

ISSN 1000-0615

水 产 学 报

Shuichan Xuebao

JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA

第 19 卷
Vol.19

第 2 期
No. 2

1995

中国水产学会编辑出版

ISSN 1000-0615



次黄嘌呤的变化情况,直至鱼肉腐败发臭。

与此同时,将另一份鱼肉5克加入10倍的无菌无氨蒸馏水,经均质器充分搅拌均质,浸抽30分钟,不断振摇,然后过滤。滤液分别按国标 GB-5009.44-84和 GB-4789.2-84食品卫生检验法理化分析部分和微生物检验部分,进行每隔2小时的不同时间总挥发性盐基氮 TVB-N 和常规细菌菌落总数的测定,直至鱼肉腐烂发臭。

以上二份鱼肉样品试验必须按要求同步进行,以便对照比较。

鲫鱼的样品准备及测定步骤与上述的青鱼样品完全相同。

2 结果与讨论

2.1 酶电极的响应特性

在 pH=7.6 的磷酸盐缓冲液中分别注入不同浓度的底物次黄嘌呤,实验指出,电流型黄嘌呤氧化酶电极有一较大的响应范围,即在 $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$ mol/l 浓度范围内有一良好的线性。图2是 $1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6}$ mol/l 的工作曲线,而图3是 $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5}$ mol/l 的工作曲线。

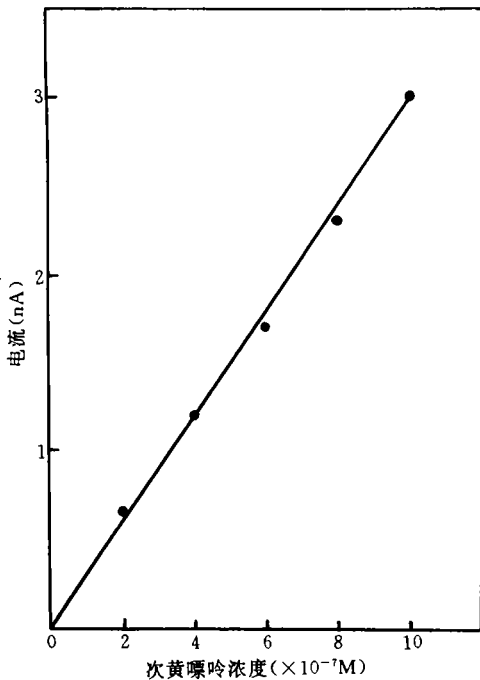


图2 在次黄嘌呤 $(1-10) \times 10^{-7}$ M 范围内酶电极的工作曲线

Fig. 2 The calibration curve of the enzyme electrode in the range of $(1-10) \times 10^{-7}$ M of hypoxanthine

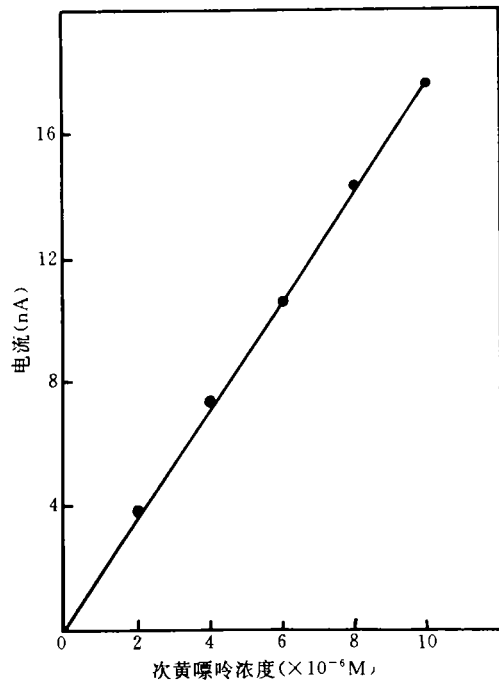


图3 在次黄嘌呤 $(1-10) \times 10^{-6}$ M 范围内酶电极的工作曲线

Fig. 3 The calibration curve of the enzyme electrode in the range of $(1-10) \times 10^{-6}$ M of hypoxanthine

2.2 溶液酸性对响应的影响

一般说来,溶液的 pH 值极大地影响着酶电极的活性。强酸或者强碱都会破坏酶的结构并

导致酶的失活或酶膜的脱落。本研究在不同 pH 的磷酸盐缓冲液中测定了酶电极对 1×10^{-5} M 次黄嘌呤的响应, 数据如表 1 所示。

由表 1 可知, 从 pH 5-8, 应答电流几乎没有变化。因而, 本研究正常的连续测定所用磷酸盐缓冲液 pH=7.6。

2.3 温度对酶电极的影响

温度对应答电流有一定的影响, 在 pH 为 7.6 的磷酸盐缓冲液中含 1×10^{-5} mol/l 次黄嘌呤, 在 $20^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内测定了酶电极的温度系数 [%/°C, 即温度每升高一度, 所得电流响应(峰高)增长的百分数], 表 2 显示了有关实验结果。

