

鲭鱼中组胺降解酶产生菌的分离筛选和基本酶学性质研究

欧昌荣¹, 汤海青^{2,3}, 张宇琼¹, 郑洁¹, 李海波¹

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波出入境检验检疫局, 浙江 宁波 315012;

3. 宁波保税区进口食品检测服务中心, 浙江 宁波 315800)

摘要: 鲭鱼亚目的海洋鱼类在捕获后易产生组胺, 导致鲭鱼中毒. 为研究组胺消长与微生物的关系, 通过平板分离和摇瓶发酵, 以荧光光度法测定酶活力, 从鲭鱼(*Pneumatophorus japonicus*)皮肉、内脏和腮中分离筛选组胺降解菌, 并对所产组胺降解酶的酶学性质进行研究和分析. 结果表明: 自内脏中分离筛选到一株组胺降解酶活力较高的革兰氏阴性杆菌, 从生长产酶曲线推测该酶为初级代谢产物. 该酶反应的最适温度为 35 °C, 最适 pH 为 7.2. 在 pH 6.0~8.0 和温度 20~35 °C 范围内有较好的稳定性. Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 K^+ 等金属离子存在时酶活力增加, Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 等金属离子存在时, 酶活力下降, 在 EDTA 存在条件下酶活力完全丧失. 对其动力学研究表明, 在甘氨酸-NaOH 缓冲反应体系中, 最大反应速度 $V_{max}=156.25\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 米氏常数 $K_m=0.22\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. 组胺降解菌国内还未见报道, 研究结果对进一步研究水产品组胺生物控制技术具有重要意义.

关键词: 鲭鱼; 组胺; 组胺降解酶; 酶学性质

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1001-5132 (2012) 03-0001-06

生物胺是一类含氮的脂肪族或杂环类低分子化合物的总称, 包括组胺、腐胺、尸胺、酪胺、胍丁胺、精胺和亚精胺等. 含有蛋白质和氨基酸的食品, 在微生物产生的氨基酸脱羧酶的作用下, 脱去羧基并生成相应的生物胺. 在食品中常检出的生物胺中, 组胺对人类的健康影响最大, 为强生物活性物质, 摄入后使机体发生中毒症状, 也是生成亚硝基类致癌物质的前体, 是食品中较为重要的不安全因素^[1]. 水产品中的生物胺含量高且种类多, 特别是组胺问题的存在, 对各种水产制品, 如青皮红肉鱼为加工原料的产品、低值鱼加工利用产品以及发酵水产品的生产开发, 均有很大的影响. 生物降解组胺技术相对于其他组胺控制技术, 具有目的明确、效果明显和安全快速等优点. 开展生物组胺降解机制和控制技术的研究, 对于避免因食用含高组胺水产品而引起的中毒、确保水产品的食用安全具有重要的意义^[2].

近年来, 世界各国对组胺的相关研究一直是水产品行业的研究热点之一. 我国的研究大多集中在组胺的检测方法的探索以及与组胺相关的鲭鱼中毒的流行性病学方面^[3-5]. 国外对组胺的研究相对深入全面, 包括组胺的萃取、分离、检测分析以及形成机理等各个方面^[6-9]. 总体而言, 各国对组胺的控制降解技术的研究, 特别是生物脱组胺工艺的研究还较薄弱. 笔者以鲭鱼为材料, 从其内脏中分离筛选到一株具有组胺降解能力的菌株, 探讨其产酶特性, 为发展安全有效的生物组胺控制降解技术提供实践基础和理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 鲭鱼样品

市场采购新鲜鲭鱼, 无菌袋收集、冷藏, 当日处理.

收稿日期: 2012-03-04.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 宁波市自然科学基金(2010A610014); 宁波大学科研基金(XYL09011, XKI09118, XKI11097).

第一作者: 欧昌荣(1974—), 男, 湖北天门人, 博士/副教授, 主要研究方向: 水产品加工及食品质量与安全. E-mail: ouchangrong@nbu.edu.cn

1.1.2 培养基

保藏及初筛培养基: Zobell 2216E 培养基(蛋白胨 5.0 g, 酵母膏 1.0 g, NaCl 25.0 g, 磷酸铁 0.01 g, 琼脂 16.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0±0.2); MC 培养基(大豆蛋白胨 5.0 g, 牛肉膏粉 5.0 g, 酵母膏粉 5.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 乳糖 20.0 g, 碳酸钙 10.0 g, 琼脂 15.0 g, 中性红 0.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 6.0±0.2).

