

文章编号:1000-0615(2008)06-0957-08

鳙中焦磷酸盐水解酶的初步研究

高瑞昌¹, 袁丽¹, 于刚², 冯慧³, 薛勇³, 李兆杰³, 薛长湖³

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

3. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 采用离子色谱方法检测添加的焦磷酸四钠(TSPP)在新鲜碎鳙鱼肉中所发生的水解过程, 并研究了焦磷酸盐水解酶(PPase)粗酶的特性。研究结果表明, 添加到新鲜碎鳙鱼肉中的 TSPP 能被水解为单磷酸(Pi); 鳙鱼肉中存在 PPase, 并且是水溶性蛋白。PPase 粗酶水解 TSPP 的最适温度为 50 °C, 最适 pH 为 8.0。Mg²⁺、Mn²⁺ 和 Co²⁺ 均可以激活 PPase, 但是 Mg²⁺ 激活酶能力最强。Mg²⁺ 浓度为 1 mol·L⁻¹ 时, PPase 活性达到了 0.023 μmol·min⁻¹·mg⁻¹, 显著高于其他两种金属离子的激活作用。葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)能够强烈抑制 PPase 活性; EDTA-Na₂ 在浓度小于 1 mol·L⁻¹ 能激活酶, 但浓度大于 1 mol·L⁻¹ 时却能够强烈抑制 PPase 活性。

关键词: 鳙; 焦磷酸盐水解; 焦磷酸盐水解酶

中图分类号: S 986

文献标识码: A

在水产品加工和肉类工业中无机磷酸盐作为肉与肉制品品质改良剂已被广泛应用。焦磷酸盐是所有磷酸盐添加剂中作用效果最显著的磷酸盐^[1], 焦磷酸盐不仅可以调高肌肉的 pH, 还可以解离肌动球蛋白生成肌球蛋白和肌动蛋白^[2-3]。其机理可能是焦磷酸盐可以和肌肉结构蛋白相互作用, 即焦磷酸盐能够解离肌动球蛋白。常使用的焦磷酸盐种类包括焦磷酸四钠、焦磷酸二氢二钠、焦磷酸亚铁和焦磷酸四钾等。有报道焦磷酸盐在添加到肌肉中后会发生酶解和非酶水解, 降低了其功能特性^[4]。无机焦磷酸盐水解酶(PPase; EC 3. 6. 1. 1)专一催化无机焦磷酸盐水解成单磷酸盐, 是生命活动中必需的酶, 广泛存在于生物器官的组织液中^[5]。但是, 目前对于肉类中焦磷酸盐水解酶的研究仅仅局限在焦磷酸水解的表观现象上^[6-7], 并没有对其降解机理进行深入研究, 对于鱼类中的焦磷酸盐水解酶的分离纯化及特性的研究更是未见报道。为了更清楚地理

解焦磷酸盐的作用机理及其科学利用, 研究其在肌肉中的生化变化非常必要, 而这就需要研究其水解酶生化特性。本实验以鳙鱼肉为原料对焦磷酸盐水解酶进行了初步研究, 以期为进一步分离纯化焦磷酸盐水解酶奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

活鳙(*Aristichthys nobilis*)购于青岛水产品市场。

1.2 方法

新鲜碎鳙鱼肉中焦磷酸盐水解的测定 活鱼经宰杀、放血、取背部肌肉搅碎, 平均分取 4 g, 加入 1 mL 6% TSPP, 混匀, 调制成 5 mL, 25 °C 水浴不同时间后, 用 20 mL 6% 的 TCA(三氯乙酸)终止反应, 超声波萃取 6 min, 过滤, 取 1 mL 滤液定容为 100 mL, 调 pH>8, 然后过 0.45 μm 的滤膜, 利用离子色谱测定 TSPP 的残留量, 来观察

收稿日期: 2007-10-21

资助项目: 国家自然科学基金(30671632); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA09Z444); 江苏大学基金项目(08JDG006)

作者简介: 高瑞昌(1976-), 男, 山东薛城人, 讲师, 主要从事水产化学与水产品加工的研究

通讯作者: 薛长湖, Tel: 0532-82032468, E-mail: xuech@ouc.edu.cn

TSPP 水解过程。对照组为鱼肉在加入 1 mL 20% 的 TCA 25 °C 水浴 10 min 后,再加入 STPP 测定水解过程。每个样品均取 3 个平行,以下实验相同。

