近年来已有多金属钼酸盐对藕片、苹果、黄瓜^[17,18]等食品保鲜研究报道,但目前国内外尚无将多金属钼酸盐应用于水产品保鲜研究,本文合成了纯钼簇 Mo_{36} 和有机-无机杂化钼簇 Mo_{36} -bipy, 研究其对酪氨酸酶的抑制性能及对冷藏凡纳滨对虾的保鲜效果,以期为新型安全水产品保鲜剂的研发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验原料

凡纳滨对虾,购于厦门市同安区洪塘头农贸市场。

1.2 主要药品试剂

T3824-25KU 蘑菇酪氨酸酶购自 Sigma-Aldrich(中国)有限公司;钼酸钠,氯化铵,硫酸钾购自西陇化工股份有限公司;盐酸羟胺、高氯酸、硼酸、硫酸铜、盐酸购自国药集团化学试剂有限公司;L-3,4-二羟基苯丙氨酸、L-酪氨酸购自美国 Sigma-Aldrich 公司,均为分析纯。

1.3 主要仪器设备

Nicolet Avatar 330 型傅里叶变换红外光谱仪,美国 Thermo Electron 公司;Cintra 2020 型紫外可见分光光度计,澳大利亚 GBC 仪器公司;K8400 型全自动凯氏定氮仪,福斯分析仪器公司;pH211C 型酸度计,北京哈纳科仪科技有限公司;NH310 型高品质便携式电脑色差仪,深圳市三恩时科技有限公司;3-30KS 型离心机,德国 Sigma 公司;SW-CJ-2FD 型洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 合成

分别参照 Wang 等^[19]和 Atencio 等^[20]法进行钼簇

Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 合成,用紫外光谱、红外光谱表征其特征结构,研究结果与前人结果一致。

1.4.2 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 对酪氨酸酶动力学研究

1.4.2.1 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 对酪氨酸酶抑制率

磷酸盐测活体系^[21]是 0.5 mmol/L 的 L-多巴(L-DOPA)溶液为底物,在测活体系中加入 100 μ L 溶于 DOMS 的不同浓度的效应物和 2.8 mL 底物溶液,30 $^{\circ}$ C 恒温水浴中保温 10 min,再加入 100 μ L 酪氨酸酶水溶液,快速混匀后用紫外分光光度计测定 A_{475} 。相同因素做三次平行实验,观察紫外吸收值随不同效应物浓度变化,计算效应物对酪氨酸酶的半数抑制率。

1.4.2.2 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 对酪氨酸酶抑制机理

在上述磷酸盐测活体系中,固定底物 L-DOPA 浓度,改变酪氨酸酶的浓度,测定不同浓度效应物对蘑菇酪氨酸酶催化 L-DOPA 氧化活力的影响,作图判定其抑制机理。

1.4.2.3 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 对酪氨酸酶抑制类型

在磷酸盐测活体系中,固定酶的浓度,改变底物 L-DOPA 浓度,测定不同浓度效应物对酶催化初速度的影响,作双倒数图判断抑制类型,再次作图计算抑制常数(K_1 、 K_{IS})。

1.4.3 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 对凡纳滨对虾保鲜指标的测定

1.4.3.1 样品前处理

活虾在冰水中猝死,将其均分成三等份,分别放入温度 4 $^{\circ}$ C,体积为 1 L 的超纯水、1 mmol/L Mo_{36} 溶液和 1 mmol/L Mo_{36} -bipy 溶液中浸泡 30 min,取出、晾干,放入无菌袋中于 4 $^{\circ}$ C 低温环境中贮藏,连续 10 d 对虾体的指标的进行测定。

1.4.3.2 保鲜指标测定方法

参照 Queiroga^[22]和 Young^[23]方法稍作修改,对样品色泽、体表、气味、肌肉组织质地、可接受程度等进行评分,感官评定标准表如表 1 所示。参照文献方法^[24]测定样品 pH 值变化;测定对虾头胸部位的明暗度 L^* 值表征其色差变化。参照国家标准 GB 5009.228-2016《食品中挥发性盐基总氮的测定》^[25]法测定样品的挥发性盐基氮(TVB-N)。参照国家标准 GB 4789.2-2016《食品卫生微生物学检验:菌落总数测定》^[26]测定其菌落总数。