种子及发酵液体培养基: 同上, 无琼脂.

1.1.3 主要试剂和设备

组胺二盐酸盐(HD: Histamine Dihydrochloride, 98%, 国药集团化学试剂有限公司). Cary100 紫外/可见分光光度计, F95 荧光分光光度计, 离心超滤.

1.2 方法

1.2.1 产组胺降解酶菌株的筛选

平板初筛: 取鲭鱼的皮肉、内脏和鱼鳃各 10 g, 分别置于盛有 90 mL 生理盐水的无菌均质袋中, 均质器拍打 2 min. 取样品匀液以 10 倍系列稀释, 从适宜稀释度中取 0.1 mL 菌液, 涂布于分离培养基平板, 28 °C、培养 24~48 h. 样品的每个稀释度做 3 个平行. 挑取单菌落, 划线分离纯化后, 斜面 4 °C 保藏备用.

摇瓶复筛: 挑取一环新鲜斜面菌种, 接入装有 20 mL 液体种子培养基的 100 mL 三角瓶中, 28 °C、160 r·min⁻¹ 下培养 24 h. 取 1 mL 种子液接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C、160 r·min⁻¹ 下培养 24 h. 取发酵液, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 测定上清液酶活力, 筛选出酶活力较高的菌株. 划线分离纯化后, 斜面 4 °C 保藏备用.

1.2.2 组胺降解酶活力测定

参照 AOAC 977.13^[10], 取 1 mL 100 μg·mL⁻¹ HD 溶液于试管中, 30 °C 水浴预热 5 min. 加入 1 mL 稀释酶液, 混匀, 30 °C 水浴反应 10 min. 加入 0.4 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 0.5 mL, 混匀后立即加入 0.1 mL 0.1% 邻苯二甲醛甲醇溶液, 混匀置室温下反应 10 min, 加 0.5 mL 0.5 mol·L⁻¹ HCl 终止反应. 荧光分光光度法测定荧光值(激发波长和发射波长分别为 347 nm 和 442 nm). 空白用 0.5 mL 无菌液体培养基离心液代替酶液. 酶活单位定义为: 每 1 mL 酶液使上述反应液在 1 min 内组胺减少 1 μg 所含酶的量为一个酶活单位(U·mL⁻¹).

1.2.3 生长和产酶曲线

取 1 mL 新鲜种子液接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C、160 r·min⁻¹ 培养. 每隔 4 h 取样, 分别测定菌液浓度和酶活力, 绘制生长和产酶曲线.

1.2.4 粗酶液酶学性质研究

新鲜发酵液经离心、超滤(MW3000D)脱盐浓缩后为粗酶液, 进行以下各项实验. 用不同的缓冲液(Na₂HPO₄-柠檬酸, Tris-HCl, 甘氨酸-NaOH)分别配制不同 pH 的 HD 溶液, 其他条件不变, 测定酶活力, 确定酶反应的最适 pH; 分别取 0.1 mL 酶液与不同 pH 的缓冲液混合, 20 °C 放置 24 h, 测定酶活力, 分析酶的酸碱稳定性; 以 500 μg·mL⁻¹ HD (pH 7.4, 0.02 mol·L⁻¹ Tris-HCl) 溶液为底物, 加入 1 mL 酶液测定不同温度条件下酶活力, 确定酶反应的最适温度; 取酶液与 pH 7.4, 0.02 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液混合, 在不同温度下分别保温一定时间后, 测定酶活力, 分析酶的热稳定性; 在酶反应体系中分别加入不同金属离子, 使其最终浓度均为 5 mmol·L⁻¹, 或向反应体系加入 1.0 mmol·L⁻¹ EDTA, 空白对照用蒸馏水代替, 分别测定酶活力, 确定金属离子对酶活性的影响; 以 0.084 6~0.676 4 g·L⁻¹ HD (pH 7.2, 0.5 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液) 为底物, 分别加入酶液进行反应, 按反应时间取样, 荧光法测定减少的组胺量. 反应初速度为反应过程线性部分的斜率, 动力学参数由 Lineweaver-Burk (L-B) 双倒数作图法^[11]计算, 探讨酶促反应动力学性质.

