

# 凡纳滨对虾 PPO 的组织分布和活性与其贮藏过程中黑变的关系

黄万有, 吉宏武, 刘书成, 郝记明, 毛伟杰, 解万翠, 陈亚励

(广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东普通高校水产品深加工重点实验室, 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088)

**摘要:** 研究了凡纳滨对虾多酚氧化酶 (Polyphenol Oxidase, PPO) 在其组织中的分布和活性、PPO 的最适 pH 值和稳定性, 分析了不同包装方式 (真空包装与非真空包装) 和不同贮藏温度 (-18 °C、4 °C、25 °C) 对虾黑变和 PPO 活性的变化规律, 探讨了对虾黑变与 PPO 催化反应速度和贮藏温度的关系以及 PPO 酶活与贮藏温度的关系。结果表明: 凡纳滨对虾的虾壳和虾头部位的 PPO 含量和活性较高, 虾肉与虾足中 PPO 含量和活性较低; 对虾 PPO 的最适 pH 值为 6, 在 pH 值 6~8 之间具有较好的稳定性和较高的活性; 对虾黑变与贮藏温度和 PPO 催化反应速度呈正相关, PPO 相对酶活与贮藏温度呈负相关; 真空包装隔绝氧气和低温抑制 PPO 活性, 降低了 PPO 的催化反应速度, 从而减缓了对虾的黑变。研究结果为凡纳滨对虾在贮藏和加工过程中防止和控制黑变提供理论参考。

**关键词:** 多酚氧化酶; 组织分布; 包装方式; 贮藏温度; 黑变

文章编号: 1673-9078(2014)2-89-94

## Relation of Tissue Distribution and Activity of Polyphenol Oxidase from *Litopenaeus vannamei* and its Melanosis during Storage

HUANG Wan-you, JI Hong-wu, LIU Shu-cheng, HAO Ji-ming, MAO Wei-jie, XIE Wan-cui, CHEN Ya-li

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** The optimal pH, stability, tissue distribution and activity of polyphenol oxidase (PPO) from *Litopenaeus vannamei* were studied. The effects of different packages (vacuum and non-vacuum package) and different storage temperatures (-18 °C, 4 °C, 25 °C) on the melanosis and PPO activity of *Litopenaeus vannamei* were analyzed. Meanwhile, the relationship of melanosis with PPO catalytic reaction rate and storage temperature and the relationship between PPO activity and storage temperature were discussed. The results showed that the activity of PPO from the shell and head of *Litopenaeus vannamei* was higher, while it was lower in the abdomen muscle and pleopods. The optimal pH of PPO was 6.0 and it was more stable with higher activity at pH 6.0~8.0. The melanosis was positively correlated with storage temperature and catalytic reaction rate of PPO; the relative activity of PPO was negatively related to storage temperature; vacuum package effectively isolated *Litopenaeus vannamei* from oxygen and lower temperature inhibited PPO activity, thus PPO catalytic reaction rate was decreased and the melanosis was prevented. It will provide a theoretical reference for controlling the melanosis of *Litopenaeus vannamei* during storage and processing.

**Key words:** poly phenol oxidase; tissue distribution; packaging; storage temperature; melanosis

收稿日期: 2013-09-03

项目基金: 国家自然科学基金项目 (31371801); 现代农业产业技术体系专项基金 (CARS-47); 广东省教育厅创新课题 (2012KJGX0062); 广东省水产蛋白改性技术研究团队 (2011A020102005); 广东省自然科学基金项目 (10152408801000010)

作者简介: 黄万有 (1987-), 女, 主要从事水产品加工新技术的研究

通讯作者: 刘书成 (1977-), 男, 博士, 教授, 主要从事水产品加工新技术基础理论和应用研究

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*), 又称南美白对虾, 肉质鲜嫩、风味独特、高蛋白、低脂肪, 富含矿物质和人体内所需的维生素, 营养非常价值高, 深受国内外特别是欧美国家消费者的青睐, 但对虾捕获后在贮藏和加工过程中极易发生黑变现象<sup>[1]</sup>。虾体黑变一旦发生就很难去除。虾类体表黑变虽然对虾的营养价值影响较小, 但在保藏和销售过程中对虾体的感官品质和商品价值影响较大, 从而影响其市场销售

