

纳豆及其制品的安全性研究

王露露^{1,2}, 李斌³, 彭雪菲¹, 陈楠楠³, 曹梦思¹, 刘明^{1*}, 郭新光¹, 别小妹²

(¹中国食品发酵工业研究院 北京 100015)

(²南京农业大学食品科技学院 南京 210095)

(³食品行业生产力促进中心 北京 100015)

摘要 以市售纳豆及其制品为研究对象,从中分离到数株具有芽孢杆菌特征的菌株,采用菌落形态、生理生化及 16S rDNA 序列比对等方法鉴定到 13 株枯草芽孢杆菌。采用纸片扩散法检测 8 种常见抗菌药物对菌株的最低抑制浓度(MIC 值),根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)中耐药性解释标准,SD-7 菌株对所选抗菌药物均敏感,其它菌株均表现出不同程度的耐药性。采用液相色谱法检测市售纳豆及其制品中的生物胺含量,7 种生物胺标准品都能得到较好的分离,且标准曲线的线性较好(R^2 均>0.9963);20 种样品中生物胺的总含量在 2.21~200.91 mg/kg 范围。市售纳豆及其制品中具有潜在的转移性致病基因和代谢有毒产物的风险,研究结果为建立产品食用安全性评价方法提供参考。

关键词 纳豆及其制品; 枯草芽孢杆菌; 耐药性; 生物胺

文章编号 1009-7848(2022)08-0325-09 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2022.08.035

纳豆是由纳豆芽孢杆菌发酵豆类而成的一类发酵食品^[1],在发酵过程中会产生纳豆激酶(Nattokinase, NK)、维生素 K₂、异黄酮、超氧化物歧化酶(SOD)等活性物质^[2],可以溶解血栓^[3],预防骨质疏松^[4],降血压^[5],降血脂^[6],减脂助消化^[7],免疫调节^[8]等。纳豆芽孢杆菌属于枯草芽孢杆菌的亚种,研究表明,枯草芽孢杆菌可以有效抑制动物肠道内致病菌^[9],调节肠道菌群平衡^[10],提高机体免疫力^[11],促进酶类及 B 族维生素合成,进而提高食物的消化吸收利用率^[12]等。

发酵食品是否安全,与发酵菌株和生产工艺密不可分。一般来说,发酵工艺条件可控,具有较高的安全性,然而,发酵菌株的安全性、有毒有害代谢产物及杂菌的污染不可避免地会增加食品安全风险^[13]。随着抗生素在人和动物中持续过度的使用,甚至滥用,肠道致病菌或非致病菌产生耐药性或携带耐药基因,可传递或转移给肠道内其它细菌,对环境及人体健康造成威胁^[14]。目前细菌的耐药性俨然成为影响公众卫生安全的问题。然而,

大多数耐药性研究聚焦在致病菌的药物敏感性,有关非致病菌耐药性的研究很少,枯草芽孢杆菌与常见抗生素相互作用的研究更是寥寥。纳豆及其制品中有大量活性菌随产品的摄入进入人体,如果其存在可转移耐药基因,就有可能引起人体肠道致病菌产生耐药性,对人体造成安全威胁。

传统发酵食品一般不会存在安全性问题,然而,在食品发酵过程中生物胺(Biogenic Amines, BA)的积累很难控制^[15]。适当的 BA 对人体的各项生理机能具有调节作用,当 BA 代谢能力饱和或代谢活性被特异性地减弱或抑制时,会在人体内大量积累,可能会发生食物中毒^[16]。目前各国对食品中 BA 的限量标准不一,我国尚未对各类食品 BA 含量作出要求。王充等^[17]对豆豉、豆酱、酱油 3 种大豆发酵制品的 8 个样品中生物胺含量进行检测,发现 50%的样品中组胺含量超过美国食品药品监督管理局确定的危害水平(500 mg/kg)。Yang 等^[18]对市售大豆和豆腐中生物胺含量进行研究,发现 30 种发酵大豆样品中有 8 种存在生物胺不安全性,组胺、酪胺和 β -苯乙胺的含量达到威胁人类健康的水平,豆腐中的腐胺含量也存在安全隐患。由此可见,发酵纳豆中也可能存在过量积累 BA 的风险。目前有关发酵豆制品中 BA 的研究多集中在发酵初制品的检测,缺少终产品中生物胺含量的数据。