表 1 溶液酸性对响应电流的影响

Table 1 The effect of the solution acidity on the current response

pH	电流变化($\times 10^{-8}$ nA)
5.1	2.2
6.2	2.3
7.1	2.1
7.6	2.4
8.0	2.1

表 2 酶电极温度系数的测定结果

Table 2 The determination results of temperature coefficient of enzyme electrode

温度(°C)	20.5	22.0	23.0	23.2	23.9	25.0	26.0	28.5	30.0
温度系数(%/°C)	3.10	3.12	3.16	3.45	3.45	3.45	3.10	3.12	3.12

试验中不同温度的电流响应表明, 在 $20^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$ 范围内, 酶电极都有较好的精确度; 又由表 2 可见, 在 $23.2^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$ 之间酶电极的反应最为灵敏。因此, 选择了 25°C 作为测定次黄嘌呤的温度。

2.4 不同离子和组份对酶电极的影响

在 1×10^{-5} mol/l 次黄嘌呤-磷酸盐缓冲溶液中, 加入定量的 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、葡萄糖、 α -丙氨酸、D-酪氨酸、胱氨酸等组份。实验表明, 这些组份均不影响次黄嘌呤的测定, 即对酶电极并不产生干扰, 见表 3。

表 3 共存组份对酶电极的影响

Table 3 Effect of the coexist composition in solution on the enzyme electrode

共存组份	加入量(mg/dl)	次黄嘌呤加入量(mol/l)	次黄嘌呤测得量(mol/l)
Na^+	2.8	1×10^{-5}	1×10^{-5}
Ca^{2+}	2.8	1×10^{-5}	1×10^{-5}
Fe^{3+}	2.8	1×10^{-5}	1×10^{-5}
葡萄糖	3.5	1×10^{-5}	1.1×10^{-5}
α -丙氨酸	2.0	1×10^{-5}	1.3×10^{-5}
D-酪氨酸	2.0	1×10^{-5}	1.2×10^{-5}
胱氨酸	2.0	1×10^{-5}	1.1×10^{-5}

2.5 酶电极的检测下限和寿命

由于丝蛋白微孔膜对黄嘌呤氧化酶有很好的固化作用,并且有一定的导电性能,因此自制酶电极具有很高的灵敏度。该电极在 5×10^{-8} M 次黄嘌呤溶液中,显示了明显的电流响应,是目前所报导的最灵敏的方法之一[Haemmerli 等,1990;Jones 等,1964;Mulchandani 等,1989;Suzuki 等,1989]。

该电极在每天连续测定20—30个试样的情况下,可使用21天。实验证明,在电极制备中,黄嘌呤氧化酶用5%戊二醛交联,并固化在丝蛋白微孔膜上后较为稳定,使用后最好放在18℃温度下保存(与其工作温度25℃较为接近)。三周后,灵敏度下降至初始值的一半。

2.6 电极的回收率试验

取鱼肉样品液5个分别测定其次黄嘌呤值后加入已知量的次黄嘌呤溶液。计算回收率以示电极和方法的准确度。测定结果见表4。

表4 回收率测定结果

Table 4 The determination of recovery for hypoxanthine

样品号	原样品中次黄嘌呤含量(g)	加入次黄嘌呤量(g)	实际测得量(g)	回收率(%)
1	0.45×10^{-4}	0.5×10^{-4}	0.93×10^{-4}	97.9
2	0.85×10^{-4}	0.5×10^{-4}	1.33×10^{-4}	98.5
3	1.68×10^{-4}	1.1×10^{-4}	2.74×10^{-4}	98.6
4	0.21×10^{-3}	0.16×10^{-3}	0.36×10^{-3}	97.3
5	0.92×10^{-3}	1.0×10^{-3}	1.94×10^{-3}	101.5

由表4可知,回收率为97.3—101.5%。

2.7 测定结果

2.7.1 青鱼

对不同放置时间下(室温30℃)的青鱼进行次黄嘌呤、总挥发性盐基氮以及细菌菌落总数的测定,实验数据见表5。

表5 青鱼次黄嘌呤、总挥发性盐基氮和细菌菌落总数的测定结果
Table 5 The determination results of hypoxanthine concentration, total volatile basic nitrogen and bacteria number for black carp

