

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240315015

基于黄鲫蛋白肽制备南美白对虾多酚氧化酶复合生物抑制剂的研究

张敏珍, 邹小雨, 宋 茹*

(浙江海洋大学食品与药学学院, 舟山 316022)

摘 要: 目的 以黄鲫蛋白肽(half-fin anchovy hydrolysate peptides, HAHp)为基料复配抗坏血酸和茶多酚制备南美白对虾多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)复合生物抑制剂(composite biological inhibitor, CBI)。**方法** 以南美白对虾 PPO 抑制率为检测指标, 分别研究 HAHp、抗坏血酸、茶多酚、柠檬酸和乙二胺四乙酸二钠盐(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA-2Na)单独抑制 PPO 活性, 选取 HAHp、抗坏血酸和茶多酚进行三因素三水平正交优化实验优化 CBI 配方组成, 通过酶促动力学研究 CBI 对南美白对虾 PPO 的抑制模式。**结果** HAHp、抗坏血酸、茶多酚、柠檬酸和 EDTA-2Na 对南美白对虾 PPO 都有一定的抑制作用, 且有一定的剂量依赖性, 但单一抑制剂对 PPO 的抑制作用有限。HAHp 与天然抗氧化剂抗坏血酸和茶多酚复配, 经(L_93^3)正交实验优化 CBI 的最佳配方为: 0.7% HAHp、0.02%抗坏血酸和 0.20%茶多酚。经测定 CBI 对南美白对虾 PPO 抑制率达到 94.71%±0.46%, 酶促动力学结果表明 CBI 是一种混合型抑制剂, 通过降低南美白对虾 PPO 对底物亲和力实现抑制 PPO 活力。**结论** 以 HAHp 为基料复配抗坏血酸和茶多酚制备的 CBI 能够有效地抑制南美白对虾 PPO 活性, 有望开发成一种防虾黑变的天然抑制剂, 为南美白对虾天然保鲜剂的研究奠定了理论基础。

关键词: 南美白对虾; 多酚氧化酶; 黄鲫蛋白肽; 复合生物抑制剂; 酶促动力学

Development of a half-fin anchovy (*Setipinna taty*) hydrolysate peptides based composite biological inhibitor for polyphenol oxidase derived from *Litopenaeus vannamei*

ZHANG Min-Zhen, ZOU Xiao-Yu, SONG Ru*

(School of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

ABSTRACT: Objective To prepare a composite biological inhibitor (CBI) on polyphenol oxidase (PPO) of *Litopenaeus vannamei* using half-fin anchovy hydrolysate peptides (HAHp) as the basic substrate and combination of ascorbic acid and tea polyphenols. **Methods** Using *Litopenaeus vannamei* PPO inhibition rate as the indicator, the PPO inhibition rates of 5 individual inhibitors, namely HAHp, ascorbic acid, tea polyphenols, citric acid, and ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA-2Na), were determined, and HAHp, ascorbic acid and tea

基金项目: 舟山市科技局项目(2021C21004)

Fund: Supported by the Project of Zhoushan Science and Technology Bureau (2021C21004)

*通信作者: 宋茹, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: rusong@zjou.edu.cn

*Corresponding author: SONG Ru, Ph.D, Professor, School of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, No.1, Haida South Road, Lincheng District, Zhoushan 316022, China. E-mail: rusong@zjou.edu.cn

polyphenols were selected to optimize the formula composition of CBI through a three-factor and three-level of orthogonal experiment. Furthermore, the inhibitory mode of CBI on PPO of *Litopenaeus vannamei* was evaluated through enzymatic kinetics. **Results** All of these five individual inhibitors HAHp, ascorbic acid, tea polyphenols, citric acid, and EDTA-2Na had certain inhibitory effects on PPO, and showed dose-dependent manners to some extent. However, the inhibitory effect of individual inhibitor on PPO was limited. By combining HAHp with natural antioxidants of ascorbic acid and tea polyphenols, the optimal formula composition of CBI was optimized through L_93^3 orthogonal experiment as follows: 0.7% of HAHp, 0.02% of ascorbic acid and 0.20% of tea polyphenol. The inhibition rate of CBI on PPO reached to $94.71\% \pm 0.46\%$. The enzymatic kinetics results showed that CBI should be a mixed inhibitor on PPO by reducing the affinity of *Litopenaeus vannamei*' PPO to substrate. **Conclusion** CBI prepared by combining ascorbic acid and tea polyphenols with HAHp as the base substrate can effectively inhibit the PPO activity of *Litopenaeus vannamei*, which can be expected to develop a natural melanosis inhibitor to inhibit shrimp melanosis, thus providing a theoretical basis for the development of natural preservative for *Litopenaeus vannamei*.

