

莫三比克吳郭魚在鹽度轉移過程中肌肉麩胺酸/麩醯胺酸代謝之研究

王宏原¹ · 王郁峻^{2*} · 關寶龍³ · 曾庸哲³

¹ 國立臺灣師範大學生命科學系研究所

² 行政院農業委員會水產試驗所企劃資訊組

³ 中央研究院細胞與個體生物學研究所臨海研究站

摘要

臺灣養殖吳郭魚在出貨前多會進行海水轉移步驟以清除肉質的不良風味。本研究運用廣鹽性莫三比克吳郭魚 (*Oreochromis mossambicus*) 探討在不同鹽度處理下，肌肉內麩胺酸 (glutamate) / 麩醯胺酸 (glutamine) 相關代謝機制之作用。結果顯示，在轉移至 10 psu 海水處理後，肌肉中麩醯胺酸合成酶 (Glutamine synthetase, GLUL) 與麩胺酸脫氫酶 (Glutamate dehydrogenase, GLUD) 的基因表現量有顯著提升，同時麩醯胺酸與其他胺基酸含量亦有上升。而在各鹽度處理下，肌肉中氮含量有下降的趨勢。因此我們推測：在 10 psu 海水短期處理 (6 hr) 後，吳郭魚肌肉會傾向將麩胺酸與鉍離子結合生成麩醯胺酸，並累積於肌肉中。由以上莫三比克吳郭魚適應高滲透壓緊迫環境所採用的生理策略，導致肌肉組織中胺基酸組成的變化，可能是造成人類在食用味覺上產生「鮮味」刺激的原因之一。

關鍵詞：吳郭魚、肌肉、鹽度轉移、麩胺酸 / 麩醯胺酸代謝

前言

全球水域環境中存在由於區域、氣候或地質因素影響，形成鹽度組成差異的區域 (Weslawski *et al.*, 1993; Satheeshkumar and Khan, 2012)。例如：臺灣北部淡水河 (Tanshui River) 的紅樹林在同一個觀測點在半年內可測得 4.2 - 33.1 psu 的鹽度落差 (Tzeng and Wang, 1992)。故生存於鹽度因子多變的水域環境中，棲息的生物就必須有著相對應的生理策略機制，以應對緊迫的環境變化 (Elliott and Quintino, 2007; McLusky and Elliott, 2007; Lombardi, 2012)。

為了能在具有明顯鹽度差異的水域中生存，生物必須具備適應環境鹽度變化的生理機制。部

分硬骨魚已被證實為具有廣鹽性適應機制的脊椎動物，此一生理特性除了可提高生存率之外，還擴張了物種棲息與活動的水域。以廣鹽性魚類代表的莫三比克吳郭魚 (*Oreochromis mossambicus*) 為例：馴養在淡水中時的血漿滲透壓約為 285 mOsm/kg，海水中則約為 325 - 350 mOsm/kg 之間 (Hwan *et al.*, 1989; Inokuchi *et al.*, 2008)。當魚類棲息於淡水水域 (平均鹽度低於 0.5 psu，滲透壓約為 1 - 25 mOsm/kg)，此時水分會主動滲透到魚體內使得細胞滲透壓降低，因此廣鹽性魚類必須藉由鰓上特化的富含粒腺體細胞 (mitochondria-rich cells, MR cells) 進行主動運輸等方式來獲取鹽類，同時藉著腎臟從尿液中再吸收離子來維持體內滲透壓平衡 (Evans, 1980; Bradley, 2009)；而棲息在海水 (平均鹽度約為 35 psu，滲透壓約在 1000 mOsm/kg) 時，魚類體內滲透壓低於環境水域的情況下容易使水分自細胞內流失，因此個體需大量攝取海水並同時藉著鰓、腸道將多餘的鹽類離子

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02)2462-2101
轉 2524; FAX: (02) 2462-4627; E-mail: ycwang@mail.tfrin.gov.tw

排出體外 (Evans, 1980; Hwang *et al.*, 1989; Bradley, 2009; Zikos *et al.*, 2014)。此外, 在莫三比克吳郭魚鰓上的 MR cells 旁會伴隨著富含肝醣細胞 (glycogen-rich cells), 可提供離子細胞進行滲透壓調節時所需的能量 (Tseng *et al.*, 2007)。

對於魚類而言, 胺基酸是作為主要的能量來源物質 (Moon and Johnston, 1981; Jayaram and Beamish, 1992)。魚類在胚胎與幼魚時期, 幾乎僅以胺基酸作為生長與發育所需的能量 (Fyhn, 1989; Rønnestad and Fyhn, 1993; Ohkubo and Matsubara, 2002), 而且魚類中肉食性種類占大多數, 因此以胺基酸 (蛋白質) 作為系統發育營養來源是一種古老且基本的生理特徵 (Furuichi and Yone, 1982; Wilson, 1994)。在代謝路徑中, 胺基酸多半是先透過酵素作用進而轉化為醣類代謝與三羧酸循環 (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) 途徑的中間產物才得以生成三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP), 例如丙胺酸 (alanine) 與甘胺酸 (glycine) 等可藉由個別專屬的轉移酶去除胺基後轉為丙酮酸 (pyruvate)。麩胺酸 (glutamate) 則可藉由麩胺酸脫氫酶 (glutamate dehydrogenase, GLUD) 的催化取得胺基轉為 α -酮戊二酸 (α -ketoglutaric acid, α -KG) 而進入三羧酸循環轉化為能量。此外, 麩醯胺酸亦可藉由麩醯胺酸合成酶 (glutamine synthetase, GLUL) 的作用, 催化其與鉍離子反應生合成為麩醯胺酸; 抑或是反向地藉由麩胺酸合成酶 (glutamate synthase, GLS) 的作用, 催化麩醯胺酸轉化為麩胺酸累積, 除了可減少代謝鉍離子在細胞中的毒性累積, 並有助於組織或體液中游離麩胺酸與麩醯胺酸濃度的恆定。因此在代謝策略上, 胺基酸可從多面向的轉換途徑作為能量代謝用途。

對於多數硬骨魚類而言, 占整體體積約 60% 以上的肌肉是作為體內胺基酸儲存主要的組織 (Halver and Hardy, 2002; Ayala *et al.*, 2010), 而胺基酸多以游離方式與水分保存在肌肉組織中。從前人的研究可知許多廣鹽性的硬骨魚類在面臨鹽度轉移的變化時, 肌肉中的胺基酸組成會有顯著的變異 (Assem and Hanke, 1983)。以生存在泥沼地的黃鱔 (*Monopterus albus*) 為例: 長期暴露於半淡鹹水會使其肌肉中的丙胺酸、絲胺酸 (serine)、麩醯胺酸等多類游離胺基酸含量會明顯增加

(Tok *et al.*, 2009); 此外在具溯溪洄游性的虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) (Kaushik and Luquet, 1979)、降河迴游性的歐洲鰻鱺 (*Anguilla anguilla*) (Huggins and Colley, 1971)、生活於淺灘泥潭地的歐洲川鰈 (*Platichthys flesus*) (Lange and Fugelli, 1965) 以及生存於河口具廣鹽性適應力的莫三比克吳郭魚 (Venkatachari, 1974; Fiess *et al.*, 2007) 等等, 在鹽度轉移相關的研究上都有發現其肌肉組織內的游離胺基酸皆有會累積的現象。另外在棲息於淡水的鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 之相關研究也指出, 當其處於 15 psu 的海水時, 肌肉中的丙胺酸、甘胺酸、牛磺酸 (taurine) 以及組胺酸 (histidine) 含量都有上升的情形 (Hegab and Hanke, 1983)。因此對於多數硬骨魚類而言, 水域中的鹽度可作為魚體肌肉當中游離胺基酸含量組成變化的誘導因子之一。