收稿日期: 2021-08-04

基金项目: 国家重点研发计划项目【食品添加剂及保健食品标准再评估研究(2019YFC1605203)】

作者简介: 王露露(1996—),女,硕士生

通信作者: 刘明 E-mail: lm_bob@163.com

本文通过纸片法研究 8 种常见抗菌药物对 14 株枯草芽孢杆菌的最低抑制浓度(MIC 值),采用液相色谱法测定市售纳豆及其制品生物胺含量。根据菌株耐药性和产品的生物胺含量评价纳豆及其制品的安全性,为尽快实现其安全性的标准化评价方法提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 样品 20 种纳豆及其制品,购自北京、广东、西安、大连等市场。

1.1.2 菌株 枯草芽孢杆菌枯草亚种(CICC 10023),中国工业微生物菌种保藏管理中心。金黄色葡萄球菌(ATCC29213),本实验室保藏。

1.1.3 培养基 LB 肉汤培养基,用于种子培养;LB 固体培养基,用于菌株划线纯化;MHA (Mueller-Hinton Agar),用于抗生素敏感试验;PCA(Plate Count Agar),用于平板计数。

1.1.4 试剂 抗菌药物(环丙沙星、氯霉素、美罗培南、头孢他啶、头孢曲松、氨苄西林、庆大霉素、四环素),购自中国食品药品检定研究院;生物胺标准品(腐胺、尸胺、组胺、2,4,6-三甲基苯乙胺、酪胺、亚精胺、精胺)、1,7-二氨基庚烷内标标准品、丹磺酰氯衍生物,购自美国 Sigma 公司;乙腈(色谱纯级),德国 CNW Technologies 公司;丙酮(色谱纯级),韩国 DUKSAN 公司。其余试剂均为国产分析纯级。

1.1.5 仪器与设备 恒温培养箱,德国 MEMMERT 公司;GR60DA 高压灭菌锅,厦门致微仪器有限公司;MQL-61R 立式振荡培养箱,上海昃泉仪器有限公司;CX33 光学显微镜,日本 Olympus Corporation 公司;HC-3518 高速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;T-Gradient 梯度 PCR 仪、琼脂糖凝胶电泳仪,德国 BIOMETRA 公司;Waters 2695 液相色谱仪,美国 Waters 公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离与纯化 称取 10 g 样品置于均质袋中,加入 100 mL 无菌水均质 5 min,80 °C 水浴 30 min 除去杂菌,冷却至室温后取 1 mL 上清液进行梯度稀释,分别取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 4 个梯度

在 LB 培养基上涂布,每个梯度 3 个平行,37 °C 培养 24 h,挑取疑似菌株的单菌落至 LB 平板连续划线至得到大小均一的单个菌落。

1.2.2 菌株鉴定

1.2.2.1 形态学观察 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》解释标准,观察平板上单个菌落的大小形态、颜色、表面粗糙度、透明度、边缘整齐情况等。

1.2.2.2 生理生化鉴定 以枯草芽孢杆菌亚种(CICC 10023)作为对照,按照鉴定芽孢杆菌生理生化鉴定试剂盒的使用说明,进行 12 种生理生化试验,观察试剂盒内各培养基颜色变化。

1.2.2.3 16S rDNA 鉴定 提取纯化的单菌落至 LB 液体培养基中,37 °C 培养 24 h,用 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA。以试剂盒提取的 DNA 为模板,对其 16S rRNA 进行 PCR 扩增,采用通用引物 27F:5' -AGAGTTTGATCCTGGTCAGAAC-GAACGCT -3';1492R:5' -TACGGCTACCTTGT-TACGACTTCACCCC-3'。PCR 扩增体系:12.5 μ L 2 \times Taq PCR Master Mix,0.5 μ L(10 μ mol/L)上下游引物,1 μ L 模板 DNA,ddH₂O 补足到 25 μ L,进行 35 个循环。

PCR 扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳仪检测。选择明亮且清晰准确的条带 DNA 交由生工生物工程股份有限公司进行 16S rDNA 双向测序。对测序结果采用 DNA MAN 软件拼接,登录 NCBI 利用 Nucleotide BLAST 在线对样品序列结果进行序列同源性比对,下载数据库中获得的高同源性比较高的菌株 16S rDNA 基因序列信息,获得菌株的系统发育地位。

1.2.3 药物敏感性试验 将 8 种抗菌药物稀释成试验所需的浓度,浸透自制无菌药敏片(8 mm \times 0.7 mm),37 °C 烘干备用。将甘油管内保存的菌株活化后,采用麦氏比浊法调整菌液浓度大约至 1.5×10^8 CFU/mL,再用生理盐水稀释 100 倍(大约为 $10^5\sim 10^6$ CFU/mL)。取 100 μ L 置于制备好的 MHA 培养基,用一次性涂布棒涂至菌液完全被琼脂吸收,正置 30 min,用无菌镊子夹取各浓度的耐药纸片平铺于平板,每个纸片的中心距离 >24 mm,纸片边缘距平板边缘 >15 mm,37 °C 恒温培养箱内孵育 18 h。以金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)作为质控菌株,质控菌株和试验菌株的药敏试验