[2]。黑变是甲壳类动物死后在甲壳和肉之间的膜上发生的一种生化反应，其主要是由多酚氧化酶（Polyphenol Oxidase, PPO）引起的，是一种酶促反应过程。在活虾中 PPO 主要以酪氨酸酶原（proPPO）的形式存在于血细胞中，不具有催化活性，但与模式识别蛋白、丝氨酸蛋白酶等一同构成了复杂的酚氧化酶原激活系统；对虾死后，一些外源多糖（微生物细胞壁的主要成分）与分子识别蛋白结合，激活 proPPO，PPO 催化酚类化合物生成无色醌类物质，这些醌类物质在非酶促反应下聚合生成黑色素，该过程即为虾的黑变[3]。

在对虾贮藏与加工过程中，对虾黑变是限制对虾养殖捕捞和加工产业健康发展的重要瓶颈问题之一，而如何有效控制虾体的黑变一直是科学家们所关注的热点课题。目前，国内外对虾多酚氧化酶的研究，主要是从多酚氧化酶的生化特性和活性抑制等方面开展[3-5]。要达到有效控制虾体黑变，还需要完善的理论体系作为支撑与指导。本试验重点研究多酚氧化酶在凡纳滨对虾中的组织分布和活性，分析不同包装（真空与非真空包装）和不同贮藏温度（-18、4、25℃）下对虾的黑变和多酚氧化酶活性的变化规律，探讨对虾黑变与 PPO 活性和贮藏温度的关系以及 PPO 酶活与贮藏温度的关系，以期控制凡纳滨对虾在贮藏和加工过程中的黑变提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

凡纳滨对虾，购于湛江市霞山东风市场，选取鲜活、大小均一、完整的个体，流水清洗加冰猝死并置于-80℃冻藏，待用。

### 1.2 试剂与仪器

Brij35（Sigma 公司）；3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-L-alanine(L-DOPA)（Sigma 公司）；其他试剂均为分析纯。

DZ400/2D 真空包装机，瑞利包装机械有限公司；AUY220 型分析天平，日本岛津仪器有限公司；UX2200H 型电子托盘天平，日本岛津仪器有限公司；UV-2550 紫外分光光度计，日本岛津仪器有限公司；CR22G II 高速冷冻离心机，日本日立公司；组织匀浆机，荷兰飞利浦。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 样品处理

新鲜活虾加冰猝死，然后将虾分割为7个部分（虾头壳、虾头肉、虾腹壳、虾腹肉、虾尾壳、虾尾肉、虾足），进行非真空或真空包装，置于-18、4、25℃下贮藏，以全虾作为对照组，每天观察虾的黑变现象。

对虾的7个部位分别提取多酚氧化酶，测定其酶活性。将提取的多酚氧化酶液分装于试管中，分别放置于-18、4、25℃下贮藏，每隔一段时间观察酶液颜色和测其酶活性。

#### 1.3.2 多酚氧化酶粗酶液的制备

称取半解冻的带壳虾头 150 g 与 450 mL 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液（0.5 mol/L NaCl, 0.2% Brij35, pH 7.5）混匀。在 4±1℃ 静置 3 h，再于 4℃, 10000 r/min 条件下，冷冻离心 30 min。取上清液，加入固体硫酸铵分级沉淀，达 40~70% 饱和度，4±1℃ 静置 30 min。再 4℃, 12000 r/min 冷冻离心 30 min，弃上清液，将沉淀溶解于 0.05 mol/L, pH 7.2 磷酸盐缓冲液中，再在 4±1℃ 进行透析，透析液为相同的缓冲液，更换三次透析液。即获得 PPO 粗酶液。提取后立即于-80℃超低温冰箱中保存。