KEY WORDS: *Litopenaeus vannamei*; polyphenol oxidase; half-fin anchovy hydrolysate peptides; composite biological inhibitor; enzymatic kinetics

0 引言

南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)是一种水产养殖虾,产量约占全球对虾总量的90%。南美白对虾具有很高的营养价值和经济价值,但是在捕获后及储存过程中,由于脂质氧化、酶促反应及微生物代谢活动,导致南美白对虾很容易发生黑变和腐败^[1-2]。虾的黑变主要发生头部、尾部和壳上,研究表明,虾的黑变与多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)的酶促反应有关,酚类通过PPO酶促反应被氧化为醌类化合物,而后醌类化合物通过非酶促聚合和自氧化转化为高分子量的黑色素,从而引起虾发生黑变^[1,3]。虽然黑变虾的黑斑对人体无害,但是会降低消费者购买欲望,从而降低了虾的经济价值。

为了抑制虾发生黑变,最大限度地减少经济损失,虾在保存过程中常添加黑变抑制剂。亚硫酸盐类,特别是焦亚硫酸钠,可以有效地防止虾在捕获后发生黑变。但是,亚硫酸盐使用量积累可能超过法定残留限量,对人体产生一定的危害,例如引起哮喘和皮肤过敏等^[4]。因此,开发天然黑变抑制剂代替化学类黑变抑制剂的研究引起广泛关注。据报道,一些天然来源提取物或化合物有抑制PPO作用,如阿魏酸^[5]、抗坏血酸^[6-7]、儿茶素及其衍生物^[8-9]、茶多酚^[10]、绿茶提取物^[11]、石榴皮提取物^[12]、藻类提取物^[13]等。此外,氨基酸和一些生物活性肽也能抑制PPO活性^[14-16]。通过酶解法制备的黄鲫蛋白肽(half-fin anchovy hydrolysate peptides, HAHp)有很强的体外抗氧化和抗菌作用^[17-19]。但是,将HAHp用于抑制PPO的研究还少见报道。

本研究在系统检测HAHp、抗坏血酸、茶多酚、柠檬酸和乙二胺四乙酸二钠盐(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA-2Na)单独使用对南美白对虾PPO抑制

率基础上,以HAHp为基料,与天然来源且对PPO抑制作用较强的抗坏血酸和茶多酚进行复配,通过三因素三水平正交实验优化南美白对虾PPO复合生物抑制剂(composite biological inhibitor, CBI)配方组成,并进一步研究CBI对南美白对虾PPO的抑制模式,以期为HAHp源复合生物抑制剂用于延缓或抑制南美白对虾黑变研究奠定理论基础,同时也为肽类在黑变抑制剂的开发应用方面提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

活南美白对虾,购自舟山市老碇菜场,平均重量 (25 ± 5) g,加碎冰30 min内运至实验室。冰鲜黄鲫,购自舟山市东门市场,平均重量为 (28 ± 2) g,加碎冰1 h内运至实验室,人工去除鱼头和内脏,流动水清洗干净,剪成小块,经破碎机破碎成糜状,用聚乙烯袋分装, -20°C 冻藏备用。HAHp,实验室自制[肽质量浓度为 (22.06 ± 0.35) mg/mL]。

胃蛋白酶(1200 U/g,生化试剂)、盐酸、氢氧化钠、抗坏血酸、柠檬酸、EDTA-2Na、硫酸铵、无水磷酸氢二钠、无水磷酸二氢钠(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司); L-3,4-二羟苯丙氨酸(L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA)(分析纯,上海Amamas试剂有限公司);聚氧乙烯月桂醚(Brij35)(分析纯,上海阿拉丁生化科技有限公司);茶多酚(食品级,仟味食品科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

JJ500 电子天平(精度0.1 mg,常熟市双杰测试仪器厂); JYL-C93T(A)高速通用破碎机(九阳股份有限公司); Thermo He 冷冻离心机[赛默飞市尔科技(中国)有限公司]; TU1810PC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限

责任公司); HHS-11-2 数显恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); KQ5200E 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); PHB-4 型便携式 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 南美白对虾 PPO 提取液制备

参考文献[1]方法,并略作修改。具体操作如下:收集南美白对虾头部,用破碎机捣碎成 5 mm 左右碎糜,按照 1:3 (m:V)比例在虾碎糜中加入相应体积 0.05 mol/L 预冷磷酸盐缓冲液(pH 7.2, 含 1 mol/L NaCl 和 0.2% Brij35), 4℃静置 4 h, 混合物经 8000×g 离心 30 min (4℃), 收集上清液。在上清液中加入硫酸铵(硫酸铵的质量分数达到 40%), 4℃静置过夜, 12500×g 离心 30 min (4℃), 收集沉淀, 用 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)溶解沉淀, 放透析袋(截留分子量: 200 D)中在 pH 7.2 磷酸盐缓冲液中透析过夜(4℃, 期间换缓冲液 3 次), 透析后混合物经 3000×g 离心 30 min (4℃), 收集上清液, 即为南美白对虾 PPO 提取液。

1.3.2 HAHp 制备

参考文献[20]方法,并略做修改。具体操作如下:将 -20℃冻存黄鲫肉糜在 4℃下解冻, 按照 1:4 (m:V)比例在黄鲫肉糜中加入去离子水, 充分搅拌, 然后用 6 mol/L 盐酸和 6 mol/L 氢氧化钠调节混合浆液 pH 至胃蛋白酶最适 pH 2.0, 37℃保温 10 min, 根据鱼糜质量按照 1:1 质量比加入相应质量胃蛋白酶, 充分搅拌, 然后在 37℃水浴下准确酶解 2.4 h, 期间每隔 30 min 用 6 mol/L 盐酸和 6 mol/L 氢氧化钠调节反应体系 pH 为 2.0。酶解结束后, 将混合物在 95~100℃水浴中加热 10 min 达到钝化灭酶作用, 然后调节浆液 pH 至 7.0, 冷却至室温, 7000×g 离心 20 min (4℃)弃去上层油膜层和底部残渣, 收集中间清液, 即为 HAHp。