结果必须符合美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) 颁布的最新版 M100-2C 抗菌药物敏感性试验解释标准, 确定明显抑制菌株生长的最低抑制浓度 (MIC 值)。

1.2.4 生物胺含量检测

1.2.4.1 样品的提取 将各样品研磨至碎, 准确称取 5 g, 置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 三氯乙酸超声提取 30 min, 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液转移至 25 mL 容量瓶中, 沉淀用 10 mL 三氯乙酸重复提取、离心, 取上清液转移至容量瓶后, 用三氯乙酸定容至刻度。

1.2.4.2 衍生及测定 样品及生物胺标准系列溶液的衍生参考 GB 5009.208-2016《食品安全国家标准 食品中生物胺的测定》^[9]。

1.2.4.3 色谱条件 色谱柱为 C18 柱 (柱长 250 mm, 柱内径 4.6 mm, 柱填料粒径 5 μm), 紫外检测波长 254 nm, 进样量 20 μL , 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 流动相 A: 90% 乙腈和 10% 乙酸铵溶液 (0.01 mol/L, 含 0.1% 乙酸), 流动相 B: 10% 乙腈和 90% 乙酸铵溶液 (0.01 mol/L, 含 0.1% 乙酸), 流速为 0.8 mL/min。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	0	22	25	32	31	37
流动相 A/%	60	85	100	100	60	60
流动相 B/%	40	15	0	0	40	40

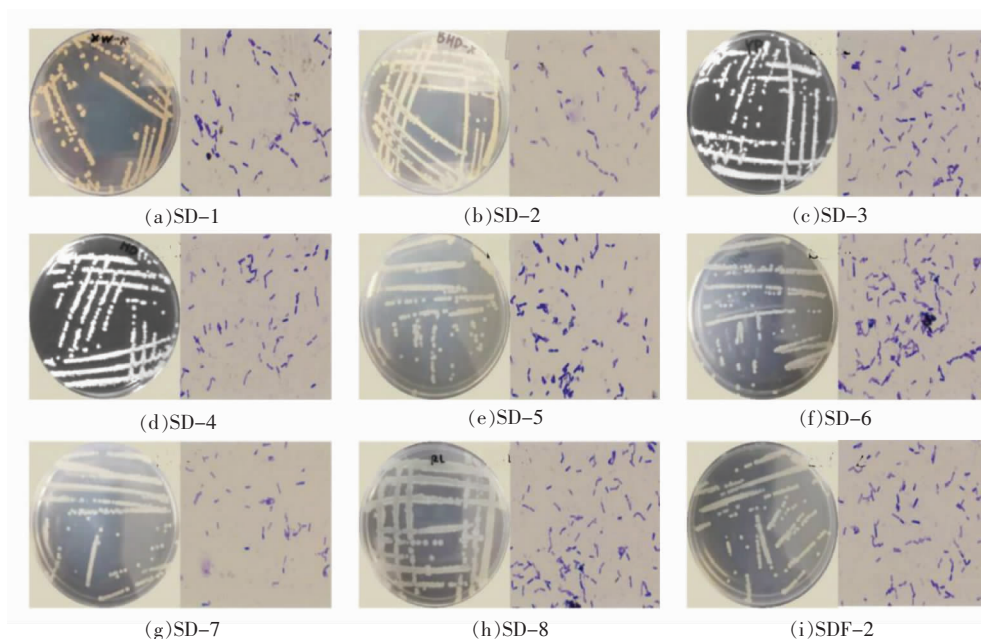
2 结果与分析

2.1 菌株的分离鉴定

2.1.1 菌株的形态特征 在纳豆及其制品中共分离到 14 株菌, 编号分别为 SD-1~SD-8、SDF-2、SDF-3、SDF-4、SDP-1、SDP-3、SDP-5。菌株的菌落形态及革兰氏染色结果如图 1 所示, 菌落近似圆形, 表面呈乳白色或浅黄色, 湿润有皱褶, 不透明, 边缘呈叶齿状, 与培养基紧密结合。菌体显蓝

紫色, 属革兰氏阳性菌, 短杆状, 单个或链状排列, 菌体内有芽孢。

2.1.2 生理生化鉴定 如表 2 所示, 14 株菌的生理生化结果与阳性菌株 CICC 10023 各项指标相同, 符合《伯杰细菌鉴定手册第 8 版》、《常见细菌系统鉴定手册》中芽孢杆菌的特性描述, 结合菌株的形态特征, 可以确定 14 株菌为芽孢杆菌属。



