

温度、pH对日本沼虾血清酚氧化酶活力及稳定性的影响*

李 义

(苏州大学生命科学学院水产系 215006)

摘要 以日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)为材料,研究温度、pH对其血清酚氧化酶活力及稳定性的影响。试验以L-多巴为作用底物,测得酚氧化酶的最适温度为40℃,大于或低于该值,酶活力均迅速下降,同时该酶在40℃以下表现出较高的热稳定性;该酶的最适pH为7.0,在pH6~8范围内具有较高的活性,最稳定的pH为8.0。

关键词 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*),血清,温度,pH,酚氧化酶

虾的褐变是影响感观质量的重要因素。在虾中酶促褐变主要是由于L-酪氨酸和L-多巴在酚氧化酶(Phenoloxidase, PO)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的黑色素所致^[4,6]。另一方面,酚氧化酶在虾体免疫中又承担着重要的角色,由酚氧化酶诱导产生的黑色素及代谢中间产物可杀死微生物和寄生虫^[2]。因此,长期以来,对于虾类的酚氧化酶的研究一直受到人们的重视。然而,有关淡水虾类的酚氧化酶的研究报道甚少。本文以日本沼虾为材料,研究温度、pH对其血清酚氧化酶活力及稳定性的影响,以为日本沼虾免疫学研究积累材料,并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 材料与方法

1.1 实验材料

体长4~6cm的日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*),购于苏州市浒墅关集贸市场。购回后暂养于100cm×50cm×60cm的PVC水族箱中,暂养期保持水温25℃,每天吸污、换水1次,投喂适量日本沼虾颗粒饵料。实验所用L-多巴(L-dopa)为Sigma公司产品,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 血清的制备

取鲜活沼虾40尾,用吸水纸擦干其身体表面的水分,用1ml注射器从其头胸甲后插入心脏部位抽取血淋巴液,将2尾虾的血淋巴液并在1支1ml的洁净指管中。待血液凝固后,10000r/min(4℃)离心20min,即得血清。

1.3 酚氧化酶活力的测定

以L-dopa为底物,参照Ashida^[3]的方法适当修改

后进行。将3.0ml 0.1mol/L pH6.0的磷酸盐缓冲液与0.1ml 0.01mol/L的L-dopa及0.1ml待测血清于室温下混匀,每次间隔2min,读取在490nm波长下的光密度值。以试验条件下每分钟OD₄₉₀增加0.001定义为1个酶活力单位。

1.4 温度对酚氧化酶活力及稳定性的影响

1.4.1 PO活力测定 预先将3.0ml 0.1mol/L pH6.0磷酸盐缓冲液与0.1ml 0.01mol/L的L-dopa在不同温度(20,30,40,50,60,70℃)下保温5min,然后加入0.1ml血清,测定其酶活力。

1.4.2 PO热稳定性测定 首先将0.1ml血清在不同的温度下预热15min,然后立即置于冰浴中冷却5min,0.1ml血清与3.0ml 0.1mol/L pH6.0的磷酸盐缓冲液及0.1ml 0.01mol/L的L-dopa在室温下混匀后,测定PO的残留活力。

1.5 pH对PO活力及稳定性的影响

1.5.1 配制不同pH的缓冲溶液 0.1mol/L柠檬酸-0.2mol/L Na₂HPO₄, pH3.0~5.0; 0.1mol/L NaH₂PO₄-0.1mol/L Na₂HPO₄, pH6.0~8.0; 0.1mol/L甘氨酸-0.1mol/L NaOH, pH9.0~10.0。

