

模拟探究凡纳滨对虾磷脂在贮藏过程中的水解机理

王晓旭¹, 王昕岑², 梁 栋¹, 宋 雨¹, 徐 杰^{1*}, 薛长湖¹

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003;

2. 武夷学院茶与食品学院, 福建 武夷山 354330)

摘要: 为探究凡纳滨对虾磷脂(PL)在贮藏过程中的水解机理, 本研究建立了磷脂相关酶与磷脂酰胆碱(PC)的体外模型, 模拟凡纳滨对虾磷脂水解反应。实验分别从凡纳滨对虾体内分离纯化得到磷脂相关酶与PC, 进行体外反应, 并采用“鸟枪”脂质组学法及气相色谱—质谱法分析水解反应前后PC、溶血磷脂(LPL)及游离脂肪酸(FFA)的组成和含量变化, 进而推断磷脂的水解机理。结果显示, 凡纳滨对虾体内磷脂水解酶包括脂肪酶、磷脂酶A₁(PLA₁)、磷脂酶A₂(PLA₂)、磷脂酶C(PLC)及磷脂酶D(PLD), 其中PLA₂活力最高, 可达177.87 U。体外模拟反应中, 凡纳滨对虾PC含量由516.45显著降至146.14 mg/g, 总FFA含量由36.42上升至568.57 mg/g, 其中多不饱和脂肪酸(PUFA)显著增加了280.5 mg/g。通过相关性分析水解前后磷脂水解酶活力变化与PC含量变化, 发现PC的变化与PLA₂显著相关($R=0.91$)。研究表明水产品中PC变化是磷脂相关酶催化的水解反应, 其水解产物主要为FFA与LPC, 且PLA₂对水产品贮藏过程中磷脂的水解影响最大。本实验建立了新型的体外水解模型, 并初步探究了磷脂的水解机理, 为水产品贮藏及磷脂酶的研究及应用奠定了理论基础。

关键词: 凡纳滨对虾; 磷脂; 磷脂酶; 水解机理

中图分类号: TS 254.4

文献标志码: A

磷脂(phospholipids, PL)是一类含有磷酸根脂质的总称, 广泛存在于生物体内^[1], 其中海洋食物来源磷脂富含二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)等多不饱和脂肪酸, 易被消化吸收, 具有更多活性^[2], 但易发生水解和氧化。海洋虾类中磷脂含量较高, Takeungwongtrakul等^[3]研究发现凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的虾头和肝胰腺中磷脂含量各占到总脂的82.51%和38.03%, 其在贮藏过程中易水解产生大量游离脂肪酸(FFA), 导致水产品色泽、风味改变及营养损失。目前有部分关于水产品贮藏过程中脂质劣变的研究, 发现磷脂的变化主要由于酶促和非酶促的氧化及水解导致^[4-5], 其中水解的发生主要与磷脂酶(PLA₁、PLA₂、PLC、PLD)和脂肪

酶(lipase)有关, PLA₂、PLC可水解磷脂产生FFA、LPL等^[6], PLD催化甘油磷脂如PC、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰甘油(PG)水解释放磷脂酸和相应的极性头部^[7]。而鲜有对水产品中磷脂水解机理的报道。因此, 基于目前已研究清楚水产品贮藏过程中磷脂水解变化的基础上^[8-10], 本研究首次从凡纳滨对虾体内提取磷脂及相关水解酶, 建立体外水解模型, 避免了实际贮藏时体系的复杂性, 明确了磷脂水解与磷脂酶的关系, 初步探究了凡纳滨对虾体内磷脂水解机理。

此外, 液相色谱—串联质谱联用技术(LC-MS/MS)逐渐被用于分析未知脂质的分子结构及脂质sn-1、sn-2位的脂肪酸组成, 其中电喷雾串联质谱(ESI-MS/MS)具有精确度高、重现性好且

收稿日期: 2015-11-05 修回日期: 2016-04-11

资助项目: 国家自然科学基金(31330060); “泰山学者”攀登计划

通信作者: 徐杰, E-mail: xujie9@ouc.edu.cn

灵敏度高特点, 现多用于磷脂的分析^[11], 但难以精确定量数百种磷脂分子, 且所需内标繁多, 分析时间长。而“鸟枪”脂质组学分析方法^[12], 即直接进样电喷雾串联质谱法, 无需对样品进行色谱分离而直接进样, 通过串联质谱特异扫描可分离脂质混合物中的同分异构体, 快速准确地对PL进行定性及定量分析。因此, 利用ESI电离技术和三重四极杆质谱的特点, 根据母离子扫描(precursor ion scan, PIS)和中性丢失扫描(neutral loss scan, NLS)对磷脂电离产生的特征碎片进行扫描, 便可实现高通量、快速地鉴定不同的磷脂类型^[13-14]及水解前后磷脂变化。

因此, 本研究采用独特的体外模拟磷脂水解方法, 从凡纳滨对虾体内提纯磷脂相关酶, 与底物PC作用, 并利用快速简便的“鸟枪法”分析了凡纳滨对虾体内磷脂水解前后脂质组成及含量变化, 探究了磷脂在贮藏过程中的水解变化机理。此外, 建立了从低值水产品中提取磷脂酶的方法, 为水产品贮藏、低值水产品的高值化利用等提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料及仪器

鲜活凡纳滨对虾购于青岛市团岛水产品市场。

色谱纯的三氯甲烷、甲醇购于德国Merck公司; 磷脂内标PC(14:0/14:0)、溶血磷脂内标LPC(14:0) (纯度大于99%)、棕榈酸对硝基苯酚酯(4-NPP)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、硝基苯基磷酸胆碱(NPPC)、脱氧胆酸钠、过氧化氢酶、胆碱氧化酶、脂肪酸(C15:0)甲酯均购于美国Sigma-Aldrich公司; Triton X-100、8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)、牛血清白蛋白、卵磷脂购于北京索莱宝科技有限公司; 其余试剂为国产分析纯。