焦磷酸盐水解酶(PPase)粗酶液的制备

取 100 g 碎鱼肉加入 4 倍体积预冷的 0.05 mol·L⁻¹ KCl-20 mmol·L⁻¹ tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液,在匀浆机上以 8 000 r·min⁻¹ 匀浆,每匀 20 s 静止 20 s,重复 3 次。然后低温冷冻离心,9 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,得到的上清液即为 PPase 粗酶液,置冰箱中备用。

PPase 粗酶的确定 在反应体系中添加不同量的粗酶液和等量底物,反应后测定底物水解程度。粗酶液添加量分别为 0.1、0.3 和 0.5 mL,底物浓度为 1 mmol·L⁻¹ TSPP,用同种缓冲液调整使总反应体系体积为 2 mL。反应温度为 25 °C,反应时间 10 min,用终浓度为 5% 的 TCA 终止反应,然后离心,取 1 mL 上清液,稀释定容至 1 mL,调 pH>8.0,过 0.45 μm 的滤膜,然后利用离子色谱测定残留焦磷酸根(PP_i)和生成的单磷酸根(P_i)摩尔数。以 TCA 变性后的粗酶液为对照。

蛋白浓度的测定 按双缩脲法进行^[8]

1.3 PPase 粗酶特性

温度对鳙 PPase 粗酶活性的影响

1.9 mL 粗酶液加入 0.1 mL 的 20 mmol·L⁻¹ TSPP(pH 7.0),在不同的温度下孵育 10 min,加入 1 mL 10% 的 TCA 终止反应,然后离心,取上清液,稀释定容,调 pH>8.0,过膜,利用离子色谱测定底物和产物的含量,计算酶活性的变化。同时利用离子色谱测定粗酶本身含有的单磷酸的量,以终浓度为 5% 的 TCA 变性后的粗酶液为对照。以每毫克蛋白每分钟水解 1 μmol TSPP 为 1 个活力单位,下同。

pH 对鳙 PPase 粗酶活性的影响

0.2 mL 的粗酶液加到 1.7 mL 的各种 pH 缓冲液中,25 °C 下保温 30 min,再加入 0.1 mL 的 20 mmol·L⁻¹ 的 TSPP(调整为相应的 pH 值),在 25 °C 反应 10 min,以终浓度为 5% 的 TCA 终止反应,然后离心 8 000 rpm 5 min,取上清液,稀释定容,调整 pH>8,利用离子色谱测定酶活性的变化。对照是粗酶溶液先加入终浓度为 5% 的 TCA,25 °C 下孵育 10 min 后再加入 TSPP 测定其水解。

本实验采用的缓冲液为 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸-醋

酸钠 (pH 4.0~6.0),0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 6.0~9.0)及 0.1 mol·L⁻¹ 甘氨酸-氢氧化钠 (pH 9.0~12.0)。

鳙 PPase 粗酶对二价金属离子的选择性

将制备的粗酶液在 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液中低温透析过夜,换两次透析液。取 0.2 mL 的透析后的粗酶溶液加到 1.6 mL 的 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 7.0)的缓冲液中,加入 0.1 mL 的 100 mmol·L⁻¹ 的不同二价金属离子保持 30 min,再加入 0.1 mL 的 20 mmol·L⁻¹ 的 TSPP(pH 7.0),在 25 °C 下孵育 10 min,以终浓度为 5% 的 TCA 终止反应,然后离心 8 000 r·min⁻¹ 5 min,取上清液,稀释定容,调整 pH>8,利用离子色谱测定酶活性的变化,观察 PPase 粗酶对二价金属离子的选择性。

G-6-P 和 EDTA-Na₂ 对鳙 PPase 粗酶的抑制性 取 0.2 mL 的透析后的粗酶溶液加到 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 7.0)的缓冲液中,加入 0.1 mL 的 100 mmol·L⁻¹ 的 Mg²⁺,使其终浓度为 5 mmol·L⁻¹。再加入终浓度分别为 0.5 mmol·L⁻¹、1 mmol·L⁻¹、5 mmol·L⁻¹ 和 7 mmol·L⁻¹ 的 G-6-P 或 EDTA-Na₂,在 25 °C 水浴中孵育 30 min,再加入 0.1 mL 的 20 mmol·L⁻¹ 的 TSPP(pH 7.0),总反应液体积为 2 mL。在 25 °C 反应 10 min,以终浓度为 5% 的 TCA 终止反应,然后离心 8 000 r·min⁻¹ 5 min,取上清液,稀释定容,调整 pH>8,利用离子色谱测定酶测定其残留活性。