2 结果

2.1 组胺降解菌的分离筛选

通过 Zobell 琼脂和 MC 琼脂平板初筛, 在鲭鱼的皮肉、内脏和腮中均分离到大量菌株, Zobell 琼脂平板上挑取 87 个单菌落, 分离纯化后分别用 Zobell 液体和 MC 液体培养基进行摇瓶复筛. 通过测定发酵液的酶活力, 确定以 Zobell 琼脂平板从内脏中分离得到的菌株 T6 具有明显的组胺降解能力, 而 MC 琼脂平板上分离到的乳酸菌均未检测到组胺降解酶活力. 菌株 T6 在 Zobell 平板上 28 °C 培养 24 h, 为圆形、微黄、不透明、表面光滑湿润, 过氧化氢酶阳性, 革兰氏染色阴性, 短杆状, 大小为 0.5 μm×1.0 μm, 见图 1. 经过平板划线分离, 纯化

后接入斜面培养, 4℃保藏备用。



图1 菌株的形态特征

2.2 组胺降解酶产生菌的生长和产酶曲线

从图2可以看出, 菌株的生长呈现出一般微生物的“S”型曲线, 0~6 h为生长的延滞期, 6 h后进入对数期, 18 h后进入稳定期, 24 h后菌株因为其他代谢产物积累和营养物浓度降低等因素的影响导致部分菌株死亡, 进入到衰亡期。菌株 T6 的产酶曲线与生长曲线趋势一致, 初步推测该酶为菌株的初级代谢产物, 在生长过程中持续产生。

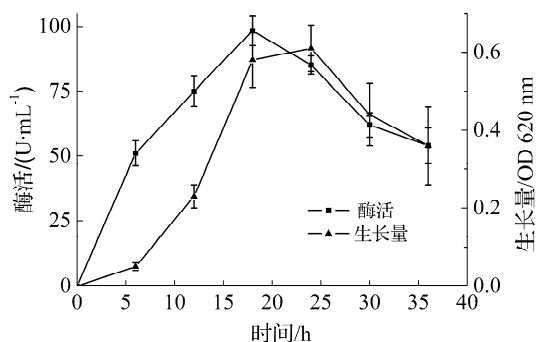


图2 组胺降解酶产生菌 T6 的生长和产酶曲线

2.3 组胺降解酶酶学性质

2.3.1 pH 对酶活性的影响

测定粗酶液在 pH 5.0~10.5 范围内的酶活力, 以相对酶活力绘制曲线, 结果如图3所示。酶最适

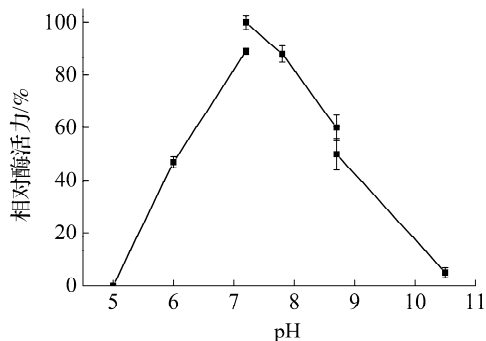


图3 酶反应的最适 pH

作用 pH 为 7.2, 偏酸或偏碱时酶活力迅速下降。将粗酶液分别在 pH 5.0~10.5 条件下放置 24 h, 以相对酶活力绘制曲线, 结果如图4所示。在 pH 6.0~8.0 之间酶稳定性较好, 酶活力可保持 78%以上; 当过酸过碱时, 酶活力迅速降低。

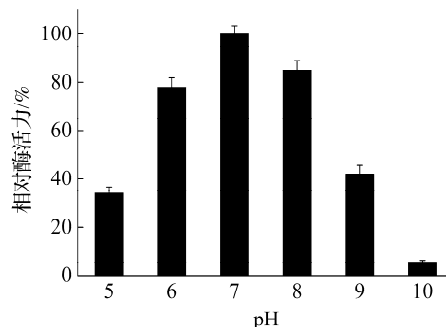


图4 组胺降解酶的 pH 稳定性

2.3.2 温度对酶活性的影响

在 pH 7.2 的反应体系中, 测定不同温度下的酶活力, 以相对酶活绘制曲线, 结果如图5所示。该酶最适反应温度为 35℃, 超出 25~35℃范围时, 酶活力迅速下降。分别在不同温度下保温 24 h 后, 测定酶活力, 结果如图6所示。该酶在 20~35℃范围内, 保持较高的酶活力, 当温度高于 40℃时, 酶活力下降至 42%, 高于 45℃时则完全失活。