MS 3 B S25电动匀浆机, 德国IKA公司; GL-20G-II飞鸽牌系列离心机, 上海安亭科学仪器厂; AL204电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; RE52CS型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; Milli-Q超纯水系统, 美国Millipore公司; 721型分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 680型酶标仪, 美国Bio-Rad公司; HH-8型数显恒温水浴锅, 金坛市双捷实验仪器厂; 6980N/5973i气相色谱—质谱联用仪、1260RPLC/

6410B液相色谱—三重四极杆串联质谱仪均为美国Agilent公司生产。

1.2 原料预处理

选取鲜活凡纳滨对虾用水清洗后加冰猝死, 去除头部, 将剩余部分均质后置于4℃备用。

1.3 凡纳滨对虾体内磷脂组成分析

磷脂的提取 采用Folch等^[15]的方法。在冰温条件下, 称取5 g样品于烧杯中, 加入氯仿/甲醇(2:1, V/V)溶液后搅拌、匀浆, 并用15 mL氯仿清洗匀浆杯, 将清洗液与匀浆液混合均匀后静置2 min, 抽滤, 合并滤液至分液漏斗中, 静置过夜分层。收集下层氯仿层, 无水硫酸钠脱水后, 40℃旋转蒸发至干。干燥后的样品精确加入10 mL氯仿/甲醇(2:1, V/V)溶液复溶, 过0.22 μm有机滤膜后置于-20℃冰箱中, 待测。

磷脂组成分析 采用“鸟枪”脂质组学质谱法测定样品中磷脂种类。质谱参数: 离子源温度350℃; 毛细管电压5.5 kV (+ESI), 4.5 kV (-ESI); 雾化器压力35 psi (+ESI), 25 psi (-ESI), 扫描范围*m/z* 400~1000, 进样量2 μL。+PIS 184, +NLS 141, -NLS 87和-PIS 241分别用于PC/LPC, PE/LPE, PS/LPS以及PI/LPI的特异性扫描。

1.4 PC的提取纯化

将“凡纳滨对虾体内磷脂的提取”中得到的磷脂复溶于氯仿/甲醇(3:1, V/V)溶液中, SPE硅胶柱分离纯化^[16]。取1 mL于预处理过的硅胶柱中, 先后用15 mL氯仿/甲醇(3:1, V/V)溶液和5 mL甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液, 氮气吹干后复溶于氯仿/甲醇(2:1, V/V)溶液中, 重复上述操作, 收集甲醇洗脱液, 氮气吹干后备用。

1.5 磷脂相关酶提取纯化及活力测定

磷脂相关酶提取纯化 准确称取预处理的原料50 g于三角瓶中, 分别加入5倍体积pH 7.5、8.0和8.5的0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液, 于4℃下搅拌30 min, 10 000 r/min离心20 min, 取上清液采用双缩脲法^[17]测定蛋白质浓度, 并测定酶活力, 以确定酶活最优磷脂酶粗提液。向酶活最优的磷脂酶粗提液中加入饱和度为10%~70%硫酸铵溶液进行盐析, 盐析后以相同条件离心, 取上

清液测定其中的酶活力及蛋白浓度, 确定盐析的最佳盐浓度。收集下层沉淀, 复溶于最适提取液中透析至完全, 将酶液冻干备用。

脂肪酶活力测定 配制3 mg/mL 4-NPP作为底物溶液^[18], 反应体系为0.2 mol/L Tris-HCl (pH 7.2)缓冲液, 取底物溶液与缓冲液以9:1(V/V)混匀, 4 mL混合液中加入1 mL上述提取纯化的酶液, 涡旋混匀, 置于37 °C反应10 min后加入1 mL 95%乙醇溶液终止反应, OD₄₀₅测定吸光度值。

磷脂酶A₁活力测定 磷脂酶A₁活力参考文献[19]测定。在试管中加入2.0 mL的卵磷脂(8%, 0.1% CaCl₂, W/V)和2.5 mL Tris-HCl (10 mmol/L, pH 8.5)缓冲液, 并加入0.5 mL提取纯化的酶液, 混匀后于37 °C反应15 min, 然后按文献方法操作。

磷脂酶A₂活力测定 将50 μL DMPC的甲醇溶液(40 mmol/L)和50 μL脱氧胆酸钠的甲醇溶液(40 mmol/L)混合, 快速注入1 mL水中, 制成最终浓度为200 μmol/L的DMPC底物溶液^[20]。通过酶标仪在吸收和发射波长分别为377和470 nm下测定。将170 μL溶液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L NaCl, 5 μg/mL牛血清白蛋白, 5 mmol/L CaCl₂, 10 μmol/L ANS)和20 μL DMPC底物溶液于26 °C下保温5 min, 加入10 μL提取纯化的酶液(1 mg/mL)后开始反应, 荧光发射15 min观测其动力学曲线。

磷脂酶C活力测定 参考张露娟等^[21]的方法。

磷脂酶D活力测定 采用酶联免疫反应原理进行测定^[22]。将0.4 mL反应液(0.1 mol/L CaCl₂, 7.5% Triton X-100, pH 6.0的柠檬酸缓冲液)与0.1 mL卵磷脂底物溶液混合, 加入0.1 mL提取纯化的酶液于37 °C反应20 min, 加入0.2 mL 50 mmol/L EDTA溶液终止反应, 并沸水浴5 min, 恢复至室温后, 加入0.2 mL显色液(1.0 mol/L、pH 8.0 Tris-HCl缓冲液)37 °C下显色30 min, OD₅₀₀测定吸光度值。