离子色谱测定条件 仪器型号:戴安 ICS-2000;色谱柱类型:戴安 IonPac AG11 保护柱(4×50 mm)+AS11 分离柱(4×250 mm);检测方式:抑制型电导检测;淋洗液组成:KOH 淋洗液发生器发生 KOH;进样体积:25 μL;洗脱条件参考 Ruichang 等^[9]的方法。

2 结果

2.1 TSPP 在新鲜碎鱼肉中的水解

TSPP 的纯度和稳定性 实验所使用 TSPP 的离子色谱图如图 1 所示。由图可以看出试剂本身除 PP_i 外,还含有少量的 P_i。焦磷酸盐的纯度达到 99.53%。P_i 的保留时间为 8.40 min,PP_i 的保留时间为 11.04 min,回收率为 99.5%~104.2%。

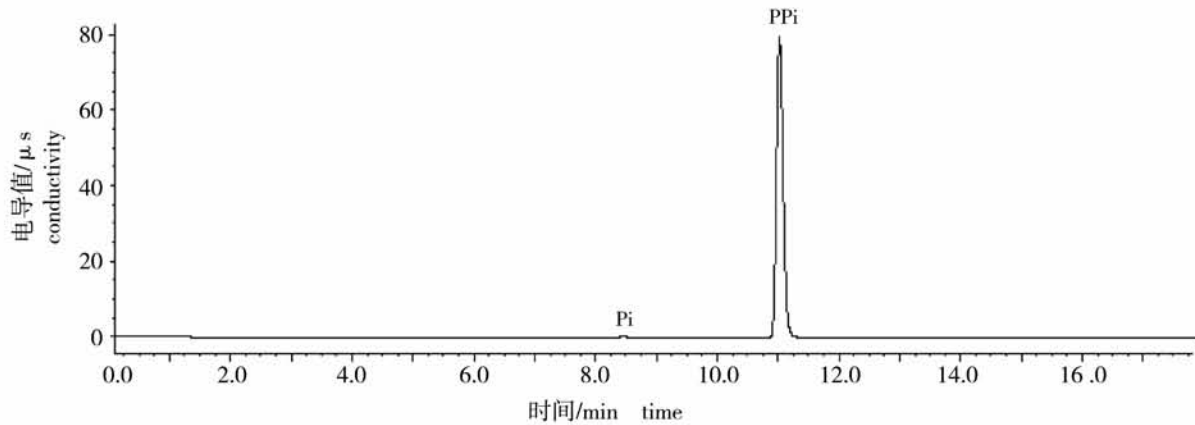


图1 TSPP 离子色谱图

Fig. 1 Chromatogram of sodium pyrophosphate

表1 25℃下 TSPP 的稳定性
Tab. 1 The stability of TSPP at 25℃

25℃下放置时间(h) time	0	6	12	36	48
PP 含量(mg) content	24.82 ± 0.09	24.69 ± 0.22	24.60 ± 0.12	24.27 ± 0.08	24.09 ± 0.15

从表1可以看出 TSPP 溶液(pH 9.80)在室温下放置虽然会发生水解,但速度十分缓慢,在配制 48 h 后仅水解了 2.94% ($P > 0.05$)。

TSPP 在新鲜碎鲮鱼肉中的水解 从图 2-a

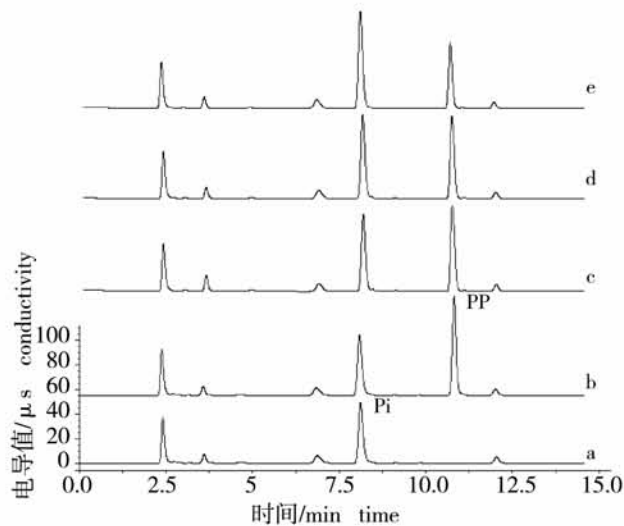


图2 25℃下,TSPP 在新鲜鲮鱼肉中的水解离子色谱图
a. 未加 TSPP 的新鲜鲮鱼肉; b. TSPP 处理 30 min; c. TSPP 处理 60 min; d. TSPP 处理 270 min; e. TSPP 处理 360 min