莫三比克吳郭魚原產於非洲尚比西河中下游 (Philippart and Ruwet, 1982), 在 20 世紀後半逐漸引進到其他熱帶、副熱帶與溫帶地區 (Pillay and Kutty, 2005), 引進的目的多半是作為食用魚類養殖、休閒漁業、控制水草生長以及研究用途。莫三比克吳郭魚具有高度的環境適應力, 根據前人研究所示: 莫三比克吳郭魚對於直接轉移鹽度上限是 27 psu (Al-Amoudi, 1987), 逐步轉移鹽度的上限可高達 120 psu (Whitfield and Blaber, 1979)。而莫三比克吳郭魚具備對環境水域鹽度的高度適應力, 以及不易受壓力發生疾病影響, 在飼育上有著生長快速以及高飼料換肉率 (feed conversion rate, FCR) 等優點 (Olvera-Nova *et al.*, 2002)。這些生理特性使得莫三比克吳郭魚成為養殖漁業上重要的魚種之一。在養殖上除了淡水或純海水養殖法外, 更有一種是依照廣鹽性魚類本身的適鹽特性處理: 先在淡水中進行養殖作業, 出貨前的三個月左右轉移到鹽水中所進行的半淡鹹水養殖法。

魚類肉質鮮美可從人類味覺感官的「鮮味」(umami) 解釋。此一名稱由池田菊苗教授於 1908 年所命名 (Ikeda, 2002), 立論基礎是: 鮮味雖是來自多種胺基酸誘發的感覺生理反應, 但主要是一種人類舌頭上的味覺受體接收到麩胺酸鹽類的羧酸根離子所產生的味覺訊號 (Chaudhari *et al.*, 2000; Lindemann, 2000; Nelson *et al.*, 2002; Chandrashekar *et al.*, 2006), 能夠促使唾液分泌並

刺激咽喉與口腔，並平衡食物整體的味道 (Beauchamp, 2009)。從半淡鹹水養殖的吳郭魚較受歡迎且作為主要外銷的現象來推論：藉著半淡鹹水養殖吳郭魚的肉質，較純淡水養殖吳郭魚肉質較為甘甜的效果，是導因於人們食用時鮮味的途徑被誘發，因此半淡鹹水養殖的吳郭魚肉質會與海水魚相似。因此本實驗是藉由養殖業現場處理流程所啟發，試圖理解外在水域鹽度的改變，對於廣鹽性吳郭魚肌肉中麩胺酸/麩醯胺酸的含量變化，是否與滲透壓調節時的能量代謝調整有所關聯，導致肌肉的構成或累積物質產生變化，進而對於人們食用時表現出「鮮味」的科學假設。

材料與方法

一、實驗動物飼養

莫三比克吳郭魚飼養在溫度約 $27\pm 1^\circ\text{C}$ 的 8 L 恆溫水缸中，日照週期設定為每天 12 hr 光照 / 12 hr 黑暗，每個水缸放置 5 - 7 隻吳郭魚，設置滴流系統提供穩定充足的曝氣水，並放置打氣石供應水中溶氧，每日投食飼料兩次並清除沉在底部糞便與殘留飼料，避免因為水中雜質腐爛導致水質惡化。

二、實驗動物的鹽度轉移

持續飼養吳郭魚至體重約 5 - 6 g 大小，雌雄不拘，挑選體型相近的 5 - 7 隻個體作為一組並移轉到飼養水缸中，三組共 60 隻個體，皆禁食一天。實驗開始前將實驗用轉移水缸注入鹽度 0 psu 的淡水作為對照組 (FW)，與使用人工海鹽 (Taikong, Taipei, Taiwan) 配置出鹽度分別為 10 psu (SW10) 和 20 psu (SW20) 的人工海水作為實驗組，對照組與實驗組的水缸中皆放置打氣石供應水中溶氧。實驗開始將吳郭魚從飼養水缸直接轉移至實驗用轉移水缸中，根據過去同樣針對莫三比克吳郭魚鹽度轉移對於代謝調整的實驗設計 (Tseng *et al.*, 2007)，實驗期間對照組與實驗組皆不進行餵食，分別於鹽度轉移後的 6、24 與 72 hr，從每組轉移水缸的 20 隻個體當中取 6 隻個體進行解剖與肌肉採樣作為後續實驗所用。

三、RNA 萃取

實驗後解剖的吳郭魚，固定截取其一側的背側肌肉放進離心管中，加入 0.5 ml Trizol 試劑 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，利用組織研磨棒以及均質研磨機 (Retsch, Haan, Germany) 將肌肉樣本均勻打碎，接著加入 0.1 ml 三氯甲烷 (chloroform) 混合後靜置在常溫下 3 min，接著將離心管放入離心機內以 $12,000 \times g$ 進行 30 min 以 4°C 進行離心，將上清液移至新的離心管並加入等量異丙醇 (isopropanol) 均勻混合後置於 -20°C 。靜置隔日後以 $13,000 \times g$ 進行 30 min 離心並將上清液去除，以 1 ml 的 75% 乙醇 (ethanol) 清洗在離心管底部的白色沉澱物，接著進行 $13,000 \times g$ 、10 min、 4°C 離心，重複此步驟兩次後移除乙醇，將離心管蓋打開，置於已去 RNase 活性的 37°C 烘箱內將沉澱物烘乾，隨後加入 RNase-free 去離子水使 RNA pellet 回溶並置於 60°C 加熱 10 min，再加入 1 μl DNase I (Promega, Madison, WI, USA)，放置於 37°C 烘箱內反應 1 hr，最後以 70°C 加熱 10 min 終止反應。取 1 μl 的 RNA 原液和 4 μl RNase-free water 配置成 5 倍稀釋液，使用分光光度計 (ND-2000, NanoDrop Technol, Wilmington, DE, USA) 進行 RNA 定量，並進行 RNA 電泳確定其品質。其餘的 RNA 原液置於 -20°C 保存供後續實驗所用。

四、反轉錄聚合酶連鎖反應

(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

取 5 μg total RNA，加入 1 μl Oligo (dT) 18 引子與 1 μl 10 mM dNTP mix，接著以 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 水加至總體積 13 μl ，以 65°C 加熱 5 min 使 RNA 變性拆解，Oligo (dT) 18 引子可嵌入其中，待加熱結束後立即置於冰上冷卻 1 min 以上使得 RNA 可與 Oligo (dT) 18 引子結合，再加入 4 μl 5X First Strand BF、1 μl 0.1M DTT、1 μl RNase Out (40 U/ μl) 以及 1 μl Super Script III RT (200 U/ μl) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，將試劑均勻混合後以 50°C 反應 1 hr，再提升至 70°C 加熱 15 min，結束後置於冰上加入 180 μl 的