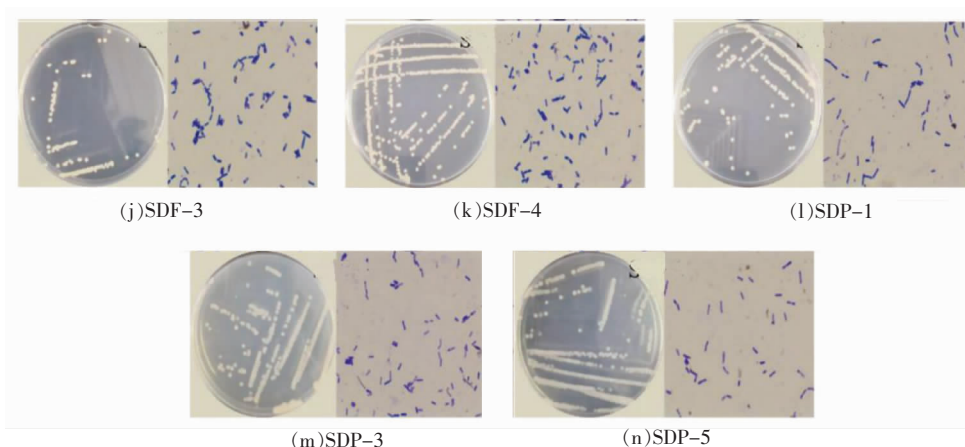


图1 菌株的菌落形态及细胞形态

Fig.1 Colony and cell morphology of strain

表2 菌株的生理生化鉴定

Table 2 Physiological and biochemical identification of strains

	丙二酸 盐利用 试验	乙酰甲 基甲醇 试验	柠檬酸 盐利用 试验	ONPG	硝酸盐 还原 试验	触酶 试验	精氨酸 脱羧酶 试验	蔗糖 发酵	甘露醇 发酵	葡萄糖 发酵	阿拉伯 糖发酵	海藻糖 发酵
S.S	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
P.C	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SD-1	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SD-2	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SD-3	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SD-4	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SD-5	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SD-6	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SD-7	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SD-8	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SDF-2	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SDF-3	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SDF-4	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SDP-1	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SDP-3	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SDP-5	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

注:ONPG. 2-硝基苯基-β-D-半乳糖苷;“S.S”表示标准结果,“P.C”表示阳性菌株(CICC 1002)结果,“+”表示阳性,“-”表示阴性。

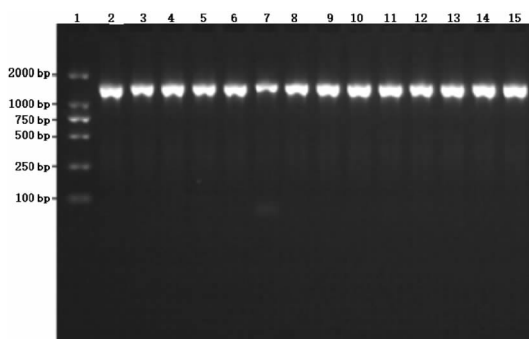
2.1.3 16S rDNA 鉴定 利用 DNA 基因组提取试剂盒在无菌环境下提取各菌株的 DNA 后,PCR 扩增后用琼脂糖凝胶电泳检测条带大小,结果显示其碱基对数目为 1 400 bp 左右,说明扩增成功,菌株 NDA 扩增条带如图 2。

13 株菌完成了双向测序,Seq Man 软件拼接后,各菌株的 16S rDNA 全长在 1 460 bp 左右。将 13 株菌的序列分别使用 BLAST 在基因库中进行

同源性在线搜索,确定 13 株菌均为枯草芽孢杆菌。

2.2 药物敏感性试验

如表 3 所示,分离到的 14 株枯草芽孢杆菌中,只有 SD-7 菌株未表现出对任何一种抗菌药物的耐受性,其它菌均表现出不同程度的耐药。SD-1、SD-2、SD-4、SD-8、SDF-4、SDP-5 菌株对头孢他啶表现出高度耐受性,SD-6、SDF-2、SDP-3



注:从左至右共 15 条泳道,分别为:泳道 1:Marker,2 000 bp;泳道 2:BZT;泳道 3:XW;泳道 4:10023;泳道 5:YJ;泳道 6:HYD;泳道 7:BL;泳道 8:BHD;泳道 9:HD;泳道 10:HQ;泳道 11:GY;泳道 12:NDYP;泳道 13:SZY;泳道 14:RL;泳道 15:LD。

图 2 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 DNA agarose gel electrophoresis

