

# 日本对虾的酚氧化酶特性研究

赵 娇 戚晓玉 尤瑜敏 王季襄 周培根

(上海水产大学, 200090)

**摘 要** 本文以日本对虾为材料提取和部分纯化酚氧化酶,并对其特性进行了研究。以邻苯二酚为作用底物,该酶的最适 pH 为 6.5,在 pH 5.0—8.0 范围内有较高稳定性,最稳定的 pH 为 7.0。最适温度为 40℃,在 40℃ 以下表现出较高的热稳定性,而在 50℃ 以上迅速失活。该酶对不同的酚类物质表现出不同的底物专一性,由高至低的趋势依次为三元酚(焦性没食子酸)、二元酚(邻苯二酚及 DL-多巴)和单元酚(L-酪氨酸)。米氏常数  $K_m$  值测定表明,该酶对邻苯二酚比 DL-多巴有更高的亲和力。浓度 15 mmol/L 的 Vc 和 L-半胱氨酸对酶的活性具有强烈抑制作用,抑制效率分别为 89.6% 和 86.0%。

**关键词** 日本对虾,酚氧化酶,酶促褐变

虾的褐变是影响感官质量的重要因素。在虾中,酶促褐变主要是 L-酪氨酸和 L-多巴在酚氧化酶(Phenoloxidase,简称 PO; E. C. 1.10.3.1)的作用下氧化生成的多巴色素与其它的发色基团一起形成黑色素所致[Bailey 等,1960b; Ferrer 等,1989]。因此长期以来,对虾类酚氧化酶的研究一直受到人们的重视。Simpson 等人[1988]分离纯化了桃红对虾(*Penaeus duorarus*)和白对虾(*Penaeus setiferus*)中的 PO,并对它们的特性进行了比较。Rolle 等人[1990]对斑节对虾(*Penaeus monodon*)的 PO 进行纯化,并对其特性进行了研究。Chen 等人[1991]利用制备型聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化了美洲龙虾(*Panulirus argus*)和天鹅龙虾(*Panulirus cygnus*)的 PO,并对它们的特性及分子量进行了测定。Opoku-Gyamfua 等人[1992]从龙虾(*Homarus americanus*)中提取多酚氧化酶并与商品酪氨酸酶的某些特性进行了比较。

本文以日本对虾为材料,提取和部分纯化酚氧化酶,并对其特性及抑制剂进行研究,为虾的褐变机理及其在保鲜和加工中防止褐变提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

活的日本对虾(*Penaeus japonicus*)购自上海市场,取其头部组织在液氮中研磨成细粉,于 -25℃ 保存备用。

### 1.2 PO 的提取及部分纯化

PO 的提取及部分纯化主要按 Chen 等人[1991]和 Simpson 等人[1987,1988]的方法并略加改进。

称取100克虾粉,将其悬浮于300mL 0.05mol/L pH 7.2的磷酸盐缓冲溶液,内含有1.0 mol/L NaCl及0.2% Brij 35(日本产)。在温和搅拌下提取1小时,过滤,滤液于20000g离心30分钟,除去液面上的脂类和色素后,取上清液作为粗酶液。

加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 到粗酶液中,使其饱和度为40%,静置30分钟,于20000g离心30分钟,收集沉淀并溶解在少量体积的0.05 mol/L pH 7.2磷酸盐缓冲溶液中,然后在相同的缓冲液中透析过夜,其间更换3次透析液。

经透析的酶液通过DEAE-纤维素32(DE32, Whatman)离子交换柱(2.6×34 cm)纯化。上样后,先用125 mL 0.05mol/L pH 7.2磷酸盐缓冲溶液洗脱,然后用500mL含NaCl(0—1.0 mol/L)的相同缓冲溶液进行梯度洗脱并收集,流速为0.2 mL/min,每4.0 mL收集一管。最后合并含高PO活性的洗脱液。按前面所述方法进行透析,经透析后的酶液用于特性研究。以上操作步骤均在4℃下进行。

