

一种多金属氧酸盐对多酚氧化酶的抑制活性评价及在南美白对虾保鲜上的应用

Evaluation of inhibitory activity of a polyoxometallate on polyphenol oxidase and its application in the preservation of *Litopenaeus vannamei*

方佳琪^{1,2} 韩 情^{1,2} 马阳瑜^{1,2} 王 芳^{1,2}

FANG Jia-qi^{1,2} HAN Qing^{1,2} MA Yang-yu^{1,2} WANG Fang^{1,2}

李莉莉³ 李文杰^{1,4} 王 力^{1,3}

LI Li-li³ LI Wen-jie^{1,4} WANG Li^{1,3}

(1. 福建省海洋藻类活性物质制备与功能开发重点实验室, 福建 泉州 362000; 2. 泉州师范学院海洋与食品学院, 福建 泉州 362000; 3. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 4. 泉州师范学院化工与材料学院, 福建 泉州 362000)

(1. Fujian Province Key Laboratory for the Development of Bioactive Material from Marine Algae, Quanzhou, Fujian 362000, China; 2. College of Oceanology and Food Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou, Fujian 362000, China; 3. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China; 4. College of Chemical Engineering and Materials, Quanzhou Normal University, Quanzhou, Fujian 362000, China)

摘要:目的:研究新型多酚氧化酶抑制剂对南美白对虾的保鲜效果。方法:通过紫外和红外光谱表征合成的多酚氧化酶抑制剂 $H_8[P_2Mo_{17}Ni(OH_2)O_{61}]$ ($P_2Mo_{17}Ni$), 研究其对蘑菇多酚氧化酶(PPO)相对酶活的影响及抑制机制和抑制类型;再测定经 $P_2Mo_{17}Ni$ 处理后的南美白对虾在贮藏过程中的感官评分、色差(L^*)值、总色差(ΔE)值、菌落总数、酸碱度(pH)值和总挥发性盐基氮(TVB-N)值的变化情况,评价 $P_2Mo_{17}Ni$ 在南美白对虾保鲜上的作用。结果: $P_2Mo_{17}Ni$ 对体外蘑菇 PPO 的活性具有抑制作用,其半抑制浓度(IC_{50})为 (0.377 ± 0.004) mmol/L,且对 PPO 的抑制模式为竞争型可逆抑制,抑制常数 K_1 为 0.185 mmol/L。在 4 °C 冷藏条件下,与空白组相比, $P_2Mo_{17}Ni$ 处理能延缓对虾感官评分的下降和 L^* 值、 ΔE

值的增加,抑制效果显著;且能显著延缓菌落总数、pH 值和 TVB-N 值的增加,货架期可延长 4~5 d。结论: $P_2Mo_{17}Ni$ 对南美白对虾具有良好的保鲜效果。

关键词:多金属氧酸盐;多酚氧化酶;抑制剂;南美白对虾;保鲜

Abstract: **Objective:** To design new and effective polyphenol oxidase (PPO) inhibitors and expand their application in the field of aquatic product preservation. **Methods:** The synthesized $H_8[P_2Mo_{17}Ni(OH_2)O_{61}]$ ($P_2Mo_{17}Ni$) structure was characterized by ultraviolet and infrared spectrum. The inhibitory effect, type and mechanism of $P_2Mo_{17}Ni$ on the relative activity of mushroom PPO *in vitro* was clarified. Then, the preservation effects of $P_2Mo_{17}Ni$ on *Litopenaeus vannamei* Boone were evaluated through studying the index change of shrimps treated with $P_2Mo_{17}Ni$ stored at 4 °C, in which included the sensory score, the value of chromatic aberration L^* , the value of total chromatic aberration (ΔE), the total number of colonies, the value of pH and the value of total volatile basic nitrogen (TVB-N). **Results:** The results showed that $P_2Mo_{17}Ni$ was synthesized successfully. $P_2Mo_{17}Ni$ inhibited the activity of PPO from mushroom *in vitro* with semi-inhibitory concentration (IC_{50}) of (0.377 ± 0.004) mmol/L. $P_2Mo_{17}Ni$ inhibited mushroom PPO in a competitive reversible manner, and the

基金项目:福建省自然科学基金项目(编号:2020J01791, 2022J011109);福建省海洋藻类活性物质制备与功能开发重点实验室开放课题(编号:2020FZSK04);国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:202210399003)

作者简介:方佳琪,女,泉州师范学院在读本科生。

通信作者:王芳(1969—),女,泉州师范学院教授,硕士生导师,博士。E-mail: dwf320@163.com

收稿日期:2022-03-05 **改回日期:**2022-11-23

inhibition constant K_I was 0.185 mmol/L. Under the cold storage condition of 4 °C, compared with the control group, $P_2Mo_{17}Ni$ could effectively delay the decline of sensory score and the increase of L^* and ΔE value in shrimps treated with $P_2Mo_{17}Ni$, and the inhibitory effect was significant. $P_2Mo_{17}Ni$ could significantly inhibit the increase of total number of colonies, pH value and TVB-N value. $P_2Mo_{17}Ni$ could extend the shelf life of shrimps for 4~5 days. **Conclusion:** $P_2Mo_{17}Ni$ can slow down the blackening of shrimps and prevent its spoilage. $P_2Mo_{17}Ni$ possesses a good preservation effect on *L. vannamei* and can be used in the preservation industry of aquatic products.

