

文章编号: 1000-0615(2017)06-0845-09

DOI: 10.11964/jfc.20161210642

## 金乌贼肌肉中三甲胺脱甲基酶的分离纯化及酶学性质

金洋, 薛张芝, 张洪超, 宋正规, 朱仁义, 步婷婷, 李和生\*

(宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

**摘要:** 为了提取纯化金乌贼肌肉中的三甲胺脱甲基酶(TMAOase), 本研究采用含有0.1 mol/L NaCl、pH 7.0、浓度为20 mmol/L的三羟甲基氨基甲烷(Tris)-醋酸缓冲液提取粗酶液, 经透析、浓缩处理后, 通过DEAE-52阴离子交换柱层析和Sephacryl S-300柱层析得到了纯化的TMAOase, 并对其酶学性质进行了研究。结果显示, 经Sephacryl S-300柱层析的TMAOase相比粗酶纯化了209.54倍; 粗酶和纯化酶的最适温度分别为55和50 °C, 当温度高于最适温度时, 酶活性开始出现显著下降, 粗酶在80 °C仍残留21.9%的活性; 而纯化酶在80 °C时, 几乎检测不到酶活; 粗酶和纯化酶的最适pH均为7.0, 中性条件下表现稳定, 在酸性和碱性条件下稳定性下降, pH为9.0时, 粗酶残留60.7%的活性, 而纯化酶的活性仅为20.5%。以双倒数作图法(Lineweaver-Burk法)测得纯化的TMAOase的 $K_m$ 值为22.8 mmol/L; 经SDS-PAGE电泳分析, 测得其分子量为21.3 ku; 在化学物质中, 柠檬酸和CaCl<sub>2</sub>对酶活性具有显著的促进作用, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Na<sub>2</sub>S对TMAOase活性有显著抑制作用。

**关键词:** 金乌贼; 肌肉; 三甲胺脱甲基酶; 纯化; 酶学性质

**中图分类号:** S 912; TS 254.1

**文献标志码:** A

金乌贼(*Sepia esculenta*)又名墨鱼, 乌鱼, 主要分布于东亚海域。金乌贼的全球年产量在所有乌贼中高居第2位, 是我国北方海域经济价值最大的乌贼<sup>[1]</sup>, 与大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、小黄鱼(*L. polyactis*)、带鱼(*Trichiurus lepturus*)并称为我国传统四大海产。金乌贼可食部分约占总体质量的92%, 富含钙、磷、铁等矿物元素, 每百克乌贼肉中含蛋白质13 g, 脂肪仅0.7 g, 是一种高蛋白低脂肪的食品, 其肉厚、味美, 可鲜食, 亦可加工成墨鱼干, 雄性生殖腺干品为乌鱼穗, 雌性缠卵腺干品为乌鱼蛋, 均是海味中的佳品, 深受大众喜爱。

金乌贼在冷藏冷冻过程中, 组织中的三甲胺脱甲基酶(TMAOase)催化底物氧化三甲胺(TMAO)分解成三甲胺(TMA)、二甲胺(DMA)和甲醛(FA)<sup>[2]</sup>。FA可引起蛋白质变性<sup>[3]</sup>, 导致肉质

发生变化。以往研究表明, 该酶主要分布在如茎柔鱼(*Dosidicus gigas*)等鱿鱼或墨鱼的肝脏、脾脏和红肌中<sup>[4]</sup>, 在白肌<sup>[5]</sup>中很少; 但国外研究发现太平洋鳕(*Gadus macrocephalus*)<sup>[6]</sup>和明太鱼(*Theragra chalcogramma*)等<sup>[7]</sup>的白肌中也存在TMAOase。贾佳<sup>[8]</sup>对茎柔鱼的研究发现, 肌肉中的TMAOase酶(粗酶)最适作用温度和pH分别为50 °C和7.0。冯慧等<sup>[9]</sup>也对印度洋鳶乌贼(*Symlelectoteuthis oualaniensis*)肌肉中的粗酶和纯化后的TMAOase进行了研究, 得出纯化后的TMAOase分子质量为18.2 ku, 最适温度和pH分别为55 °C和7.0, 且该酶在50 °C和pH 7.0~9.0具有很好的稳定性。

TMAOase的分离纯化是研究酶学性质的前提和基础, 比较常用的方法有硫酸胺沉淀法<sup>[10]</sup>、等电点分离法<sup>[11]</sup>、离子交换层析法<sup>[12]</sup>、DEAE-Sephacel弱阴离子交换色谱<sup>[13]</sup>和凝胶过滤法<sup>[14]</sup>。

收稿日期: 2016-12-14 修回日期: 2017-03-07

资助项目: 浙江省重大科技专项(2009C03017-3); “水产”浙江省重中之重学科开放基金(xkzsc1523); 宁波市自然科学基金(013A610156)

通信作者: 李和生, E-mail: lihesheng@nbu.edu.cn

以往研究发现,可利用基因工程合成TMAOase,其纯度高,特异性好<sup>[15-16]</sup>。目前国内外已有对于该酶在鲑鱼加工等方面的研究<sup>[17-18]</sup>,但在金乌贼中的相关研究鲜见报道,因此本实验针对金乌贼中TMAOase的分离纯化方法及其酶学性质进行研究,为进一步阐明金乌贼在贮藏过程中产生甲醛的机理提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