1.4.4 数据分析

采用 Origin 8.0 与 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析。

表 1 感官评定标准

Table 1 Standard of Sensory score			
评分项目	评分参考标准		
	2 分	1 分	0 分
体表	虾体清洁完整,无脱落无黑头现象	虾体较完整,少数出现黑头现象	虾体不完整,甲壳、尾部脱落严重,黑头现象严重
色泽	体色正常,有光泽	色泽稍有变化,光泽变暗	色泽发暗,无光泽
气味	虾固有的香味	有较淡的腥味或氨味	有强烈的腥臭味和氨味
肌肉组织质地	组织坚实,弹性好	组织稍有连接,较有弹性	组织松弛,手触弹性差
可接受程度	较好,可以接受	一般,勉强接受	较差,难以接受

2 结果与分析

2.1 Mo₃₆ 和 Mo₃₆-bipy 对酪氨酸酶酶动力学分

析

2.1.1 Mo₃₆ 和 Mo₃₆-bipy 对酪氨酸酶半数抑制率

分别以 Mo₃₆ 和 Mo₃₆-bipy 为效应物的磷酸盐测活体系中,固定 L-DOPA 浓度,测定效应物在不同浓度下对酪氨酸酶二酚酶抑制效果。结果显示效应物对酪氨酸酶的抑制率随效应物浓度的增加而降低,表明 Mo₃₆ 和 Mo₃₆-bipy 对酪氨酸酶二酚酶活力有明显的抑制作用,Mo₃₆ 对酪氨酸酶二酚酶的 IC₅₀ 为 0.0358 mmol/L; Mo₃₆-bipy 对酪氨酸酶二酚酶的 IC₅₀ 为 0.0601 mmol/L。效应物 Mo₃₆-bipy 的结构中,吡啶与苯的结构相似,具有一定的芳香性,吡啶环上的氮原子的电荷性较大,对环上电子云密度分布有很大影响,Bity 嵌入到 Mo₃₆ 空穴中使其的结构发生变化,Mo₃₆-bipy 酸强度随其阴离子电荷的增加而减弱,酶促反应的最佳 pH 4~7 之间,Mo₃₆-bipy 酸碱度影响酪氨酸酶的活性^[27],Mo₃₆ 对酪氨酸酶二酚酶的抑制效果略优于 Mo₃₆-bipy。

2.1.2 Mo₃₆ 和 Mo₃₆-bipy 对酪氨酸酶二酚酶的抑制机理

分别以 Mo₃₆ 和 Mo₃₆-bipy 为效应物的磷酸盐测活体系中,固定底物 L-DOPA 浓度,改变测活体系中的酶量,测定效应物浓度变化对酶促反应的影响。结果如图 1 显示,以酶活力为纵坐标,酶浓度为横坐标得到一组经过原点的直线。图 1 中直线斜率分别随着 Mo₃₆, Mo₃₆-bipy 浓度增大而降低,两种效应物通过与酶结合生成可解离的复合物,抑制剂与游离酶和酶-底物复合物之间达到一定的平衡关系,降低了测活体系中酶催化反应的速率,但是没有减少有效酶量,Mo₃₆、Mo₃₆-bipy 对酪氨酸酶二酚酶均是可逆抑制机理。

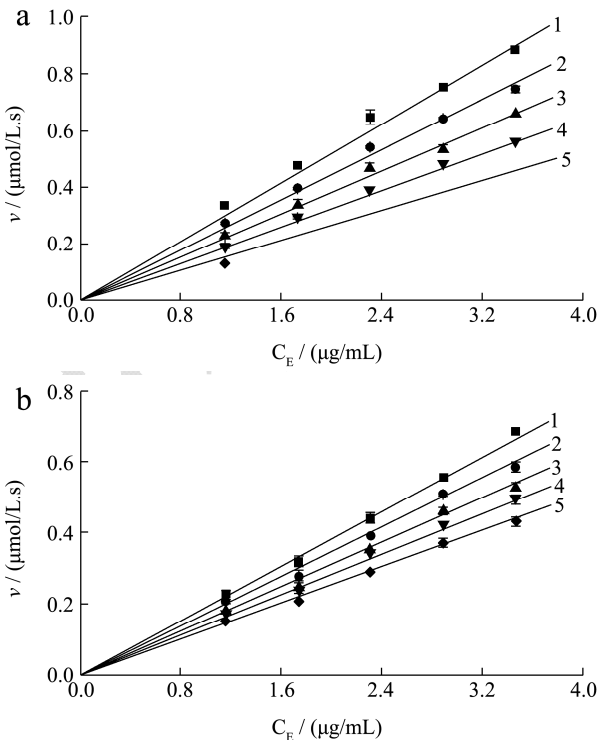


图 1 Mo₃₆ 和 Mo₃₆-bipy 对酪氨酸酶二酚酶的抑制机理

Fig.1 Inhibitory mechanism of Mo₃₆ and Mo₃₆-bipy on the diphenolase of tyrosinase

