

乳酸菌半连续发酵虾头虾壳过程中甲醛的生成规律研究

段杉, 毛颖超

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 本文以嗜酸乳杆菌半连续发酵虾头、虾壳回收蛋白质和甲壳素。对半连续发酵过程中氧化三甲胺酶(TMAOase)酶活、甲醛含量以及 pH 值的变化进行监测, 初步探索了发酵过程中甲醛的生成规律。研究表明, 在发酵过程中, 当发酵液 pH 值为 4.5~5.0 时, TMAOase 活性最高, 半连续发酵五个批次的甲醛含量的变化趋势与 TMAOase 活性变化相一致, 说明 TMAOase 活性是造成甲醛含量增高的主要原因, 其中发酵至第五批时甲醛含量最高达 30.79 mg/kg。

关键字: 半连续发酵; 虾头虾壳; 氧化三甲胺酶; 甲醛

文章编号: 1673-9078(2013)1-1551-1554

Formation of Formaldehyde during Semi-Continuous Lactic Acid Fermentation of Shrimp Waste

DUAN Shan, MAO Ying-chao

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this paper, semi-continuous lactic acid fermentation was employed in shrimp waste fermentation to recover protein and chitin. The variation of TMAOase activity and the formation of formaldehyde with the change of pH during the fermentation were investigated, and the mechanism of formaldehyde formation production preliminary was explored. It was showed that the activity of the TMAOase achieved the highest when the pH of fermentation broth decreased to 4.5~5.0. The change of formaldehyde content coincided with the change of TMAOase activity during the five batches of semi-continuous fermentation. This illustrated that the activity of the TMAOase was the main reason for the formation of formaldehyde. The highest point of formaldehyde content was 30.79 mg/kg in the fifth batch.

Key words: semi-continuous fermentation; shrimp waste; TMAOase; formaldehyde

甲醛(HCOH)为中等毒性物质, 已经被世界卫生组织确定为致癌和致畸物质^[1]。水产品内源性甲醛是指在水产品中检测出并证明并非人为添加的甲醛含量, 包括各种水产品及其制品在保藏和加工过程中自身存在及产生甲醛的量。国外对水产品内源性甲醛生成机理进行了大量报道, 目前认为主要有两条生成途径: 一为酶催化分解, 二为非酶途径生成。其中氧化三甲胺(TMAO)代谢产生的内源性甲醛被认为是水产品中甲醛的主要来源^[2], Gill^[3]、Parkin^[4]得出 TMAOase 能催化 TMAO 转变为二甲胺和甲醛。甲醛产生的非酶途径主要涉及加热或高温条件下 TMAO 直接分解生成甲醛^[5]。

全球对虾产量丰富, 其中虾头虾壳占 40~48%,

收稿日期: 2013-03-06

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2010B090400295)

作者简介: 段杉(1966-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物化学及水产品综合利用; 毛颖超, 并列第一作者

这些对虾废弃物主要含有 40%蛋白质、35%的矿物质和 14~30%的甲壳素, 且含有少量的虾青素^[6-7]。目前国内外利用虾头虾壳的主要方法是将其干燥粉碎作饲料; 或用化学法生产甲壳素。该法污染严重, 且无法全面利用各种成分。较新的技术是以乳酸菌发酵虾头、虾壳同时回收甲壳素、蛋白质和虾青素^[8-11]。本研究小组曾利用从对虾中筛选到的一株嗜酸乳杆菌 SW01 发酵虾头虾壳, 可有效回收甲壳素和蛋白质^[12], 并采用半连续发酵方式, 节约了接种成本, 缩短了发酵周期。

虾头虾壳中含有丰富的 TMAO 和 TMAOase, 在发酵过程中是否产生甲醛目前是未知的, 国内外均未有相关研究报道。如果该发酵过程中有甲醛产生, 则甲醛将使蛋白质交联^[13], 可能会影响蛋白酶水解, 同时甲醛也会影响回收的蛋白质的安全性。本文通过对半连续发酵过程中甲醛含量的变化的监测, 初步探索该发酵过程中甲醛生成的规律和影响因素, 进而为控