#### 1.3.3 多酚氧化酶的活力测定

以 L-DOPA 作为反应底物，反应溶液包括 0.3 mL 粗酶液，1 mL 15 mmol/L 的 L-DOPA，1 mL 0.05 mol/L pH6.0 磷酸盐缓冲液，1 mL 去离子水。在 25±1℃ 条件下反应 3 min，于 475 nm 波长下检测多巴色素的生成。空白对照为 0.3 mL 去离子水替代 PPO 粗酶液，其他加入物质与上述相同。一个酶活力单位定义为：在上述条件下吸光度值每分钟每增加 0.001 为一个酶活力单位。相对酶活计算公式为：

$$\text{相对酶活}\% = \frac{\text{处理后样品吸光度}A_{\text{值}}}{\text{处理前样品吸光度}A_0\text{值}} \times 100\%$$

#### 1.3.4 多酚氧化酶的最适 pH 值及其稳定性

根据 Zamorano<sup>[6]</sup>的方法稍作修改。将 0.3 mL 粗酶液，1 mL 15 mmol/L 的 L-DOPA（去离子水配制），1 mL 0.05 mol/L 不同 pH 的缓冲液（0.1 mol/L 柠檬酸-0.2 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 3~5, 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0.1 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6~8, 0.1 mol/L 甘氨酸-0.1 mol/L NaOH pH 9）在 25±1℃ 条件下反应 3 min，于 475 nm 波长下检测多巴色素的生成。多酚氧化酶 pH 稳定性测定方法：将上述不同 pH 的缓冲液与 0.3 mL 粗酶液混合于室温下放置 1 h，然后测定多酚氧化酶的相对酶活性。

#### 1.3.5 数据处理

数据以平均值±标准差表示；方差分析和 Tukey's

HSD多重比较采用 JMP7.0软件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 多酚氧化酶在凡纳滨对虾组织中的分布

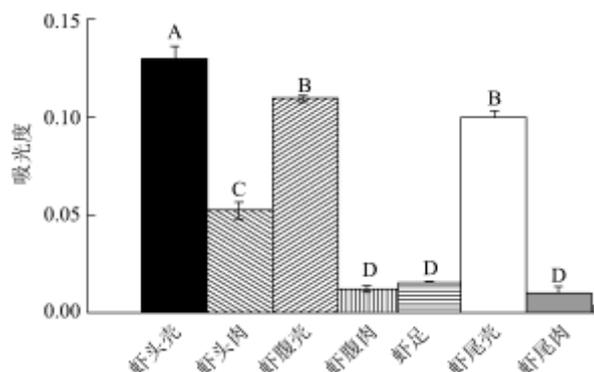


图1 凡纳滨对虾不同组织中多酚氧化酶的活性

Fig.1 Activity of PPO from different tissues of *Litopenaeus vannamei*

注：柱形图上标注不同字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

从图1可以看出, 凡纳滨对虾虾头壳部位的PPO活性最高, 其次是虾身壳和虾尾壳部位, 虾头肉部位的PPO也具有相对较高的活性, 而虾腹肉和虾尾肉以及虾足的PPO活性最低。同一虾体的不同部位, PPO的酶活性是不相同<sup>[7]</sup>。Zamorano和Montero等也报道虾甲壳中PPO活性最高<sup>[68]</sup>, 但 *Parapenaeus longirostris* 肌肉几乎检测不到PPO酶活<sup>[6]</sup>。虾肌肉中的PPO活性可能来自于血淋巴和肌肉表皮<sup>[8]</sup>。对虾的黑变现象进行观察发现, 对虾死后先开始黑变的部位是头部, 接着是虾腹部边缘, 随后尾部逐渐出现黑色斑点, 壳与肉渐渐分离, 最后是虾身变黑<sup>[1]</sup>。因此, 对虾的黑变现象与各部位PPO的酶活具有很好的相关性。