### 1.3 PO活力及蛋白质测定

PO活力测定按Zhou等人[1993]的方法进行。以0.1 mol/L pH 6.0磷酸盐缓冲液配制0.05 mol/L邻苯二酚溶液作为酶的底物。0.2 mL酶液与2.8 mL底物溶液在30℃反应,在分光光度计上于波长420nm处测定吸光度值。在上述条件下,使吸光度值每分钟增加0.001所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

蛋白质的测定按Lowry法[Lowry等,1951]进行。以BSA作为测定的标准蛋白。

### 1.4 pH对PO活性及稳定性影响

配制不同pH的底物的缓冲溶液:0.1 mol/L柠檬酸—0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 3.0—5.0; 0.1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ —0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.0—8.0; 0.1 mol/L甘氨酸—0.1 mol/L NaOH, pH 9.0—10.0。

pH对PO活性影响的测定:2.8 mL不同pH的0.05mol/L邻苯二酚溶液与0.2 mL酶液在30℃反应,测定PO活力。

在测定pH对PO稳定性的影响时,分别吸取0.2 mL酶液,在0.4 mL不同的pH(pH 2.5—10.0)的缓冲液中于30℃保温30分钟。然后用0.3 mL保温的PO酶液与2.7mL 0.05 mol/L邻苯二酚溶液(pH 6.0)在30℃反应,测定PO的残留活力。

### 1.5 温度对PO活性及稳定性影响

温度对PO活力影响的测定:预先将2.9 mL 0.05 mol/L邻苯二酚底物溶液(pH 6.0)在不同温度(20℃—70℃)下保温5分钟,然后加入0.1 mL酶液,测定其酶活力。

PO热稳定性测定:首先将酶液在不同温度下预热30分钟,然后立即在冰浴中冷却5分钟。0.1 mL酶液与2.9 mL 0.05 mol/L邻苯二酚溶液(pH 6.0)在30℃反应,测定PO残留活力。

### 1.6 底物专一性测定

用于PO作用的底物分别为:L-酪氨酸(2.5 mmol/L),邻苯二酚(10 mmol/L),DL-多巴(5 mmol/L)和焦性没食子酸(10 mmol/L)。以上均用0.1 mol/L pH6.0磷酸盐缓冲溶液配制。2.7 mL不同底物溶液与0.3 mL酶液于30℃反应3分钟,在各自底物最适波长(见表2)测定吸光度变化,计算酶活力。

### 1.7 米氏常数(K<sub>m</sub>)测定

以0.1 mol/L pH 6.0磷酸盐缓冲溶液分别配制不同浓度的底物溶液。邻苯二酚的浓度为2.0—6.0 mmol/L; DL-多巴的浓度为2.0—8.0 mmol/L。

2.7 mL 底物溶液与0.3 mL 酶液在30℃反应3分钟,在波长420 nm(邻苯二酚)和475 nm(DL-多巴)处测定酶活力。

根据 Lineweaver 等[1934]曲线计算  $K_m$  值。

### 1.8 抑制剂的影响

本研究的抑制剂为维生素 C(Vc), L-半胱氨酸和对氨基苯甲酸(PABA),用0.1 mol/L pH 6.0磷酸盐缓冲溶液配制,浓度均为0.15、1.5和15 mmol/L。

测定时,先用0.2 mL 抑制剂溶液与0.3 mL 酶液在30℃保温30分钟,然后加入2.5 mL 10 mmol/L 邻苯二酚溶液(用上述缓冲溶液配制)于30℃反应3分钟,在波长420 nm 处测量吸光度变化,计算酶活力。由于抑制剂的作用,酶反应出现一个滞后期,测定吸光度变化时从滞后期过后开始。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PO 的提取及部分纯化

在 PO 提取的预备实验中观察到,该酶在 pH7.0 左右比较稳定,一周内酶活力降低大约 5%,而且在酶的提取时含有 0.2% Brij 35 及 1.0 mol/L NaCl 时可提高 PO 的提取率,这可能是由于 Brij 35 对细胞膜有一定的破坏作用,并增加 PO 的溶解性,而 NaCl 有促进 Brij 35 的增溶作用[冯万祥等,1989]。