注: a. 中直线 1~5 浓度分别为 0, 0.00833、0.0167、0.0250 和 0.0333 mmol/L; b. 中直线 1~5 浓度分别为 0、0.0100、0.0200、0.0399 和 0.0400 mmol/L。

2.1.3 Mo₃₆ 和 Mo₃₆-bipy 对酪氨酸酶二酚酶的抑制类型及抑制常数

分别以不同浓度 Mo₃₆ 和 Mo₃₆-bipy 为效应物的磷酸盐测活体系中,固定酪氨酸酶的浓度,改变测活体系中底物 L-DOPA 浓度,测定效应物浓度的变化对酶催化反应的影响。酶反应速率倒数对 L-DOPA 浓度倒数作的 Lineweaver-Burk 双倒数图。如图 2a 所示,直线 1~5 相交于纵轴,随着 Mo₃₆ 浓度变大,米氏常数 (K_m) 增大,最大反应速率 (V_{max}) 不变,表明效应物 Mo₃₆ 对酪氨酸酶是竞争型抑制,得出抑制常数 K_I=0.00284 mmol/L。Mo₃₆ 只是与游离的酶结合,而不

是与酶-底物复合物结合^[28]。如图 2b 所示, 直线 1~5 相交于第 II 象限, 随着 Mo_{36} -bipy 浓度变大, 米氏常数 (K_m) 变大, 最大反应速率 ($V_{\max}$) 变小, 表明 Mo_{36} -bipy 对酪氨酸酶的抑制类型为混合型, 得出抑制常数 $K_i=0.0604 \text{ mmol/L}$, 对酶-底物络合物抑制常数 $K_{is}=0.0825 \text{ mmol/L}$ 。 Mo_{36} -bipy 既能与游离酶结合, 也能与酶-底物复合物结合。

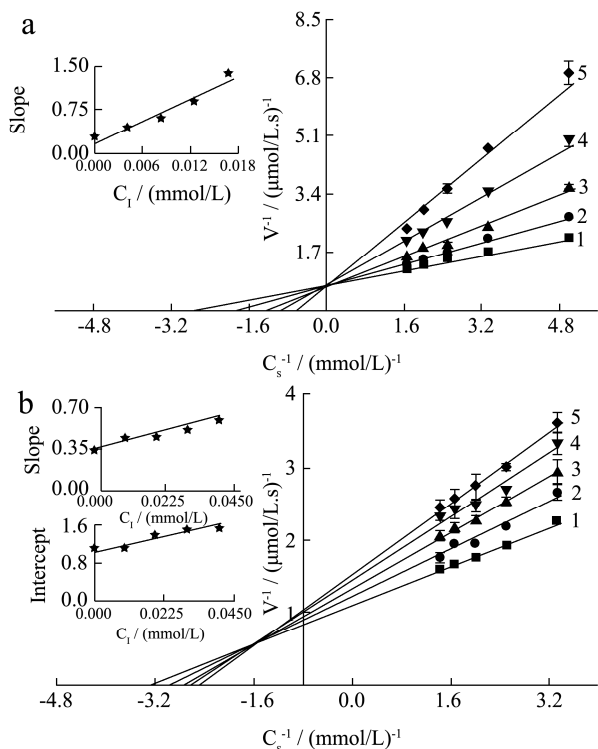


图 2 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 对酪氨酸酶二酚酶抑制类型及抑制常数
Fig.2 Inhibitory type and inhibition constants of Mo_{36} and Mo_{36} -bipy on the diphenolase of tyrosinase

注: a. 中直线 1~5 浓度分别为 0, 0.00833、0.0167、0.0250 和 0.0333 mmol/L; b. 中直线 1~5 浓度分别为 0、0.0100、0.0200、0.0399 和 0.0400 mmol/L。

