

淡水鱼肌肉中酸性磷酸酶的酶学特性*

王彩霞 刘 茹 刘友明 陈加平 熊善柏**

华中农业大学食品科学技术学院/湖北省水产品加工工程技术研究中心, 武汉 430070

摘要 以草鱼、鲢鱼、鳙鱼为原料,从 3 种淡水鱼肌肉中提取酸性磷酸酶(ACP),对粗酶液的酶学特性进行了研究。结果表明:草鱼、鲢鱼和鳙鱼肌肉中 ACP 适宜反应 pH 值分别为 5.0、5.8 和 5.6,适宜反应温度分别为 60、37、43 ℃;草鱼、鳙鱼肌肉中 ACP 在 pH 值为 5~9 条件下较稳定,鲢鱼肌肉 ACP 在 pH 值为 5~8 条件下较稳定;Na⁺、K⁺、Mg²⁺ 对酶活性影响不大,而 Zn²⁺ 对 ACP 有激活作用,Cu²⁺、Ca²⁺、Hg²⁺ 对酶活性有抑制作用;半胱氨酸、磷酸钠、焦磷酸钠对鱼肉 ACP 酶活性有较好的抑制效果。

关键词 淡水鱼; 肌肉; 酸性磷酸酶; 酶活性

中图分类号 TS 254.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0518-04

磷酸酶存在于各种生物组织中,对大量的磷酸单酯化合物中的磷酸单酯键均有水解活性^[1-3]。根据最适 pH 值的不同,可分为碱性磷酸酶和酸性磷酸酶^[4]。鱼被宰杀后,鱼肉中的三磷酸腺苷(ATP)经过降解生成肌苷酸(IMP)。IMP 是对鱼肉鲜味贡献最大的物质,但是在 5'-核苷酸酶、碱性磷酸酶(ALP)和酸性磷酸酶(ACP)作用下会被进一步降解为肌苷(HxR)和次黄嘌呤(Hx)^[4-5]。随着 IMP 的降解及 HxR 和 Hx 的逐渐积累,鱼肉鲜味下降、风味变差^[5]。若在 IMP 降解前能有效抑制磷酸酶的活性,将会较好地保留鱼肉的鲜味。国内外有关磷酸酶的研究主要集中在核酸、毒物学以及医学等方面,对肉制品 IMP 的降解作用研究较少,尚未有通过控制磷酸酶的活性来抑制淡水鱼肌肉 IMP 降解的相关报道^[4,6]。

随着我国经济的发展,人们对淡水鱼的消费已逐渐从鲜活形式转向生鲜形式,但淡水鱼宰杀后如果处理不及时或不当,其鲜度会迅速下降。笔者以草鱼、鲢鱼、鳙鱼为原料,提取它们肌肉中酸性磷酸酶,研究其酶学特性,同时探寻抑制酸性磷酸酶活性的有效措施,旨在为开发出生鲜水产品鲜味抑制剂提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试草鱼、鳙鱼购于湖北省武汉市华中农业大学菜场,鲢鱼由湖北省洪湖市德炎水产食品有限公司提供;草鱼、鲢鱼每尾质量在 1.0~1.5 kg 之间,鳙鱼每尾 50~70 g,鱼体健康。牛血清白蛋白为 Sigma 公司产品;三羟甲基氨基甲烷(Tris)为 BBI 产品;磷酸苯二钠、4-氨基安替比林及其余试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

Avanti J-26 型高速冷冻离心机,美国贝克曼公司产品;FJ-200 型高速分散均质机,上海标本模型厂制造;722 型紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司产品;HHS214 型恒温水浴锅,江苏省医疗器械厂生产;818 型 pH 计,美国奥立龙公司产品。

1.3 试验方法

1)酸性磷酸酶的提取。参照陈素丽等^[7]的方法,并作适当修改。分别以草鱼、鲢鱼和鳙鱼肉为提取酶的材料,绞碎后按料液比 1:3 加入 0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液(pH 5.0,含 5 mmol/L 巯基乙醇和 30% 甘油)并匀浆。匀浆后于 4 ℃ 抽