在预备实验中也发现,分别以虾的头、腹和尾部为材料的粗提液相比较,头部组织的 PO 活性明显高于其它部位,而蛋白质的含量最低。因此,本研究用虾的头部组织作为 PO 的材料来源。PO 提取及部分纯化结果见表1。

表1 日本对虾酚氧化酶的纯化

Tab. 1 Purification of Japanese prawn phenoloxidase

纯化步骤	总体积 (mL)	总活力 (单位)	总蛋白质 (mg)	比活力 (单位/mg 蛋白)	产率 (%)	纯化倍数 (倍)
粗酶液	298.0	35755.0	2457.2	14.6	100	
0-40%(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	66.0	29960.3	200.4	149.5	83.8	10.3
DEAE-纤维素32	62.0	17039.7	43.7	389.9	47.7	26.8

注:100g 虾粉按前述的方法处理,每个测定数据均为三次平行试验结果的平均值。

PO 纯化的第一步一般采用丙酮或硫酸铵沉淀。由于丙酮沉淀对酶有相当的失活作用[Simpson 等,1988],故本研究采用硫酸铵沉淀。结果表明,绝大部分 PO 活性存在于硫酸铵饱和度为40%的沉淀中,回收率达83.8%,比活力比粗酶液提高10.3倍。据报道,白对虾的 PO 主要也集中在40%饱和度的硫酸铵沉淀中。

PO 的进一步纯化采用 DEAE-纤维素32离子交换柱层析,洗脱曲线见图1。从图中可以看出,在第65-80管之间有一个 PO 主峰,相应于 NaCl 浓度为0.60 mol/L;在其后面似乎还有一个很小的 PO 洗脱峰。合并主峰的洗脱液,比活力为389.9单位/mg 蛋白,比上柱前的酶液提高了2.6倍。经过上述两步纯化,PO 的总纯化倍数为26.8倍。有文献报道,在虾 PO 的纯化中,经硫酸铵沉淀后,直接采用多巴-Sepharose 4B 亲和柱层析和 Phenyl Sepharose CL-4B 柱