2.2 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 对南美白对虾保鲜作用

2.2.1 感官分析

对照组与处理组 (Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy) 凡纳滨对虾在贮藏期间感官评分变化如图 3 所示。在贮藏期间对虾体的色泽、体表、气味、肌肉组织质地、可接受程度进行评估。对照组与处理组 (Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy) 凡纳滨对虾的感官评分均随贮藏时间延长呈现下降趋势。在贮藏期的第 3 d, 对照组的凡纳滨对虾体头部出现黑头现象, 色泽变暗, 感官评定分值急剧下降, 贮藏 10 d 后感官评分值低于 1。处理组 (Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy) 的感官评分明显高于对照组 ($p<0.01$)。如图所示处理组凡纳滨对虾感官评分下降趋势缓慢, 贮藏 10 d 后感官评分值降到 6, 主要因为效应物抑制了

虾体内酪氨酸酶催化氧化活性, 减缓了虾体质量劣变, Mo_{36} -bipy 处理组感官评分高于 Mo_{36} , Mo_{36} -bipy 保鲜效果更佳。

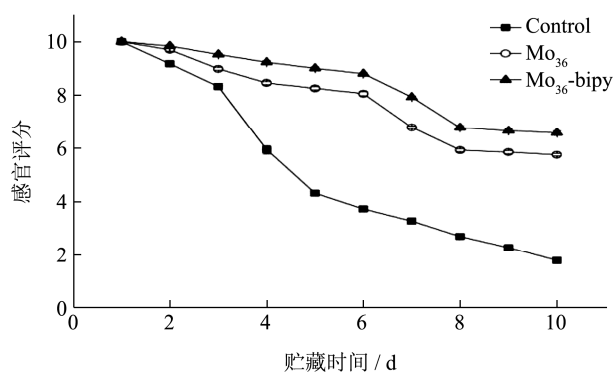


图 3 凡纳滨对虾在贮藏过程中的感官评分变化

Fig.3 Changes in sensory score values of *Litopenaeus vannamei* during chilled storage

2.2.2 pH 值

对照组与处理组 (Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy) 凡纳滨对虾在贮藏期间 pH 变化情况如图 4 所示。Kallada^[29]报道了白对虾低温贮藏时, pH 值达到 7.6 不可接受。对照组新鲜的凡纳滨对虾 pH 值为 6.82, 在第 5 d 已不被消费者接受, 该结果与 Múgica^[30]的研究基本一致, 可能是由于凡纳滨对虾体内的蛋白质, 氨基酸在微生物和酶的作用下分解产生碱性胺类物质导致 pH 值上升^[31]。如图所示 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 处理组凡纳滨对虾 pH 值均随贮藏期间延长而上升, 处理组样品的最初 pH 值均低于对照组, 主要因为 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 水溶液 pH 较低, Mo_{36} 处理组在第 6 d pH 值达到不可接受临界值, Mo_{36} -bipy 在第 7 d pH 值达到 7.62。 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 对凡纳滨对虾 pH 值的影响趋势呈现一致性。

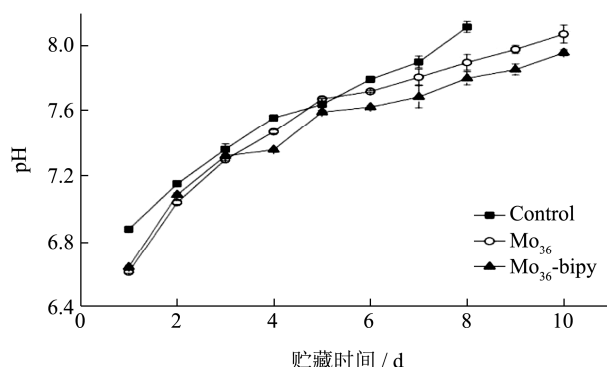


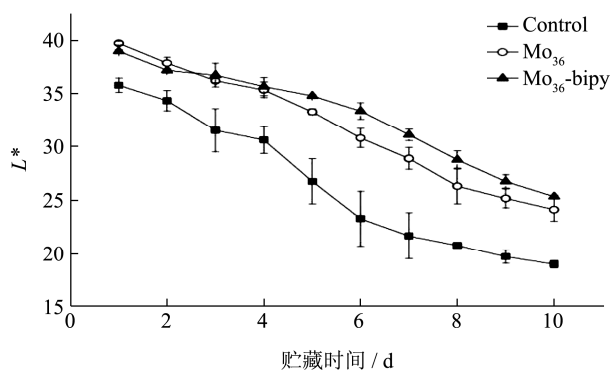
图 4 凡纳滨对虾在贮藏过程中的 pH 变化

Fig.4 Changes in pH values of *Litopenaeus vannamei* during chilled storage

2.2.3 颜色变化

对照组与处理组 (Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy) 凡纳滨对虾在贮藏期间颜色变化如图 5 所示。 L^* 值表示颜色的