Table 1 *Oreochromis mossambicus* primers used for qPCR analysis

Protein name	Gene name	Primer sequence	Amplicon size (bp)	Amplification efficiency	Accession number
Glutamine synthetase (GLUL)	<i>glula</i>	F 5'- GCACCGTGTCTGTGAGGATTT -3' R 5'- AATCCACCGTCTTCCTCATCT -3'	126	1.89	ENSONIG00000009803
	<i>glulb</i>	F 5'- GTGGATTGCTCGCTTCATCCTT -3' R 5'- CCGTCATCCTCTCTCATCTCCTTT -3'	144	2.02	ENSONIG00000019230
Glutamate synthase (GLS)	<i>gls1a</i>	F 5'- ATGGGCATCATGTGTTGGTCTC -3' R 5'- CTGCGAGGATCCAGCTTCTTTG -3'	146	1.92	ENSONIG00000012207
	<i>gls1b</i>	F 5'- AGTGCAAGCAACGCAGAGAAA -3' R 5'- TGA CT CACGCTCAGACTGGAAT -3'	111	1.97	ENSONIG00000016812
	<i>gls2a</i>	F 5'- CCACTGGACAGGGTTGAAATAG -3' R 5'- ACTTGTTCTGTCTATCGCCATC -3'	148	2.00	ENSONIG00000017028
	<i>gls2b</i>	F 5'- CTCTAGATGACGCCATGCAGTTTG -3' R 5'- CGGCTTTCTGTCTATCTGTGT -3'	114	1.90	ENSONIG00000006844
Glutamate dehydrogenase (GLUD)	<i>glud1a</i>	F 5'- ACGATGGTGCCATGTTGCAGTT -3' R 5'- AGTGTGTGGGCATCGGAGAGATT -3'	100	1.90	ENSONIT00000008696
	<i>glud1al</i>	F 5'- TGACCAAGAGCAACGCCAACAA -3' R 5'- TCCGGGATCACCAGGATGTTTCT -3'	118	1.95	ENSONIT00000008853
Reference gene					
Ribosomal protein L7	<i>rpl7</i>	F 5'- TGAAGGCCATGCGTGTCAAGAA -3' R 5'- TCTGCCTGTACTCCTTGTGGTACTT -3'	108	2.00	ENSONIT00000017988

F: forward primer; R: reverse primer

Elution buffer 稀釋成 10 倍，隨後使用分光光度計 (ND-2000, NanoDrop Technol, Wilmington, DE, USA) 進行 cDNA 定量，測得反應產物濃度後置於 -20°C 保存供後續實驗所用。

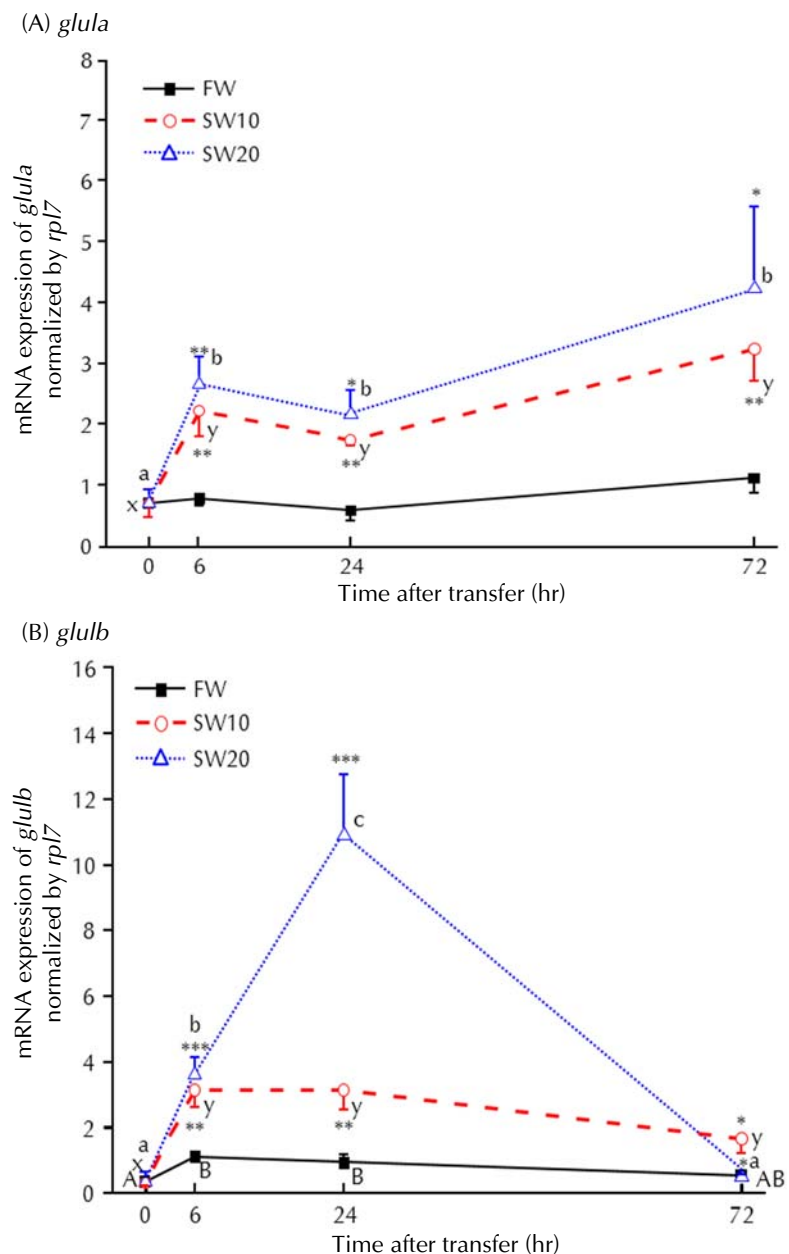
五、定量即時聚合酶鏈鎖反應 (quantitative real time polymerase chain reaction, QRT-PCR)

將 cDNA 原液濃度稀釋至 10 - 20 ng，取 4 µl cDNA 作為反應模板，再加入 5 µl 2x SYBR Green I Master Mix (Roche, Penzberg, Germany) 與 0.5 µl 10 µM 目標基因之引子，混合成總體積為 10 µl 的反應物；以 light cyclor real-time PCR system (Roche) 進行螢光反應偵測。實驗結果採取相對 ribosomal protein L7 (*rpl7*) 基因表現量的方式表現。定量即時聚合酶鏈鎖反應實驗中所使用的 *rpl7* 與目標引子序列如 Table 1 所示。

六、肌肉組織氨濃度與胺基酸含量檢測

取解剖後 -80°C 冷凍保存的吳郭魚肌肉組織約 10 - 15 mg 放入到離心管，加入 2.5 ml 的乙醇與 12.5 nmole 的正纈胺酸 (norvaline)，以均質研磨機均勻打碎，進行 4300 × g 10 min 以 4°C 進行離心，取上清液 2 ml 至 2.5 ml 的新離心管後以真空濃縮器 (Concentrator 5301) 將其乾燥，接著加入 100 µl 的 8 mM 氯化氫 (hydrogen chloride, HCl) 復原為液狀，再以注射式過濾器 (Millipore syringe filters, Millipore Millex, France) 進行過濾後，使用 AccQ Tag Ultra Reagent Kit (186003836, Waters, Milford, MA, USA) 分離化樣本。將分離化後的樣本注入到裝設 BEHC18 管柱與 TUV 偵測器的超高效液相色譜儀 (Ultra-Performance Liquid Chromatography, UPLC) (ACQUITY UPLC H-Class System, Waters, Milford, MA, USA) 中檢測樣本內的氨與胺基酸含量。藉著層析圖表分析滯留時間與曲線尖峰面積來判別胺基酸種類並將濃度定量化。

Fig. 1 Qualitative real-time PCR (qPCR) analysis results of mRNA expressions of glutamine synthase homologues in muscle of *Oreochromis mossambicus*. Relative mRNA expression levels of *glula* (A) and *glulb* (B) in muscle during salinity- and FW-transferred were normalized by ribosomal protein L7 (*rpl7*) and are presented as mean \pm standard deviation (SD) ($n=4-6$). *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, and ***: $p<0.005$, indicate significant differences between the FW control group and the SW transfer counterparts at the same transferring time point (Student's *t*-test). Different capital letters and overlapping letters indicate significant differences and non-significant differences, respectively, among treatment time points within the same salinity. (A, B, and C are presented in square for FW; x, y, and z are presented in round for 10 psu SW; a, b, and c are presented in triangle for 20 psu SW).