层析进行纯化,纯化效果均优于 DEAE—纤维素柱层析[Simpson 等,1987、1988;Rolle 等,1991]。

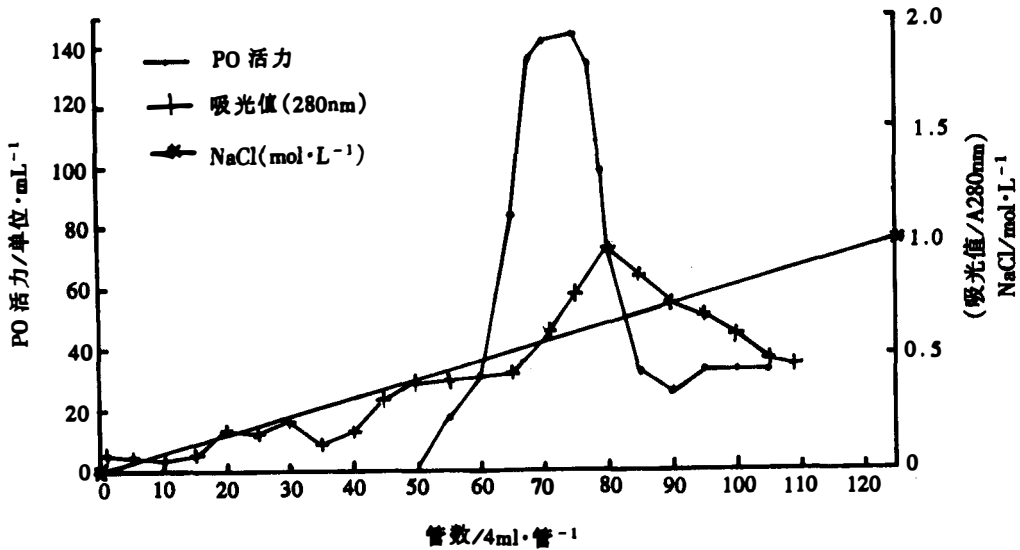


图1 酚氧化酶的 DEAE—纤维素32柱层析洗脱曲线

Fig. 1 Elution profile of PO from DEAE—Cellulose 32 ion—exchange column

## 2.2 PO 的最适 pH 及其稳定性

日本对虾 PO 活性与 pH 的关系曲线见图2。结果表明,以邻苯二酚为底物,在 pH 3.0—6.5 之间酶活性随着 pH 升高而增加,其中在 pH 5.0—6.5 之间酶活性增加的速率更为迅速。当 pH 升高至 6.5 以上,其酶活性则随着 pH 的升高而下降,其最适 pH 为 6.5。这一结果与美洲龙虾和褐对虾(*Penaeus aztecus*)中 PO 的最适 pH 相一致[Chen 等,1991;Madero 等,1982]。然而,斑节对虾、白对虾和桃红对虾的 PO 最适 pH 分别为 6.0、7.5 和 8.0[Rolle 等,1991;

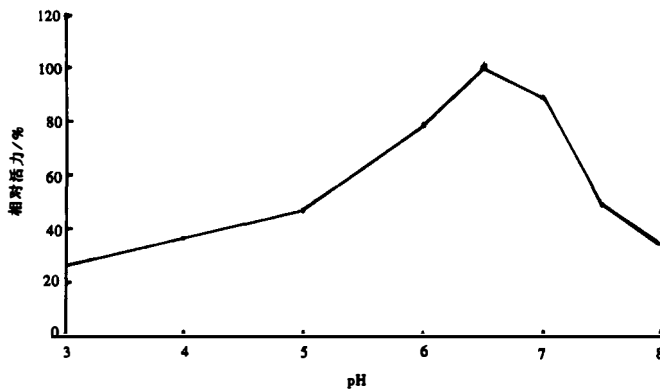


图2 pH 对酚氧化酶活性的影响

Fig. 2 Effect of pH on phenoloxidase activity

Simpson 等, 1987、1988]。这些差别可能是由于虾的来源、PO 的提取和纯化方法以及测定酶活性所采用的底物和缓冲溶液的类型不同有关。

PO 的 pH 稳定曲线如图3所示。在 pH 5.0—8.0 范围内, 该酶表现出较高的稳定性, 于 30℃ 保温30分钟后保存有原活性的84%以上, 在 pH 7.0 时最为稳定, 酶活性仅下降9.1%。在更为碱性条件下(pH 8.0—10.0)该酶也表现出一定的稳定性, 当 pH 为10.0 时仍保存有原来的66.5%的活性。然而, 在较酸性条件下, 酶活性随着 pH 的降低而迅速下降, 在 pH 3.0 时仅残留有原来的27.5%的活性。该酶在酸性条件下稳定性差的原因可能是由于 pH 的降低引起了酶分子中活性部位的结构发生改变, 从而导致酶活性的急剧下降[Chen 等, 1991]。除此以外, 可能还受到其它因素的影响, 如保温时间、温度、缓冲溶液种类和浓度等[Simpson 等, 1988]。

