

冷藏南美白对虾丝氨酸蛋白酶活力与黑变相关性研究

徐德峰¹, 李彩虹², 孙力军¹, 王雅玲¹, 叶日英¹, 刘唤明¹, 张永平¹, 励建荣³

(1. 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088) (2. 广东医学院生物化学与分子生物学教研室, 广东东莞 523808) (3. 渤海大学食品安全重点实验室, 辽宁锦州 121013)

摘要: 为探明冷藏对虾黑变规律, 研究了南美白对虾在为期 10 d 的冷藏过程中黑变与丝氨酸蛋白酶 (serine protease, SP) 的活性变化及其相关性。结果表明, 南美白对虾感官黑变呈现出先慢后快的特征, 前 2 d 基本无变化, 第 3 d 时变化开始加快, 第 5 d 变化最为显著, 第 6 至第 10 d 黑变速率差异不显著, 第 4 d 是黑变防控的关键期。进一步定量分析表明对虾不同部位的黑变速率存在显著差异, 冷藏至第 4 d 时头部、腹部和尾部间的明度 L 值差异开始明显, 第 5 d 时三者之间达到显著性差异 ($P < 0.05$); 统计分析表明对虾冷藏过程中不同部位 SP 活力与黑变存在显著相关性, 头部组织对 SP 活力变化最为敏感, 其斜率 k 为 0.0312, 明显大于尾部的 0.0271 和腹部的 0.0128, 是黑变调控的关键部位。本研究证明在冷藏南美白对虾体内也存在酚氧化酶激活系统, SP 活力水平同样对酚氧化酶原的激活水平起重要调控作用, 其规律和机制有待深入研究。

关键词: 冷藏南美白对虾; 黑变; 丝氨酸蛋白酶活力

文章编号: 1673-9078(2014)2-100-104

The Melanosis, Serine Protease Activity and Their Correlation of *Litopenaeus vannamei* during Cold Storage

XU De-feng¹, LI Cai-hong², SUN Li-jun¹, WANG Ya-ling¹, YE Ri-ying¹, LIU Huan-ming¹, ZHANG Yong-ping¹, LI Jian-rong³

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, College of Food Science and Technology of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China) (2. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China) (3. Food Safety Key laboratory of Liaoning Province, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

Abstract: To ascertain the melanosis rule of shrimp during cold storage, the melanosis, serine protease activity and their correlation in *Litopenaeus vannamei* during 10-day cold storage were investigated. The results showed that the melanosis speed of the shrimp was slow at first and then accelerated, which had no obvious change in appearance until the third day and the most distinct melanosis process was found at the fifth day. This indicated that the fourth day was the key term for melanosis inhibition. Quantitative analysis revealed that there was significant difference in melanosis score among different parts of *Litopenaeus vannamei*, in which the difference of brightness value L between cephalosome, abdomen and stern became evident at the fourth day and was significant at the fifth day ($P < 0.05$). The correlations of melanosis and serine activity between the three parts were statistically analyzed and appeared that cephalosome was the crucial part for melanosis inhibition due to its most sensitive property to serine protease activity, with slop of k between brightness and serine protease activity of 0.0312, which was larger than that of abdomen (0.0271) and stern (0.0128). This study demonstrated that the prophenoloxidase activating system was discovered in cold storage shrimp, and the level of serine protease activity had similar regulatory effect on the status of prophenoloxidase activating system but its pattern and mechanism remained further study.

Key words: cold-storing *Litopenaeus vannamei*; melanosis; serine protease activity

收稿日期: 2013-09-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201309, 30972287); 十二五国家支撑计划项目 (2012BAD29B06); 广东省教育部产学研结合项目 (2011B090400154); 湛江市科技计划项目 (2011D02)