七、統計分析

實驗數據以平均值正負標準差 (mean \pm SD) 表示，實驗所得之資料由 Student's *t*-test 或 one-way analysis of variance 及 Tukey's multiple-comparison 作為統計檢定方式。

結 果

一、鹽度轉移對肌肉中麩醯胺酸合成酶基因表現之影響

麩醯胺酸合成酶 *glula* 在肌肉的基因表現量，SW10 實驗組與 FW 對照組相較，在各轉移時間點均明顯地上升至 1.8 - 2 倍；SW20 組則明顯上升約 2.4 - 3.8 倍 (Fig. 1A)。而 *glulb* 的基因表現量，SW10 組在轉移至 10 psu 海水處理的各時間點，其基因表現量相較於對照組皆明顯上升 1.8 - 2.3 倍；而 SW20 組僅在轉移後的 6 與 24 hr 分別明顯上升約 2.2 倍與 10.7 倍，72 hr 後與對照組之間則無明顯差異 (Fig. 1B)。

Table 2 Free amino acid concentrations ($\mu\text{moles}/\mu\text{g}$) in the muscle of *Oreochromis mossambicus* kept in freshwater (FW) and directly transferred to 10 psu (SW10) and 20 psu (SW20) seawater for 6, 24, and 72 hours

	Native group 0 hr	FW			SW10			SW20		
		6 hr	24 hr	72 hr	6 hr	24 hr	72 hr	6 hr	24 hr	72 hr
Alanine	0.195± 0.055	0.140± 0.054	0.250± 0.043	0.340± 0.057	0.224± 0.089	0.248± 0.082	0.256± 0.086	0.461± 0.106***	0.341± 0.118	0.375± 0.119
Glutamate	0.024± 0.008	0.028± 0.008	0.018± 0.008	0.025± 0.004	0.022± 0.004	0.026± 0.004	0.024± 0.008	0.025± 0.005	0.030± 0.002*	0.017± 0.001*
Glutamine	0.122± 0.031	0.039± 0.006	0.141± 0.021	0.191± 0.056	0.184± 0.058***	0.102± 0.036 [†]	0.110± 0.064	0.270± 0.091***	0.128± 0.049	0.113± 0.055
Glycine	0.394± 0.093	0.284± 0.174	0.528± 0.084	0.713± 0.158	0.596± 0.147*	0.583± 0.250	0.495± 0.155	0.761± 0.275**	0.372± 0.045***	0.450± 0.159
Histidine	0.042± 0.015	0.017± 0.001	0.057± 0.012	0.049± 0.007	0.067± 0.025***	0.081± 0.048	0.028± 0.003	0.106± 0.030***	0.034± 0.013*	0.047± 0.012
Serine	0.131± 0.022	0.186± 0.044	0.023± 0.002	0.043± 0.008	0.029± 0.007***	0.037± 0.016	0.034± 0.005	0.044± 0.010***	0.036± 0.005***	0.050± 0.022
Taurine	1.934± 0.189	2.221± 0.554	1.584± 0.393	1.011± 0.303	1.984± 0.925	1.958± 0.394	1.717± 0.380***	2.119± 0.516	1.104± 0.381	0.784± 0.260
Threonine	0.025± 0.013	0.021± 0.003	0.037± 0.013	0.029± 0.009	0.049± 0.017*	0.043± 0.026	0.037± 0.021	0.067± 0.016***	0.033± 0.012	0.043± 0.023

Free amino acid concentrations are presented as $\mu\text{mole } \mu\text{g}^{-1}$ muscle weight

Results represent means \pm standard deviations ($n = 4 - 6$).

*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, and ***, $p < 0.005$, indicate significant differences between the control and transfer groups (Student's t -test).

二、鹽度轉移對肌肉中麩胺酸合成酶基因表現之影響

麩胺酸合成酶 *gls1a* 在肌肉的基因表現量，SW10 組在 6 hr 時較對照組顯著下降 47%；SW20 組在轉移至 20 psu 鹽度處理後的 6 與 72 hr，與對照組相較分別下降 51% 與 81% (Fig. 2A)。 *gls2a* 的基因表現量在轉移至 20 psu 鹽度處理後的 6 hr，與對照組相較顯著下降了 69% (Fig. 2B)。而 *gls2b* 的基因表現量則是在轉移至 20 psu 鹽度處理後的 24 hr 與對照組相較顯著上升了 64% (Fig. 2C)。

三、鹽度轉移對肌肉中麩胺酸脫氫酶基因表現之影響

麩胺酸脫氫酶 *glud1a* 在肌肉的基因表現量，SW10 組在轉移至 10 psu 鹽度處理後的 24 hr，比對照組明顯上升了 76%；SW20 組在各轉移時間點則明顯較對照組下降約 53 - 78% (Fig. 3A)。而 *glud1a1* 的基因表現量，SW10 在 24 hr 後，較對照

組明顯上升了 91%，SW20 組則顯著下降了 68% (Fig. 3B)。

四、鹽度轉移對肌肉組織中氨與胺基酸含量之影響

將吳郭魚轉移至 20 psu 鹽度 (SW 20) 處理後的 24 hr，其肌肉當中所含的氨濃度相較於淡水 (FW) 對照組會明顯下降約 35%；至於其他時間點以及 SW10 組則與對照組之間無明顯差異 (Fig. 4)。

此外，運用超高效液相色譜儀 (UPLC) 分析莫三比克吳郭魚肌肉組織內的各類胺基酸發現，以牛磺酸的相對含量最高 (Table 2)。而把吳郭魚由淡水移到 10 psu 環境飼養後發現，僅麩醯胺酸含量於轉移後的 6 hr 較對照組明顯上升約 3.76 倍，但 24 hr 後則顯著下降約 28%。而 SW20 組在轉移至 20 psu 鹽度後的 6 hr，吳郭魚肌肉中的丙胺酸與麩醯胺酸含量較對照組分別顯著上升約 2.3 倍與 6 倍；麩胺酸含量則在轉移後的 24 hr 較對照組顯著增加 69%，72 hr 後則明顯下降約 32% (Table 2)。