深浅程度, L^* 值越小, 表示虾体表颜色越深, 表面暗淡无光泽, 在整个贮藏期间, 对照组与 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 处理组的 L^* 值随着贮藏时间延长而呈下降趋势, 不同的处理方式下降速率有明显的差别, 对照组的 L^* 下降趋势最大, Mo_{36} 处理次之, Mo_{36} -bipy 最小。对照组新鲜的凡纳滨对虾 L^* 值为 36.85, 贮藏第 4 d L^* 值急剧下降, 第 10 d L^* 值降到 18.95。处理组 L^* 值均高于对照组, 1~10 d 之间 L^* 值下降趋势缓慢, 贮藏第 10 d L^* 值下降到 24.85。对照组与处理组间存在极显著性差异 ($p < 0.05$)。 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 能有效抑制虾体黑变, 抑制了酪氨酸酶的氧化催化, 减缓了虾体黑色素的生成, Mo_{36} -bipy 对虾的保鲜效果更佳, 与感官评定的结果一致。冯家敏^[32]等人研究流化冰结合防黑剂、抑菌剂对南美白对虾的保鲜效果, 同样发现感官评分与颜色变化结果具有一致性, 凡纳滨对虾虾体 L^* 值的变化与虾的外表感官有关联性, 虾体颜色变化主要原因是由于酪氨酸酶的催化氧化所致。

图5 凡纳滨对虾在贮藏过程中的 L^* 变化Fig.5 Changes in L^* values of *Litopenaeus vannamei* during chilled storage

2.2.4 挥发性盐基氮 (TVB-N) 变化

对照组与处理组 (Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy) 凡纳滨对虾贮藏时 TVB-N 变化情况如图 6 所示。TVB-N 是白对虾死亡后其体内含氮物质分解的产物, 是白对虾腐败程度的重要指标之一^[33]。GB 2733-2015《鲜、冻动物性水产品卫生标准》^[34]规定, 海水虾类 TVB-N 可食用限量为 $\leq 30 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 。对照组新鲜凡纳滨对虾 TVB-N $7.2 \text{ mg}/100 \text{ g}$, 随贮藏时间的延长 TVB-N 含量呈上升趋势, 第 6 d TVB-N 含量已达到标准临界值。如图所示对照组与处理组 (Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy) 凡纳滨对虾的 TVB-N 值随着贮藏时间的延长而增大, 对照组和 Mo_{36} 处理组间无显著性差异 ($p > 0.05$), 对照组和 Mo_{36} -bipy 处理组存在显著性差异 ($p < 0.05$)。在贮藏第 7 d Mo_{36} 处理组与对照组的 TVB-N 值均超过国家标准值, 虾体已经腐败变质。 Mo_{36} -bipy 处理组在第 10 d 才达到的值 $30 \text{ mg}/100 \text{ g}$, 主要原因是 Mo_{36} -bipy