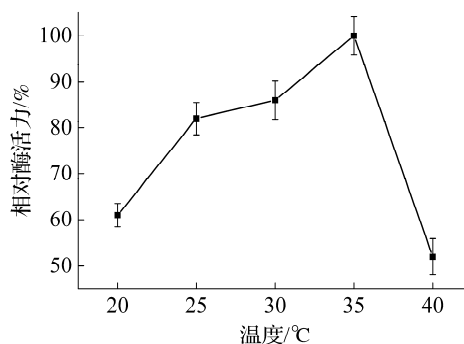


图5 温度对酶反应的影响

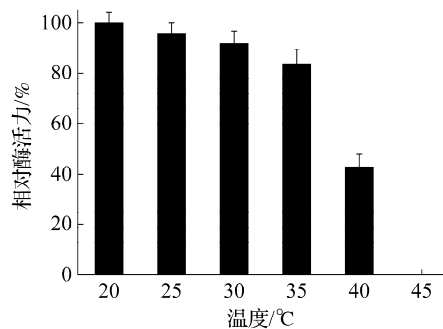


图6 酶反应的热稳定性

2.3.3 金属离子对酶活性的影响

由图 7 可见, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mn}^{2+}$ 、 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 离子对该组胺降解酶有不同程度的激活作用, 以 Mg^{2+} 最为明显, 相对酶活达 152%。 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 离子对该酶有抑制作用, EDTA 存在条件下酶活性完全丧失。

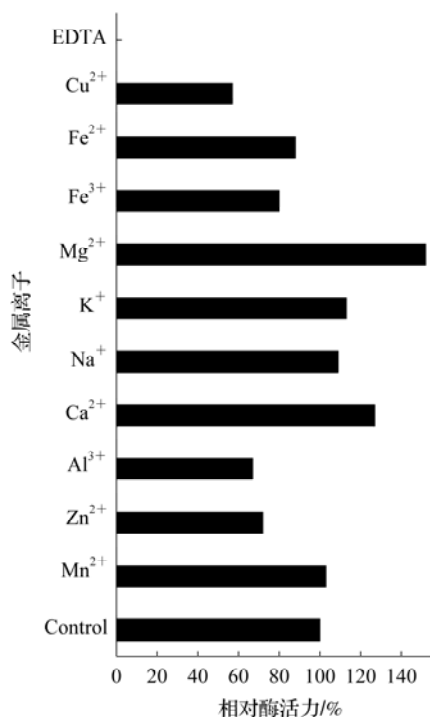


图 7 金属离子对酶活性的影响

2.3.4 酶促反应动力学

组胺降解酶在不同组胺底物浓度下的反应初速度如图 8 所示, V 为各一元回归线性方程的斜率。据双倒数作图法(L-B), 求的最大反应速度: $V_{\max} = 156.25 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 米氏常数 $K_m = 0.22 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 即在一定酶量下, 达到最大反应速度的组胺浓度为 $0.22 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