Keywords: polyoxometalate; polyphenol oxidase; inhibitor; *Litopenaeus vannamei* Boone; preservation

南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei* Boone) 味道鲜美、营养丰富、经济价值高,深受消费者欢迎^[1]。但是,虾在贮藏过程中会发生黑变等问题,这是因为虾体内的多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 会催化一系列复杂的化学反应生成黑色素而引起虾黑变^[2]。因此,寻找安全有效的 PPO 抑制剂对减缓黑变、延长贮藏期尤为重要。PPO 抑制剂分为天然提取物和合成化合物^[3]。Yang 等^[4]从茶花花粉中已分离出 PPO 抑制剂。Micillo 等^[5]研究表明,2-S-硫酰咖啡酸是很有前途的天然 PPO 抑制剂。Song 等^[6]报道一种新的氨基硫脲化合物能有效抑制 PPO 的活性。刘蒙娜等^[7]报道天然巯基化合物对南美白对虾 PPO 有抑制效果。周雅琪^[8]报道亚牛磺酸对南美白对虾黑变有显著抑制作用。天然提取物提取和纯化的工艺复杂、提取物纯度低、成本高等问题,限制了天然提取物的应用^[3]。而合成化合物因其合成简便、合成过程可控、化合物成分易控制、成本低等特点,正逐渐成为 PPO 抑制剂的研究重点^[3]。

多金属氧酸盐 (polyoxometalates, POMs) 是一类无机金属氧化物化合物,不仅合成步骤简单、产量高,而且水溶性稳定性好^[3]。研究表明,POMs 具有抗病毒^[9]、抗肿瘤^[10]、抗糖尿病^[11]、抑菌^[12]等活性,尤其能有效抑制小鼠黑色素瘤细胞 (B16 细胞) 中的酪氨酸酶活性并调节黑色素形成^[10],因此 POMs 在药物化学领域具有良好的应用前景。研究^[12-14]也显示,POMs 能减缓鲜切莲藕、鲜切苹果和红毛丹果实的褐变进程,这促进了 POMs 在食品保鲜中的应用。POMs 分为同多酸和杂多酸两大类^[15]。杂多酸根据其化学结构分为 Dawson 和 Keggin 等多种化合物^[16]。杂多酸因具有结构的稳定性和多样性而成为研究的重点^[17]。其中,Dawson 型 POMs 似乎具有更高的生物活性和更低的毒性^[18-19]。因此,Dawson 型 POMs 作为一种新型无毒低成本防腐剂更具潜力。迟国祥等^[14]合成 Dawson 型过渡金属锰取代的 2:18 型磷钼酸 $H_8[P_2Mo_{17}Mn(OH_2)O_{61}]$ 并应用于鲜切苹果保鲜。

过渡金属取代的磷钼酸对 PPO 的抑制作用可能与其离子半径和元素的氧化还原电位有关^[15,20]。由于金属镍离子半径和元素的氧化还原电位与金属锰相比均有较大差异,研究拟合成过渡金属镍取代的 2:18 型磷钼酸 ($H_8[P_2Mo_{17}Ni(OH_2)O_{61}]$,简称 $P_2Mo_{17}Ni$),并分析其结构及对多酚氧化酶的抑制机理和抑制类型。根据 $P_2Mo_{17}Ni$ 处理后南美白对虾在 4 °C 冷藏过程中感官评分、色差 (L^*) 值、总色差 (ΔE) 值、菌落总数、酸碱度 (pH) 值和总挥发性盐基氮 (total volatile basic nitrogen, TVB-N) 值的变化情况,评价该抑制剂对南美白对虾的保鲜效果,旨在为设计新型、有效的 PPO 抑制剂和水产品防腐提供理论基础,并扩展 POMs 在食品保鲜领域的应用。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

$P_2Mo_{17}Ni$: 自制;

南美白对虾: 平均质量 (15±5) g, 福建省泉州市泰禾大有码头市场;

蘑菇 PPO: 酶活 ≥ 965 U/mg, 美国 Worthington Biochemical 公司;

邻苯二酚、二甲基亚砜 (DMSO): 纯度 $\geq 99\%$, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司;

其他试剂: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器设备

玻碳电极: Φ 5 mm, 武汉高仕睿联科技有限公司;

饱和甘汞电极: 232 型, 武汉高仕睿联科技有限公司;

铂丝电极: Φ 1 mm, 武汉高仕睿联科技有限公司;

紫外-可见分光光度计: TU-1900 型, 北京普析通用仪器有限责任公司;

傅里叶红外光谱仪: Nicolet iS20 型, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司;

冰箱: BCD-200M22S 型, 惠而浦 (中国) 投资有限公司;

冷冻离心机: H2100R 型, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

冷冻离心机: GL-10MD 型, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

多功能全波长酶标仪: CLARIOstar 型, 德国 BMG LABTECH 公司;

测色色差计: WSC-S 型, 上海精密科学仪器有限公司;

恒温恒湿培养箱: GNP-9080 型, 上海精宏实验设备有限公司;

正置生物显微镜: ECLIPSE Ci-E 型, 尼康映像仪器销售 (中国) 有限公司;

pH 计: 雷磁 PHSJ-4A 型, 上海精密科学仪器有限公司;

公司;

自动凯氏定氮分析仪:K8400 型,丹麦 FOSS 分析仪器公司。

1.3 样品制备

1.3.1 $P_2Mo_{17}Ni$ 制备 参照文献[21]。

1.3.2 南美白对虾样品 配制 5 mmol/L $P_2Mo_{17}Ni$ 溶液(溶于 DMSO 中),与超纯水贮存于 4 °C 冰箱中。新鲜的南美白对虾浸入冰水使其死亡,将虾分别浸入超纯水(对照组)和 5 mmol/L $P_2Mo_{17}Ni$ 溶液(处理组)中轻轻摇晃 30 min,再均匀分装于无菌自封袋,并于 4 °C 冰箱中贮存。在每个取样日取 9~10 只虾,观察虾的变化,同时测定虾的各项新鲜度指标。