1.5.2 PO活力测定 3.0ml不同pH的缓冲液

* 江苏省教育厅自然科学基金项目01KJD240001号和江苏省苏州市科委项目SZN0051号。

作者:李义,出生于1966年,学士,副教授,在研课题:罗氏沼虾免疫器官结构与免疫因子研究。E-mail:ly5980@sina.com.cn

收稿日期:2002-03-07;修回日期:2002-05-08

溶液加 0.1 ml 0.01 mol/L 的 L-dopa 及 0.1 ml 血清, 在室温下反应, 测定 PO 活力。

1.5.3 PO 的 pH 稳定性测定 分别吸取 3.0 ml 不同 pH 的缓冲液和 0.1 ml 血清置于洁净试管中于 30 °C 保温 30 min。然后, 再加入 0.1 ml 0.01 mol/L 的 L-dopa 于室温下反应, 测定 PO 的残留活力。

2 结果

2.1 温度对酚氧化酶活力及稳定性的影响

日本沼虾血清中 PO 的活力与温度的关系及 PO 的热稳定性曲线见图 1。

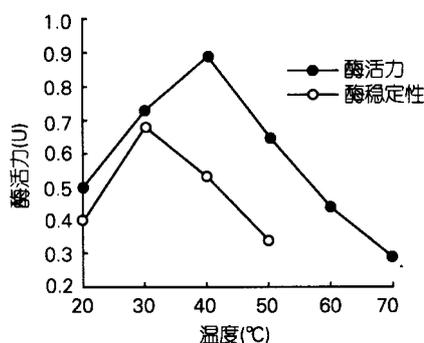


图 1 温度对酚氧化酶活力及稳定性的影响

Fig.1 Effect of temperature on activity and stability of phenoloxidase

结果表明, 以 L-dopa 为底物, 在 20 ~ 40 °C 之间, 酚氧化酶活力随着温度的升高而增加; 高于 40 °C 时, 酶活性随着温度的升高而下降, 最适温度为 40 °C。

酚氧化酶在 20 ~ 40 °C 范围内表现出比较高的稳定性, 保温 15 min 后残留的酶活力均在 83% 以上, 其中 30 °C 时最为稳定, 保留有原活力的 93%。当温度达到 60 °C 以上时, 日本沼虾的血清发生变性凝固, 无法检测。

2.2 pH 对酚氧化酶活力及稳定性的影响

日本沼虾血清中 PO 的活力与 pH 的关系及 PO 的 pH 稳定性曲线见图 2。

结果表明, 以 L-dopa 为底物, 在 pH 3.0 ~ 7.0 之间, 酚氧化酶活力随 pH 的升高而增加; 以 pH 6.0 ~ 7.0 酶活力增加较快; 当 pH 升至 7.0 以上, 酶活力则随着 pH 的升高而下降, 其最适 pH 为 7.0。

酚氧化酶在 pH 6.0 ~ 8.0 范围内表现出较高的稳定性, 在 30 °C 保温 30 min 后保存有原活力的 80% 以上, 在 pH 8.0 时最为稳定, 酶活力仅下降 9%; 在更

为碱性的条件下, 该酶也表现出一定的稳定性。然而, 在较酸性条件下, 酶活力随着 pH 的降低而迅速下降, 在 pH 3.0 时酶活力仅为原活力的 31%。

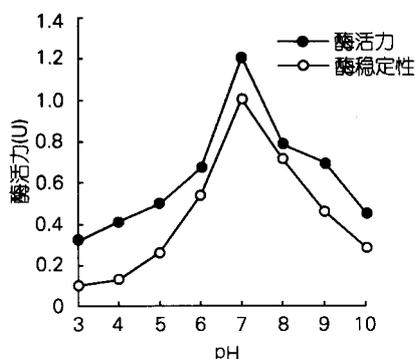


图 2 pH 对酚氧化酶活力及稳定性的影响

Fig.2 Effect of pH on activity and stability of phenoloxidase

3 讨论

3.1 PO 的最适温度

本试验得到的日本沼虾 PO 的最适温度为 40 °C, 此结果与桃红对虾中 PO 多巴反应最适温度一致^[8], 但低于白对虾和斑节对虾的最适温度 45 °C^[9], 高于龙虾 PO 的最适温度 30 °C^[7]。