收稿日期:2009-05-15; 修回日期:2009-06-22

* 现代农业产业技术体系建设专项资金(NYCYTX-49-23)和国家科技支撑计划项目(2006BAD30B01)资助

** 通讯作者。E-mail: xionsgb@mail.hzau.edu.cn

王彩霞,女,1983 年生,硕士研究生。研究方向:水产品加工与保鲜技术。E-mail: caixiaxinling@163.com

提 4 h,离心(12 000 r/min,4 ℃,20 min)后取上清液(即粗酶液)。

2)酶活性的测定。采用磷酸苯二钠为底物的金氏法^[8],1.0 mL 的 0.2 mol/L 的柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0),加入 1.0 mL 的 0.02 mol/L 的碳酸苯二钠,37 ℃ 预热 5 min,然后加入 0.1 mL 的稀释酶液,混匀后于 37 ℃ 保温 1 h,再加入 2.0 mL 的碱性溶液和 3.0 mL 的铁氰化钾,最后在 510 nm 的波长下测定吸光值。酶活定义为在该条件下每分钟产生 1 μmol 酚所需的酶量为 1 个酶活力单位 U。

3)蛋白质质量浓度的测定。采用 Lowry 等^[9]方法测定蛋白质质量浓度,以牛血清白蛋白为标准样品。

4)数据处理。每组试验重复 3 次,每次试验做 3 次平行,所有数据采用 Excel 及其相关方法进行处理和分析。

2 结果与分析

2.1 pH 值对淡水鱼肌肉 ACP 活性的影响

参照唐云明^[10]的方法,将从草鱼、鲃鱼和鳊鱼肌肉中提取的 ACP 粗酶液 0.1 mL,分别加到 pH 值为 3.0~6.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中,于 37 ℃ 测定其酶活性,结果见图 1。从图 1 可知,草鱼、鲃鱼、鳊鱼肌肉中 ACP 的适宜反应 pH 值不同,分别为 5.0、5.8、5.6。当 pH<3.8 或 pH>6.6 时 3 种淡水鱼肌肉 ACP 酶活性明显降低。因此,可以通过调节鱼肉 pH 值来降低酶活性,抑制鱼肉鲜度的下降。

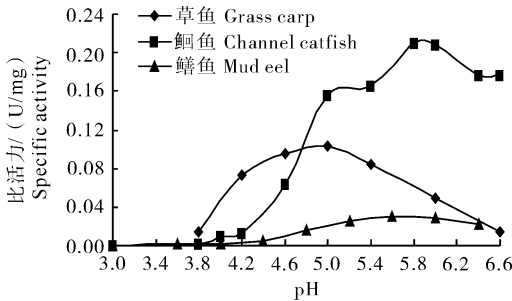


图 1 pH 值对草鱼、鲃鱼和鳊鱼肌肉 ACP 活性的影响
Fig. 1 Effects of pH value on muscle ACP activity of grass carp, channel catfish and mud eel

2.2 温度对淡水鱼肌肉 ACP 活性的影响

在 3 种淡水鱼肌肉 ACP 各自适宜反应 pH 值下(草鱼、鲃鱼、鳊鱼分别为 pH 5.0、pH 5.8、pH 5.6),分别测定不同温度下 3 种淡水鱼肌肉 ACP 的

酶活力^[10],其结果见图 2。从图 2 可以看出,鲃鱼、鳊鱼肌肉 ACP 的适宜反应温度较低,分别为 37 ℃ 和 43 ℃,而草鱼肌肉 ACP 的适宜反应温度较高,其值为 60 ℃,反应温度超过 75 ℃ 后酶活力完全丧失。

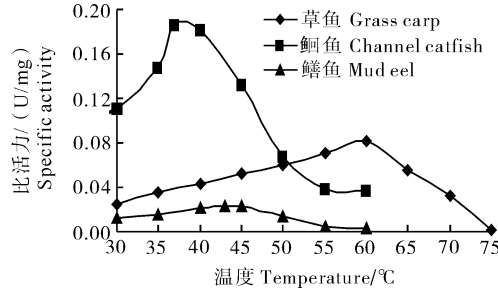


图 2 温度对草鱼、鲃鱼和鳊鱼肌肉 ACP 活性的影响
Fig. 2 Effects of temperature on muscle ACP activity of grass carp, channel catfish and mud eel

