

龙头鱼中内源性甲醛产生的酶促机理初探

孙 永^{1,2} 靳 肖^{1,3} 周德庆^{1*}

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学食品学院, 201306)

(³中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

摘 要 对比了龙头鱼不同内脏对肌肉甲醛含量的影响, 其中肾脏活性最强; 从龙头鱼肾脏中获得了提取物, 在体外模拟体系中, 该提取物能够将氧化三甲胺分解为甲醛和二甲胺, 通过响应面分析, 发现该提取物反应最适条件为 50℃, pH=7, 能够被三氯乙酸灭活而丧失分解氧化三甲胺的能力, 该提取物在不同的温度和 pH 条件下呈现酶的特性, 且分解产物甲醛和二甲胺的含量比例关系稳定, 保持在 1.6~1.8 之间。在一定程度上解释了龙头鱼中甲醛的产生原因, 表明龙头鱼中的甲醛可以自身产生。

关键词 龙头鱼 氧化三甲胺酶 甲醛 二甲胺 响应面

中图分类号 S912/TS254.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)06-0036-07

A preliminary study on enzymatic mechanism of endogenous formaldehyde in *Harpadon nehereus*

SUN Yong^{1, 2} JIN Xiao^{1, 3} ZHOU De-qing^{1*}

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, 201306)

(³College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266060)

ABSTRACT Influence of different bombayduck *Harpadon nehereus* organs on the formaldehyde content of muscle was studied. Kidney was proved to have the highest formaldehyde producing activity among the organs. An extract was obtained from the kidney. Trimethylamine-N-oxide can be decomposed to formaldehyde and dimethylamine by the extract. The optimum catalyzing conditions of the extract were found to be 50℃, pH=7 using the responding surface method (RSM), and it can be inactivated by the trichloroacetic acid to lose the ability of decomposing trimethylamine-N-oxide. The extract showed typical enzyme properties at different temperature and pH value. There was a stable ratio between formaldehyde and dimethylamine which ranged between 1.6~1.8. The findings in this study partially explained why there was formaldehyde in the bombayduck and proved that some formaldehyde was endogenous.

国家自然科学基金项目(30871949/c120308)资助

* 通讯作者。E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85819337

收稿日期: 2009-12-28; 接受日期: 2010-04-20

作者简介: 孙 永(1982-), 男, 硕士, 主要从事水产品质量安全研究。E-mail: oohyeah@yeah.net, Tel: 13589200852

KEY WORDS *Harpadon nehereus* TMAOase Formaldehyde Dimethylamine
Responding surface method

甲醛(FA)在食品中属于禁用化学物质。因此,原农业行业标准 NY5073-2001《无公害食品 水产品中有毒有害物质限量》对 FA 安全限量规定为“不得检出”,但是标准在具体的实施应用中遇到问题,引起了一些争端或困惑,甚至造成了经济损失。究其原因,在于该标准制定时没有认识到一些水产品可自身产生 FA,从而造成只要检测到 FA 就是人为添加的错觉,该标准的制定缺乏科学性和严谨性。作为海洋生物有机渗透压调节物质重要组成部分的氧化三甲胺(Trimethylamine-N-oxide, TMAO)广泛存在于海产水产品中(Yancey *et al.* 1982)。据国外文献报道,TMAO 能够在氧化三甲胺脱甲基酶(Trimethylamine-N-oxide demethylase, TMAOase)的作用下分解为二甲胺(DMA)和 FA(Amona *et al.* 1963; Amona *et al.* 1965; Harada 1975)。然而如何辨别水产品中含有的 FA 是人为添加的还是自身产生的,成为摆在质监部门面前的一道难题。其实,能够自身产生 FA 的水产品种类比较多,如鳕形目的多种鳕鱼、鲑鱼以及狗母鱼科的龙头鱼等等,这些水产动物肌肉中都含有较高量的 TMAO(Kelly *et al.* 1999; 刘志标等 2006)。龙头鱼 *Harpadon nehereus* 俗称水潺、九吐鱼,属硬骨鱼纲、灯笼鱼目、狗母鱼科、龙头鱼属,在我国分布在浙江和福建沿海,鱼体柔软,呈乳白色,主要栖息于大陆架深水域,常至河口水域觅食,是中小型底栖鱼类,主要以小型鱼类及甲壳类为食(Whitehead 1984)。研究发现,捕获后的龙头鱼在排除人为添加的可能性之后,死后其体内 FA 含量非常高,随着贮藏时间的增加最高可达 500 mg/kg,干品甚至可以达到 2 000 mg/kg(钟惠英等 2006)。TMAOase 被认为是水产品中内源性 FA 产生的主要原因,这方面的研究国外已有报道,国内仅见于一些综述性文章(马敬军等 2004;宋丹阳等 2007),深入探讨 FA 产生机理的研究工作开展得较少。本文从水产品本底 FA 产生的生化机理方面研究了与 FA 产生相关的因素,以期阐明水产品产生 FA 的酶促机理,以甄别水产品中人为添加 FA 和本底 FA,从而为水产品 FA 标准的制定提供的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