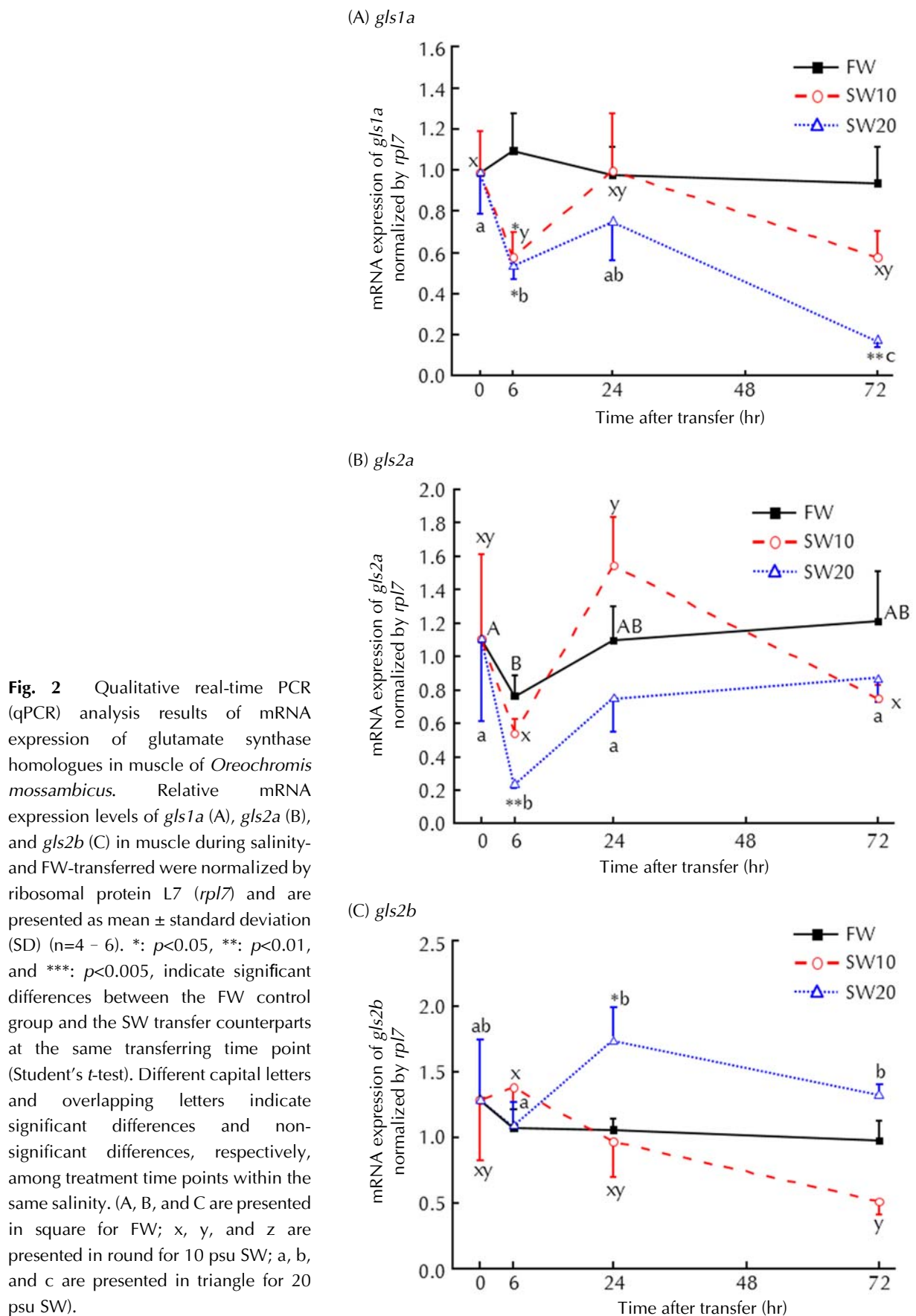
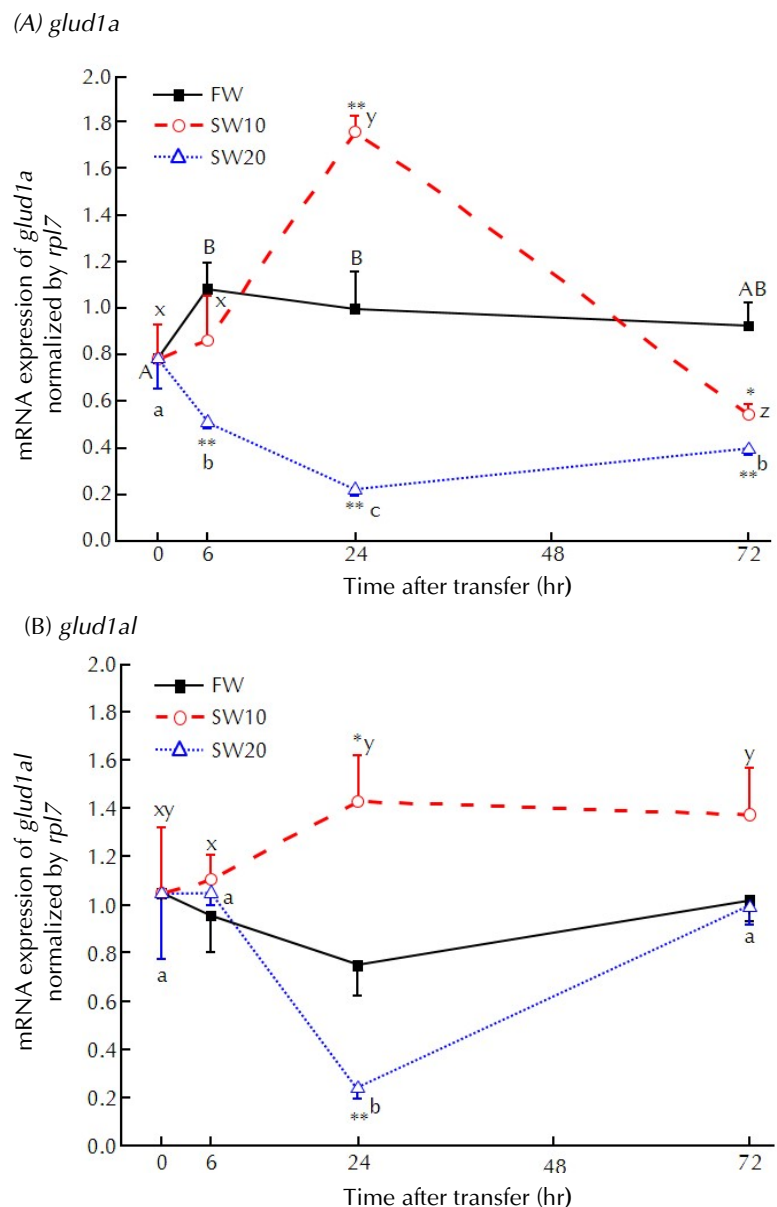


Fig. 3 Qualitative real-time PCR (qPCR) analysis results of mRNA expression of glutamate dehydrogenase homologues in muscle of *Oreochromis mossambicus*. Relative mRNA expression levels of *glud1a* (A) and *glud1a1* (B) in muscle during salinity- and FW-transferred were normalized by ribosomal protein L7 (*rpl7*) and are presented as mean \pm standard deviation (SD) (n=4-6). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, and ***: $p < 0.005$, indicate significant differences between the FW control group and the SW transfer counterparts at the same transferring time point (Student's *t*-test). Different capital letters and overlapping letters indicate significant differences and non-significant differences, respectively, among treatment time points within the same salinity. (A, B, and C are presented in square for FW; x, y, and z are presented in round for 10 psu SW; a, b, and c are presented in triangle for 20 psu SW).