2.3 淡水鱼肌肉 ACP 的稳定性范围

将草鱼、鲃鱼和鳊鱼肌肉 ACP 粗酶液各 1.0 mL 分别与 3.0 mL 不同 pH 值的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 3~6)、Tris-HCl 缓冲液(pH 7~9)和碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲液(pH 11)混合,于 4 ℃ 下保温 24 h,然后分别取 0.1 mL 按本文“1.3”中 2)的方法在各自适宜的条件下测定 ACP 酶活力^[11],其结果见图 3。

从图 3 可以看出,不同鱼种,其肌肉 ACP 的 pH 稳定性稍有不同。草鱼、鳊鱼肌肉 ACP 在 pH 值 5~9 条件下稳定,pH 值<5 或 pH>9 酶活力丧失较快;鲃鱼肌肉 ACP 在 pH 值 5~8 条件下稳定,pH<5 或 pH>8 酶活力丧失较快。

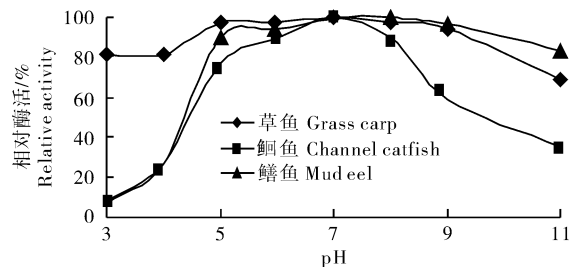


图 3 草鱼、鲃鱼和鳊鱼肌肉 ACP 的 pH 稳定性
Fig. 3 Stability of pH value on muscle ACP from grass carp, channel catfish and mud eel

2.4 金属离子对淡水鱼肌肉 ACP 活性的影响

在不含 Mg²⁺ 的测活体系中,分别在 3 种淡水鱼肌肉 ACP 适宜 pH 值的缓冲溶液中加入不同浓度的金属离子,在适宜温度下反应,以天然酶活力为 100%,测定相对酶活力^[12],其结果见表 1。

表 1 草鱼、鲢鱼和鳙鱼肌肉 ACP 在不同浓度金属离子中的相对酶活性

Table 1 The relative enzyme activity of muscle ACP in different metal ion concentrations

金属离子 Metal ion	浓度/ (mmol/L) Concentration	相对酶活力 Relative enzyme activity/%		
		草鱼 Grass carp	鲢鱼 Channel catfish	鳙鱼 Mud eel
K ⁺	30	101.99±0.35	98.85±2.16	98.97±1.56
Na ⁺	30	100.83±0.38	101.47±1.54	96.03±0.20
Ca ²⁺	5	65.21±1.23	96.18±0.54	88.18±0.99
Mg ²⁺	5	100.25±0.99	103.38±0.90	94.07±0.59
Zn ²⁺	1	112.38±1.27	116.06±0.27	158.13±2.24
Mn ²⁺	1	105.11±4.76	100.89±0.48	12.06±0.56
Hg ²⁺	1	7.56±1.04	3.70±0.67	5.42±0.43
Cu ²⁺	1	19.70±0.99	94.55±0.41	9.16±0.70

由表 1 可知 K⁺、Na⁺ 和 Mg²⁺ 对 3 种淡水鱼肌肉 ACP 酶活性影响不大, Cu²⁺、Ca²⁺ 和 Hg²⁺ 对酶活力具有不同程度的抑制作用, 而 Zn²⁺ 对酶活力则有激活作用。因此可以通过在鱼肉中添加微量的 Cu²⁺、Ca²⁺ 来抑制鱼肉鲜度的降解。

2.5 半胱氨酸、磷酸盐对淡水鱼肌肉 ACP 活性的影响

分别在底物缓冲液中添加半胱氨酸、焦磷酸钠、磷酸钠、多聚磷酸钠使其浓度分别达到 1、5、10、30 mmol/L。将草鱼、鲢鱼和鳙鱼肌肉 ACP 粗酶液与上述底物缓冲液保温, 按照正常测活体系测定剩余酶活力, 以天然酶活为 100%, 以不加外源物为空白, 测得不同浓度外源添加物下淡水鱼肌肉 ACP 的相对酶活力如图 4 所示。