表现为轻微耐药性,其余均对头孢他啶高度敏感。SDF-2 和 SDP-1 对环丙沙星表现出高度耐受性,SD-3 表现为轻微耐药性,其它均对环丙沙星敏感。美罗培南对 SD-2、SDP-5 的 MIC 值为 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$,表现为轻微耐药,对其余 12 株菌则抑制作用明显。14 株菌对头孢曲松和庆大霉素高度敏感,表明均未携带头孢曲松和庆大霉素抗性基因。SD-2、SD-3、SD-7、SDF-2、SDP-1 对氯霉素敏感,其它菌株均表现为轻微耐药。因为 CLSI 中未规定氨苄西林对芽孢杆菌属类细菌的 MIC 值,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质量浓度未观察到对菌株的抑制作用,无法判定菌株是否耐药。

表 3 常见抗菌药物对各菌株的 MIC 值($\mu\text{g}/\text{mL}$)及敏感性判断

Table 3 MIC value ($\mu\text{g}/\text{mL}$) and sensitivity judgment of common antimicrobial agents against each strain

菌株	抗菌药物							
	氨苄西林	头孢他啶	头孢曲松	美罗培南	庆大霉素	四环素	环丙沙星	氯霉素
SD-1	<8/-	>32/R	<8/S	<4/S	<4/S	2.5/S	<0.0625/S	16/I
SD-2	<8/-	>32/R	<8/S	8/I	<4/S	<4/S	<0.0625/S	<8/S
SD-3	<8/-	<8/S	<8/S	<4/S	<4/S	5/I	1/I	<8/S
SD-4	<8/-	>32/R	<8/S	<4/S	<4/S	1.25/S	<0.0625/S	16/I
SD-5	<8/-	<8/S	<8/S	<4/S	<4/S	1.25/S	<0.625/S	10/I
SD-6	<8/-	16/I	<8/S	<4/S	<4/S	2.5/S	<0.0625/S	10/I
SD-7	<8/-	<8/S	<8/S	<4/S	<4/S	2.5/S	<0.0625/S	<8/S
SD-8	<8/-	>32/R	<8/S	<4/S	<4/S	<4/S	<0.0625/S	10/I
SDF-2	<8/-	10/I	<8/S	<4/S	<4/S	<4/S	5/R	<8/S
SDF-3	<8/-	<8/S	<8/S	<4/S	<4/S	<4/S	<0.0625/S	10/I
SDF-4	<8/-	>32/R	<8/S	<4/S	<4/S	<4/S	<0.0625/S	16/I
SDP-1	<8/-	<8/S	<8/S	<4/S	<4/S	<4/S	5/R	<8/S
SDP-3	<8/-	16/I	<8/S	<4/S	<4/S	<4/S	<0.0625/S	10/I
SDP-5	<8/-	>32/R	<8/S	8/I	<4/S	<4/S	<0.0625/S	16/I

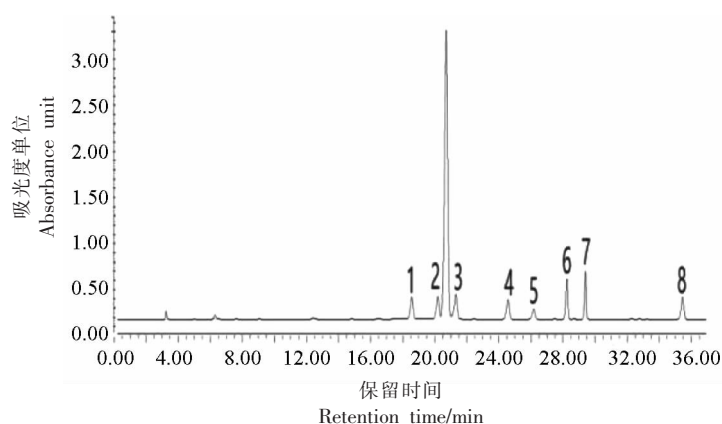
注:“-”表示未表现出敏感或耐药性;S(susceptible). 敏感;I(intermediate). 中度敏感;R(resistance). 耐药;“<”或“>”表示抑菌圈小于或大于 MIC 值。

2.3 生物胺含量检测

如图 3 所示,7 种生物胺标准品在 37 min 内全部出峰,且各生物胺之间都能得到很好的分离,出峰顺序及保留时间分别为腐胺 18.570 min、尸胺 20.201 min、组胺 21.319 min、2,4,6-三甲基苯乙胺 26.183 min、酪胺 28.242 min、亚精胺 29.401 min、精胺 35.466 min。