金乌贼购于宁波江北路林市场; SDS-PAGE蛋白电泳试剂,南京生兴生物技术有限公司; 标准氧化三甲胺(TMAO):分析纯, Sigma公司; Sephacryl S-300填料:分析纯, GE Healthcare Bio-Science AB公司; DE-52填料:分析纯, Whatman公司; PEG20000:分析纯,北京Solarbio公司。

### 1.2 实验仪器

GL21MC型冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; DS-1高速组织捣碎机,上海精科实业有限公司; UV-3300型紫外分光光度计,上海美谱达仪器有限公司; HL-2数显恒流泵、TH-300梯度混合器、HD-3紫外检测仪、HD-A层析图谱采集分析仪、SBS-100数控计滴自动部份收集器,上海沪西分析仪器厂有限公司; ZD-2自动电位滴定仪,上海精密科学仪器有限公司; VE-180电泳系统,上海天能科技有限公司。

### 1.3 实验方法

**肌肉粗酶液的提取** 将金乌贼肌肉在室温下解冻,称取10 g样品,以1:5的比例加入抽提液(0.1 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-乙酸),混合匀浆90 s,离心(10 000 r/min, 4 °C, 30 min),取上清液;然后用1 mol/L HCl将其酸化,调节pH至4.5后,离心(10 000 r/min, 4 °C, 30 min)除去杂蛋白;最后用1 mol/L NaOH调节pH至6.0,继续离心(10 000 r/min, 4 °C, 30 min),取上清液,即为酸化的粗酶液。将其装入透析袋(截留分子量7000 u),以20 mmol/L Tris-乙酸缓冲液(含有5 mmol/L Ca<sup>2+</sup>)作为透析液,在4 °C下透析过夜,得到粗酶液。

**DE-52阴离子柱层析** 离子交换采用DEAE-52填料为介质,用20 mmol/L Tris-乙酸缓冲液(含有5 mmol/L Ca<sup>2+</sup>, pH 7.0)洗脱平衡色谱柱(1.8 cm×50 cm),将粗酶液上柱,以0~0.5 mol/L NaCl缓冲

液进行线性梯度洗脱。控制流速为1 mL/min,每管收集5 mL,用紫外检测仪于280 nm测定吸光值,合并比活力较高的部分洗脱液,用截流分子质量为10 000 u的膜离心超滤后,再以PEG20000浓缩,冷藏待后续处理。

**Sephacryl S-300凝胶柱层析** 先以洗脱液平衡,然后将浓缩样品上柱,洗脱流速为0.4 mL/min,分步收集,每管2.5 mL,同时用紫外检测仪于280 nm测定吸光值,绘制洗脱曲线,并同时检测酶活性,将活性高的峰合并收集。

**TMAOase的活性** 参考Kimura等<sup>[19]</sup>的测定方法。根据酶催化TMAO生成等比例的甲醛与二甲基乙酰胺(DMA)的反应, TMAOase酶活性测定以生成产物甲醛为准。反应液中含有20 mmol/L TMAO、2 mmol/L半胱氨酸(Cys)、2 mmol/L抗坏血酸(Asc)、0.2 mmol/L FeCl<sub>2</sub>和20 mmol/L Tris-乙酸(pH 7.0),加入酶液,25 °C反应15 min后加入10% TCA(三氯乙酸)终止反应,经8500 r/min离心15 min后,取1 mL上清液测定甲醛含量。在相同条件下,分别以不加酶液的反应液和不加反应液的酶液作为阴性对照。

**SDS-PAGE电泳测分子量** SDS-PAGE电泳根据Kimura等<sup>[19]</sup>的方法。15%的分离胶,4%的浓缩胶,150 V恒压电泳,微量进样器吸取5 μL蛋白溶液进行150 V恒压电泳,待溴酚蓝到达底部时停止电泳,时间约为150 min。

电泳完成后将胶取出,放入大培养皿中,加入染色液(0.1%考马斯亮蓝R-250染色,甲醇:冰醋酸:蒸馏水体积比为45:10:45),摇床染色1h。回收染色液后加入脱色液(甲醇:冰醋酸:蒸馏水体积比为25:10:65),在摇床上脱色过夜,直至蛋白条带可清晰辨认。

**最适温度与热稳定性的测定** 将粗酶液和提纯的酶液分别于25~80 °C恒温水浴1 h。取出后加入1.0 mL 10% TCA混匀,迅速流水冷却,然后测定反应液中甲醛的含量。以最大酶活性为100%,计算相对酶活。

**热稳定性试验**:将粗酶和纯化的酶液在不同温度(25~80 °C)下水浴1 h后,测定酶的残余活性,以初始温度25 °C下酶活性为100%,计算相对酶活。

**最适pH及其稳定性** 将粗酶和纯化的酶液在pH为4.5~9.0的反应液中测定酶活性,用乙酸调节pH至4.5~6.5,用100 mmol/L Tris-HCl缓冲液

调节pH至6.5~9.0, 以最大酶活性为100%, 计算相对酶活。

pH稳定性试验: 将粗酶和纯化酶置于不同pH (4.5~9.0)缓冲液中, 45 °C下静置2 h后, 测定酶的残余活性, 以最大酶活性为100%, 计算相对酶活。

酶促反应动力学 以不同浓度的TMAO为底物, 在20 mmol/L Tris-醋酸溶液(pH 7.0)、2 mmol/L Cys、2 mmol/L Asc和0.2 mmol/L FeCl<sub>2</sub>混合液中加入纯化的酶液, 50 °C下测定前10 min酶活性。以双倒数作图法(Lineweaver-Burk法), 求出TMAOase对TMAO的K<sub>m</sub>值。