龙头鱼,在浙江舟山捕获后立即加冰封箱运至实验室处理;TMAO,Fluka 公司;Trisbase,Biosharp 公司;Triton X100,Solarbio 公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

DELTA 320 pH 计,Mettler-Toldedo;Sigma 3k15 高速冷冻离心机,Sigma;LD5-10 低速离心机,雷勃尔;723A 分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;SHA-B 水浴恒温震荡器,金坛精达仪器制造厂;T18 basic 高速匀浆机,IKA。

1.3 试验方法

1.3.1 龙头鱼样品处理

将龙头鱼去头去皮,小心取肌肉避免内脏污染;同时分别取出龙头鱼肝脏、幽门盲囊和肾脏,以塑料袋封装,于-80℃保藏备用。

1.3.2 龙头鱼肾脏提取物制备

龙头鱼肾脏样品于 4℃冰箱解冻 2 h,以 1:5 比例加入提取液(20 mmol/L Trisbase-醋酸,0.1 mol/L NaCl,0.1% Triton X-100,pH=7.0),高速匀浆机破碎 1 min(每次不超过 10 s),4℃条件下 20 000 g 离心 1 h,取上清液备用。以上过程均在 4℃条件下操作。

1.3.3 反应体系

参考 Kimura 等(2000)的反应体系,4.5 ml 反应液(20mmol/L TMAO,100 mmol/L Trisbase-醋酸,pH=

7.0)中加入 0.5 ml 肾脏提取物开始反应,最后以 1 ml 10%三氯乙酸(TCA)中止反应,4 000 g 条件下离心 30 min,分别取 1 ml 上清液测定 FA 和 DMA 含量。

1.3.4 酶促反应体系中 FA 和 DMA 含量的测定

FA 含量采用乙酰丙酮显色法测定,1 ml 反应上清液以蒸馏水补齐至 10 ml,加入 1 ml 乙酰丙酮显色,沸水浴中加热 10 min,流水冷却后在 413 nm 波长下测定 FA 含量。

DMA 含量按 Dyer 等(1945)建立的方法测定,略有改动,1 ml 反应上清液以蒸馏水补齐至 5 ml,加入 1 ml 铜氨试剂和 10 ml 5%二硫化碳-甲苯溶液,40~50 °C 水浴 5 min,涡旋混合器混合 5 min,静置 5 min,加入 1ml 10%醋酸溶液,涡旋震荡至甲苯层澄清,取甲苯层,以无水硫酸钠干燥后在 440 nm 波长下测定 DMA 含量。

1.3.5 水产品中 FA 含量的测定

按行业标准 SC/T3025-2006 水产品中 FA 的测定进行。

2 结果与分析

2.1 龙头鱼肌肉和不同内脏 TMAOase 活性

国外文献报道,作为水产品中 TMAO 生化降解原因的 TMAOase 主要分布在水产品的内脏器官中,Rehbein 等(1984)报道 TMAOase 大部分存在于肾脏和脾中,Rey-Mansilla 等(2001)发现欧洲鳕肾脏附近肌肉中的 DMA 含量明显高于其他位置的肌肉;Harada(1975)从长舌鲷肝脏中部分纯化了 TMAOase;Kimura 等(2000)报道从阿拉斯加绿鳕肌肉中部分纯化了 TMAOase。本试验通过将 3 种不同内脏,肝脏、幽门盲囊和肾脏以 1:50 比例添加到肌肉中,以匀浆机打碎混匀,在-20°C 储藏 30 d 以观察 FA 含量的变化,结果如图 1。