制甲醛的产生提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

虾头、虾壳：由阳江市谊林海达速冻水产有限公司提供。

菌种：从虾头中分离出的嗜酸乳杆菌 SW01，中国典型培养物保藏中心保藏，保藏号 CCTCC NO: M2011035。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵条件

半连续发酵条件如下：以虾头、虾壳重量为 100% 计，加入 15% 葡萄糖(m/m)，嗜酸乳杆菌 SW01 接种量 10%(m/m)，固液比 1:0.5，每批次 40 °C 发酵 48 h，接种龄为 24 h，即上一批原料发酵至 24 h，取出大部分发酵产物继续发酵 24 h，留下 10%(m/m) 发酵液，并补充新鲜原料，利用上一批原料中的乳酸菌作菌种继续发酵。

1.2.2 甲醛的测定

参考 SC/T 3025-2006《水产品中甲醛的测定》，绘制标准曲线为 $Y=0.0139x-0.0008$ ， $R^2=0.9994$ 。其中样品测定的前处理参考杨艺娟（2008）加热浸泡法^[14]进行。

1.2.3 TMAOase 活性的测定

TMAOase 活性通过测定产生的甲醛来衡量，以 TMAO (Sigma 公司) 为底物，并添加一些辅助因子^[15]。具体方法如下：5 mL 测定混合体系中包括 Tris-醋酸溶液 (120 mmol/L, pH 7.0)、TMAO (24 mmol/L)、Cys (2.4 mmol/L)、Vc (2.4 mmol/L) 和 FeCl₂ (0.24 mmol/L)，加入 1 mL 适当稀释的酶粗提液起始反应，在 25 °C 精确反应 20 min 后，在混合物中加入 2 mL 10% 的三氯乙酸终止反应。反应混合物在 8000 g 离心 15 min，上清液用来检测其中的甲醛含量。空白以同样的方法测定，但是，加入 2 mL 10% 的三氯乙酸之后再加入酶粗提液。规定在该反应条件下，1 min 内产生的 1 μmol 甲醛所需酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

2 结果与讨论

2.1 半连续发酵前两批次甲醛的变化规律

由图 1、2 可以看出，在第一批次发酵的前期(0~8 h)，pH 值从初始 7.8 降至 4.0 之间，随着 pH 值降低，甲醛含量和 TMAOase 的活性急剧的升高，发酵的第 6 h，此时 pH 值在 4.5 左右，甲醛含量和 TMAOase 的活性达到最大值。随着发酵时间延长，甲醛含量和

TMAOase 的活性逐渐降低，在发酵的 6~24 h，甲醛含量和 TMAOase 的活性下降趋势明显。24~48 h 随着发酵时间的延长，变化趋势不明显。这是由于 pH 值小于 4.0 时，抑制了 TMAOase 的活性，分解 TMAO 产生甲醛的减弱。

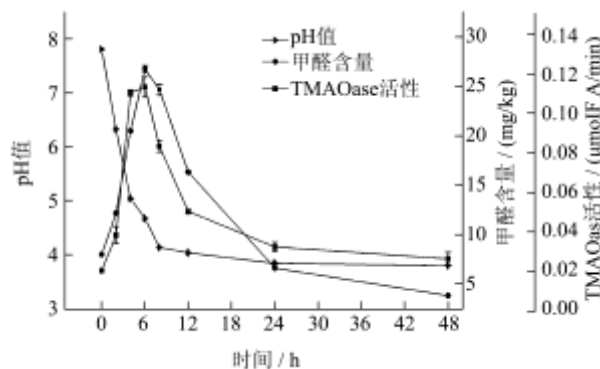


图 1 半连续第一批发酵过程中甲醛含量和 TMAOase 的活性的变化

Fig.1 The change of formaldehyde content and TMAOase activity in the 1st batch of semi-continuous fermentation