1.6 模拟磷脂水解反应

将吹干的凡纳滨对虾PC样品溶于5 mL 0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.5, 含有0.1% CaCl₂)中制成底物溶液。取“磷脂相关酶提取纯化及活力测定”的冻干磷脂相关酶1 g复溶于10 mL pH 8.0的0.1 mol/L Tris-HCl中, 将酶液与PC底物溶液按5:1(V/V)加

入具塞试管中, 37 °C反应5 h。并取2 mL不同时间点的酶解样品, 分别加入氯仿/甲醇(2:1, V/V)溶液, 萃取后取下层, 3000 r/min离心5 min, 反复提取2次, 合并下层, 37 °C氮气吹干, 待测。

1.7 磷脂水解产物检测

PC种类及含量测定 采用“南美白对虾体内”磷脂组成分析中的方法测定磷脂种类, 通过磷脂内标标准品PC (14:0/14:0)对不同酶解时间点PC进行定量分析。+PIS 184用于PC/LPC特异性扫描, ESI-MS数据通过Mass-Hunter质谱工作站采集并进行定性定量分析, 记录PC含量变化。

FFA种类及含量测定 采用重氮甲烷衍生效制备脂肪酸甲酯^[23]。使用HP-INNOWax石英毛细管柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm), 通过气相色谱—质谱联用仪分析脂肪酸种类及含量^[24]。采用归一化法对各组分峰面积进行积分, 计算其相对含量。

磷脂水解酶活力变化测定 采用“磷脂相关酶活力测定”方法检测磷脂水解模型中不同时间点(同PC含量检测时间点)样品的酶活。

2 结果与分析

2.1 凡纳滨对虾磷脂组成

本实验采用直接进样的电喷雾串联质谱法即“鸟枪法”对凡纳滨对虾体内磷脂组成进行分析。凡纳滨对虾体内含量最丰富的磷脂为PC, 其中质荷比760.9的16:0/18:1 PC分子种类含量最多; 其次是PE, PS和PI含量较低。此外, 溶血磷脂类, 鲜活凡纳滨对虾体内LPC含量最高(图1)。

2.2 磷脂酶提取纯化方法优化

本实验对提取纯化方法进行了优化, 以得到最佳酶活力的磷脂相关酶。缓冲液pH 8.0时, 脂肪酶、PLA₂、PLC和PLD的酶活力最大, PLA₁在缓冲液pH 7.5时酶活力最大, 其最适pH较其他磷脂酶偏低。综合考虑提取效果, 确定pH 8.0为提取磷脂酶的最适pH(表1)。

采用硫酸铵沉淀法纯化磷脂酶, 对上清液中酶活力、蛋白浓度及pH进行测定。随着硫酸铵饱和度的不断增加, 蛋白质表面产生的大量电荷被中和, 导致它们相互凝聚而沉淀(图2)。当硫酸铵饱和度由10%升至20%时, 上清液中磷