由表 4 可知,7 种生物胺标准品回归方程的相

关系数 $R^2 > 0.9963$,说明标准曲线呈良好的线性关系,以 3 倍和 10 倍的信噪比分别确定 7 种生物胺的检出限和定量限分别在 0.033~0.167 mg/L 和 0.112~0.558 mg/L,7 种生物胺回收率在 90.2%~113%之间。同时进行 6 个平行样品,7 种生物胺的相对标准偏差(RSD)范围为 0.085~0.016 之间,说明该方法具有良好的精密度,所选液相色谱仪能满足检测样品中生物胺含量的要求。



注:1. 腐胺;2. 尸胺;3. 组胺;4. 1,7-二氨基庚烷(内标);5. 2,4,6-三甲基苯乙胺;6. 酪胺;7. 亚精胺;8. 精胺。

图3 生物胺混合标准品液相色谱图(25 mg/L)

Fig.3 Liquid chromatography of mixed standard of biogenic amines (25 mg/L)

表4 液相色谱法测定生物胺标准品的特征参数

Table 4 Characteristic parameters of biogenic amine standards by liquid chromatography

生物胺标准品	回归方程	相关系数(R^2)	检出限/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	定量限/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
腐胺	$y = 0.4177x - 0.1944$	0.9999	0.075	0.251
尸胺	$y = 0.4371x - 0.2074$	0.9998	0.071	0.236
组胺	$y = 0.5343x - 0.2189$	0.9989	0.059	0.199
2,4,6-三甲基苯乙胺	$y = 0.2062x - 0.1024$	0.9997	0.167	0.558
酪胺	$y = 0.5523x - 0.2583$	0.9998	0.039	0.132
亚精胺	$y = 0.5399x - 0.2286$	0.9985	0.033	0.112
精胺	$y = 0.4217x - 0.1623$	0.9963	0.070	0.236

不同产品形式含有的生物胺种类及含量不同,8种发酵纳豆生物胺总含量范围在8.48~162.16 mg/kg,8种纳豆中均未检出2,4,6-三甲基苯乙胺。除ND-5产品外,其它7种纳豆均未检出组胺。同样是发酵大豆,ND-5产品生物胺总含量高达162.16 mg/kg,ND-6产品中生物胺含量仅8.48 mg/kg,每千克样品生物胺含量相差150 mg之多。6种纳豆冻干粉生物胺含量范围在2.21~200.91 mg/kg,不同厂家的冻干粉生物胺含量也存在较大的差异。6种纳豆糖果产品中生物胺含量范围在3.54~21.71 mg/kg,6种糖果产品中均未检出组胺和2,4,6-三甲基苯乙胺。根据美国食品药品监督管理局(FDA)对食品中生物胺限量标准,20种产品中生物胺含量均未超标,然而,ND-5腐胺、尸胺含量较高,具有一定的安全风险,要注意控制食用量,过量食用可能影响人体健康。

3 讨论

纳豆及其制品中的活菌会随产品的摄入进入人体,一旦产生耐药性,其耐药基因极有可能会通过各种方式在不同种、属水平中产生转移,使肠道内致病菌产生耐药性^[20],同时枯草芽孢杆菌的益生作用也会逐渐被抑制,对人体健康造成威胁。本研究首次开展了分离市售纳豆及其制品中的优势菌株,通过制备不同质量浓度梯度的抗生素,研究8种常见抗菌药物对产品优势菌的MIC值。除SD-7菌株外,其它菌均有不同程度的耐药,在检测菌株中有6株对头孢他啶药物表现出高度耐受性,两株对环丙沙星耐受,9株对氯霉素轻微耐药,说明菌株中可能存在这几类抗菌药物的耐受基因,因此,摄入含枯草芽孢杆菌的产品时,应注意和其敏感抗菌药物分开食用,同时需加强产品生产菌的耐药检测、监督、管理及控制。下一步可以根据报道的文献,研究不同菌株对不同药物的

表5 样品生物胺含量测定结果(mg/kg)
Table 5 Results of biogenic amines in sample groups (mg/kg)