作者简介: 徐德峰 (1978-), 男, 博士, 讲师, 主要从事水产食品质量与安全控制研究; 通讯作者: 孙力军 (1964-), 男, 博士, 教授

近年来,我国虾类养殖与海洋捕捞发展迅猛,已是出口创汇的主要海产品,但由于保鲜技术仍未能获得实质性突破,原料在冷藏和运输过程中的黑变现象十分突出,影响对虾感官品质和经济性状,是影响产业发展的关键问题之一^[1-2]。研究表明,虾类黑变与微生物作用无关,而主要与酚氧化酶(PO)有关^[3]。基于酶促褐变的机理,目前对虾冷藏过程中的黑变主要通过理化方法控制。在物理措施方面,通过低温或高温调控酶的活性^[4-5];也可通过控制气体成分,如填充氮气、臭氧等抑制酶活性,甚至采用高浓度二氧化碳处理来钝化酚氧化酶活性^[6-7]。在化学措施方面,主要通过添加亚硫酸盐、壳聚糖、间苯二酚等化合物来抑制酚酶的活性^[4, 8-9]。实践表明,低温并不能很好抑制黑变,在4℃低温下48h后黑变进程加快,高温钝化酶活性的措施不适于保鲜虾的加工。在化学抑制剂方面,随着人们对合成添加剂(尤其是含硫制剂)安全性的日益担忧,关注的重点开始转向了天然添加成分,如绿茶和蘑菇提取物^[1, 10]。从系统观点来看,目前上述对虾黑变防控措施从阶段上讲都属于末端策略,而对虾的黑变是一个极其复杂的级联系统。

研究表明,对虾只具备先天免疫系统,在生长过程中,依靠血液中的丝氨酸蛋白酶级联系统激活酚氧化酶,抵抗外界不利因素的刺激。概括来讲,外界刺激因子按一定的信号级联系统激活丝氨酸蛋白酶原(proserine protease, ProSP),形成具有活性的SP,而SP又激活酚氧化酶原(prophenoloxidase, ProPO)成为有活性的PO。PO诱导有关基质由酚形成醌,最终产生黑色素,黑色素及其代谢产物可杀死微生物及寄生虫,起到免疫作用^[4],但同时造成对虾外观颜色的加深。冷藏作为现阶段重要保藏手段在对虾长途运输和短期保藏过程中有着广泛应用,但冷藏过程中的黑变现象较为突出,是制约对虾产业核心竞争力构建的关键要素。捕捞后的不可逆退化性黑变与养殖过程中的免疫应激所引发的可逆黑变其机理和意义显著不同。因此,阐明对虾冷藏期间的黑变规律及其机制,将为黑变防控提供直接理论依据和技术指导。然而,对虾冷藏过程中的黑变规律及其生化机制目前尚未见报道。本文基于养殖过程中丝氨酸蛋白酶在对虾黑变中的关键作用,通过跟踪监测冷藏过程中不同部位丝氨酸蛋白酶的活力变化、黑变速率,及其二者之间的相关性,初步揭示对虾冷藏过程中由丝氨酸蛋白酶介导的黑变规律,为对虾冷链物流过程中的黑变靶向防控提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

鲜活南美白对虾购自广东省湛江市东海岛,体长8~10cm,体重10~15g,不脱水带回实验室。SP底物suc-ala-ala-pro-phe-p-NA购自Sigma公司;牛血清白蛋白(BSA)、考马斯亮蓝G-250购自上海博奥生物科技有限公司;其他分析纯试剂购自广州化学试剂厂;BS110S电子天平,北京赛多利斯天平有限公司;SIGMA3-18K冷冻离心机,德国Sigma公司;精密数显PHS-29A pH计,上海精密科学仪器有限公司;UV-3200PC紫外分光光度计,上海美谱达仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂配制

(1) 1.0 mmol/L suc-ala-ala-pro-phe-p-NA: 底物溶液,将25 mg底物溶于4.0 mL DMSO(二甲基亚砷),分装成1.0 mL/管,-18℃冻存,用时解冻后将每管中的底物移于9.0 mL 0.1 M pH8.0 Tris-HCl缓冲液中混匀即可;(2) 0.1 M pH8.0 Tris-HCl: 称取1.21 g Tris(三羟甲基氨基甲烷)溶于90 mL蒸馏水,用1.0 mol/L HCl调pH至8.0,蒸馏水定容至100 mL;(3) 1.0 mg/mL牛血清蛋白(BSA)标准溶液: 称取100 mg BSA溶于100 mL蒸馏水,并定容;(4) 考马斯亮蓝G-250染色液: 称取100 mg考马斯亮蓝G-250,溶于50 mL 90%乙醇中,加入85% (m/V)的磷酸100 mL,蒸馏水定容至1000 mL。