討 論

綜合本次環境鹽度變化與吳郭魚肌肉中麩胺酸-麩醯胺酸代謝的相關實驗結果可知：在鹽度處理過程中，調控麩醯胺酸生合成之 *glud1a* 的表現量皆高於淡水對照組，從以上結果我們可推測：鹽度處理會顯著提升肌肉中麩醯胺酸的生合成。另一方面，鹽度處理並不會刺激肌肉中麩胺酸生合成相關基因的轉錄。綜合以上麩胺酸-麩醯胺酸代謝基因群在肌肉組織中表現量的結果，我們推論：在鹽度提升處理下，廣鹽性魚類肌肉中的麩胺酸-麩醯胺酸代謝機制，會傾向生合成麩醯胺酸，

而此反應最大的益處在於這個生合成過程中，麩胺酸需與游離銨 (NH_4^+) 結合，因此可藉由麩醯胺酸的生合成降低細胞因外在高張緊迫而產生的代謝毒性銨於肌肉中的累積。

從過去研究報告中指出：硬骨魚類會以胺基酸作為主要的營養來源，是一種普遍存在的原始生理特徵 (Furuichi and Yone, 1982; Wilson, 1994; Kaushik and Seiliez, 2010)。而肌肉作為魚體主要的胺基酸儲存組織 (Halver and Hardy, 2002; Ayala *et al.*, 2010)，因此本研究從胺基酸代謝的相關途徑中，選擇檢測丙胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸以及牛磺酸在環境鹽度提升下的變化。肌肉中丙胺

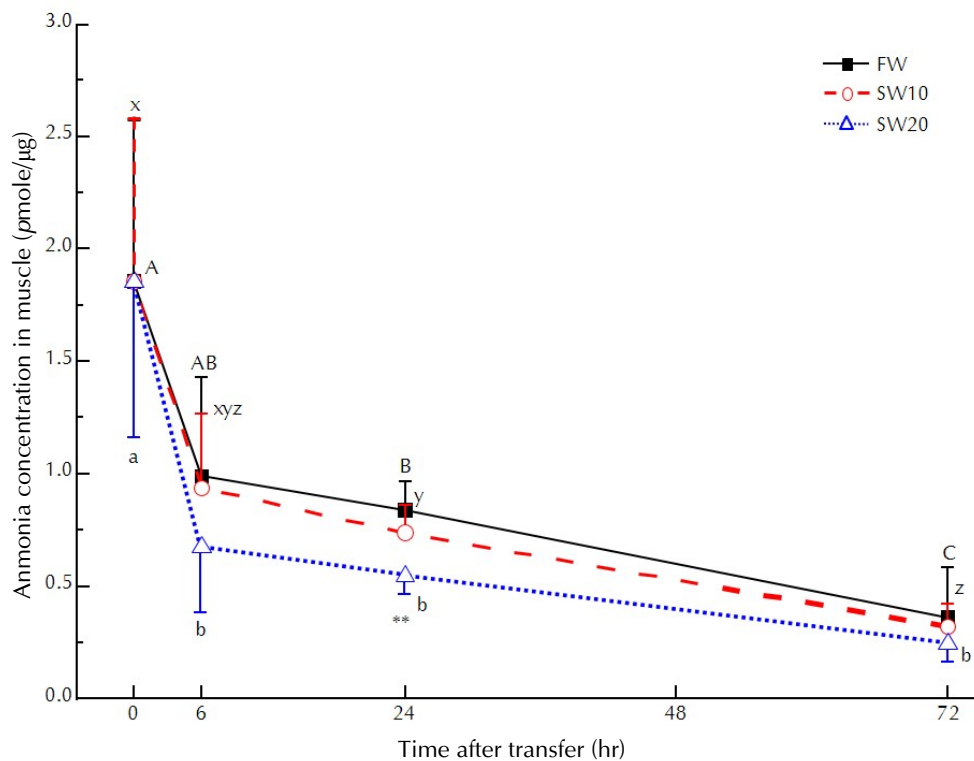


Fig. 4 Ammonia concentrations in *Oreochromis mossambicus* muscle in different salinities of 10 psu and 20 psu. Ammonia (NH_3) concentrations were detected by a spectrophotometric multiwell plate reader. Values are presented as mean \pm standard deviation (SD) ($n=4-6$). **: $p<0.01$, indicates a significant difference between the FW control group and the SW transfer counterparts at the same transferring time point (Student's t -test). Different capital letters and overlapping letters indicate significant differences and non-significant differences, respectively, among treatment time points within the same salinity. (A, B, and C are presented in square for FW; x, y, and z are presented in round for 10 psu SW; a, b, and c are presented in triangle for 20 psu SW).

酸和麩醯胺酸的濃度變化趨勢相似 (Table 2)，在麩胺酸-麩醯胺酸相關的代謝反應中，麩胺酸可藉著 GLUL 與鉍離子結合為麩醯胺酸，或是藉著 GLUD 的催化釋出鉍離子轉換為 α -KG，而丙酮酸 (Pyruvate) 可與釋出的鉍離子結合轉換為丙胺酸，因此我們推測：當吳郭魚在 10 psu 鹽度短期處理的 6 hr 之後，肌肉為了降低體內因外在鹽度緊迫而產生的代謝鉍累積，會將麩胺酸生合成為麩醯胺酸，而 24 hr 則傾向生合成麩胺酸，此現象可能是為了生合成 α -KG 產生能量相關。而在 20 psu 鹽度處理的 6 hr 之後，丙酮酸會與麩胺酸共同作用生合成出 α -KG 進入到 TCA 循環中生成能量，進而導致丙胺酸的累積。

過去在麩胺酸-麩醯胺酸代謝的相關研究較注重在麩胺酸/麩醯胺酸之間的轉換 (Chakrapani *et al.*, 2017)，由於麩胺酸本身是一種興奮性神經傳

遞物質，過多的麩胺酸累積對神經細胞會產生興奮性毒殺作用 (excitotoxicity)，因此神經系統周邊的星狀膠細胞 (Astrocyte) 可藉著 GLUL 將過多的麩胺酸與鉍離子結合，轉換為麩醯胺酸避免神經細胞受到傷害。陸生脊椎動物細胞可藉著此轉換機制保護中樞神經免於胺基酸代謝導致的毒性與相關病變 (Cooper and Plum, 1987; Thrane *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2014)。雖然胺基酸毒性的說法在魚類未必適用，但過去研究確實有指出大彈塗魚 (*Periophthalmodon schlosseri* 以及 *Boleophthalmus boddarti*) 在不同鉍濃度處理下，其腦組織同樣發現 GLUL 活性升高以及麩醯胺酸含量增加的情形 (Peng *et al.*, 1998; Ip *et al.*, 2005)。此外亦有研究指出黃鱔長期處於 25 psu 的鹽水中，肌肉中的麩醯胺酸濃度與 GLUL 活性都會明顯上升 (Tok *et al.*, 2009)。故推測廣鹽性魚類除了神經系統以外，其

餘組織器官亦能發現高 GLUL 活性表現時，此現象可能表示這些組織藉著麩胺酸-麩醯胺酸的合成路徑來除去因環境緊迫壓力所導致的鉍離子累積，同時上述麩醯胺酸與丙胺酸濃度的增加也顯示了這個合成路徑與麩胺酸的相關性。

此外，吳郭魚肌肉中的牛磺酸含量比例最高，此發現也與過去的研究相符合 (Chiou *et al.*, 1990; Takeuchi *et al.*, 2000)。過去研究已指出牛磺酸可作為滲透壓調節物質，對於廣鹽性魚類而言，牛磺酸在組織中的累積也是鹽度適應過程中重要的滲透壓調節機制(Huxtable, 1992; Auerswald *et al.*, 1997; Schaarschmidt *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2015)。