1.4 理化参数测定

1.4.1 紫外可见光谱测定 参照文献[21]。

1.4.2 红外光谱测定 参照文献[21]。

1.4.3 颜色变化测定 参照文献[8, 22]的方法并稍作修改。基于 CIE Lab 值的测量值(L^* 值代表黑白度, a^* 值代表红绿,和 b^* 值代表黄蓝),在虾头胸部中确定颜色位置(见图 1)。 L^* 值表示虾样品的黑白度,其测定范围在 0~100。 L^* 值为 0 时,表示虾样品的颜色为黑色,严重褐变。比较南美白对虾在 4 °C 贮藏过程中表观色泽在亮度、红色、黄色上的改变。每天测定 1 次,其中每组虾头颜色的测定需做 6 次平行重复。并且根据式(1)计算总色差。

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}, \quad (1)$$

式中:

ΔE ——总色差;

ΔL ——黑白度差;

Δa ——红绿色值差;

Δb ——黄蓝色差值。

1.4.4 细菌总数测定 培养条件中细菌培养温度为 30 °C,培养时间为 72 h,其他步骤参照 GB 4789.2—2016。

1.4.5 pH 值测定 参照 GB 5009.237—2016 的方法并稍作修改,准确称量 5 g 虾肉,将虾肉用玻璃匀浆器匀浆后,用 45 mL 超纯水洗入离心管中,于振荡器中振荡 20 min 混合均匀,静置 30 min,采用 4 °C、4 000 r/min 离



图 1 虾中测量色差的对应部位

Figure 1 The corresponding parts of shrimp for determining chromatic aberration

心 15 min,测定上清液的 pH 值。

1.4.6 TVB-N 值测定 参照 GB 5009.228—2016 中半微量定氮法并稍作修改,取 2 g 虾肉于 50 mL 离心管中,加入 30 mL 质量浓度为 20 g/L 三氯乙酸,在 15 000 r/min 下均质 2 min 后在 7 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min;取上清液置于 4 °C 环境中,用三氯乙酸定容到 50 mL。从中取 5 mL 样品液于消化管中,用自动凯氏定氮仪测定 TVB-N 值,每组 3 次平行。

1.5 酶动力学分析

根据文献[23—24],研究抑制剂 $P_2Mo_{17}Ni$ 对蘑菇 PPO 的抑制作用、抑制机理和抑制类型。

1.6 感官评价

根据文献[25—27]的分级标准,对虾的感官评价方法修改如下:由 10 名经过感官评价训练的老师和同学根据样品的评价标准(如表 1),对虾的感官特征和整体可接受性进行评估,其中优秀 9~10 分、良好 7~8 分、可接受 5~6 分、差 3~4 分和极差 1~2 分,分数的平均值代表虾的整体感官质量。

1.7 数据处理

试验均设 3~6 次平行,利用 SPSS 17.0 进行数据处理,采用 Duncan 法对不同处理间差异显著性进行统计分析,并进行方差分析。

2 结果与分析

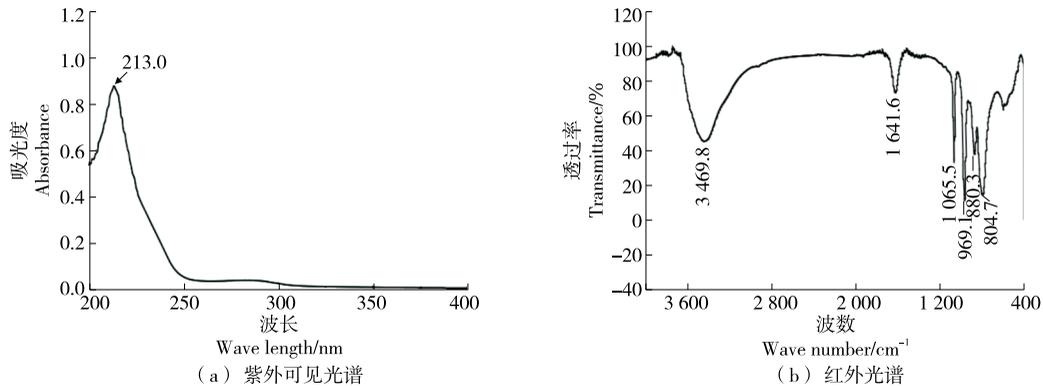
2.1 $P_2Mo_{17}Ni$ 的光谱表征

采用紫外可见光谱和红外光谱分析 $P_2Mo_{17}Ni$ 的基本结构,如图 2 所示。由图 2(a)可知,在 $P_2Mo_{17}Ni$ 的紫

表 1 感官评价分级标准

Table 1 Sensory evaluation grading standards

评价项目	2 分	1 分	0 分
虾体表面	虾体清洁完整,无脱落,无黑头现象	虾体完整,有少数黑头现象	虾体不完整,甲壳和尾巴脱落严重,黑头现象严重
颜色	身体颜色正常,有光泽	颜色稍有变化,光泽较暗	颜色黑暗和沉闷
气味	虾固有香气	有轻微的气味或氨味	有浓烈的氨味和异味
肌肉组织纹理	组织性强,弹性好	组织稍有连接,更灵活	组织松散,触感差
可接受级别	好,可接受	一般和勉强接受	差,不能接受

图2 $P_2Mo_{17}Ni$ 的紫外可见光谱和红外光谱表征Figure 2 Characterization of $P_2Mo_{17}Ni$ by ultraviolet-visible and infrared spectrum

紫外可见光谱中于 213.0 nm 处有一个特征吸收谱带,表现出典型的 POMs 紫外峰,为 $Od \rightarrow Mo$ 的荷移跃迁。由图 2(b)可知,在 3469.8 cm^{-1} 处有 $H-O-H$ 的弯曲振动吸收峰,在 1641.6 cm^{-1} 处有水中 $O-H$ 键的对称和反对称伸缩振动吸收峰,在 $1065.5, 969.1, 880.3, 804.7\text{ cm}^{-1}$ 处存在 Dawson 结构的特征峰,分别表示 $P-O$ (a)、 $Mo-O$ (d)、 $Mo-O$ (b) 和 $Mo-O$ (c) 拉伸振动峰^[28]。 $P_2Mo_{17}Ni$ 的紫外可见光谱和红外光谱特征与 Dawson 型 POMs 的特征谱带一致^[21],表明该化合物已成功合成。