	腐胺	尸胺	组胺	2,4,6-三甲 基苯乙胺	酪胺	亚精胺	精胺	总含量
ND-1	18.48	11.79	ND	ND	ND	17.92	8.77	56.96
ND-2	11.01	12.85	ND	ND	13.83	8.73	ND	46.42
ND-3	12.42	11.99	ND	ND	ND	27.69	10.69	62.79
ND-4	3.82	3.22	ND	ND	ND	8.17	2.99	18.2
ND-5	57.34	94.24	2.38	ND	3.43	2.75	2.02	162.16
ND-6	ND	2.69	ND	ND	ND	3.74	2.05	8.48
ND-7	3.64	3.00	ND	ND	ND	8.19	3.12	17.95
ND-8	5.05	2.84	ND	ND	ND	8.96	3.69	20.54
NDF-1	11.68	ND	ND	10.51	ND	12.29	ND	34.48
NDF-2	2.59	3.39	ND	ND	2.95	2.18	ND	11.11
NDF-3	ND	ND	ND	ND	ND	2.21	ND	2.21
NDF-4	18.03	11.29	ND	10.74	ND	11.97	ND	52.03
NDF-5	3.97	3.00	ND	ND	ND	7.59	2.85	17.41
NDF-6	28.37	26.49	26.46	27.08	37.62	28.31	26.58	200.91
NDP-1	ND	ND	ND	ND	2.38	2.32	ND	4.7
NDP-2	7.63	2.95	ND	ND	3.30	5.42	2.41	21.71
NDP-3	3.12	3.71	ND	ND	2.93	3.90	2.21	15.87
NDP-4	3.54	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.54
NDP-5	2.67	3.09	ND	ND	3.02	3.57	ND	12.35
NDP-6	2.39	2.43	ND	ND	2.68	3.69	ND	11.19

注:ND. 纳豆样品;NDF. 纳豆冻干粉;NDP. 纳豆糖果;“ND”表示未检出。

耐药机制及其耐药基因的转移规律,完善产品的食用安全性评价。

纳豆发酵造成生物胺的累积不仅影响纳豆的风味和口感,在一定的条件下还可能转化成强致癌的亚硝胺,过量摄入会影响人体健康^[21]。目前国内没有纳豆及其制品生物胺限量标准,同时有关研究中缺少关于终产品中生物胺含量的数据,本研究中以纳豆及其制品为研究对象,通过对产品中生物胺含量检测发现,同种产品形式生物胺含量存在较大差异,可能与选择的菌株与加工工艺有关。不同产品形式中生物胺种类及含量存在差异,纳豆糖果产品相对比发酵纳豆而言,生物胺含量减少,这可能与终产品加工过程中发酵菌株的总数减少有关,进一步说明影响生物胺产生的一个重要因素是发酵的微生物种类及数量。参照美国食品药品监督管理局(FDA)对食品中生物胺限量标准,各产品生物胺总含量虽然没有超标现象,但个别产品的生物胺含量具有一定的安全风险,

有必要建立纳豆制品中生物胺含量限值。

以上结果表明,发酵纳豆类是具有安全风险的,应该重视发酵产品可能存在和产生的致病基因以及毒性代谢产物带来的风险。完善纳豆及其制品安全性的评价方法,开展产品发酵菌株耐药性研究和生物胺含量的检测是纳豆及其制品安全性的重要评价手段,将为提高产品的食用安全性提供保障。

参 考 文 献

- [1] HU Y J, GE C R, YUAN W, et al. Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation[J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90(7): 1194-1202.
- [2] 聂冰秀, 顾悦, 张承泰, 等. 纳豆的保健功效及应用前景[J]. *粮食加工*, 2021, 46(1): 69-72.
NIE B X, GU Y, ZHANG C T, et al. Healthcare functions and applications prospect of natto[J]. *Grain Pro-*