化学物质对酶活性的影响 将2 mmol/L Cys、2 mmol/L Asc、0.2 mmol/L FeCl<sub>2</sub>共同添加到20 mmol/L Tris-醋酸溶液(pH 7.0)、20 mmol/L TMAO标准反应体系中, 以此作为反应液。向纯化的酶液中分别加入添加剂, 4 °C作用30 min, 再加入上述反应液, 测定其残留酶活。添加剂分别为2~10 mmol/L的柠檬酸(citric acid, CA)、Na<sub>2</sub>S和CaCl<sub>2</sub>以及0.06%~0.30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。以不加入任何添加剂的酶活性为100%, 计算相对酶活。

蛋白质的测定 按Lowry等<sup>[20]</sup>的方法, 在波长280 nm处比色测定。

甲醛的测定 按乙酰丙酮分光光度法<sup>[21]</sup>, 在波长414 nm处比色测定。

数据分析 采用Origin 8.5进行数据处理与分析, 实验设3个平行, 结果以平均值±标准差(mean±SD)表示, 采用SPSS 17.0 ANOVA进行方差分析, P<0.05为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 TMAOase的分离纯化

DE-52离子交换柱层析 将透析后的粗酶液上样, 经NaCl溶液线性梯度洗脱后, 用紫外检测仪在280 nm处检测并采集图谱(图1)。金乌贼肌肉粗酶在DE-52离子交换洗脱后, 在6~12管之间出现第1个蛋白峰, 说明洗脱液中含有一定量的蛋白质, 但没有检测出TMAOase的酶活, 故为无酶活性的杂蛋白。当洗脱至第40~60管时, 出现较明显的蛋白峰, 在第42~58管检测出TMAOase的酶活, 且与蛋白峰基本重叠, 在第48管酶活达到最高, 其纯化倍数为粗酶的130.92倍。收集该洗脱峰, 经浓缩后, 上样于Sephacryl S-300柱层析。

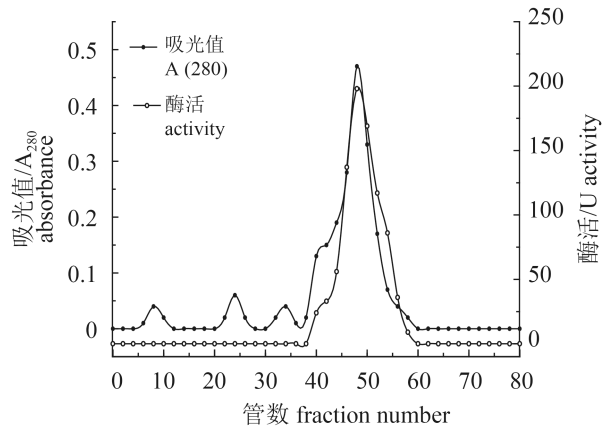


图1 TMAOase的DE-52离子交换洗脱曲线  
Fig. 1 Elution profile of TMAOase by DE-52 ion exchange column chromatograph

Sephacryl S-300凝胶柱层析 经Sephacryl S-300凝胶柱层析后得到的纯化酶在26~45管有较好的洗脱峰, 且峰型基本对称(图2)。在30~40管有明显的TMAOase酶活性。收集此组分, 进行纯度检验以及酶学性质研究。

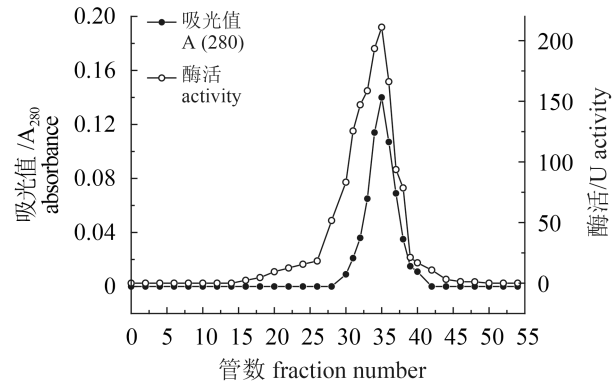


图2 TMAO酶的Sephacryl S-300凝胶层析洗脱曲线  
Fig. 2 Elution curve of TMAOase by Sephacryl S-300 Gel column chromatograph

用0.1 mol/L NaCl与pH 7.0的20 mmol/L Tris-醋酸缓冲液提取金乌贼肌原纤维中的TMAOase, 后经酸碱处理去除杂蛋白, TMAOase纯化4.13倍, 产率达到79.45%。经DE-52阴离子交换柱和Sephacryl S-300凝胶柱层析后, 纯化了209.54倍, 产率为31.72%(表1)。

### 2.2 TMAOase的性质

酶的分子量 将经DE-52阴离子交换柱和Sephacryl S-300凝胶柱层析后得到的样品分别经SDS-PAGE电泳分析、考马斯亮蓝R-250染色脱

表 1 金乌贼肌肉TMAOase的分离纯化过程

Tab. 1 Purification process of TMAOase from muscles of *S. esculenta*

纯化过程 purification process	总酶活/U total enzyme activity	总蛋白/mg total protein	比活力/(U/mg) specific activity	纯化倍数 purification fold	产率/% yield
粗提液 crude extraction	602.4	2512.7	0.24	1.00	100.00
酸碱处理 acid-base treatment	478.6	483.0	0.99	4.13	79.45
DE-52	389.6	12.4	31.42	130.92	64.67
Sephacryl S-300	191.1	3.8	50.29	209.54	31.72