2.2 $P_2Mo_{17}Ni$ 对蘑菇 PPO 的抑制作用

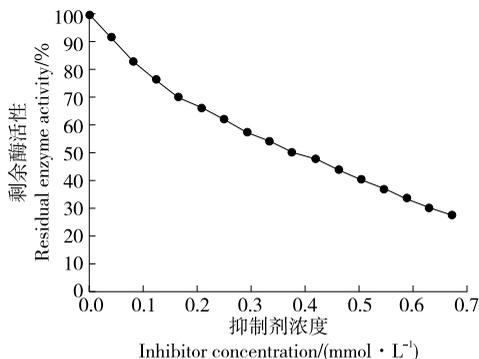
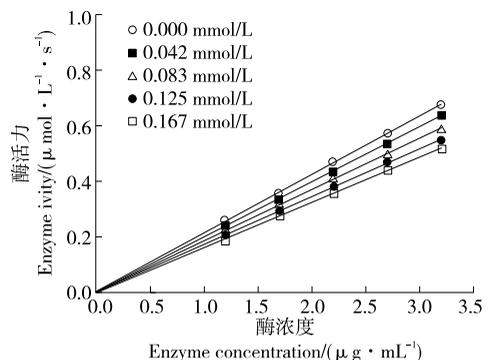
以化合物 $P_2Mo_{17}Ni$ 作为样品,研究其对蘑菇 PPO 催化底物邻苯二酚氧化活力的影响,结果见图 3~图 5。

由图 3 可知,在测活体系中,随着 $P_2Mo_{17}Ni$ 浓度的增加,蘑菇 PPO 的相对酶活力呈下降趋势, $P_2Mo_{17}Ni$ 对蘑菇 PPO 的抑制作用显著。当蘑菇 PPO 的相对酶活力下降到 50% 时, $P_2Mo_{17}Ni$ 的浓度为 $(0.377 \pm 0.004)\text{ mmol/L}$,即 $P_2Mo_{17}Ni$ 对蘑菇 PPO 的半抑制浓度 (IC_{50}) 为 $(0.377 \pm 0.004)\text{ mmol/L}$,这一数值小于李莉莉^[29]测定的 $P_2Mo_{17}Ni$ 对蘑菇酪氨酸酶抑制的 IC_{50} 值 (0.467 mmol/L)。吕艳芳等^[23,30]研究发现曲酸和植酸对

蘑菇 PPO 的 IC_{50} 分别为 $0.7, 4.7\text{ mmol/L}$ 。因此, $P_2Mo_{17}Ni$ 对蘑菇 PPO 的抑制效果比曲酸和植酸的强。

由图 4 可知,在测活体系中,保持底物浓度不变,在不同浓度 $P_2Mo_{17}Ni$ 下,蘑菇 PPO 活性与酶浓度之间的关系曲线均通过原点,且随 $P_2Mo_{17}Ni$ 浓度的增加,关系曲线的斜率随 $P_2Mo_{17}Ni$ 浓度的升高而减小,且在相同体系情况下,随着 $P_2Mo_{17}Ni$ 浓度增加可导致蘑菇 PPO 活性的降低,表明 $P_2Mo_{17}Ni$ 对蘑菇 PPO 的抑制机理属于可逆性抑制^[31]。

在可逆抑制中,根据抑制剂的结合位点不同可以分为竞争型、非竞争型、混合型和非竞争型抑制类型^[32]。可以通过 Lineweaver-Burk 图来确定 $P_2Mo_{17}Ni$ 对 PPO 活性的抑制类型。由图 5 可知,在测活体系中,保持蘑菇 PPO 浓度不变,改变底物的浓度,测定不同浓度的 $P_2Mo_{17}Ni$ 存在的条件下,蘑菇 PPO 活力的变化。 $P_2Mo_{17}Ni$ 对蘑菇 PPO 抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图,得到的一组曲线均与纵坐标轴 (y 轴) 相交于一点,且随 $P_2Mo_{17}Ni$ 浓度的增加,关系曲线的斜率 K_m 值增大,表现酶对底物的亲和力下降,抑制剂的存在阻碍了底物和酶的结合^[33]。而酶反应的最大反应速度 V_{max} 保持

图3 $P_2Mo_{17}Ni$ 对蘑菇 PPO 的抑制作用Figure 3 Inhibitory effects of $P_2Mo_{17}Ni$ on the activity of mushroom PPO *in vitro*图4 $P_2Mo_{17}Ni$ 对蘑菇 PPO 的抑制机理Figure 4 Inhibitory mechanism of $P_2Mo_{17}Ni$ on the activity of mushroom PPO *in vitro*

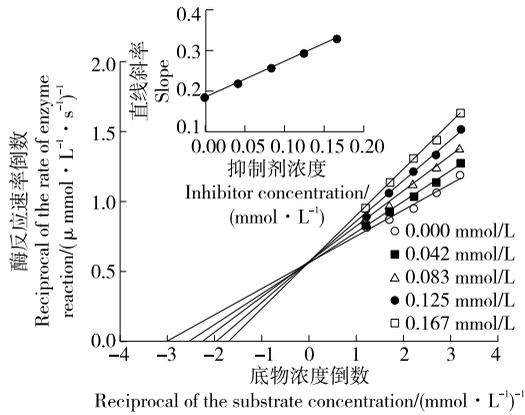


图 5 $P_2Mo_{17}Ni$ 对蘑菇 PPO 的抑制类型

Figure 5 Inhibitory type of $P_2Mo_{17}Ni$ on the activity of mushroom PPO *in vitro*