从图 1 可以看出,4 个试样在 7 d 内 FA 快速产生,在短期内即产生大量 FA,之后产生速度放缓,但 30 d 之后仍有上升趋势;其中以肾脏的反应速度和 FA 产生量为最高,肌肉最低;通过肌肉中 FA 的变化可以看出肌肉中也存在 TMAOase 活性。因此可以认为在龙头鱼中,相对来说肾脏中 TMAOase 的活性较高,可以作为 TMAOase 提取的优先选择。

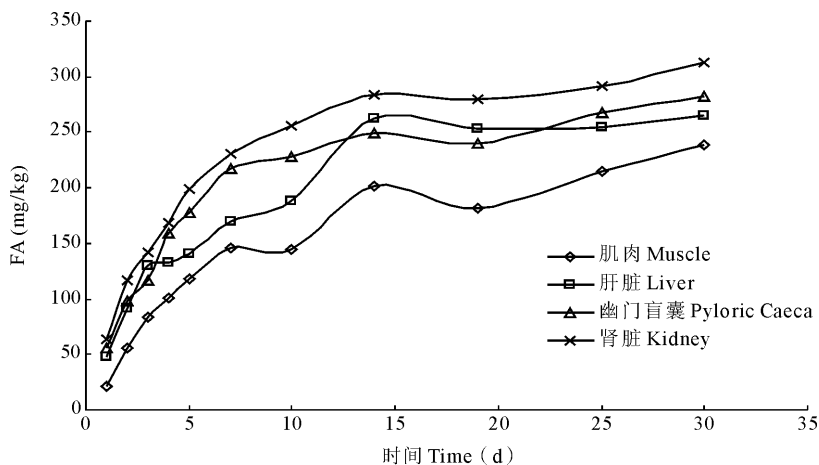


图 1 储藏过程中不同龙头鱼样品甲醛含量的变化

Fig. 1 Variations of FA content in different *H. nehereus* samples during storage