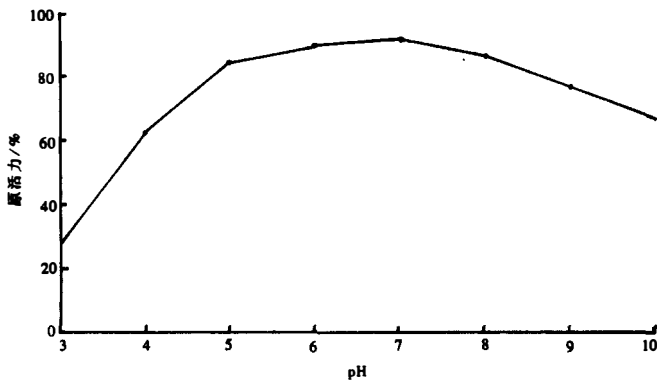


图3 pH 对酚氧化酶稳定性的影响

Fig. 3 Effect of pH on phenoloxidase stability

### 2.3 最适温度及其热稳定性

PO 活性与温度的关系见图4。以邻苯二酚为底物, 在 15℃—40℃ 之间, 酶活性随着温度的

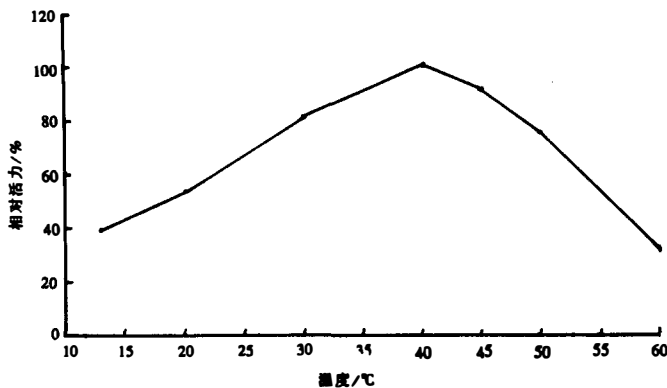


图4 温度对酚氧化酶活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on phenoloxidase activity

升高而增加,高于40℃时,酶活性随着温度的升高而下降,最适温度为40℃。这一最适温度与桃红对虾中的PO—多巴反应最适温度一致[Simpson等,1988],但低于白对虾和斑节对虾PO的最适温度(45℃),高于龙虾PO的最适温度(30℃)[Simpson等,1987;Rolle等,1991]。

PO热稳定性曲线如图5所示。该酶在20℃—50℃范围内表现出比较高的稳定性,保温30分钟后残留的酶活性均在70%以上,其中30℃时最为稳定,保留有原活性的81%。这一结果与文献报道虾的PO通常在30℃—50℃内比较稳定相一致[Simpson等,1987、1988;Madero等,1982]。

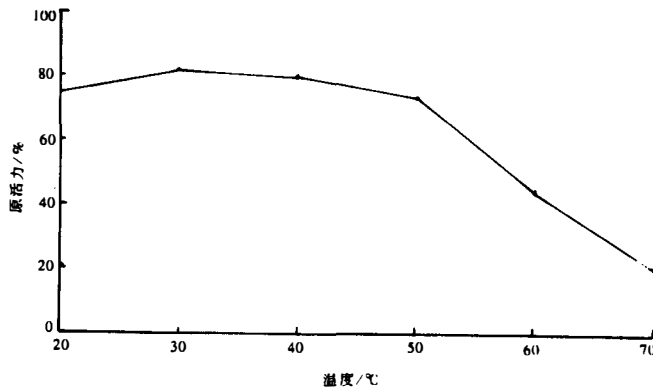


图5 温度对酚氧化酶稳定性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on phenoloxidase stability

从图中也可以看出,当温度高于50℃时,酶液保温30分钟后活性迅速下降,在70℃时,仅残留有原活性的20.6%。这表明在高温下该酶容易失活。这与Vamos-Vigyazo[1981]的报道相一致,即在大多数情况下PO于70℃以上短时间热处理,可使酶全部或部分地不可逆失活。

有文献报道,虾的PO稳定温度随其生活环境不同而有差异[Madero等,1982]。Chen等人[1991]研究了美洲龙虾和天鹅龙虾中的PO热稳定性,前者生活在温水域,酶的最稳定温度为35℃,而后者生活在冷水域,其最稳定温度为30℃。由此可见,虾PO的最稳定温度的差异可能与它们生活环境的温度有关。

#### 2.4 PO的底物专一性及K<sub>m</sub>值

该酶对不同底物的作用专一性见表2,其专一性从高到低的趋势为三元酚、二元酚和单元酚。以邻苯二酚为底物,其K<sub>m</sub>值为2.78 mmol/L;以DL—多巴为底物,其K<sub>m</sub>值为3.45 mmol/L(图6)。这说明该酶对邻苯二酚的亲合力高于DL—多巴。该结果与斑节对虾、天鹅对虾、美洲对虾