色后得到单一的条带(图3), 得出金乌贼肌肉中TMAOase的分子量为21.3 ku。

TMAOase的最适温度及热稳定性 以TMAO为底物, 粗酶和纯化酶在不同温度水浴1 h后,

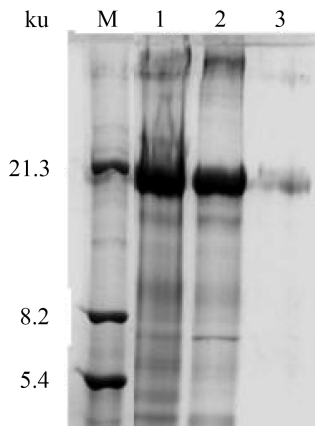


图 3 金乌贼肌肉TMAOase的SDS-PAGE图谱

M. 标准分子质量, 1. 粗酶液, 2. DE-52, 3. Sephacryl S-300

Fig. 3 SDS-PAGE pattern of TMAOase from *S. esculenta* muscle

M. standard molecular weight, 1. crude enzyme, 2. DE-52, 3. Sephacryl S-300

随着温度的升高, 酶活性先上升后下降, 粗酶和纯化酶的最适温度分别为55和50 °C, 当温度高于最适温度时, 酶活性开始出现显著下降 ( $P < 0.05$ ), 粗酶在80 °C仍残留21.9%的活性, 而纯化酶在80 °C时, 几乎检测不出酶活(图4-a)。

金乌贼肌肉中提取的粗酶和纯化酶的热稳定性在低于50 °C时较好, 高于50 °C时, 纯化酶活性迅速降低, 说明50 °C是其热稳定性的拐点, 当温度升高至70 °C时, 纯化酶活性仅为6.4%; 而粗酶在80 °C时仍具有95.7%的活性(图4-b)。

TMAOase的最适pH及其稳定性 随着pH值的上升, 粗酶和纯化酶的活性先升高后降低, 2种酶在pH 6.5~7.5均表现出很高的活性, 其中pH 7.0时, 酶的活性达到最高(图5-a)。而在酸性和碱性条件下, 酶活性下降明显。

粗酶和纯化酶在不同pH下保持2 h后, 在pH 7.0时稳定性最高, 在酸性或碱性条件下, 酶的稳定性都有所降低。粗酶在pH 5.5~7.5时仍能保持较高稳定性, 而纯化酶的稳定性在酸性和碱性条件下, 下降均较为明显(图5-b)。

酶促反应动力学 利用双倒数作图法, 得

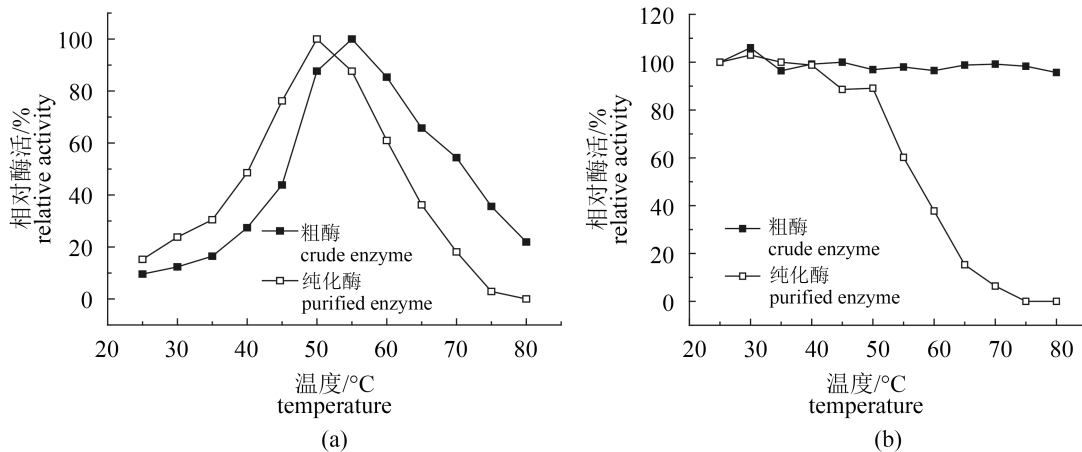


图 4 粗酶和纯化酶的最适温度(a)及热稳定性(b)

Fig. 4 Optimal temperature (a) and thermal stability (b) of crude and purified TMAOase

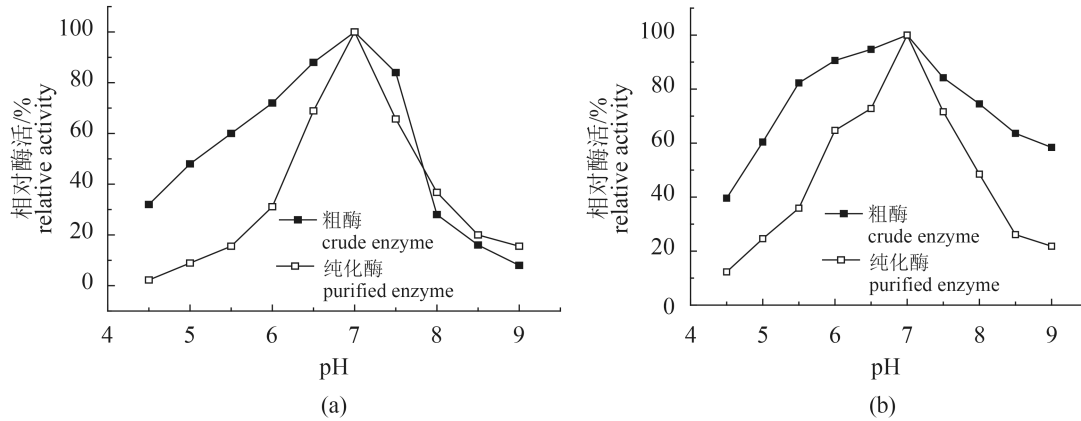


图5 粗酶和纯化酶的最适pH(a)及其稳定性(b)