### 2.2 多酚氧化酶的最适 pH 值及其稳定性

本课题组前期的研究表明: 凡纳滨对虾PPO的最适温度约为44℃, 在25~40℃范围内是稳定的<sup>[5]</sup>。

从图2可以看出, 凡纳滨对虾PPO相对酶活在pH值3~6内逐渐升高, pH值大于6时相对酶活下降。因此, 凡纳滨对虾PPO最适pH值应为6, 这与Nirmal<sup>[3]</sup>报道的一致, 然而福建养殖的凡纳滨对虾PPO的最适pH值为7<sup>[4]</sup>, 这可能与对虾的生长环境有关。大部分甲壳类动物PPO最适pH值在6~8之间<sup>[9-11]</sup>, 也有部分在4~6值<sup>[6,12]</sup>; 大多数甲壳类动物PPO仅有一个最适pH值, 但特殊情况下会出现两个最适pH值<sup>[8,13]</sup>。PPO最适pH值很大程度上取决于PPO在自然生态上所处的pH值环境。从图2还可以看出, 在低酸性(pH

值3~4)条件下, PPO不稳定, 出现混浊现象, pH值为4时PPO相对酶活仅为15.17%; 在pH值6~8之间, PPO表现出了较好的稳定性, 酶液呈现澄清透明。大部分物种来源的PPO在酸性条件下都是不稳定的, 而在偏碱性(pH值6~8)条件下较稳定<sup>[6,8-9,13]</sup>。对虾死后肌肉pH值约在6.5~7.5之间变化<sup>[14]</sup>, 该pH值范围正是PPO最稳定区域, 因此, 这也是导致对虾死后黑变加速的重要原因之一。

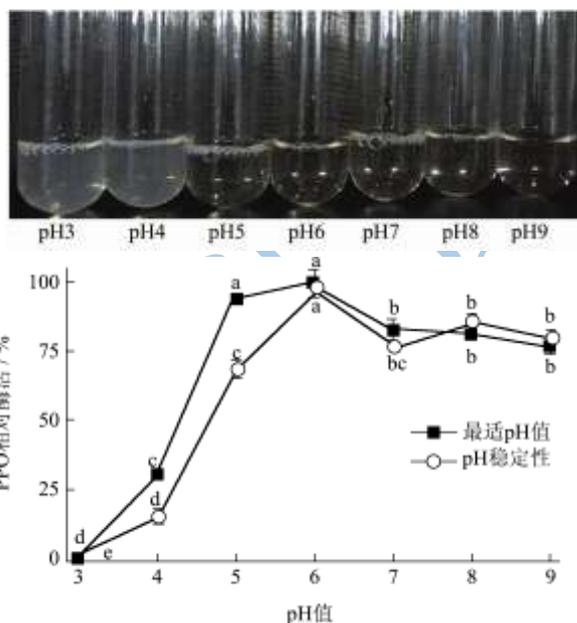


图2 多酚氧化酶的最适 pH 及其稳定性

Fig.2 Optimum pH and pH stability of PPO from *Litopenaeus vannamei*

注：同一曲线不同点标注不同字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

### 2.3 贮藏温度对多酚氧化酶液色泽和活性的影响

对虾死后黑变过程可以分为两个阶段: 第一阶段, PPO的激活。PPO一般以无活性的酚氧化酶原的形式存在于血细胞中, 对虾死后, 外源多糖(微生物细胞壁的主要成分)与分子识别蛋白结合, 在丝氨酸蛋白酶参与下, 酚氧化酶原被激活为PPO。第二阶段, PPO催化酚类化合物(酪氨酸)生成无色醌类物质, 这些醌类化合物在非酶作用下发生聚合生成黑色素, 与氨基酸或蛋白质结合加深颜色<sup>[15]</sup>。本试验的材料为凡纳滨对虾粗酶液, 即PPO已经基本处于激活状态, 因此, 贮藏过程中粗酶液色泽的变化主要是由于PPO催化酪氨酸生成黑色素及其与氨基酸或蛋白质结合加深颜色。把提取的PPO粗酶液分别置于-18、4、25℃下贮藏, 每隔一定时间观察酶液现象和测定酶活性, 结果见图3。