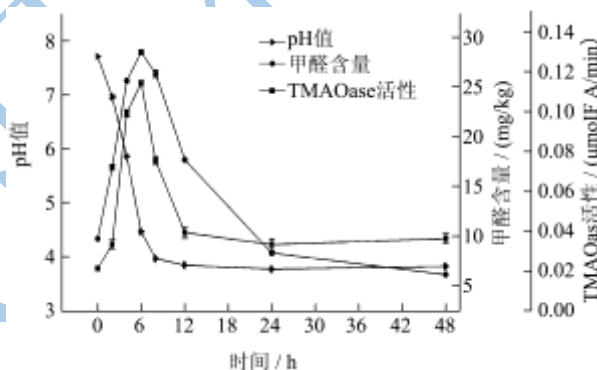


图 2 半连续第二批发酵过程中甲醛含量的变化

Fig.2 The change of formaldehyde content and TMAOase activity in the 2nd batch of semi-continuous fermentation

2.2 半连续发酵后第三批甲醛的变化规律

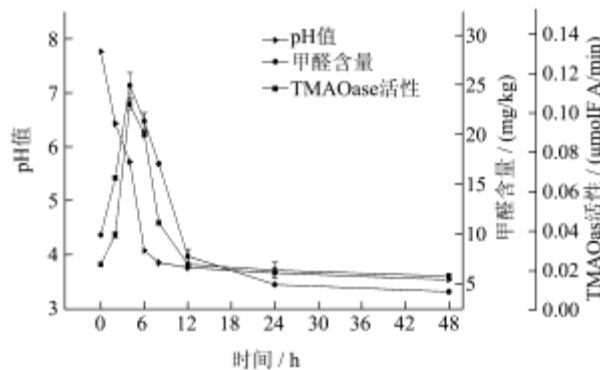


图 3 半连续第三批发酵过程中甲醛含量的变化

Fig.3 The change of formaldehyde content and TMAOase activity in the 3rd batch of semi-continuous fermentation

由图 3 可知，当半连续发酵接种至第三批时，在发酵的第 4 h 时，pH 值已降至 4.5 以下，此时甲醛含

量和 TMAOase 活性已升至最高,但生成的甲醛含量已明显低于前两批的最值,在 4~12 h,甲醛含量和 TMAOase 的活性随着 pH 值的降低迅速下降,在发酵的中后期甲醛含量和 TMAOase 的活性缓慢降低。

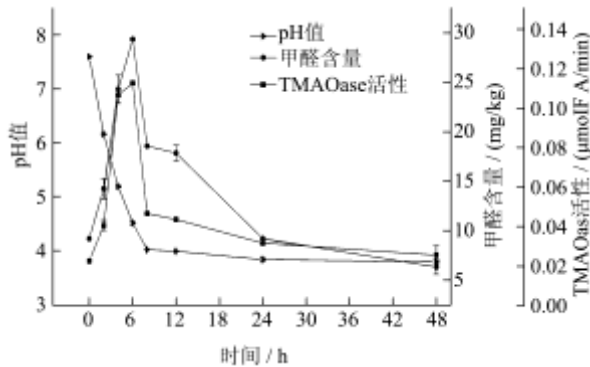


图4 半连续第四批发酵过程中甲醛含量的变化

Fig.4 The change of formaldehyde content and TMAOase activity in the 4th batch of semi-continuous fermentation

由图4可知,半连续发酵第四批的0-6 h的甲醛含量和 TMAOase 的活性上升趋势与第一、二批相似。在 pH 值小于 4.0 时, TMAOase 的活性被抑制,而甲醛的生成量较前三批有所增加。有研究表明,在发酵性食品中,微量的甲醛有可能是发酵过程中存在的微生物代谢产生的,或是某些成分的自动氧化产生的^[16]。目前报道无色杆菌属中有 20~40% 的种属可能具有还原 TMAO 的能力,交替单胞菌和弧菌中也有部分种属具有还原能力,动物肠道中的肠杆菌科也证实存在具有还原 TMAO 能力的细菌^[17]。在半连续发酵过程中,乳酸菌与污染的杂菌同时存在,随着发酵批次的增加,体系的菌相随时可能发生变化,不排除微量甲醛的产生会由此类具有还原 TMAO 能力的细菌产生。