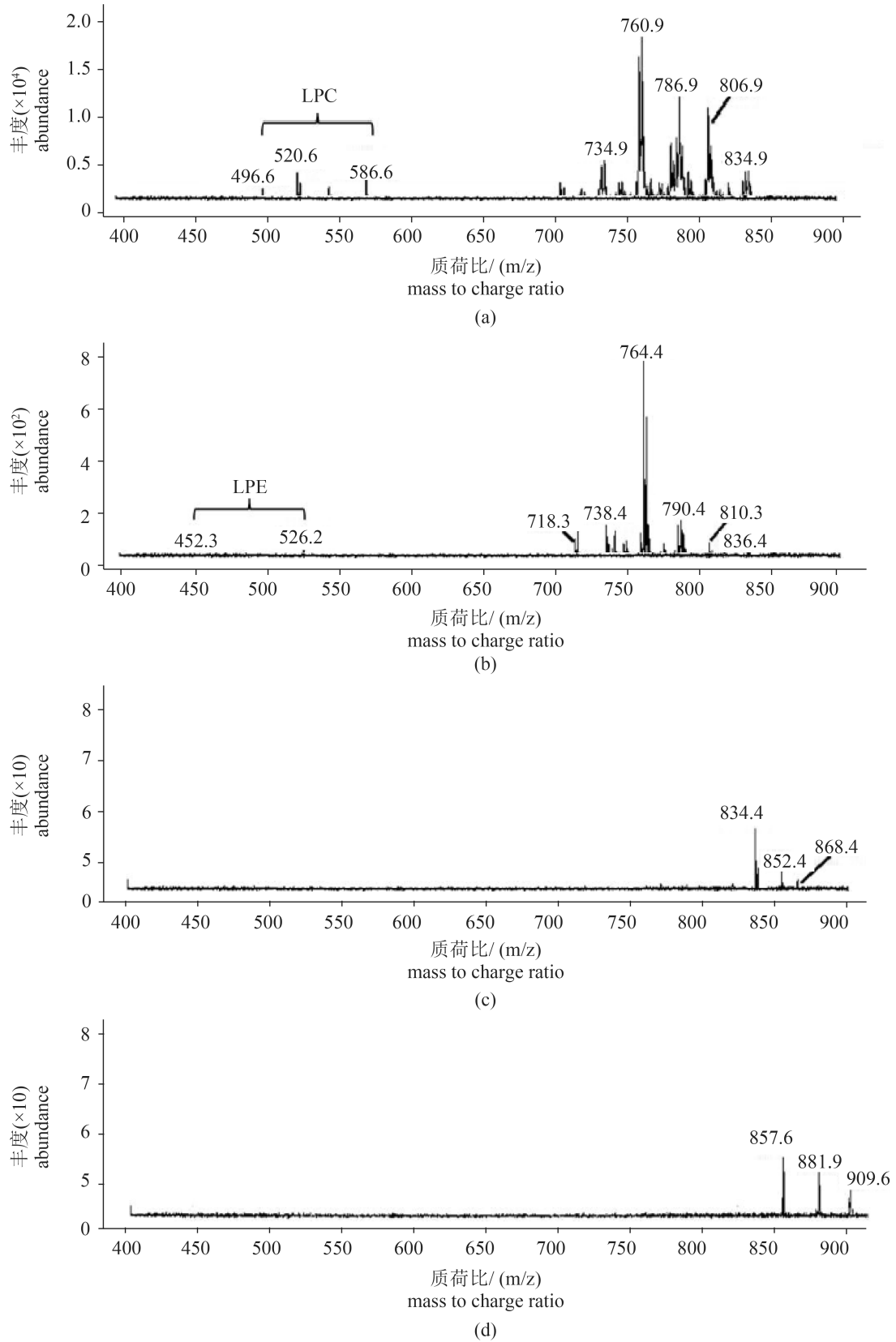


图 1 凡纳滨对虾磷脂的一级扫描质谱图

(a). PC与LPC (+PIS, 质荷比184); (b). PE与LPE (+NLS, 质荷比141); (c). PS (-NLS, 质荷比87); (d). PI (-PIS, 质荷比241)

Fig. 1 PIS and NLS mass spectra of PLs from *L. vannamei*

(a). PC and LPC (+PIS, m/z 184); (b). PE and LPE (+NLS, m/z 141); (c). PS (-NLS, m/z 87); (d). PI (-PIS, m/z 241)

表 1 缓冲液pH对磷脂酶提取效果的影响

Tab. 1 Effect of pH of buffer solution on extracting efficiency of phospholipase

pH	脂肪酶/U lipase	磷脂酶A ₁ /U PLA ₁	磷脂酶A ₂ /U PLA ₂	磷脂酶C/U PLC	磷脂酶D/U PLD
7.5	1.68±0.05	0.96±0.06	14.36±0.17	0.41±0.01	4.47±0.21
8.0	3.41±0.13	0.72±0.02	28.46±0.97	0.67±0.01	5.17±0.28
8.5	2.31±0.02	1.52±0.01	26.36±0.45	0.63±0.01	4.50±0.19

注: 数据表示为平均值±标准差, 下同

Notes: values are expressed as mean ± SD, the same below

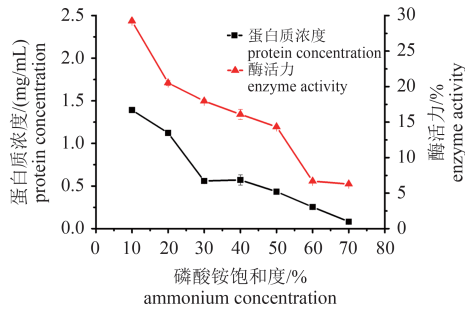


图 2 磷脂水解酶的硫酸铵盐析曲线

Fig. 2 Ammonium sulfate fraction precipitation curve of phospholipase and lipase

脂酶活力显著下降, 而溶液中的蛋白浓度变化不大, 说明主要是磷脂酶沉淀; 当硫酸铵饱和度为20%~50%时, 磷脂酶活力和蛋白浓度均呈现下降趋势; 为60%时, 上清液中的酶活力和蛋白浓度已降至较低水平, 且上清液中pH已由初始的8.50降至7.04; 当硫酸铵饱和度达到70%时蛋白沉淀效果与60%时相近, 但上清液中pH降至6.85, 已超出大部分磷脂酶的最适pH。因此, 确定60%为最佳硫酸铵饱和度, 用于磷脂酶盐析沉淀。

经过硫酸铵沉淀后, 磷脂水解酶活力提高了3~6倍, 但由于部分酶活在纯化过程中有所损失, 不同磷脂酶纯化倍数不同(表2)。PLA₂活力

表 2 磷脂水解酶的分离纯化结果

Tab. 2 Purification summary of the phospholipase

磷脂酶 phospholipase	粗酶液酶活/U crude enzyme activity	纯化酶液酶活/U purified enzyme activity	纯化倍数 multiple of purification
脂肪酶 lipase	3.41±0.13	15.52±0.27	4.55
PLA ₁	0.72±0.02	2.64±0.12	3.62
PLA ₂	28.46±0.97	177.87±1.03	6.24
PLC	0.67±0.01	3.39±0.21	5.06
PLD	5.17±0.28	16.22±0.73	3.13

最高, 其酶活力比脂肪酶、PLD高90%左右, 为PLA₁活力的67倍。因此, PLA₂可能为致使凡纳滨对虾PC发生变化的关键酶, 为探究二者相关性, 本研究进一步建立了体外水解模型。

2.3 磷脂水解模拟反应的产物检测

磷脂水解模拟反应中磷脂变化 以凡纳滨对虾体内提取的PC为水解底物, 与纯化后的磷脂酶于37 °C反应5 h, 不同分子种类PC含量均呈现减少现象(表3)。总PC含量由516.45显著下降至146.12 mg/g($P<0.05$), 水解程度达到71.70%, 其中含量最丰富的PC 16:0/18:1由72.20下降至16.45 mg/g。并且PUFA型磷脂含量较饱和脂肪酸型(SFA)磷脂含量下降显著($P<0.01$), 其中PC 16:0/18:2和PC 11:1/18:1由54.09降至9.21 mg/g, PC 16:0/22:6由36.56降至10.22 mg/g, PC 16:0/20:5由21.66降至6.77 mg/g, 水解率均大于70%。表明模拟反应中凡纳滨对虾PC在磷脂水解酶作用下发生了水解变化。