从图3可以看出, 在25℃下贮藏4h, 酶液颜色变

深, PPO相对酶活显著降低 ( $p < 0.05$ ); 随着贮藏时间延长, 酶液颜色逐渐加深, PPO相对酶活也急剧降低; 贮藏到24 h时, PPO相对酶活降低到9.64%, 酶活几乎完全丧失。凡纳滨对虾PPO粗酶液在4 °C下贮藏1 d内, 酶液颜色几乎没变化, 但12 h内PPO相对酶活有所增加, 这可能是因为PPO粗酶液中含有部分酶原, 贮藏过程中被激活; 然后随贮藏时间延长, PPO相对酶活又有所降低, 贮藏1 d时, PPO相对酶活为98.47%; 贮藏到第2 d时, 酶液开始变色, PPO相对酶活也急剧降低; 贮藏到第4 d时, PPO相对酶活仅为2.03%, 活性几乎完全丧失。凡纳滨对虾PPO粗酶液在-18 °C下贮藏7 d, 酶液颜色基本没有显著变化; PPO相对酶活测定显示, PPO粗酶液在-18 °C下贮藏2 d时, 其相对酶活变化不显著 ( $p > 0.05$ ), 贮藏到第3 d时, PPO相对酶活开始显著降低 ( $p < 0.05$ )。以上分析表明: 在一定贮藏温度下, 随着贮藏时间延长, PPO酶液颜色越深, 相对酶活越低, 一方面是由于PPO催化生成的黑色素与酶液中的氨基酸或蛋白质结合, 加深了酶液色泽<sup>[15]</sup>, 另一方面是由于PPO催化反应的底物减少, 产物醌类物质含量增高, 导致PPO的活性下降<sup>[16]</sup>; 在一定贮藏时间下, 温度越高, 酶液颜色越深, PPO相对酶活越低, 一方面是由于温度高, PPO催化生成黑色素的速度快, 另一方面是由于温度高, PPO酶活变化剧烈, 在短时间内具有较高活性, 而后急剧降低<sup>[16]</sup>。

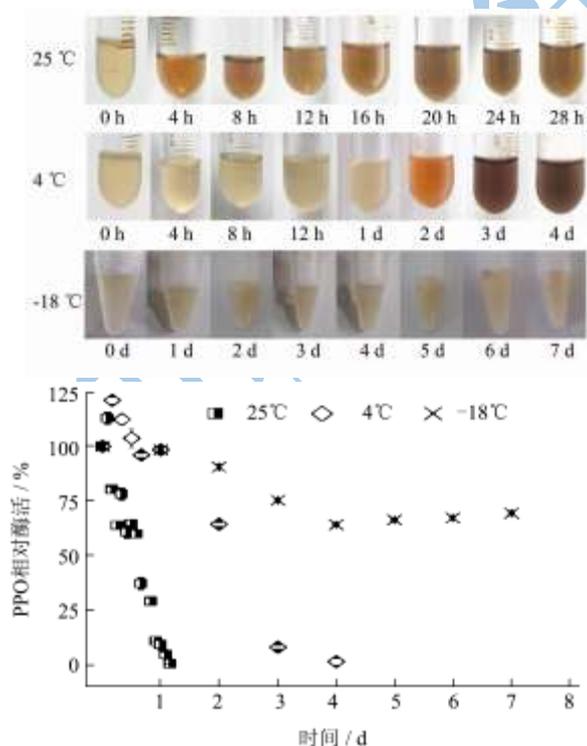


图3 贮藏温度对凡纳滨对虾 PPO 黑变和酶活的影响

Fig.3 Effect of storage temperature on melanosis and activity of PPO from *Litopenaeus vannamei*