不变,表明 $P_2Mo_{17}Ni$ 对蘑菇 PPO 的抑制类型属于竞争型抑制^[32-33]。以不同浓度 $P_2Mo_{17}Ni$ 下测定的 K_m 值对 $P_2Mo_{17}Ni$ 浓度进行二次作图,得到一条直线(图 5 内插图)。通过求该直线的斜率可以获得 $P_2Mo_{17}Ni$ 对蘑菇 PPO 的抑制常数(K_i)^[32-33],其值为 0.185 mmol/L。

2.3 $P_2Mo_{17}Ni$ 在南美白对虾贮藏中的应用

2.3.1 感官评分的变化 由图 6 可知,在 4 °C 贮藏条件下,随着贮藏时间的延长,对照组与处理组对虾感官评分均下降但处理组整体感官评分高于对照组。处理组比对照组对虾的虾头变红色、虾肉变松软的速度缓慢,且氨味变化轻微。

对虾死亡后,体内 PPO 等多酚氧化酶被激活,在有氧条件下易发生酶促褐变反应,且由于微生物与酶的共同作用,虾体内的蛋白质、氨基酸以及一些含氮物质会分解变成氨、硫化氢等物质,散发出难闻的气味,因此对虾的感官质量会随贮藏时间的延长而逐渐下降。但 $P_2Mo_{17}Ni$ 能够抑制对虾体内 PPO 的活性,抑制酶促褐变而保持南美白对虾的感官质量,在一定程度上延长南美白对虾的保质期。

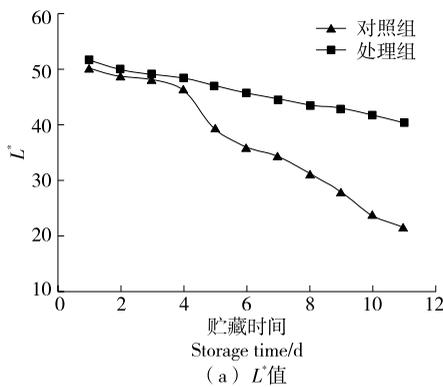


图 7 南美白对虾在 4 °C 贮藏条件下 L^* 值和 ΔE 值随时间的变化趋势

Figure 7 Changes of L^* value and ΔE value from *L. vannamei* with time at 4 °C storage

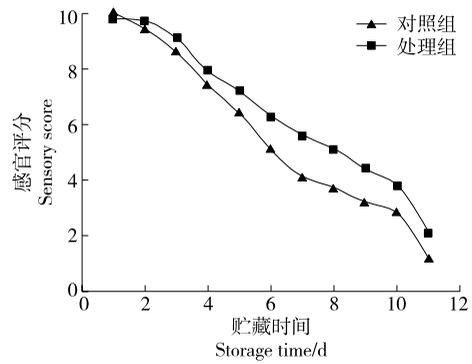


图 6 南美白对虾感官评分随时间的变化

Figure 6 Changes of sensory score from *L. vannamei* with time at 4 °C storage

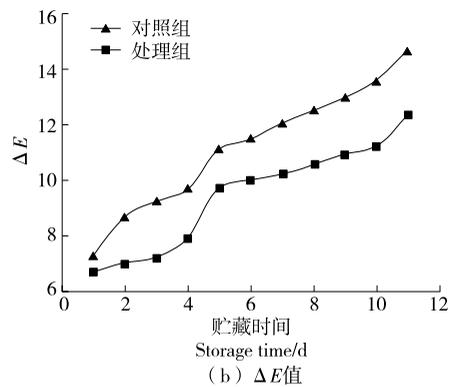
2.3.2 色差的变化 由图 7(a)可知,对照组和 $P_2Mo_{17}Ni$ 处理组的 L^* 值均随贮藏时间的增加而逐渐下降,其中 $P_2Mo_{17}Ni$ 处理组的 L^* 值整体高于对照组的。在贮藏的 1~4 d 时,处理组与对照组的 L^* 值差别不显著,从第 5 天开始两组的 L^* 值出现显著差异。未处理的 L^* 值显著低于对照组的($P < 0.05, n = 6$)。

由图 7(b)可知, $P_2Mo_{17}Ni$ 处理组与对照组的 ΔE 值均随着贮藏时间的增加而显著增加。处理组的 ΔE 值显著低于对照组的($P < 0.05, n = 6$),该结果与周雅琪^[8]的研究结果相似,可能是由于 $P_2Mo_{17}Ni$ 通过抑制虾头内 PPO 的活性而抑制了黑色素的生物合成而发挥的作用。

综上, $P_2Mo_{17}Ni$ 处理可以延缓虾的颜色变化,使虾保持良好的感官品质。

2.3.3 菌落总数的变化 由文献[34]可知,当菌落总数 $\leq 10^5$ CFU/g 时,虾类产品被认为处于一级新鲜度;当菌落总数 $\leq 5 \times 10^5$ CFU/g 时,虾类产品被认为处于二级新鲜度;当菌群总数 $\geq 10^6$ CFU/g 时,表明虾体已经腐烂,保质期结束。

由图 8 可知,在相同贮藏时间条件下处理组的菌落总数始终低于对照组的。对照组虾的菌落总数在贮藏前



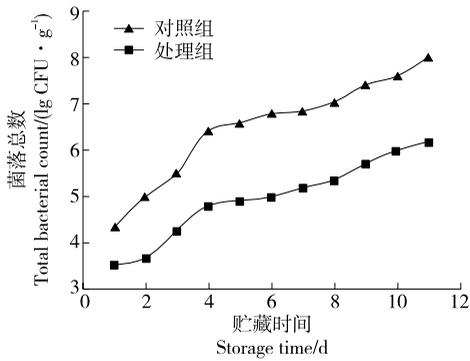


图8 南美白对虾在4 °C贮藏条件下菌落总数随时间的变化趋势

Figure 8 Changes of the total bacterial count from *L. vannamei* with time at 4 °C storage