- cessing, 2021, 46(1): 69–72.
- [3] SUMI H, HAMADA H, TSUSHIMA H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. *Experientia*, 1987, 43(10): 1110–1111.
- [4] LIU Y, HE Y, HE B R, et al. The anti-osteoporotic effects of natto on bone mineral density in perimenopausal women[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2021, 28(25): 5191–5200.
- [5] FUJITA M, OHNISHI K, TAKAOKA S, et al. Antihypertensive effects of continuous oral administration of nattokinase and its fragments in spontaneously hypertensive rats[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2011, 34(11): 1696–1701.
- [6] PARK K J, KANG J I, KIM T S, et al. The antithrombotic and fibrinolytic effect of natto in hypercholesterolemia rats[J]. *Prev Nutr Food Sci*, 2012, 17(1): 78–82.
- [7] 卓怡云, 吕婧, 刘颖, 等. 纳豆激酶对大鼠酒精性肝损伤的改善效果及免疫调节作用[J]. *食品科学*, 2019, 40(7): 156–162.
- ZHUO Y Y, LÜ J, LIU Y, et al. Nattokinase alleviates alcoholic liver injury and modulates immune function in rats[J]. *Food Science*, 2019, 40(7): 156–162.
- [8] CAI D B, ZHU C J, CHEN S W. Microbial production of nattokinase: Current progress, challenge and prospect[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 33(5): 84.
- [9] 曹少谦, 南楠, 袁勇军, 等. 枯草芽孢杆菌发酵提取物对大肠杆菌的抑制作用[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(3): 111–115, 126.
- CAO S Q, NAN N, YUAN Y J, et al. Inhibitory effect of fermented extracts by *Bacillus subtilis* on *Escherichia coli*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(3): 111–115, 126.
- [10] WHELAN R A, DORANALLI K, RINTTILÄ T, et al. The impact of *Bacillus subtilis* DSM 32315 on the pathology, performance, and intestinal microbiome of broiler chickens in a necrotic enteritis challenge[J]. *Poult Sci*, 2019, 98(9): 3450–3463.
- [11] UPADHAYA S D, SHANMUGAM S K, KANG D K, et al. Preliminary assessment on potentials of probiotic *B. subtilis* RX7 and *B. methylotrophicus* C14 strains as an immune modulator in *Salmonella*-challenged weaned pigs[J]. *Trop Anim Health Prod*, 2017, 49(5): 1065–1070.
- [12] 朱沛霖. 枯草芽孢杆菌对雪山鸡生产性能、肠道健康和免疫机能的影响及机制[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.
- ZHU P J. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* on growth performance, intestinal health and immune function response of Xueshan broiler[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2017.
- [13] 黄晓棠, 于宏伟, 郭润芳. 发酵食品工业中的生物安全性评价[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(4): 356–360, 367.
- HUANG X T, YU H W, GUO R F. Biosafety evaluation in the fermented food industry[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(4): 356–360, 367.
- [14] 许女, 李雅茹, 王超宇, 等. 传统发酵食品中乳酸菌的抗生素耐药性评估及耐药基因分析[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(7): 160–171.
- XU N, LI Y R, WANG C Y, et al. Antimicrobial resistance evaluation and resistant gene profiles of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(7): 160–171.
- [15] LAN G Q, LI C Q, HE L P, et al. Effects of different strains and fermentation method on nattokinase activity, biogenic amines, and sensory characteristics of natto[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 57(12): 4414–4423.
- [16] 王新南. 发酵豆制品中生物胺含量研究进展[J]. *中国调味品*, 2019, 44(9): 188–190.
- WANG X N. Research progress of biogenic amines in fermented soybean products[J]. *China Condiment*, 2019, 44(9): 188–190.
- [17] 王充, 易少凌. 高效液相色谱法测定大豆发酵制品中的生物胺[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(6): 2049–2055.
- WANG C, YI S L. Determination of biogenic amines in fermented product from soya beans by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2015, 6(6): 2049–2055.
- [18] YANG J, DING X W, QIN Y R, et al. Safety assessment of the biogenic amines in fermented soya beans and fermented bean curd[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(31): 7947–7954.

- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中生物胺的测定: GB5009.208—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. Determination of biogenic amines in food: GB5009.208—2016 [S]. Beijing: China Standard Press, 2016.
- [20] 龚发源. 饲用益生枯草芽孢杆菌的食品安全性评价研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
GONG F Y. Study on food safety assessment of probiotic *Bacillus subtilis* used in animal feed [J]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.
- [21] 冯婷婷, 方芳, 杨娟, 等. 食品生物制造过程中生物胺的形成与消除[J]. 食品科学, 2013, 34(19): 360–366.
FENG T T, FANG F, YANG J, et al. Formation and removal of biogenic amines in food bioprocessing[J]. Food Science, 2013, 34(19): 360–366.

Research on the Safety of Natto and Its Products

Wang Lulu^{1,2}, Li Bin³, Peng Xuefei¹, Chen Nannan³, Cao Mengsi¹, Liu Ming^{1*}, Guo Xinguang¹, Bie Xiaomei²

¹China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015

²College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

³Food Industry Productivity Promotion Center, Beijing 100015

Abstract This article took commercially available natto and its products as the research object, from which several strains with characteristics of *Bacillus* were isolated, and 13 strains of *Bacillus subtilis* were identified by colony morphology, physiology and biochemistry, and 16S rDNA sequence comparison. The paper diffusion method was used to detect the MIC values of 8 common anti-bacterial drugs against strains. According to the standards for drug resistance interpretation in the American Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), only SD-7 strains were sensitive to the selected antibacterial drugs, and other bacteria all showed varying degrees of resistance. Using liquid chromatography to detect the content of biogenic amines in commercially available natto and its products, 7 kinds of biogenic amine standards could be well separated, and the linearity of the standard curve was good ($R^2 > 0.9963$). In 20 kinds of samples, the total content of biogenic amine was between 2.21–200.91 mg/kg. This study found that commercially available natto and its products have potential metastatic disease-causing genes and the risk of metabolizing toxic products, which provided data support for the establishment of product safety evaluation methods.

Keywords natto and its products; *Bacillus subtilis*; drug resistance; biogenic amines