1.3.3 PPO 酶活力测定

参考文献[21]方法,并稍作修改,以 L-DOPA 为 PPO 特异性底物,反应温度 37℃,取 600 μL 15 mmol/L L-DOPA 加到 1.2 mL 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)中,混匀,然后添加 200 μL PPO 提取液启动酶促反应。以去离子水代替反应体系中 PPO 提取液作为调零管,测定反应体系在 475 nm 处吸光度(0 min),精准反应 10 min 再次测定吸光度值,计算吸光度变化(ΔA)。一个酶活力单位(U)定义为单位体积酶液(mL)在单位时间使酶促反应体系产物在 475 nm 吸光度增加 0.001[公式(1)]。

$$\text{酶活力}/U = \frac{\Delta A}{0.001 \times t \times V} \quad (1)$$

式中, ΔA 为吸光值变化量; t 为反应时间(min); V 为反应体系中加入 PPO 提取液体积(mL)。

1.3.4 不同抑制剂对 PPO 活性影响

分别研究单独使用 HAHp、抗坏血酸、茶多酚、柠檬酸和 EDTA-2Na 对 PPO 活性影响。具体做法如下: HAHp、

抗坏血酸、茶多酚、柠檬酸和 EDTA-2Na 分别与 PPO 提取液按 1:1 (V:V)混合, 混合液中 HAHp(以肽浓度计)实际添加量为 0.3%、0.5%、0.7%、0.9%和 1.1%, 抗坏血酸为 0.005%、0.010%、0.015%、0.020%和 0.025%、茶多酚为 0.05%、0.10%、0.15%、0.20%和 0.25%、柠檬酸为 0.05%、0.10%、0.15%、0.20%和 0.25%, EDTA-2Na 为 0.05%、0.10%、0.15%、0.20%和 0.25%, 混合液在 4℃下孵育 30 min, 然后取 200 μL 与 1.2 mL 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液混合, 再添加 600 μL 经 37℃预热 10 min 的 15 mmol/L L-DOPA, 启动酶促反应, 按照 1.3.3 测定 PPO 酶活力, 根据公式(2)计算 PPO 活性抑制率:

$$\text{抑制率}/\% = \frac{A-B}{A} \times 100\% \quad (2)$$

式中, A 为 PPO 初始酶活力; B 为添加抑制剂后 PPO 酶活力。

1.3.5 CBI 组成优化

根据抑制剂单独抑制 PPO 活性结果, 以 HAHp 为基料(A), 选取抗坏血酸(B)和茶多酚(C)进行三因素三水平正交实验 $L_9(3^3)$ (表 1), 以 PPO 活性抑制率为检测指标, 优化 CBI 组成。

1.3.6 CBI 对南美白对虾 PPO 抑制动力学

CBI 用去离子水分别稀释 1.5、2.0、4.0 倍, 取 2 mL CBI 及不同倍数稀释液分别与 2 mL PPO 提取液混合, 4℃下孵育 30 min, 上述混合液记作 PPO 测定液。将 600 μL 不同浓度 L-DOPA (5、10、15、20 和 25 mmol/mL)分别与 1.2 mL 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)混合, 在 37℃下预热 10 min, 然后加入 200 μL PPO 测定液, 混合均匀, 测定 475 nm 处吸光值, 精准反应 10 min 再测定 1 次吸光值, 根据 1.3.3 方法计算酶活力, 根据反应时间, 计算出酶反应速度(U/min)。采用 Lineweaver-Burk 公式[见式(3)]分析 CBI 对南美白对虾 PPO 抑制动力学, 然后以底物浓度 1/[S]为横坐标, 反应速率 1/V 为纵坐标, 以 Lineweaver-Burk 双倒数[见式(4)]作图, 计算底物米氏常数(K_m)、最大速率(V_{max})和特异性(V_{max}/K_m)。

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4)$$

1.4 数据处理

所有实验均平行测定 3 次, 实验结果以平均值±标准偏差表示。数据采用 SPSS 26 软件进行单因素方差分析和事后独立样本 t 检验, 采用 Origin 2024(学习版)软件绘制图。