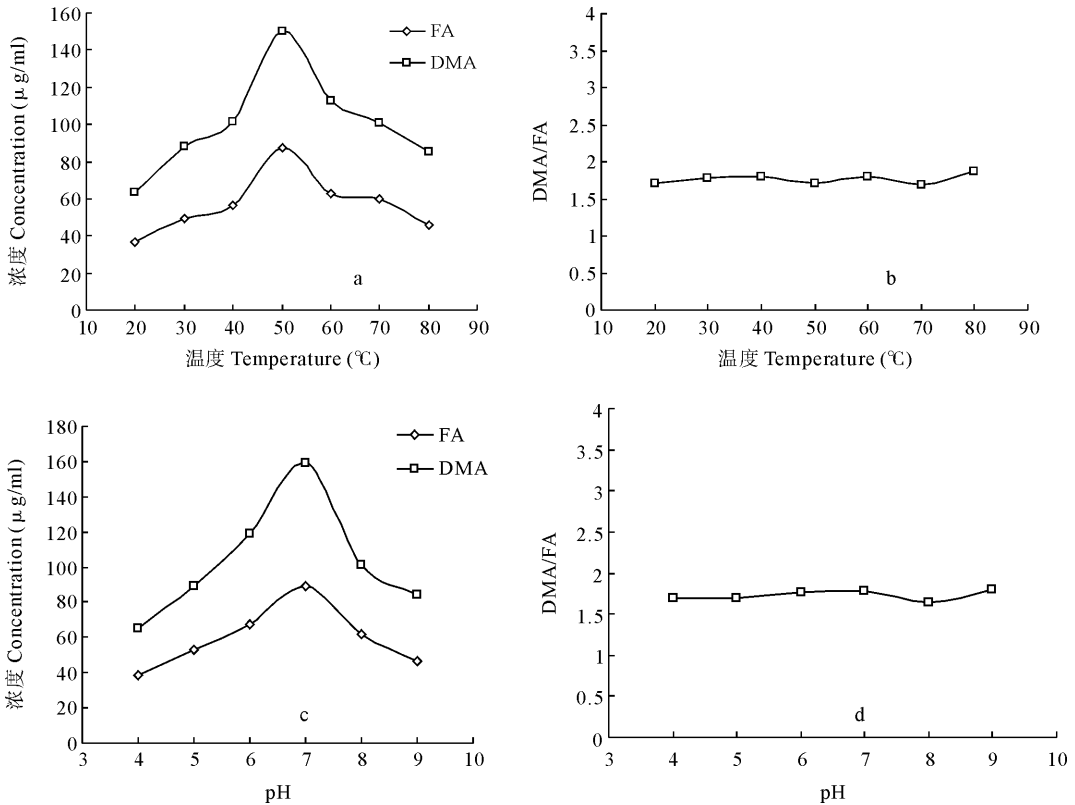
2.2 单因素试验

选用肾脏作为 TMAOase 提取的基质,根据 1.3.2 的方法制得提取液进行单因素试验。Benjakul 等(2003)从狗母鱼 *Saurida tumbil* 的肾脏中分离出一种部分纯化的 TMAOase,并测定其最适 pH 为 7.0,温度为 50°C。以下分别固定 pH=7 和温度为 50°C 做单因素试验,测定不同温度和 pH 条件下 DMA 和 FA 产生量的变化,以及 DMA 与 FA 二者之间的关系,结果如图 2。

从图 2-a 可以看出,在 pH 为中性条件下,龙头鱼肾脏提取物的活性随着温度改变有较大程度的波动,在 50°C 之前随着温度的上升活性增大,50°C 时反应活性最强,50°C 之后活性开始下降。从图 2-c 可以看出,在温度为 50°C 时,肾脏提取物的活性随着 pH 变化而变化,在 pH=7 时活性最高,这两组曲线都呈现酶特有的催化特性。

国外有文献报道,TMAOase 能够催化 1 mol TMAO 生成 1 mol DMA 和 1 mol FA(Castell *et al.* 1971; Hebard *et al.* 1982; Mackie *et al.* 1974),即: $(\text{CH}_3)_3\text{NO} \rightarrow (\text{CH}_3)_2\text{NH} + \text{HCHO}$ 。生成的 DMA 与 FA 的

理论质量比值为 1.5,考虑到反应体系中由于提取物的加入而存在一定量的蛋白质,而 FA 能够与蛋白质结合,导致测定的 FA 含量偏低而使 DMA/FA 值偏高。这两组单因素试验中,DMA/FA 均稳定在 1.6~1.8 之间,如图 2-b 和图 2-d 所示,说明 DMA/FA 的比值基本符合理论推断。水产品中人为添加的 FA 往往含量较高,与水产品中的 DMA 的比例关系远远超过自然产生的 FA 与 DMA 的比例关系,因此可以在检测 FA 的同时测定 DMA 的含量,比较二者之间的关系,再行判断水产品中的 FA 是否为人添加。



a:pH=7 时,FA 和 DMA 含量与反应温度的关系;b:DMA 与 FA 含量比值与反应温度的关系;

c:温度为 50°C 时,FA 和 DMA 含量与溶液 pH 的关系;d:DMA 与 FA 含量比值与溶液 pH 的关系

a:Relationship between FA and DMA concentration and temperature when pH=7; b:Relationship between DMA/FA and temperature;

c:Relationship between FA and DMA concentration and pH value in 50°C; d:Relationship between DMA/FA and pH value

图 2 不同温度和 pH 条件下 DMA 和 FA 产生量的变化

Fig.2 Relationship between FA, DMA concentration and pH, temperature

通过以下在水产品中以人工添加 FA 方法对本结论进行了验证:分别将龙头鱼、狭鳕和鲑鱼中添加不同浓度的 FA(0、500、1 000 mg/kg),测定 DMA/FA,结果如图 3。

从图 3 可以看出,人工添加 FA 的阳性样品其 DMA/FA 均小于 1.5,且随着添加浓度的增大而减低;空白对照组样品的 DMA/FA 均大于 1.5,狭鳕的空白对照甚至达到 3.56,其原因是由于在组分较为复杂的生物体内,TMAO 分解生成的 FA 有相当一部分与蛋白质、小分子肽和氨基酸结合导致可提取的 FA 含量较实际 FA 偏小,使得 DMA/FA 值偏