从图3还可以看出, 当粗酶液分别在25 °C、4 °C和-18 °C下贮藏相同时间时, 25 °C酶液色泽变化的速度和酶活下降速度要快于4 °C的, 4 °C酶液色泽变化的速度和酶活下降速度要快于-18 °C的, 说明PPO酶液色泽变化速度和酶活下降速度与贮藏温度呈正相关。这主要是因为温度高, PPO催化酪氨酸生成黑色素的反应速度快, 而且随贮藏时间延长, 酶活急剧下降; 温度低, 贮藏过程中PPO活性被抑制, 催化酪氨酸生成黑色素的反应速度慢, 酶活性也被保留下来。因此, 低温可以有效抑制PPO的活性, 降低催化反应速度, 从而减缓酶液色泽的变化。

## 2.4 贮藏温度和包装方式对凡纳滨对虾黑变的影响

为了考察凡纳滨对虾 PPO 在不同组织中分布与其黑变的关系、PPO 酶液色泽变化与对虾黑变的关系, 本试验将凡纳滨对虾体分割为7个部分 (虾头壳、虾头肉、虾腹壳、虾腹肉、虾尾壳、虾尾肉、虾足), 采用真空或非真空包装, 分别置于-18、4、25 °C贮藏, 观察虾各组织部位的变化, 结果见图4。

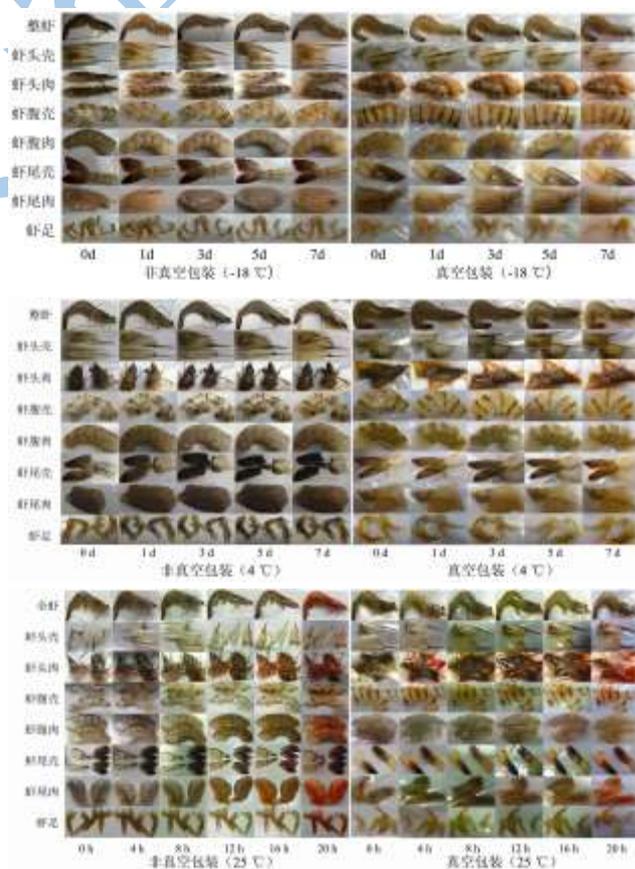


图4 贮藏温度和包装方式对凡纳滨对虾黑变的影响

Fig.4 Effect of storage temperature and package on melanosis of *Litopenaeus vannamei*

从图4可以看出,非真空包装的虾及各组织部位,虾壳和虾头容易发生黑变,而虾肉则不易黑变。对虾黑变主要是PPO催化引起的,因此从侧面反映了虾壳和虾头部位的PPO含量和活性较高,而虾肉中的PPO含量和活性较低。与未去壳的整虾相比,去壳虾头的黑变速度要快而且严重,可能是由于去除虾壳后没有虾壳的保护,PPO和底物与氧气更易接触,导致黑变加速<sup>[6]</sup>。非真空包装的虾及各组织部位,在-18℃贮藏7d没有发生黑变,4℃贮藏1d后开始出现黑变,25℃贮藏4h后开始出现黑变,8h后开始出现红变。温度越低,黑变越慢,主要是因为低温能有效抑制PPO活性;25℃下由于贮藏初期PPO活性较高,黑变发生较快,而且微生物易引起腐败造成蛋白质变性,使虾青素游离出来而呈现红色。