3.2 PO 的热稳定性

本试验得到的日本沼虾 PO 热稳定性试验结果与文献报道的虾的 PO 通常在 30 ~ 50 °C 内比较稳定有一定的差异^[7,8], 这可能与本试验使用的是血清而不是纯化或部分纯化的酶有关。另外, 由于血清在 60 °C 以上时发生变性凝固, 因而无法检测 PO 在 50 °C 以上的热稳定性情况。但据赵娇等^[1]对部分纯化的 PO 的试验结果, 当温度高于 50 °C 时, PO 溶液保温 30 min 后活性迅速下降, 在 70 °C 时, 仅残留有原活性的 20.6%。这表明该酶容易失活。Vámos-Vigyazo^[10]也认为, PO 在 70 °C 以上经短时间热处理, 可全部或部分地不可逆失活。Chen 等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 °C; 而后者生活在冷水域, 其最稳定温度为 30 °C^[5]。由此可见, 虾的 PO 的最稳定温度的差异可能与它们生活环境的温度有关。

3.3 PO 的最适 pH

本试验得到的日本沼虾 PO 的最适 pH 为 7.0, 这一结果与美洲龙虾和褐对虾 (*Penaeus aztecus*) 中 PO 的最适 pH 相一致^[5,7]。然而, 斑节对虾、白对虾、桃红对虾的 PO 最适 pH 分别为 6.0、7.5 和 8.0^[7,9] 这些差异

可能是与虾的种类、来源、使用的是血清还是纯化或部分纯化的酶、PO的提取和纯化的方法以及测定酶活性所采取的底物和缓冲溶液的类型不同有关。

3.4 PO的pH稳定性

PO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改变,从而导致酶活力的迅速下降^[5]。除此之外,可能还受到诸如保温的时间、温度、缓冲溶液种类和浓度等因素的影响^[8]。

参考文献

- 1 赵 娇等.日本对虾的酚氧化酶特性研究,上海水产大学学报,1997,6(3):157~165
- 2 Ashida M., Soderhall K.. The prophenoloxidase activating system in crayfish, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1984, 77B(1): 21~26
- 3 Ashida M.. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, 144:749~762
- 4 Bailey M. E. et al.. Phenoloxidase in shrimp and crab, *Food Res.*, 1960, 25:565~572
- 5 Chen J. S. et al.. Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenoloxidases, *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39:1496~1501
- 6 Ferrer O. J. et al.. Phenoloxidase from the cuticle of Florida spiny lobster (*Panulirus argus*): mode of activation and characterization, *J. Food Sci.*, 1989, 54(1): 63~66
- 7 Rolle R.S. et al.. Purification and characterization of prophenoloxidase isoforms from Taiwanese black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), *J. Food Biochem.*, 1991, 15: 17~32
- 8 Simpson B.K. et al.. Phenoloxidase from pink and white shrimp: kinetic and other properties, *J. Food Biochem.*, 1988, 12:205~217
- 9 Simpson B.K. et al.. Phenoloxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): purification and some properties, *J. Agric. Food Chem.*, 1987, 35:918~921
- 10 Vámos-Vigyazo L.. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables, *Critical Review Food Science and Nutrition*, 1981, 15:49~127

EFFECT OF TEMPERATURE AND pH ON ACTIVITY AND STABILITY OF PHENOLOXIDASE IN SERUM OF *Macrobrachium nipponense*

LI Yi

(College of Life Sciences, Suzhou University, 215006)

Received: Mar. 7, 2002

Key Words: *Macrobrachium nipponense*, Serum, Temperature, pH, Phenoloxidase

Abstract

This paper studies the effect of temperature and pH on activity and stability of phenoloxidase of serum of *Macrobrachium nipponense* based on Edopa. The result of research shows that the optimum temperature of phenoloxidase is 40 °C, and that when the temperature is above or below 40 °C, vigour of the enzyme will drop promptly and the enzyme will show higher heat stability under the temperature of 40 °C. the optimum pH of the enzyme is 7.0, while the pH is between 6.0 and 8.0. The enzyme keeps higher stability, and its most stable pH is 8.0.

(本文编辑:刘珊珊)