表2 酚氧化酶的底物专一性

Tab. 2 Substrate specificity of phenoloxidase

底物	浓度 (mmol/L)	波长 (nm)	酶活力 (单位/毫升)	与邻苯二酚比较 的相对活力(%)
焦性没食子酸	10	334	546.7	228.4
邻苯二酚	10	400	239.4	100.0
DL—多巴	5	460	167.8	70.1
L—酪氨酸	2.5	472	42.8	17.9

注:每个测定数据均为三次平行试验结果的平均值

和桃红对虾中的情况相同[Rolle 等,1991;Chen 等,1991]。该酶对 DL-多巴的亲合力低于邻苯二酚的可能原因是在多巴的结构中侧链部分含羧基基团,对酶具有抑制效应,而邻苯二酚的结构中不含有羧基基团[Rolle 等,1991]。然而,也有报道,白对虾等品种中 PO 对 DL-多巴的亲合力高于邻苯二酚[Chen 等,1991]。造成这种差别的主要原因可能在于虾的种类不同,酶分子结构有差别。另外,影响酶和底物结合速度常数的许多因素也能改变  $K_m$  值,例如,pH、离子强度、温度等。

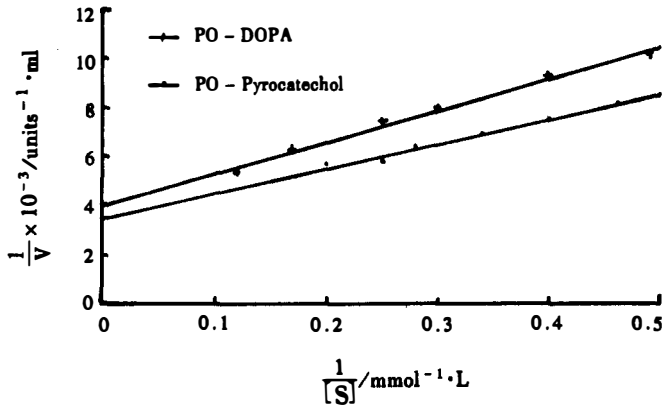


图6 PO-邻苯二酚、PO-多巴反应的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig. 6 Lineweaver-Burk double reciprocal plots of PO-pyrocatechol and PO-DOPA reactions

2.5 抑制剂对酶活性的影响

Vc、L-半胱氨酸和 PABA 对酶活性的抑制作用见表3。当它们的浓度为 0.15 mmol/L 时,对酶活性均无抑制作用。当浓度升高到 1.5 mmol/L 时,三者均表现出对 PO 的抑制作用,其中 L-半胱氨酸和 PABA 的抑制率基本相同,分别为 27.5% 和 28.3%,而 Vc 有较强的抑制作用,其抑制效率为 53.2%。当它们的浓度升高到 15 mmol/L 时,Vc 和 L-半胱氨酸均表现出强烈抑制作用,分别为 89.6% 和 86.0%,而 PABA 的抑制效率仅为 48.1%。

上述结果表明,当抑制剂浓度为 1.5 mmol/L 时,Vc 是较好的 PO 抑制剂。在浓度为 15 mmol/L 时,Vc 和 L-半胱氨酸均是 PO 的强力抑制剂。Vc 和 L-半胱氨酸对 PO

的抑制作用主要是由于它们的氧化产物-醌的还原剂。同时,它们又可作为酶分子中  $Cu^{2+}$  的螯合剂。除此以外,Vc 也能被 PO 直接氧化,起到竞争性抑制作用。L-半胱氨酸能与 PO 作用

表3 各种抑制剂对 PO 活性的影响

Tab. 3 Effect of inhibitors on phenoloxidase activity

抑制剂种类	浓度 (mmol/L)	抑制效率 (%)
Vc	15	89.6
	1.5	53.2
	0.15	0
L-半胱氨酸	15	86.0
	1.5	27.5
	0.15	0
PABA	15	48.1
	1.5	28.3
	0.15	0.8