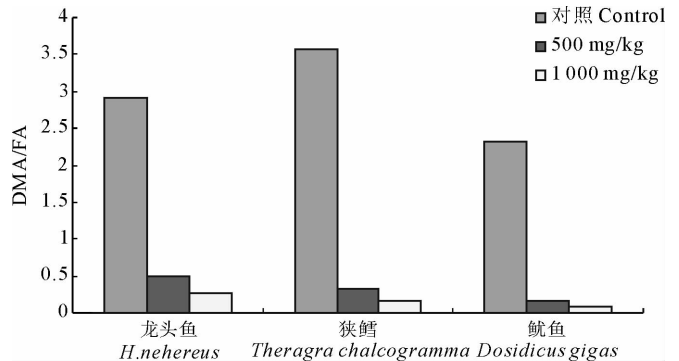


图 3 人工添加不同浓度甲醛样品的 DMA/FA

Fig.3 DMA/FA of samples with different concentration of artificially-added FA

大。为达到防腐杀菌效果而人为添加的 FA 含量往往都非常高,其 DMA/FA 较小。所以 DMA/FA 作为辨别是否存在人为添加的 FA 具有实际意义。

2.3 反应体系最适条件的确定

根据单因素实验的结果,本文选取了温度、pH 和反应时间 3 个因素以 Design Expert 7.1 软件设计了 Box-Behnken Design 以确定龙头鱼肾脏提取物的最适反应条件。此设计以产生的 FA 含量为响应值做响应面模型,其中温度范围为 20~80℃,pH 范围为 5~9,反应时间为 20~60 min,如表 1 所示。根据试验设计所要求的试验条件分别测定了 FA 的响应值,见表 2。

表 1 响应面实验设计

Table 1 RSM design

	变量 Variable	单位 Unit	-1 水平 -1 level	+1 水平 +1 level
A	pH		5	9
B	温度 Temperature	℃	20	80
C	时间 Time	min	20	60

表 2 各处理组的试验结果

Table 2 Results of response surface design test

处理组 Treatment	pH	温度 Temperature (℃)	时间 Time (min)	甲醛 FA(μg/ml)	处理组 Treatment	pH	温度 Temperature (℃)	时间 Time (min)	甲醛 FA(μg/ml)
1	9	80	40	30.40	10	6	80	40	40.92
2	7	20	60	34.31	11	6	50	60	67.76
3	7	50	40	89.75	12	9	50	20	55.68
4	7	50	40	86.31	13	7	80	60	26.06
5	9	20	40	23.01	14	7	50	40	90.05
6	6	50	20	62.84	15	9	50	60	64.74
7	7	50	40	79.08	16	7	80	20	26.62
8	7	50	40	87.28	17	6	20	40	46.60
9	7	20	20	24.38					

2.4 响应模型的分析与验证

采用 Design Expert 7.1 进行分析,得到 FA 生成量与 pH(A)、温度(B)、时间(C)等变量之间的函数关系为:

$$FA = +86.49 - 1.05A - 1.10B + 2.72C + 4.53AB + 1.55AC - 2.62BC - 12.66A^2 - 43.09B^2 - 15.56C^2$$

从表 3 可以看出,此模型的 F 值为 51.39, $P < 0.0001$, 达到极显著水平,而失拟项 F 值为 1.25, $P = 0.40 > 0.05$, 不显著,说明该模型有较高的可信度。

经计算,该模型在反应时间固定在 40 min,温度为 49.5℃,pH=6.9 时,FA 产生量最高,即肾脏提取物的反应活性最高,预测值为 86.53 μg/ml,这与实际值 88.83 μg/ml 的绝对误差仅有 2.6%,说明该模型基本反映了温度、pH 值和时间三者之间的关系,拟合度较好。

表 3 模型方差分析
Table 3 ANOVA for response surface quadratic model

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	
Model	10 110. 72	9	1 123. 413	51. 390 79	<0. 000 1	极显著 Significant
A-pH	1. 894 8	1	1. 894 8	0. 086 678	0. 777 0	
B-Temp	9. 266 535	1	9. 266 535	0. 423 9	0. 535 8	
C-Time	56. 434 75	1	56. 434 75	2. 581 621	0. 152 1	
AB	48. 816 44	1	48. 816 44	2. 233 12	0. 178 7	
AC	5. 705 938	1	5. 705 938	0. 261 019	0. 625 1	
BC	27. 510 03	1	27. 510 03	1. 258 453	0. 298 9	
A ²	159. 343 9	1	159. 343 9	7. 289 227	0. 030 6	
B ²	7 816. 798	1	7 816. 798	357. 581 3	<0. 000 1	
C ²	1 020. 015	1	1 020. 015	46. 660 85	0. 000 2	
残差 Residual	153. 021 4	7	21. 860 2			
失拟 Lack of fit	74. 155 67	3	24. 718 56	1. 253 703	0. 401 8	不显著 Not significant
纯误差 Pure error	78. 865 72	4	19. 716 43	51. 390 79	<0. 000 1	
总变异 Total variation	10 263. 74	16	1 123. 413	0. 086 678	0. 777 0	