有效的抑制虾体内微生物的生长与繁殖, 减缓了虾体内含氮物质的分解, 减少了挥发性盐基总氮的产生, 延长了贮藏时间。

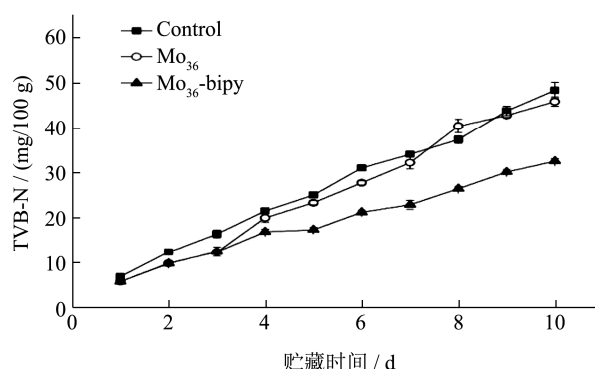


图6 凡纳滨对虾在贮藏过程中的 TVB-N 的变化

Fig.6 Changes in TVB-N of *Litopenaeus vannamei* during chilled storage

2.2.5 菌落总数变化

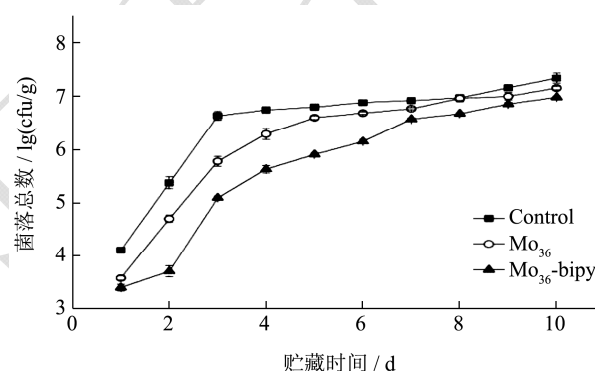


图7 凡纳滨对虾在贮藏过程中的菌落总数的变化

Fig.7 Changes in total number of colonies of *Litopenaeus vannamei* during chilled storage

对照组与处理组 (Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy) 对凡纳滨对虾在贮藏期菌落总数变化如图 7 所示。微生物利用虾体蛋白质等营养物质大量生长繁殖, 菌落总数超过 $6(\lg(\text{cfu/g}))$ 时, 虾体腐败变质, 已不可食用^[35]。如图所示对照组凡纳滨对虾菌落总数在 1~3 d 急剧上升, 4°C 的冷藏环境, 微生物仍能生长繁殖, 贮藏第 3 d 菌落总数为 $6.6 \log_{10} \text{ cfu/g}$, 之后处于平稳状态。处理组与对照组凡纳滨对虾菌落总数变化趋势是相同, 但处理组菌落总数显著低于对照组 ($p < 0.05$)。 Mo_{36} 处理组菌落总数在第 4 d 达到 $6.3 \log_{10} \text{ cfu/g}$, Mo_{36} -bipy 处理组菌落总数在第 6 d 达到 $6.1 \log_{10} \text{ cfu/g}$, 凡纳滨对虾贮藏时间延长了 1~3 d, 虾体内的微生物得到一定程度的抑制, 第 8~10 d 菌落总数处于平缓状态, 微生物增长缓慢, 可能由于微生物繁殖空间不足, 代谢产物影响微生物正常生长繁殖, 随时间的延长效应物 Mo_{36} 和 Mo_{36} -bipy 对微生物的抑制能力减弱, 导致处理组的菌落总数与对照组呈现一致性变化。此结果与

凌平华^[36]的研究冷藏结果一致,处理组比广泛应用的冰温贮藏效果好,低温冷藏并添加抑酶剂能更好的抑制微生物的生长繁殖。

3 结论

3.1 本文合成 2 种高核钼簇 Mo_{36} 和 $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$, 并通过紫外和红外的表征证实其为目标化合物。合成的高核钼簇 Mo_{36} 和 $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 对酪氨酸酶二酚酶有抑制作用。 Mo_{36} 和 $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 对酪氨酸酶二酚酶抑制一半的 IC_{50} 值分别为 0.0358 mmol/L 和 0.0601 mmol/L, Mo_{36} 对酪氨酸酶二酚酶为可逆竞争型抑制, 抑制常数 $K_i=0.00284$ mmol/L。 $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 对酪氨酸酶为可逆混合型抑制, $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 既能与游离酶结合, 也能与酶-底物复合物结合, 其抑制常数 $K_i=0.0604$ mmol/L, 对酶-底物络合物抑制常数 $K_{is}=0.0825$ mmol/L。根据两种效应物对酪氨酸酶的半数抑制率可知 Mo_{36} 对酪氨酸酶活性的抑制作用效果优于 $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 。

3.2 综合感官评分, 颜色 L^* 值, pH 值、TVB-N 和菌落总数五个指标分析, 在 4 °C 冷藏条件下, 凡纳滨对虾的货架期为 3 d, 此结果与吴佩君^[37]的结果基本一致。经 Mo_{36} 和 $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 处理的凡纳滨对虾能贮藏 5~7 d。效应物 Mo_{36} 和 $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 能一定程度上调节对虾的黑变现象, 能适当提升感官分值、 L^* 值, 改善对虾外观, 降低 pH 值与菌落总数。效应物 Mo_{36} 和 $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 抑菌效果不显著, 挥发性盐基总氮含量较高。 Mo_{36} 和 $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 能有效抑制凡纳滨对虾在低温贮藏期间的黑变现象, 起到保鲜剂的作用, $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 的抑制效果比 Mo_{36} 的抑制效果好。 $\text{Mo}_{36}\text{-bipy}$ 有望作为一种新型的酪氨酸酶抑制剂应用于凡纳滨对虾保鲜, 延长其货架期。