1.2.2 丝氨酸蛋白酶粗酶制备

参照文献^[11]适当修改,鲜活南美白对虾实验室暂养3天,然后用无菌袋封装后于4℃冻藏,分别在0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 d时取样,取3条作为重复,将每条虾表面用75%酒精消毒后分成头部、腹部和尾部三个部分,除去外骨骼(虾壳)后将每个部分分别用手术刀剪碎,称取2.0 g放置于研钵中,加入8.0 mL PBS缓冲液,冰浴上研磨至糊状,转移至50 mL无菌离心管,于4℃下12000 r/min离心20 min,取上清作为粗酶液,立即测定蛋白含量和SP活力。

1.2.3 SP活力测定

参照Lee方法^[12]适当修改,在光程为1 cm的石英比色皿中加入2.0 mL Tris-HCl缓冲液,0.5 mL底物溶液,在37℃的恒温水浴锅中保温10 min后,加入0.5 mL粗酶液,混匀后继续保温并开始计时,以缓冲

液为对照,每隔 1 min 记录 405 nm 波长处吸光值。酶活力单位定义为每分钟吸光值变化 0.01 为一个酶活力单位 (U)。活力强弱以活力单位数与蛋白含量的比值表示 (U/mg 蛋白)。蛋白质含量的测定采用 Bradford 法,以 BSA 制作标准曲线,根据标准曲线求出蛋白质含量。

1.2.4 黑变程度的测定

参照文献^[6]方法,采用 WSC-I 型色差计测定。仪器光圈直径 30 mm,聚光镜直径 30 mm,用标准陶瓷板 (X=91.295, Y=94.295, Z=107.045) 作为工作标准,测量对虾表面在测样盒中的反射光。选用色系统 3,由 CIE 三刺激值(X、Y、Z)计算出 L 值。L 表示颜色透明度, L=0 为黑色, L=100 为白色, L 值越小表示黑变越严重,每组数值重复测三次取平均值。

1.3 统计分析

数据采用平均值±标准偏差的形式表示,采用 SPSS15.0 对数据进行统计分析,多重比较采用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 对虾冷藏期间感官形态变化

南美白对虾在冷藏过程中的黑变进程可由图 1 的形态变化和表 1 明度值变化进行描述和分析。



图 1 南美白对虾冷藏过程感官变化

Fig.1 Changes in sensory quality of *Litopenaeus vannamei* during cold storage

由图 1 感官变化图可以明显看出,南美白对虾在冷藏过程中的黑变随时间的延长而加重,但初始 1~2 d 变化不明显,第 3 d 时有明显变化,第 4 d 时变化加快,第 5 d 时变化最大,之后颜色逐渐加深,至第 10 d 时内部组织已发生溃烂,无法食用,失去保藏价值。同时可以看出,对虾不同部位其黑变发生的速率和程度有较大差异,变化最显著的是头部,其次是尾部,腹部最慢。采用色差计对整个过程的黑变程度进行定量

分析发现(表 1),冷藏至第 3 d 时,三个部位 L 值与对照相比都有不同程度的下降,至第 4 d 时头部开始有较大变化,但未达到显著水平,第 5 d 时头部和尾部与对照相比均达到了显著性水平 (P<0.05),而腹部仍未达到显著性水平。在冷藏的后半阶段,头部 L 值在第 7 d 时又有显著性变化,一直维持的到末期;而腹部和尾部虽一直处于下降状态,但直到末期才达到显著性水平。由表 1 同一时期不同部位的 L 值可以看出,在冷藏的前 4 d 各部位间基本没有显著性差异,由第 5 d 开始,各部位间差异达到显著性,一直到冷藏结束均维持此状态。