注:每年测定数据均为三次平行试验结果的平均值。

产物—醌作用生成稳定的无色化合物[Bailey 等, 1960a]。

第一作者现工作单位为沈阳市卫生防疫站。

上海水产大学渔业学院纪成林教授为本研究材料对虾品种进行鉴定, 特此致谢。

### 参 考 文 献

- [1] 冯万祥等(编著), 1989. 生化技术, 15—68. 湖南科学技术出版社(长沙)。
- [2] Bailey, M. E. *et al.*, 1960a. Physico-chemical properties of the enzymes involved in shrimp melanogenesis. *Food Res.*, **25**:557—564.
- [3] Bailey, M. E. *et al.*, 1960b. Phenol oxidase in shrimp and crab. *Food Res.*, **25**:565—572.
- [4] Chen, J. S. *et al.*, 1991. Comparison of phenoloxidase activity from Florida spiny lobster and Western Australian lobster. *J. Food Sci.*, **56**(1):154—157.
- [5] Chen, J. S. *et al.*, 1991. Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases. *J. Agric Food Chem.*, **39**:1496—1401.
- [6] Ferrer, O. J. *et al.*, 1989. Phenoloxidase from the cuticle of Florida spiny lobster (*Panulirus argus*): mode of activation and characterization. *J. Food Sci.*, **54**(1):63—66.
- [7] Lineweaver, H. *et al.*, 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **56**:658—666.
- [8] Lowry, O. H. *et al.*, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265—275.
- [9] Madero, C. F. *et al.*, 1982. Properties of phenoloxidase isolated from Gulf shrimp. *Proc. 7th Annual Trop. Subtrop. Fish. Technol. Conf. Americas.*, 1982, 7, 328.
- [10] Opoku-Gyamfua, A. *et al.*, 1992. Comparative studies on the polyphenol oxidase fraction from lobster and tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.*, **40**:772—775.
- [11] Rolle R. S. *et al.*, 1990. Phenoloxidase forms of Florida spiny lobster: immunological and spectropolarimetric characterization. *Comp. Biochem. Physiol.*, **97B**(3):483—489.
- [12] Rolle R. S. *et al.*, 1991. Purification and characterization of phenoloxidase isoforms from Taiwanese black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Food Biochem.*, **15**:17—32.
- [13] Simpson, B. K. *et al.*, 1987. Phenoloxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): purification and some properties. *J. Agric. Food Chem.*, **35**:918—921.
- [14] Simpson, B. K. *et al.*, 1988. Phenoloxidases from pink and white shrimp: kinetic and other properties. *J. Food Biochem.*, **12**:205—217.
- [15] Vamos-Vigyazo, L., 1981. Polyphenol oxidase and peroxidases in fruits and vegetables. *Critical Review in Food Science and Nutrition.* **15**:49—127.
- [16] Zhou, P. G. *et al.*, 1993. Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **41**:532—536.

## STUDY ON SOME CHARACTERISTICS OF PHENOLOXIDASE FROM JAPANESE PRAWN, *PENAEUS JAPONICUS*

Zhao Jiao, Qi Xiao-yu, You Yu-min, Wang Ji-xiang and Zhou Pei-gen

(Shanghai Fisheries University, 200090)

**ABSTRACT** Phenoloxidase (PO) was extracted and partially purified from Japanese



prawn, *Penaeus japonicus* and its properties were studied. The optimum pH for PO-pyrocatechol reaction was 6.5. The enzyme was stable between pH 5.0 and pH 8.0, most stable at pH 7.0. The optimum temperature for the oxidation of pyrocatechol by PO was 40°C and the enzyme was heat stable up to 50°C, and it was rapidly inactivated at temperature above 50°C. The enzyme had different substrate specificities for different kinds of phenolic compounds, showing a maximum activity with triphenol(pyrogallol), then with diphenols(pyrocatechol and DL-DOPA) and monophenol(L-tyrosine). The  $K_m$  values of phenoloxidase indicated that the enzyme had higher affinity for pyrocatechol than for DL-DOPA. The presence of 15 mmol/L ascorbic acid or L-cysteine inhibited strongly the enzyme activity with 89.6% or 86.0% inhibition, respectively.

**KEYWORDS** Japanese prawn, *Penaeus japonicus*, phenoloxidase, enzymatic browning