期(第1~3天)增加较快,贮藏中后期增加缓慢;贮藏第3天,对照组虾的菌落总数达5.48 lg(CFU/g),未达到二级新鲜度,因此对照组的虾货架期仅为3 d^[8]。而处理组的菌落总数在贮藏第1~2天时细菌繁殖增长缓慢,但在贮藏第2~3天时,虾的菌落总数显著增加,此后虾的菌落总数缓慢增长直到贮藏第7天时菌落总数达到5.16 lg(CFU/g),相比较于对照组的菌落总数,处理组的货架期延长了4 d。综上, $P_2Mo_{17}Ni$ 能够通过抑制微生物的生长和繁殖延缓南美白对虾的腐败从而延长虾的保质期。

2.3.4 pH值的变化 由图9可知,对照组和处理组的pH值均在贮藏第1天时最小,之后随贮藏时间的延长pH值均增加,但处理组的pH值始终整体低于对照组的($P < 0.05, n = 3$)。对照组的pH值在贮藏第5天时达7.69,超过了限定值7.6,表明虾已完全发生腐败变质^[35]。而处理组的pH值在贮藏第10天才达到7.64。

新鲜虾肌肉组织的pH值通常保持在7.0~7.2^[36]。对照组和处理组的pH值在贮藏第1天时低于7.0,这可

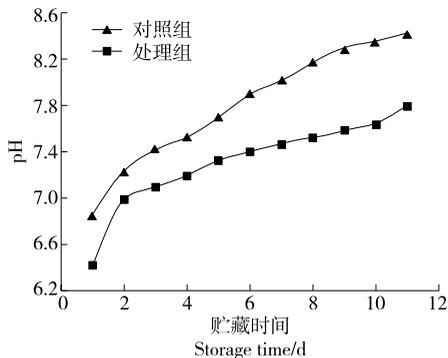


图9 南美白对虾在4 °C贮藏条件下pH值随时间的变化趋势

Figure 9 Changes of pH from *L. vannamei* with time at 4 °C storage

能是由于在运输、加工以及保藏过程中,虾肉中的代谢过程也会发生改变,肌糖剧烈分解,乳酸和磷酸逐渐凝聚,从而使肉的pH值下降,这一过程称为排酸;此后随放置时间变长,肉表面的细菌开始繁殖产生的胺类碱性物质又会使肌肉中的pH值上升,这一阶段的虾肉已经变成了次鲜肉;当细菌继续大量繁殖,虾体内的胺类物质继续产生,肌肉的pH值进一步上升,肉彻底腐败^[36-37]。处理组的pH值显著低于对照组的,说明 $P_2Mo_{17}Ni$ 可以延缓南美白对虾在贮藏过程中的腐败变质,抑制pH值的上升,使其货架期延长4~5 d。

2.3.5 TVB-N值的变化 一般鲜虾中的TVB-N值应低于30.00 mg/100 g^[38]。由图10可知,在贮藏过程中,处理组的TVB-N值始终显著低于对照组的($P < 0.05, n = 3$)。对照组的TVB-N值在贮藏第6天时达(30.78 ± 1.23) mg/100 g,该值已经超过可食用阈值,说明虾接近腐败^[39];而在贮藏第11天时,处理组虾才接近腐败,其TVB-N值为(31.42 ± 3.69) mg/100 g。综上, $P_2Mo_{17}Ni$ 可以有效延缓南美白对虾的腐败进程,并使其货架期延长4~5 d。

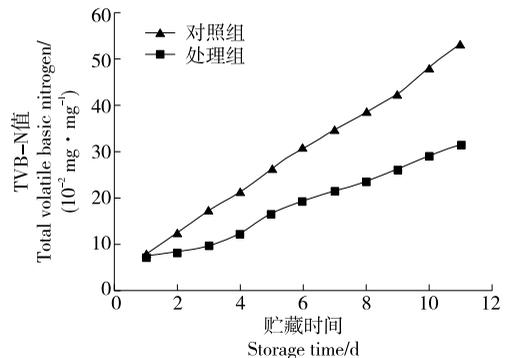


图10 南美白对虾在4 °C贮藏条件下TVB-N值随时间的变化趋势

Figure 10 Changes of TVB-N from *L. vannamei* with time at 4 °C storage

3 结论

过渡金属镍取代的2:18型磷钼酸($P_2Mo_{17}Ni$)对体外蘑菇多酚氧化酶的活性有抑制作用,IC₅₀值为0.377 mmol/L。 $P_2Mo_{17}Ni$ 属于对体外蘑菇多酚氧化酶的可逆竞争型抑制剂,抑制常数 K_1 为0.185 mmol/L。

在4 °C冷藏条件下,与空白组相比, $P_2Mo_{17}Ni$ 处理组对虾的感官指标、 L^* 值和 ΔE 值的变化明显减缓,菌落总数、pH值和TVB-N值的增加均受到显著抑制,说明 $P_2Mo_{17}Ni$ 能有效延缓南美白对虾的黑变和腐败变质,使南美白对虾的货架期延长4~5 d。

人工合成的、过渡金属取代的Dawson型磷钼酸 $P_2Mo_{17}Ni$ 不同于从天然产物中纯化的多酚氧化酶活性

抑制剂,该抑制剂高效易获得,且不容易失活、性质稳定。有关 $P_2Mo_{17}Ni$ 的后续研究将从以下几个方面展开: $P_2Mo_{17}Ni$ 对南美白对虾体内多酚氧化酶活性的抑制作用, $P_2Mo_{17}Ni$ 抑制南美白对虾黑变的剂量效应, $P_2Mo_{17}Ni$ 抑制南美白对虾黑变的分子机制, $P_2Mo_{17}Ni$ 与其他保鲜剂在水产品保鲜上的协同作用,以及 $P_2Mo_{17}Ni$ 作为食品保鲜剂的安全性及其安全剂量范围。

参考文献

[1] 郭美娟, 柴春祥, 鲁晓翔, 等. 南美白对虾腐败过程中挥发性成分的测定[J]. 食品与机械, 2013, 29(4): 153-156, 165.
GUO M J, CHAI C X, LU X X, et al. Determination of volatile components of *Penaeus vannamei* during spoilage [J]. Food & Machinery, 2013, 29(4): 153-156, 165.