Fig. 2 Chromatogram of the hydrolysis of TSPP

in the *Aristichthys nobilis* fresh minced meat at 25℃

a. fresh *A. nobilis* minced meat; b. TSPP has been added for 30 min; c. TSPP has been added for 60 min; d. TSPP has been added for 270 min; e. TSPP has been added for 360 min

可以看出,新鲜的鲮鱼肉本身含有较高的单磷酸 70×10^{-6} g,这些单磷酸一是肌浆本身缓冲液成分,二是体内 ATP、ADP 及磷酸肌酸等含磷的高能化合物水解产物。从 b、c、d 和 e 中可以看出,在室温条件下 TSPP 被加到新鲜的碎鲮鱼肉中后,立即发生水解,水解产物为 Pi。添加 0.5 h 后的结果(图 2-b),PPi 有原来的 25.38 mg 降低到 24.59 mg,水解程度为 3.1%,反应 1 h 时(图 2-c)有 5.87% 水解,反应 6 h 时有 36.88% 发生水解。从结果可看出,TSPP 在新鲜碎鲮鱼肉中发生了较大变化,水解速率远远高于在室温下水溶液中的自然水解 ($P < 0.01$),并且对照组肌肉在被 TCA 处理后不具备水解 PPi 的能力,说明鲮鱼肌肉中的确存在焦磷酸盐水解酶 (PPase)^[10]。Belton 等^[6]指出 TSPP 鸡胸肉中的水解速度非常快无 NaCl 时,添加到蛋鸡胸肉中的 TSPP 在 30 min 内完全水解。Li 等^[7]报道,焦磷酸四钠在新鲜鸡胸肉中 1.25 h 内完全水解。样品中添加的 TCA 离子色谱中保留时间为 15.13 min 比较靠后不影响各种磷酸盐的测定,图中不再给出。

2.2 PPase 的确定

在相同的反应时间和底物浓度条件下,随粗酶含量的增加,焦磷酸盐水解量增大,生成的单磷

酸增多(表 2),这进一步表明了鳙鱼体内的确存在焦磷酸盐水解酶。

表 2 粗酶含量对 PP_i 水解的影响
Tab. 2 Effect of the content of crude PPase on the PP hydrolysis

蛋白质含量(mg) protein content	P _i (mmol·L ⁻¹) P _i concentration (测定值-粗酶本身含量)	PP _i (mmol·L ⁻¹) PP _i concentration
control	0.003 ± 0.002	0.986 ± 0.005
1.562 ± 0.008	0.043 ± 0.006	0.0576 ± 0.0008
4.686 ± 0.011	0.1259 ± 0.0070	0.0389 ± 0.0006
7.810 ± 0.015	0.2063 ± 0.0120	0.0289 ± 0.0009

由结果可看出鳙鱼肉的漂洗液具有较强的焦磷酸盐水解酶活性,所以 PPase 应为水溶性蛋白,并且在添加相同量的 TSP 条件下,第一次的漂洗液能在 30 min 内能够将 TSP 完全水解,且第二次与第三次得到的漂洗液的水解能力远低于第一次漂洗液。因此以 0.05 mol·L⁻¹ KCl-20 mmol·L⁻¹ tris-HCl (pH 7.0) 第一次漂洗液为粗酶进行酶活特性的研究。Matsunaga 等^[10] 研究结果认为漂洗后的鲤鱼肉中焦磷酸盐水解含量降低,焦磷酸盐水解酶应存在于可溶性蛋白部分。据报道生物界中的无机焦磷酸盐水解酶主要以两种方式存在,一是可溶性蛋白,另一是膜结合型蛋白^[11-12]。本实验结果表明鳙中的 PPase 应为水溶性的。