综合分析不难发现,这种感官上的变化(图 1)与明度值 L 的变化(表 1)趋势具有良好的一致性。从统计定量角度来看,表 1 不仅定量了冷藏过程不同部位黑变速率的差异,而且将各部位的差异也进行了统计比较。结合感官评定和色差值的统计分析,可以确定明度值 L 的变化速率除了腹部变化不甚明显外,头部和尾部在冷藏至第 4~6 d 时都有显著变化,第 5 d 时变化最大,之后趋于平缓。因此,冷藏至第 4 d 时是黑变防控的关键期。

表 1 南美白对虾冷藏过程不同部位明度值的变化

Table 1 Changes in brightness of *Litopenaeus vannamei* during cold storage

冷藏进程/d	头部	腹部	尾部
0	54.92±0.29 ^A	56.19±0.55 ^A	55.81±0.32 ^A
1	53.97±0.59 ^{aA}	55.82±0.48 ^{aA}	54.63±0.56 ^{aA}
2	52.85±0.76 ^{aA}	55.53±0.64 ^{aA}	54.14±0.49 ^{aA}
3	51.76±0.67 ^{aA}	55.26±0.91 ^{aA}	53.92±0.87 ^{aA}
4	49.61±0.79 ^{abA}	54.91±0.7 ^{aAB}	53.28±0.92 ^{aAB}
5	45.48±0.83 ^{bA}	54.64±0.55 ^{aC}	50.83±0.64 ^{bB}
6	41.57±0.82 ^{bA}	54.18±0.88 ^{aC}	49.36±0.79 ^{bB}
7	40.72±0.78 ^{cA}	53.82±0.91 ^{aC}	48.71±0.69 ^{bB}
8	39.61±0.69 ^{cA}	52.19±0.77 ^{aC}	47.64±0.84 ^{bB}
9	37.83±0.96 ^{cA}	51.93±0.81 ^{aC}	46.42±0.63 ^{bB}
10	36.69±0.79 ^{cA}	50.46±0.68 ^{bC}	45.31±0.74 ^{cB}

注:(1)同一列数据中,不同小写字母表示与对照 L 值相比在 P<0.05 水平上有差异显著性水平;(2)同一行数据中,不同大写字母表示不同部位间 L 值在 P<0.05 水平上有差异显著性水平。

2.2 对虾冷藏期间各部分 SP 活性变化

由图 2 可知,南美白对虾在冷藏过程不同部位 SP 活力变化趋势大体相同,均呈现出先升后降的特点,但不同部位酶活力变化幅度不同。与上述图 1 和表 1 结果相对应,图 2 中 SP 活力变化表明头部活力最高

(509 U/mg 蛋白),且冷藏末期仍维持在 359 U/mg 蛋白的较高水平;尾部虽然在第 5 d 时也有较大上升(356 U/mg 蛋白),但明显低于头部,且很快下降到几乎初始水平(178 U/mg 蛋白);总体来讲,腹部没有较大变化,酶活基本维持在 100~300 U/mg 蛋白之间。