磷脂水解模拟反应中溶血性磷脂的变化

反应后共检测出4种LPC, 且含量均有所增加, 总LPC含量由反应前17.19升高至304.10 mg/g ($P<0.01$), LPC含量的显著增加表明底物PC在磷脂酶作用下发生显著水解(表4)。因凡纳滨对虾体内PC的sn-2位多为PUFA, 该酯键易断裂产生sn-1位LPC, 而提取的磷脂水解酶中活力最高的PLA₂易水解sn-2位脂肪酸酯键产生sn-1位LPC。因此, LPC的大量增加可能与PLA₂活力最高有关。

磷脂水解模拟反应中游离脂肪酸的变化以纯化的凡纳滨对虾PC为底物模拟水解反应, 采用GC-MS分析反应前后FFA含量变化。结果显示凡纳滨对虾体内各种FFA含量均显著增加($P<0.01$), 总FFA由反应前的36.42增加至568.57 mg/g(表5);

表 3 磷脂酶水解模型中磷脂酰胆碱种类及含量变化

Tab. 3 Molecular species and contents of phosphatidylcholines from model of phospholipase hydrolysis

质荷比/(m/z) mass to charge ratio	分子种类 molecular species	含量/(mg/g) content		质荷比/(m/z) mass to charge ratio	分子种类 molecular species	含量/(mg/g) content	
		水解前 before hydrolysis	水解后 after hydrolysis			水解前 before hydrolysis	水解后 after hydrolysis
704.8	14:0/16:1	7.37±0.04	1.24±0.22	776.8	16:1/20:6	-	-
706.8	14:0/16:0	4.00±0.12	0.93±0.01	780.8	16:0/20:5	21.66±0.14	6.77±0.01
718.8	a16:0/16:1	5.39±0.29	1.49±0.08	782.8	16:0/20:4	13.44±0.17	3.63±0.11
720.8	a16:0/16:0	4.11±0.02	1.03±0.01	784.8	16:0/20:3	21.18±0.02	3.73±0.01
732.8	16:0/16:1	13.37±0.43	2.64±0.01	786.8	18:0/18:2, 18:1/18:1	41.26±0.11	7.14±0.19
734.8	16:0/16:0	18.59±0.19	3.30±0.01	788.8	18:0/18:1	21.56±0.01	4.11±0.34
744.8	a16:0/18:2	8.53±0.17	1.77±0.15	790.8	a16:1/22:6	4.30±0.01	1.41±0.45
746.8	a16:0/18:1	10.63±0.02	2.50±0.12	792.8	a16:0/22:6	12.32±0.02	7.66±0.17
748.8	a16:0/18:0	4.14±0.01	0.94±0.01	794.8	a16:0/22:5	10.29±0.02	8.31±0.88
756.8	14:0/20:3	6.15±0.61	1.37±0.01	804.8	16:1/22:6	6.41±0.91	1.63±0.21
758.8	16:0/18:2, 16:1/18:1	54.09±0.09	9.21±0.22	806.8	16:0/22:6	36.56±0.73	10.22±0.01
760.8	16:0/18:1	72.20±0.82	16.45±0.21	810.8	18:0/20:4	6.59±0.01	2.28±0.81
762.8	16:0/18:0	11.94±0.01	2.60±0.01	812.8	18:0/20:3	3.78±0.09	1.51±0.01
764.8	a14:0/22:6	4.04±0.03	1.63±0.01	814.9	18:0/20:2	3.67±0.01	1.25±0.32
766.8	a14:0/22:5	11.86±0.08	10.83±0.09	820.8	a18:0/22:6	7.09±0.19	4.28±0.01
768.8	a16:0/20:4	4.11±0.11	3.38±0.07	830.8	18:2/22:6	4.68±0.56	0.97±0.18
772.8	14:0/22:4	8.57±0.23	2.07±0.01	832.8	18:1/22:6	9.82±0.18	2.89±0.36
774.8	14:0/22:3	7.77±0.01	1.68±0.02	834.8	18:0/22:6	13.31±0.02	6.69±0.03
∑PUFA-PC		343.13	108.89**	∑MFA-PC		130.52	28.43
∑SFA-PC		42.8	8.8	∑PC		516.45	146.12

注: -未检出; *.差异显著, $P<0.05$; **.差异极显著, $P<0.01$; 下同

Notes: -. not detected; *. significant difference, $P<0.05$; **. extremely significant difference, $P<0.01$; the same below

表 4 磷脂酶水解模拟反应中溶血性磷脂酰胆碱种类及含量变化

Tab. 4 Molecular species and contents of lysophospholipids from simulation of phospholipase hydrolysis

质荷比 m/z mass to charge ratio	分子种类 molecular species	含量/(mg/g) content	
		水解前 before hydrolysis	水解后 after hydrolysis
496.5	C16:0	6.53±0.12	112.18±0.92
520.5	C18:2	3.20±0.01	7.74±0.03
522.5	C18:1	5.04±0.29	74.80±0.01
524.5	C18:0	2.41±0.01	109.38±0.03
∑LPC		17.19	304.10**

PUFA 含量由水解反应前的2.65增加至283.15 mg/g, 除底物中原有少量FFA外, 其含量的显著增加表明凡纳滨对虾体内PC在磷脂水解酶作用下发生了显著的水解反应, 且可能与PLA₂有关。

2.4 磷脂水解模拟反应中水解酶活力变化

通过模拟反应测定磷脂水解酶活力, 酶活力变化与PC变化的相关性分析, 表明PC含量变化与PLA₂酶活力变化之间呈极显著的正相关性, 相关系数达0.91(表6), 即PLA₂为影响凡纳滨对虾体内磷脂水解最主要的水解酶; 其次,