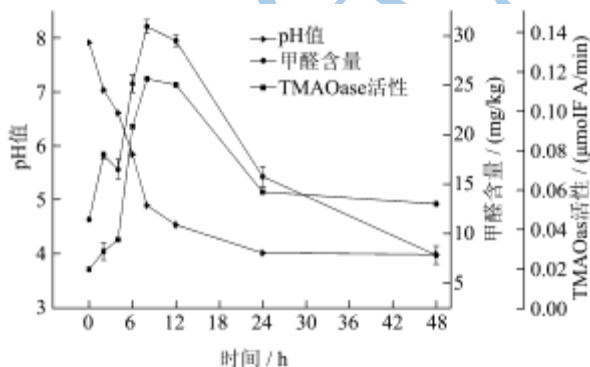


图5 半连续第五批发酵过程中甲醛含量的变化

Fig.5 The change of formaldehyde content and TMAOase activity in the 5th batch of semi-continuous fermentation

由图5可知,当半连续发酵批次增加至第五批次时,发酵液 pH 值的下降趋势明显低于前四批,而发酵的前 12 h 甲醛含量和 TMAOase 的活性略高于前四个批次,其最值分别达到 30.79 mg/kg 和 0.116 U。

从图1到图5可以看出,采用半连续发酵工艺每批次发酵 48 h 结束时甲醛的含量明显低于发酵初始时甲醛的含量,且甲醛含量生成的高峰期都在发酵前期,即嗜酸乳杆菌 SW01 的对数生长期。当发酵液酸度处于较高水平, pH 较低时,高酸环境使得 TMAOase 酶活急剧下降,抑制了 TMAOase 对 TMAO 的分解程度。可见半连续发酵工艺的不同批次产生的甲醛含量和酶活稍有不同,但总体生成规律趋势相似。

Benjakul 等人发现,从鲮鱼肾脏中提取的 TMAOase 的最适 pH 为 7.0^[18]。鲮鱼肌原纤维中的也是中性时表现出最佳活性^[15]。但 Rehbeil 从鲮鱼内脏,包括肾脏、脾脏、幽门盲肠中获得的 TMAOase 的最适 pH 为 4.5~5.0^[19]。Harada 发现来自鲮鱼肝脏的 TMAOase 的最适 pH 为 5.0^[20], Gill 等认为鲮鱼肾脏中 TMAOase 是一种多酶体系,用等电聚焦方法分离出至少四种同工酶,其中最主要的一种酶结合在溶酶体膜上,在绿鲮肾脏中分离出三种酶,最适 pH 为 5.0,且酶活性不受氧气浓度影响^[3]。Joly 等通过阴离子交换层析,从绿鲮肾脏中分离出三种高分子量(200~2000 kDa)的独立的氧化三甲胺同工酶,它们的等电点不同,分别是 4.1、4.5、5.0^[21]。可以看出,不同来源的 TMAOase 其最适 pH 差异较大。

本实验中甲醛含量变化与 TMAOase 活性的变化趋势一致,因此,推测本发酵过程中甲醛主要由 TMAOase 的催化产生。甲醛含量未发生积累,推测其原因如下:由于本实验半连续发酵过程中以透气的硅胶塞封口,少部分生成的甲醛可挥发出去;溶于水的甲醛与发酵液中的蛋白质、氨基酸反应被消耗,但参与反应的蛋白质、氨基酸等也被破坏。甲醛的产生会影响蛋白质的水解;并且无论进一步将发酵液加工为食品还是饲料,甲醛的存在都将危害发酵液的安全性。因此如何有效抑制 TMAOase 活性,从而控制甲醛的生成量还有待进一步研究。

3 结论

本实验监测了半连续乳酸菌发酵虾头虾壳过程中甲醛含量和氧化三甲胺酶活性的变化。结果发现,发酵过程中 TMAOase 有一定活性,并且其活性随着发酵产酸的变化而变化。TMAOase 催化作用是本发酵过程中产生甲醛的主要途径。甲醛的生成量也随 TMAOase 活性变化同步变化。