Fig. 5 The optimum pH (a) and pH stability (b) of crude and purified TMAOase

出金乌贼肌肉中TMAOase米氏常数。反应速率与底物浓度的拟合方程为 $Y=13.349X+0.574(R^2=0.9972)$ , 计算出酶的 $K_m$ 值为22.8 mmol/L。

#### 化学物质对TMAOase纯化酶活性的影响

将不同浓度的CA、CaCl<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Na<sub>2</sub>S加入粗酶以及纯化的酶液中, 分别于4℃下作用30 min。结果显示, CA对酶活性具有显著的促进作用( $P<0.05$ ); 相比粗酶, CA对于纯化酶活性的提升更明显, 当CA浓度为10 mmol/L时, 纯化酶的酶活达到原来的2.12倍; CaCl<sub>2</sub>对纯化酶活性亦具有显著的促进作用( $P<0.05$ ), 但不同浓度之间的差异不显著( $P>0.05$ )。当添加剂浓度低于6 mmol/L时, 酶活性增加显著( $P<0.05$ ), 高于该值则不显著增长( $P>0.05$ ); Na<sub>2</sub>S和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对于酶活性的抑制作用显著( $P<0.05$ ), 当Na<sub>2</sub>S的浓度在10 mmol/L、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的浓度在0.30%时, 均可使TMAOase纯化酶完全失活, 而粗酶在此条件下仍具备一定的活性(图6)。

### 3 讨论

本研究运用DE-52阴离子交换柱层析和Sephacryl S-300柱层析的纯化方法, 对金乌贼肌肉中的TMAOase进行纯化, 纯化倍数达到了209.54, 与Kimura等<sup>[19]</sup>对于明太鱼的研究结果基本相符。而冯慧等<sup>[9]</sup>使用此方法对印度洋鸚乌贼进行了研究, 其纯化酶相比于粗酶纯化了300倍, 说明印度洋鸚乌贼肌肉中的TMAOase更适用于此法纯化。通过SDS-PAGE电泳分析, 得到该酶的分子量为21.3 ku, 这与冯慧等<sup>[9]</sup>的研究相类似, 但与其他鱼体中提取的相似的酶有很大区别, Benjakul等<sup>[22]</sup>从蛇鲻(*Saurida filamentosa*)的肾脏中部分提

取了TMAOase, 且纯化了82倍, 分子质量为128 ku。Kimura等<sup>[19]</sup>从明太鱼肌肉中得到了13 260倍的纯化率和产率为13%的TMAOase, 且通过Sephacryl S-300测得分子质量为400 ku。

Kimura等<sup>[23]</sup>对明太鱼肌纤维中TMAOase最适温度的研究发现, TMAOase在25℃比较稳定, 加热到50℃时就会失活。朱军莉等<sup>[24]</sup>也发现了茎柔鱼肾脏和肌肉中酶的最适反应温度为40~50℃。这说明提取原料不同, TMAOase的最适温度存在一定差异。且TMAOase在海产动物组织中分布广泛, Rehbein等<sup>[25]</sup>在中国东海和南海海域检测的300种海洋鱼类中, 均检测到TMAOase活性。

在热稳定性实验中, 本实验结果与冯慧等<sup>[9]</sup>对印度洋鸚乌贼肌肉中TMAOase的研究相似, 在低于50℃时, 粗酶与纯化酶均保持较高的热稳定性。在加工贮藏中, 尤其在乌贼的干制过程中, 热风干燥的温度基本稳定在40~50℃, 在此温度下TMAOase依然保持较高的热稳定性, 这会对乌贼干制品的品质带来不利的影响<sup>[26]</sup>。

Fu等<sup>[27]</sup>研究茎柔鱼肌肉中酶的最适pH为7.0, Benjakul等<sup>[22]</sup>同样发现, 从蛇鲻肾脏中提取的TMAOase的最适pH也为7.0。这与本研究的金乌贼肌肉中酶的最适pH为7.0的情况基本一致。这是由于酸碱条件下的电荷排斥, 引起酶的结构发生改变, 导致酶的活性降低, 所以TMAOase在中性条件下活性较高<sup>[28]</sup>。且在乌贼生产加工过程中的一些处理方法, 如酸化或碱化有助于降低TMAOase的活性, 从而减少甲醛的产生<sup>[29]</sup>。