表5 磷脂酶水解模拟反应中游离脂肪酸的种类及含量变化

Tab. 5 Molecular species and contents of free fatty acids from simulation of phospholipase hydrolysis

峰序号 peak no.	保留时间 /min retention time	分子种类 molecular species	含量/(mg/g) content	
			水解前 before hydrolysis	水解后 after hydrolysis
1	6.99	C14:0	0.11±0.01	1.76±0.11
2	11.67	C16:0	10.47±0.18	66.29±0.47
3	12.27	C16:1	1.67±0.01	34.08±0.90
4	17.49	C18:0	10.32±0.91	80.32±0.11
5	17.92	C18:1(<i>n-9t</i>)	11.2±0.11	102.97±0.82
6	18.21	C18:1(<i>n-9c</i>)		
7	19.36	C18:2	0.45±0.21	67.65±0.99
8	20.23	C18:3	0.09±0.01	17.33±0.28
9	25.69	C20:4	0.22±0.01	58.18±0.11
10	27.12	C20:5	0.81±0.01	67.67±0.78
11	38.68	C22:6	1.08±0.01	72.32±0.12
		∑SFA & MFA	33.77	285.42
		∑PUFA	2.65	283.15
		∑FFA	36.42	568.57**

表6 凡纳滨对虾体内PC含量变化与磷脂水解酶活力变化的相关性分析

Tab. 6 Correlation analysis between the activity changes of hydrolytic enzymes and the content of phospholipid in *L. vannamei*

磷脂 phospholipid	相关系数 R				
	脂肪酶	PLA ₁	PLA ₂	PLC	PLD
PC	0.52	0.82	0.91**	0.14	0.26

PLA₁与PC水解也呈现一定的相关性。表明凡纳滨对虾体内PC主要在磷脂水解相关酶作用下发生水解,并且主要由于磷脂酶A特别是PLA₂的作用,从而证明了水产品磷脂在贮藏过程中发生的变化主要是由磷脂水解酶催化发生水解反应所致,并与特定的磷脂酶相关。

3 讨论

水产品加工贮藏过程中普遍存在脂质水解氧化等引发的品质下降问题,尤其是海产品脂质富含有益于人体健康的EPA/DHA等*n-3*型

PUFA,更易发生水解等劣变。而海产品中磷脂占总脂比例较大,Winther等^[25]提取南极大虾(*Euphausia superba*)虾油发现其中的磷脂含量约为总脂含量的61.7%。PC为磷脂的主要成分之一,本研究通过“鸟枪”脂质组学方法分析凡纳滨对虾体内磷脂组成(图1),发现PC比PE、PS、PI分子种更丰富、含量更高,且定量分析水解前PC组成表明其以PUFA型为主(表3),即凡纳滨对虾磷脂中富含PUFA,与Ali-Nehari等^[26]研究结果一致,他们分析发现虾油的成分主要为PC、PE、PI等,其中所含的EPA和DHA占脂肪酸总量的22%~35%。故选择提取凡纳滨对虾体内PC,进一步研究富含PUFA的PC与磷脂水解酶的关系,探究贮藏过程中的磷脂水解机理,对于后续控制其磷脂水解具有重要意义。

近年来水产品磷脂的水解已成为研究热点,主要集中于水产品在实际贮藏过程中磷脂的水解变化。大量研究通过分析贮藏过程中脂质组成以及FFA的变化来评判脂质水解情况^[4-5],Takeungwongtrakul等^[3]发现凡纳滨对虾在整个低温贮藏过程中,FFA大量增加,认为FFA的形成和甘油三酯的减少预示着水解的发生。在本研究中,采用“鸟枪”脂质组学方法及气相色谱—质谱法快速分析了PC及FFA的变化,同样发现水解后PC含量大量减少,特别是PUFA型PC显著减少(表3),同时也检测出FFA及LPC显著增加($P<0.01$)。此外,已有研究表明磷脂水解与磷脂酶和脂肪酶密切相关^[6, 27],且脂肪酶和脂肪氧化酶可加速脂质的水解和氧化进程,氧化、水解等常常相伴发生,互相促进^[28]。然而在这样复杂的体内体系中还包括动物自身对磷脂的利用以及脂质转运等过程,难以实现磷脂水解机理的研究。本研究尝试通过提取凡纳滨对虾体内的磷脂和磷脂水解酶,建立了体外磷脂水解模拟体系,排除了体内因素干扰,可单独研究磷脂水解反应,并通过分析水解前后的磷脂组成、水解产物FFA含量、PLA酶活力等的变化,能够更清晰、直观地对磷脂的水解机理进行探究。

本研究在模拟磷脂水解反应前,优化了磷脂酶提取方法,最终确定缓冲液pH值为8.0,与Romero等^[29]从海葵体内提取磷脂酶A₂及Wang等^[6]提取PLA₂和PLC缓冲液的最适pH(7.5~8.0)接近;并通过优化硫酸铵沉淀法^[30-31]将磷脂相关酶纯化至3~6倍,发现其中PLA₂活力最高(表2)。在水解反应中,PLA₁、PLA₂分别作用于PC的*sn-1*位和*sn-2*位酯键并产生LPC和FFA^[32],磷脂酶C作用于甘

油磷脂酯键产生甘油二酯, 磷脂酶D作用于磷脂产生磷脂酸(PA)和胆碱基团。因此, 结合磷脂水解酶酶解酯键的位置以及磷脂变化, PLA酶活力及FFA含量明显增加的结果, 推测PC水解与PLA₂最为相关。本研究结果表明凡纳滨对虾体内PLA₂对其磷脂的水解作用最大, 相关系数高达0.91(表6)。Wang等^[6]在探讨鸭肉腌制加工过程中也发现磷脂含量的减少及FFA的增加与PLA₂酶活力变化密切相关($R=0.996$, $P<0.01$)。此外, 本研究还显示PLA₁对凡纳滨对虾磷脂水解也产生一定影响。