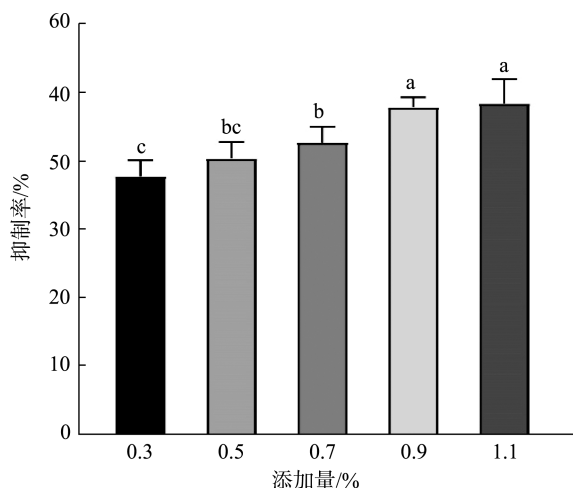
2 结果与分析

2.1 不同抑制剂对南美白对虾 PPO 活性影响

2.1.1 HAHp 对 PPO 活性影响

由图 1 可知, 0.9%的 HAHp 对 PPO 活性抑制率接近 50%。蛋白质、多肽和氨基酸至少可以通过与邻醌反应和

整合 PPO 活性位点铜离子两种方式影响 PPO 活性^[22], 肽类一般具有出色的抗氧化能力, 因此被誉为是一类很有潜力的抗褐变剂^[16]。本研究通过蛋白酶水解方式制备的 HAHp 含有 AGDDARPA、EMSAGLHE、NKVKGELD、WRKKDPLND 等短肽, 其中 EMSAGLHE 和 WRKKDPLND 对 DPPH 自由基清除效果超过 50%^[19]。此外, HAHp 还含有抗褐变氨基酸^[20], 如甘氨酸、精氨酸和蛋氨酸^[23]。因此, HAHp 对南美白对虾 PPO 活性抑制推测与含有抗氧化肽和抗褐变氨基酸有关。



注: 不同小写字母代表差异显著 $P < 0.05$, 下同。

图1 HAHp对PPO活性影响($n=3$)

Fig.1 Effects of HAHp on the PPO activity ($n=3$)

2.1.2 抗坏血酸对 PPO 活性影响

图 2 中添加量为 0.005%~0.015%时, 抗坏血酸对 PPO 的抑制率逐渐增强。当添加量提高到 0.020%时, 抗坏血酸对 PPO 的抑制率显著增加到 $55.94\% \pm 0.50\%$ ($P < 0.05$)。与本研究结果一致, NIRMAL 等^[11]报告了抗坏血酸在浓度 0.005%和 0.010%时可显著降低南美白对虾 PPO 活性。在

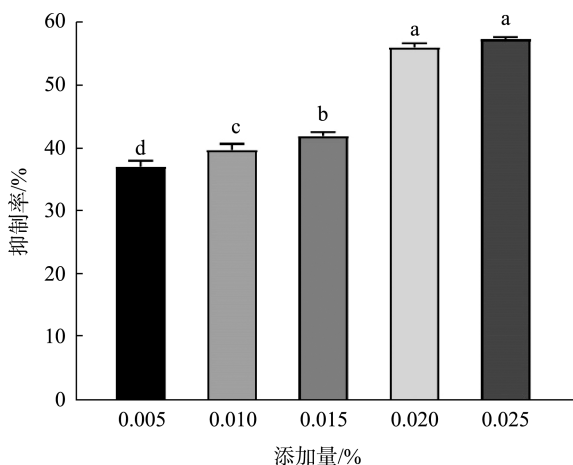


图2 抗坏血酸对PPO活性影响($n=3$)

Fig.2 Effects of ascorbic acid on the PPO activity ($n=3$)

PPO 酶促反应过程中, 抗坏血酸可以作为竞争抑制剂与底物竞争 PPO 活性位点, 阻止底物与 PPO 接触, 从而防止褐变反应发生^[24-25]。此外, 抗坏血酸具有很强的还原性, 能减少酶促褐变中反应中间产物醌的生成, 从而减少黑色素的形成^[26]。

2.1.3 茶多酚对 PPO 活性影响

茶多酚主要由儿茶素及其衍生物组成, 包括儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素等^[5]。如图 3 所示, 0.10%的茶多酚对 PPO 的抑制率显著高于 0.05%的抑制率($P < 0.05$)。之后, 随着添加量的增加, 茶多酚对 PPO 抑制作用逐渐增强, 在 0.20%时对 PPO 的抑制率达到 $52.77\% \pm 1.10\%$, 说明茶多酚对 PPO 有较强抑制作用。与图 3 结果一致, NIRMAL 等^[27]报道儿茶素对南美白对虾 PPO 的抑制作用随着浓度的增加而增强。NIRMAL 等^[11]发现绿茶提取物中的儿茶素和类黄酮化合物作为 PPO 竞争性抑制剂, 以剂量依赖方式抑制南美白对虾 PPO 活性, 从而延缓南美白对虾在冷藏期间的黑变和品质变化。

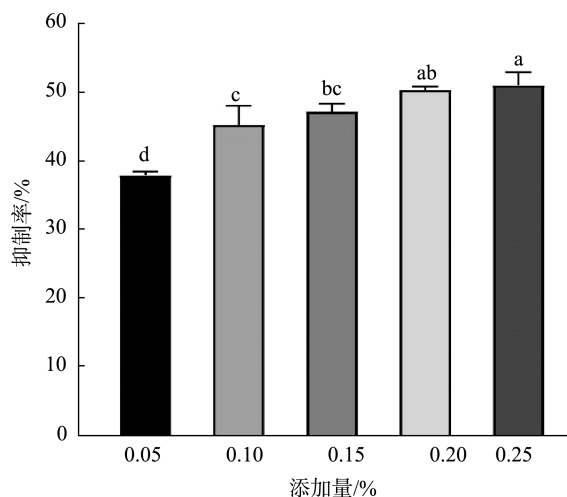


图3 茶多酚对PPO活性影响($n=3$)

Fig.3 Effects of tea polyphenols on the PPO activity ($n=3$)