放置时间(小时)	2	4	6	8	10	12	14	16	18
次黄嘌呤(mg/5g)	0.20	0.27	0.36	0.51	0.72	1.02	1.40	1.80	2.42
总挥发盐基氮(mg/100g)	6.34	9.92	14.61	21.00	31.15	46.10	63.50	87.42	116.90
细菌菌落数(个/g)	1.5×10^3	2.6×10^3	1.4×10^4	7.8×10^5	7.0×10^6	1.1×10^8	5.0×10^9	8.4×10^9	2.0×10^{10}
新鲜度判别	新鲜	新鲜	新鲜	次新鲜	开始腐败	腐败	腐败	腐败	腐败

图4、图5显示了次黄嘌呤(Hx)和总挥发性盐基氮(TVB-N)以及次黄嘌呤(Hx)和细菌菌落总数之间的相关性。

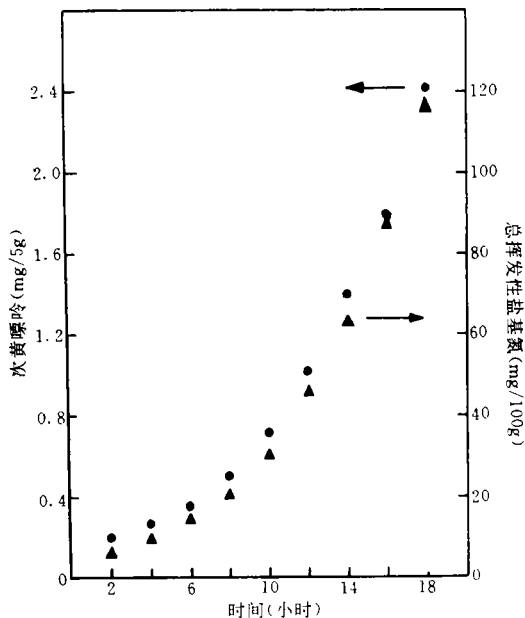


图4 青鱼新鲜度检测中,次黄嘌呤(Hx)和总挥发性盐基氮(TVB-N)之间的关系

Fig. 4 The relationship between the hypoxanthine concentration and total volatile basic nitrogen amount for the evaluation of the fish freshness. (●-Hx,▲-TVB-N)

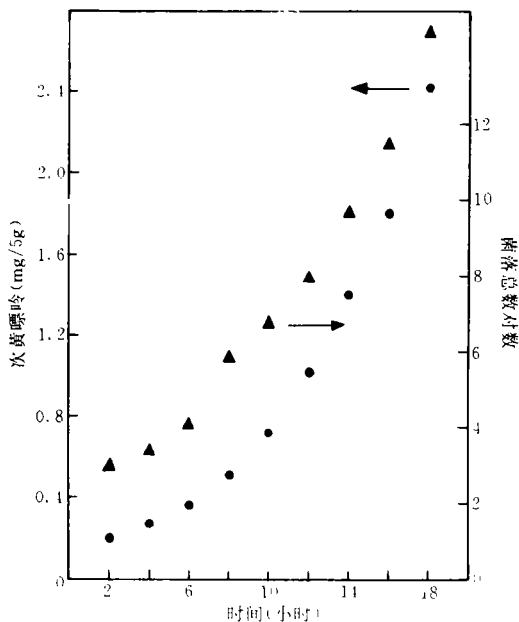


图5 青鱼新鲜度检测中,次黄嘌呤和细菌菌落总数对数之间的关系

Fig. 5 The relationship between the hypoxanthine concentration and the logarithm of microbe colonies. (●-Hx, ▲-Log [microbecolonies/g]) for the evaluation of black carp freshness.

由表5、图4、图5可知,在青鱼的腐烂过程中,不同放置时间其次黄嘌呤和总挥发性盐基氮之间以及次黄嘌呤和细菌菌落总数之间存在着很好的相关性,即随着时间的增长,总挥发性盐基氮量及细菌菌落总数增加,次黄嘌呤的量也同步增加,且增加的比例几近相等(图4及图5中,二条曲线的斜率皆颇为接近)。

2.7.2 鲫鱼

对室温下放置不同时间的鲫鱼,亦进行了次黄嘌呤、总挥发性盐基氮以及细菌菌落总数的测定,数据列於表6。

由表6可知,由於鱼种的不同,同一腐烂时间其次黄嘌呤的含量不同,但次黄嘌呤与总挥发性盐基氮、细菌菌落总数之间依然体现出了很好的相关性,即鲫鱼的各项指标测定结果原则上与青鱼的测定结果一致,只是腐烂的时间推迟2小时而已。当然,對於个别腐烂过程中不生成次黄嘌呤的鱼种,该方法就不适用了。

表6 鲫鱼次黄嘌呤、总挥发性盐基氮以及细菌菌落总数的测定结果
Table 6 The determination results of hypoxanthine concentration, total volatile basic nitrogen and bacteria number for crucian carp