综上所述, 本研究利用直接进样电喷雾串联质谱法, 分析了凡纳滨对虾体内磷脂水解前后的组成及含量变化, 该方法前处理简单、稳定、特异性强且快速准确; 特别是首次从凡纳滨对虾体内提纯磷脂及磷脂水解酶建立了体外水解模拟反应体系, 对磷脂的水解机理进行了探讨, 该体系可排除基体干扰, 有利于根据磷脂含量下降、FFA含量上升及PLA酶活力的变化情况, 直观、准确地分析并推测出水产品磷脂的水解机理, 为水产品实际贮藏过程中磷脂成分的变化提供理论依据。

参考文献:

- [1] Vance D E, Vance J E. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes[M]. 4th ed. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science, 2002.
- [2] Wijendran V, Huang M C, Diao G Y, *et al.* Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates[J]. Pediatric Research, 2002, 51(3): 265-272.
- [3] Takeungwongtrakul S, Benjakul S, H-kittikun A. Lipids from cephalothorax and hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): compositions and deterioration as affected by iced storage[J]. Food Chemistry, 2012, 134(4): 2066-2074.
- [4] Pourashouri P, Chapela M J, Atanassova M, *et al.* Quality loss assessment in fish-based ready-to-eat foods during refrigerated storage[J]. Grasas Y Aceites, 2013, 64(1): 22-29.
- [5] Aubourg S P, Álvarez V, Pena J. Lipid hydrolysis and oxidation in farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) slaughtered and chilled under different icing conditions[J]. Grasas Y Aceites, 2010, 61(2): 183-190.
- [6] Wang D Y, Zhang M H, Bian H, *et al.* Changes of phospholipase A₂ and C activities during dry-cured duck processing and their relationship with intramuscular phospholipid degradation[J]. Food Chemistry, 2014, 145(7): 997-1001.
- [7] Khatoon H, Mansfeld J, Schierhorn A, *et al.* Purification, sequencing and characterization of phospholipase D from Indian mustard seeds[J]. Phytochemistry, 2015, 117(1): 65-75.
- [8] Vázquez M, Torres J A, Gallardo J M, *et al.* Lipid hydrolysis and oxidation development in frozen mackerel (*Scomber scombrus*): effect of a high hydrostatic pressure pre-treatment[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2013, 18(2): 24-30.
- [9] Aubourg S P, Medina I. Influence of storage time and temperature on lipid deterioration during cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) frozen storage[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999, 79(13): 1943-1948.
- [10] Xing Y H, Yoo Y, Kelleher S D, *et al.* Lack of changes in fatty acid composition of mackerel and cod during iced and frozen storage[J]. Journal of Food Lipids, 1993, 1(1): 1-14.
- [11] Blanksby S J, Mitchell T W. Advances in mass spectrometry for lipidomics[J]. Annual Review of Analytical Chemistry, 2010, 3(1): 433-465.
- [12] Han X L, Gross R W. Shotgun lipidomics: Electro spray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2005, 24(3): 367-412.
- [13] Hsu F F, Turk J. Electrospray ionization/tandem quadrupole mass spectrometric studies on phosphatidylcholines: the fragmentation processes[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003, 14(4): 352-363.
- [14] Hsu F F, Turk J. Electrospray ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem mass spectrometry of glycerophospholipids: mechanisms of fragmentation and structural characterization[J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877(26): 2673-2695.
- [15] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1957, 226(1): 497-509.