2.1.4 柠檬酸对 PPO 活性影响

由图 4 可知, 柠檬酸添加量 0.05%时, 对 PPO 的抑制率仅为 11.66%, 随着柠檬酸添加量的加大, 对 PPO 的抑制作用也逐渐地增强, 0.20%的柠檬酸对 PPO 的抑制率急剧提高到 49.78% ($P < 0.05$)。柠檬酸作为一种羧酸, 添加到 PPO 提取液中会降低体系 pH, 导致 PPO 变性或使酶促反应 pH 超出最佳反应 pH 范围, 结果导致 PPO 活性降低^[28]。ZHOU 等^[29]总结发现, PPO 的活性会随着柠檬酸浓度的增加而逐渐降低, 且 PPO 二级结构发生了变化。高酸性环境下, PPO 活性中心 Cu^{2+} 易解离导致 PPO 变性, 进而影响 PPO 活性^[28]。因此, 柠檬酸的酸化作用可能是抑制 PPO 活性主要原因。

2.1.5 EDTA-2Na 对 PPO 活性影响

PPO 属于金属酶, 活性中心存在 Cu^{2+} ^[21], 郝云彬等^[30]报道 PPO 活性随着 EDTA-2Na 浓度的增加而降低, EDTA-

2Na 抑制 PPO 活性与结合 PPO 活性中心 Cu^{2+} 有关。图 5 中 0.05%~0.15% EDTA-2Na 对 PPO 活性抑制无显著性差异 ($P>0.05$), 当添加量提高到 0.20%~0.25% 时, 虽然 EDTA-2Na 对 PPO 的抑制率显著性增强, 但是总体抑制率低于 40%。与其他 4 种抑制剂(HAHp、抗坏血酸、茶多酚、柠檬酸)相比, EDTA-2Na 对 PPO 活性抑制作用相对较弱。

2.2 CBI 组成优化——正交实验

综合图 1~5 结果可以看出, HAHp、抗坏血酸、茶多酚、柠檬酸和 EDTA-2Na 对南美白对虾 PPO 都有一定的抑制作用, 且有一定的剂量依赖性。但是, 进一步增加 HAHp 用量(>0.9%)对 PPO 的抑制率无显著提高($P>0.05$)。同样, 当抗坏血酸(>0.020%)、茶多酚(>0.20%)、柠檬酸

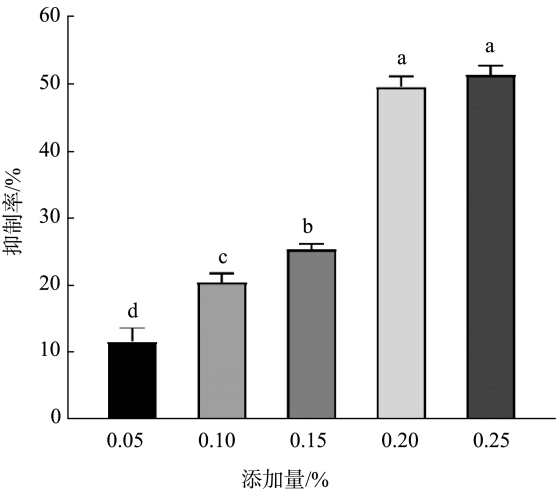


图4 柠檬酸对PPO活性影响($n=3$)
Fig.4 Effects of citric acid on the PPO activity($n=3$)

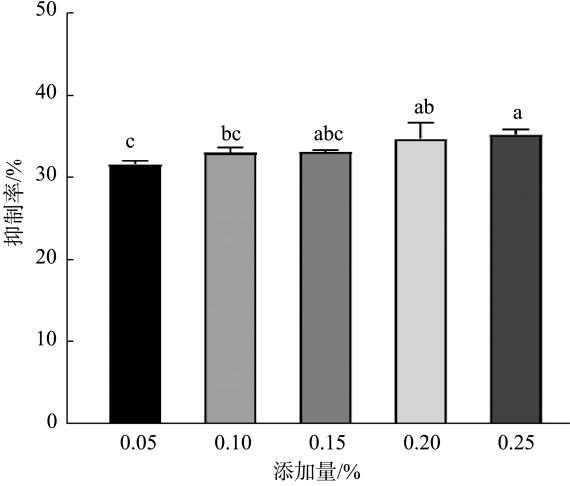


图5 EDTA-2Na对PPO活性影响($n=3$)
Fig.5 Effects of EDTA-2Na on the PPO activity ($n=3$)

(>0.20%)在较高添加量时, 对 PPO 的抑制率也未进一步提升。上述结果表明, 单一抑制剂对南美白对虾 PPO 的抑制作用有限。将单一抑制剂复配, 制备复合型 PPO 抑制剂, 不仅可以增强抑制 PPO 效果, 而且有助于减少单一抑制剂用量, 降低对食品质量影响, 提高其使用安全性。根据图 1~5 结果, 综合考虑成本和对食品安全及消费者健康影响, 以 HAHp 为 PPO 复合生物抑制剂的基料, 与天然抗氧化剂抗坏血酸和茶多酚进行复配。以 PPO 抑制率为指标, 通过三因素三水平 (L_93^3) 正交实验优化 HAHp (A)、抗坏血酸(B)和茶多酚(C)在 CBI 中组成, 实验结果见表 1, 方差分析结果见表 2。

R 值大小可表示各因素对被测指标影响程度, R 值越高, 表示该因素对结果影响越强。表 1 中 HAHp、抗坏血酸和茶多酚对 PPO 抑制率影响顺序为: 抗坏血酸($R=9.99$)>