放置时间(小时)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
次黄嘌呤(mg/5g)	0.10	0.19	0.28	0.35	0.53	0.70	1.12	1.48	1.88	2.45
总挥发盐基氮(mg/100g)	3.40	6.12	10.16	13.90	20.80	31.00	50.12	65.30	89.36	117.20
细菌菌落总数(个/g)	3×10^2	1.2×10^3	3.0×10^3	1.5×10^4	7.5×10^5	7.8×10^6	1.5×10^8	5.8×10^9	9.0×10^9	2.7×10^{10}
新鲜度判别	新鲜	新鲜	新鲜	新鲜	次新鲜	开始腐烂	腐烂	腐烂	腐烂	腐烂

鉴于上述实验结果,特别是在鱼肉腐败过程中体现出的次黄嘌呤和总挥发性盐基氮、细菌菌落总数之间的极好的相关性,可将次黄嘌呤作为检测指标来取代总挥发性盐基氮、细菌菌落总数等国标以判别鱼类食品的新鲜度。换言之,生物传感器这一快速检测手段完全可以代替常规的化学分析及微生物检验方法。

3 结论

用次黄嘌呤生物传感器检测鱼类食品新鲜度是一种新颖、快速而又简便、可靠的方法。根据初步试验结果,以次黄嘌呤作为检测指标,则判别鱼类食品新鲜度的标准可以定为:

新鲜:次黄嘌呤 $\leq 3.60 \times 10^{-4}$ g/5 g)。

(此时相应的国标——总挥发性盐基氮 ≤ 15 mg/100 g,细菌菌落总数 $\leq \times 10^4$ 个/g)

次新鲜: 3.6×10^{-4} g/5 g < 次黄嘌呤 $\leq 5.9 \times 10^{-4}$ g/5 g。(此时相应的国标——总挥发性盐基氮15—25 mg/100 g, 10^4 个/g < 细菌菌落总数 $\leq \times 10^6$ 个/g)

腐败:次黄嘌呤 $> 5.90 \times 10^{-4}$ g/5 g。

(此时相应的国标——总挥发性盐基氮 > 25 mg/100 g,细菌菌落总数 $> \times 10^6$ 个/g)

参 考 文 献

- [1] 黄伟坤等,1979.食品化学分析,210-212.上海科学出版社。
- [2] 罗颖华等,1990.黄嘌呤氧化酶电极的研制和鱼的鲜度测定.化学传感器,10(2)35-40。
- [3] Haemmerli, S. D. *et al.*, 1990. Amperometric determination of hypoxanthine and inosine use of enzyme sensors based on a clark-type hydrogen peroxid or oxygen electrode. *Anal. lett.*,23(4):577.
- [4] Jone, N. R. *et al.*, 1964. Rapid estimation of hypoxanthine concentrations as indices of the freshness of chill-stored fish. *J. Sci. Food Agric.*,15:763.
- [5] Mulchandani, A. *et al.*, 1989. Development and application of a biosensor for hypo-xanthine in fish extract. *Anal. Chem. Acta.*,18:221-225.
- [6] Suzuki, M. *et al.*, 1989. A disposable hypoxanthine sensor based on a micro oxygen electrode. *Anal. lett.*,22(15): 2915.

STUDIES ON ESTIMATION OF THE FISH FRESHNESS BY A HYPOXANTHINE BIOSENSOR

Sheng Lianqing

(*Department of Food, Hangzhou Institute of Commerce, Hangzhou, 310035*)

ABSTRACT The conventional determination of the freshness of fish is to detect total volatile basic nitrogen (TVB-N, GB) or number of microbe colonies. But these methods are all complex and expensive. The fast and exact assay method for the freshness of fish has been demonstrated in this paper — the method of Hypoxanthine Biosensor. Adenosine triphosphate (ATP) in the fish tissue being degraded from the dead fish, adenosine triphosphate is decomposed quickly to adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), and inosine monophosphate (IMP). Inosine monophosphate is an important factor to the pleasant flavour of fresh fish. Under the existence of enzymes, inosine monophosphate is further decomposed to inosine (HxR), hypoxanthine (Hx), xanthine (X), and uric acid (UA). The good relationship between TVB-N (GB) and hypoxanthine is found by the experiments. Therefore, hypoxanthine is accumulated in fish tissue and the amount of hypoxanthine can be used to indicate the fish freshness. In order to determine hypoxanthine, the enzyme biosensor has been designed for this purpose. The method is relatively simple and the determination is rapid. Hypoxanthine biosensor will replace the conventional assays of the fish freshness in the future.

KEYWORDS hypoxanthine, biosensor, freshness of fish, total volatile basic nitrogen (TVB-N), number of microbe colonies.