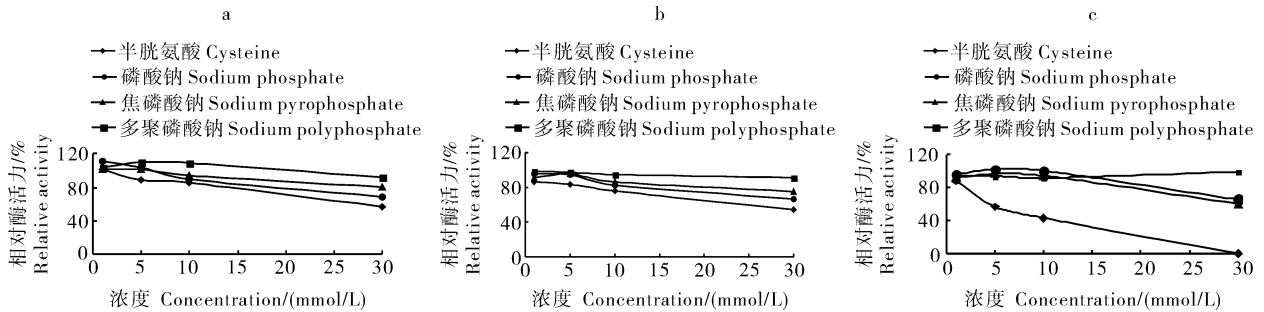


图 4 半胱氨酸、磷酸盐对草鱼(a)、鲢鱼(b)和鳙鱼(c)肌肉 ACP 活性的影响

Fig. 4 Effects of cysteine, phosphate on muscle ACP activity of grass carp(a), channel catfish(b) and mud eel(c)

从图 4 中可以看出, 半胱氨酸、焦磷酸钠、磷酸钠、多聚磷酸钠对 3 种淡水鱼肌肉 ACP 都有不同程度的抑制作用。半胱氨酸的抑制作用最佳, 特别是对鳙鱼肌肉 ACP 有很好的抑制效果。随着浓度的增加, 半胱氨酸的抑制效果有上升的趋势。磷酸钠、焦磷酸钠对 3 种淡水鱼肌肉 ACP 的抑制效果差别不大, 但均好于多聚磷酸钠的。在鱼肉中添加食用级的半胱氨酸、磷酸钠、焦磷酸钠均可以有效抑制鱼肉 ACP 的酶活, 且磷酸盐还是一种肉制品水分保持剂。

3 讨论

淡水鱼肌肉中 ACP 的活性, 直接影响到 IMP 的降解速度^[2]。3 种淡水鱼中, 鲢鱼肌肉 ACP 活性最强, 表明在贮藏过程中若不采取有效的控制措施, 鲢鱼肌肉的鲜度下降最快, 鱼肉最易腐败。ACP 的酶学特性因物种不同而异, 试验结果表明, 草鱼、鲢鱼、鳙鱼肌肉 ACP 的适宜反应 pH 值分别为 5.0、5.8 和 5.6, 适宜反应温度分别为 60、37、43 °C。而

长毛对虾^[7]的最适反应 pH 值为 4.5, 最适反应温度为 40 °C。这与淡水鱼的生长环境及鱼肉本身的 pH 有关, 鱼肉本身为中性偏酸。对草鱼、鲢鱼、鳙鱼肌肉 ACP 的 pH 稳定性研究结果表明, 3 种淡水鱼在 pH 5~8 条件下稳定, pH < 5 或 pH > 9 酶活力下降较快, 因此, 可以通过添加食醋等酸性物质调节鱼肉的 pH 来抑制 ACP 的酶活性。

从不同金属离子对淡水鱼肌肉 ACP 活力的影响来看, K⁺、Na⁺、Mg²⁺ 对酶活力影响不大, Ca²⁺、Cu²⁺、Hg²⁺ 对酶促反应有一定程度的抑制作用, 这与文献^[7]的结果一致。Zn²⁺ 对酶促反应有一定的激活作用, 这与 Zn²⁺ 对工蜂 ACP 有较强的激活作用^[13]结果相一致, 而陆珊^[14]研究表明, Zn²⁺ 对麦芽 ACP 有较强的抑制作用, 可见不同种类动植物的 ACP 的激活机制并不完全相同。基于人体健康的考虑, 抑制鱼肉 ACP 活性要选择含钙、铜元素丰富且含锌元素较少的食物。