2.3 PPase 粗酶特性

最适温度范围 由图 3 可以看出温度对酶的活性有较大的影响,在小于 10 °C 时酶活力非常低,随后随温度升高,酶活力增强,在 50 °C 时达到最强,但是当温度高于 50 °C 时酶活力迅速下降,符合生物蛋白酶对温度的依赖性。结果表明,焦磷酸盐水解酶粗酶的最适温度约为 50 °C 左右,低温下活性较弱,而高温下蛋白质容易变性,导致酶失活。Hamm 和 Nerral^[13] 报道牛肉中的焦磷酸盐水解速度在 40 °C 最高。

最适 pH 范围 由图 4 可以看出反应环境的 pH 对酶活性也有较大的影响。在酸性条件下,酶活性较低,随 pH 值的升高,酶活性增强。在 pH 值为 8.0 左右时,酶活力达到最高,当 pH > 9.0 时酶活性迅速下降。结果表明 PPase 粗酶的最适 pH 在 8.0 左右,稍微偏碱性。

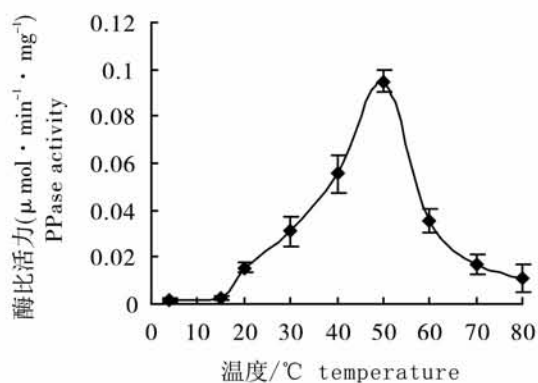


图 3 温度对粗酶活性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the activity of crude PPase

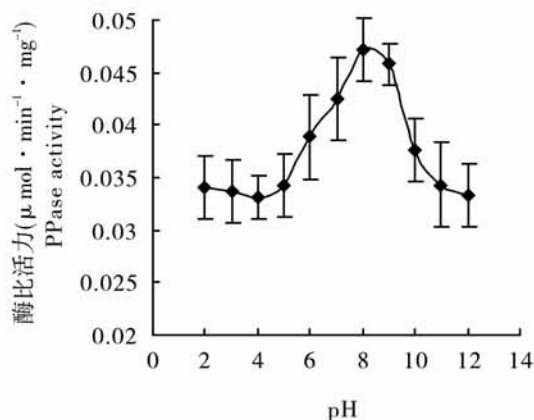


图 4 pH 对粗酶活性的影响

Fig. 4 Effect of pH on the activity of crude PPase

Hamm 和 Nerral^[14] 研究牛肉中的 PPase 粗酶的最适 pH 值约为 6.7~6.8。Nakamura 等^[15] 研究兔肉中的 PPase 的最适 pH 值有两个范围,分别为 5.2 和 7.4。Hiraishi 等^[15] 报道牛肝中的 PPase 最适 pH 值约为 6.5。

二价金属离子对粗酶的影响 二价金属离子是许多生物体中各种酶的辅助因子,对酶的活性有着很大的影响。表 3 表示了二价金属离子对粗酶的影响,完全透析的粗酶在没有二价金属离子的情况下,不显示活性,结果表明 PPase 是一种金属离子依赖性生物酶。Mg²⁺、Co²⁺ 和 Mn²⁺ 均能激活酶活性,其中 Mg²⁺ 效果最显著。在 Mg²⁺ 浓度为 1 mol·L⁻¹ 时,PPase 活性达到了 0.023 μmol·min⁻¹·mg⁻¹,显著高于 Co²⁺ 和 Mn²⁺。而 Ca²⁺、Fe²⁺ 和 Cu²⁺ 均没有影响,说明 PPase 对金属离子呈现选择性依赖。Nakamura 等^[15] 研究了哺乳动物兔子肉中的 PPase 也需要 Mg²⁺。

表 3 PPase 粗酶对二价金属离子的依赖性
Tab. 3 The dependence of PPase on the metal ion

金属离子 (mmol·L ⁻¹) metal ion	酶比活力 (μmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹) activity
None	N. D.
Ca ²⁺	N. D.
Fe ²⁺	N. D.
Cu ²⁺	N. D.
Mg ²⁺	0.023 ± 0.008
Mn ²⁺	0.0016 ± 0.0006
Co ²⁺	0.006 ± 0.001