表 1 $L_9(3^3)$ 正交实验设计及实验结果
Table 1 Design and results of $L_9(3^3)$ orthogonal experiment

序号	A (HAHp)/%	B(抗坏血酸)/%	C(茶多酚)/%	PPO 抑制率/%
1	1 (0.5)	1 (0.010)	1 (0.10)	68.83±0.62
2	1	2 (0.015)	2 (0.15)	78.34±1.15
3	1	3 (0.020)	3 (0.20)	80.77±0.29
4	2 (0.7)	2	3	88.06±1.03
5	2	3	1	87.45±1.41
6	2	1	2	79.35±1.14
7	3 (0.9)	3	2	87.15±0.72
8	3	1	3	77.23±0.66
9	3	2	1	78.74±1.14
K1	227.94	225.41	235.02	
K2	254.86	245.14	244.84	
K3	243.12	255.37	246.06	
k1	75.98	75.14	78.34	
k2	84.95	81.71	81.61	
k3	81.04	85.12	82.02	
R	8.97	9.99	3.68	
优化水平	A_2	B_3	C_3	

HAHp ($R=8.97$)>茶多酚($R=3.68$)。根据表 2 方差分析结果可知, HAHp 和抗坏血酸用量显著影响复配液的 PPO 抑制效果($P<0.05$), 因此复配液要严格控制 HAHp 和抗坏血酸用量。根据表 1 结果, 确定 CBI 的最佳配方为 $A_2B_3C_3$, 即: 0.7% HAHp、0.02%抗坏血酸、0.20%茶多酚浓度。根据最佳配方组成制备 CBI, 经测定对南美白对虾 PPO 的抑制率为 $94.71\%\pm0.46\%$ ($n=3$), 高于表 1 中所有 PPO 抑制率, 因此, 正交实验确定的最佳 CBI 组成有效。

2.3 CBI 对 PPO 的抑制动力学

为了评估 CBI 对 PPO 抑制的影响, 以不同浓度 L-DOPA 为底物, 测定了 CBI 及不同稀释倍数 CBI 与 PPO 提取液作用后 PPO 的酶促动力学, 如图 6 所示。

图 6 中垂直截距和直线斜率随着 CBI 稀释倍数的增大

而逐渐减小, 曲线的交点在第二象限, 表明 CBI 是一种混合型抑制剂, 直线斜率则是随着 CBI 浓度的增加而增大。与本研究结果相似, SUN 等^[21]报道了 PPO 的混合型抑制剂酸性电解水对 PPO 的酶动力学的垂直截距和线性斜率随着酸性电解水浓度的变化而变化, 且交点也均在第二个象限。

表 3 总结了不同稀释倍数 CBI 处理 PPO 的米氏常数 (K_m)、最大反应速率(V_{max})和特异性(V_{max}/K_m)。 K_m 值代表酶对底物的亲和力, K_m 值越高, 酶的催化效率越低^[31]。未加 CBI 时, PPO 提取液中 PPO 对 L-DOPA 有最低 K_m 值(4.29 mM)和最高 V_{max} (18.05 U/min), 表明此时 PPO 对 L-DOPA 有最高的亲和力。相比之下, PPO 提取液经 CBI 作用后, K_m 值(54.45 mM)几乎是对照组的 13 倍。随着 CBI 的稀释倍数逐渐加大, 与 PPO 提取液作用后, PPO 的 K_m 值逐渐

表 2 方差分析结果
Table 2 Results of variance analysis

因素	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
A	121.438	2	60.719	24.192	0.039	*
B	154.614	2	77.307	30.801	0.031	*
C	24.422	2	12.211	4.865	0.170	
误差	5.020	2	2.510			
总和	305.495	8				

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.00$; *表示具有显著性差异($P<0.05$)。

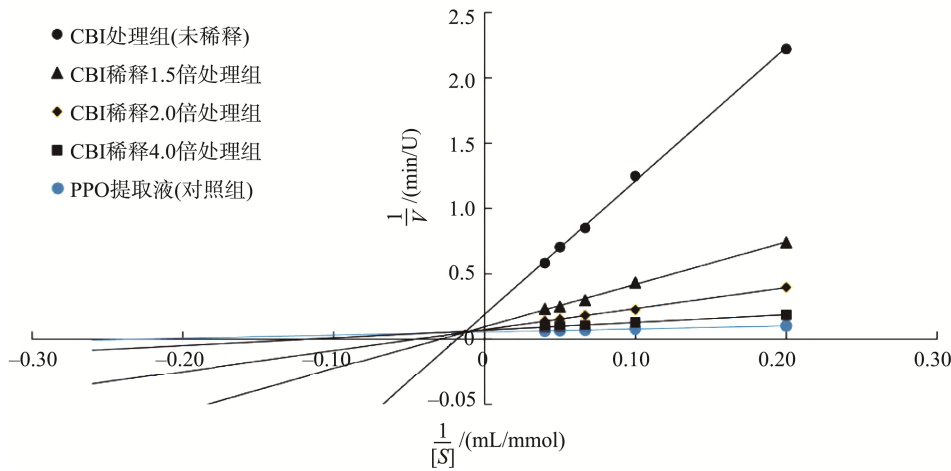


图6 CBI作用后PPO的Lineaweaver-Burk图
Fig.6 Lineaweaver-Burk plots of PPO after CBI treatment