- [16] Fauland A, Trötz Müller M, Eberl A, *et al.* An improved SPE method for fractionation and identification of phospholipids[J]. *Journal of Separation Science*, 2013, 36(4): 744-751.
- [17] Toldrá F, Flores M, Aristoy M C, *et al.* Pattern of muscle proteolytic and lipolytic enzymes from light and heavy pigs[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1996, 71(1): 124-128.
- [18] 郑毅, 叶海梅, 周斌, 等. 脂肪酶活力测定研究进展[J]. *工业微生物*, 2005, 35(4): 36-40.
Zheng Y, Ye H M, Zhou X, *et al.* Progress of lipase activity determination[J]. *Industrial Microbiology*, 2005, 35(4): 36-40 (in Chinese).
- [19] 赵梦梦, 薛正莲, 黄祖耀, 等. 三种磷脂酶 A_1 活力测定方法的比较[J]. *食品与发酵科技*, 2012, 48(3): 74-77, 85.
Zhao M M, Xue Z L, Huang Z Y, *et al.* Comparison of three determination methods for phospholipase A_1 activity[J]. *Food and Fermentation Technology*, 2012, 48(3): 74-77, 85 (in Chinese).
- [20] Qiu S C, Lai L H. Tailoring the pH dependence of human non-pancreatic secretory phospholipase A_2 by engineering surface charges[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 171(6): 1454-1464.
- [21] 张露娟, 王道营, 卞欢, 等. 鸭肉肌内磷脂水解酶的提取及相关酶系的酶活测定[J]. *东北农业大学学报*, 2011, 42(6): 41-45.
Zhang L J, Wang D Y, Bian H, *et al.* Extraction of phospholipids lipolysis enzymatic in duck and determination of correlative enzymatic activity[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 42(6): 41-45 (in Chinese).
- [22] 黄勇, 吴兴中, Ahmad Q I, 等. 用酶联比色法测定肝脏磷脂酰胆碱专一性磷脂酶D及其应用[J]. *上海医科大学学报*, 1997, 24(5): 343-346.
Huang Y, Wu X Z, Ahmad Q I, *et al.* Determination of phosphatidyl choline specific phospholipase D using enzyme coupling colorimetric method and its application[J]. *Acta Academiae Medicinae Shanghai*, 1997, 24(5): 343-346 (in Chinese).
- [23] Roach J A G, Mossoba M M, Yurawecz M P, *et al.* Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 465(1-2): 207-226.
- [24] 楼乔明, 徐杰, 王玉明, 等. 气相色谱/质谱法分析孔石莼中的脂肪酸[J]. *色谱*, 2010, 28(7): 668-672.
Lou Q M, Xu J, Wang Y M, *et al.* Analysis of fatty acid composition of *Ulva pertusa* Kjellm by gas chromatography/mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2010, 28(7): 668-672 (in Chinese).
- [25] Winther B, Hoem N, Berge K, *et al.* Elucidation of phosphatidylcholine composition in krill oil extracted from *Euphausia superba*[J]. *Lipids*, 2011, 46(1): 25-36.
- [26] Ali-Nehari A, Chun B S. Characterization of purified phospholipids from krill (*Euphausia superba*) residues deoiled by supercritical carbon dioxide[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2012, 29(7): 918-924.
- [27] Gallier S, Shaw E, Cuthbert J, *et al.* Hydrolysis of milk phospholipid and phospholipid - protein monolayers by pancreatic phospholipase A_2 [J]. *Food Research International*, 2013, 54(1): 718-725.
- [28] 王建辉, 刘冬敏, 刘永乐, 等. 冷藏期间草鱼肌肉脂质降解的影响因素分析[J]. *食品科学*, 2013, 34(18): 276-279.
Wang J H, Liu D M, Liu Y L, *et al.* Factors influencing lipid degradation of grass carp muscle during cold storage[J]. *Food Science*, 2013, 34(18): 276-279 (in Chinese).
- [29] Romero L, Marcussi S, Marchi-Salvador D P, *et al.* Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A_2 from the sea anemone *Condylactis gigantea*[J]. *Biochimie*, 2010, 92(8): 1063-1071.
- [30] Murayama K, Kano K, Matsumoto Y, *et al.* Crystal structure of phospholipase A_1 from *Streptomyces albidoflavus* NA297[J]. *Journal of Structural Biology*, 2013, 182(2): 192-196.
- [31] Sugimori D, Kano K, Matsumoto Y. Purification, characterization, molecular cloning and extracellular production of a phospholipase A_1 from *Streptomyces albidoflavus* NA297[J]. *FEBS Open Bio*, 2012, 2(1): 318-327.
- [32] Six D A, Dennis E A. The expanding superfamily of phospholipase A_2 enzymes: classification and characterization[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2000, 1488(1-2): 1-19.

Study on hydrolysis mechanism of *Litopenaeus vannamei* phospholipids during storage *in vitro* model system

WANG Xiaoxu¹, WANG Xincen², LIANG Dong¹, SONG Yu¹, XU Jie^{1*}, XUE Changhu¹

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. College of Tea and Food Science, Wuyi University, Wuyishan, 354330, China)

Abstract: *Litopenaeus vannamei* contains abundant phospholipids (PL), especially rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA), which was easy to be hydrolyzed during storage and to produce free fatty acids (FFA). The increase of FFA leads to flavor, color and other changes, which affects the quality of aquatic products. Therefore in recent years, some information regarding the changes of lipids in aquatic food during handling and storage has been reported, such as *L. vannamei*, Pacific white shrimp and so on. However, the limited information on PL hydrolysis mechanism during storage is available, which is mainly owing to the complex system of PL hydrolysis and the lower content of phospholipases and lipase in aquatic food than mammals and microbes. Fortunately, electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) has demonstrated high accuracy and reproducibility in phospholipids analysis, which brings potentiality for the study of the PL hydrolysis. Thus, to better understand the hydrolysis mechanism in sea foods during storage, we established a model system of phospholipids hydrolysis for the first time, which avoided the barrier of the complex system. We had extraction and purification of the phospholipases and PC from *L. vannamei*, and measured the enzyme activity of purified phospholipases. What's more, a fast and efficient "shotgun" lipidomics strategy was applied to analyze the levels and changes of PL, lysophosphatides (LPL) in *L. vannamei*. And the content of free fatty acids was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that the phospholipases extracted from *L. vannamei* included lipase, phospholipase A₁ (PLA₁), phospholipase A₂ (PLA₂), phospholipase C (PLC) and phospholipase D (PLD), among them PLA₂ had the highest enzyme activity. And in the reaction system, the content of PC decreased from 516.45 to 146.14 mg/g. Meanwhile, FFA had a significant increase from 36.42 to 568.57 mg/g, and PUFA increased by 280.5 mg/g. Furthermore, the study showed the close correlation between PC hydrolysis and PLA₂ ($R=0.91$) by measuring the enzymes activities before and after hydrolysis reaction. Besides, PLA₁ also showed the relatively close relationship with the PC hydrolysis compared to PLA₂. These information, mentioned above, suggested that aquatic phospholipases can hydrolyze phospholipids and produce a series of hydrolyzates, mainly including LPL and FFA. In a word, this study indicated the hydrolysis mechanism of phospholipids in aquatic products was correlated with the activities of lipid hydrolytic enzymes during storage, and PLA₂ was crucial to the hydrolysis of PC, which laid a theoretical foundation for the aquatic food storage and phospholipids research. Therefore, the suppression of lipid hydrolysis and the study of the complete hydrolysis mechanism will be a means to maintain the quality of aquatic food stored in ice, which may be a significant research direction in the future.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; phospholipids; phospholipase; hydrolysis mechanism

Corresponding author: XU Jie. E-mail: xujie9@ouc.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31330060); "Taishan Scholar" Climbing Program