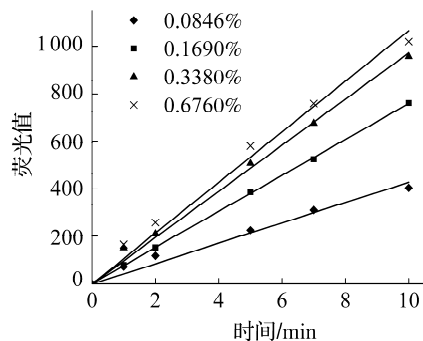


图 8 不同底物浓度下的组胺降解酶的反应速率

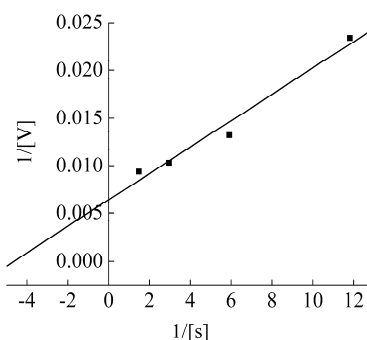


图 9 组胺降解酶的反应动力学参数 L-B 双倒数图

3 讨论

人们很早以前就研究发现鲭科类如鲭鱼、金枪鱼、鲣鱼、秋刀鱼等海洋鱼类中有较高含量组胺的存在。食用过量的组胺会引起过敏反应, 甚至危及生命, 同时组胺超标严重阻碍了这些低值鱼类的高值化加工^[12]。国外对此进行了大量的研究, 研究内容从过去的检测监测分析转变为研究组胺的消长机制以及影响因素, 进而研究其控制技术。其中主要集中在组氨酸脱羧酶的微生物的筛选鉴定及特性分析上。分属柠檬酸杆菌、葡糖球菌、泛菌、沙门氏菌等近 20 个种属的不同微生物被分离鉴定具有产组氨酸脱羧酶活性^[13-14], 既有革兰氏阳性菌^[15], 又有革兰氏阴性菌^[16], 其中摩根氏菌属的 *Morganella morganii* 及肠杆菌属的 *Enterobacter aerogenes* 和 *Enterobacter gergoviae* 的组氨酸脱羧酶活性比较强^[17-18]。笔者前期研究也从鲭鱼中分离到 5 株具有组氨酸脱羧酶活性的微生物(另文发表)。

最新的研究表明, 水产品中除了含有产组胺脱羧酶的微生物外, 还含有能产生组胺氧化酶或组胺脱氢酶等酶类, 从而能降解食品中的组胺的微生物^[19]。Wanaporn 等^[20]从腌制水产品中分离到 1 株产组胺氧化酶的嗜盐古细菌(*Natrinema gari* BCC 24369); Renata 等^[21]从各种发酵食品菌群中筛选到具有组胺氧化酶活力的多个菌株, 包括 27 株乳酸菌、21 株扩展短杆菌(*Brevibacterium linens*)和 17 株微球菌(*Micrococcus* sp.)等, 同时研究了各菌株的生物胺代谢过程, 证明食品发酵过程中产生生物胺的菌株并不具备降解生物胺的能力, 说明水产品中组胺的消长是不同的微生物引起的。本实验分别使用海洋细菌培养基 Zobell 和乳酸菌培养

基MC作为初筛培养基,试图从鲭鱼材料中分离得到有降解酶潜力的海洋细菌和乳酸菌。通过酶活力测定,在Zobell培养基上发现一株革兰氏阴性杆菌T6,产酶活力达到 $98.4\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,这与Renata等的报道相一致,说明一些杆菌属微生物具有降解组胺作用。因相关文献报道较少,产酶活性大小尚无法比较。从鲭鱼中分离到的乳酸菌中没有得到有组胺降解活性菌株,从不多的文献报道看,具有降解组胺的乳酸菌大多是从发酵食品中发现的,这为我们下一步筛选具有强组胺降解作用的微生物提供了借鉴。