根据实验所得数据由 Design Expert 7. 1 得到的响应面模型见图 4。

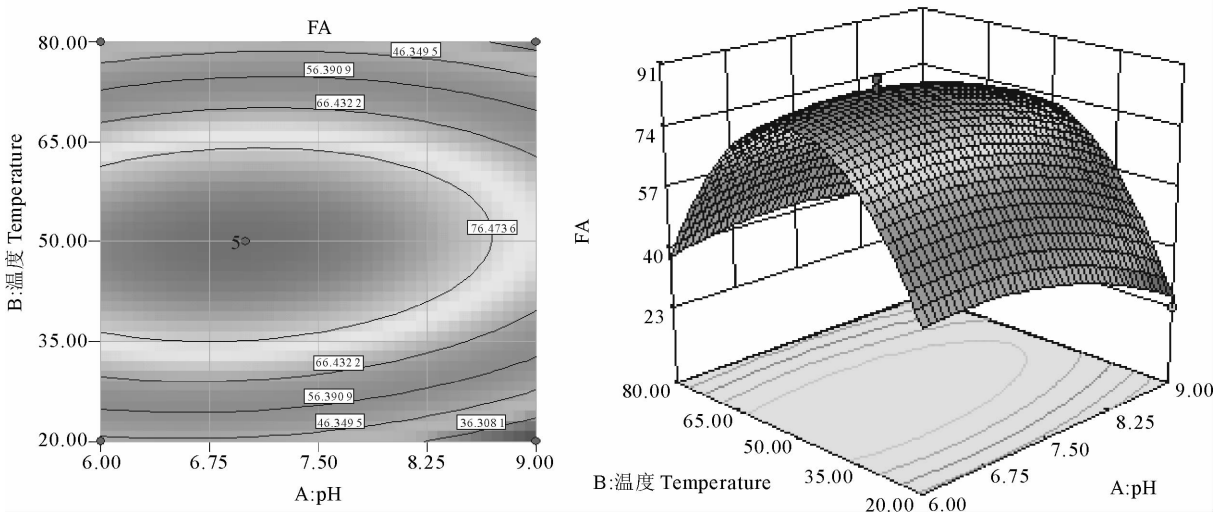


图 4 反应体系中甲醛产生量的响应
Fig. 4 Response surface of FA production in reaction system

2.5 三氯乙酸(TCA)灭活试验

龙头鱼肾脏提取物用 10%TCA 变性后加入 TMAO 反应体系中, pH=7, 温度 50°C, 反应 40 min, 与对照组相比, 没有 FA 和 DMA 产生(图 5)。

由此看出 TCA 处理之后肾脏提取物失去了分解 TMAO 生成 FA 和 DMA 的能力, 说明在肾脏提取物中起到催化作用的物质属于蛋白质。根据单因素实验以及反应最适条件等反面的数据可以认为肾脏提取物中含有大量能够催化 TMAO 分解的酶或者酶系。

3 结论

龙头鱼中肾脏的 TMAOase 活性最高,以肾脏为基质得到了提取物;在体外模拟体系中,龙头鱼肾脏提取物能够将 TMAO 分解为 FA 和 DMA,通过响应面分析,发现该提取物反应最适条件为 50℃,pH=7,反应时间为 40 min;且提取物能被 TCA 灭活而丧失分解 TMAO 的能力。该提取物在不同的温度和 pH 条件下呈现酶的特性,分解产物 DMA 和 FA 的含量比例关系稳定,DMA/FA 保持在 1.6~1.8 之间,通过比值的大小可判断水产品中 FA 是自身产生还是人为添加。上述实验结果,提示龙头鱼中的 FA 可以通过酶促机理自身产生。