印度洋鸚乌贼TMAOase的 $K_m$ 值为24.7

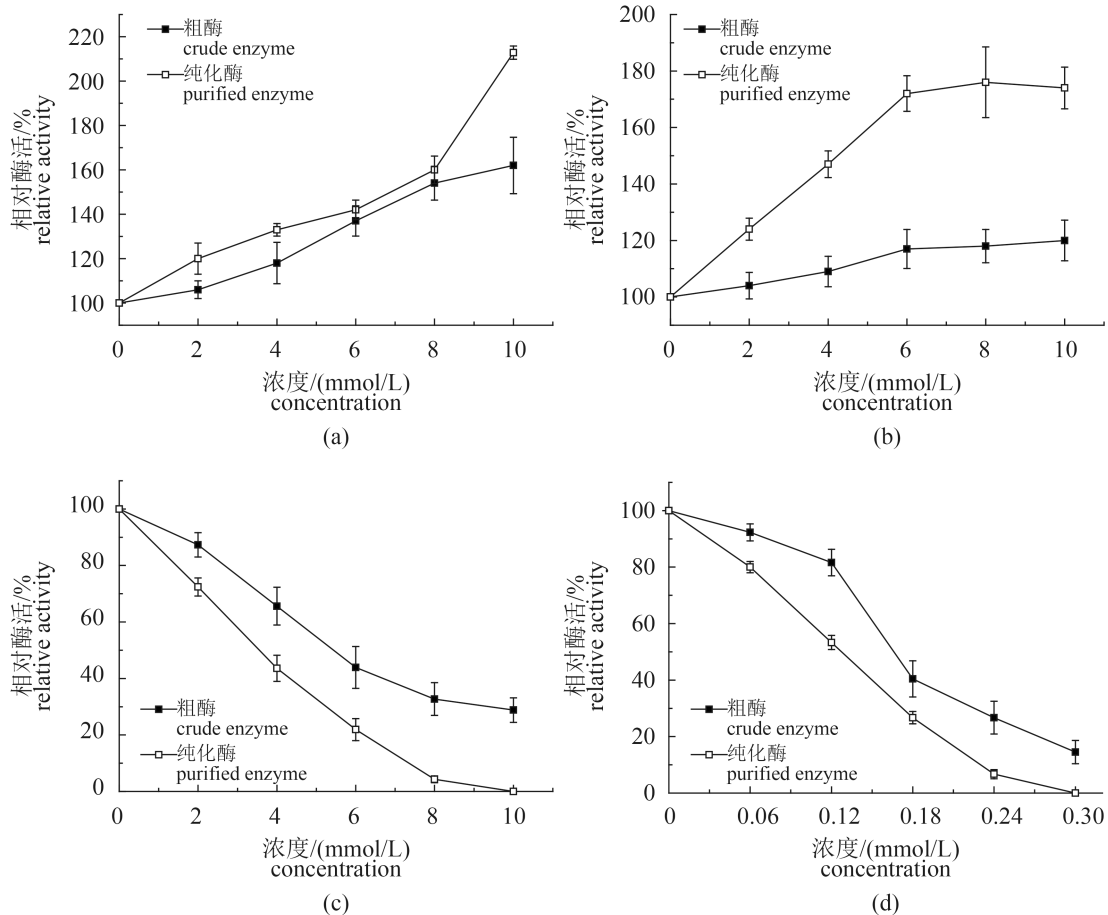


图6 不同添加剂对TMAOase活性的影响

(a) 柠檬酸, (b)  $\text{CaCl}_2$ , (c)  $\text{Na}_2\text{S}$ , (d)  $\text{H}_2\text{O}_2$

Fig. 6 Effects of additives on TMAOase activity

(a) citric acid, (b)  $\text{CaCl}_2$ , (c)  $\text{Na}_2\text{S}$ , (d)  $\text{H}_2\text{O}_2$

$\text{mmol/L}^{[9]}$ , 茎柔鱼TMAOase的 $K_m$ 值为 $26.2 \text{ mmol/L}^{[30]}$ 。本实验测得该酶的 $K_m$ 值为 $22.8 \text{ mmol/L}$ , 相比较而言, 金乌贼肌肉中TMAOase对底物TMAO的亲合力较强。

在添加剂对于酶活的影响中,  $\text{CaCl}_2$ 对于酶的促进作用可能是由于 $\text{Ca}^{2+}$ 是该酶的活性中心<sup>[31]</sup>, 而 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\text{Na}_2\text{S}$ 都具备一定的酸碱性, 故对酶活性有抑制作用<sup>[32]</sup>, 且超过一定浓度均可使TMAOase失活。因此, 这2种抑制剂都可用于乌贼的加工工艺中, 抑制酶的活性, 进而减少组织中还原产物甲醛的产生。这对于更好地控制乌贼在加工及贮藏过程中产生内源性的甲醛有一定的意义。

粗提液经酸碱处理后, 通过DE-52阴离子交换柱层析和Sephacryl S-300柱层析得到了纯化209.54倍的TMAOase, 金乌贼肌肉纯化TMAOase的分子量为 $21.3 \text{ ku}$ 。粗酶和纯化酶的最适温度分别为 $55$ 和 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , 2种酶在低于 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 时热稳定性较

好,  $\text{pH } 7.0$ 为2种酶的最适 $\text{pH}$ , 且稳定性都达到最高。TMAOase的 $K_m$ 值为 $22.8 \text{ mmol/L}$ 。柠檬酸、 $\text{CaCl}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{Na}_2\text{S}$ 对肌肉TMAOase纯化酶分别具有显著的促进和抑制作用。本研究为金乌贼在贮藏过程中产生甲醛的机理提供理论支持, 而TMAOase随时间在不同贮藏条件下的活性变化, 是本实验进一步研究的主要方向。

#### 参考文献:

- [1] 董正之. 世界大洋经济头足类生物学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1991: 197-207.  
Dong Z Z. Biology of the Economic Species of Cephalopods in the World Oceans[M]. Jinan: Shandong Science & Technology Press, 1991: 197-207 (in Chinese).
- [2] Leelapongwattana K, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Raman spectroscopic analysis and rheological