从图4还可以看出,-18℃下无论是真空包装还是非真空包装,贮藏期间对虾各部位几乎都没有发生黑变现象。4℃下非真空包装的整虾,黑变首先出现在头腮部(1d),随后延伸至背部(3d)和虾尾(5d),第7d虾头与虾腹交接处理出现黑变,并有脱离虾肉现象;4℃下非真空包装的虾头壳、虾身壳、虾尾壳、虾头肉和虾足,都在1d后出现轻微黑变,随着贮藏时间的延长,黑变加重,而虾身肉和虾尾肉部位并未出现黑变。4℃下真空包装的整虾及各组织部位在贮藏过程中均未发生黑变,但有变红的趋势。25℃非真空包装的虾头肉贮藏2h已开始腐烂,虾头壳、虾身壳和虾尾壳部位开始出现黑点;整虾在4h后腹部边缘出现黑点,8h头腮部出现了黑点;虾身肉、虾尾肉和虾足部位未出现黑变,但10h后开始变红,20h后出现类似煮熟现象。25℃下真空包装的整虾及其各组织部位在贮藏过程中均未发生黑变,但是贮藏12h后开始变红,变红现象比非真空包装的稍微轻缓。以上分析可知,凡纳滨对虾在非真空包装条件下的黑变现象与PPO粗酶液的色泽变化(图3)是一致的,即贮藏温度越高,PPO催化反应生成黑色素的速度快,使对虾黑变较快;贮藏温度越低,由于PPO酶活被抑制,催化反应生成黑色素的速度慢,黑变现象发生较迟缓。因此,对虾黑变与PPO催化反应速度和贮藏温度也是呈正相关的,即贮藏温度越高,PPO催化反应速度越快,对虾黑变越快。

对于真空包装的虾及各组织部位,在-18、4、25℃下实验贮藏期内均未发生黑变,但在4和25℃贮藏期间发生了红变。氧气是对虾黑变的必须条件之一。由于采用真空包装,对虾及各组织部位与氧气隔绝,PPO的催化作用受到了抑制,从而抑制了黑变的发生。这也说明真空包装可以有效抑制虾的黑变。真空包装的

虾及各组织部位在4和25℃下的红变要比非真空包装的稍微轻缓,这说明真空包装虽然能通过抑制微生物生长,延缓红变,但并不能起到完全抑制作用。

### 3 结论

凡纳滨对虾虾壳和虾头部位的PPO含量较多,而对虾肌肉中的PPO含量较少;凡纳滨对虾PPO的最适pH值为6,在pH值6~8之间具有较好的稳定性;对虾黑变速度与PPO催化反应速度和贮藏温度呈正相关,即贮藏温度越高,PPO催化反应速度越快,对虾黑变也越快;PPO相对酶活与贮藏温度呈负相关,即贮藏温度越高,随着贮藏时间延长,PPO相对酶活越低;真空包装通过隔绝氧气、低温抑制PPO活性降低了PPO的催化反应速度,从而减缓对虾的黑变。因此,将凡纳滨对虾进行真空包装并低温贮藏,是防止其黑变抑制腐败的有效措施之一。