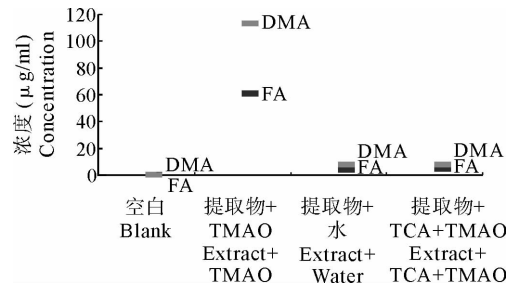


图5 TCA 灭活后的肾脏提取物对氧化三甲胺体系的作用

Fig. 5 The effects of TCA inactivated kidney extracts on the TMAO system

参 考 文 献

- 马敬军,周德庆,张双灵. 2004. 水产品中甲醛本底含量与产生机理的研究进展. 海洋水产研究, 25(4): 85~89
- 刘志标,钟创光. 2006. 冷藏龙头鱼甲醛本底含量研究. 见:中山大学研究生学位论文
- 宋丹阳,周德庆,杜永芳,柳淑芳. 2007. 氧化三甲胺酶研究进展. 食品科学, 28(1): 350~353
- 钟惠英,申屠基康,梁芹芹,舒苏萍,王剑萍. 2006. 龙头鱼 *Harpadon nehereus* 的甲醛含量调查. 中国食品卫生杂志, 18(5): 144~147
- Amona, K., Yamada, K., and Bito, M. 1963. Detection and identification of formaldehyde in gadoid fish. Bull. Jan. Soc. Sci. Fish. 29: 695~701
- Amona, K., and Yamada, K. 1965. Studies on biological formation of formaldehyde and dimethylamine in fish and shellfish—VII. Bull. Jan. Soc. Sci. Fish. 31: 1 030~1 037
- Benjakul, S., Visessanguan, W., and Tanaka, M. 2003. Partial purification and characterization of trimethylamine-N-oxide demethylase from lizardfish kidney. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 135: 359~371
- Castell, H., Smith, B., and Neal, W. 1971. Production of dimethylamine in muscle of several species of gadoid fish during frozen storage, especially in relation to presence of dark muscle. J. Fish. Res. 28: 1~5
- Dyer, W. J., and Mounsey, Y. A. 1945. Amines in fish muscle. II. Development of trimethylamine and other amines. Fish. Res. Board Can. 6: 359~367
- Harada, K. 1975. Studies on enzyme catalyzing the formation of formaldehyde and dimethylamine in tissues of fishes and shells. J. Shimonoseki Univ. Fish. 23: 163~241
- Hebard, E., Flick, J., Martin, E. et al. 1982. Chemistry and biochemistry of marine food products. AVI Publishing Company Westport, Connecticut, 149~304
- Kelly, R. H., and Yancey, P. H. 1999. High contents of trimethylamine oxide correlating with depth in deep-sea teleost Fishes, Skates, and Decapod crustaceans. Bio. Bull. 196(1): 18~25
- Kimura, M., Seki, N., and Kimura, I. 2000. Purification and characterization of trimethylamine-N-oxide demethylase from walleye *Pollock muscle*. Fish Sci. 66: 725~729
- Landolt, L. A., and Hultin, H. O. 1981. The removal of trimethylamine oxide and soluble protein from intact red hake muscle by washing. J. Food Pr. Prese. 5: 227~242
- Lapa-Guimaraes, J., Eduarado de Felicio, P., and Contreras-Guzman, E. S. 2005. Chemical and microbial analyses of squid muscle (*Loligo plei*) during storage in ice. Food Chem. (91): 477~483
- Mackie, M., and Thomson, W. 1974. Decomposition of trimethylamine oxide during iced and frozen storage of whole and comminuted tissue of fish. Proc. IV Int. Congress Food Sci. Technol. 243~250
- Nash, T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. Biochem. J. 55: 416~421
- Rey-Mansilla, M., Sotelo, C. G., Aubourg, S. P. et al. 2001. Localization of formaldehyde production during frozen storage of European Hake (*Merluccius merluccius*). Eur. Food Res. Technol. 213: 43~47
- Rehbein, H., and Schreiber, W. 1984. TMAOase activity in tissues of fish species from the northeast Atlantic. Comp. Biochem. Physiol. 79(3): 447~452
- Whitehead, P. J. P. 1984. Harpadontidae. In W. Fischer and G. Bianchi (eds.) FAO species identification sheets for fishery purposes. Western Indian Ocean Fishing Area 51, Vol. 2. FAO, Rome
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C. et al. 1982. Living with water stress: Evolution of Osmolyte Systems. Science, 217: 1 214~1 222