表 3 南美白对虾 PPO 经 CBI 作用后酶促反应参数变化
Table 3 Changes in enzymatic reaction parameters of PPO of *Litopenaeus vannamei* after CBI treatment

样品组	米氏常数(K_m)/mM	最大反应速率(V_{max})/(U/min)	特异性(V_{max}/K_m)/(U/min/mM)
PPO 提取液(对照组)	4.29	18.05	4.21
CBI 稀释 4.0 倍处理组	8.58	14.51	1.69
CBI 稀释 2.0 倍处理组	21.92	13.64	0.62
CBI 稀释 1.5 倍处理组	34.16	10.53	0.31
CBI 处理组(未稀释)	54.45	5.32	0.10

减小, 而 $V_{\max}$ 逐渐增大, 表明增大 CBI 稀释倍数提高了 PPO 对底物的催化效率, 即: CBI 作用浓度越高, PPO 提取液中 PPO 对底物的催化效率越低, 表明 CBI 能够阻止 PPO 与底物 *L*-DOPA 亲和, 从而抑制 PPO 酶活性。与本研究结果一致, NIRMAL 等^[27]报道了儿茶素对南美白对虾头胸 PPO 的抑制模式为混合型抑制, 且随着儿茶素浓度的增加, K_m 值增加而 $V_{\max}$ 值降低。

常用 $V_{\max}/K_m$ 比值(催化效率)评价酶与底物的特异性, $V_{\max}/K_m$ 比值越大, 代表酶对底物的催化效率越高。从表 3 可以看出, 对照组的 $V_{\max}/K_m$ 的比值最高达到 4.21。相比之下, CBI 或 CBI 稀释液处理组的 $V_{\max}/K_m$ 比值均低于对照组。此外, 与未稀释的 CBI 处理组相比, CBI 的稀释倍数越大, $V_{\max}/K_m$ 比值越大, 说明 PPO 对底物 *L*-DOPA 的催化效率越高。综上可知, CBI 通过降低南美白对虾 PPO 对底物的亲和力实现抑制 PPO 活力, 将有助于减少酶促反应中间产物及终产物黑色素的生成。

3 结 论

本研究以 HAHp 作为南美白对虾 PPO 抑制剂的基料, 复配抗坏血酸和茶多酚, 通过实验优化制备了南美白对虾 PPO 的混合型抑制剂 CBI, 对南美白对虾 PPO 提取液中 PPO 的抑制率达到 94% 以上。CBI 由肽类、抗坏血酸和茶多酚复配而成, 所以安全性高, 而且还能保留 HAHp 本身抗菌作用。因此, 基于 HAHp 制备的天然 PPO 抑制剂 CBI 在防止或延缓对虾发生黑变方面应用前景广泛, 本研究可为天然抗黑变剂的开发提供技术支撑。

参考文献

- [1] NIRMAL NP, BENJAKUL S. Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage [J]. Food Chem, 2009, 116(1): 323–331.
- [2] NIRMAL NP, BENJAKUL S, AHMAD M, et al. Undesirable enzymatic browning in crustaceans: Causative effects and its inhibition by phenolic compounds [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2015, 55(14): 1992–2003.
- [3] SAE-LEAW T, BENJAKUL S. Distribution and characteristics of polyphenoloxidase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. J Food Sci, 2019, 84(5): 1078–1086.
- [4] IAMMARINO M, TARANTO AD, IENTILE AR. Monitoring of sulphites levels in shrimps samples collected in Puglia (Italy) by ion-exchange chromatography with conductivity detection [J]. Food Addit Contam B, 2013, 7(2): 84–89.
- [5] NIRMAL NP, BENJAKUL S. Effect of catechin and ferulic acid on melanosis and quality of Pacific white shrimp subjected to prior freeze-thawing during refrigerated storage [J]. Food Control, 2010, 21(9): 1263–1271.
- [6] 周宇芳, 胡建坤, 郝云彬, 等. 4-HR 与抗坏血酸对中华管鞭虾多酚氧

化酶的抑制动力学模拟分析[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 69–74.

ZHOU YF, HU JK, HAO YB, et al. Kinetic analysis of the inhibitory effect of 4-hexylresorcinol and ascorbic acid on polyphenoloxidase from *Solenocera crassicornis* [J]. Food Sci, 2019, 40(4): 69–74.