洪燕飞等^[15]研究表明, 巯基化合物能有效地抑制鲍鱼碱性磷酸酶活力, 但是很多巯基化合物对人

体都有毒副作用。笔者采用无毒的半胱氨酸来抑制淡水鱼肌肉 ACP 酶活性,表明抑制效果较好。磷酸盐作为品质改良剂和水分保持剂,是肉制品加工中常用的食品添加剂。试验结果表明磷酸钠在高浓度时对淡水鱼肌肉 ACP 的抑制作用最好,其次是焦磷酸钠,多聚磷酸钠抑制效果最差。因此,为抑制淡水鱼肌肉 ACP 的活性,较多地保留鲜味物质 IMP,可以在鱼肉中添加食醋、半胱氨酸、焦磷酸钠、磷酸钠及含钙、铜元素较多的物质。

参 考 文 献

- [1] 陈素丽,陈清西,杨佩真,等.长毛对虾磷酸酯酶的研究[J].中山大学学报:自然科学版,2000,39:135-140.
- [2] 陈昌福,姚娟,陈萱等.免疫多糖对南美白对虾免疫相关酶的激活作用[J].华中农业大学学报,2004,23(5):551-554.
- [3] 黄宇,张海伟,徐芳森.植物酸性磷酸酶的研究进展[J].华中农业大学学报,2008,27(1):148-154.
- [4] 吕东坡,朱仁俊.肌苷酸的研究现状及展望[J].肉类研究,2007(11):12-15.
- [5] 熊善柏.水产品保鲜储运与检验[M].北京:化学工业出版社,2007:36-65.
- [6] 陈定福.长吻鮠碱性磷酸酶的动力学研究[J].水生生物学报,1995,19(4):338-343.
- [7] 陈素丽,陈清西,胡天惠,等.长毛对虾酸性磷酸酶的纯化与性质[J].厦门大学学报:自然科学版,1997,36(1):121-125.
- [8] 崔福生.医学生化检验手册[M].天津:天津科学技术出版社,1981:268-272.
- [9] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, RANDALL R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-269.
- [10] 唐云明.泥鳅碱性磷酸酶的分离纯化及部分性质[J].水产学报,1997,21(3):336-339.
- [11] 张继平,林建成,谢进金,等.草鱼碱性磷酸酶的分离纯化与部分性质研究[J].厦门大学学报:自然科学版,2005,44(5):684-687.
- [12] 张洪渊,刘克武,龚由彬,等.金属离子和腮对背角无齿蚌碱性磷酸酶的影响[J].四川大学学报:自然科学版,1996,33(1):100-104.
- [13] 江琰.工蜂酸性磷酸酶的分离纯化及性质研究[D].成都:四川大学生命科学学院,2003.
- [14] 陆珊.麦芽酸性磷酸酶的部分性质研究[D].成都:四川大学生命科学学院,2006.
- [15] 洪燕飞,廖金花.巯基化合物和磷酸盐及其类似物对鲍鱼碱性磷酸酶的抑制作用[J].厦门大学学报:自然科学版,2004,43:16-19.

Enzymatic Characteristics of Acid Phosphatase in Muscle of Freshwater Fish

WANG Cai-xia LIU Ru LIU You-ming CHEN Jia-ping XIONG Shan-bai

*College of Food Science and Technology/Aquatic Products Engineering and Technology
Research Center of Hubei Province, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract The acid phosphatase(ACP) from grass carp, channel catfish and mud eel muscles were extracted and partial properties of the crude enzyme were investigated. The results showed that the optimal pH values of ACP of grass carp, channel catfish and mud eel muscle were 5.0, 5.8 and 5.6, respectively. The optimal temperatures were 60 °C, 37 °C and 43 °C, respectively. ACP of grass carp and mud eel muscle were stable in the pH range of 5-9, while ACP of channel catfish was in the pH range of 5-8. Na^+ , K^+ , Mg^{2+} have no effect on the enzymes, whereas ACP activity was stimulated by Zn^{2+} and inhibited by Cu^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} . ACP activity was also inhibited by cystine, sodium phosphate, sodium pyrophosphate.

Key words freshwater fish; muscle; acid phosphatase; enzyme activity