- measurements on natural actomyosin from haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) during refrigerated (4 °C) and frozen (-10 °C) storage in the presence of trimethylamine-*N*-oxide demethylase from kidney of lizardfish (*Saurida tumbil*)[J]. Food Chemistry, 2008, 106(3): 1253-1263.
- [ 3 ] Leelapongwattana K, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Effect of trimethylamine-*N*-oxide demethylase from lizardfish kidney on biochemical changes of haddock natural actomyosin stored at 4 and -10 °C[J]. European Food Research and Technology, 2008, 226(4): 833-841.
- [ 4 ] 吴富忠, 黄丽君. 鲑鱼及制品中甲醛来源与产生规律探索[J]. 中国公共卫生管理, 2006, 22(3): 256-258.
- Wu F Z, Huang L J. Study on sources of formaldehyde in sleeve-fishes and their products and rule of its generation[J]. Chinese Journal of Public Health Management, 2006, 22(3): 256-258(in Chinese).
- [ 5 ] 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(4): 1283-1288.
- [ 6 ] Phillippy B Q, Hultin H O. Distribution and some characteristics of trimethylamine *N*-oxide (TMAO) demethylase activity of red hake muscle[J]. Journal of Food Biochemistry, 1993, 17(4): 235-250.
- [ 7 ] Leelapongwattana K, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Effects of trimethylamine-*N*-oxide demethylase (TMAOase) inhibitors and antioxidants on physicochemical and biochemical changes of haddock muscle induced by lizardfish TMAOase during frozen storage[J]. Journal of Food Biochemistry, 2010, 34(5): 1032-1048.
- [ 8 ] 贾佳. 秘鲁鱿鱼中氧化三甲胺热分解生成甲醛和二胺机理的初步研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2009.
- Jia J. The thermal conversion of trimethylamine oxide (TMAO) to formaldehyde and dimethylamine in jumbo squid (*Dosidicus gigas*)[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2009 (in Chinese).
- [ 9 ] 冯慧, 付雪艳, 薛长湖, 等. 印度洋鸢乌贼氧化三甲胺脱甲基酶的分纯化及生化特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(9): 27-32.
- Feng H, Fu X Y, Xue C H, *et al.* Purification and characterization of trimethylamine-*N*-Oxide demethylase from Ryukyu squid (*Symlectoteuthis oualaniensis*)[J]. Food and Fermentation Industries, 2008, 34(9): 27-32(in Chinese).
- [10] 陈胜军, 陈辉, 高瑞昌, 等. 超声波辅助酶解法提取罗非鱼眼透明质酸工艺条件[J]. 核农学报, 2014, 28(8): 1446-1452.
- Chen S J, Chen H, Gao R C, *et al.* Extraction of hyaluronic acid from eyeball of tilapia by ultrasonic-assisted enzyme method[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2014, 28(8): 1446-1452(in Chinese).
- [11] 吴东晓, 杨文鸽, 徐大伦, 等. 食用明胶的酶解及其酶解物的甲醛捕获特性研究[J]. 核农学报, 2013, 27(5): 658-662.
- Wu D X, Yang W G, Xu D L, *et al.* The hydrolysis of edible gelatine and formaldehyde-removal activity of it's hydrolysate[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2013, 27(5): 658-662(in Chinese).
- [12] Deng Y, Liu Y M, Qian B J, *et al.* Impact of far-infrared radiation-assisted heat pump drying on chemical compositions and physical properties of squid (*Illex illecebrosus*) fillets[J]. European Food Research and Technology, 2011, 232(5): 761-768.
- [13] 梁新乐, 黄莹莹, 张虹, 等. 响应面法优化桔青霉F-5-5核酸酶P1发酵培养基碳氮源[J]. 核农学报, 2011, 25(1): 57-61.
- Liang X L, Huang Y Y, Zhang H, *et al.* Response surface optimization of carbon and nitrogen sources for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* F-5-5[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2011, 25(1): 57-61(in Chinese).
- [14] 励建荣, 曹科武, 贾佳, 等. 利用电子自旋共振(ESR)技术对秘鲁鱿鱼中甲醛生成非酶途径中相关自由基的研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 16-21.
- Li J R, Cao K W, Jia J, *et al.* Studies on the non-enzymic formation radical of formaldehyde in jumbo squid by ESR method[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(1): 16-21(in Chinese).
- [15] Gou J Y, Lee H Y, Ahn J. Effect of high pressure processing on the quality of squid (*Todarodes pacificus*) during refrigerated storage[J]. Food Chemistry, 2010, 119(2): 471-476.
- [16] 段文佳. 水产品中甲醛的暴露评估与风险管理研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- Duan W J. Primary study on exposure assessment and risk management of formaldehyde in aquatic products[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011