- [7] WEN YT, LIANG YQ, CHAI WM, et al. Effect of ascorbic acid on tyrosinase and its anti-browning activity in fresh-cut Fuji apple [J]. J Food Biochem, 2021, 45(12).
- [8] SAE-LEAW T, BENJAKUL S, SIMPSON BK. Effect of catechin and its derivatives on inhibition of polyphenoloxidase and melanosis of Pacific white shrimp [J]. J Food Sci Technol, 2017, 54(5): 1098–1107.
- [9] MITTAL A, SINGH A, ZHANG B, et al. Inhibition mechanism of chitooligosaccharide-polyphenol conjugates toward polyphenoloxidase from shrimp cephalothorax [J]. Molecules, 2023, 28(14): 5560.
- [10] 李帅浩, 谭充, 冯子健, 等. 茶多酚对酪氨酸酶的抑制作用及分子机制研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(15): 40–46.
- LI SH, TAN C, FENG ZJ, et al. Inhibitory effect of tea polyphenols on tyrosinase and its molecular mechanism [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(15): 40–46.
- [11] NIRMAL NP, BENJAKUL S. Effect of green tea extract in combination with ascorbic acid on the retardation of melanosis and quality changes of Pacific white shrimp during iced storage [J]. Food Bioprocess Tech, 2010, 5(8): 2941–2951.
- [12] BASIRI S, SHEKARFOROUSH SB, AMINLARI M, et al. The effect of pomegranate peel extract (PPE) on the polyphenol oxidase (PPO) and quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during refrigerated storage [J]. LWT-Food Sci Technol, 2015, 60(2): 1025–1033.
- [13] LI YC, YANG ZY, LI JR. Shelf-life extension of Pacific white shrimp using algae extracts during refrigerated storage [J]. J Sci Food Agric, 2017, 97(1): 291–298.
- [14] ALI HM, EL-GIZAWY AM, EL-BASSIOUNY RE, et al. The role of various amino acids in enzymatic browning process in potato tubers, and identifying the browning products [J]. Food Chem, 2016, 192: 879–885.
- [15] WILLS RBH, LI YX. Use of arginine to inhibit browning on fresh cut apple and lettuce [J]. Postharvest Biol Technol, 2016, 113: 66–68.
- [16] LIU X, LU YZ, YANG HY, et al. Cod peptides inhibit browning in fresh-cut potato slices: A potential anti-browning agent of random peptides for regulating food properties [J]. Postharvest Biol Tec, 2018, 146: 36–42.
- [17] SONG R, WEI RB, LUO HY, et al. Isolation and characterization of an antibacterial peptide fraction from the pepsin hydrolysate of half-fin anchovy (*Setipinna taty*) [J]. Molecules, 2012, 17(3): 2980–2991.
- [18] SONG R, WEI RB, ZHANG B, et al. Optimization of the antibacterial activity of half-fin anchovy (*Setipinna taty*) hydrolysates [J]. Food Bioprocess Tech, 2012, (5), 1979–1989.
- [19] SONG R, WEI RB, RUAN GQ, et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from peptic hydrolysates of half-fin anchovy (*Setipinna taty*) [J]. LWT-Food Sci Technol, 2015, 60(1): 221–229.
- [20] 宋茹. 黄鲫(*Setipinna taty*)抗菌肽的制备及抗菌作用等生物活性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- SONG R. Preparation of half-fin anchovy antibacterial peptides,

- antibacterial activity and other bioactive capacities analysis [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.
- [21] SUN JP, WANG M, LIU HQ, *et al.* Acidic electrolysed water delays browning by destroying conformation of polyphenoloxidase [J]. *J Sci Food Agric*, 2018, 98(1): 147–153.
- [22] KAHN V. Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana [J]. *J Food Sci*, 1985, 50: 111–115.
- [23] GIRELLI AM, MATTEI E, MESSINA A, *et al.* Inhibition of polyphenol oxidases activity by various dipeptides [J]. *Food Chem*, 2004, 52: 2741–2745.
- [24] SIKORA M, ŚWIECA M. Effect of ascorbic acid postharvest treatment on enzymatic browning, phenolics and antioxidant capacity of stored mung bean sprouts [J]. *Food Chem*, 2018, 239: 1160–1166.
- [25] ARIAS E, GONZÁLEZ J, PEIRÓ M, *et al.* Browning prevention by ascorbic acid and 4-hexylresorcinol: Different mechanisms of action on polyphenol oxidase in the presence and in the absence of substrates [J]. *J Food Sci*, 2007, 72(9): C464–C470.
- [26] ARIAS E, GONZÁLEZ J, ORIA R, *et al.* Ascorbic acid and 4-hexylresorcinol effects on pear PPO and PPO catalyzed browning reaction [J]. *J Food Sci*, 2007, 72(8): C422–C429.
- [27] NIRMAL NP, BENJAKUL S. Inhibition kinetics of catechin and ferulic acid on polyphenoloxidase from cephalothorax of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Food Chem*, 2012, 131(2): 569–573.
- [28] ALI HM, EL-GIZAWY AM, EL-BASSIOUNY REI, *et al.* Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PPO-catechol-cysteine reaction products [J]. *J Food Sci Technol*, 2015, 52(6): 3651–9.
- [29] ZHOU L, LIAO T, LIU W, *et al.* Inhibitory effects of organic acids on polyphenol oxidase: From model systems to food systems [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(21): 3594–3621.
- [30] 郝云彬, 相兴伟, 周宇芳, 等. 复合无硫抑制剂对中华管鞭虾中多酚氧化酶的协同作用机理[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(19): 25–31.
- HAO YB, XIANG XW, ZHOU YF, *et al.* Effects and mechanisms of compound sulfur-free inhibitor on polyphenol oxidase in *Solenocera crassicornis* [J]. *Food Ferment Ind*, 2019, 45(19): 25–31.
- [31] LIU GX, YANG LL, FAN TJ, *et al.* Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica* [J]. *Fish Shellfish Immun*, 2006, 20(1): 47–57.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



张敏珍, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。

E-mail: ZhangMinZhen@zjou.edu.cn



宋茹, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。

E-mail: rusong@zjou.edu.cn