從莫三比克吳郭魚肌肉中麩胺酸-麩醯胺酸以及醣類代謝的反應，我們發現：接近魚體滲透壓的 10 psu 鹽度處理下，吳郭魚會以麩胺酸-麩醯胺酸與其他胺基酸的累積趨向為主。以上代謝產物累積的趨勢對於莫三比克吳郭魚而言原本是一種適應高張緊迫環境的生理策略，但是作為養殖與食用魚類，此種生理機制可能成為人們口中所謂「鮮味」的來源。在味覺相關研究上發現：鮮味的受體在表皮特化的味覺細胞內，反應途徑是藉由 G-protein 活化下游的神經傳遞物質 (Chaudhari, 2013; Kusuhara *et al.*, 2013)。因此我們推測，莫三比克吳郭魚從淡水轉移到海水中蓄養後，肌肉內產生麩醯胺酸累積的趨勢，將導致人們食用時感覺系統的鮮味路徑被誘發，此綜合的味覺反應乃是被人們認知為一種相似於海水魚的「甘味」。

結 論

對於廣鹽性魚類而言，麩胺酸-麩醯胺酸的合成機制可作為協助魚類在適應水域鹽度變化時，維持體內鉍離子濃度恆定的生理機制。由於魚類活動的關係，肌肉需要足夠的能量供應以及穩定的代謝物處理機制，在不同鹽度刺激下，肌肉組織可透過麩胺酸-麩醯胺酸的代謝活化，選擇適合的代謝路徑進行能量提供，以及穩定鉍離子的濃度。本論文針對廣鹽性硬骨魚類模式物種－莫三比克吳郭魚相關的養殖經驗，提出鹽度處理與肉質「鮮味」關聯性的假設。肌肉中麩胺酸可藉著吸收鉍離子以及與丙酮酸共同作用的路徑參與能量代謝，同時調節 α -KG 與麩醯胺酸的濃度，本研究

推論此生理現象即為半淡鹹水養殖會促使吳郭魚肉質產生與海水魚相似「甘味」風味主因。本研究結果預期可延伸至其他具經濟價值的廣鹽性養殖魚類，例如鮭魚、鱒魚與烏魚等。之後並可進一步詳細地探討各類胺基酸代謝路徑，確實地架構出肌肉在鹽度變化下的生理機制，提供往後半淡鹹水養殖工作在分子層面上的參考方向。

參考文獻

- Al-Amoudi, M. (1987) Acclimation of commercially cultured *Oreochromis* species to sea water – an experimental study. *Aquaculture*, 65(3-4): 333-342.
- Assem, H. and W. Hanke (1983) The significance of the amino acids during osmotic adjustment in teleost fish – I. Changes in the euryhaline *Sarotherodon mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.*, 74(3): 531-536.
- Auerswald, L., K. Jürss, D. Schiedek and R. Bastrop (1997) The influence of salinity acclimation on free amino acids and enzyme activities in the intestinal mucosa of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.*, 116(2): 149-155.
- Ayala, M. D., I. Abdel, M. Santaella, C. Martínez, M. J. Periago, F. Gil, and O. L. Albors (2010) Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. *LWT-Food Sci. Technol.*, 43(3): 465-475.
- Beauchamp, G. K. (2009) Sensory and receptor responses to umami: an overview of pioneering work. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 90 (3): 723S-727S.
- Bradley, T. J. (2009) *Animal osmoregulation*. Oxford University Press.
- Chakrapani, V., K. D. Rasal, S. D. Mohapatra, A. R. Rasal, P. Jayasankar, and H. K. Barman (2017) Molecular characterization, computational analysis and transcript profiling of glutamate dehydrogenase (gdh) gene of *Macrobrachium rosenbergii* exposed to saline water. *Gene Rep.*, 8: 37-44.
- Chandrashekar, J., M. A. Hoon, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444 (7117): 288-294.
- Chaudhari, N. (2013) Sweet umami: the twain shall meet. *J. Physiol.*, 591(7): 1597-1597.
- Chaudhari, N., A. M. Landin and S. D. Roper (2000) A metabotropic glutamate receptor variant functions

- as a taste receptor. *Nature Neuroscience*, 3(2): 113-119.
- Chiou, T. K., C. Y. Shiau, and T. J. Chai (1990) Extractive nitrogenous components to cultured milkfish and tilapia. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56(8): 1313-1317.
- Cooper, A. and F. Plum (1987) Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev.*, 67(2): 440-519.
- Elliott, M., and V. Quintino (2007) The estuarine quality paradox, environmental homeostasis and the difficulty of detecting anthropogenic stress in naturally stressed areas. *Mar. Pollut. Bull.*, 54(6): 640-645.
- Evans, D. H. (1980) Osmotic and ionic regulation by freshwater and marine fishes. In *Environmental Physiology of Fishes* (M. A. Ali ed.), NATO Advanced Study Institutes Series (Series A: Life Science), Springer, Boston, MA., Vol. 35, 93-122.
- Furuichi, M., and Y. Yone (1982) Effect of insulin on blood sugar levels of fishes (carp, red seabream and Yellowtail). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 48(9): 1289-1291.
- Fyhn, H. J. (1989) First feeding of marine fish larvae: are free amino acids the source of energy? *Aquaculture*, 80 (1): 111-120.
- Halver, J. E., and R. W. Hardy (2002) *Fish Nutrition*. Academic press.
- Hegab, S. A. and W. Hanke (1983) The significance of the amino acids during osmotic adjustment in teleost fish - II. Changes in the stenohaline *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Physiol.*, 74 (3) , 537-543.
- Huggins, A., & L. Colley, (1971) . The changes in the non-protein nitrogenous constituents of muscle during the adaptation of the eel *Anguilla anguilla* L. from fresh water to sea water. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Comp. Biochem.*, 38 (3): 537-541.
- Huxtable, R. (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.*, 72 (1): 101-163.
- Hwang, P., C. Sun and S. Wu (1989) Changes of plasma osmolality, chloride concentration and gill Na - K-ATPase activity in tilapia *Oreochromis mossambicus* during seawater acclimation. *Mar. Biol.*, 100(3): 295-299.
- Ikeda, K. (2002) New seasonings. *Chem. Senses*, 27(9): 847-849.
- Inokuchi, M., J. Hiroi, S. Watanabe, K. M. Lee and T. Kaneko (2008) Gene expression and morphological localization of NHE3, NCC and NKCC1a in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to a wide range of salinities. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. and Integrative Physiol.*, 151(2): 151-158.
- Ip, Y. K., M. W. Leong, M. Y. Sim, G. S. Goh, W. P. Wong and S. F. Chew (2005) Chronic and acute ammonia toxicity in mudskippers, *Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti*: brain ammonia and glutamine contents, and effects of methionine sulfoximine and MK801. *J. Exp. Biol.*, 208(10): 1993-2004.
- Jayaram, M. G. and F. Beamish (1992) Influence of dietary protein and lipid on nitrogen and energy losses in lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.*, 49 (11): 2267-2272.
- Kaushik, S. J., and P. Luquet (1979) Influence of dietary amino acid patterns on the free amino acid contents of blood and muscle of rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Comp. Biochem.*, 64 (2): 175-180.
- Kaushik, S. J. and I. Seiliez (2010) Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquacul. Res.*, 41(3): 322-332.
- Kusuhara, Y., R. Yoshida, T. Ohkuri, K. Yasumatsu, A. Voigt, S. Hübner, K. Maeda, U. Boehm, W. Meyerhof and Y. Ninomiya (2013) Taste responses in mice lacking taste receptor subunit T1R1. *J. Physiol.*, 591(7): 1967-1985.
- Lange, R. and K. Fugelli (1965) The osmotic adjustment in the euryhaline teleosts, the flounder, *Pleuronectes flesus* L. and the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 15 (3): 283-292.
- Lindemann, B. (2000) A taste for umami. *Nature Neuroscience*, 3 (2): 99-100.
- Lombardi, S. A. (2012) Comparative physiological ecology of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and the Asian oyster, *Crassostrea ariakensis*: an investigation into aerobic metabolism and hypoxic adaptations. Doctor Degree Thesis, University of Maryland, 121 pp.
- McLusky, D. and M. Elliott (2007) Transitional waters: a new approach, semantics or just muddying the waters? *Estuarine, Coastal and Shelf Sci.*, 71(3): 359-363.
- Moon, T. and I. Johnston (1981) Amino acid transport and interconversions in tissues of freshly caught and food-deprived plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Biol.*, 19(6): 653-663.
- Nelson, G., J. Chandrashekar, M. A. Hoon, L. Feng, G.