- (in Chinese).
- [17] 董瑞琦, 时多, 焦炳华, 等. 冰冻保存鱿鱼体内氧化三甲胺脱甲基酶活性测定方法的建立[J]. 农产品加工(学刊), 2010(6): 35-38.
- Dong R Q, Shi D, Jiao B H, *et al.* Establishment of the method for detecting TMAOase in frozen-reserved squid[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2010(6): 35-38(in Chinese).
- [18] Lin J K, Hurng D C. Thermal conversion of trimethylamine-N-oxide to trimethylamine and dimethylamine in squids[J]. Food & Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 1985, 23(6): 579-583.
- [19] Kimura M, Seki N, Kimura I. Occurrence and some properties of trimethylamine-N-oxide demethylase in myofibrillar fraction from walleye pollack muscle[J]. Fisheries Science, 2000, 66(4): 725-729.
- [20] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275.
- [21] 环境保护部. HJ 601-2011水质甲醛的测定乙酰丙酮分光光度法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2011.
- Environmental Protection Department. HJ 601-2011 Water quality-Determination of formaldehyde-Acetylacetone spectrophotometric method[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2011 (in Chinese).
- [22] Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M. Partial purification and characterization of trimethylamine-N-oxide demethylase from lizardfish kidney[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 135(2): 359-371.
- [23] Kimura M, Seki N, Kimura I. Purification and characterization of trimethylamine-N-oxide demethylase from walleye Pollack muscle[J]. Fisheries Science, 2000, 66(5): 967-973.
- [24] 朱军莉, 励建荣, 苗林林, 等. 基于高温非酶途径的秘鲁鱿鱼内源性甲醛的控制[J]. 水产学报, 2010, 34(3): 375-381.
- Zhu J L, Li J R, Miao L L, *et al.* Control on the intrinsic formaldehyde content in jumbo squid based on the non-enzymatic thermal pathway[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(3): 375-381(in Chinese).
- [25] Rehbein H, Schreiber W. TMAO-ase activity in tissues of fish species from the Northeast Atlantic[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Comparative Biochemistry, 1984, 79(3): 447-452.
- [26] 段振华. 水产品干燥技术研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(5): 213-216.
- Duan Z H. Research and development of drying technology of aquatic products[J]. Food Research and Development, 2012, 33(5): 213-216(in Chinese).
- [27] Fu X Y, Xue C H, Miao B C, *et al.* Purification and characterization of trimethylamine-N-Oxide demethylase from Jumbo Squid (*Dosidicus gigas*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(3): 968-972.
- [28] 张杰, 张永勤, 罗彩华, 等. 海参体壁中 $\alpha$ -1,4淀粉酶的分离纯化及性质[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 137-141.
- Zhang J, Zhang Y Q, Luo C H, *et al.* Purification and characterization of  $\alpha$ -1,4-amyase in body wall of sea cucumber[J]. Food Science, 2015, 36(5): 137-141(in Chinese).
- [29] 朱仁义, 李和生, 王亚儿, 等. 加工贮藏条件对乌贼内源性甲醛含量的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(21): 339-343.
- Zhu R Y, Li H S, Wang Y E, *et al.* Effect of processing and storage on endogenous formaldehyde content in cuttlefish[J]. Food Science, 2013, 34(21): 339-343(in Chinese).
- [30] 朱军莉, 励建荣. 秘鲁鱿鱼TMAOase性质及其与甲醛生成相关性研究[J]. 中国食品学报, 2012, 10(2): 97-103.
- Zhu J L, Li J R. Properties of trimethylamine-N-oxide demethylase and relation between the enzyme and formation of formaldehyde in the squid from Peru[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 10(2): 97-103(in Chinese).
- [31] 王阳光, 李碧清, 高华明. 在室温下存放的鱿鱼甲醛含量的变化[J]. 食品工业科技, 2006, 6(1): 169-170.
- Wang Y G, Li B Q, Gao H M. Changes in the content of formaldehyde from sleeve-fish at room temperature[J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 6(1): 169-170(in Chinese).
- [32] 傅婷, 万骥, 王丹, 等. 牛肾溶菌酶的分离纯化及部分酶学性质[J]. 食品科学, 2016, 37(5): 126-131.
- Fu T, Wan J, Wang D, *et al.* Isolation, purification and partial characterization of lysozyme from bovine kidney[J]. Food Science, 2016, 37(5): 126-131(in Chinese).



## Purification and enzymatic properties of TMAOase from muscles of *Sepia esculenta*

JIN Yang, XUE Zhangzhi, ZHANG Hongchao, SONG Zhenggui,  
ZHU Renyi, BU Tingting, LI Hesheng\*

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** In order to extract and purify TMAOase, acetate buffer made of NaCl (0.1 mol/L) and Tris-CH<sub>3</sub>COOH (pH 7.0, 20 mmol/L) was used to extract from the muscles of cuttlefish. After the process of acid, alkali, dialysis and concentrated treatment, the extract was further purified by DEAE-52 Sephacel and Sephacryl S-300 chromatography. The enzymatic properties of TMAOase were also studied. The results revealed that the enzyme purified by Sephacryl S-300 was 209.54 times purer than the crude enzyme. The optimum temperature of the crude and purified enzyme was 55 and 50 °C, respectively. Moreover, their thermal stability decreased significantly over this temperature. As the temperature reached 80 °C, crude enzyme still retained 21.9% of its activity. Whereas purified enzyme lost its activity totally. The optimum pH of the purified enzyme was 7.0, which stayed well at this pH, but decreased in acidic and alkaline conditions. As the pH increased to 9.0, especially, the activity of crude and pure enzyme reduced to 60.7% and 20.5%, respectively. The  $K_m$  of TMAOase measured by Lineweaver-Burk double reciprocal mapping method was 22.8 mmol/L. The purity of the obtained TMAOase was proved by SDS-PAGE, with a molecular weight of 21.3 ku. Chemicals of citric acid and CaCl<sub>2</sub> remarkably promoted the activity of the enzyme, while H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>S significantly inhibited TMAOase activity.

**Key words:** *Sepia esculenta*; muscle; TMAOase; purification; enzymatic properties

**Corresponding author:** LI Hesheng. E-mail: lihesheng@nbu.edu.cn

**Funding projects:** Major Scientific and Technological Projects in Zhejiang Province (2009C03017-3); “Aquatic Products” in Zhejiang Province Top Priority Disciplines Open Fund (xkzsc1523); Ningbo Natural Fund Project (013A610156)