[2] ZHU Y J, QIU L, ZHOU J J, et al. Inhibitory effects of hinokitiol on tyrosinase activity and melanin biosynthesis and its antimicrobial activities[J]. Journal of Enzyme Inhibition & Medicinal Chemistry, 2010, 25(6): 798-803.

[3] 赵美娟. Keggin 型多金属氧酸盐和两种食品添加剂对酪氨酸酶的抑制作用研究[D]. 厦门: 集美大学, 2021: 1-2.
ZHAO M J. The inhibitory effects of Keggin-type polyoxometalates and two food additives on tyrosinase[D]. Xiamen: Jimei University, 2021: 1-2.

[4] YANG Y F, LAI X Y, LAI G Y, et al. Purification and characterization of a tyrosinase inhibitor from camellia pollen[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 27: 140-149.

[5] MICILLO R, PISTORIO V, PIZZO E, et al. 2-S-Lipoylcaffeic acid, A natural product-based entry to tyrosinase inhibition via catechol manipulation[J]. Biomimetics, 2017, 2(3): 15.

[6] SONG S C, YOU A, CHEN Z Y, et al. Study on the design, synthesis and structure-activity relationships of new thiosemicarbazone compounds as tyrosinase inhibitors[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2017, 139: 815-825.

[7] 刘蒙娜, 刘媛, 刘书成, 等. 3 种巯基化合物对凡纳滨对虾多酚氧化酶的抑制效果和动力学[J]. 广东海洋大学学报, 2017, 37(3): 67-72.
LIU M N, LIU Y, LIU S C, et al. Inhibitory effects and kinetics of three sulfhydryl compounds on polyphenol oxidase from *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2017, 37(3): 67-72.

[8] 周雅琪. 亚牛磺酸对南美白对虾黑变抑制机理及品质的影响研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021: 34.
ZHOU Y Q. Study on the inhibition mechanism and quality of hypotaurine on the melanosis of *Penaeus vannamei*[J]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021: 34.

[9] 王迪, 王腾腾, 沈卫阳. 多金属氧酸盐抗病毒研究进展[J]. 化学通报, 2021, 84(5): 419-425.
WANG D, WANG T T, SHEN W Y. Research progress of polyoxometalates antiviral [J]. Chemistry Bulletin, 2021, 84(5):

419-425.

[10] 陈祥松, 帅蝶, 姜泽东, 等. $H_6[P_2Mo_{18}O_{62}]$ 的钒取代多金属氧酸盐对小鼠黑色素瘤细胞 B16 黑色素生成的调控及其机制研究[J]. 化学学报, 2022, 80(2): 116-125.
CHEN X S, SHUAI D, JIANG Z D, et al. Study on the regulation and mechanism of the vanadium substituted polyoxometalates of $H_6[P_2Mo_{18}O_{62}]$ on melanogenesis of mouse melanoma cell B16[J]. Acta Chimica Sinica, 2022, 80(2): 116-125.

[11] HU J J, WANG L, WANG F, et al. Molecular docking of polyoxometalates as potential α -glucosidase inhibitors. Journal of Inorganic Biochemistry, 2020, 203: 110914.

[12] 邢蕊. 多酸型酪氨酸酶抑制剂的功能性研究[D]. 厦门: 集美大学, 2016: 63-64.
XING R. Functional study of polyacid tyrosinase inhibitors[D]. Xiamen: Jimei University, 2016: 63-64.

[13] 郑阿萍. Keggin 型多金属氧酸盐的抑酶活性及果蔬保鲜应用[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2018, 33(3): 204-207, 218.
ZHENG A P. Study on the regulation and mechanism of the vanadium substituted polyoxometalates of $H_6 [P_2Mo_{18} O_{62}]$ on melanogenesis of mouse melanoma cell B16[J]. Journal of Inner Mongolia University for Nationalities (Natural Science), 2018, 33(3): 204-207, 218.

[14] 迟国祥, 谢乐芳, 李莉莉, 等. $H_8[P_2Mo_{17}Mn(OH_2)O_{61}]$ 对鲜切苹果的保鲜作用[J]. 中国食品学报, 2019, 19(5): 208-213.
CHI G X, XIE L F, LI L L, et al. The preservation effects of $H_8[P_2Mo_{17}Mn(OH_2)O_{61}]$ on fresh-cut apples [J]. Acta Chimica Sinica, 2022, 80: 116-125.

[15] 迟国祥. α -葡萄糖苷酶抑制剂的功能性研究[D]. 厦门: 集美大学, 2020: 4.
CHI G X. Functional study on α -glucosidase inhibitors [D]. Xiamen: Jimei University, 2020: 4.

[16] 王恩波, 胡长文, 许林. 多酸化学导论[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998: 67-70.
WANG E B, HU C W, XU L. Introduction to polyacidification[M]. Beijing: Chemical Industrial Press, 1998: 67-70.

[17] BLAZEVIC A, ROMPEL A. Theanderson-evans polyoxometalate: from inorganic building blocks via hybrid organic-inorganic structures to tomorrows "Bio-POM"[J]. Coordination Chemistry Reviews, 2016, 307: 42-64.

[18] GENG J, LI M, REN J S, et al. Polyoxometalates as inhibitors of the aggregation of amyloid β -peptides associated with Alzheimer's disease[J]. Angewandte Chemie (International ed. in English), 2011, 50(18): 4 184-4 188.

[19] PU F, WANG E B, JIANG H Y, et al. Identification of polyoxometalates as inhibitors of basic fibroblast growth factor[J]. Molecular BioSystems, 2013, 9(1): 113.