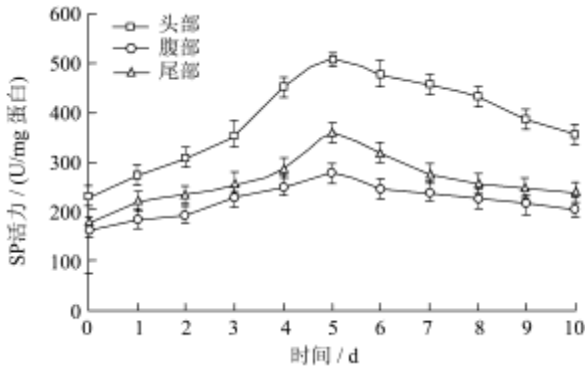


图 2 南美白对虾冷藏过程各部位 SP 活力变化

Fig.2 Changes in SP activity of *Litopenaeus vannamei* during cold storage

2.3 SP 活性与黑变相关性

为了定量评价 SP 活力与黑变之间的相关性,采用 spss 软件对冷藏黑变速率最快的前 5 d SP 活力与明度值 L 进行数据拟合和相关性分析,结果见图 3。

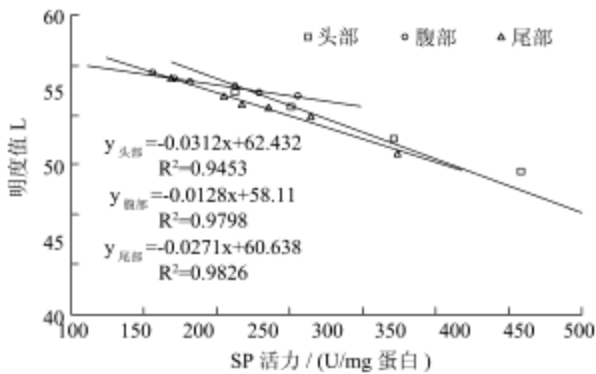


图 3 南美白对虾冷藏过程明度值与 SP 活力相关性

Fig.3 Correlation between the brightness and SP activity of *Litopenaeus vannamei* during cold storage

由图 3 可以看出,对虾头部、腹部和尾部在冷藏过程中其黑变程度均与 SP 活力呈显著负相关($R^2 > 0.9$, $k < 0$);比较拟合曲线的斜率可知, $k_{\text{头部}} = 0.0312 > k_{\text{尾部}} = 0.0271 > k_{\text{腹部}} = 0.0128$,表明头部对酶活变化反应最为敏感,最容易引起黑变,其次是尾部,最后是腹部,其生化原因有待深入研究。

3 讨论

在养殖活体中,可逆性对虾黑变是由外界因子刺激引起的先天性免疫反应,其过程是一个极其复杂的级联系统。酚氧化酶首先以非活性的酶原存在,只有

在一定条件刺激下才能被激活,然后经多步酶促和非酶促反应生成黑色素,表现出黑变现象,当胁迫刺激因子消除后黑变自动消失,机体恢复半透明状态。然而在对虾冷链物流过程中,因先天的血液循环和体内代谢终止,退行性黑变的规律和生化机制可能与活体对虾不同,阐明冷藏对虾的黑变规律和机制,制定关键性防控措施对于维持产品的良好感官价值和提高市场竞争力意义重大。总体来看,目前冷藏对虾黑变防控措施从阶段上讲都属于末端策略,在技术上仅是通过各种物理、化学和生物的方法抑制或钝化酚氧化酶的活力来延缓黑变的速率和程度,缺乏从根本上进行源头调控的理论依据和技术指导。研究对虾冷藏过程中 ProPO 激活规律和生化机制,须首先在宏观上明确 SP 活性与黑变的相关性。本研究结果初步表明南美白对虾在冷藏过程中黑变速率呈现先慢后快的特点,在冷藏至第 5 d 时最大,从 SP 活力变化角度来看,也呈现出类似规律,统计学分析表明对虾各部位的明度值 L 与其 SP 活力之间的相关性均大于 0.9。从图 1 的黑变程度来看,对虾头部明显是黑变最严重的部位,其次是腹部,而尾部最轻;从 SP 活力来看,头部的活力也显著高于腹部和尾部。与活体研究结果相比可以发现,在冷藏对虾中同样存在 SP 活力与黑变程度密切相关的现象,即 SP 在介导对虾黑变过程中发挥关键作用。进一步探明冷藏过程中 SP 活力与酚氧化酶活力之间的相关性将有利于从整体把握冷藏对虾的黑变规律,关于此方面的研究目前正由笔者所在的研究团队着力实施。与迟海^[3]等人-8 °C 冻藏研究结果相比,本研究发现冷藏对虾的感官黑变速率更快,可能在于相对较高的温度更利于 ProPO-AS 的激活。

综合以上研究结果可以初步推测,在对虾冷藏过程中,某种活化因子首先激活 ProSP,使之变构象改变为有活性的 SP,而 SP 又将无活性的 ProPO 水解掉一段肽段,使之激活为 PO,然后快速启动黑变反应,其详尽过程有待进一步探索和验证。通过深入研究对虾冷藏过程中酚氧化酶原激活系统 ProPO-AS 的激活规律和生化机制,明确激活过程的关键限制性因素,一方面有助于丰富和加深对 ProPO 激活过程的理论认识,另一方面为理性设计和筛选高效天然抑制剂奠定理论基础,将有助于从根本上解决对虾冷藏过程的黑变问题。