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
ZHANG Gao-jing, HAN Li-ping, SUN Jian-feng, et al. Analysis and evaluation of nutritive composition in *Penaeus vannamei* [J]. Journal of Chinese Institute of Food, 2013, 13(8): 254-260
- [2] Montero P, Lopezcaballero M E, Perezmateos M. The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*) [J]. Journal of Food Science, 2010, 66(8): 1201-1206
- [3] 段秀霞, 施文正, 邱伟强, 等. 南美白对虾多酚氧化酶的提取及其性质研究[J]. 广东农业科学, 2017, 44(3): 136-142
DUAN Xiu-xia, SHI Wen-zheng, QIU Wei-qiang, et al. Extraction and characteristics of polyphenol oxidase from white shrimp [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2017, 44(3): 136-142
- [4] 吕艳芳, 魏春娇, 王娇, 等. 南美白对虾酚氧化酶的提取及生化特性[J]. 食品科学, 2014, 35(7): 113-117
LYU Yan-fang, WEI Chun-jiao, WANG Jiao, et al. Extraction and biochemical characteristics of phenoloxidase from *Penaeus vannamei* [J]. Food Science, 2014, 35(7): 113-117
- [5] Mu Y, Li L, Zhou Y, et al. Inhibitory mechanism of red globe amaranth on tyrosinase [J]. Journal of Cosmetic Science, 2013, 64(2): 99-100
- [6] Al-Dagal M M, Bazaraa W A. Extension of shelf life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria [J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(1): 51-56
- [7] Wu S. Effect of Chitosan-based edible coating on preservation of white shrimp during partially frozen storage [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 65(5): 325-328
- [8] García M A, Paz N D L, Castro C, et al. Effect of molecular weight reduction by gamma irradiation on the antioxidant capacity of chitosan from lobster shells [J]. Journal of Radiation Research & Applied Sciences, 2015, 8(2): 190-200
- [9] 吕艳芳, 蔡路昀, 李颖畅, 等. 冰温下复合保鲜剂和焦亚硫酸钠对南美白对虾防黑变保鲜效果比较[J]. 中国食品学报, 2017, 17(7): 129-138
LYU Yan-fang, CAI Lu-jun, LI Ying-chang, et al. The comparison between compound preservatives and sodium metabisulfite treatment on the anti-melanosis effect of *Penaeus vannamei* under ice-temperature [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(7): 129-138
- [10] Nirmal N P, Benjakul S. Use of tea extracts for inhibition of polyphenoloxidase and retardation of quality loss of pacific white shrimp during iced storage [J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(4): 924-932
- [11] 王恩波. 多酸化学概论[M]. 长春: 东北师范大学出版社, 2009: 1-75
WANG En-bo. Introduction to polyacid chemistry [M]. Changchun: Northeast Normal University Press, 2009: 1-75
- [12] Kawasaki N, Wang H, Nakanishi R, et al. Nanohybridization of polyoxometalate clusters and single-wall carbon nanotubes: Applications in molecular cluster batteries [J]. Angewandte Chemie, 2011, 123(15): 3533-3536
- [13] Wang X H, He J H, Zhang R C, et al. Synthesis, spectroscopic characterization and antitumor activity *in vitro*