G-6-P 的影响 从图 5 可以看出 G-6-P 能够强烈抑制 PPase 活性。在低浓度下抑制程度较低, 1.0 mmol·L⁻¹ 时活性比 0.5 mmol·L⁻¹ 时下降了 14.8%。随浓度升高, 抑制能力增强, 3.0 mmol·L⁻¹ 时活性急剧下降, 比 0.5 mmol·L⁻¹ 下降了 79.8%。G6P 浓度若进一步升高, PPase 活性进一步下降。当 G6P 浓度达到 7 mmol·L⁻¹, PPase 活性以基本完全丧失。

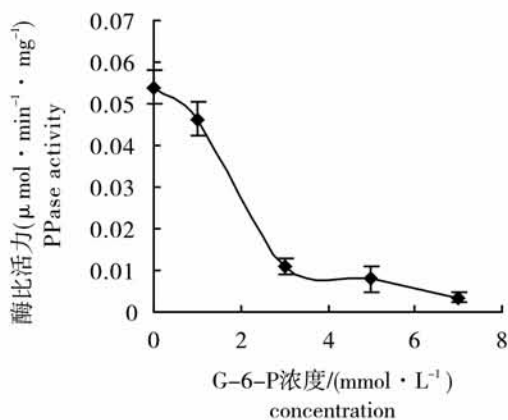


图 5 G-6-P 对 PPase 粗酶活性的影响

Fig. 5 Effect of G-6-P on the activity of crude PPase

EDTA-Na₂ 的影响 EDTA-Na₂ 对 PPase 有强烈的影响, 从图 6 可以看出在低浓度条件下, EDTA-Na₂ 可以激活酶活性。在 1.0 mmol·L⁻¹ 时, PPase 活性最强, 比未添加样品提高了 25.9%。但是当 EDTA-Na₂ 浓度进一步升高时, 酶活性却迅速下降。在 3.0 mmol·L⁻¹ 时, PPase 活性仅有原活性的 13.7% 左右。当 EDTA-Na₂ 浓度大于 5 mmol·L⁻¹ 时 PPase 几乎失活, 说明高浓度 EDTA-Na₂ 能够强烈抑制 PPase。有报道认

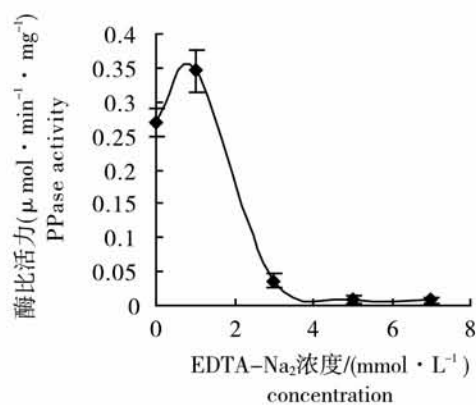


图 6 EDTA-Na₂ 对 PPase 粗酶活性的影响

Fig. 6 Effect of EDTA-Na₂ on the activity of crude PPase

为 EDTA-Na₂ 可以强烈抑制哺乳动物兔肉中的 PPase 活性^[15]。Li 等^[7] 研究也认为 EDTA-Na₂ 对新鲜鸡胸肉中添加的多聚磷酸盐的水解起到抑制作用。而本试验结果表明不同浓度的 EDTA-Na₂ 对鲮鱼肉中 PPase 既有激活作用又有抑制作用。

3 讨论

3.1 TSPP 在新鲮鱼肉中的水解

TSPP 在添加到新鲜碎鲮鱼肉中能迅速被水解成 Pi, 而对照组用 TCA 处理后 TSPP 基本不发生水解, 结果表明在鲮鱼肌肉中存在一种能水解 TSPP 的酶即 PPase。通过对鱼肉蛋白质的初步分离, 利用 0.05 mol·L⁻¹ KCl-20 mmol·L⁻¹ tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液漂洗鱼肉, 所得到的溶液具有较高的 PPase 活性, 结果表明 PPase 应是一种水溶性蛋白质。本实验结果与 Matsunaga 等^[10] 对冷冻鱼糜制品生产过程中焦磷酸盐降解的研究结果相似, 其研究结果认为在漂洗后的鲤鱼鱼糜中几乎不能水解添加的 TSPP, 而水溶液中 TSPP 水解增加。Belton 等^[6] 和 Li 等^[7] 利用³¹P 核磁共振技术检测到鸡胸肉中添加的焦磷酸盐和三聚磷酸盐均发生了水解。本研究表明漂洗液中有 PPase 活性, 但随漂洗次数增加, 所得到的水溶液中 PPase 活性显著变化。第一次漂洗得到的漂洗液活性最高, 第二次得到的漂洗液活性显著下降, 故以第一次漂洗液为粗酶对 PPase 酶学特性作初步研究。