4 结论

在为期 10 d 的冷藏过程中,南美白对虾感官黑变呈现出先慢后快的变化趋势,前 2 d 基本无变化,第 3 d 时变化开始加快,第 5 d 变化最为显著,之后变化差

异不大;不同部位的黑变速率存在显著差异,其顺序为头部>尾部>腹部,冷藏至第4 d时头部、腹部、尾部间 L 值差异开始明显,第 5d 时三者之间达到显著性差异。冷藏期间黑变速率最快的前 5 d 数据表明不同部位黑变指标 L 值与其 SP 活力存在密切相关性,证明在冷藏对虾体内也存在 ProPO-AS 激活系统,SP 活力水平同样对 ProPO-AS 的激活状态起重要调控作用,其规律和机制有待深入研究。

参考文献

- [1] Encarnacion AB, Fagutao F, Jintasatporn O, et al. Application of ergothioneine-rich extract from an edible mushroom *Flammulina velutipes* for melanosis prevention in shrimp, *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* [J]. Food Research International, 2012, 45: 232-237
- [2] 曹荣.对虾生物保鲜与其熟制品保藏技术的研究[D].中国海洋大学博士学位论文,2009:10-45
Cao R. Study on preservation technology of fresh prawns and cooked products [D]. Dissertation Submitted to Ocean University of China for Doctor Degree, 2009: 10-45
- [3] Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M. Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) [J]. Journal of Food Biochemistry, 2005, 29: 470-485
- [4] Martínez-Alvarez O, López-Caballero M E, Gómez-Guillén M C, et al. The effect of several cooking treatments on subsequent chilled storage of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with different melanosis-inhibiting formulas [J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42: 1335-1344
- [5] Manheem K, Benjakul S, Kijroongrojana K, et al. The effect of heating conditions on polyphenol oxidase, proteases and melanosis in pre-cooked Pacific white shrimp during refrigerated storage [J]. Food Chemistry, 2012, 131: 1370-1375
- [6] 李海波,郑海平,郑海辉,等.臭氧对虾类多酚氧化酶(PPO)抑制作用的初步研究[J].浙江海洋学院学报(自然科学版), 2009,28(3):307-311
Li HB, Zheng HP, Zheng HH, et al. A Preliminary Study on the Inhibitory Effect of Ozone on Shrimps Polyphenol Oxidase (PPO) [J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2009, 28(3): 307-311
- [7] Zhang L, Liu SC, Ji HW, et al. Inactivation of polyphenoloxidase from Pacific white shrimp by dense phase carbon dioxide [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2011, 12: 635-641
- [8] 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: 1263-1271
- [9] 凌萍华,李清纯,谢晶.4-HR 对涂膜南美白对虾的黑变抑制和残留量分析[J].食品工业科技,2010,31(12):309-313
Ling PH, Li QC, Xie J. Melanosis inhibition and residual levels of 4-hexylresorcinol combined with chitosan in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(12): 309-313
- [10] Nirmal NP, 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: 924-932
- [11] 陈飞东.虾保鲜冰制备工艺的研究及其应用[D].浙江工商大学硕士学位论文,2007
Chen FD. Study on preparation and application of fresh ice for prawn [D]. Dissertation Submitted to Zhejiang Gongshang University for Master Degree of Engineering, 2007
- [12] Lee KY, Zhang R, Kim MS, et al. A zymogen form of masquerade-like serine proteinase homologue is cleaved during prophenoloxidase activation by Ca²⁺ in coleopteran and *Tenebrio molitor* larvae [J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269: 4375-4383
- [13] 迟海,李学英,杨宪时,等.南极磷虾冻藏温度下的品质变化及其货架期分析[J].水产学报,2012,36(1):153-160
Chi H, Li XY, Yang XS, et al. Analysis of quality changes and shelf-life of Antarctic krill (*Euphausia superba*) at frozen temperature [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(1): 153-160