食品中组胺控制过去大多从组胺产生菌着手,本实验结果为利用组胺降解菌去除水产品中的组胺提供了新思路。生物控制方法作用条件温和、反应迅速、节约能源、安全可靠等。但是目前对于水产品中组胺的生物降解技术的研究,仍处于探索阶段。因此在本实验基础上,对菌株T6进行生理生化、分子鉴定,并通过优化培养基和培养条件,提高菌株T6的产酶能力,进一步筛选具有高组胺降解活性的菌株,从而研究食品中组胺的生物控制技术,对保障水产品食用安全和贸易,具有重要的意义,值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Lehan L, Olley J. Histamine fish poisoning revisited: Review[J]. Int J Food Microbiol, 2000, 58:1-37.
- [2] 谢超,王阳光,邓尚贵.水产品中组胺控制降解技术研究概述[J].食品工业科技,2009,30(12):414-417.
- [3] 郝宏兰.水产品中组胺的测定方法研究[J].食品科学,2000,21(8):46-48.
- [4] 金安宝.水产品中组胺测定方法的改进[J].中国卫生检验杂志,2007,17(1):149-150.
- [5] 宋京玲.一起食用日本鲭鱼引起组胺食物中毒报告[J].职业与健康,2005,21(2):227.
- [6] Kuda T, Mihara T, Yano T. Detection of histamine and histamine-related bacteria in fish-nukazuke, a salted and fermented fish with rice-bran, by simple colorimetric microplate assay[J]. Food Control, 2007, 18(6):677-681.
- [7] Kristin B B, Gregory E B, Lee A J, et al. Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 139(3):161-167.
- [8] Bakke M, Sato T, Ichikawa K, et al. Histamine dehydrogenase from *Rhizobium* sp: Gene cloning, expression in *Escherichia coli*, characterization and application to histamine determination[J]. Journal of Biotechnol, 2005, 119(3):260-271.
- [9] Inmaculada C F, Karola B, Jos é M G, et al. Differential characterization of biogenic amine-producing bacteria involved in food poisoning using MALDI-TOF mass fingerprinting[J]. Electrophoresis, 2010, 31(6):1116-1127.
- [10] AOAC Method 35.1.32, method 977.13-1995. Histamine in seafood: Fluorometric method[S].
- [11] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].2版.北京:高等教育出版社,1997:143-151.
- [12] Innocente N, Biasutti M, Padovese M, et al. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract[J]. Food Chemistry, 2007, 101(3):1285-1289.
- [13] Costantini A, Cersosimo M, Prete V D, et al. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: Screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(2):391-396.
- [14] Lopez-Sabater E I, Rodriguez-Jerez J J, Herrnhdez-Herrero M, et al. Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barce-lona area[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 28(3):411-418.
- [15] Butler K B, Jones J L, Benner R, et al. Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for detection of Gram-negative histamine-producing bacteria in fish[J]. Food Microbiology, 2011, 28(3):356-363.
- [16] Butler K B, Bolton G E, Jaykus A, et al. Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 139(3):161-167.
- [17] Huang Y R, Liu K J, Hsieh H S, et al. Histamine level and histamine-forming bacteria in dried fish products sold in Penghu Island of Taiwan[J]. Food Control, 2010, 21(9): 1234-1239.
- [18] Hwang C C, Lee Y C, Huang Y R, et al. Biogenic amines content, histamine-forming bacteria and adulteration of bonito in tuna candy products[J]. Food Control, 2010, 21(6):845-850.
- [19] Dapkevicius M L, Nout M J R, Rombouts F M, et al. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 57(1/2):107-114.

- [20] Wanaporn T, Somboon T, Kirk L P, et al. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(2):92-99.
- [21] Renata G L, Martina H, Walter P H. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms [J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 39 (1/2):1-10.

Isolation of Histamine-degrading Enzyme Producing Bacteria from Mackerel and Characteration of Enzyme Concerned

OU Chang-rong¹, TANG Hai-qing^{2,3}, ZHANG Yu-qiong¹, ZHENG Jie¹, LI Hai-bo¹

(1.School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Ningbo Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of People's Republic of China, Ningbo 315012, China;

3.Imported Food Testing Service Center of Ningbo Free Trade Zone, Ningbo 315800, China)

Abstract: Marine fishes, scombroid species in paticular, are susceptible to producing histamine during processing and storage, as has been reported in incidents of scombroid fish poisoning. To understand the relationship between the producing and degrading of histamine and the microorganism concerned in fish, the bacterials with the capacity of producing histamine-degrading enzyme are screened from skin, flesh, entrails and gills of mackerel (*Pneumatophorus japonicus*) by plate and shaking flask culture, followed with testing the enzyme activity by pectrofluorimetry method. A gram-negative rod bacterium producing histamine-degrading enzyme is isolated from entrails of mackerel. The enzyme is presumed to be primary metabolite according to the growth and enzyme production curves. The optimum pH and temperature of the crude enzyme activity to histamine is found to be 7.2 and 35 °C respectively, and a high stability of the enzyme is observed at 20-35 °C and pH 6.0~8.0. It is activated by 5 mmol·L⁻¹ of ions such as Mn²⁺, Ca²⁺, Na⁺, Mg²⁺, K⁺, but inhibited by Zn²⁺, Al³⁺, Fe³⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, and completely inhibited by EDTA. The results of kinetic studies show that the kinetic parameter K_m of the enzyme was 0.22 mg·mL⁻¹, and the V_{max} of the enzyme is 156.25 U·mL⁻¹. This paoer presents the first domestic report on histamine-degrading enzyme producing bacteria, and the study is believed to be important to seek biological control of histamine in food processing in the future.

Key words: chub mackerel; histamine; histamine-degrading enzyme; enzymatic properties

(责任编辑 史小丽)