- of organometallo substituted polyoxotungstates (RM)₃P₂W₁₅-O₅₉ⁿ⁻ (RM=CpTi, CpZr, C₄H₇O₂Sn or C₅H₉O₂Sn) [J]. Chinese Journal of Chemistry, 2003, 21(4): 415-418
- [14] Li D, Gao X Z, Gu J M, et al. A novel application of ti-substituted polyoxometalates: Anti-inflammatory activity in OVA-induced asthma murine model [J]. Bioinorganic Chemistry and Applications, 2016, 2: 1-9
- [15] Balici S, Niculae M, Pall E, et al. Antibiotic-like behaviour of polyoxometalates *in vitro* comparative study: Seven polyoxotungstates-nine antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria [J]. Revista De Chimie-Bucharest, 2016, 67(3): 485-490
- [16] Colovic M B, Medic B, Cetkovic M, et al. Toxicity evaluation of two polyoxotungstates with anti-acetylcholinesterase activity [J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2017, 33: 68-75
- [17] Xing R, Zheng A, Wang F, et al. Functionality study of Na₆PMo₁₁FeO₄₀ as a mushroom tyrosinase inhibitor [J]. Food Chemistry, 2015, 175: 292-299
- [18] Chen B N, Xing R, Wang F, et al. Inhibitory effects of α-Na₈SiW₁₁CoO₄₀ on tyrosinase and its application in controlling browning of fresh-cut apples [J]. Food Chemistry, 2015, 188: 177
- [19] Wang L, Jiang M, Wang E B, et al. Synthesis and characterization of the nanoporous ultrathin multilayer films based on molybdenum polyoxometalate (Mo₃₆)_n [J]. Materials Letters, 2004, 58(5): 683-687
- [20] Atencio R, Briceno A, Galindo X. A mesoporous hydrogen-bonded organic-inorganic framework bearing the isopolymolybdate [Mo₃₆O₁₁₂(OH₂)₁₆]⁸⁻ [J]. Chemical Communications, 2005, 5: 637-639
- [21] Lin Y F, Hu Y H, Jia Y L, et al. Inhibitory effects of naphthols on the activity of mushroom tyrosinase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(1-2): 32-36
- [22] Queiroga I M B N, Silva J A D, Cavalheiro J M O, et al. Sensory quality of frozen shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Semina Ciências Agrárias, 2014, 35(4): 1801-1812
- [23] Young H, Anang D M, Tiwari B K. Shelf life and textural properties of cooked-chilled black tiger prawns (*Penaeus monodon*) stored in vacuum pack or modified atmospheric packaging at 4 or 20 °C [J]. Food Packaging & Shelf Life, 2014, 2(2): 59-64
- [24] Bindu J, Ginson J, Kamalakanth C K, et al. Physico-chemical changes in high pressure treated indian white prawn (*Fenneropenaeus indicus*) during chill storage [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013, 17(1): 37-42
- [25] GB5009.228-2016,水产品中挥发性盐基氮的测定[S]
GB 5009.228-2016, Determination of Volatile Base Nitrogen in Aquatic Products [S]
- [26] GB4789.2-2016m 食品微生物学检验菌落总数测定[S]
GB 4789.2-2016, Determination of the Total Number of Colonies in Food Microbiological Tests [S]
- [27] Kaplan H, Laidler K J. The Influence of pH and inhibitors on the kinetics of enzyme reactions [J]. Canadian Journal of Chemistry, 2011, 45(5): 539-546
- [28] 金一琼,陈周谭,赖富饶,等.曲酸与阿魏酸对酪氨酸酶的抑制作用研究[J].现代食品科技,2012,28(4):378-381
JIN Yi-qiong, CHEN Zhou-tan, LAI Fu-rao, et al. Evaluation and applications of inhibitory effects of kojic acid and ferulic acid on tyrosinase [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(4): 378-381
- [29] Kallada R K, Han I Y, Toler J E, et al. Shelf life extension of shrimp (white) using modified atmosphere packaging [J]. Polish Journal of Food & Nutrition Sciences, 2013, 63(2): 87-94
- [30] Múgica B, Barros-Velázquez J, Miranda J M, et al. Evaluation of a slurry ice system for the commercialization of ray (*Raja clavata*): Effects on spoilage mechanisms directly affecting quality loss and shelf-life [J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(6): 974-981
- [31] Goncalves A C, López-Caballero M E, Nunes M L. Quality changes of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) packed in modified atmosphere [J]. Journal of Food Science, 2003, 68(8): 2586-2590
- [32] 冯家敏,张宾,蒋林珍,等.流化冰结合防黑剂,抑菌剂对南美白对虾的保鲜效果[J].食品科学,2016,37(2):244-249
FENG Jia-min, ZHANG Bin, JIANG Lin-zhen, et al. Quality preservation of fresh shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by employment of slurry ice in combination with bacteriostatic agent and melanosis inhibitor [J]. Food Science, 2016, 37(2): 244-249
- [33] Lin T, Wang J J, Li J B, et al. Use of acidic electrolyzed water ice for preserving the quality of shrimp [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61(36): 8695-8702
- [34] GB2733-2015,鲜、冻动物水产品卫生标准[S]
GB2733-2015, Sanitary Standards for Fresh and Frozen Animal Aquatic Products [S] (下转第 197 页)