3.2 鳙 PPase 粗酶酶学特性

鳙 PPase 粗酶活性很容易受到温度、pH 值、金属离子和一些抑制剂的影响。鳙 PPase 粗酶的最适温度在 50 °C 附近。温度对酶促反应过程具有很大的影响,一方面温度升高使反应物能量增加,单位时间内有效碰撞次数也增加,从而使反应速率增大;另一方面,温度过高会使酶变性而失活,反而使反应速率降低,故酶促反应过程存在一个最适温度。PPase 粗酶最适反应 pH 值约为 8.0 左右。在极性的酸碱的条件下,由于电荷的排斥和离子键的减少导致酶的结构的变化,从而使酶的活性降低。

二价金属离子对 PPase 的影响遵循离子对蛋白质影响的普遍规律,金属离子与活性中心的基团结合,对肌原纤维 PPase 起到激活作用。本实验表明 PPase 对二价金属离子有较强的选择依赖性,其中 Mg^{2+} 对鳙鱼 PPase 激活作用最强。Shiro 和 Ken-ichi 研究了 $MgCl_2$ 对鲤肌肉中的焦磷酸盐水解酶活性的影响,结果显示添加 $MgCl_2$ 可以促进焦磷酸盐水解,并且水解酶活性只有 Mg^{2+} 浓度高于 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时才达到最高^[16]。Matsunaga 等^[4]的研究结果与此相似,在 Mg^{2+} 为 $0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时焦磷酸盐水解酶几乎没有活性,随 Mg^{2+} 浓度的增加活性升高,当浓度大于 $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,活性达到最高并趋于稳定。 Mg^{2+} 是生物界中大多数无机焦磷酸盐水解酶的必需因子^[17-19],鳙鱼中的 PPase 也符合此规律。

EDTA- Na_2 低浓度时能激活 PPase,而高浓度下却能显著地抑制鳙鱼 PPase 粗酶的活性。其原因可能是,EDTA- Na_2 是一种强烈的金属螯合剂,在低浓度时的激活作用可能是 EDTA- Na_2 结合 Mg^{2+} 更接近酶活性中心,从而促进水解 PP_i 的活性。因为反应体系中的 Mg^{2+} 的浓度远高于 EDTA- Na_2 的浓度,所以能排除了 Mg^{2+} 浓度变化对 PPase 活性的影响。高浓度 EDTA- Na_2 的抑制作用也说明了 PPase 是一种金属离子强依赖性水解酶,高浓度下螯合了 PPase 催化过程中所需要的必需金属离子,而且可能导致酶蛋白质活性中心的结构受到改变,使酶失去了催化活性。

参考文献:

[1] Yasui T, Fukazawa T, Takahashi K, *et al.*

- Hashimoto Y. Phosphate effects on meat: specific interaction of inorganic polyphosphates with myosin B [J]. *J Agric. Food Chem*, 1964, 12: 399-404.
- [2] Trout G R, Schimdt G R. Effect of phosphates on the functional properties of restructured beef rolls: the role of pH, ionic strength, and phosphate type [J]. *J Food Sci*, 1986, 51: 1416-1423.
- [3] Lee S, Stevenson-Barry J M, Kauffman R G, Kim-B C. Effect of ion fluid injection on beef tenderness in association with calpain activity [J]. *Meat Sci*, 2000, 56 (3): 301-310.
- [4] Matsunaga A, Ooizumi T, Yamamoto A, *et al.* Degradation of polyphosphates during manufacture of surimi-based products [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1990, 56(12): 2077-2082.
- [5] Sivula T, Salminen A, Parfenyev A N, *et al.* Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase [J]. *FEBS Lett*, 1999, 454: 75-80.
- [6] Belton P S, Paker K J, Southon T E. ³¹P NMR studies of the hydrolysis of added phosphates in chicken meat [J]. *J Sci Food Agric*, 1987, 40: 283-291.
- [7] Li R R, Kerr W L, Toledo R T, *et al.* ³¹P NMR analysis of chicken breast meat vacuum tumbled with NaCl various phosphates [J]. *J Sci Food Agri*, 2001, 81: 576-582.
- [8] Gornall A G, Bardawill C J, David M M. Determination of serum protein by means of the biuret reaction [J]. *J Biol Chem*, 1949, 177: 751-766.
- [9] Gao R C, Xue C H, Yuan L, *et al.* Determination of the big head carp myofibrillar (*Aristichthys nobilis*) adenosine triphosphatase activity by ion chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1118: 278-280.
- [10] Matsunaga A, Ooizumi T, Yamamoto A, *et al.* Washing effect of minced fish muscle in water on degradation of polyphosphates durin manufacturing process of surimi-based products [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, 58: 79-83.
- [11] Drozdowicz Y M, Lu Y P, Patel V, *et al.* A thermostable vacuolar-type membranepyrophosphatase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum*: Implications for the origins of pyrophosphate-energized pumps [J]. *FEBS Lett*, 1999, 460: 505-512.
- [12] Nyre N P, Nore B F. Proton-pumping *N, N'*-dicyclohexylcarbodiimide sensitive inorganic

- pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: Purification, characterization, and reconstitution [J]. *Biochem*, 1991, 30: 2883–2887.
- [13] Hamm R, Neraal R. On the enzymatic breakdown of tripolyphosphate and diphosphate in comminuted meat. XI. Influence of heating and freezing [J]. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1977, 164(2): 101–104.
- [14] Hamm R, Neraal R. On the enzymatic breakdown of tripolyphosphate and diphosphate in minced meat. VI. Influence of pH on the tripolyphosphatase and diphosphatase activities in bovine muscle (author's transl) [J]. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1977b, 163: 213–215.
- [15] Nakamura S, Yamaguchi M, Morita J, *et al.* Muscle pyrophosphatase [J]. *J Agric Food Chem*, 1969, 17(3): 633–638.
- [16] Shiro I, Ken-ichi A, Hiraishi H, *et al.* Purification and characterization of hepatic inorganic pyrophosphatase hydrolyzing imidodiphosphate [J]. *Arch. Biochem, Biophys*, 1997, 341(1): 153–159.
- [17] Shiro I, Ken-ichi A. Denaturation of actin in carp myosin B induced by polymerized phosphate in the presence of $MgCl_2$ [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1988, 54(11): 2009–2017.
- [18] Shimizu T, Imai M, Araki S, *et al.* Some properties of inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis* [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(2): 303–310.
- [19] Kuhn N J, Ward S. Purification, properties, and multiple forms of a manganese-activated inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 354: 47–56.

Study on the pyrophosphatase (PPase) from *Aristichthys nobilis* muscle

GAO Rui-chang¹, YUAN Li¹, YU Gang², FENG Hui³,
XUE Yong³, LI Zhao-jie³, XUE Chang-hu³

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

3. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The hydrolysis of sodium pyrophosphate (TSPP) in the fresh *Aristichthys nobilis* minced meat was studied by using ion chromatography (IC) in this work. The biochemical properties of the crude pyrophosphatase (PPase) were also studied. The results showed that TSPP was hydrolyzed to orthophosphate (Pi) in *A. nobilis* minced meat. There was a resoluble pyrophosphatase in the *A. nobilis* meat. The optimum temperature and pH for the crude PPase activity of *A. nobilis* meat was 50 °C, and 8.0, respectively. The PPase activity was activated by Mg²⁺, Mn²⁺ and Co²⁺, but Mg²⁺ was the more suitable to the crude PPase. Under the condition of 1 mol·L⁻¹ Mg²⁺, the PPase activity was 0.023 μmol·min⁻¹·mg⁻¹. Glucose 6-phosphate (G-6-P) could inhibit the activity of crude PPase. The crude PPase activity was activated under the condition of below 1 mol·L⁻¹ EDTA-Na₂, but was strongly inhibited when the concentration of EDTA-Na₂ over 1 mol·L⁻¹

Key words: *Aristichthys nobilis*; hydrolysis of pyrophosphate; pyrophosphatase (PPase)