参考文献

- [1] 李颖畅,朱军莉,励建荣.水产品中内源性甲醛的产生和控制研究进展[J].食品工业科技,2012,33(8):406-408

- [2] 马敬军,周德庆.水产品中甲醛本底含量与产生机理的研究进展[J].海洋水产研究,2004,8(4):85-88
- [3] Gill T A, Paulson A T. Localization, characterization and partial purification of TMAO-ase [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1982, 71B:49-56
- [4] PARKIN K L, HULTIN H O. Characterization of trimethylamine-N-oxide (TMAO) demethylase activity from fish muscle microsomes [J]. *Journal of Biochemistry*, 1986, 100: 77-86
- [5] 励建荣,朱军莉.食品中内源性甲醛的研究进展[J].中国食品学报,2011,11(9):247-257
- [6] 刘斯雅,林瑞君,庄泽娟,等.植物乳杆菌发酵虾头虾壳回收蛋白质和甲壳素的研究[J].现代食品科技,2011,27(4):408-411,383
- [7] 张祥刚,周爱梅,林晓霞,等.南美白对虾虾头、虾壳化学成分的对比研究[J].现代食品科技,2009,25(3):224-227
- [8] Cira L A, Huerta S, Hall, G M, et al. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery [J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37: 1359-1366
- [9] Duan S, Li L, Zhuang Z J, et al. Improved production of chitin from shrimp waste by fermentation with epiphytic lactic acid bacteria [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 89, 1283-1288
- [10] Pacheco N, Garnica-González M, Ramírez-Hernández J Y, et al. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 2849-2854
- [11] Rao M S, Stevens W F. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan [J]. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 2005, 80: 1080-1087
- [12] 李磊,庄泽娟,段杉,等.以共附生乳酸菌发酵虾头虾壳[J].食品与发酵工业,2011,37(6):82-86
- [13] Simeonidou S, Govaris A, Varelziz K. Quality assessment of seven Mediterranean fish species during storage on ice [J]. *Food Research International*, 1997, 30(7): 479-484
- [14] 叶艺娟,周国惠,陈轶男.乙酰丙酮法测定食品中甲醛及前处理方法探讨[J].海峡预防医学杂志,2008,14(4):50-51
- [15] Kimura M, Seki N, Kimura I. Purification and characterization of trimethylamine-N-oxide demethylase from walleye pollack muscle [J]. *Fisheries Science*, 2008, 66: 967-973
- [16] 刘金峰,钱家亮,武光明.啤酒生产中甲醛残留量控制[J].中国酿造,2010,37(5):57-59
- [17] 郭修娟.氧化三甲胺代谢相关菌的研究[D].青岛,中国海洋大学,2011
- [18] Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M, et al. Partial purification and characterization of trimethylamine-N-oxide demethylase from lizardfish kidney [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 2003, 135(2): 359-371
- [19] Rehbein H, Schreiber W. TMAOase activity in tissue of fish species from the northeast Atlantic [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 1984, 79: 447-452
- [20] Harada K. Studies on enzymes forming formaldehyde and dimethylamine in fish and shellfish [J]. *Shimonoseki Univ. Fish*, 1975, 23: 163-241
- [21] Joly A, Cottin P, Hanching L, et al. Trimethylamine N-oxide Demethylase (TMAO-ase) of saithe (*Pollachius virens*) kidney: a study of some Physicochemical and enzymic properties kidney [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1992, 59: 261-267

欢迎订阅 EI 收录期刊、中文核心期刊 《现代食品科技》

邮发代号：46-349 刊号：ISSN 1673-9078/CN 44-1620

每期定价 15 元，全年 12 期仅 180 元。欢迎食品及相关行业的机构和科学工作者到各地邮局订阅，并踊跃投稿或建立广告宣传 and 产学研合作关系。

地址：广州五山华南理工大学轻工与食品学院麟鸿楼 508，邮编：510640

电话：020-87112373, 87113352, 87112532

E-mail: xdspkj@vip.sohu.com