[20] 王安杏, 方向红, 张庆. 多金属氧酸盐抑制酪氨酸酶活性研究进展[J]. 保山学院学报, 2021, 40(5): 35-41.
WANG A X, FANG X H, ZHANG Q. Research progress on

- inhibition of tyrosinase activity by polyoxometalates[J]. Journal of Baoshan University, 2021, 40(5): 35-41.
- [21] 高丽华, 赵月, 赵慧珍, 等. Dawson 结构钼磷过渡元素三元杂多酸稳定性的研究[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 1993(2): 52-56.
- GAO L H, ZHAO Y, ZHAO H Z, et al. Study on the stability of Dawson structured molybdenum-phosphorus transition element ternaryheteropolyacids[J]. Journal of Natural Sciences of Harbin Normal University, 1993(2): 52-56.
- [22] MU H L, CHEN H J, FANG X J, et al. Effect of cinnamaldehyde on melanosis and spoilage of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during storage[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2012, 92(10): 2 177-2 182.
- [23] 吕艳芳, 陈培丽, 李颖畅, 等. 曲酸对蘑菇多酚氧化酶的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2017, 17(4): 30-36.
- LU Y F, CHEN P L, LI Y C, et al. Inhibitory effect of kojic acid on mushroom polyphenol oxidases[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(4): 30-36.
- [24] BUCKOW R, WEISS U, KNORR D. Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10: 441-448.
- [25] JEYASEKARAN G, GANESAN P, ANANDARAJ R, et al. Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) stored in dry ice[J]. Food microbiology, 2006, 23(6): 526-533.
- [26] AZAM K, ALAM S M N, NAHER S S. Quality Assessment of farmed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in supply chain: organoleptic evaluation [J]. Journal of Food Processing & Preservation, 2010, 34: 164.
- [27] ZAMORA-MÉNDEZ S, ROBLES-RPMO A, MARIN-PERALTA E, et al. Postmortem metabolic, physicochemical, and lipid composition changes in *Litopenaeus vannamei* in response to harvest procedures[J]. Taylor & Francis, 2017, 26(9): 1 093.
- [28] ZHANG S W, LI Y X, LIU Y, et al. Synthesis and characterization of B-type Anderson polyoxoanions supported copper complexes with mixed ligands[J]. Journal of Molecular Structure, 2008, 920(1): 284-288.
- [29] 李莉莉. Dawson 型磷钼酸作为酪氨酸酶抑制剂的功能性研究[D]. 厦门: 集美大学, 2017: 4.
- LI L L. Functionality study of Dawson type phosphomolybdic as tyrosinase inhibitors[D]. Xiamen: Jimei University, 2017: 4.
- [30] 吕艳芳, 迟乾苏, 徐芳, 等. 植酸对多酚氧化酶的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2016, 16(5): 82-88.
- LU Y F, CHI Q S, XU F, et al. Inhibition effect of phytic acid against polyphenol oxidase[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science & Technology, 2016, 16(5): 82-88.
- [31] CUI Y, LIANG G, HU Y H, et al. Alpha-substituted derivatives of cinnamaldehyde as tyrosinase inhibitors: inhibitory mechanism and molecular analysis[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(2): 716-722.
- [32] 徐海宁. 半胱氨酸美拉德反应产物抑制酪氨酸酶促褐变的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017: 56.
- XU H N. Inhibition of tyrosine-induced Browning by cysteine Maillard reaction products [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017: 56.
- [33] 张春乐. 抑制剂对蘑菇酪氨酸酶的抑制效应及抗菌活性[D]. 厦门: 厦门大学, 2007: 78.
- ZHANG C L. Effects of inhibitors on mushroom tyrosinase and their antibacterial activity [D]. Xiamen: Xiamen University, 2007: 78.
- [34] LALITHA K V, SURENDRAN P K. Microbiological changes in farm reared freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) in ice[J]. Food Control, 2005, 17(10): 802-807.
- [35] WU S. Effect of chitosan-based edible coating on preservation of white shrimp during partially frozen storage [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 65: 325-328.
- [36] MÚGICA B, BARROS-VELÁZQUEZ J, MIRANDA J M, et al. Evaluation of a slurry ice system for the commercialization of ray (*Raja clavata*): Effects on spoilage mechanisms directly affecting quality loss and shelf-life[J]. LWT-Food Science & Technology, 2007, 41(6): 974-981.
- [37] NIRMAL N P, BENJAKUL S. Melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(9): 3 578-3 586.
- [38] WANG Y, LIU L, ZHOU J, et al. Effect of chitosan nanoparticle coatings on the quality changes of postharvest white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, during storage at 4 °C [J]. Food & Bioprocess Technology, 2015, 8(4): 907-915.
- [39] 熊青, 谢晶, 高志立, 等. 不同生物保鲜剂对冷藏南美白对虾的保鲜效果[J]. 食品工业科技, 2014, 35(1): 270-274.
- XIONG Q, XIE J, GAO Z L, et al. Preservation effects of different biological preservatives on frozen South American white shrimp [J]. Food Industry Science & Technology, 2014, 35(1): 270-274.

(上接第 54 页)

- [14] 刘芳, 张亦红, 周焕英, 等. 离子色谱法测定鲜牛奶中硫氰酸根的不确定度评估[J]. 解放军预防医学杂志, 2013, 31(6): 511-513.
- LIU F, ZHANG Y H, ZHOU H Y, et al. Evaluation of uncertainty in determination of thiocyanate in milk by ion chromatography[J]. Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army, 2013, 31(6): 511-513.
- [15] 韩梦莎, 田佳鑫, 杜英伟, 等. 电感耦合等离子体质谱测定白酒中铅及其不确定度评定[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(6): 247-252.
- HAN M S, TIAN J X, DU Y W, et al. Evaluation of uncertainty in determination of lead in Baijiu by inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(6): 247-252.