### 参考文献

- [1] 常耀光,李兆杰,薛长湖,等.超高压处理对南美白对虾在冷藏过程中贮藏特性的影响[J].农业工程学报,2008,24(12): 230-237  
CHANG Yao-guang, LI Zhao-jie, XUE Chang-hu, et al. Effects of Ultra High Pressure Treatment on Storage Characteristics of White Shrimp in Cold Storage [J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(12): 230-237
- [2] 吴亮亮,杨会成,廖妙飞,等.不同对虾中多酚氧化酶的提取比较及在虾体的分布研究[J].食品工业科技,2012,33(7): 55-62  
WU Liang-liang, YANG Hui-cheng, LIAO Miao-fei, et al. Study on Extraction of Polyphenoloxidase and Enzyme Distribution on Different Shrimps [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(7): 55-62
- [3] Nilesh Prakash N, Soottawat B. Biochemical Properties of Polyphenoloxidase from The Cephalothorax of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. International Aquatic Research, 2012, 4(1): 1-13
- [4] 陈丽娇,郑明锋,李怡宾.南美白对虾多酚氧化酶的生化特性[J].福建农林大学学报(自然科学版),2004,33(3):377-380  
CHEN Li-jiao, ZHENG Ming-feng, LI Yi-bing. Biochemical Characteristics of Polyphenoloxidase in Prawns [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2004, 33(3): 377-380
- [5] ZHANG Liang, LIU Shu cheng, JI Hong-wu, et al. Inactivation of Polyphenol Oxidase from Pacific White Shrimp by Dense phase Carbon Dioxide [J]. Innovative Food

- Science & Emerging Technologies, 2011, 12(4): 635-641
- [6] José Pablo Z, Martínez-Álvarez O, Montero P, et al. Characterisation and Tissue Distribution of Polyphenol Oxidase of Deepwater Pink Shrimp (*Parapenaeus longirostris*) [J]. Food Chemistry, 2009, 112(1): 104-111
- [7] 蔡燕萍,张建友. 虾体多酚氧化酶特性及其抑制技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 424-428  
CAI Yan-ping, Zhang Jian-you. Research Progress in Characterization and Inhibition of Shrimp Polyphenol Oxidase [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(13): 424-428
- [8] Montero P, Ávalos A, Pérez Mateos M. Characterization of Polyphenoloxidase of Prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to Inhibition: Additives and High-pressure Treatment [J]. Food Chemistry, 2001, 75(3): 317-324
- [9] Giménez B, Martínez-Alvarez Ó, Montero P, et al. Characterization of Phenoloxidase Activity of Carapace and Viscera from Cephalothorax of Norway Lobster (*Nephrops norvegicus*) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2010, 43(8): 1240-1245
- [10] Perdomo Morales R, Montero Alejo V, Perera E, et al. Phenoloxidase Activity in The Hemolymph of The Spiny Lobster *Panulirus Argus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(6): 1187-1195
- [11] WANG Yu-Chi, CHANG Poh-shing, CHEN Houng-yung. Tissue Distribution of Prophenoloxidase Transcript in the Pacific White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(3): 414-418
- [12] Adachi K, Hirata T, Nagai K, et al. Hemocyanin a Most Likely Inducer of Black Spots in Kuruma Prawn *Penaeus Japonicus* During Storage [J]. Journal of Food Science, 2001, 66: 1130-1136
- [13] Simpson Benjamin K, Marshall Maurice R, Steven Otwell W. Phenol Oxidase from Shrimp (*Penaeus Setiferus*): Purification and Some Properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35(6): 918-921
- [14] Montero P, Martínez-Álvarez O, Zamorano J P, et al. Melanosis inhibition and 4-hexylresorcinol residual levels in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) following various treatments [J]. European Food Research and Technology, 2006, 223(1): 16-21
- [15] Bartolo I, Birk E O. Some factors affecting Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) cuticle polyphenol oxidase activity and blackspot development [J]. International Journal of Food Science and Technology, 1998, 33: 329-336
- [16] 杨颖,邢志恩,王军,等. 贮藏期香椿中多酚类物质含量与相关酶活变化的关系[J]. 食品科技, 2013, 41(10): 24-28  
YANG Ying, XING Zhi-en, WANG Jun, et al. The relationship between the contents of the polyphenol and the activity of the related enzymes in Chinese Toons during storage [J]. Food Science and Technology, 2010, 35(2): 24-28