- Zhao, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature*, 416 (6877): 199-202.
- Ohkubo, N. and T. Matsubara (2002) Sequential utilization of free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of barfin flounder *Verasper moseri*. *Mar. Biol.*, 140 (1): 187-196.
- Olvera-Nova, M., C. Marti'nez-Palacios and L. Olivera-Castillo (2002) Utilization of torula yeast (*Candida utilis*) as a protein source in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) fry. *Aquacul. Nutr.*, 8 (4): 257-264.
- Peng, K. W., S. Chew, C. Lim, S. Kuah, W. Kok and Y. Ip (1998) The mudskippers *Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti* can tolerate environmental NH₃ concentrations of 446 and 36μM, respectively. *Fish Physiol. Biochem.*, 19 (1): 59-69.
- Philippart, J. C. and J. C. Ruwet (1982) . Ecology and distribution of tilapias. *Biol. Cul. Tilapias*, 7: 15-60.
- Pillay, T. V. R. and M. N. Kutty, M. N. (2005) *Aquaculture: Principles and Practices*. Blackwell publishing.
- Rønnestad, I. and H. J. Fyhn (1993) Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. *Rev. Fish. Sci.*, 1(3): 239-259.
- Satheeshkumar, P. and A. B. Khan (2012) Identification of mangrove water quality by multivariate statistical analysis methods in Pondicherry coast, India. *Environ. Monitor. Assess.*, 184(6): 3761-3774.
- Schaarschmidt, T., E. Meyer and K. Jürss (1999) A comparison of transport-related gill enzyme activities and tissue-specific free amino acid concentrations of Baltic Sea (brackish water) and freshwater threespine sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, after salinity and temperature acclimation. *Mar. Biol.*, 135 (4): 689-697.
- Takeuchi, K., H. Toyohara, M. Kinoshita and M. Sakaguchi (2000) . Ubiquitous increase in taurine transporter mRNA in tissues of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during high-salinity adaptation. *Fish physiol. Biochem.*, 23(2): 173-182.
- Thrane, V. R., A. S. Thrane, F. Wang, M. L. Cotrina, N. A. Smith, M. Chen, Q. Xu, N. Kang, T. Fujita and E. A. Nagelhus (2013) Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering. *Nature Med.*, 19(12): 1643-1648.
- Tok, C. Y., S. F. Chew, W. Y. Peh, A. M. Loong, W. P. Wong and Y. K. Ip (2009) Glutamine accumulation and up-regulation of glutamine synthetase activity in the swamp eel, *Monopterus albus* (Zuiew), exposed to brackish water. *J. Exp. Biol.*, 212 (Pt 9): 1248-1258. doi:10.1242/jeb.025395
- Tseng, Y. C., C. J. Huang, J. C. H. Chang, W. Y. Teng, O. Baba, M. J. Fann and P.P. Hwang (2007) Glycogen phosphorylase in glycogen-rich cells is involved in the energy supply for ion regulation in fish gill epithelia. *Am. J. Physiol-Regul., Integra. Comp. Physiol.*, 293(1): R482-R491.
- Tzeng, W. N. and Y. T. Wang (1992) Structure, composition and seasonal dynamics of the larval and juvenile fish community in the mangrove estuary of Tanshui River, Taiwan. *Mar. Biol.*, 113(3): 481-490.
- Venkatachari, S. (1974) Effect of salinity adaptation on nitrogen metabolism in the freshwater fish *Tilapia mossambica*. I. Tissue protein and amino acid levels. *Mar. Biol.*, 24 (1): 57-63.
- Wang, G., K. Xu, X. Tian, S. Dong and Z. Fang (2015) Changes in plasma osmolality, cortisol and amino acid levels of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) at different salinities. *J. Ocean Univ. China*, 14(5): 881-887.
- Weslawski, J., J. Wiktor, M. Zajaczkowski and S. Swerpel (1993) . Intertidal zone of Svalbard. *Polar Biol.*, 13(2): 73-79.
- Whitfield, A. K. and S. J. Blaber (1979) The distribution of the freshwater cichlid *Sarotherodon mossambicus* in estuarine systems. *Environ. Biol. Fishes*, 4(1): 77-81.
- Wilson, R. (1994) Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*, 124(1): 67-80.
- Yao, P. S., D. Z. Kang, R. Y. Lin, B. Ye, W. Wang and Z. C. Ye (2014) Glutamate/glutamine metabolism coupling between astrocytes and glioma cells: neuroprotection and inhibition of glioma growth. *Biochem. Biophysiol. Res. Commun.*, 450 (1): 295-299.
- Zikos, A., A. P. Seale, D. T. Lerner, E. G. Grau, and K. E. Korsmeyer (2014) Effects of salinity on metabolic rate and branchial expression of genes involved in ion transport and metabolism in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 178: 121-131. doi:10.1016/j.cbpa.2014.08.016.

Glutamate-glutamine Metabolism in Euryhaline Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Muscle Under Salinity Challenges

Hong-Yuan Wang¹, Yu-Chun Wang^{2*}, Pou-Long Kuan³ and Yung-Che Tseng³

¹ Institute of Life Science, National Taiwan Normal University

²Planning and Information Division, Fisheries Research Institute

³Marine Research Station, Institute of Cellular and Organismic Biology, Academia Sinica

ABSTRACT

In tilapia aquaculture, the transfer of the fish to hyperosmotic seawater (SW) is one of the essential steps for diminishing undesirable flavor in muscle. In this study, Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) was utilized to investigate glutamate/glutamine-related metabolism in muscle under various salinity treatments. Transcript expressions of glutamate-ammonia ligase (GLUL) and glutamate dehydrogenase (GLUD) in muscle were found to be significantly increased in 10 psu SW. In addition, the contents of glutamine and other amino acids in muscle were found to be increased in both 10 and 20 psu SW. In contrast, the ammonia contents in muscle were not affected by different SW conditions. These results indicated that the glutamine accumulated in muscle may be generated by the coupling of glutamate with ammonia following 10 psu SW treatment. These physiological strategy utilized by aquaculture tilapia muscle under hyperosmotic stress would cause the accumulation of amino acids and further induce the “umami” flavor of human taste.

Key words: tilapia, muscle, salinity transfer, glutamate-glutamine metabolism

*Correspondence: 199 Hou-lh Road, Keelung, Taiwan. TEL: (02)2462-2101 ext. 2524; FAX: (02) 2462-4627; E-mail: ycwang@ mail.tfrin.gov.tw